

การศึกษาหน้าที่ของยีน salt inducible kinase1 (*sik1*) ต่อการชักนำการตกไข่  
ในปลาม้าลาย (*Denio rerio*)

STUDY OF SALT INDUCIBLE KINASE 1 (*sik1*) GENE FUNCTION TO  
INDUCE OVULATION IN ZEBRAFISH (*Denio rerio*)



สุทธิรัตน์ ปัญญจันทร์  
SUTTHIRAT PANCHAKHAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2565

KMITL-2022-AG-M-081-352

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**STUDY OF SALT INDUCIBLE KINASE 1 (*sik1*) GENE FUNCTION  
TO INDUCE OVULATION IN ZEBRAFISH (*Denio rerio*)**



**SUTTHIRAT PANCHAKHAN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT**

**OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF**

**MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2022**

**KMITL-2022-AG-M-081-352**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2022**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาหน้าที่ของยีน salt inducible kinase1 ( <i>sik1</i> ) ต่อการชักนำการตกไข่ในปลาหม้าลาย ( <i>Denio rerio</i> )
นักศึกษา	นางสาวสุทธิรัตน์ ปัญจจันทร์
รหัสประจำตัว	61604022
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. วลัยลดา กลางนุรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. มณฑล แก่นมณี

### บทคัดย่อ

ยีน salt inducible kinase1 (*sik1*) เป็นยีนที่ถูกรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของไข่จากระยะ maturation เข้าสู่ระยะ ovulation ในปลาหม้าลาย โดยอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในช่วงของการเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้ทำการหยุดการทำงาน (knock-out) ของยีน *sik1* ด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 และสร้างตัวกลายพันธุ์แบบ homozygous mutant (*sik1<sup>-/-</sup>*) เพื่อศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน โดยเปรียบเทียบกับปลาหม้าลาย wild-type หลังจากนั้นกระตุ้นการพัฒนาของไข่ของปลาหม้าลายที่เป็น homozygous mutant และ wild-type ด้วย 17,20β-DHP เพื่อเป็นตัวแทนของรังไข่ระยะ maturation และ ovulation ตามลำดับ แล้วศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ และการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ได้แก่ยีน *casp3a* และ *XIAP* ผลการศึกษาพบว่ารังไข่ของปลาหม้าลาย *sik1<sup>-/-</sup>* มีร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และมีตัวอ่อนที่ผิดปกติสูงกว่าไข่ที่ได้รับจากปลาหม้าลาย wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และพบว่ารังไข่ในระยะ ovulation นั้น ไข่ในรังไข่ของปลาหม้าลาย *sik1<sup>-/-</sup>* นั้นมีการพัฒนาช้าเมื่อเทียบกับปลาหม้าลาย wild-type โดยหลังจากกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ไปแล้ว 2 ชั่วโมงไข่ยังคงอยู่ในระยะ oocyte maturation (IV) แต่ในรังไข่ของ wild-type ไข่ส่วนมากจะอยู่ในระยะที่ mature egg (V) อีกทั้งยังพบว่าไข่ระยะ mature egg (V) ของปลาหม้าลาย *sik1<sup>-/-</sup>* มีลักษณะที่ผิดปกติ โดยมีเซลล์ไข่เรียงติดกันแน่น เมื่อเปรียบเทียบกับไข่ในระยะเดียวกันที่พบในรังไข่ของปลาหม้าลาย wild-type และการแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* พบว่าในปลาหม้าลาย *sik1<sup>-/-</sup>* นั้นมีการแสดงออกของยีน *casp3a* ต่ำกว่าใน wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ในรังไข่ระยะ ovulation แต่การแสดงออกของยีน *XIAP* นั้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบกับปลาม้าลาย wild-type แสดงให้เห็นว่าปลาม้าลาย *sik1*<sup>-/-</sup> ยังคงเกิด apoptosis ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้เกิด ovulation ได้ แต่การเกิด apoptosis จะลดลง ส่งผลทำให้จำนวนของเซลล์ที่เกิด apoptosis ในรังไข่ช่วง ovulation น้อยตามไปด้วยเมื่อเทียบกับใน wild-type การศึกษาครั้งนี้จึงได้ข้อสรุปว่ายีน *sik1* ไม่ได้เป็นยีนหลัก (key gene) ที่ควบคุมการเกิด apoptosis ระหว่างการพัฒนาของไข่จากระยะ maturation จนเข้าสู่ระยะ ovulation โดยตรง เนื่องจากยังมีแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการ apoptosis เพียงแต่มีการแสดงออกที่ลดลงเท่านั้น ซึ่งส่งผลให้จำนวนของเซลล์ที่เกิด apoptosis นั้นลดลงตามไปด้วย ทั้งนี้การที่ยีน *sik1* ถูก knock out นั้นส่งผลทำให้ไข่ในรังไข่มีการพัฒนาช้า และคุณภาพของไข่ที่ได้รับจากปลาม้าลาย *sik1*<sup>-/-</sup> ลดลงเมื่อเทียบกับ wild-type จากการทดลองครั้งนี้จึงชี้ให้เห็นว่ายีน *sik1* มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของไข่ปลา เพื่อศึกษาบทบาทของการเกิด apoptosis ในระหว่างการพัฒนาของไข่ปลา ในอนาคตจะต้องมีการหยุดการทำงานของยีนอื่นร่วมด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Thesis</b>	Study of salt inducible kinase1 ( <i>sik1</i> ) gene function to induce ovulation in zebrafish ( <i>Denio rerio</i> )
<b>Student</b>	Miss Sutthirat Panchakhan
<b>Student ID.</b>	61604022
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Fisheries science
<b>Year</b>	2021
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. prof. Wanlada Klangnuruk, Ph.D
<b>Thesis Co-Advisor</b>	Assoc.prof. Monthon Ganmanee, Ph.D

## ABSTRACT

Salt inducible kinase1 (*sik1*) is one of candidate ovulation inducing gene, which function in apoptosis mechanism during germinal vesicle breakdown (GVBD). This study aimed to investigate function of *sik1* gene during ovulation in zebrafish ovary. The *sik1* gene was knock out by CRISPR/Cas9 technique for producing homozygous mutant. Phenotype analysis (fertilization rate, and abnormal larva rate) were observed in homozygous mutant of *sik1* (*sik1*<sup>-/-</sup>) compare with wild-type. Histology of ovary, and relate-apoptosis gene expression (*casp3a*, and *XIAP*) of homozygous mutant (*sik1*<sup>-/-</sup>) and wild-type were investigated after inducing by 17,20β-DHP *in vivo* for 1 and 2 hrs. for representing maturation, and ovulation groups, respectively. The result shows, that fertilization rate in *sik1*<sup>-/-</sup> is lower than wild-type significantly and abnormal larvae in *sik1*<sup>-/-</sup> higher significantly than wild-type. Ovulation of *sik1*<sup>-/-</sup> has oocytes late oocytes development most of oocyte in IV stage, while most of oocyte of wild-type develop to V stage. Characteristic of *sik1*<sup>-/-</sup> oocyte tissue is difference from wild-type at the same stage. The expression of *casp3a* in ovulation ovary is significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) in *sik1*<sup>-/-</sup> than wild-type, but *XIAP* expression is not significantly difference ( $p > 0.05$ ) It mean that apoptosis is occur in *sik1*<sup>-/-</sup> but number of apoptosis oocyte cells is significantly lower than wild-type ( $p \leq 0.05$ ).

This study shows that *sik1* gene is not a key gene, which control the apoptosis mechanism for induce-oocyte development from maturation stage to ovulation stage, because the gene responsible for inducing apoptosis are still expressed. However, *sik1*<sup>-/-</sup> zebrafish shows late oocyte development compared to wild-type. It was indicated that the *sik1* gene are involved in

ovulation. We suggest to co-knock-out of another candidate apoptosis genes which express in ovulation to understand ovulation inducing pathway.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. วัลย์ธดา กลางนุรักษ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร. มณฑล แก่นมณี ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ รศ.ดร. ปวีณา ทวีกิจการ และ รศ.ดร. รุ่งตะวัน ยมหล้า กรรมการสอบหัวข้อ โครงร่างวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ที่ให้คำแนะนำด้านการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ รวมทั้งคณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาเพื่อทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทาง Shizuoka university ที่ให้ความกรุณานำสัตว์ทดลองที่ผ่านการหยุดการ ทำงานของยีนเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ รวมถึงสารเคมีต่างๆ ที่ทาง Shizuoka university ได้ให้ความอนุเคราะห์แก่งานวิจัยนี้ และสำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

สุทธิรัตน์ ปัญจพันธ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
สารบัญตัวย่อ	XIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 สมมุติฐานของการศึกษา	3
1.4 ทฤษฎีหรือแนวคิดที่ใช้ในการวิจัย	3
1.5 ขอบเขตการวิจัย	4
1.6 ขั้นตอนการศึกษา	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ปลาหมี่ลาย (zebrafish)	5
2.2 การพัฒนาของไข่และตัวอ่อนของปลาหมี่ลาย	7
2.2.1 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเซลล์ไข่ภายในรังไข่ปลาหมี่ลาย	7
2.2.2 กลไกการพัฒนาของไข่ปลาหมี่ลาย	12
2.3 การควบคุมการ ovulation ด้วยยีน	14
2.4 Apoptosis	23
2.4.1 ลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis	23
2.4.2 กลไกการเกิด apoptosis (apoptosis mechanism)	26
2.4.3 บทบาทของ apoptosis ต่อการพัฒนาของไข่และตัวอ่อน	28
2.5 ยีน salt inducible kinase 1 ( <i>sik1</i> )	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	30
3.1 สัตว์ทดลองและวิธีการเลี้ยงดู	30
3.2 แผนการเพิ่มจำนวนปลาหมึกลายก่ายพันธุ์แบบโฮโมไซกัส ( <i>sik1<sup>-/-</sup></i> ; <i>sik1</i> homozygous mutant )	31
3.3 ตรวจสอบ homozygous mutant ด้วยวิธี heteroduplex mobility assays (HMA)	32
3.4 ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์	35
3.4.1 ร้อยละของไข่ผสมติด	36
3.4.2 ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม	36
3.4.3 ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ	37
3.5 ศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่	37
3.6 gene expression	38
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง	40
4.1 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสาย DNA	40
4.2 การแสดงออกทางฟีโนไทป์และลักษณะทางพยาธิสภาพ	41
4.3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis	46
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง	48
5.1 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสาย DNA	48
5.2 การแสดงออกทางฟีโนไทป์และลักษณะทางพยาธิสภาพ	48
5.3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ apoptosis	50
บทที่ 6 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	54
ประวัติผู้เขียน	60

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไข่ปลาหม้าลาย	8
2.2	ระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ปลาหม้าลายในช่วง early development	21
3.1	Primer ที่ใช้สำหรับทำ HMA และ sequencing	35
3.2	Primer ที่ใช้สำหรับทำ real-time PCR	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปลาหมึกหลายสายพันธุ์ AB ตัวเต็มวัย (A) ปลาหมึกหลายตัวผู้ (B) ปลาหมึกหลายตัวเมีย	5
2.2 จำนวนเอกสารทางวิชาการที่มีการเผยแพร่ใน Web of Science ที่มีการใช้ปลาหมึกหลายเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในช่วง 30 ปี จากปี 1970 จนถึง 2016	6
2.3 ลักษณะของปลาหมึกหลายสายพันธุ์ roy orbison	7
2.4 ลักษณะรังไข่ของปลาหมึกหลาย (a) oogonium (b) pre-vitellogenic (c) vitellogenic follicle (d) pre-ovulatory follicle (e) ovary	7
2.5 เซลล์ไข่ในระยะ IB primary growth ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ประกอบด้วย (o) oocyte และ (gv) germinal vesicle	9
2.6 เซลล์ไข่ในระยะ cortical alveolus ย้อมด้วยสี H&E ที่กำลังขยาย 100X โดย Om-mature oocyte, Coc- C=cortical alveoli, O- cytoplasm, N- nucleus, No- nucleoli, Ca- cortical alveoli, Ve-vitellin envelope, Fe- follicular epithelium	9
2.7 oocyte ในระยะ vitellogenesis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light micrograph ย้อมด้วยสี H&E ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดย Om-mature oocyte, Ca- cortical alveoli และ N- nucleus	10
2.8 photomicrographs ของ oocyte ในระยะ pre-maturational (A,C) และ post-maturational (B,D) โดยกระตุ้นด้วย $17\alpha$ - $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) บริเวณลูกศรชี้ในภาพ C แสดงถึง germinal vesicle	10
2.9 electron micrograph ของ mature oocyte ที่ย้อมด้วยสี toluidine blue โดย Po- primer oocyte, Om- mature oocyte, ve- vitellin envelope, ZR- zona radiata และ Ca- cortical alveoli	11
2.10 รังไข่ของปลาหมึกหลายเพศเมีย ในช่วงก่อนการปล่อยไข่ ที่ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin	11
2.11 กราฟแสดงการชักนำการพัฒนาของไข่ด้วย $17,20\beta$ -DHP ที่เวลา 0, 1.5, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง โดยแท่งสีดำแสดงถึง %GVBD และแท่งสีขาวแสดงถึง %ovulation	12
2.12 การทำงานของ maturation inducing hormone (MIH) หรือสเตอรอยด์ ที่เข้าจับกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และชักนำให้สร้าง cyclin-B ผ่านทาง non-genomic pathway เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จากนั้น MIH จะเข้าจับกับ nuclear progesterin receptor ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส เพื่อชักนำให้ไข่พัฒนาสู่ระยะ ovulation
- 2.13 ลักษณะของไข่ปลาม้าลายในแต่ละระยะ (A) ไข่ปลาม้าลายในระยะ immature 13  
(B) ไข่ปลาม้าลายในระยะ maturation และ (C) ไข่ปลาม้าลายในระยะ ovulation บริเวณลูกศรชี้แสดง fertilization membrane
- 2.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลาม้าลายที่ถูก knock out npr ( $npr^{-/-}$ ) และ ปลาม้า 15  
ลายที่เป็น wild type ( $npr^{+/+}$ ) (A) แสดงถึงขนาดตัวของปลาม้าลาย (B) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่ (C) ลักษณะของไข่ที่สังเกตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ (D) ลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ในปลาม้าลายที่ถูก knock out npr ( $npr^{-/-}$ ) และ ปลาม้าลายที่เป็น wild type ( $npr^{+/+}$ ) โดยบริเวณที่ลูกศรชี้ บอถึง การมีอยู่ของเยื่อหุ้ม follicle
- 2.15 การชักนำการพัฒนาของไข่ด้วย LH-induced ovulation ผ่าน prostaglandin 16  
system
- 2.16 ลักษณะของไข่ปลาม้าลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *stm* (A ไข่) เซลล์ไข่ที่ 17  
ได้รับการปฏิสนธิ (A ไข่) เซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (B ไข่) ตัวอ่อนที่มีการพัฒนาปกติ (B ไข่) ตัวอ่อนที่ผิดปกติ
- 2.17 อัตรารอดของตัวอ่อนในกลุ่มตัวอย่าง wild-type และ  $stm^{-/-}$  โดย n = จำนวนตัว 18  
อ่อน N = จำนวน biological replication
- 2.18 ภาพถ่าย otolith ของปลาม้าลาย wild-type และ  $stm^{-/-}$  ตัวเต็มวัย scale bar = 100 18  
 $\mu\text{m}$
- 2.19 (A) ภาพถ่ายปลาม้าลายเพศเมียที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *stm* อย่างสมบูรณ์ 19  
( $stm^{-/-}$ ) (B) Immunohistology ของรังไข่ปลาม้าลาย wild-type และ  $stm^{-/-}$  ใน immature oocyte และ ovulated oocyte ที่ย้อมด้วย anti-Stm antibody และ DAPI ลูกศรสีขาว ชี้ให้เห็นถึงสัญญาณของ anti-Stm staining โดย scale bar = 50  $\mu\text{m}$
- 2.20 ภาพถ่ายด้านนอกและด้านในของ follicle envelope จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 20  
แบบส่องกราดของปลาม้าลาย wild-type และ  $stm^{-/-}$  บริเวณลูกศรชี้คือ fibre-supported knob-like structures โดย scale bar ในรูป A, B, E, และ F = 2  $\mu\text{m}$  ส่วนรูป C, D, G, และ H = 10  $\mu\text{m}$
- 2.21 วงจรชีวิตของปลาม้าลาย 22
- 2.22 (a) ความดกไข่ (b) อัตราการผสมติด (c) อัตราการฟัก และ (d) จำนวนของตัวอ่อน 23  
ที่ผิดปกติ ของปลาม้าลายที่มีการปล่อยไข่ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึง 5 โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.23	เนื้อเยื่อบริเวณตับอ่อนในหนูที่ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin แสดงลักษณะของการจับตัวกับเป็นก้อนของโครมาติน (สีม่วงเข้ม) บริเวณที่ถูกครีส์ดำชี้คือ Apoptosis cell	24
2.24	การเกิด Apoptosis ระหว่างการฟ่อของ follicle ในปลา <i>Leporinus obtusidens</i> (a, b) การย้อมด้วยสี hematoxylin (a) บริเวณลูกครีส์แสดงถึง TUNEL-Positive follicular cell ในระยะก่อนการฟ่อของ follicle (early stage) (b)บริเวณลูกครีส์แสดงถึง TUNEL-Positive follicular cell ในระยะหลังการฟ่อของ follicle (late stage) และ (c) immunoreaction ของ caspase-3 ในระยะหลังการฟ่อของ follicle	25
2.25	ผล TUNEL ที่แสดงเป็น positive ในรังไข่ของปลา <i>P. argenteus</i> โดยมี scale bar = 20 $\mu$ m	26
2.26	แผนภาพแสดงการเกิด Apoptosis แบบ Extrinsic Pathway และ Intrinsic pathway	27
3.1	การสร้างปลาม้าลายกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 และการผสมพันธุ์ปลาม้าลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีนเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทำงานโดย Shizuoka University ก่อนจะมีการส่งมายังประเทศไทย	30
3.2	การผสมพันธุ์ปลาม้าลายเพื่อขยายพันธุ์และเก็บตัวอย่างไข่เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง	31
3.3	แผนภาพการผสมพันธุ์ปลาเพื่อให้ได้ homozygous mutant โดยทำการตรวจหาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอเบื้องต้น (ตรวจหา strain) ด้วยวิธี heteroduplex mobility assay (HMA) ตั้งแต่ลูกรุ่น F1	32
3.4	ตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้ขนาด 185 bp (บริเวณสีเหลือง) และขนาด 641 bp (บริเวณสีเทา) บริเวณสีดำ คือบริเวณเป้าหมายของการตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9	34
3.5	แผนผังการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์	36
4.1	15% non- denaturing gel จาก heteroduplex mobility assay โดย M คือ HyperLadderTM 100bp, ตัวอย่างที่ 1-4 คือ ปลาที่มีกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส ( <i>sik1</i> <sup>(+/-)</sup> ) และตัวอย่างที่ 5-7 คือ ปลาที่เป็นไวลด์ไทป์	40
4.2	ลักษณะทางจีโนไทป์ของปลาม้าลายหลังจากยีน <i>sik1</i> ถูก knockout (บริเวณไฮไลต์แสดงถึงตำแหน่งเป้าหมายที่ Cas9 เข้าไปตัด เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสายดีเอ็นเอ)	41
4.3	(A) ลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ร้อยละจำนวนไข่ปลาที่มีการพัฒนาได้อย่างปกติ (normal) ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized) และ ร้อยละของตัว	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อ่อนที่ผิดปกติ (abnormal) จากปลาม้าลายเพศเมีย wild-type ผสมกับตัวผู้ wild-type (กราฟแท่งสีเหลือง ; n = 725) และ ปลาม้าลายเพศเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* ผสมกับตัวผู้ wild-type (กราฟแท่งสีฟ้า ; n = 1082) โดยเครื่องหมายดอกจันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (B) ลักษณะผิดปกติของตัวอ่อนที่พบได้จากปลาม้าลายเพศเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* ผสมกับตัวผู้ wild-type
- 4.4 ร้อยละของจำนวนเซลล์ไข่แต่ละระยะในกลุ่มตัวอย่างที่กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ไข่ด้วย 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อเป็นตัวอย่างของกลุ่ม maturation (A) และ 2 ชั่วโมงเพื่อเป็นตัวอย่างของกลุ่ม ovulation (B) โดยแท่งสีขาวแสดงถึงร้อยละของจำนวนเซลล์ไข่ของปลาม้าลาย wild-type และแท่งสีดำแสดงถึงจำนวนเซลล์ไข่ของปลาม้าลาย *sik1<sup>-/-</sup>* ส่วนเครื่องหมายดอกจันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) 44
- 4.5 ลักษณะทางสภาพริสตาของรังไข่ปลาม้าลายหลังจากกระตุ้นด้วย 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้รังไข่ของปลาม้าลายมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation โดย (A) เป็นตัวอย่างของรังไข่ปลาม้าลาย wild-type ส่วน (B) เป็นตัวอย่างของปลาม้าลาย *sik1<sup>-/-</sup>* (homozygous mutant) ขนาดของ scale bar = 100 ไมโครเมตร 45
- 4.6 การแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* ในรังไข่ระยะ maturation และ ovulation จากปลาม้าลายเพศเมีย wild-type (กราฟแท่งสีน้ำเงิน) และปลาม้าลายเพศเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* (กราฟแท่งสีส้ม) โดยเครื่องหมายดอกจันบอถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) 46
- 4.7 (A) ร้อยละของเซลล์ที่เกิด apoptosis ในรังไข่ระยะ ovulation สีส้มแสดงถึงร้อยละของไข่ที่มีการเกิด apoptosis และสีน้ำเงินแสดงถึงร้อยละของไข่ที่ไม่มีการเกิด apoptosis (B) บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis บริเวณไข่ของปลาม้าลาย 47

## สารบัญย่อ

อักษรย่อ	ชื่อเต็ม
17,20 $\beta$ -DHP	17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one
<i>adamts15a</i>	ADAM metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 15
AIF	apoptosis inducing factor
AMPK	adenosine monophosphate-activated kinase
apaf-1	Apoptotic protease activating factor
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BID	BH3 interacting-domain death agonist
<i>Bmal1</i>	brain and muscle ARNT-like protein
bp	Base pair
CAD	caspase-3 activated fuse
cAMP-PKA pathway	The cyclic AMP-dependent protein kinase pathway
<i>cas3a</i>	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase a
<i>casps-3</i>	Calcyphosine-3
cdk	Cyclin-dependent kinase
<i>clock</i>	circadian locomotor output cycles kaput
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9
CRTC1	CREB-regulate transcription coactivator 1
<i>cry</i>	Cryptochrome gene
<i>ctrb1</i>	chymotrypsinogen B1
<i>ctsb</i>	cathepsinB
DSB	DNA double stand break
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	elongation factor 1-alpha 1
ER	endoplasmic reticulum
ERS	endoplasmic reticulum stress
FADD	fas-associates death domain
G6PT	glucose-6-phosphate transportation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GVBD	germinal vesical breakdown
hCG	Human chorionic gonadotropin
HDR	homology-directed repair
HMA	Heteroduplex mobility assay
LH	Luteinizing Hormone
LKB1	Liver kinase1
MIH	maturation inducing hormone
mPR	membrane-brond progesterin receptor
MPT	mitochondrial permeability transition
NHEJ	non-homologous end joining
nPR	nuclear progesterin receptor
p53	Cellular tumor antigen p53
<i>pax2a</i>	Paired box gene 2
PCR	polymerase chain reaction
<i>per</i>	Period gene
<i>prss59.1</i>	protease, serine, 59, tandem duplicate 1
<i>Ptger4b</i>	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) b
<i>Ptgs2a</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
<i>rbm47</i>	RNA Binding Motif Protein 47
<i>rf2</i>	Ring Finger Protein 2
SCN	suprachiasmatic nucleus
<i>sik1</i>	salt inducible kinase1 gene
<i>sik<sup>-/-</sup></i>	homozygous mutant of salt inducible kinase1
<i>slc37a4a</i>	solute carrier family 37member 4
Smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspase/ Diablo
	homolog
<i>stm</i>	Starmarker gene
tBID	Truncated form of BH3 interacting-domain death agonist
<i>XIAP</i>	X-link inhibitor of apoptosis
<i>zgc:65811</i>	Zebrafish Gene No. 65811
<i>zgc:92184</i>	Zebrafish Gene No. 92184

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาหม้อลาย (*Derio rerio*) ถูกจัดเป็นหนึ่งในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ที่การนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์ เช่น พิษวิทยา พฤติกรรมของสัตว์ การวิวัฒนาการ และระบบสืบพันธุ์ รวมถึงพันธุศาสตร์ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยมีการใช้ปลาหม้อลายเป็นสัตว์ทดลองเพื่อพิสูจน์และระบุหน้าที่ของยีนในมนุษย์ เนื่องจากมีการเปรียบเทียบจีโนม (genome) ของมนุษย์และปลาหม้อลายพบว่ามีของลำดับเบสที่คล้ายคลึงกัน (orthologue) อย่างน้อยร้อยละ 70 โดยการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์นั้นมีการรายงานถึงการลดระดับการทำงานของยีน (gene knock-down) การหยุดการทำงานของยีน (gene knockout) และเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน (overexpression) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับฟีโนไทป์

ในการศึกษาที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ปลาหม้อลายถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย และเป็นที่ยอมรับ ปลาหม้อลายเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย อีกทั้งยังมีความคงทน สามารถติดตามการพัฒนาของตัวอ่อนได้ทุกระยะเนื่องจากตัวอ่อนของปลาหม้อลายมีความโปร่งใส และมีการพัฒนาการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ไว โดยทั่วไปแล้วปลาหม้อลายทั้งเพศผู้และเพศเมียจะสมบูรณ์เพศเมื่ออายุประมาณ 2.5 ถึง 3 เดือน ซึ่งข้อดีเหล่านี้ทำให้ปลาหม้อลายเป็นที่นิยมเพื่อใช้เป็นสัตว์ทดลอง ทั้งนี้ยังสามารถวางไข่ได้เป็นจำนวนมากในแต่ละรอบของการสืบพันธุ์ โดยมีการแบ่งระยะไข่ของปลาหม้อลายโดยแบ่งจากการสังเกตภายนอก ออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะไข่ไม่สุก (immature) ระยะไข่สุก (maturation) และระยะตกไข่ (ovulation) ซึ่งกระบวนการการพัฒนาของเซลล์ไข่จะมีการควบคุมด้วยยีน ซึ่งเป็นตัวตั้งต้นในการแปลรหัส (translation) ให้เป็นโปรตีน โดยตามการศึกษาของ Tokumoto et al. (2011) ได้รายงานถึง pathway ของการพัฒนาเซลล์ไข่จากระยะ immature ไปจนถึงระยะ ovulation ว่าเกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 pathway คือ non-genomic pathway และ genomic pathway โดยเริ่มจาก non-genomic pathway คือการที่สารจำพวกสเตอรอยด์ หรือฮอร์โมนเข้าจับกับตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound progesterin receptor ; mPR) เหนี่ยวนำให้สร้าง maturation inducing hormone (MIH) ชักนำให้เกิด cyclin-B ที่เป็นตัวกลางที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ แล้วทำให้ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation จากนั้น genomic pathway จะทำงานต่อเพื่อทำให้เซลล์ไข่พัฒนาสู่ระยะ ovulation โดย maturation inducing hormone จะเข้าจับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear progesterin receptor ; nPR) ทำให้เกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) หรือการแตกออกของเยื่อหุ้มนิวเคลียสขึ้น ส่งผลให้โครมาตินมีการกระจายตัวออกไป โดยมีการรายงานถึงรายชื่อของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ ovulation โดยใช้ 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 $\beta$ -DHP) กระตุ้นให้เซลล์ไข่มีการพัฒนาผ่านทาง non-genomic pathway ได้แก่ ยีน Solute Carrier Family 37 Member 4 (*slc37a4a*) , *zgc:65811*, *zgc:92184*, chymotrypsinogen B1 (*ctrb1*), protease serine 59 tandem duplicate 1 (*prss59.1*), cathepsinB (*ctsb*), salt inducible kinase1 (*sik1*) starmarker (*stm*), ADAM metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 15 (*adamts15a*), Paired box gene 2 (*pax2a*), RNA Binding Motif Protein 47 (*rbm47*) และ Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*ptgs2a*) (Klangnurak et al., 2018; Klangnurak and Tokumoto, 2017) ซึ่งมีการสันนิษฐานว่าการเกิด GVBD นั้นอาจมีกระบวนการ apoptosis เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เนื่องจากมีการรายงานถึง ยีนที่หน้าหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในเซลล์สัตว์ ซึ่งได้แก่ยีน *slc37a4a*, *sik1*, *zgc:65811* และ *zgc:92184*

ยีน *sik1* จัดอยู่กลุ่มของ adenosine monophosphate (AMPK) -relative serine/threonine kinase โดยถูกกระตุ้นให้ทำงานผ่านกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ของ liver kinase1 (LKB1) ทั้งนี้มีการรายงานถึงหน้าที่ของยีน *sik1* ที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุม circadian clock หรือการควบคุมการทำงานระบบต่างๆ ของร่างกาย เช่น การควบคุมอุณหภูมิร่างกาย การหลั่งฮอร์โมน รวมถึงการหลับและการตื่น อีกทั้งยีน *sik1* ยังมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลูโคส รวมถึงการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด และเป็นตัวตั้งต้นในการควบคุม p53-mediated anikis ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของการเกิด apoptosis

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน *sik1* เนื่องจากมีการสันนิษฐานว่าระหว่างที่ไข่มีการพัฒนาจากระยะ maturation สู่วัย ovulation นั้นจะมีการเกิด apoptosis ขึ้น เนื่องจากมีการรายงานถึงรายชื่อของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเกิด apoptosis ถึง 4 ยีน โดยยีน *sik1* คือหนึ่งในยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเกิด apoptosis ดังนั้นเพื่อทำความเข้าใจถึงการเกิด apoptosis ในระหว่างพัฒนาของเซลล์ไข่เข้าสู่ระยะ ovulation ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ ลักษณะทางพยาธิสภาพของเซลล์ไข่ และการแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในปลาม้าลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *sik1* อย่างสมบูรณ์ (*sik1*<sup>-/-</sup>; *sik1* homozygous mutant)

### 1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

ในการศึกษานี้มีการตั้งสมมุติฐานการทดลองว่าปลาหมึกหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *sik1* อย่างสมบูรณ์ จะทำให้ปลาหมึกหลายเพศเมียมีการพัฒนาไข่หรือตัวอ่อนที่ผิดปกติ เนื่องจากมีการรบกวนการเกิด apoptosis ที่ถูกควบคุมโดยยีน *sik1* ในระหว่างการเกิด GVBD ซึ่งจะส่งผลทำให้ลักษณะทางฟีโนไทป์ เช่น การพัฒนาของไข่ในรังไข่ ความสามารถในการพัฒนาตัวอ่อน หรือการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเกิด apoptosis เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับปลาหมึกหลายไวรัสดีไทป์ (wild-type) เนื่องจากยีน *sik1* มีการรายงานว่าเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis

### 1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การพัฒนาของไข่ปลาหมึกหลายจากระยะ immature ไปจนถึงระยะ ovulation เกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 pathway คือ non-genomic pathway และ genomic pathway โดยการทำงานที่สารจำพวกสเตอรอยด์ หรือฮอร์โมนเข้าจับกับตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound progesterin receptor ; mPR) เหนี่ยวนำให้สร้าง maturation inducing hormone (MIH) ซึ่งนำไปให้เกิด cyclin-B ที่เป็นตัวกลางที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ แล้วทำให้ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation จากนั้น genomic pathway จะทำงานต่อ เพื่อทำให้เซลล์ไข่พัฒนาสู่ระยะ ovulation โดย maturation inducing hormone จะเข้าจับกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear progesterin receptor ; nPR) ทำให้เกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) ขึ้นส่งผลทำให้ลักษณะของไข่ใสขึ้นเนื่องจากการแตกออกของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ทำให้โครมาตินมีการกระจายตัวออกไป ซึ่งการพัฒนาของไข่ในระยะนี้มีการสันนิษฐานว่าอาจมีการตายของเซลล์แบบ apoptosis เข้ามาเกี่ยวข้องในการทำให้เกิด GVBD ซึ่งการพัฒนาของไข่จากระยะ maturation และ ovulation ถือว่าเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นค่อนข้างซ้อนทับกัน ทั้งนี้ตามการศึกษาของ Klangnarak et al. (2018) และ Klangnarak and Tokumoto (2017) ได้รายงานถึงรายชื่อของยีนที่มีการแสดงออกในช่วงที่ไข่พัฒนาจากระยะ maturation เพื่อเข้าสู่ระยะ ovulation ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกในช่วง ovulation เท่านั้น ซึ่งยีน *sik1* เป็นหนึ่งในยีนที่มีการกล่าวถึงในการศึกษาข้างต้น โดยยีน *sik1* จัดอยู่ในกลุ่มของ adenosine monophosphate (AMPK) - relative serine/threonine kinase โดยมีความเกี่ยวข้องกับยีน *p53* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเกิด anoikis (รูปแบบหนึ่งของการเกิด apoptosis) (Cheng et al., 2009) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้หยุดการทำงานของยีน *sik1* โดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตัดแปลงรหัสพันธุกรรมสมัยใหม่ที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อทำการตรวจสอบหน้าที่ที่แน่ชัดของยีน *sik1* ต่อการพัฒนาของไข่ในปลาหมึกหลายโดยเปรียบเทียบกับปลาหมึกหลาย wild-type

## 1.5 ขอบเขตการวิจัย

ตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ของปลาหมึกหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *sik1* อย่างสมบูรณ์ด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 ได้แก่ ลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ ร้อยละไข่ผสมติด ร้อยละไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน รวมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ได้แก่ ยีน *casp3a* และ *XIAP* โดยเปรียบเทียบกับปลาหมึกหลาย wild-type

## 1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

การศึกษาหน้าที่ของยีน *sik1* ต่อการพัฒนาของไข่ในปลาหมึกหลายจะใช้ปลาหมึกหลายเพศเมียที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *sik1* อย่างสมบูรณ์ (*sik1*<sup>-/-</sup>) ด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 และปลาหมึกหลาย wild-type มาเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการมีการควบคุมแสง และอุณหภูมิน้ำ ตามวิธีมาตรฐานของการเลี้ยงปลาหมึกหลายเพื่อใช้เป็นสัตว์ทดลอง โดยจะทำการตรวจสอบตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของปลาหมึกหลายด้วยวิธี heteroduplex mobility assay (HMA) และ sequencing เพื่อระบุการเป็น homozygous mutant และ wild-type จากนั้นจะทำการผสมพันธุ์ระหว่าง *sik1*<sup>-/-</sup> เพศเมียและ wild-type เพศผู้ (*sik1*<sup>-/-</sup> x wild-type) เพื่อศึกษาร้อยละไข่ผสมติด ร้อยละไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ โดยเปรียบเทียบกับ ปลาหมึกหลายเพศเมีย wild-type ที่ผสมกับเพศผู้ wild-type (wild-type x wild-type) รวมทั้งตรวจสอบการพัฒนาของไข่ภายในรังไข่ของปลาหมึกหลาย *sik1*<sup>-/-</sup> และ wild-type โดยใช้เทคนิคทางพยาธิสภาพ (histological analysis) เพื่อตรวจสอบการเกิด apoptosis และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis โดยใช้ real-time PCR

## บทที่ 2

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ปลาหม้อลาย (Zebrafish)

ปลาหม้อลาย (*Denio rerio*) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลาตะเพียน (Cyprinoid) มีการแพร่กระจายในเขตร้อนแถบทวีปเอเชียตอนใต้ ได้แก่ ประเทศอินเดีย บังกลาเทศ และปากีสถาน มีต้นกำเนิดจากแม่น้ำในประเทศอินเดีย ปกติแล้วปลาหม้อลายนิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม รูปร่างของปลาหม้อลายมีลักษณะยาวเรียว และมีแถบยาวสีน้ำเงินยาวตั้งแต่หัวจรดหาง ปลาชนิดนี้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มีการปฏิสนธิภายนอก (external fertilization) รังไข่ของปลาหม้อลายมีการพัฒนาแบบแบบ asynchronous หรือไข่สุกไม่พร้อมกันทั้งฝัก จึงสามารถพบไข่ในรังไข่ได้ทุกระยะ (Lawrence, 2007) โดยตัวเมียจะมีลักษณะของท้องที่โตกว่าตัวผู้ (รูปที่ 2.1)

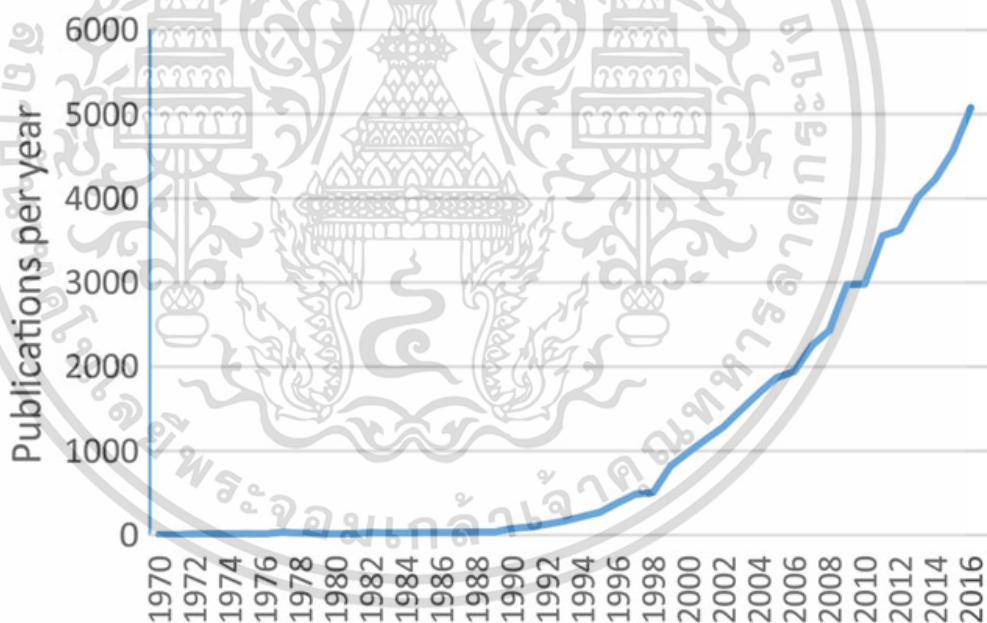


รูปที่ 2.1 ปลาหม้อลายสายพันธุ์ AB ตัวเต็มวัย (A) ปลาหม้อลายตัวผู้ (B) ปลาหม้อลายตัวเมีย

ที่มา : ดัดแปลงจาก Meyers (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาหมึกลายนิยมนำมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบ (model organism) ในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ เช่น พฤติกรรมของสัตว์ เกษษวิทยา พืชวิทยา รวมถึงการทำงานและการพัฒนาของระบบต่างๆ ของร่างกาย ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในปี 1998 (Meyers, 2018) (รูปที่ 2.2) เนื่องจากเป็นปลาที่ดูแลง่าย วงจรชีวิตสั้น และสามารถเจริญเติบโตได้เร็วจึงทำให้สามารถศึกษาการพัฒนาของปลาชนิดนี้ได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตตั้งแต่อยู่ในไข่ เนื่องจากลักษณะของไข่ปลาหมึกลายมีความโปร่งใสจึงสามารถศึกษา และติดตามการพัฒนาได้ง่าย ทั้งนี้ปลาหมึกลายยังสามารถออกไข่ได้จำนวนมาก จึงมีการศึกษาที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์โดยใช้ปลาหมึกลายเป็นสัตว์ทดลองจำนวนมาก (Eimon and Ashkenazi, 2010; Klangnarak et al., 2018; Klangnarak and Tokumoto, 2017; Li and Ge, 2020; Tang et al., 2017a; Tang et al., 2017b; Tang et al., 2016; Tokumoto et al., 2004a; Tokumoto et al., 2004b; Tokumoto et al., 2005; Tokumoto et al., 2011) ทั้งนี้ในการศึกษาที่มีความเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์จะนิยมใช้สายพันธุ์ Roy Orbison ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ท้องมีความโปร่งใส (รูปที่ 2.3) ทำให้เห็นระยะพัฒนาของไข่ในท้องปลาตัวเมียได้ค่อนข้างชัดเจน



รูปที่ 2.2 จำนวนเอกสารทางวิชาการที่เผยแพร่ใน Web of Science ที่มีการใช้ปลาหมึกลายเป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในช่วง 30 ปี จากปี 1970 จนถึง 2016

ที่มา : Meyers (2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

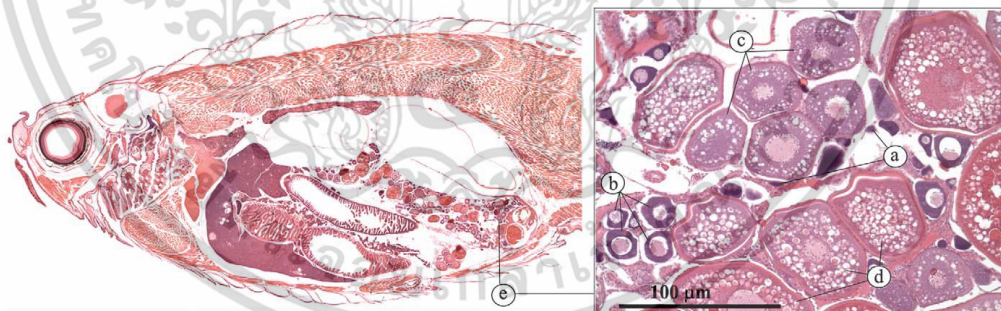


รูปที่ 2.3 ลักษณะของปลาหม้อลายสายพันธุ์ roy orbison  
ที่มา : ดัดแปลงจาก Stoletov and Klemke (2008)

## 2.2 การพัฒนาไข่และตัวอ่อนของปลาหม้อลาย

### 2.2.1 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเซลล์ไข่ภายในรังไข่ปลาหม้อลาย

ปลาหม้อลายมีลักษณะของรังไข่เป็นแบบ asynchronous เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธีทางพยาธิสภาพจะสามารถพบทุกได้ทุกระยะของการพัฒนา (stage) เป็นปกติ (Menke et al., 2011) (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 ลักษณะรังไข่ของปลาหม้อลาย (a) oogonium (b) pre-vitellogenic (c) vitellogenic follicle (d) pre-ovulatory follicle (e) ovary

ที่มา : Menke et al. (2011)

ตามการศึกษาของ Selman (1993) และ Aytekin and Yüce (2008) ได้แบ่งระยะการพัฒนาของไข่ปลาหม้อลายออกเป็น 5 ระยะ ได้แก่ primary growth stage, cortical alveolus stage,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

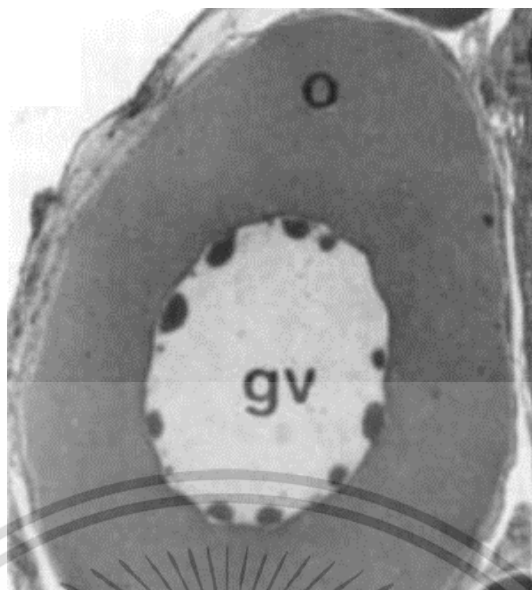
vitellogenesis stage, oocyte maturation stage และ mature egg ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางกายภาพ และกระบวนการชีวิตเคมี ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ไข่ปลาหม้าลาย

ระยะ	เส้นผ่าศูนย์กลาง	รายละเอียด
I primary growth	7-140 $\mu\text{m}$	Oocyte มีการจับตัวกันเป็นกลุ่ม มี nuclei ใน nucleus (germinal vesicle) จำนวนมาก (รูปที่ 2.5)
II cortical alveolus	0.14-0.34 mm	Oocyte และ nucleus มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับระยะ primary growth มีการสะสมของ cortical alveoli หรือ yolk vesicles เพิ่มขึ้น ความหนาของ follicle เพิ่มขึ้น และเซลล์ไข่เริ่มทึบแสง ในระยะนี้ nuclei จะถูกผลักออกจากเยื่อหุ้มนิวเคลียส และสามารถสังเกตเห็นเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (vitelline envelope) 2 ชั้น เนื่องจากชั้น zona radiata มีการพัฒนา จึงทำให้มีความหนาเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.6)
III vitellogenesis	0.34-0.69 mm	ขนาดของ oocyte ใหญ่ขึ้น nucleus ไม่เป็นรูปร่าง มีการสร้าง vitelline ภายใน oocyte สามารถสังเกตเห็น cortical vesicle ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกลมกระจายอยู่รอบ cytoplasm (รูปที่ 2.7) และมีจำนวนของ yolk vesicle เพิ่มขึ้น
IV oocyte maturation	0.69-0.73 mm	การแบ่งเซลล์แบบ meiosis เริ่มขึ้นใน oocyte ระยะนี้เกิดการสลายของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (germinal vesicle breakdown) ทำให้ follicle มีความโปร่งใส (รูปที่ 2.8)
V mature egg	0.73-0.75 mm	Oocyte ในระยะนี้จะไม่สามารถสังเกตเห็น nucleus ได้ มีการสร้าง vitelline membrane ขึ้นในบริเวณด้านในของ vitelline envelope และเริ่มมีการสลายตัวโดยทำให้เกิดช่องว่างขึ้นระหว่างชั้นด้านในกับด้านนอก (รูปที่ 2.9)

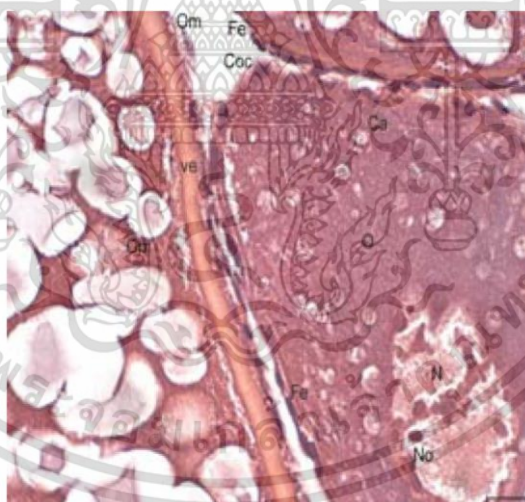
ที่มา : Selman (1993) และ Aytakin and Yüce (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 เซลล์ไข่ในระยะ IB primary growth ภายใต้วัดกล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ประกอบด้วย (o) oocyte และ (gv) germinal vesicle

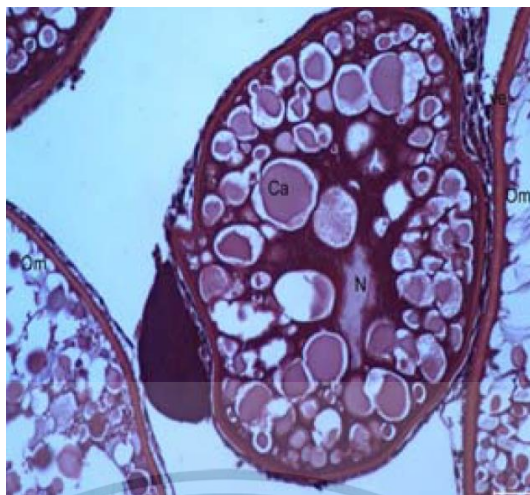
ที่มา : Selman (1993)



รูปที่ 2.6 เซลล์ไข่ในระยะ cortical alveolus ย้อมด้วยสี H&E ที่กำลังขยาย 100X โดย Om-mature oocyte, Coc- C=cortical alveoli, O- cytoplasm, N- nucleus, No- nucleoli, Ca- cortical alveoli, Ve-vitellin envelope, Fe- follicular epithelium

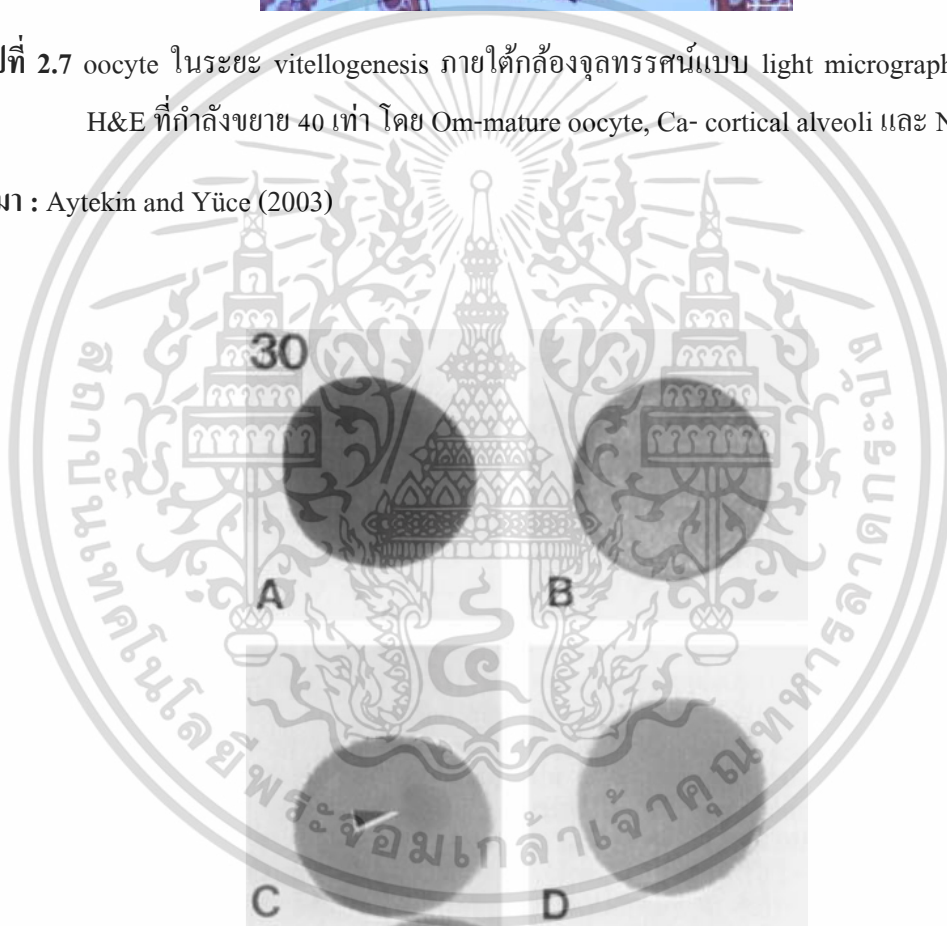
ที่มา : Aytekin and Yüce (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 oocyte ในระยะ vitellogenesis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light micrograph ย้อมด้วยสี H&E ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดย Om-mature oocyte, Ca- cortical alveoli และ N- nucleus

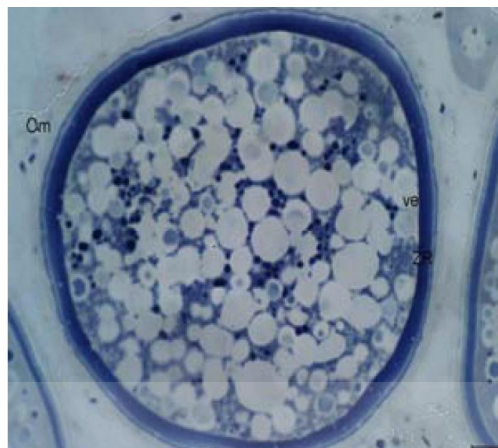
ที่มา : Aytekin and Yüce (2003)



รูปที่ 2.8 photomicrographs ของ oocyte ในระยะ pre-maturational (A,C) และ post-maturational (B,D) โดยกระตุ้นด้วย  $17\alpha$ - $20\beta$ -dyhydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) บริเวณลูกศรชี้ใน ภาพ C แสดงถึง germinal vesicle

ที่มา : Selman (1993)

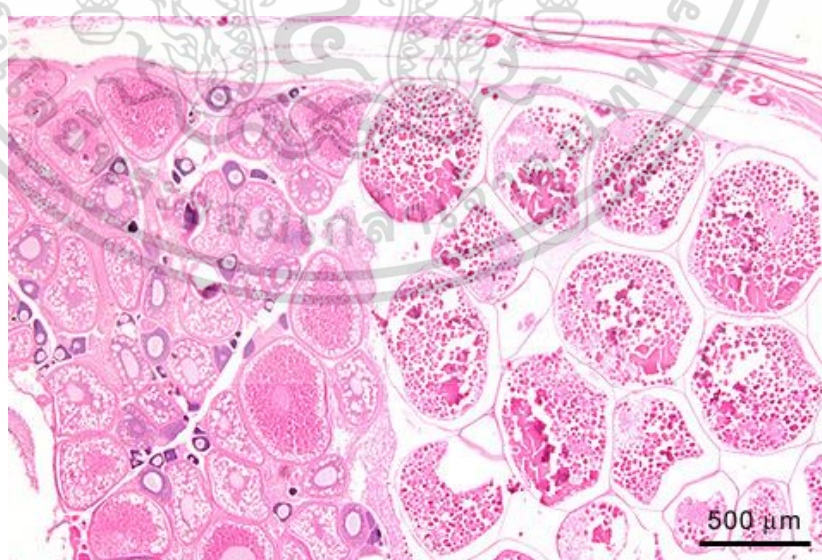
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 electron micrograph ของ mature oocyte ที่ย้อมด้วยสี toluidine blue โดย Po- primer oocyte, Om- mature oocyte, ve-vitellin envelope, ZR- zona radiata และ Ca- cortical alveoli

ที่มา : Aytekin and Yüce (2003)

ทั้งนี้ตามการศึกษาของ Van Der Ven and Wester (2003) ได้รายงานถึงลักษณะของรังไข่ปลาฆ่าลายในช่วงก่อนการปล่อยไข่ โดยแสดงลักษณะของไข่ในระยะ mature และ ovulation ในบริเวณ caudal oviduct (รูปที่ 2.10) พบว่าลักษณะของไข่ในระยะ ovulation ที่พร้อมปล่อยออกสู่ภายนอก ไข่จะมีสะสม yolk ในไข่และมีการแยกตัวออกห่างกันเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการปล่อยสู่ภายนอกตัว เนื่องจากปลาฆ่าลายมีพฤติกรรมการปล่อยไข่ที่ละฟอง



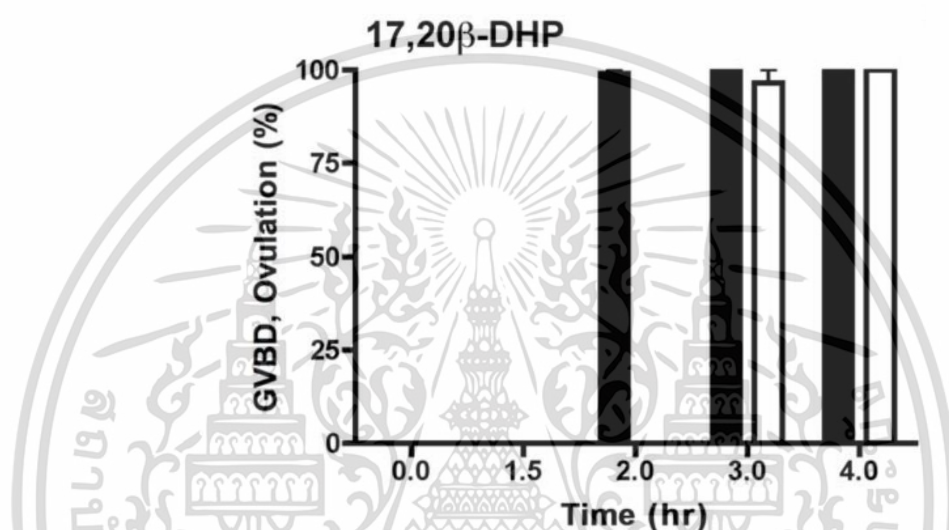
รูปที่ 2.10 รังไข่ของปลาฆ่าลายเพศเมีย ในช่วงก่อนการปล่อยไข่ ที่ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin

ที่มา : Van Der Ven and Wester (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.2 กลไกการพัฒนาของไข่ปลาหม่าลาย

จากการศึกษาของ Tokumoto et al. (2011) ได้แบ่งระยะของการพัฒนาของไข่ปลาหม่าลาย ออกเป็น 3 ระยะได้แก่ ระยะไข่ไม่สุก (immature) ระยะไข่สุก (maturation) และ ระยะตกไข่ (ovulation) ซึ่งมีการชักนำการพัฒนาของไข่จากระยะ immature ไปจนถึงระยะ ovulation ด้วย  $17,20\beta$ -DHP ด้วยวิธี *in vivo* พบว่าไข่ปลาในรังไข่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation ในเวลา 1 ชั่วโมง และมีการเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) ในเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 2.11)



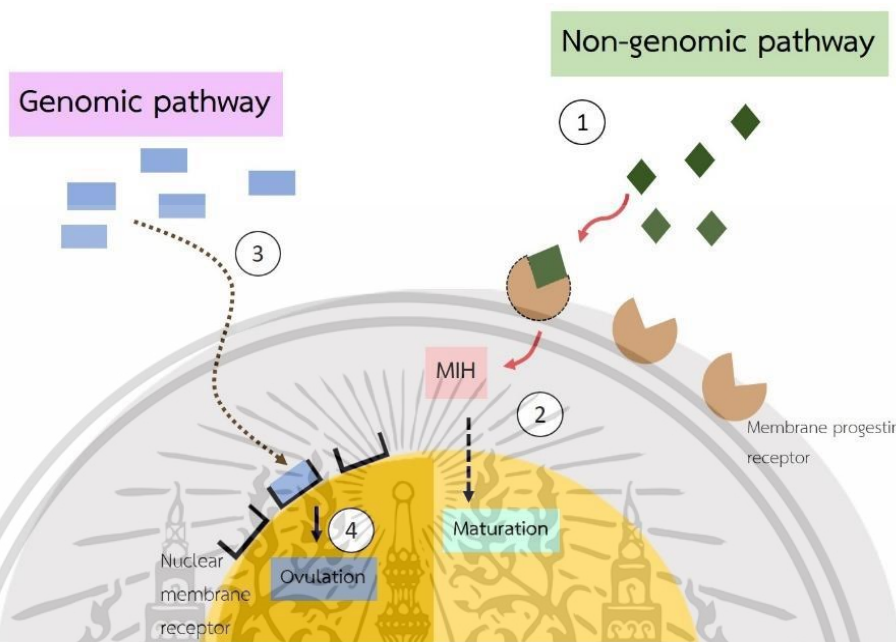
รูปที่ 2.11 กราฟแสดงการชักนำการพัฒนาของไข่ด้วย  $17,20\beta$ -DHP ที่เวลา 0, 1.5, 2, 3, และ 4 ชั่วโมง โดยแท่งสีดำแสดงถึง %GVBD และแท่งสีขาวแสดงถึง %ovulation

ที่มา : Tokumoto et al. (2011)

การพัฒนาของไข่จากระยะ maturation จนเข้าสู่ระยะ ovulation ว่าเกิดจากการทำงานร่วมกันของ 2 pathway ได้แก่ non-genomic pathway และ genomic pathway (รูปที่ 2.12) โดยเริ่มตั้งแต่ไข่ในระยะ immature ถูกกระตุ้นด้วย maturation inducing hormone (MIH) หรือสารจำพวก สเตอรอยด์ เช่น  $17,20\beta$ -DHP เข้าจับกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound progesterin receptor ; mPR) และกระตุ้นให้สร้าง cyclin-B ขึ้นมาเพื่อจับกับ cdk ผ่านทาง non-genomic pathway แล้วชักนำให้เซลล์เริ่มมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ในระยะ m-phase (Nagahama and Yamashita, 2008) ต่อมาไข่จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation ซึ่งไข่ในระยะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลง โดยมีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 2.13) และเกิด germinal vesical breakdown (GVBD) หรือการแตกออกของเยื่อหุ้มนิวเคลียสของไข่ทำให้โครมาตินกระจายตัวออกไป และมีการดูดน้ำเข้าไปในเซลล์ไข่ ทำให้เซลล์ไข่มีลักษณะโปร่งใสขึ้น จากนั้นเมื่อมีการเกี่ยวพาราสิ หรือสารจำพวกสเตอรอยด์จะเข้าจับกับ nuclear progesterin receptor (nPR) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสและชักนำให้ไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation ผ่านทาง cAMP-PKA pathway ส่งผลให้มีการผลึกเซลล์ไข่ในระยะ maturation ออกมาจากชั้น follicle layer ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่และพัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation



รูปที่ 2.12 การทำงานของ maturation inducing hormone (MIH) หรือสเตอรอยด์ ที่เข้าจับกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และชักนำให้สร้าง cyclin-B ผ่านทาง non-genomic pathway เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation จากนั้น MIH จะเข้าจับกับ nuclear progesterin receptor ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส เพื่อชักนำให้ไข่พัฒนาสู่ระยะ ovulation

ที่มา : Tokumoto et al. (2005)



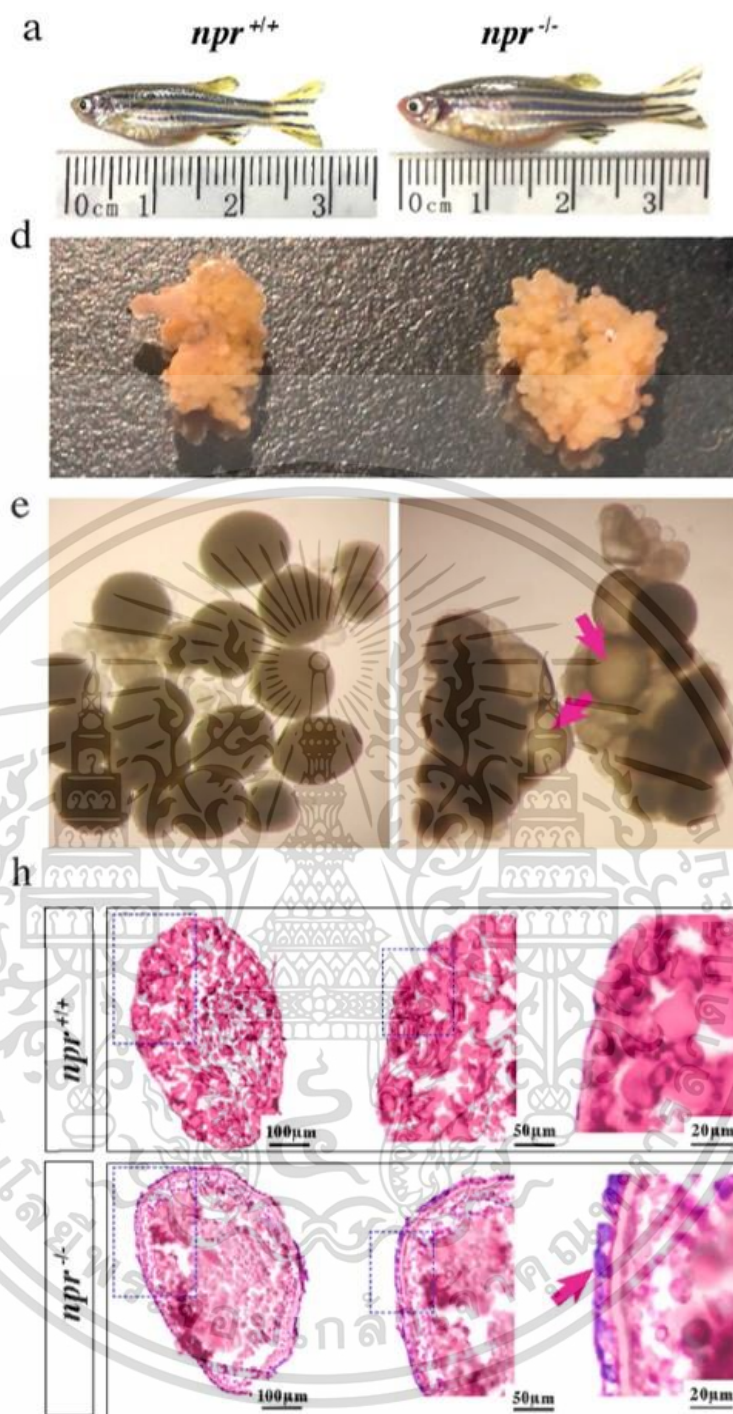
รูปที่ 2.13 ลักษณะของไข่ปลาที่ตายในแต่ละระยะ (A) ไข่ปลาที่ตายในระยะ immature (B) ไข่ปลาที่ตายในระยะ maturation และ (C) ไข่ปลาที่ตายในระยะ ovulation บริเวณลูกศรชี้แสดง fertilization membrane

ที่มา: Tokumoto et al. (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3 การควบคุมการ ovulation ด้วยยีน

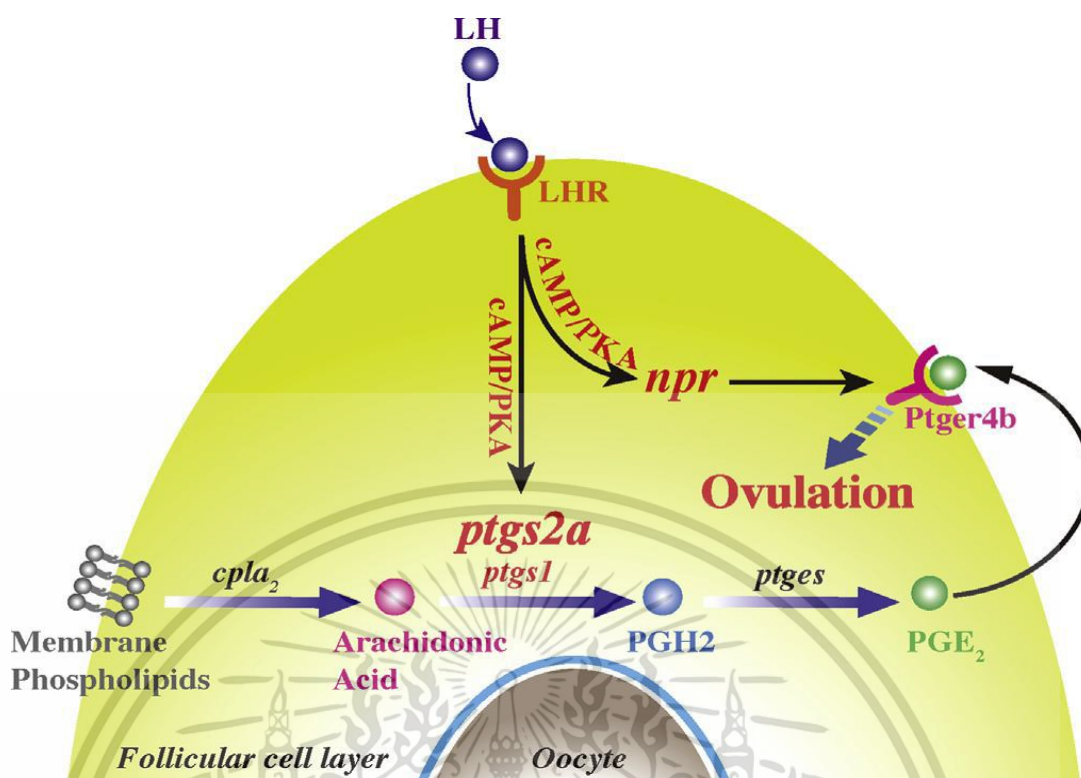
ระหว่างการพัฒนาของไข่ในแต่ละระยะจะมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันออกไป จากการศึกษาของ Tang et al. (2017b) รายงานถึงการทำงานของ Luteinizing Hormone (LH) ที่มีบทบาทในการกระตุ้นการพัฒนาของไข่ทาง genomic pathway โดย LH นั้นสามารถเข้าจับกับ LH receptor ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วชักนำให้มีการสร้าง prostaglandin ขึ้นมาเข้าจับกับ prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) b (*Ptger4b*) แล้วกระตุ้นให้ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation (Cerda et al., 2008; Tokumoto et al., 2004a; Tokumoto et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ genomic pathway โดยดูการแสดงออกของยีน nuclear progesterone receptor (*nPR*) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ LH (LH-signaling) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส โดยใช้วิธีหยุดการทำงานของยีน (gene knockout) ในปลาม้าลาย พบว่ารังไข่ของปลาม้าลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *nPR* มีขนาดใหญ่กว่าปลาม้าลายที่เป็น wild-type และมีการพัฒนาของไข่เข้าสู่ระยะ maturation ได้เร็วกว่า แต่ไข่จะไม่สามารถพัฒนาให้เข้าสู่ระยะ ovulation ได้ เนื่องจากไม่มีการสลายของ follicle layer ที่อยู่รอบเซลล์ไข่ (รูปที่ 2.14) แสดงว่า การทำงานร่วมกันระหว่าง LH และยีน *nPR* มีผลต่อการพัฒนาของเซลล์ไข่เพื่อเข้าสู่ระยะ maturation แต่ไม่สามารถทำให้เกิด ovulation ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *Ptger4b* และ *Ptgs2a* เป็นยีนที่ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการฉีด Human chorionic gonadotropin (hCG) ให้เข้ามากระตุ้นที่ *nPR* ดังนั้นจะเห็นได้ว่าทั้ง *nPR* ยีน *Ptger4b* และ ยีน *Ptgs2a* มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้ไข่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation ผ่าน cAMP-PKA pathway ที่เกิดขึ้นบนในนิวเคลียส (Tang et al., 2017b) (รูปที่ 2.15) หรือการชักนำการ ovulation ผ่าน genomic pathway



รูปที่ 2.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปลาหม้าลายที่ถูก knock out *npr* ( $npr^{-/-}$ ) และ ปลาหม้าลายที่เป็น wild type ( $npr^{+/+}$ ) (A) แสดงถึงขนาดตัวของปลาหม้าลาย (B) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่ (C) ลักษณะของไข่ที่สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ (D) ลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ในปลาหม้าลายที่ถูก knock out *npr* ( $npr^{-/-}$ ) และ ปลาหม้าลายที่เป็น wild type ( $npr^{+/+}$ ) โดยบริเวณที่ถูกสรชี บอกถึง การมีอยู่ของเยื่อหุ้ม follicle

ที่มา : Tang et al. (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

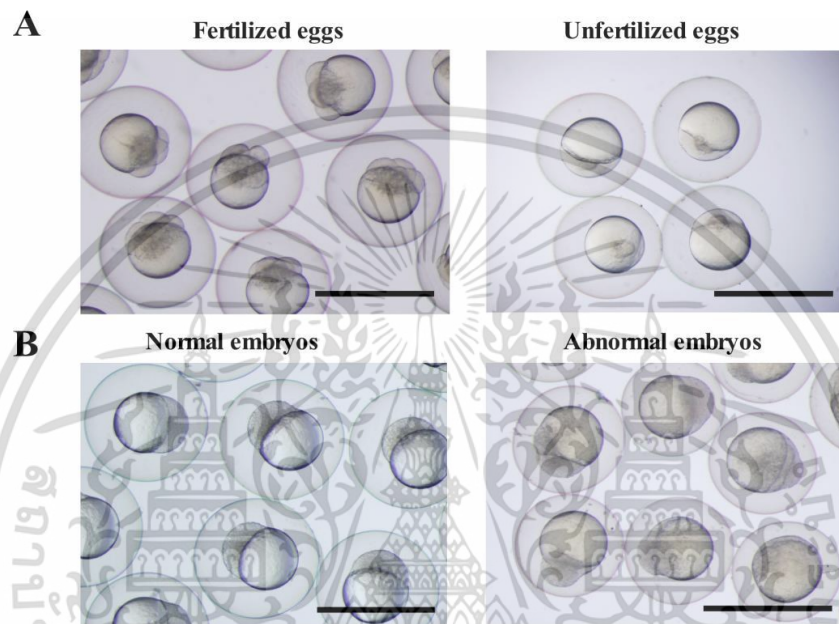


รูปที่ 2.15 การชักนำการพัฒนาของไข่ด้วย LH-induced ovulation ผ่าน prostaglandin system  
ที่มา : Tang et al. (2017)

ในปี 2017 มีการศึกษาการเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ ovulation ด้วยวิธี microarray โดยกระตุ้นผ่านทาง non-genomic pathway ด้วย  $17\text{-}20\beta\text{-DHP}$  แบบ *in vivo* โดยฮอร์โมนชนิดนี้ เข้าจับกับ membrane-borne progesterin receptor (*mPR*) แล้วทำงานต่อใน genomic pathway กระตุ้นให้เกิดการ ovulation (Tokumoto et al., 2011) โดยพบว่าในช่วงที่เซลล์ไข่พัฒนาเข้าระยะ ovulation มีการแสดงออกของยีน 3 ยีนที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการ ovulation คือ *slc37a4a*, *zgc:65811*, *zgc:92184* เพราะเป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงเฉพาะในช่วง ovulation เมื่อเทียบกับไข่ในช่วง maturation โดยจากการทดลองนี้ ได้มีการวิจารณ์ผลการทดลองถึงบทบาทของยีน 2 ใน 3 ยีนนี้ว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกับการ apoptosis (Klangnurak and Tokumoto, 2017) ในปีต่อมาได้มีการศึกษาของ Klangnurak et al. (2018) ได้รายงานรายชื่อของยีนที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการ ovulation เพิ่มเติม โดยใช้วิธี RNA sequencing พบยีนที่มีการแสดงออกสูงในช่วง ovulation เพิ่มขึ้น อีก 8 ยีน ซึ่งได้แก่ *ctrb1*, *prss59.1*, *ctsbb*, *stm*, *adamts15a*, *sik1*, *pax2a*, และ *rbm47* โดยในการศึกษารั้งนี้มีการรายงานถึงยีนที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ในช่วง ovulation เพิ่มเติมอีก 2 ยีน คือ *sik1* และ *ctsbb* ทั้งนี้มีเพียงยีน *stm* และ *pax2a* เท่านั้นที่มีการระบุหน้าที่ของยีนในช่วง ovulation (Pachosuk et al., 2021; Pachosuk et al., 2020)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาของ Klangnurak et al. (2018) พบว่าไข่ของปลาหมึกหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *stm* อย่างสมบูรณ์แล้ว ปลายังสามารถให้การปล่อยไข่ แต่หลังจากได้รับการปฏิสนธิ ไข่ที่ได้จาก *stm*<sup>-/-</sup> จะมีร้อยละความผิดปกติของการพัฒนาตัวอ่อน (embryo) สูง (รูปที่ 2.16Bขวา) แสดงให้เห็นว่า ยีน *stm* มีความสำคัญในช่วงของการปฏิสนธิ และช่วงเริ่มแรกของการพัฒนาตัวอ่อน (fertilization and early development)



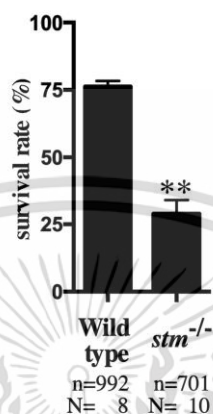
รูปที่ 2.16 ลักษณะของไข่ปลาหมึกหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *stm* (Aซ้าย) เซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (Aขวา) เซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Bซ้าย) ตัวอ่อนที่มีการพัฒนาปกติ (Bขวา) ตัวอ่อนที่ผิดปกติ

ที่มา : Klangnurak et al. (2018)

ทั้งนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมที่เกี่ยวกับหน้าที่ของยีน *stm* (Pachoensuk et al., 2021) เพื่อยืนยันหน้าที่ที่แน่ชัดของยีน *stm* ต่อการปฏิสนธิ การพัฒนาของไข่ และการพัฒนาของตัวอ่อน โดยทำการหยุดการทำงานของยีนด้วยวิธี CRISPR/Cas9 ทำให้เกิดการ deletion 14 bp และ insertion 1 bp ที่บริเวณ exon ที่ 7 ของยีน *stm* พบว่าไข่ที่ได้จากปลาหมึกหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *stm* (homozygous mutant ; *stm*<sup>-/-</sup>) มีอัตราการผสมติด และอัตราการรอดของตัวอ่อนต่ำกว่าใน wild-type อย่างนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ wild-type (รูปที่ 2.17) อีกทั้งยังพบว่า otoliths ของปลาหมึกหลาย *stm*<sup>-/-</sup> มีลักษณะขรุขระ ซึ่งมีลักษณะที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับ wild-type (รูปที่ 2.18) การศึกษากครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบตำแหน่งที่มีการแสดงออกของยีน *stm* ที่บริเวณรังไข่ของปลาหมึกหลาย โดยใช้วิธี

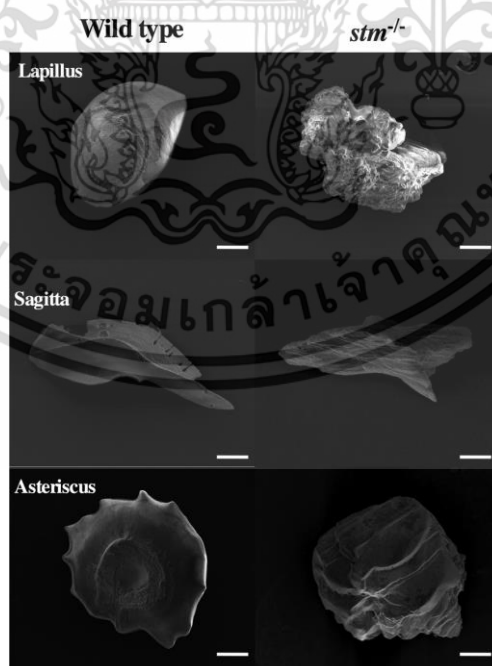
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

immunohistochemical พบว่า ในปลาฆ่าตาย wild-type มีการแสดงออกของยีน *stm* บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของตัวอ่อน (chorion) ในช่วง ovulation ที่ส่วน posterior ของรังไข่ แต่เซลล์ไข่ในระยะ immature ที่อยู่บริเวณ anterior ของรังไข่เมื่อย้อมด้วย DAPI พบว่าบริเวณ nuclei และ follicular ไม่มีการติดสีย้อมแสดงให้เห็นว่า ในบริเวณนี้ไม่มี *stm* protein (รูปที่ 2.19)



รูปที่ 2.17 อัตรารอดของตัวอ่อนในกลุ่มตัวอย่าง wild-type และ *stm*<sup>-/-</sup> โดย n = จำนวนตัวอ่อน N = จำนวน biological replication

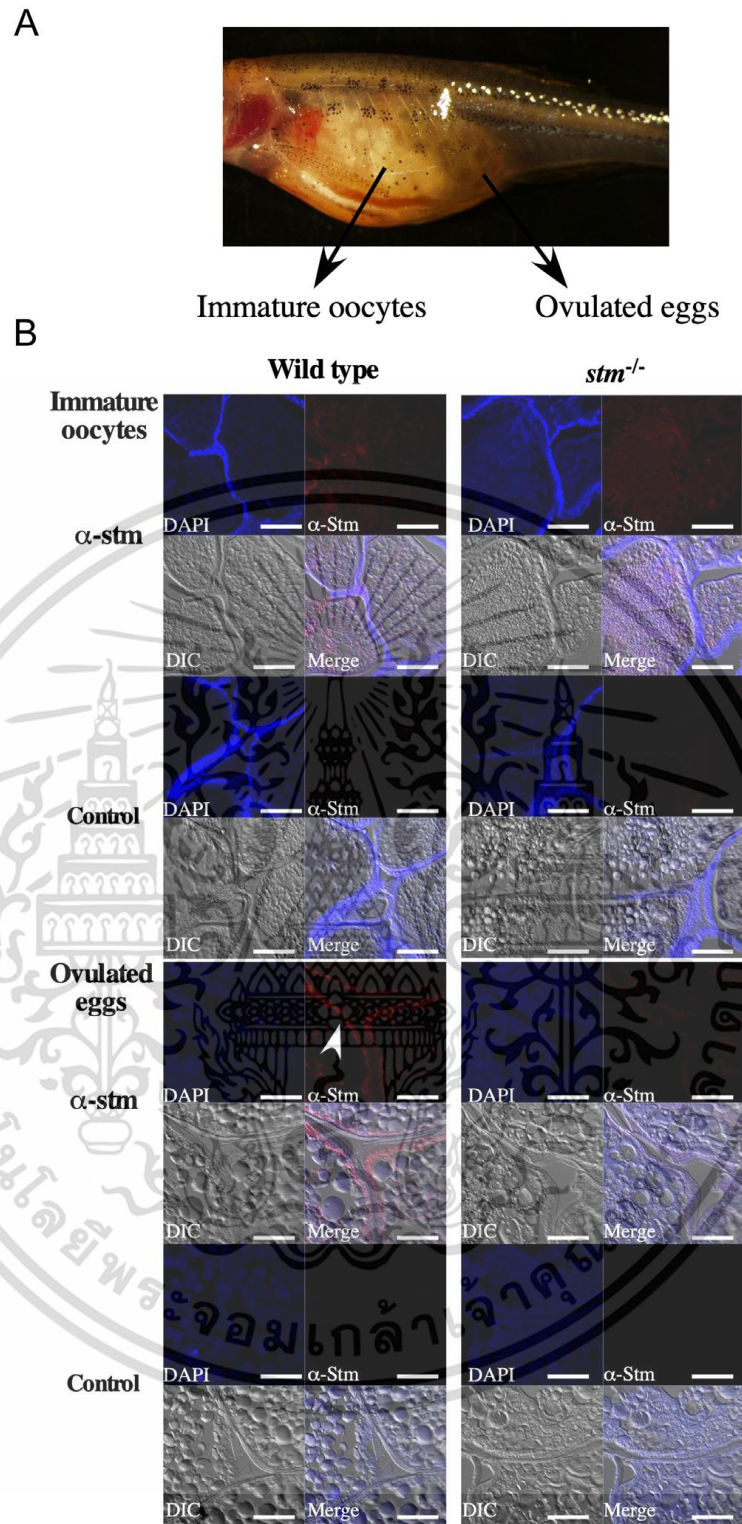
ที่มา : Theeranukul et al. (2021)



รูปที่ 2.18 otolith ของปลาฆ่าตาย wild-type และ *stm*<sup>-/-</sup> ตัวเต็มวัย scale bar = 100  $\mu$ m

ที่มา : Theeranukul et al. (2021)

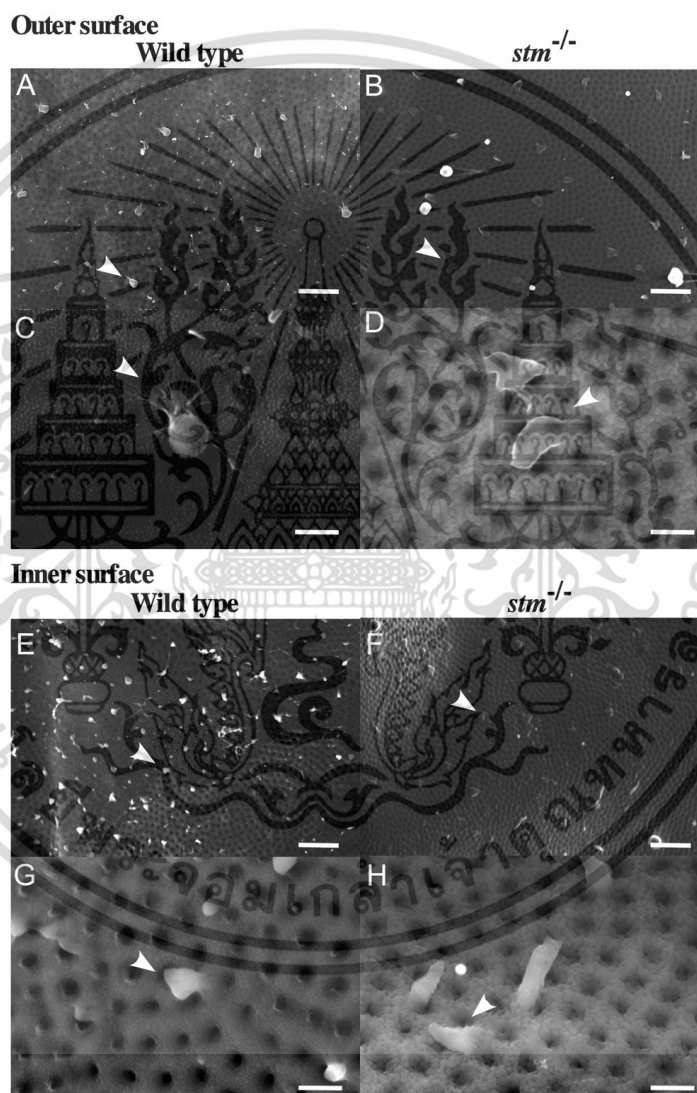
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.19 (A) ปลาหมี่ลายเพศเมียที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *stm* อย่างสมบูรณ์ (*stm*<sup>-/-</sup>) (B) Immunohistology ของรังไข่ปลาหมี่ลาย wild-type และ *stm*<sup>-/-</sup> ใน immature oocyte และ ovulated oocyte ที่ย้อมด้วย anti-Stm antibody และ DAPI ลูกศรสีขาว ชี้ให้เห็นถึงสัญญาณของ anti-Stm staining โดย scale bar = 50  $\mu$ m

ที่มา : Theeranukul et al. (2021)  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่ายีน *stm* อาจมีหน้าที่เกี่ยวกับ follicle envelope จึงได้ทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยพบว่า follicle envelope ของปลาหมึก wild-type มีโครงสร้างลักษณะ fibre-supported knob-like structures เป็นจำนวนมาก แต่พบใน follicle envelope ของปลาหมึก *stm<sup>-/-</sup>* เพียงเล็กน้อยและมีโครงสร้างผิดปกติคล้ายการถูกบิดและอยู่อย่างกระจัดกระจาย (รูปที่ 2.20) ทำให้ประสิทธิภาพของ follicle envelope ถูกเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้การซึมผ่านของอากาศ และสารอาหารต่างๆ ลดลง จึงทำให้ลูกปลาอัตรการรอดต่ำ



รูปที่ 2.20 ลักษณะด้านนอกและด้านในของ follicle envelope จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของปลาหมึก wild-type และ *stm<sup>-/-</sup>* บริเวณลูกศรชี้คือ fibre-supported knob-like structures โดย scale bar ในรูป A, B, E, และ F = 2 $\mu$ m ส่วนรูป C, D, G, และ H = 10  $\mu$ m

ที่มา : Theeranukul et al. (2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่าการพัฒนาของไข่เพื่อเข้าสู่ระยะ ovulation นั้นมีการทำงานของยีนหลายยีนเข้ามาเกี่ยวข้องเพื่อให้ไข่มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation ได้อย่างสมบูรณ์และพร้อมสำหรับการปฏิสนธิ ซึ่งแต่ละยีนก็มีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งจะเห็นได้ว่าหากมียีนใดยีนหนึ่งผิดปกติไป จะส่งผลทำให้ไข่มีการพัฒนาที่ผิดปกติ

หลังจากที่ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation แล้ว เซลล์ไข่จะถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกตัวปลา เพื่อรับการปฏิสนธิจากสเปิร์ม จากนั้นเซลล์จะเริ่มมีการพัฒนาจากไซโกต จนถึงระยะตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่ ตามตารางที่ 2.2 (Kimmel et al., 1995)

ตารางที่ 2.2 ระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ปลาหลายใน ช่วง early development

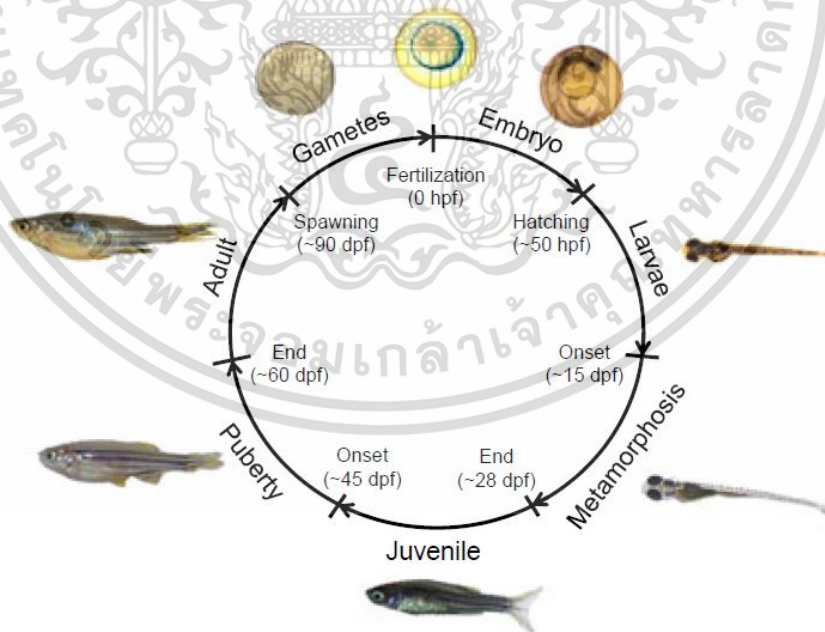
ระยะ	เวลา (ชั่วโมง)	รายละเอียด
Zygote	0	หลังจากการปฏิสนธิแล้วเซลล์จะเข้าสู่ Zygotic cell cycle
Cleavage	$\frac{3}{4}$	เข้าสู่ cell cycle ที่ 2 โดยเกิดขึ้น 7 รอบพร้อมกันอย่างรวดเร็ว
Blastular	$2 \frac{1}{4}$	เริ่มมีการสร้าง epiboly ที่บริเวณกลาง Blastula
Gastular	$5 \frac{1}{4}$	มีการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะพื้นฐาน โดยมีการพัฒนาของ epiblast, hypoblast และ embryonic axis
Segmentation	10	มีการพัฒนาของ pharyngeal arch และระบบประสาท รวมทั้งมีการพัฒนาของหาง รวมถึงอวัยวะ (primary organ)
Pharyngula	24	Phylotypic-stage embryo มีการพัฒนาของกระดูกสันหลัง โครงสร้างบริเวณบน yolk พัฒนาของเม็ดสี (pigment) และกรีป
Hatching	48	อวัยวะต่างๆ บริเวณส่วนหัวและส่วนอกพัฒนาสมบูรณ์ และเริ่มมีการฟักตัว
Early larva	72	swim bladder พองตัว และมีพฤติกรรมหาอาหาร

ที่มา : Kimmel et al. (1995)

สำหรับพฤติกรรมสืบพันธุ์ของปลาหลายตามธรรมชาติปลาหลายจะวางไข่ช่วงเดือนเมษายนถึง เดือนสิงหาคม ในบริเวณที่อยู่อาศัย และไม่มีกรอพยพเพื่อวางไข่ การวางไข่ของปลาหลายจะขึ้นอยู่กับอิทธิพลของการได้รับแสง (photoperiod) โดยการวางไข่ของปลาหลายจะเกิดขึ้นในช่วงแรกของการได้รับแสง ตามการศึกษาของ Spence et al. (2007) พบว่าปลาหลายตามธรรมชาติจะใช้เวลาช่วงสั้นๆ ในการวางไข่หลังจากได้รับแสงในช่วงแรก โดยตัวผู้จะว่ายน้ำไล่ตัวเมีย

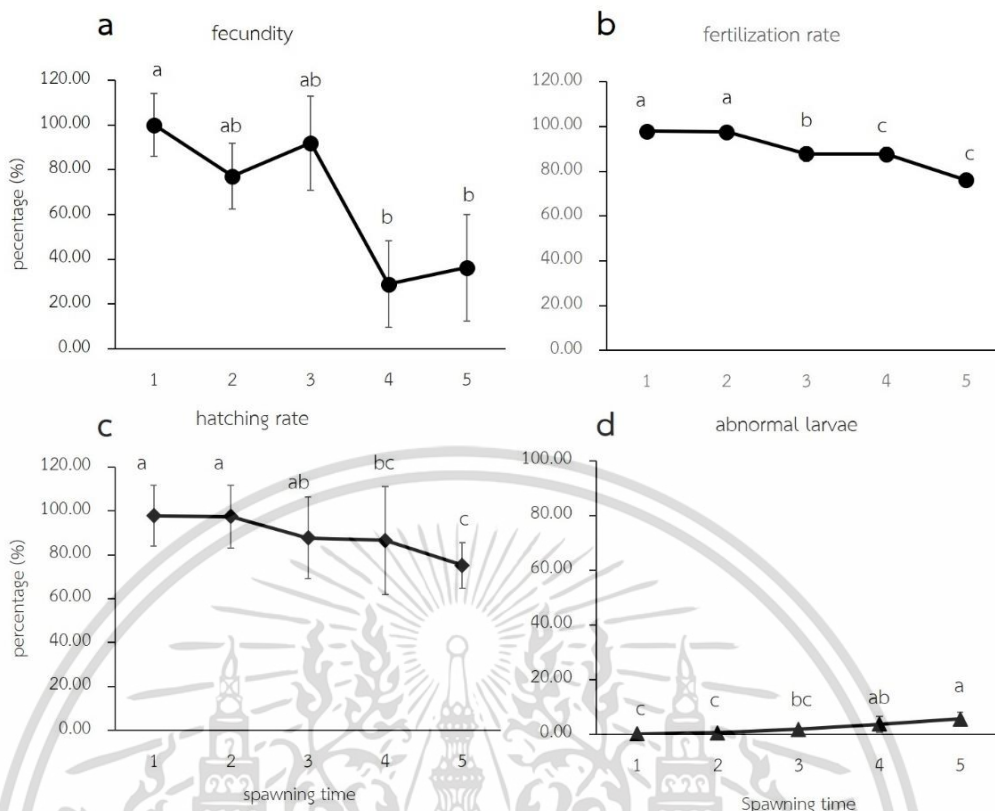
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อใช้จะงอยปากคุณบริเวณด้านข้างท้องของตัวเมียเพื่อกระตุ้นให้ตัวเมียมีการปล่อยไข่ซึ่งเป็นพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีของปลาหมอไทย (Spence et al., 2008) หลังจากไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้วตัวอ่อนจะใช้เวลา 2-5 วันในการฟักออกจากไข่ แล้ว 2-3 เดือนเพื่อเจริญเข้าสู่ตัวเต็มวัย (รูปที่ 2.21) ทั้งนี้ถ้าเลี้ยงในสภาวะห้องทดลองปลาหมอไทยจะสามารถออกไข่ได้ตลอดทั้งปี (Ribas and Piferrer, 2014) แม้การเลี้ยงปลาหมอไทยในสภาวะห้องปฏิบัติการจะทำให้ปลาหมอไทยสามารถออกไข่ได้ทุกวัน แต่ตามการศึกษาของ Niimi and LaHam (1974) ได้รายงานระยะห่างระหว่างการผสมพันธุ์ของปลาหมอไทยเพื่อให้ได้จำนวนไข่มากที่สุด และมีอัตราการตายของตัวอ่อนน้อยที่สุด โดยพบว่าการผสมพันธุ์ปลาหมอไทยควรมีการเว้นระยะเวลาประมาณ 10 วัน ทั้งนี้จากการศึกษาของ สุทธิรัตน์ ปัญจพันธ์ และคณะ (2563) ได้ทำการศึกษาความถดถอยของรังไข่จากปลาหมอไทยแม่พันธุ์ที่มีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง พบว่าปลาหมอไทยที่มีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง 5 ครั้งทำให้ความตกไข่ อัตราการผสมติด และอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนมีแนวโน้มลดลง และมีจำนวนของตัวอ่อนที่ผิดปกติเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีการพัฒนาของเซลล์ไข่ในรังไข่ช้าลง (รูปที่ 2.22) เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ ดังนั้นตามการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าเมื่อปลาหมอไทยแม่พันธุ์มีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง จะส่งผลให้คุณภาพและปริมาณของไข่ และตัวอ่อนที่ผลิตได้ จึงมีความจำเป็นในการเว้นระยะการผสมพันธุ์ในระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้รังไข่ได้มีการฟื้นฟูก่อนการผสมพันธุ์ในครั้งถัดไป



รูปที่ 2.21 วงจรชีวิตของปลาหมอไทย โดย hpf หมายถึง ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ (hours post fertilization) และ dpf หมายถึง วันหลังการปฏิสนธิ (day post fertilization)

ที่มา : Ribas and Piferrer (2013)  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.22 (a) ความตกไข่ (b) อัตราการผสมติด (c) อัตราการฟัก และ (d) จำนวนของตัวอ่อนที่ผิดปกติ ของปลาหมอชัยภูมิที่มีการปล่อยไข่ตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึง 5 โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่มา : สุทธิรัตน์ ปัญจันท์ และคณะ (2563)

## 2.4 Apoptosis

Program cell death (PCD) หรือ การตายของเซลล์ ที่เกิดขึ้นเป็นปกติเพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ภายในร่างกายสำหรับสัตว์ชั้นสูง ซึ่งการ apoptosis เป็นกระบวนการที่สำคัญในการกำจัดเซลล์ที่มีการเสื่อมสภาพซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการแก่ตัวของเซลล์ เช่น การฝ่อของเยื่อหุ้มฟอลลิเคิล (follicle atresia) และ การสลายของต่อมไขมันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลังจากการหย่านม

### 2.4.1 ลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis

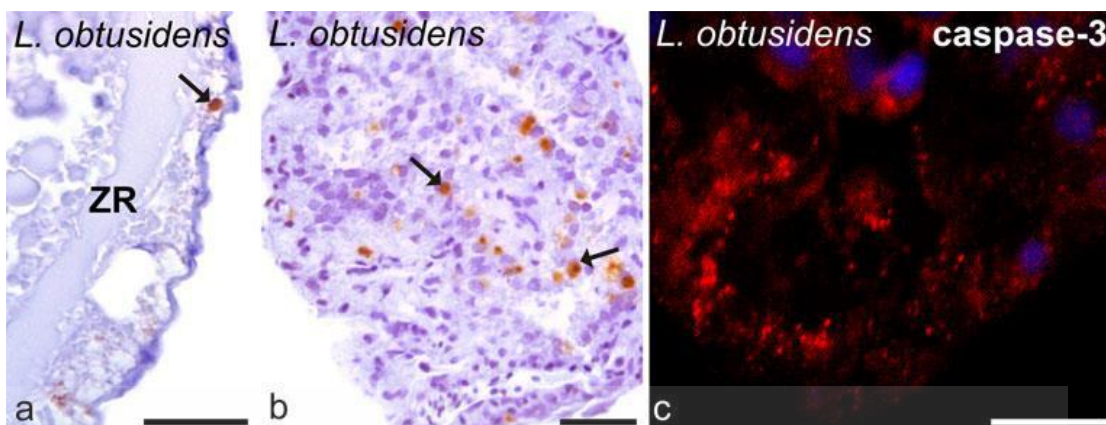
เซลล์ที่เกิดการ apoptosis จะมีการหดตัวทำให้ขนาดเล็กลงเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope (Kerr et al., 1972) จากนั้นโครมาตินจะมีการจับตัวกันเป็นก้อน (Pyknosis ; รูปที่ 2.23) และเยื่อหุ้มเซลล์จะโป่งพองขึ้นคล้ายลูกโป่ง (Elmore, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Morais et al. (2012) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเกิด apoptosis ในปลา *Leporinus obtusidens* พบว่าระหว่างที่เกิดการฝ่อของ follicle นั้นจะเกิดการ apoptosis ขึ้นบริเวณท่อ follicle (follicle lumen) และ zona radiata เนื่องจากเกิด DNA fragmentation โดยทำการตรวจสอบด้วย TUNEL-straining ซึ่งเป็นเทคนิคที่ตรวจสอบการเกิด apoptosis จากการแตกหักของ DNA (DNA fragmentation) เซลล์เกิด apoptosis จะติดสีแดง ทั้งในช่วงก่อนการฝ่อ และช่วงที่มีการฝ่อของรังไข่ (รูปที่ 2.24) ทั้งนี้ caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดการ apoptosis จะพบมากในระยะหลังการฝ่อ (late stage) โดยใช้การตรวจสอบด้วยวิธี immunolocalization เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (รูปที่ 2.24C)



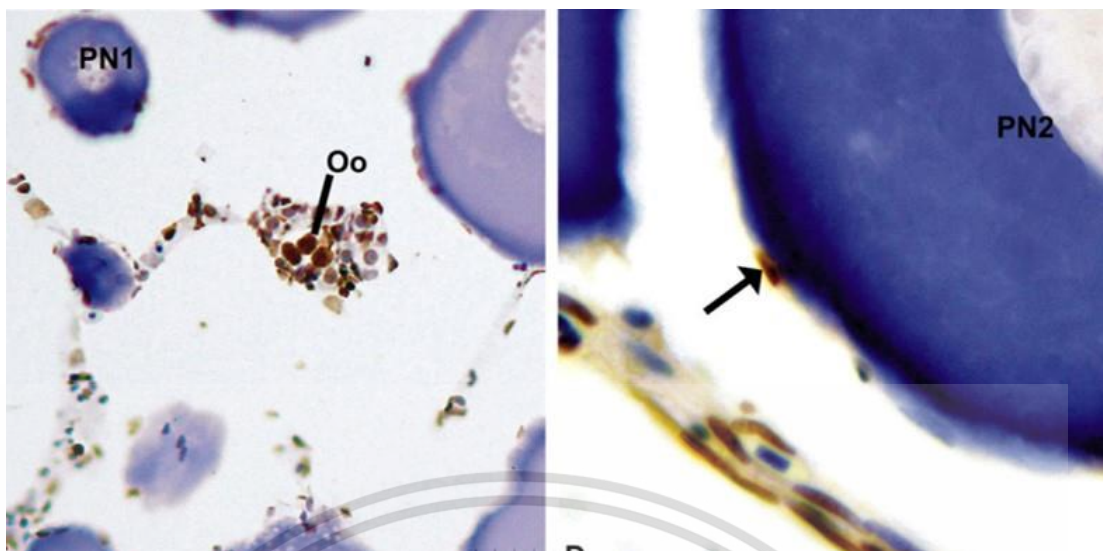
รูปที่ 2.23 เนื้อเยื่อบริเวณตับอ่อนในหนูที่ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin แสดงลักษณะของการจับตัวกับเป็นก้อนของโครมาติน (สีม่วงเข้ม) บริเวณที่ถูกครีตีนดำชี้ คือ Apoptosis cell  
ที่มา : Elmore (2007)



รูปที่ 2.24 การเกิด Apoptosis ระหว่างการฝ่อของ follicle ในปลา *Leporinus obtusidens* (a, b) การย้อมด้วยสี hematoxylin (a) บริเวณลูกศรชี้แสดงถึง TUNEL-Positive follicular cell ในระยะก่อนการฝ่อของ follicle (early stage) (b)บริเวณลูกศรชี้แสดงถึง TUNEL-Positive follicular cell ในระยะหลังการฝ่อของ follicle (late stage) และ (c) immunoreaction ของ caspase-3 ในระยะหลังการฝ่อของ follicle

ที่มา : Morais et al. (2012)

ทั้งนี้การเกิด apoptosis ยังมีบทบาทในการสับพันธุ์ของปลาในระยะลูกอ่อนหลังเพื่อรักษาสมดุลของจำนวนเซลล์ระหว่างที่มีการพัฒนาของเซลล์ในช่วงการพัฒนาของรังไข่ (ovarian development) (Janz and Van Der Kraak, 1997) การฝ่อของไข่ (follicle atresia) (Wood and Van Der Kraak, 2003) และการพัฒนาของรังไข่หลังจากการปล่อยไข่ (postovulatory follicle) (Drummond et al., 2000) โดยมีเอนไซม์ตั้งต้นได้แก่ caspase-2, -8, -9 และ -10 และมีตัวกระตุ้นหรือ (effector) คือ caspase-3, -6 และ -7 โดยตามการศึกษาของ Thomé et al. (2012) ได้ทำการตรวจสอบการเกิด apoptosis ในรังไข่ของปลา *Prochilodus argenteus* โดยใช้เทคนิค TUNEL เพื่อตรวจสอบการแตกหักของสายดีเอ็นเอในเซลล์ที่มีการเกิด apoptosis และ caspase-3 colorimetric หรือการใช้เอนไซม์ในการตรวจสอบการทำงานของ caspase-3 ในรังไข่ พบว่าที่บริเวณ oogonia และ follicular มีผลของ TUNEL เป็น positive (รูปที่ 2.25) และมีการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 เกิดขึ้น แสดงว่าเกิด apoptosis ได้ในไข่ปลา



รูปที่ 2.25 ผล TUNEL ที่แสดงเป็น positive ในรังไข่ของปลา *P. argenteus* โดยมี scale bar = 20  $\mu$ m

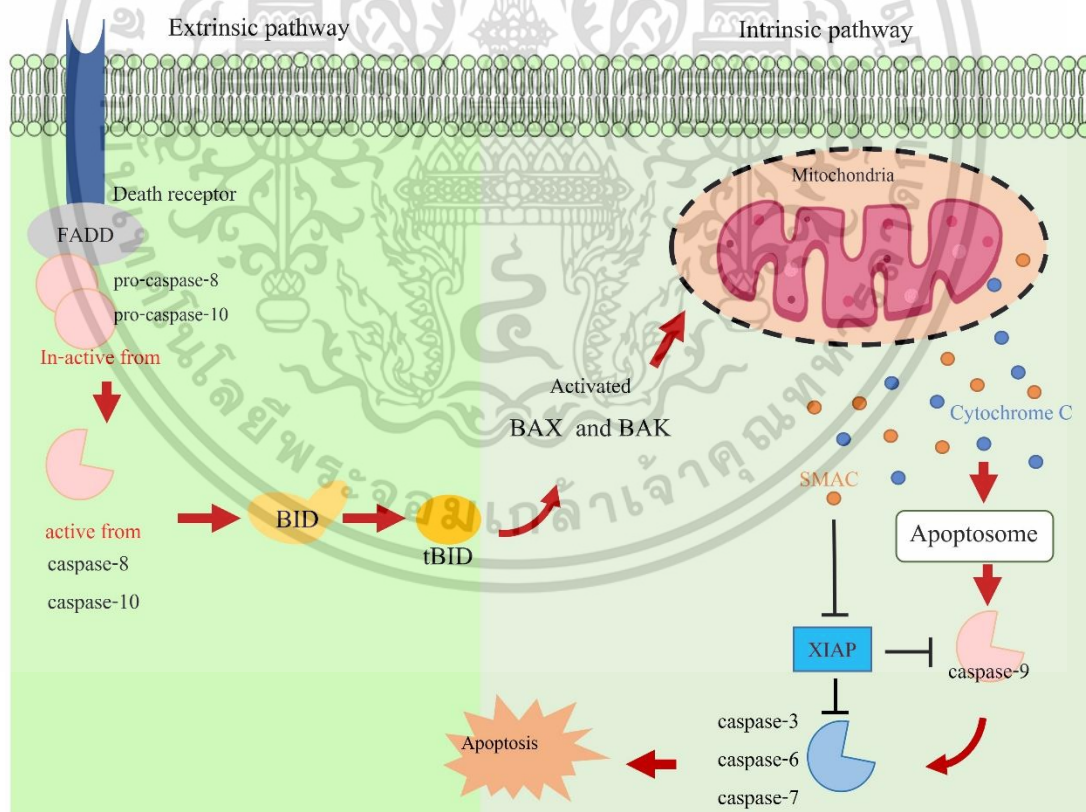
ที่มา : Thome et al. (2012)

#### 2.4.2 กลไกการเกิด apoptosis (apoptosis mechanism)

กลไกการเกิด apoptosis ในปลาหลาย มีอยู่ 2 pathway คือ extrinsic pathway และ intrinsic pathway (รูปที่ 2.26) โดย extrinsic pathway หรือการรับสัญญาณจากภายนอก จะกระตุ้นให้โปรตีน cytokine ligand หลั่งออกมาจากต่อมไร้ท่อ แล้วเข้าจับกับตัวรับสัญญาณที่เป็น death receptor บริเวณผิวเซลล์อย่างจำเพาะเจาะจง จากนั้น fas-associated death domain (FADD) จะถูกสร้างขึ้นที่ cytoplasm ส่งผลให้ procaspase-8 และ procaspase-10 ถูกกระตุ้นให้มีการรวมตัวกันภายใน cytoplasm ด้วยกระบวนการสลายตัวของเซลล์ (autolytic) ทำให้ caspase-8 และ caspase-10 สามารถทำงานได้ จากนั้น caspase จะไปกระตุ้น BID ใน Cleaves BID ซึ่งอยู่ในสถานะ inactive เปลี่ยนแปลงเป็น tBID ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเชื่อม extrinsic pathway และ intrinsic pathway เข้าด้วยกัน โดย tBID จะเข้าไปกระตุ้น BAX และ BAK ใน intrinsic pathway และใน intrinsic pathway หรือ mitochondrial pathway โดย pathway นี้สามารถเริ่มขึ้นภายในเซลล์จากการกระตุ้นโดย ความเครียด เช่น รังสี UV ความร้อน และ DNA damage ทำให้ BAK และ BID จับกับเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria แล้วกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง cytochrome C (Takemori et al., 2007) ที่อยู่ใน mitochondrial ถูกปล่อยออกมาสู่ไซโตพลาสซึมผ่านทางช่องเปิดที่เรียกว่า mitochondrial permeability transition (MPT) pore โดยสารที่ถูกหลั่งออกมาไมโทคอนเดรีย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ cytochrome c, second mitochondria-derived activator of caspase / Diablo homolog (Smac/DIABLO) และ serine protease HtrA2/Omi ที่จัดเป็น caspase-dependent mitochondrial pathway ซึ่ง cytochrome c จะเข้าจับกับ Apoptotic protease activating factor (apaf-1) และ procaspase-9 เพื่อสร้าง "apoptosome" ขึ้นมา เมื่อ procaspase-9 รวมกลุ่มกัน เกิดเป็น caspase-9 ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่หรือใช้ซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smac/DIABLO และ serine protease HtrA2/Omi จะเป็นตัวที่ไปยับยั้งการทำงานของ x-link inhibitors of apoptosis protein (*XIAP*) ทำให้ *XIAP* หยุดทำงาน ส่งผลให้ caspase สามารถทำงานได้ ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของ pro-apoptotic protein ได้แก่ apoptosis inducing factor (AIF), endonuclease G และ caspase-3 activated DNase (CAD) ที่หลั่งออกจาก mitochondrial ขณะที่เกิด apoptosis โดยโปรตีนเหล่านี้จะย้ายตำแหน่งจากไมโทคอนเดรียไปยังนิวเคลียส โดย AIF และ endonuclease G จะทำให้เกิด DNA fragment และการจับตัวกันของโครมาติน ซึ่งเรียกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในลักษณะนี้เป็น “Stage I” ซึ่งโปรตีน 2 ชนิดนี้จัดเป็น caspase-independent manner ส่วน CAD นั้นจะถูกหลั่งจากไมโทคอนเดรียและย้ายไปยังนิวเคลียสหลังจากที่เกิด oligonucleosomal DNA fragmentation และ caspase-3 ทำงาน จะทำให้การจับตัวกันของโครมาติน ซึ่งการจับตัวกันแน่นขึ้นของโครมาติน เป็น “stage II” ของการเกิด apoptosis (Elmore, 2007; Nagahama and Yamashita, 2008; Tang et al., 2017a) โดยเป็นการทำงานของโปรตีน caspase-3 -6 และ -7 หลังจากถูกกระตุ้นด้วย caspase-9 ใน intrinsic pathway และ caspase-8 -10 ใน extrinsic pathway ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง และกระบวนการทางชีวเคมี (Elmore, 2007)



รูปที่ 2.26 : แผนภาพแสดงการเกิด Apoptosis แบบ Extrinsic Pathway และ Intrinsic pathway

ที่มา : ดัดแปลงจาก Elmore (2007) และ Rampal et al. (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.3 บทบาทของ apoptosis ต่อการพัฒนาของไข่และตัวอ่อนปลาหมึก

จากการศึกษาของ Kklangnurak and Tokumoto (2017) ได้วิจารณ์ผลการทดลองหลังจากที่ได้ทำการคัดเลือกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ ovulation ว่า ยีน *slc37a4a* มีบทบาทในการขนส่ง glucose-6-phosphate (G6PT) ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการควบคุมสมดุลกลูโคสในเซลล์ (glucose homeostasis) ระหว่าง cytoplasm กับ lumen ของ endoplasmic reticulum (ER) เมื่อ glucose-6-phosphate เริ่มมีการทำงานจะทำให้เกิด endoplasmic reticulum stress (ERS) นำไปสู่การ apoptosis ของเซลล์ นอกจากนี้ยีน *ctsbb* และ *sik1* ตามการศึกษาของ Kklangnurak et al. (2018) พบว่ายีน *ctsbb* นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดเนื้องอกและมะเร็งในมนุษย์โดยเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการ apoptosis ส่วนยีน *sik1* เป็น serine/threonine kinase มีบทบาทเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยจะชักนำให้สร้าง cytokines and cytotoxicity in CD8 (+) T-cells ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะต้องถูกควบคุมโดย B-cell apoptosis ซึ่งยีนที่มีการแสดงออกสูงของทั้ง 2 งานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การ apoptosis อาจมีความสำคัญในการพัฒนาของเซลล์ไข่โดยมีบทบาทในการแตกออกของ follicle (follicle rupture) เพื่อให้เซลล์ไข่มีการพัฒนาสู่ระยะ ovulation ได้อย่างสมบูรณ์

### 2.5 ยีน salt inducible kinase1 (*sik1*)

ยีน salt inducible kinase1 หรือ *sik1* จัดอยู่ครอบครัว *sik* ซึ่งประกอบด้วย *sik1* *sik2* และ *sik3* ซึ่งเป็นในกลุ่มของ AMP-activated protein kinase (AMPK) โดยมีหน้าที่ควบคุมการทำงานทางสรีระวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความต้องการพลังงานของร่างกาย (energy response-related physiological process) (Takemori et al., 2007) เช่น การสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) เมแทบอลิซึมของกรดไขมัน (lipid metabolism) (Sun et al., 2020) และ การรักษาสมดุลของเกลือแร่ (mineral balance) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม *sik1* mRNA มีการแสดงออกมากที่บริเวณ ต่อมหมวกไต สมอง อัณฑะ และกล้ามเนื้อลาย แต่มีการแสดงออกน้อยในบริเวณเนื้อเยื่อไขมัน ตับ และ หัวใจ (Horike et al., 2003)

ตามการศึกษาของ Cheng et al. (2009) ได้ระบุว่าทำงานของ *p53* ซึ่งเป็นยีนมีส่วนในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแยกตัวของเซลล์ (cell detachment) ในการเกิด apoptosis รูปแบบหนึ่งเรียกว่า anoikis นั้นจะต้องถูกกระตุ้นด้วยยีน *sik1* ทั้งนี้ยีน *sik1* ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ โดยมีการศึกษาในหนูทดลองพบว่าเมื่อ *sik1* เกิดการ downregulation ขึ้น จะทำให้ *rnf2* ซึ่งเป็นยีนที่กระตุ้นให้มีการสร้างเนื้องอก (tumorigenesis) และการกระจายตัวของเซลล์มะเร็ง (metastasis) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Ribas and Piferrer, 2014) และยีน *sik1* ยังมีอีกหนึ่งบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานของ circadian clock (Ferrarelli, 2013) หรือนาฬิกาชีวิต ซึ่งเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

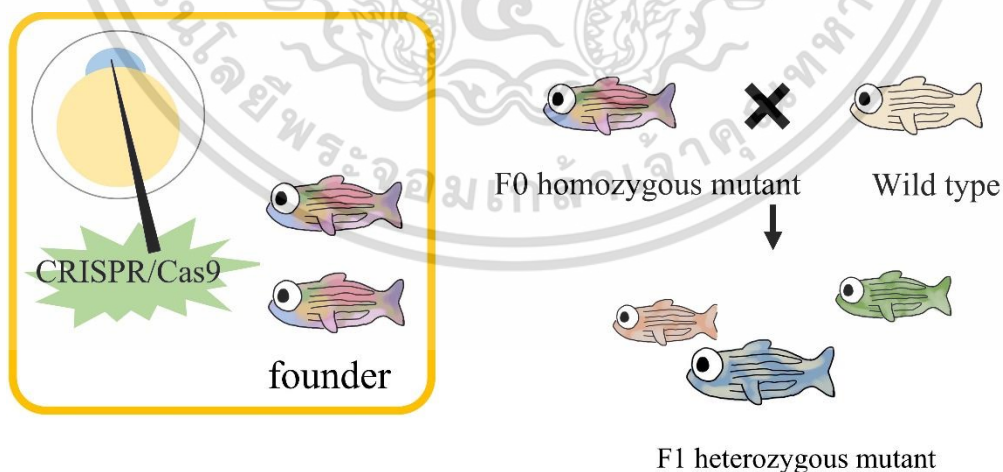
ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของร่างกายในรอบ 24 ชั่วโมงเพื่อควบคุมการทำงานระบบต่างๆ ของร่างกาย เช่น การหลั่งฮอร์โมนเพื่อควบคุมสภาวะสมดุล (homeostasis) ในร่างกาย (Neumann et al., 2019) การหลับการตื่น (Jagannath et al., 2013) การตีบพันธุ (Caba et al., 2018) รวมถึงการควบคุมการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของร่างกาย (Nagashima et al., 2018) ตามการศึกษาของ Jagannath et al. (2013) ได้รายงานถึงบทบาทของยีน *sik1* ในการรีเซต suprachiasmatic nucleus (SCN) หรือบริเวณเล็กๆ ในสมองส่วนไฮโปทาลามัสซึ่งอยู่ติดกับด้านบนของส่วนไขว้ประสาทตา โดยวิเคราะห์จากระดับการแสดงออกของ RNA ทั้งหมดในเซลล์ SCN (transcriptome) ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมแสง พบว่าบทบาทของยีน *sik1* ทำหน้าที่ที่ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรม (phase shifts) ในหนูทดลอง โดยจากการทดลองเปลี่ยนแปลงขอบเขตเวลา พบว่ายีน *sik1* มีบทบาทในการเติมหมู่ phosphate (phosphorylation) และลดการทำงานของ CREB-regulate transcription coactivator 1 (CRTC1) ทำให้การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของหนูทดลอง และการ re-entrainment เกิดไวขึ้นเมื่อมีการลดการทำงาน (knockdown) ของยีน *sik1* ลง

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สัตว์ทดลองและวิธีการเลี้ยงดู

ใช้ปลาหมากลายสายพันธุ์ roy orbison ที่เป็น wild-type และปลาที่ถูกหยุดการทำงานของยีน (gene knockout) salt induced kinase1 จาก Shizuoka University ซึ่งจะเรียกปลาหมากลายในรุ่นนี้ว่า F0 หรือ founder fish โดยปลาที่ถูกหยุดการทำงานของยีนจะได้รับการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมตรงตำแหน่งของยีนเป้าหมายด้วยวิธี CRISPR/Cas9 ตั้งแต่ยังเป็นไข่ในระยะ 1-2 เซลล์ จากนั้นนำปลาในรุ่น F0 ผสมกับ wild type (WT) จะได้ลูกรุ่น F1 ที่เป็น heterozygous mutant ทั้งหมด (รูปที่ 3.1) และปลาที่เป็นรุ่น F1 จะส่งมายังประเทศไทย ในขณะที่เป็นไข่ การอนุบาลลูกปลาได้ทำภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการที่ควบคุมแสงสว่าง 14 ชั่วโมง มีด 10 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ตามวิธีการมาตรฐานสำหรับเลี้ยงปลาหมากลายของ Westerfield (1995) ในตู้ขนาด 6,500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ให้อากาศอย่างเพียงพอ และมีการหมุนเวียนน้ำ ให้อาหาร 2 ครั้ง เวลา 9.00 และ 16.00 น. ต่อวัน ในช่วงเดือนแรกของตัวอ่อนจะให้ *Paramecium spp.* หลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนอาหารเป็น อาหารแผ่นสำเร็จรูป (tetra) ร่วมกับ *Paramecium spp.* และเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารแผ่นสำเร็จรูปอย่างเดียว เมื่อปลามีอายุ 2 เดือนจนถึงสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 3.1 การสร้างปลาหมากลายสายพันธุ์ด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 และการผสมพันธุ์ปลาหมากลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีนเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างขึ้นโดย Shizuoka University ก่อนจะมีการส่งมายังประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2 แผนการเพิ่มจำนวนปลาฆ่าลายกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัส (*sik1<sup>-/-</sup>*; *sik1* homozygous mutant )

การขยายพันธุ์ปลาอาศัยวิธีมาตรฐานเพื่อเพิ่มจำนวนปลาฆ่าลาย (Westerfield, 1995) เริ่มจับคู่ปลาฆ่าลายเพศเมีย และเพศผู้ ในถังสำหรับผสมพันธุ์ในช่วงเย็นเวลา 16.00 - 17.00 น. แล้วทิ้งไว้ข้ามคืน โดยเซลล์ไข่จะมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation ตอนเวลา 05.00 น. และ ovulation ตอนเวลา 08.00 น. หลังจากได้รับการกระตุ้นจากแสงในระบบเลี้ยง (รูปที่ 3.2) ตัวผู้และตัวเมียจะมีพฤติกรรมเกี่ยวพาราตี โดยตัวผู้จะใช้จะงอยปากคุนบริเวณด้านข้างท้องของตัวเมีย เพื่อกระตุ้นให้ตัวเมียมีการปล่อยไข่ออกสู่ภายนอก และรับการผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ของตัวผู้ หลังจากนั้นจะทำการเก็บไข่ปลา แล้วนำไปอนุบาลในจานเพาะเชื้อแบบพลาสติกเป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกว่าตัวอ่อนจะเริ่มมีพฤติกรรมว่ายน้ำ และกินอาหาร จึงปล่อยลงสู่ถังเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยปลาฆ่าลายจะใช้เวลาประมาณ 3 เดือนในการเจริญเติบโตเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์

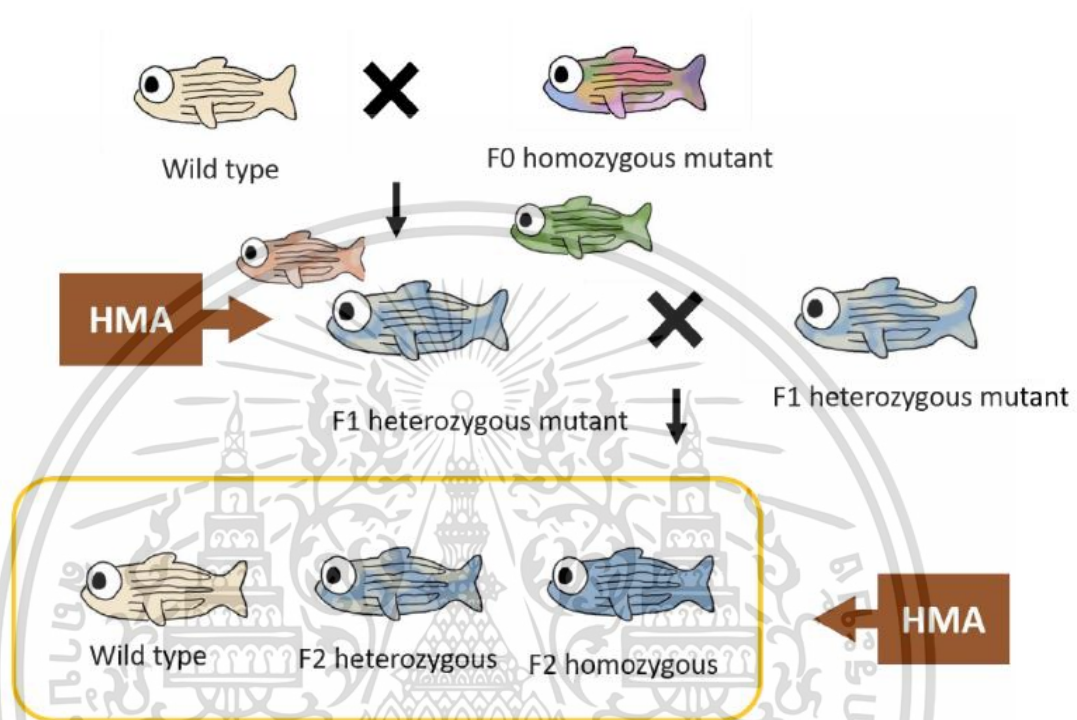


รูปที่ 3.2 การผสมพันธุ์ปลาฆ่าลายเพื่อขยายพันธุ์และเก็บตัวอย่างไข่เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

ในการผสมพันธุ์ปลาฆ่าลายเพื่อสร้างปลาฆ่าลายกลายพันธุ์แบบโฮโมไซกัส (*sik1<sup>-/-</sup>*; *sik1* homozygous mutant) จะเริ่มจากไข่ปลาที่เป็น F<sub>0</sub> ซึ่งได้จากการตัดแปลงรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9 จาก Shizuoka university ที่ตำแหน่งเป้าหมายผสมกับตัวที่เป็น wild-type ซึ่งจะได้ลูกรุ่น F<sub>1</sub> ที่มีการกลายพันธุ์แบบ heterozygous mutant แต่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้หลายรูปแบบ หรือเรียกได้ว่ามีหลาย strain ซึ่งต่อมากจะปลาฆ่าลายที่มีอายุมากกว่า 3 เดือนจะถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบการกลายพันธุ์บนสายดีเอ็นเอด้วยวิธี heteroduplex mobility assays (HMA ; รายละเอียดในหัวข้อ 3.3) เพื่อหาตัวผู้และตัวเมียที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสลักษณะเดียวกัน (strain เดียวกัน) แล้วนำ heterozygous (F<sub>1</sub>) เพศเมีย ผสมกับเพศผู้ heterozygous (F<sub>1</sub>) ที่เป็น strain เดียวกัน เพื่อสร้างตัวกลายพันธุ์แบบ homozygous mutant โดยใช้ตัวผู้และตัวเมียที่เป็น heterozygous mutant ที่มี strain เดียวกันผสมกันจะได้ลูกรุ่น F<sub>2</sub> ซึ่งจะมีโอกาส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นได้ทั้ง wild-type, heterozygous mutant และ homozygous mutant โดยปลาในรุ่น F2 จะถูกเลี้ยงดูจนมีอายุประมาณ 3 เดือนแล้วจึงทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอด้วยวิธี HMA อีกครั้ง (รูปที่ 3.3) เพื่อหาตัวที่เป็น homozygous mutant สำหรับใช้ในการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ต่อไป ตามวิธีการของ Klangnurak et al. (2018)



รูปที่ 3.3 : การผสมพันธุ์ปลาเพื่อให้ได้ homozygous mutant โดยทำการตรวจหาตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอเบื้องต้น (ตรวจหา strain) ด้วยวิธี heteroduplex mobility assay (HMA) ตั้งแต่ลูกรุ่น F1

### 3.3 ตรวจหาปลาที่เป็น mutant ด้วยวิธี heteroduplex mobility assays (HMA)

ปลาฆ่าหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีนด้วยวิธี CRSIPS/Cas9 จะมีการซ่อมแซมของสายดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกันออกไปซึ่งอาจมีการหายไปของลำดับเบสบางตำแหน่ง (deletion) การเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส (insertion) หรือการสลับทิศของลำดับเบสบางตำแหน่ง (inversion) สิ่งเหล่านี้ทำให้การถอดรหัส (translation) เป็นโปรตีนผิดไปจากปกติ ซึ่งอาจทำให้ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ของปลาฆ่าหลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีนเป้าหมายเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงต้องมีการใช้ heteroduplex mobility assays (HMA) มาใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเบื้องต้น โดยสังเกตการจากลักษณะของแถบดีเอ็นเอ เมื่อตรวจด้วย gel electrophoresis แบบแนวตั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยวิธี HMA เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform จากครีบบางของปลาม้าลายแล้วทำ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมายขนาด 185 bp โดย primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอ จะถูกออกแบบจาก genome sequence (ENSDARG00000058606) ด้วยโปรแกรม primer3plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) ให้ครอบคลุมตำแหน่งเป้าหมาย CGGCATCATGGTGATCATGA (รูปที่ 3.4) ซึ่งเป็นบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ในยีน *sik1* ที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (exon) และ บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอใกล้เคียงที่จะไม่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน (intron) โดยส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 2x Mytaq HS mix (Bioline, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer (ตามตารางที่ 3.1) ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และ DNA template ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะ (PCR condition) ที่ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นตรวจ PCR product ด้วย gel electrophoresis แบบแนวตั้งด้วย 15% non-denaturing polyacrylamide gel โดยใน 100 มิลลิลิตร (gel stock) ประกอบด้วย 40% acrylamide/bis 37.5 มิลลิลิตร 10X TBE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากเชื้อ 52.5 มิลลิลิตร เมื่อต้องการเตรียมเจลเพื่อทำ gel electrophoresis แบบแนวตั้ง จะต้องใช้ 15% non-denaturing polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในการเตรียมเจล 1 เจล แล้วเติม 10% ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว 1 ชั่วโมง หลังจากเจลแข็งตัวแล้ว สำหรับตัวอย่างของปลาม้าลายที่เป็น heterozygous mutant จะทำการผสม PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ 1X loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเพื่อให้สายของ DNA แยกออกจากกัน เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่องทำ PCR แล้วนำไปแช่ต่อน้ำแข็งทันทีเพื่อป้องกันการจับตัวอย่างถูกต้องของสายดีเอ็นเอ ก่อนจะนำตัวอย่างใส่ในหลุมเจล จากนั้นตรวจสอบด้วยการทำ gel electrophoresis ที่กำลังไฟ 150 วัตต์ ระยะเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วย midori green ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านเจล แล้วตรวจสอบตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้เทียบกับ wild-type ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า 1<sup>st</sup> HMA ส่วนตัวอย่างที่เป็น homozygous mutant จะทำขั้นตอน 1<sup>st</sup> HMA ตามที่อธิบายไว้ข้างต้นก่อน แล้วจึงทำ HMA อีกครั้ง หรือเรียกว่า 2<sup>nd</sup> HMA โดยจะทำการผสม PCR product ของตัวอย่างที่เป็น homozygous mutant ปริมาตร 3 ไมโครลิตร PCR product ของ wild-type 2 ไมโครลิตร และ 1X loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ซึ่งการทำ 2<sup>nd</sup> HMA จะต้องมีการเตรียมตัวอย่างของ wild-type ด้วย โดยจะผสม PCR product ของ wild-type ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ น้ำปราศจากเชื้อ 3 ไมโครลิตร และ 1X loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ และแช่ในน้ำแข็งก่อนจะนำตัวอย่างใส่ในหลุมเจลตามขั้นตอนที่ได้อธิบายไปข้างต้น แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบด้วยการทำ gel electrophoresis ที่กำลังไฟ 150 วัตต์ ระยะเวลามากกว่า 2 ชั่วโมงก่อนจะย้อมเจลด้วย midori green แล้วตรวจสอบลักษณะของแถบแบนดีเอ็นเอภายใต้เครื่องอ่านเจล เทียบกับ wild-type

```

5'.....ATAAATGTTTAGATTATCAGGGGATTGCTTTATAAATCAATAC
GTGTTTTGTGAAGCTTGTGATTGGATTGCATGTGTTTATGAGAATCAA
TAGATAATAATTTTTATTCTCCCTCTGAATATGTTTCATGAACCTCCATA
ATATTCATGCACGTTTATAATTTTCGTGTTTCTGGTCTATTGCAGATCAT
TTAAAGGTATCGCTGCGCTTAAGCACACACAAACACCGGCATCATGG
TGATCATGACGGACAGCAGGACGGGCTCTCACTCAAGCTGTGCCAG
GCGAGGCTCTTCAAGTCGGCTTCTACGAGATCATCAGAACCCTCGGC
AAGGGGAACCTTGCTGTGGTGAACTAGCCAGACACAAAGTAACGAA
AACACAGGCAAGTTTCTTGCATTATGCAACGCATACTATTTGTAAATC
ATTTGTAAATTTGTTATTTTGTTTTTATTAATTTAATATTATTATTA
ACAGTACTGCACAATACATTCTGCATTAAGTAACCACATTTTATTTCA
TTTTTCATGCAGGTTGCGATTAATAAATTGATAAAACAAGACTGAACT
CTGCTAATTTGGAGAAGATCTACAGGGAGGTTTCAGATTATGAAGCTGC
TTAATCACCTCACATCATAAAGCTCTAT.....3'

```

รูปที่ 3.4 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวนให้ได้ขนาด 185 bp (บริเวณสีเหลือง) และขนาด 641 bp (บริเวณสีเทา) บริเวณสีดำ คือบริเวณเป้าหมายของการตัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี CRISPR/Cas9

นอกจากนี้ตำแหน่งของดีเอ็นเอ ของปลาที่เป็น heterozygous mutant และ homozygous mutant จะถูกตรวจสอบอีกครั้งด้วยวิธี sequencing โดยเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมายขนาด 641 bp ด้วย PCR โดยมีการออกแบบ primer ตามวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยการออกแบบให้ครอบคลุมตำแหน่งเป้าหมาย และสามารถสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ทั้งในบริเวณที่เป็น exon และ intron โดยสารละลายที่ใช้ทำ PCR ประกอบด้วย 2x Mytaq HS mix (Bioline, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตามด้วย forward primer และ reverse primer (ตามตารางที่ 3.1) สำหรับการทำ sequencing ชนิดละ 2 ไมโครลิตร ภายใต้ PCR condition ที่ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที แล้วส่งตัวอย่างทำ purified และ sequencing ที่บริษัทธีระเทรคดิง เมื่อได้ข้อมูล sequencing ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยซอฟต์แวร์ CodonCode และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในปลาที่เป็น heterozygous mutant หรือ homozygous mutant เทียบกับลำดับเบสของปลาที่เป็น wild type แล้วทำการอ่านผลลำดับเบสให้เป็นกรดอะมิโน (amino acid alignment) ด้วยซอฟต์แวร์ MEGA เวอร์ชัน 6.0.6

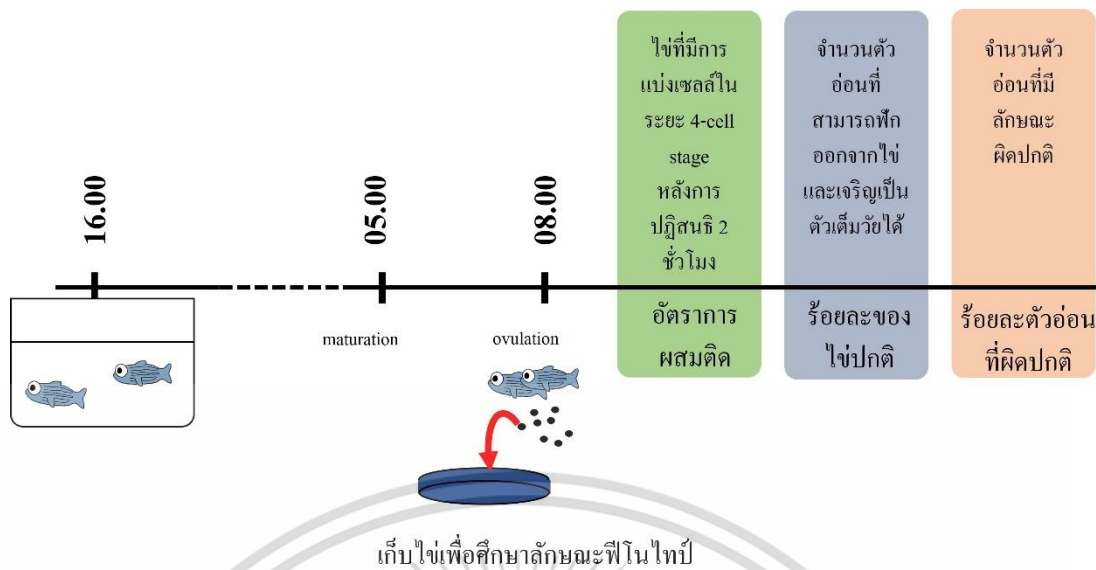
ตารางที่ 3.1 Primer ที่ใช้สำหรับทำ HMA และ sequencing

	Forward Primer	Reward Primer	Ta (°C)
HMA	AGAGAAGACCAAAGTTGATT	ATAGGATGGCTAGTATTGTG	60
Sequencing	TCGTGTTTCTGGTCTATTGCAG	TCGGCAAGGGGAAGTTTGCTG	60
	ATCA		

### 3.4 ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์

ใช้ปลาฆ่าตายเพศเมียที่เป็น *sik1<sup>-/-</sup>* 5 ตัว ตัวเมียที่เป็น wild type 5 ตัว และ เพศผู้ที่เป็น wild type 10 ตัว โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุม คือจับคู่ปลาฆ่าตายที่เป็น wild type ทั้งเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 5 คู่ และกลุ่มทดลองที่ใช้ตัวเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* จำนวน 5 ตัวผสมกับตัวผู้ที่เป็น wild type จำนวน 5 ตัวในถังสำหรับผสมพันธุ์ถึงละ 1 คู่ ควบคุมแสงในระบบเลี้ยงให้เปิดตอน 08.00 น. เพื่อกระตุ้นให้ไข่เข้าสู่ระยะ ovulation (รูปที่ 3.2) ในกรณีที่ปลาตัวเมียสามารถปล่อยไข่ได้จะเก็บตัวอย่างไข่และนับจำนวนไข่ของแต่ละเช้าทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อนำไปศึกษาร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ (รูปที่ 3.5) โดยหลังจากเก็บไข่แล้วจะนำไปสังเกตการพัฒนาของไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ในเวลา 2 ชั่วโมงจะทำการศึกษาร้อยละของไข่ผสมติด โดยไข่ปลาที่ได้รับการผสมจะมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ 4-cell stage จากนั้นจะทำการนับจำนวนแล้วแยกไข่ที่ได้รับการผสม เพื่อใช้ในการศึกษาร้อยละของไข่ที่ปกติ และร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติต่อไป โดยหลังจากที่ตัวอ่อนมีการฟัก ได้นับจำนวนลูกปลาฆ่าตายที่ฟักออกมาจากไข่ และศึกษาลักษณะภายนอกของตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทั้งนี้ปลาฆ่าตายทุกคู่จะทำการผสมซ้ำอีก 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.5 : แผนผังการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์

### 3.4.1 ร้อยละของไข่ผสมติด (normal egg)

หลังจากเก็บตัวอย่างไข่ปลา 2 ชั่วโมงจะทำการนับจำนวนของไข่ที่ได้รับการผสม โดยลักษณะของเซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วภายในเวลา 2 ชั่วโมงไข่จะมีการแบ่งเซลล์เข้าสู่ 4-cell stage และไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะไม่มีมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น แล้วนำไปหาร้อยละตามสมการที่ 2 โดยเปรียบเทียบระหว่าง wild-type และ *sik1<sup>-/-</sup>*

$$\text{ร้อยละไข่ผสมติด} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการผสม}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \quad (1)$$

### 3.4.2 ร้อยละของที่ไม่ได้รับการผสม (unfertilized egg)

หลังจากเก็บตัวอย่างไข่ปลา 2 ชั่วโมงจะทำการนับจำนวนของไข่ที่ได้รับการผสม โดยลักษณะของเซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิเมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงไข่จะยังอยู่ในระยะ 1-cell stage ซึ่งจะไม่มีการแบ่งเซลล์เข้าสู่ 4-cell stage และ โดยจะนับจำนวนของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม แล้วนำไปหาร้อยละตามสมการที่ 2 โดยเปรียบเทียบระหว่าง wild-type และ *sik1<sup>-/-</sup>*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ไม่ได้รับการผสม}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.4.3 ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ (abnormal larva)

การพัฒนาของตัวอ่อนจะสังเกตการภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 2 ชั่วโมงในวันแรก หลังจากไข่ปฏิสนธิ จากนั้นจะสังเกตวันละครั้งในช่วงเช้า จนปลาฟักออกจากไข่ โดยทำการนับจำนวนของตัวอ่อนที่มีลักษณะปกติและไม่ปกติหลังจากฟักตัวออกจากไข่ แล้วเปรียบเทียบระหว่าง wild type และ *sik1<sup>-/-</sup>* จากนั้นหาร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติตามสมการที่ 3

$$\text{ร้อยละการพัฒนาของตัวอ่อน} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่พัฒนาผิดปกติ}}{\text{จำนวนตัวอ่อนทั้งหมด}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.5 ศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่

ใช้ปลาฆ่าตายเพศเมีย wild-type จำนวน 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม และ *sik1<sup>-/-</sup>* จำนวน 10 ตัวเป็นกลุ่มทดลอง โดยชักนำการพัฒนาของไข่ปลาด้วย 17,20 $\beta$ -DHP (17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one) ด้วยวิธี *in vivo* ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ต่อปลา 1 ตัว ตามวิธีการของ Klangnurak et al. (2018) ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส และให้แสงตลอดเวลา โดยทำการกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นตัวแทนของรังไข่ในกลุ่ม maturation และ ovulation ตามลำดับ เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการเก็บตัวอย่างปลาฆ่าตายเพศเมียตามระยะเวลาที่กำหนดข้างต้น โดยทำการการุณยฆาตด้วยการตัด spinal cord แล้วตัดส่วนหัว หาง และเปิดช่องท้องเล็กน้อย ก่อนดองตัวอย่างปลาฆ่าตายใน 10% buffer formalin ให้ได้ระยะเวลามากกว่า 48 แล้วทำการ dehydrate ด้วย ethanol จากนั้นฝังลงใน paraffin ก่อนที่จะนำไปตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome (Microtome รุ่น HM 335E) ความหนา 4 ไมโครเมตร แล้วย้อมตัวอย่างด้วยสี hematoxylin และ eosin ตามวิธีการของ Tang et al. (2016) แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจำแนกเซลล์ไข่ในรังไข่แต่ละระยะตามตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบระหว่าง homozygous mutant และ wild type และวัดขนาดของไข่ในระยะ V ในรังไข่ของปลาฆ่าตาย *sik1<sup>-/-</sup>* เพื่อเปรียบเทียบกับไข่ในระยะ V ในรังไข่ของปลาฆ่าตาย wild-type ภายใต้

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Olympus BX51 BF/DF Transmitted/Reflected Light Microscope, Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่เป็นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.6 gene expression

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *casps3a* ที่จะถอดรหัสเป็น โปรตีน caspase-3 ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (effectors) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ในขณะที่เซลล์เกิด apoptosis และยีน X-linked inhibitor of apoptosis protein (*XIAP*) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเกิด apoptosis โดยใช้ real-time PCR ตรวจสอบในปลาหม้าย *sik1<sup>-/-</sup>* จำนวน 10 ตัว และ wild type จำนวน 10 ตัว เช่นกันจากนั้นกระตุ้นการพัฒนาของไข่ด้วย 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงเพื่อเป็นตัวอย่างของรังไข่ระยะ maturation และ ovulation เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น เมื่อครบเวลาแล้วทำการเก็บตัวอย่างรังไข่ของปลาหม้ายจะทำการการุณฆาตด้วยการตัด spinal cord แล้วเปิดช่องท้องเพื่อเก็บตัวอย่างของรังไข่ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ หรือ eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้ว fix ในไนโตรเจนเหลว 10 วินาทีเพื่อหยุดการทำงานของยีนต่างๆ จากนั้นย้ายไปเก็บที่ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัด RNA

ทำการสกัด RNA โดยใช้ Presto™ DNA/RNA Extraction Kit แล้ววัดปริมาณ และคุณภาพ ของ RNA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260, 280, และ 320 นาโนเมตร จากนั้นใช้ RNA ที่สกัดได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม มาทำการ reverse ให้เป็น cDNA โดยใช้ SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline Reagent Ltd., London) แล้วนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Real-time PCR ((LineGene K Plus Real-Time PCR Detection System, Bioer, China) โดยเตรียมสารละลายสำหรับทำ real-time PCR ที่ประกอบด้วย SYBR green PCR Master Mix 10 ไมโครลิตร forward และ reverse primer (ตารางที่ 3.2) ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และ cDNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ภายใต้ qPCR condition ที่ pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 40 รอบ ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที เพื่อวิเคราะห์ melting curve ซึ่งใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของการเพิ่มจำนวน cDNA แล้วคำนวณหาการแสดงออกของยีนแบบ relative expression โดยเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนที่เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ที่สามารถพบได้ในทุกบริเวณนั้นคือ elongation factor 1-alpha 1 (*ef1 $\alpha$* ) ตามสมการที่ 4

$$\text{Relative expression} = \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมาย}}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } ef1\alpha} \quad (4)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 Primer ที่ใช้สำหรับทำ real-time PCR

Target gene	Forward Primer	Reward Primer	Ta (°C)
<i>casp3a</i>	AGCCTCAATCCCATGCCTTC	ATGCCTGTCCTGCGATCAA	60
<i>XIAP</i>	ATGTATCCTGTTGTGCCGCA	CGAACTGGAGAGTCTGCTGG	60
<i>ef<math>\alpha</math></i>	TCAAACATGGGCTGGTTC	ATCAAGGGCATCAAGAAGAGTAGT	60

### 3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

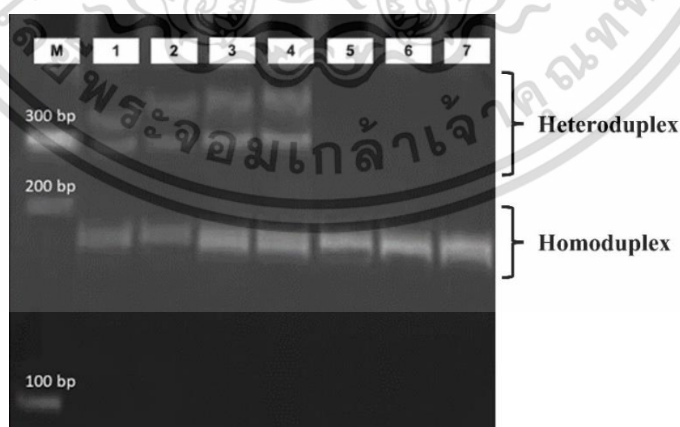
กำหนดสมมุติฐานหลัก ( $H_0$ ) ของการทดลองคือไข่ที่ได้จากปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* นั้นจะมี ร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ ลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ในแต่ละระยะ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis ไม่ความแตกต่างกับใน wild-type และกำหนดสมมุติฐานรอง ( $H_1$ ) ของการทดลองนี้คือไข่ที่ได้จากปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* นั้นจะมีร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ ลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ในแต่ละระยะ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis มีความแตกต่างกับใน wild-type โดยตรวจสอบสมมุติฐานของการทดลองนี้ด้วย t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ทั้งร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน ลักษณะทางพยาธิสภาพของไข่ในรังไข่แต่ละระยะคิดเป็นร้อยละขนาดของไข่ในรังไข่ระยะ ovulation และค่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis โดยได้ตรวจสอบข้อตกลงเบื้องต้นแล้วว่า ข้อมูลทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี t-test ได้ และค่าทั้งหมดที่แสดงในรายงานเป็นค่า mean  $\pm$  S.E. การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม IBM statistic SPSS version 28.0.0.0

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสาย DNA

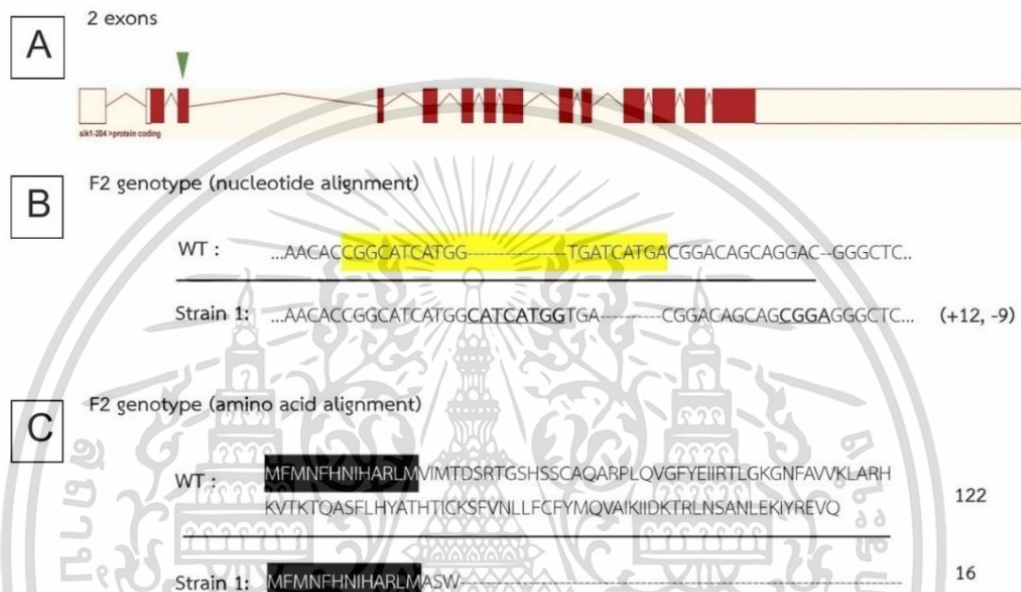
จากการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของปลาหมึกหลายด้วยวิธี HMA จะช่วยให้สามารถจำแนกปลาที่เป็นตัวกลายพันธุ์แบบ *sik1*<sup>(+/-)</sup> และ *sik1*<sup>(-/-)</sup> โดยลักษณะที่ปรากฏของแถบแบนจะมีลักษณะเป็นแบบ multiple heteroduplex เนื่องจากปลาที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygous จะมีส่วนหนึ่งของลำดับเบสที่เหมือนกับ wild-type และอีกส่วนหนึ่งเป็นส่วนที่ถูกตัดแปลงด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 หลังจากแยกสายคู่ของ DNA ด้วยความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีทำให้สาย DNA มีการจับคู่กันอย่างไม่เป็นแบบแผน ทำให้เกิดเป็นแถบแบนแบบ heteroduplex 2 แถบ ซึ่งเกิดจากการจับตัวกันของท่อน DNA ที่มีทั้งส่วนที่จับกันสนิท และไม่สนิท จึงมักเคลื่อนที่ช้ากว่าแบนที่เป็น homoduplex โดยปลาที่มี strain เดียวกันจะมีลักษณะของแถบแบนแบบเดียวกัน (รูปที่ 4.1) ซึ่งต่างกับปลาหมึกที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ wild-type จะมีแถบแบนปรากฏเพียง 1 แถบแบนเท่านั้นหรือเรียกว่า homoduplex ในขณะที่ปลาหมึกที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous mutant นั้นเมื่อทำ 2<sup>nd</sup> HMA ซึ่งเป็นการผสมตัวอย่างระหว่าง wild-type และ homozygous mutant ซึ่งลักษณะของแถบแบนที่ปรากฏก็จะมีลักษณะเป็น heteroduplex เช่นเดียวกับ heterozygous mutant



**รูปที่ 4.1** 15% non-denaturing gel จาก heteroduplex mobility assay โดย M คือ HyperLadderTM 100bp, ตัวอย่างที่ 1-4 คือ ปลาที่มีกลายพันธุ์แบบเฮเทอโรไซกัส (*sik1*<sup>(+/-)</sup>) และตัวอย่างที่ 5-7 คือ ปลาที่เป็นไวลด์ไทป์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบพันธุกรรมด้วยวิธี sequencing พบว่าตำแหน่งเป้าหมาย (target site) บนยีน *sik1* ของปลาหมึกหลายที่เป็น homozygous mutant มีการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส (insertion) 12 ตำแหน่ง และมีลำดับเบสหาย (deletion) ไป 9 ตำแหน่ง (รูปที่ 4.2B) ทำให้ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สร้างกรดอะมิโนได้เพียง 3 ตำแหน่ง ก่อนที่จะถึงส่วนที่เป็น stop codon (รูปที่ 4.2C) ซึ่งทำให้ไม่สามารถแปลรหัส (translation) เป็นกรดอะมิโนตัวอื่นได้อีก



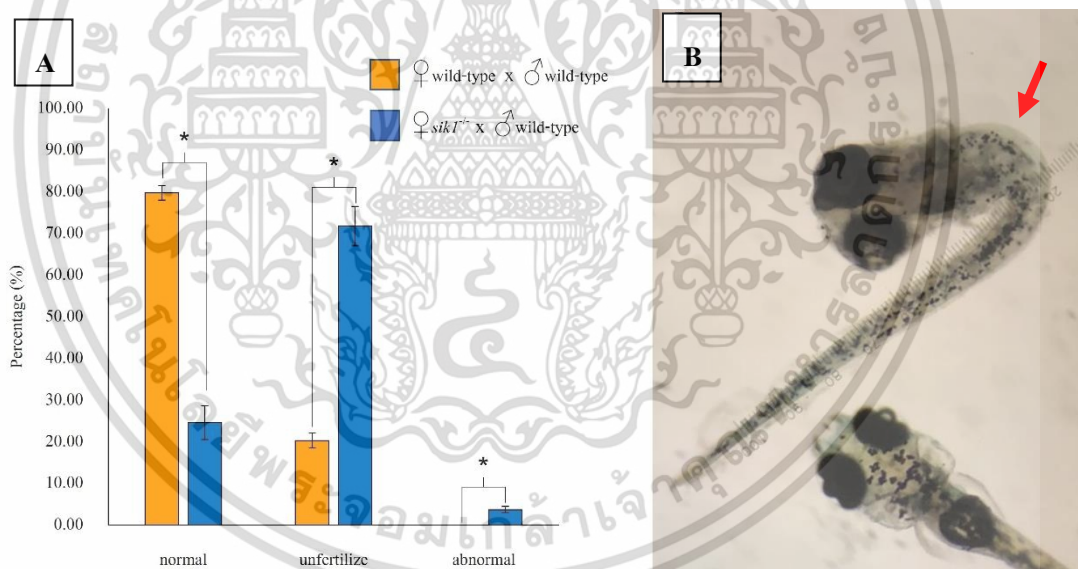
รูปที่ 4.2 ลักษณะทางจีโนมไทป์ของปลาหมึกหลายหลังจากยีน *sik1* ถูก knockout โดย (A) จำนวน exon ทั้งหมดบนยีน *sik1* โดยบริเวณลูกศรสีเขียวชี้ให้เห็นถึง exon ตำแหน่งที่ 2 บนยีน *sik1* ที่ Cas9 เข้าไปตัด (B) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Cas9 เข้าไปตัด เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสายดีเอ็นเอ บริเวณที่ไฮไลต์สีเหลืองแสดงถึงตำแหน่งเป้าหมาย โดย WT คือปลาหมึกหลาย wild-type และ strain1 คือปลาหมึกหลาย *sik1*<sup>-/-</sup> ตัวเลขหลังลำดับนิวคลีโอไทด์ เครื่องหมาย + แสดงถึงการเกิด insertion และ - แสดงถึงการเกิด deletion (C) แสดงกรดอะมิโนที่สามารถทรานสเลชันได้ โดย WT คือปลาหมึกหลาย wild-type และ strain1 คือปลาหมึกหลาย *sik1*<sup>-/-</sup> และตัวเลขหลังกรดอะมิโนแสดงจำนวนของกรดอะมิโนที่สามารถทรานสเลชันได้

#### 4.2 การแสดงออกทางฟีโนไทป์และลักษณะทางพยาธิสภาพ

ทั้งนี้เมื่อทำการผสมปลาหมึกหลายเพื่อศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ร้อยละจำนวนไข่ผสมติด ร้อยละของจำนวนไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และ ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ (รูปที่ 4.3)

พบว่า ไข่ปลาที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างปลาหมึกหลายตัวเมีย wild-type ผสมกับ ตัวผู้ wild-type ที่ได้รับจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

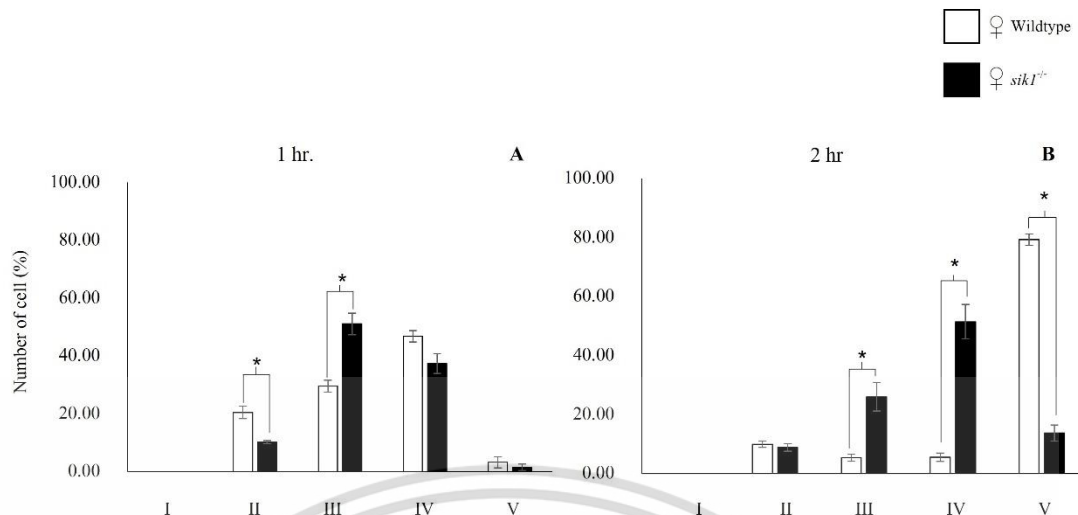
การผสมทั้งหมด 5 คู่ โดยแต่ละคู่มีการผสมซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งหมดจำนวน 725 ฟอง และ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ปลาแม่ลายเพศเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* ผสมกับตัวผู้ wild-type ที่ได้รับจากการผสมทั้งหมด 5 คู่ โดยแต่ละคู่มีการผสมซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งหมดจำนวน 1082 ฟอง พบว่าในปลาแม่ลาย wild-type มีร้อยละไข่ที่ได้รับการผสมเท่ากับ  $79.72 \pm 1.76$  ซึ่งมากกว่าในปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* ซึ่งมีอยู่เพียงร้อยละ  $24.55 \pm 9.09$  อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ( $df=8, t=12.46, p<0.001$ ) ในส่วนของไข่ที่ไม่ได้รับการผสมในปลาแม่ลาย wild-type อยู่ร้อยละ  $20.28 \pm 1.77$  ส่วนปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* มีร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสมอยู่ที่  $71.77 \pm 4.69$  เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าปลาแม่ลาย wild-type นั้นมีร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสมน้อยกว่าปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ( $df=8, t=-10.265, p<0.001$ ) ส่วนร้อยละของความผิดปกติของตัวอ่อนพบว่าในปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* นั้นมีอยู่ร้อยละ  $3.68 \pm 0.79$  โดยมีลักษณะของลำตัวทึบ และไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้ (รูปที่ 4.3B) แต่ไม่พบความผิดปกติของตัวอ่อนใน wild-type และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่า ปลาแม่ลาย wild-type นั้นมีร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติน้อยกว่าในปลาแม่ลาย *sik1<sup>-/-</sup>* อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ( $df=8, t=-4.638, p=0.002$ )



รูปที่ 4.3 (A) ลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ ร้อยละจำนวนไข่ผสมติด (normal) ร้อยละของไข่ไม่ได้รับการผสม (unfertilized) และ ร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติ (abnormal) จากปลาแม่ลายเพศเมีย wild-type ผสมกับตัวผู้ wild-type (กราฟแท่งสีเหลือง ;  $n = 725$ ) และ ปลาแม่ลายเพศเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* ผสมกับตัวผู้ wild-type (กราฟแท่งสีฟ้า ;  $n = 1082$ ) โดยเครื่องหมายดอกจันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (B) ลักษณะผิดปกติของตัวอ่อนที่พบได้จากปลาแม่ลายเพศเมีย *sik1<sup>-/-</sup>* ผสมกับตัวผู้ wild-type โดยมีลักษณะลำตัวทึบ (ลูกศรสีแดง)

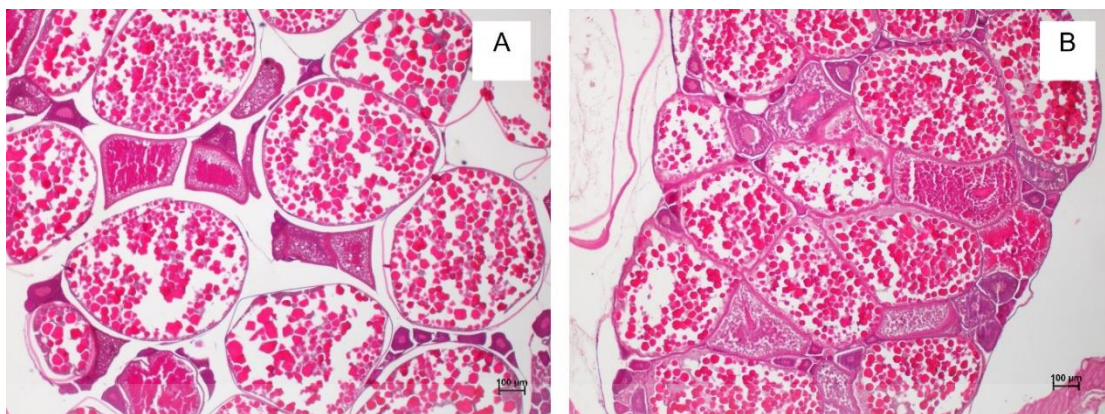
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาจำนวนของไข่ปลาในแต่ละระยะ โดยจำแนกตามตารางที่ 2.1 หลังจากทำการกระตุ้นการพัฒนาของไข่ด้วยฮอร์โมน  $17,20\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นตัวแทนของรังไข่ในกลุ่ม maturation และ ovulation ทั้งในปลาหมักลายที่เป็น wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าในรังไข่ของ wild-type ที่กระตุ้นด้วย  $17,20\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นั้นไม่พบเซลล์ไข่ใน ระยะ I มีเซลล์ไข่ใน II อยู่ร้อยละ  $20.55 \pm 2.14$  ระยะ III อยู่ร้อยละ  $29.48 \pm 1.99$  ระยะ IV ร้อยละ  $46.76 \pm 3.55$  และระยะ V อยู่ร้อยละ  $3.20 \pm 1.93$  ส่วนในรังไข่ของ *sik1*<sup>-/-</sup> ไม่พบไข่ในระยะ I เช่นเดียวกับในรังไข่ของปลาหมักลาย wild-type และพบไข่ในระยะ II ร้อยละ  $10.05 \pm 0.55$  ระยะ III ร้อยละ  $51.20 \pm 3.74$  ระยะ IV ร้อยละ  $37.64 \pm 3.40$  และระยะ V อยู่ร้อยละ  $1.11 \pm 1.11$  เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ไข่ในรังไข่ของปลาหมักลาย wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าในระยะ II ( $df=28, t=4.749, p<0.001$ ) และ III ( $df=28, t=-5.123, p<0.001$ ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในระยะ IV ( $df=28, t=1.855, p=0.074$ ) และ V ( $df=28, t=0.939, p=0.356$ ) นั้นจำนวนของไข่ในรังไข่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.4A) ในกลุ่มของ ovulation หลังจากทำการกระตุ้นการพัฒนาของไข่ด้วยฮอร์โมน  $17,20\beta$ -DHP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าในรังไข่ของ wild-type ไม่พบไข่ในระยะ I ส่วนระยะ II พบร้อยละ  $9.56 \pm 1.09$  ระยะ III ร้อยละ  $5.82 \pm 1.12$  ระยะที่ IV ร้อยละ  $5.67 \pm 1.37$  และระยะ V ร้อยละ  $78.95 \pm 1.92$  ส่วนในขณะที่ในรังไข่ของ *sik1*<sup>-/-</sup> ไม่พบไข่ในระยะ I เช่นกัน และมีจำนวนของไข่ในระยะ II อยู่ร้อยละ  $8.59 \pm 1.33$  ระยะ III ร้อยละ  $25.07 \pm 4.86$  ระยะ IV ร้อยละ  $52.99 \pm 5.82$  และระยะ V อยู่ร้อยละ  $13.34 \pm 2.72$  โดยจำนวนของไข่ในรังไข่แต่ละระยะเมื่อเปรียบเทียบระหว่างรังไข่ของปลาหมักลาย wild-type และรังไข่ของปลาหมักลาย *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าจำนวนของไข่ในระยะ II ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> ( $df=28, t=0.562, p=0.579$ ) แต่เมื่อเปรียบเทียบจำนวนไข่ในระยะ III ( $df=28, t=-3.866, p<0.001$ ), IV ( $df=28, t=-7.914, p<0.001$ ) และ V ( $df=28, t=19.664, p<0.001$ ) ระหว่าง wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าทั้ง 3 ระยะมีจำนวนไข่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.4B)



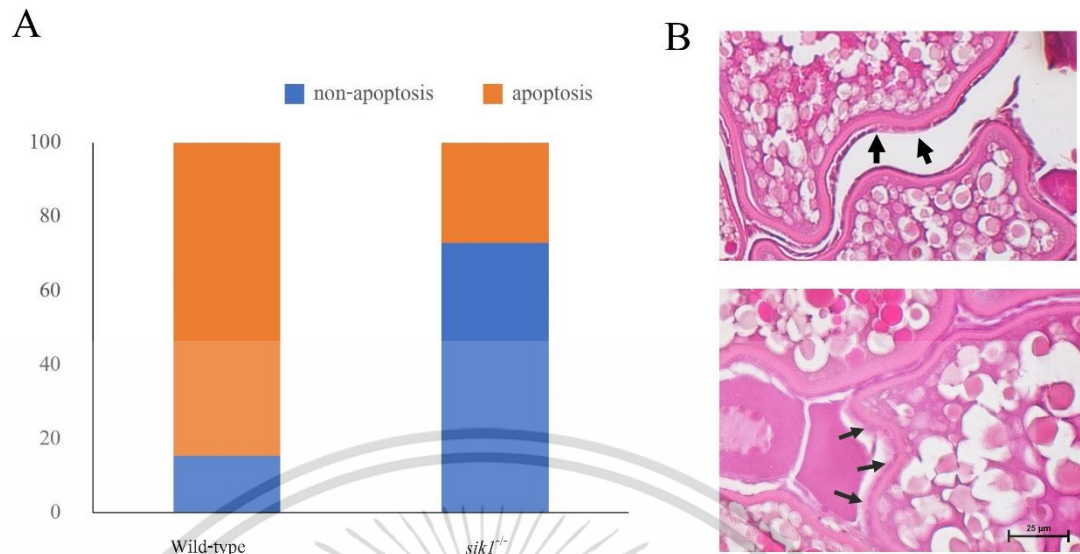
**รูปที่ 4.4** ร้อยละของจำนวนเซลล์ไข่แต่ละระยะในกลุ่มตัวอย่างที่กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ไข่ด้วย 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อเป็นตัวอย่างของกลุ่ม maturation (A) และ 2 ชั่วโมงเพื่อเป็นตัวอย่างของกลุ่ม ovulation (B) โดยแท่งสีขาวแสดงถึงร้อยละของจำนวนเซลล์ไข่ของปลาหมึกสาย wild-type และแท่งสีดำแสดงถึงจำนวนเซลล์ไข่ของปลาหมึกสาย *sik1*<sup>-/-</sup> ส่วนเครื่องหมายดอกจันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อพิจารณาลักษณะทางพยาธิสภาพโดยหลังจากกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ไข่ด้วย 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่เป็นตัวอย่างของกลุ่ม ovulation ในปลาหมึกสาย wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าลักษณะของไข่ระยะ V ของปลาหมึกสาย *sik1*<sup>-/-</sup> มีรูปร่างของไข่ที่แตกต่างไปจาก wild-type (รูปที่ 4.5) อีกทั้งในปลาหมึกสาย *sik1*<sup>-/-</sup> ไม่มีการแยกตัวของเซลล์ไข่ก่อนการปล่อยออกนอกตัว และมียังยึดติดกันแน่นผิดปกติ และยิ่งเมื่อพิจารณาถึงขนาดของไข่ในระยะ V พบว่าปลาหมึกสาย wild-type มีขนาดของไข่ระยะ V เฉลี่ยอยู่ที่ 698.76 $\pm$ 16.58 ไมโครเมตร ส่วนปลาหมึกสาย *sik1*<sup>-/-</sup> นั้นมีขนาดของไข่ระยะ V เฉลี่ยอยู่ที่ 555.94 $\pm$ 21.87 ไมโครเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างขนาดของไข่ระยะ V ในปลาหมึกสาย wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าไข่ระยะ V ของปลาหมึกสาย wild-type มีขนาดใหญ่กว่าไข่ระยะ V ของปลาหมึกสาย *sik1*<sup>-/-</sup> อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (df=32, t= 5.204,  $p < 0.001$ )



รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัภาพริศภาพของรังไข่ปลาฆ่าตายหลังจากกระตุ้นด้วย  $17,20\beta$ -DHP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้รังไข่ของปลาฆ่าตายมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation โดย (A) เป็นตัวอย่างของรังไข่ปลาฆ่าตาย wild-type ส่วน (B) เป็นตัวอย่างของปลาฆ่าตาย *sik1*<sup>-/-</sup> (homozygous mutant) ขนาดของ scale bar = 100 ไมโครเมตร

ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนของไข่ที่มีการเกิด apoptosis โดยทำการเปรียบเทียบกันในตัวอย่างรังไข่หลังจากกระตุ้นด้วย  $17,20\beta$ -DHP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตัวอย่างของรังไข่กลุ่ม ovulation ของปลาฆ่าตาย wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่า ในรังไข่ของปลาฆ่าตาย wild-type มีร้อยละของไข่ที่เกิด apoptosis อยู่  $84.63 \pm 1.44$  ในขณะที่ใน *sik1*<sup>-/-</sup> นั้นมีจำนวนของไข่ที่เกิด apoptosis อยู่เพียงร้อยละ  $27.08 \pm 5.19$  (รูปที่ 4.6) ซึ่งน้อยกว่าใน wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $df=28, t=10.685, p<0.001$ )



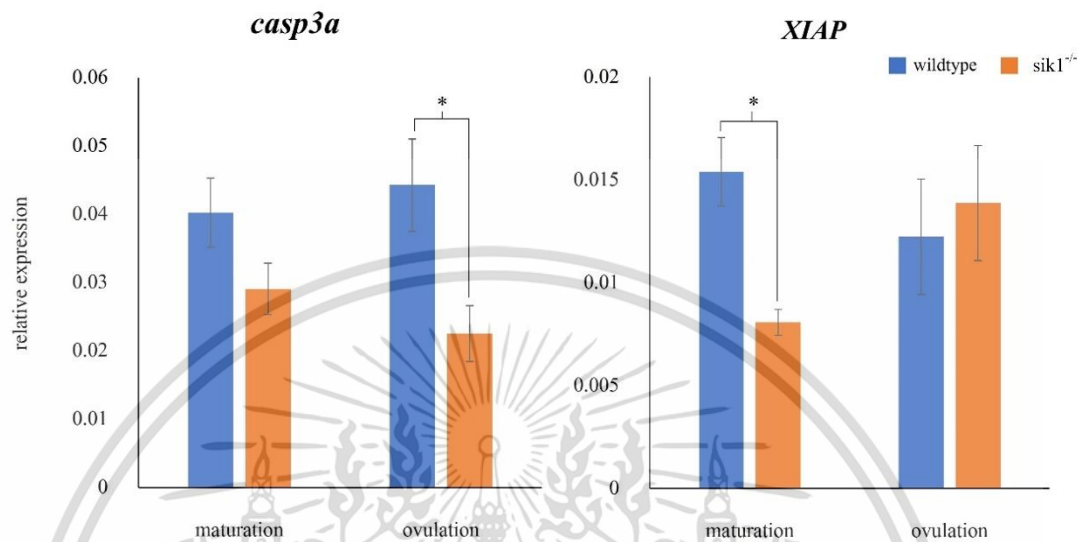
รูปที่ 4.6 (A) ร้อยละของเซลล์ที่เกิด apoptosis ในรังไข่ระยะ ovulation ที่สัมพันธ์ถึงร้อยละของไข่ที่มีการเกิด apoptosis และสีน้ำเงินแสดงถึงร้อยละของไข่ที่ไม่มีการเกิด apoptosis (B) บริเวณลูกศรชี้แสดงถึงลักษณะของเซลล์ที่เกิด apoptosis บริเวณไข่ของปลาหมึก

#### 4.3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ได้แก่ ยีน *casp3a* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และชีวเคมีระหว่างที่เซลล์เกิด apoptosis และยีน *XIAP* ที่มีหน้าที่เป็นยีนยับยั้งการเกิด apoptosis ผ่านการยับยั้งการทำงานของ *casp3*, 7, และ 9 (Dyer et al., 2019) เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* ในตัวอย่างรังไข่ของปลาหมึกเพศเมีย wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> หลังจากกระตุ้นการพัฒนาของไข่ด้วย 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง เพื่อเป็นตัวอย่างของรังไข่ที่อยู่ในระยะ maturation และ ovulation ด้วย real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *casp3a* ในรังไข่ระยะ maturation นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างปลาหมึก wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> ( $df=8$ ,  $t=1.792$ ,  $p=0.111$ ) แต่ในรังไข่ที่อยู่ในระยะ ovulation พบว่า ยีน *casp3a* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในรังไข่ของปลาหมึก *sik1*<sup>-/-</sup> เมื่อเทียบกับ wild-type ( $df=7$ ,  $t=0.029$ ,  $p=0.031$ ) ส่วนการแสดงออกของยีน *XIAP* พบว่าในรังไข่ระยะ maturation ของปลาหมึก wild-type ยีนนี้มีการแสดงออกสูงกว่าในรังไข่ของปลาหมึก *sik1*<sup>-/-</sup> อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $df=7$ ,  $t=8.761$ ,  $p<0.001$ ) แต่ในรังไข่ระยะ ovulation พบว่าการแสดงออกของยีน *XIAP* ไม่มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในรังไข่ของปลาฆ่าตาย wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> (df= 6, t= -0.042,  $p=0.968$ ) (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 การแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* ในรังไข่ระยะ maturation และ ovulation จากปลาฆ่าตายเพศเมีย wild-type (กราฟแท่งสีน้ำเงิน) และปลาฆ่าตายเพศเมีย *sik1*<sup>-/-</sup> (กราฟแท่งสีส้ม) โดยเครื่องหมายดอกจันบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ

การเปลี่ยนแปลงลำดับพันธุกรรมด้วยเทคนิค CRIPRS/Cas9 เป็นวิธีการที่อาศัยหลักการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนสายดีเอ็นเอตรงตำแหน่งเป้าหมาย โดยชักนำให้เกิดการแตกหัก หรือการแยกกันของสายคู่ดีเอ็นเอ (DNA double stand break ; DSB) ซึ่งการซ่อมแซมของสายดีเอ็นเอแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะคือ homology-directed repair (HDR) และ non-homologous end joining (NHEJ) โดย HDR จะเป็นการซ่อมแซมสายของดีเอ็นเอ โดยการทำให้เกิดการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบสการหายไปของลำดับเบส หรือการเกิดการกลายพันธุ์เพียงเล็กน้อยบนสายคู่ของดีเอ็นเอหลังจากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปจากเดิม เพื่อซ่อมแซมตัวเองโดยใช้ ลำดับเบสของ sister chromatids ซึ่งเป็น chromatid ที่มี chromosome เหมือนกับ chromatid เดิม ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเป็นต้นแบบ (Shao et al., 2017) ในการซ่อมแซมตัวเองให้กลับเข้าสู่สภาวะเดิมหลังจากที่สายของดีเอ็นเอเกิดความเสียหายจากปัจจัยใดๆ และอีกลักษณะหนึ่งของการซ่อมแซมสายของดีเอ็นเอคือ non-homologous end joining (NHEJ) คือการซ่อมแซมสายดีเอ็นเออย่างไม่มีแบบแผน ทำให้เมื่อสายของดีเอ็นเอถูกตัดออกจากกัน บริเวณนั้นจะสามารถซ่อมแซมตัวเองได้หลายรูปแบบ นำไปสู่การกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งอาจเกิดการเพิ่มเข้าของลำดับเบส (insertion) การหายไปของลำดับเบส (deletion) บางตำแหน่ง หรือ การเปลี่ยนตำแหน่ง (translocation) ที่บริเวณโลคัส (locus) ของตำแหน่งเป้าหมาย ซึ่งตามผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้พบว่าหลังจากลำดับนิวคลีโอไทป์บนสายดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงไปนั้นเกิดการซ่อมแซมตัวเองแบบ non-homologous end joining (NHEJ) ส่งผลทำให้กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้เกิดการทรานสเลชันที่ผิดปกติ (Ran et al., 2013; Yu et al., 2014) ดังนั้นในการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในปลาหม้อลาย โดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ไม่เพียงแต่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในอัตราที่สูงเท่านั้น แต่อาจสร้างตัวกลายพันธุ์ได้หลายรูปแบบด้วยเช่นกัน

#### 5.2 การแสดงออกทางฟีโนไทป์และลักษณะทางพยาธิสภาพ

ปลาหม้อลายเป็นปลาที่มีรังไข่เป็นแบบ asynchronous (Ribas and Piferrer, 2014) จึงทำให้สามารถพบเซลล์ไข่ได้ทุกระยะของการพัฒนา ตามการศึกษาของ Tokumoto et al. (2011) มีการใช้ 17,20 $\beta$ -DHP ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ maturation inducing hormone เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการพัฒนาของเซลล์ไข่ด้วยวิธี *in vivo* พบว่า 17,20 $\beta$ -DHP สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ไข่ของปลาหม้อลายพัฒนาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่จะระบุชื่อต้นทางการค้นคว้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะ immature ให้เข้าสู่ระยะ maturation ได้ และเกิด germinal vesicle breakdown (GVBD) ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ไข่ที่บ่งบอกถึงการเข้าสู่ระยะ ovulation ในเวลา 2 ชั่วโมง โดย  $17,20\beta$ -DHP จะมีปฏิสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ในชั้น theca และ granulosa ที่ชั้น theca จะมีการสร้าง  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone แล้วถูกเปลี่ยนเป็น  $17\alpha,20\beta$ -DHP ที่ชั้น granulosa โดยการทำงานของ  $20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $20\beta$ -HSD) การเหนี่ยวนำการพัฒนาของเซลล์ไข่ด้วย  $17,20\beta$ -DHP นั้นคือการชักนำให้เกิดการทำงานของ cyclin-B ที่เป็นตัวกลางที่ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ แล้วทำให้ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ maturation จากนั้น genomic pathway จะทำงานต่อเพื่อทำให้เซลล์ไข่พัฒนาสู่ระยะ ovulation โดย maturation inducing hormone จะเข้าจับกับตัวรับ (receptor) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear progesterin receptor ; nPR) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มนิวเคลียสและชักนำให้ไข่พัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation ผ่านทาง cAMP-PKA pathway ส่งผลให้มีการผลัดเซลล์ไข่ในระยะ maturation ออกจากชั้น follicle layer ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่และพัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation (Nagahama, 1997; Tokumoto et al., 2011)

ตามการผลการทดลองที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ารังไข่ของปลาหมากลายหลังจากชักนำการพัฒนาของไข่ด้วย  $17,20\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าไข่ในรังไข่ของทั้ง wild-type และ *sik1*<sup>-/-</sup> อยู่ในระยะที่ IV แต่เมื่อพิจารณาในระยะที่ III จะเห็นว่ารังไข่ของปลาหมากลาย *sik1*<sup>-/-</sup> ยังมีการพัฒนาอยู่ในระยะนี้มากกว่าใน wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าปลาหมากลายที่เป็น *sik1*<sup>-/-</sup> มีการพัฒนาของไข่ในรังไข่ช้ากว่าปลาหมากลาย wild-type เช่นเดียวกับรังไข่หลังชักนำการพัฒนาของไข่ไปแล้ว 2 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าในรังไข่ของปลาหมากลาย wild-type มีไข่ในระยะที่ V มากกว่ารังไข่ของ *sik1*<sup>-/-</sup> อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่รังไข่ของปลาหมากลาย *sik1*<sup>-/-</sup> ยังพบอยู่ในระยะ IV เป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับ wild-type ดังนั้นจากผลการทดลองชักนำการพัฒนาของไข่ในรังไข่ด้วย  $17,20\beta$ -DHP จึงให้เห็นว่าปลาหมากลายที่ถูกหยุดการทำงานของยีน *sik1* จะทำให้การพัฒนาของไข่ในรังไข่ช้าลง อีกทั้งยังพบว่าไข่ในระยะ V ของปลาหมากลาย *sik1*<sup>-/-</sup> มีลักษณะที่ผิดปกติอย่างเห็นชัด โดยจากการศึกษาของ Van Der Ven and Wester (2003) ได้รายงานถึงลักษณะปกติของรังไข่ปลาหมากลายก่อนการปล่อยไข่ โดยพบว่าลักษณะของไข่ในระยะ ovulation ที่พร้อมปล่อยออกสู่ภายนอก ไข่จะมีสะสม yolk อยู่เต็มไข่และมีการแยกตัวออกห่างกันระหว่างไข่แต่ละฟอง เนื่องจากปลาหมากลายมีพฤติกรรมการปล่อยไข่ที่ละฟอง ดังนั้นเมื่อเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้เห็นได้ชัดว่าลักษณะของไข่ในระยะก่อนการปล่อยไข่ของปลาหมากลาย *sik1*<sup>-/-</sup> มีลักษณะที่ผิดปกติ เพราะเซลล์ไข่ยังคงติดกันแน่น ไม่แยกตัวออกจากกัน เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะที่ปกติของปลาหมากลาย wild-type ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางฟิสิกส์ที่ปรากฏในปลาหมากลาย *sik1*<sup>-/-</sup> โดยทำการผสมกับปลาหมากลายตัวผู้ wild-type พบว่าไข่ที่ได้นั้นมีร้อยละการผสมติดที่ต่ำกว่าใน wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และร้อยละของตัวอ่อนที่ผิดปกติสูงกว่าใน wild-type อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้ตามการศึกษาของ Palumaa et al. (2019) ได้มีการรายงานถึงบทบาทสำคัญของยีน *sik1* ว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุม circadian clock หรือการควบคุมเหตุการณ์ทางสรีระวิทยา รวมถึงการเมแทบอลิซึม (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2013) ที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้ของแสงในหนู เมื่อมีแสงเข้ามากระตุ้นที่ retina photoreceptor จะทำให้ circadian system ของช่วงเวลากลางวันทำงาน ทำให้ cAMP response element binding protein (CREB) ใน SCN (Ginty et al., 1993) เริ่มทำงาน โดย *sik1* จะมีบทบาทในการเติมหมู่ phosphate เข้าไปที่ CREB-regulation transcription coactivator หรือ CRTC โดยจากการศึกษาของ Jagannath et al. (2013) ได้มีการระบุว่ายีน *sik1* และ CRTC-1 มีความสำคัญในการรีเซ็ต circadian clock โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการลดการทำงาน (knock-down) ของยีน *sik1* ของหนูทดลองใน SCN ลง แล้วพบว่าหนูเหล่านั้นเกิดอาการ jetlag ขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ผิดปกติ ในการควบคุม circadian clock ในปลาหมึกหลายตัวแตกต่างออกไปจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์จำพวกแมลงที่สามารถรับแสงได้เพียงที่บริเวณ ganglion cell บน retinal แล้วส่งข้อมูลไปยัง suprachiasmatic nucleus (SCM) ซึ่งในปลาที่มีกระดูกสันหลัง รวมทั้งปลาหมึก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และนก จะมีความไวต่อการกระตุ้นด้วยแสง และมีความซับซ้อนมากกว่า ซึ่งทุกๆ เซลล์ในร่างกายจะสามารถรับรู้ต่อแสงที่เข้ามากระตุ้นได้ (Steindal and Whitmore, 2020) การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม circadian clock ในปลาหมึกหลายตัวมีการศึกษาและรายงานเพียง 4 ยีน ซึ่งได้แก่ circadian locomotor output cycles kaput (*clock*), brain and muscle ARNT-like protein (*Bmal1*), period (*Per*) และ cryptochrome (*Cry*) แต่หน้าที่ของยีน *sik1* ยังไม่มีการระบุหน้าที่ที่ชัดเจนในการควบคุม circadian clock ในปลาหมึก ซึ่งการวางไข่ตาม circadian behavior ของปลาหมึกตามการศึกษาของ Krylov et al. (2021) ได้มีการรายงานว่า การวางไข่ของปลาหมึกนั้นจะเกิดขึ้นตั้งแต่วันที่แรกของการได้รับแสง และจะไม่มีการวางไข่ในช่วงเวลาที่ไม่ได้รับแสง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการที่ยีน *sik1* ถูก knock out หรือหยุดการทำงานของยีนนี้ไป อาจส่งผลทำให้เซลล์ไข่ของปลาหมึกมีการพัฒนาที่ผิดปกติตามไปด้วย เนื่องจากโดยปกติแล้วการพัฒนาของไข่ปลาหมึกจะถูกกระตุ้นด้วยแสงในการเลี้ยงปลาหมึกตามวิธีมาตรฐานนั้น จะมีการกำหนดช่วงแสงไว้ที่ สว่าง 14 ชั่วโมง และมีมืด 10 ชั่วโมง และปลาจะเริ่มปล่อยไข่ทันทีเมื่อได้รับแสง (Westerfield, 1995) แต่เมื่อยีน *sik1* ถูก knock-out อาจส่งผลต่อการรับแสงหรือกลไกการปล่อยไข่ตามปกติเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติด้านฟีโนไทป์ดังที่พบในการทดลองครั้งนี้

### 5.3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยีน *sik1* ไม่ได้เป็น key gene ในการควบคุมการเกิด apoptosis ระหว่างการพัฒนาของไข่ในรังไข่ของปลาหมึก เนื่องจากกระบวนการเกิด apoptosis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกลไกที่มีความซับซ้อนอย่างมาก โดยสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากการกระตุ้นจาก ความเครียด รังสี UV ความร้อน และ DNA Damage แล้วทำให้ cytochrome C ที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรียถูกหลั่งออกมาสู่ไซโตพลาสซึม เพื่อสร้าง apoptosome ขึ้น มากระตุ้นทำให้การทำงานของ X-link inhibitor of apoptosis protein (*XIAP*) หดลง ส่งผลให้โปรตีน caspase9 เริ่มทำงาน แล้วกระตุ้นให้โปรตีน caspase-3 และ caspase-7 ทำงาน ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และชีวเคมีในเซลล์ เปลี่ยนไป จนเกิดเป็น apoptosis cell ขึ้น นอกจากนี้การเกิด apoptosis ยังเกิดขึ้นได้จากการที่ cytokine ligand ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณจากภายนอกเซลล์ให้มีการหลั่งออกมาจากต่อมไร้ท่อ แล้วเข้าจับกับตัวรับสัญญาณที่เป็น death receptor แล้วส่งผลให้โปรตีน caspase-8 และ caspase-10 เริ่มทำงานแล้วจากนั้นจึงกระตุ้นโปรตีน caspase-3 และ caspase-7 ทำให้เซลล์มีลักษณะเป็น apoptosis cell ขึ้น (Elmore, 2007; Nagahama and Yamashita, 2008; Takle and Andersen, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้หลังจากที่หยุดการทำงานของยีน *sik1* ที่ตำแหน่งเป้าหมาย พบว่ารังไข่ของปลาหมึกลายเพศเมีย *sik1*<sup>-/-</sup> ในระยะ maturation และ ovulation ยังคงมีการแสดงออกของยีน *casp3a* แต่การแสดงออกของยีนนี้เมื่อเทียบกับการแสดงออกในรังไข่ของปลาหมึกลาย wild-type พบว่า *casp3a* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในรังไข่ระยะ ovulation แสดงให้เห็นว่าการเกิด apoptosis ในรังไข่ยังคงเกิดขึ้นได้ เพียงแต่มีจำนวนของเซลล์ที่มีการเกิด apoptosis ลดลง และเมื่อพิจารณาถึงการแสดงออกของยีน *XIAP* ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิด apoptosis ในรังไข่ปลาหมึกลาย *sik1*<sup>-/-</sup> พบว่าในระยะ ovulation การแสดงออกของยีนนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับรังไข่ของปลาหมึกลาย wild-type แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเกิด apoptosis ใน *sik1*<sup>-/-</sup> มีการลดลงเพื่อให้เกิด apoptosis ได้ไม่ต่างกับใน wild-type แต่ใน *sik1*<sup>-/-</sup> มียีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิด apoptosis แสดงออกน้อยลงจึงทำให้อัตราของรังไข่ของปลาหมึกลาย *sik1*<sup>-/-</sup> มีร้อยละของเซลล์ที่มีการเกิด apoptosis (*casp3a*) ในระยะ ovulation น้อยกว่าใน wild-type อย่างเห็นชัด แสดงให้เห็นว่าการเกิด apoptosis นั้นมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด ovulation ในปลาหมึกลาย แต่ยีน *sik1* เป็นเพียงยีนหนึ่งที่มีบทบาทในการควบคุมการเกิด ovulation ในปลาหมึกลาย ซึ่งไม่ได้เป็น key gene ของการควบคุมการเกิด apoptosis เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ แมื่อยีน *sik1* ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ซึ่งถูกหยุดการทำงานไปแล้ว ปลาหมึกลาย *sik1*<sup>-/-</sup> ยังมีความสามารถในการปล่อยไข่ได้ แต่ประสิทธิภาพ และความสมบูรณ์ของไข่นั้นจะลดลงเมื่อเทียบกับปลาหมึกลาย wild-type และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่มีบทบาทในการเกิด apoptosis พบว่า ทั้ง *casp3a* และ *XIAP* ก็ยังคงมีการแสดงออกอยู่ เพียงแต่มีการแสดงออกลดลงเท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในรังไข่ยังคงมีการเกิด apoptosis ขึ้น แต่มีจำนวนของไข่ที่เกิด apoptosis ลดลงเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองข้างต้นที่แสดงให้เห็นว่าจำนวนของไข่มี่มีการเกิด apoptosis ในรังไข่ของ *sik1<sup>-/-</sup>* นั้นมีน้อยกว่าในรังไข่ของปลาหมึกสาย wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นระหว่างการพัฒนาของไข่มี่ในรังไข่ยังมียีนอื่นที่สามารถกระตุ้นการเกิด apoptosis ในเซลล์ไข่ได้ แต่ทั้งนี้ยีน *sik1* อาจมีส่วนในการควบคุมการรับแสงที่บริเวณ photoreceptor ของปลาหมึกสาย เมื่อยีนนี้ถูกหยุดการทำงานลง จึงส่งผลต่อการควบคุม circadian clock ทำให้เซลล์ไข่มี่มีการพัฒนาที่ช้ากว่าปกติ เนื่องจากตามธรรมชาติการพัฒนาของเซลล์ไข่มี่ของปลาหมึกสายจะถูกกระตุ้นด้วยแสง ทั้งนี้เพื่อให้มีความชัดเจนต่อการระบุบทบาทของการเกิด apoptosis ระหว่างการพัฒนาของไข่มี่นั้นจะต้องมีการหยุดการทำงานของยีนอื่นที่มีการรายงานว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ร่วมด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหน้าที่ของยีน *sik1* ต่อการพัฒนาของไข่ปลาฆ่าตายโดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ในการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ เพื่อหยุดการทำงานของยีน แล้วสร้างปลาฆ่าตายกลายพันธุ์แบบ homozygous mutant โดยมีการกลายพันธุ์ในลักษณะของการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส 12 ตำแหน่ง และมีลำดับเบสหายไป 9 ตำแหน่งบน exon ที่ 2 ส่งผลให้กรดอะมิโนสร้างได้เพียง 3 ตำแหน่งเท่านั้น ก่อนที่จะเกิด stop codon ขึ้น เพื่อใช้ศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่ ร้อยละของไข่ผสมติด ร้อยละของไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน รวมถึงการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ได้แก่ยีน *casp3a* และยีน *XIAP* โดยทำการกระตุ้นการพัฒนาของไข่ในรังไข่ปลาฆ่าตายด้วยฮอร์โมน 17,20 $\beta$ -DHP เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นตัวอย่างของรังไข่ที่อยู่ในระยะ maturation และ ovulation ตามลำดับ พบว่าลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ร้อยละของไข่ผสมติดที่ได้รับจากปลาฆ่าตายเพศเมีย *sik1*<sup>-/-</sup> นั้นต่ำกว่าไข่ที่ได้รับจากปลาฆ่าตาย wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งยังพบว่าไข่ที่ได้จากปลาฆ่าตายเพศเมีย *sik1*<sup>-/-</sup> มีความผิดปกติของตัวอ่อนที่สูงกว่าปลาฆ่าตาย wild-type ผสมกับปลาฆ่าตายเพศผู้ wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนลักษณะทางพยาธิสภาพของรังไข่พบว่าในรังไข่ของปลาฆ่าตาย *sik1*<sup>-/-</sup> มีการพัฒนาที่ช้ากว่า wild-type และมีลักษณะของไข่ในระยะ V ผิดปกติ รวมทั้งขนาดของไข่ปลาในระยะ V ของปลาฆ่าตาย *sik1*<sup>-/-</sup> นั้นมีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับไข่ระยะ V ของปลาฆ่าตาย wild-type อีกทั้งยังคงมีการแสดงออกของยีน *casp3a* และ *XIAP* แสดงให้เห็นในรังไข่ของปลาฆ่าตาย *sik1*<sup>-/-</sup> ยังคงมีการเกิด apoptosis ขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *casp3a* ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis ในรังไข่ของปลาฆ่าตาย *sik1*<sup>-/-</sup> นั้นมีการแสดงออกต่ำกว่าในรังไข่ของปลาฆ่าตาย wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงส่งผลให้รังไข่ของปลาฆ่าตาย *sik1*<sup>-/-</sup> มีจำนวนของไข่ที่เกิด apoptosis น้อยกว่าใน wild-type อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามไปด้วย

จากการศึกษาครั้งนี้ระบุได้ว่ายีน *sik1* เป็นเพียงยีนหนึ่งที่มีบทบาทในการควบคุมการเกิด apoptosis แต่ไม่ได้เป็นยีนหลัก (key gene) ที่ควบคุมการเกิด apoptosis ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทของการเกิด apoptosis ระหว่างการพัฒนาของไข่ นั้นจะต้องมีการหยุดการทำงานของยีนอื่นที่มีการรายงานว่าอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis ร่วมด้วย

## บรรณานุกรม

- สุทธิรัตน์ ปัญจันท์ มณฑกานต์ ฉัตรชฤทธิ มงคล และ วิไลศดา กลางนุรักษ์. 2563. “ความตกไข่ คุณภาพของไข่ และการถดถอยของเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาม้าลายแม่พันธุ์ในช่วงเวลาที่มีการวางไข่อย่างต่อเนื่อง.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. ปีที่ 38(4). 528-534
- Aytekin, Y., and Yüce, R. (2008). Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3), 513-522.
- Caba, M., González-Mariscal, G., and Meza, E. (2018). Circadian Rhythms and Clock Genes in Reproduction: Insights From Behavior and the Female Rabbit's Brain. *Frontiers in Endocrinology*, 9(106). doi:10.3389/fendo.2018.00106
- Cerda, J., Bobe, J., Babin, P. J., Admon, A., and Lubzens, E. (2008). Functional Genomics and Proteomic Approaches for the Study of Gamete Formation and Viability in Farmed Finfish. *Reviews in Fisheries Science*, 16(s1), 56–72.
- Cheng, H. L., Liu, P. X., Wang, Z. G. C., Zou, L. H., Santiago, S., Garbitt, V., Gjoerup, O. V., et al. (2009). SIK1 Couples LKB1 to p53-Dependent Anoikis and Suppresses Metastasis. *Science Signaling*, 2(80). doi:ARTN ra3510.1126/scisignal.2000369
- Drummond, C. D., Bazzoli, N., Rizzo, E., and Sato, Y. (2000). Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *J Exp Zool*, 287(2), 176-182. doi:10.1002/1097-010x(20000701)287:2<176::aid-jez8>3.0.co;2-2
- Dyer, R. R., Ford, K. I., and Robinson, R. A. S. (2019). Chapter Twenty-One - The roles of S-nitrosylation and S-glutathionylation in Alzheimer's disease. In Garcia, B. A. (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 626, pp. 499-538): Academic Press.
- Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the Circadian Clock Converge. *Physiological Reviews*, 93(1), 107-135. doi:10.1152/physrev.00016.2012
- Eimon, P. M., and Ashkenazi, A. (2010). The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*, 15(3), 331-349. doi:10.1007/s10495-009-0432-9
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Ferrarelli, L. K. (2013). Resetting a Lagging Body Clock. *Science Signaling*, 6(292), ec215-ec215. doi:doi:10.1126/scisignal.2004707

- Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., and Greenberg, M. E. (1993). Regulation of CREB Phosphorylation in the Suprachiasmatic Nucleus by Light and a Circadian Clock. *Science*, 260(5105), 238-241. doi:doi:10.1126/science.8097062
- Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Sun, X. J., et al. (2003). Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. *J Biol Chem*, 278(20), 18440-18447. doi:10.1074/jbc.M211770200
- Jagannath, A., Butler, R., Godinho, Sofia I. H., Couch, Y., Brown, Laurence A., Vasudevan, Sridhar R., Flanagan, Kevin C., et al. (2013). The CRTCL1-SIK1 Pathway Regulates Entrainment of the Circadian Clock. *Cell*, 154(5), 1100-1111. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.004
- Janz, D. M., and Van Der Kraak, G. (1997). Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17beta-estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol*, 105(2), 186-193. doi:10.1006/gcen.1996.6820
- Kerr, J. R. F., Wyllie, A. H., and Curriet, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biology Phenomenon with Wieranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Kimmel, C. B., William, B. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Thomas, F., and Schilling, T. F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.
- Klangnurak, W., Fukuyo, T., Rezanujjaman, M. D., Seki, M., Sugano, S., Suzuki, Y., and Tokumoto, T. (2018). Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an in vivo assay in zebrafish. *Plos One*, 13(5), 1-19.
- Klangnurak, W., and Tokumoto, T. (2017). Fine selection of up-regulated genes during ovulation by in vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. *Zoological Letters*, 3, 1-10.
- Krylov, V. V., Izvekov, E. I., Pavlova, V. V., Pankova, N. A., and Osipova, E. A. (2021). Circadian rhythms in zebrafish (*Danio rerio*) behaviour and the sources of their variability. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 96(3), 785-797. doi:10.1111/brv.12678
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), 1-20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077

- Li, J. Z., and Ge, W. (2020). Zebrafish as a model for studying ovarian development: Recent advances from targeted gene knockout studies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 507. doi:ARTN 11077810.1016/j.mce.2020.110778
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., and Woutersen, R. A. (2011). Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5), 759-775. doi:10.1177/0192623311409597
- Meyers, R. J. (2018). Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, e19.
- Morais, R. D. V. S., Thomé, R. G., Lemos, F. S., Bazzoli, N., and Rizzo, E. (2012). Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. *Cell and Tissue Research*, 347, 467-478.
- Nagahama, Y. (1997). 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62(1), 190-196. doi:10.1016/s0039-128x(96)00180-8
- Nagahama, Y., and Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation*, 50, 195-219.
- Nagashima, K., Tokizawa, K., Marui, S., and Uchida, Y. (2018). Circadian Body Temperature Rhythm and the Interaction with Energy State (pp. in press).
- Neumann, A. M., Schmidt, C. X., Brockmann, R. M., and Oster, H. (2019). Circadian regulation of endocrine systems. *Auton Neurosci*, 216, 1-8. doi:10.1016/j.autneu.2018.10.001
- Niimi, A. J., and LaHam, Q. N. (1974). Influence of breeding time interval on egg number, mortality, and hatching of the zebra fish *Brachydanio rerio*. *Can J Zool*, 52(4), 515-517. doi:10.1139/z74-063
- Pachoensuk, T., Fukuyo, T., Rezanujjaman, M., Wanlada, K., Yamamoto, C., Maeno, A., Rahaman, M. M., Ali, M. H., and Tokumoto, T. (2021). Zebrafish stm is involved in the development of otoliths and of the fertilization envelope. *Reproduction and Fertility*, 2(1), 7-16. doi:10.1530/raf-20-0040
- Pachoensuk, T., Fukuyo, T., Wanlada, K., Rezanujjaman, M., Rahaman, M. M., Sasaoka, K., Sarwar Jyoti, M. M., et al. (2020). Pax2a is expressed in oocytes and is responsible for early development and oogenesis in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 533(3), 592-599. doi:10.1016/j.bbrc.2020.09.059

- Palumaa, T., Taylor, L., Nurlankyzy, M., Yücel, B., Peirson, S. N., Foster, R., and Jagannath, A. (2019). The role of salt-inducible kinase 1 in retinal physiology and light responses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(9), 5256-5256.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ribas, L., and Piferrer, F. (2014). The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 6(4), 209-240. doi:10.1111/raq.12041
- Selman, K. W., R. A. ; Sarka, A. and Qi, X. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218(2), 203-224.
- Shao, S., Ren, C., Liu, Z., Bai, Y., Chen, Z., Wei, Z., Wang, X., Zhang, Z., and Xu, K. (2017). Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 92, 43-52. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.012
- Spence, R., Ashton, R., and Smith, C. (2007). Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Behaviour*, 144, 953-966. doi:10.1163/156853907781492726
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., and Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13-34. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x
- Steindal, I. A. F., and Whitmore, D. (2020). Zebrafish Circadian Clock Entrainment and the Importance of Broad Spectral Light Sensitivity. *Frontiers in Physiology*, 11. doi:10.3389/fphys.2020.01002
- Sun, Z., Jiang, Q., Li, J., and Guo, J. (2020). The potent roles of salt-inducible kinases (SIKs) in metabolic homeostasis and tumorigenesis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 150. doi:10.1038/s41392-020-00265-w
- Takemori, H., Kajimura, J., and Okamoto, M. (2007). TORC-SIK cascade regulates CREB activity through the basic leucine zipper domain. *Febs j*, 274(13), 3202-3209. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05889.x
- Takle, H., and Andersen, O. (2007). Caspases and apoptosis in fish. *Journal of Fish Biology*, 71, 326-349.

- Tang, H., Wang, L., Chen, Y., He, J., Qu, L., Guo, Y., Liu, Y., Liu, X., and Lin, H. (2017a). Ovulation is associated with the LH-dependent induction of *pla2g4aa* in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1-8.
- Tang, H. P., Liu, Y., Li, J. Z., Li, G. F., Chen, Y., Yin, Y. K., Guo, Y., et al. (2017b). LH signaling induced *ptgs2a* expression is required for ovulation in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 447, 125-133.
- Tang, H. P., Liu, Y., Li, J. Z., Yin, Y. K., Li, G. F., Chen, Y., Li, S. S., et al. (2016). Gene knockout of nuclear progesterone receptor provides insights into the regulation of ovulation by LH signaling in zebrafish. *Scientific Reports*, 6, 1-11.
- Thomé, R. G., Domingos, F. F. T., Santos, H. B., Martinelli, P. M., Sato, Y., Rizzo, E., and Bazzoli, N. (2012). Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue and Cell*, 44(1), 54-62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.11.002>
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., Horiguchi, R., Ishikawa, K., and Nagahama, Y. (2004a). Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3686-3690.
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., Mizorogi, N., Aihara, J. I., Ishikawa, K., and Nagahama, Y. (2004b). Induction and inhibition of oocyte maturation by edcs in zebrafish. *Zoological Science*, 21(12), 1288-1288.
- Tokumoto, T., Tokumoto, M., and Nagahama, Y. (2005). Induction and inhibition of oocyte maturation by EDCs in zebrafish. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 1-9.
- Tokumoto, T., Yamaguchi, T., Ii, S., and Tokumoto, M. (2011). In Vivo Induction of Oocyte Maturation and Ovulation in Zebrafish. *Plos One*, 6(9), 1-6.
- Van Der Ven, L., and Wester, P. (2003). Histology and Histopathology Atlas of the Zebrafish. <http://zfishtoxpat.comoj.com>. Acesso em, 3(03), 2015.
- Westerfield, M. (1995). *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*: University of Oregon press.
- Wood, A. W., and Van Der Kraak, G. (2003). Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Mol Reprod Dev*, 65(2), 219-227. doi:10.1002/mrd.10272

Yu, C., Zhang, Y., Yao, S., and Wei, Y. (2014). A PCR Based Protocol for Detecting Indel Mutations Induced by TALENs and CRISPR/Cas9 in Zebrafish. *Plos One*, 9(6), e98282. doi:10.1371/journal.pone.0098282



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล      นางสาวสุทธิรัตน์ ปัญจจันทร์  
 วัน เดือน ปีเกิด    24 กุมภาพันธ์ 2539  
 ที่อยู่                62 หมู่ 4 ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา 56130  
 ประวัติการศึกษา    2560 วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์การประมง (เกียรตินิยมอันดับ 1)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2556 มัธยมศึกษาปีที่ 6

โรงเรียนพะเยาพิทยาคม จังหวัดพะเยา

ผลงานวิจัย

- พ.ศ. 2563 - ความคงไข่ คุณภาพของไข่ และการถดถอยของเนื้อเยื่อรังไข่ของปลา  
 ม้าลายแม่พันธุ์ ในช่วงเวลาที่มีการวางไข่อย่างต่อเนื่อง
- แบบแผนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีน Salt Inducible  
 Kinase1 (*sik1*<sup>(+/-)</sup>) ในปลาม้าลาย (*Denio reio*) กลายพันธุ์แบบเฮเทอ  
 โรไซกัส
- พ.ศ. 2560 - อิทธิพลของ Arrhenius Breakpoint Temperature (ABT) ต่อการสร้าง  
 ฮีทช็อกโปรตีน 70 ของหอยสองฝาชนิด *Isognomon nucleus*