แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ : 135-142 (2555). KHON KAEN AGR. J. 40 SUPPLMENT : 135-142 (2012).

การศึกษาคุณลักษณะทางอณูชีววิทยาของยีน Biliverdin reductase ในปลานิล

Molecular Characterization of Biliverdin Reductase Gene in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

เอกพล วังคะฮาต[1*], สุปราณี วิกรัยบูรณ์[1], ร่วมฤดี พานจันทร์[1], สุภาพ นนทะสันต์[2], นนทวิทย์ อารีย์ชน[3] และ ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ[3]

Eakapol Wangkahart[1*], Supranee Wigriboon[1], Ruemruedee Panchan[1], Supap Nontasan[2], Nontawith Areechon[3] and Prapansak Srisapoome[3]

บทคัดย่อ : การศึกษาลำดับกรดอะมิโนของยีน Biliverdin reductase (BVR) จากปลานิลที่แยกได้จากห้องสมุดของไตส่วนหน้า พบลักษณะโครงสร้างของยีน BVR จากปลานิลมีลำดับกรดอะมิโนความยาวทั้งสิ้น 230 amino acids มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 25.67 kDa และมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.70 โครงสร้างโมเลกุลในระดับอณูชีววิทยาของยีน BVR ของปลานิล ประกอบด้วยตำแหน่งอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน (motif) ที่สำคัญ ๆ หลายตำแหน่ง เช่น leucine zipper (bzip) motif, adenine dinucleotide-binding motif, serine/threonine kinase domain, Src homology (SH2) binding domains (YMXM and YSLF) และ Zn/metal-binding motif เป็นต้น และมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น ๆ ที่ได้รายงานไว้แล้ว พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 31-73% นอกจากนี้ จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าโครงสร้างของยีน BVR ของปลานิลนั้นมีความใกล้ชิดกับปลา pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*)

คำสำคัญ: คุณลักษณะทางอณูชีววิทยา, บิลิรูบิน รีดักเตส, ปลานิล

Abstract : In the present study, a Biliverdin reductase (BVR) gene from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was isolated from the head kidney cDNA library. The deduce amino acid sequence of Nile tilapia BVR consist of 230 residues and a molecular weight and Isoelectric point (pI) were 25.67 kDa and 5.70, respectively. Moreover, leucine zipper (bzip) motif, adenine dinucleotide-binding motif, serine/threonine kinase domain, Src homology (SH2) binding domains (YMXM and YSLF) and Zn/metal-binding motif were found in a Nile tilapia BVR deduce amino acid and share overall amino acid identities with previously reported organism were ranged from 31-73%. Additionally, the phylogenetic relationship analysis of Nile tilapia BVR was closely related to pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*).

---

[1] ภาควิชาประมง คณะสัตวแพทยศาสตร์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Department of Fisheries, Faculty of Veterinary and Animal Sciences, Mahasarakham University

[2] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี

Department of Food Science and Technology, Thepsatri Rajabhat University

[3] ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University

Corresponding author: wangkahart@yahoo.com

Keywords: Molecular Characterization, Biliverdin reductase, Nile tilapia,

บทนำ

การเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ของประเทศไทย นับเป็นกิจกรรมทางการประมงที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่ายและมีอัตราการ เจริญเติบโตที่รวดเร็ว สามารถเลี้ยงได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย เกษตรกรจึงนิยมเลี้ยงกันเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ โดยมีอัตราการปล่อยปลาในจำนวนที่หนาแน่น เพื่อเน้นการผลิตและผลกำไรให้เพิ่มมากขึ้น จากระบบการเลี้ยงที่ขยายตัวเพิ่มขึ้นจนกลายเป็นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า การเลี้ยงปลานิลของไทยในปัจจุบันได้ประสบกับปัญหาของการเกิดโรคระบาดที่รุนแรงโดยมีสาเหตุหลักมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค Streptococcosis ทำให้ปลานิลเกิดการตายและสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรอย่างมากเช่นกัน โดยปลานิลที่เป็นโรคนี้จะมีอาการว่ายน้ำช้าลง สีตัวเข้มขึ้น ตาโปนและขุ่นขาวเนื่องจากมีของเหลวมาคั่งบริเวณหลังลูกตา มีการสะสมของเหลวในช่องท้องทำให้ท้องบวม เกิดอาการตกเลือดที่บริเวณรอบตา ลำตัว รอบขากรรไกร ปาก แผ่นปิดเหงือก ฐานของครีบต่าง ๆ และปลาจะมีอาการว่ายน้ำส่ายไปมาไร้ทิศทาง อวัยวะภายใน ตับ ม้าม ไต จะมีสีซีด และมีขนาดใหญ่ขึ้น (Eldar *et al*.,1997; Perera *et al*., 1997)

จากผลการศึกษาของ เอกพล (2551) โดยอาศัยเทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) เพื่อใช้สืบค้นยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนภายหลังจากกระตุ้นปลานิลด้วยเชื้อ *S. agalactiae* พบยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด รวมถึงยีนในระบบเมตาบิลิซึมของร่างกาย โดยยีนสำคัญที่ค้นพบชนิดหนึ่งคือ Biliverdin reductase (BVR) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นตัวเร่งการสลายฮีมในเลือดเพื่อให้ได้สารประกอบที่มีสีเหลืองคือ Bilirubin ที่ทำหน้าที่เสมือนเป็นตัวเร่งการต่อต้านความเป็นพิษหรือความผิดปกติจากอนุมูลอิสระในร่างกายเพื่อให้ร่างกายคงรูปอยู่ได้ ดังนั้น จึงนิยมใช้ยีนชนิดนี้เป็นดัชนีชีวภาพพื้นฐานในการศึกษาการตอบสนองจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative response) กลไกการตายของเซลล์ (apoptosis) และเป็นองค์ประกอบในการแสดงออกของยีน (gene expression) ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ (Fakhrai and Maines, 1992; Maines *et al*., 1996; Ahmad *et al*., 2002; Kim *et al*., 2011) อย่างไรก็ตาม ในส่วนของปลานิลเองซึ่งจัดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาคุณลักษณะโครงสร้างทางอณูชีววิทยาของยีน BVR มาก่อน ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จึงถือว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ในการศึกษากลไกการตอบสนองของปลานิลต่อเชื้อแบคทีเรียชนิด *S. sgalactiae* หรือเชื้อโรคชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลานิลในอนาคตต่อไป

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจถึงบทบาทหน้าที่และคุณสมบัติของยีน Biliverdin reductase (BVR) ของปลานิลในเบื้องต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางอณูชีววิทยาของยีน BVR ลักษณะความคล้ายคลึงกันและความสัมพันธ์ในระดับวิวัฒนาการกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการศึกษาการตอบสนองของปลานิลที่มีต่อเชื้อ *S. agalactiae* ทั้งนี้เพื่อก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในกลไกการตอบสนองของปลานิลที่มีต่อเชื้อในระดับเซลล์โมเลกุลและเป็นความรู้พื้นฐานอีกประการ

หนึ่งที่จะนำไปสู่แนวทางการป้องกันโรคในอนาคตต่อไป

วิธีการศึกษา

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีน Biliverdin Reductase (BVR) ของปลานิล

ทำการสืบค้นยีน BVR โดยคัดเลือกพลาสมิดจากห้องสมุดของยีน (cDNA library screening) ที่สร้างจากไตส่วนหน้าของปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *S. agalactiae* (เอกพล, 2551) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) Agar ซึ่งมีส่วนผสมของ Ampicillin/X-Gal/IPTG หลังจากนั้นทำการสุ่มเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาว (Blue-white colony screening) มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดทางด้าน 5' โดยใช้ Thermo sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) ด้วย M13 reverse primers แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละโคลนมาทำการเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บันทึกไว้แล้วใน GenBank database โดยใช้โปรแกรม BLASTN โดยกำหนดให้มีความเหมือนของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบส และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching น้อยกว่า 10^{-4} และใช้โปรแกรม BLASTX เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน โดยบริเวณที่เหมือนกันต้องมีจำนวนของกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 10 amino acids และต้องมีค่าความน่าจะเป็นของการเกิด Random matching น้อยกว่า 10^{-4}

การศึกษาคุณลักษณะ การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและการศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน Biliverdin Reductase (BVR) ของปลานิลกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ

ภายหลังจากได้รับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BVR ในข้อ 1 แล้ว ทำการศึกษาคุณลักษณะและโครงสร้างของยีน BVR ของปลานิลโดยทำการเปรียบเทียบและหาค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโน (Alignment and identity) กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้แล้วใน GenBank database โดยการใช้โปรแกรม CLUSTALW และ EMBOSS Pairwise alignment algorithms (http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/) หาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน BVR ด้วยโปรแกรม MEGA 5.0 ตามวิธีการของ Neighbour-joining method โดยอาศัยลำดับกรดอะมิโนของยีน BVR ของปลานิลและลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่ได้รายงานไว้แล้วใน GenBank database ซึ่งได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน และปลาชนิดต่าง ๆ โดยการเลือกใช้ค่า bootstrap ที่ 1,000

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การค้นพบ cDNA และลักษณะโครงสร้างของยีน Biliverdin Reductase (BVR) จากห้องสมุด cDNA

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากห้องสมุด cDNA ที่สร้างจากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจำนวนทั้งสิ้น 2,179 โคลน พบ cDNA จำนวน 4 โคลน มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนที่สมบูรณ์(full-length) ของยีน Biliverdin reductase (BVR) โดยพบว่าลักษณะโครงสร้างของยีน BVR จากปลานิลมีลำดับกรดอะมิโนความยาวทั้งสิ้น 230 amino acids น้ำหนักมวลโมเลกุล 25.67 kDa และมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.70 (Figure 1) โดยทั่วไปลักษณะโครงสร้างของยีน BVR ประกอบด้วยรูปแบบ (form) ที่แตกต่างกัน 2 แบบ ตามน้ำหนักมวลโมเลกุล คือ Biliverdin reductase A (BVRA) และ Biliverdin reductase B (BVRB) หรือเรียกอีกชื่อว่า (BVR IX□ และ BVR IX□) โดยเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยองค์ประกอบชนิดเดียว (monomeric) และมีโครงสร้าง 2 ส่วน คือ N-terminal dinucleotide-binding domain ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโนค่อนข้างสูงและ C-terminal domain เป็นส่วนที่มีความหลากหลายของ

กรดอะมิโนต่ำหรือค่อนข้างคงที่ มีการศึกษาในมนุษย์พบว่ายีน BVRA ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 296 amino acids น้ำหนักมวลโมเลกุล 33.5 kDa ในขณะที่ยีน BVRB มีการศึกษาเช่นเดียวกันแต่คุณสมบัติและหน้าที่ยังมีข้อมูลไม่มากนักรวมถึงตำแหน่งอนุรักษ์ที่สำคัญของลำดับกรดอะมิโน (motif) โดยพบว่าโครงสร้างของยีนประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 206 amino acids และมีมวลโมเลกุล 21 kDa (McCoubrey *et al*., 1995) นอกจากนี้ มีการศึกษาพบว่ายีน BVRA เป็นยีนที่มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Schluchter and Glazer, 1997) เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างโมเลกุลในระดับอณูชีววิทยาของยีน BVR ของปลานิลกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ในครั้งนี้สามารถพบตำแหน่งอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน (motif) ที่สำคัญ ๆ หลายตำแหน่งในยีน BVRA เช่น leucine zipper (bzip) motif, adenine dinucleotide-binding motif, serine/threonine kinase domain, Src homology (SH2) binding domains (YMXM and YSLF) และ Zn/metal-binding motif เป็นต้น (Fakhrai and Maines, 1992; Komuro *et al*., 1996; Maines *et al*., 1996; 2001) (Figure 1) แสดงให้เห็นว่ายีน BVR ของปลานิลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้คล้ายคลึงกับยีน BVRA ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน BVR ของปลานิลกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน BVR ที่ได้จากปลานิลกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เพื่อประเมินค่าความคล้ายคลึงกันของยีน (Similarity) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 57-73% เมื่อทำการเปรียบเทียบกับยีนของปลาชนิดต่าง ๆ โดยพบว่ายีน BVR จากปลานิลนั้นมีค่าความคล้ายคลึงของยีนสูงสุดกับยีน BVR ของปลา pufferfish (73%) รองลงมาได้แก่ zebrafish (67%), channel catfish (62%) และมีค่าความคล้ายคลึงต่ำสุดกับปลาชนิด blue catfish (61%) ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของยีน BVR กับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 57-60% และมีค่าระหว่าง 57-58% เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มของสัตว์ปีก (Avians)

ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน BVR

การหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีนโดยใช้ลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากปลานิลกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่ายีน BVR ของปลานิลมีความใกล้ชิดกันกับปลา pufferfish โดยรูปแบบของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของสิ่งมีชีวิตออกเป็น 4 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ กลุ่มของปลา กลุ่มสัตว์ลูกด้วยนม กลุ่มสัตว์ปีกและกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน นอกจากนี้ ในกลุ่มของปลายังสามารถจัดกลุ่มของปลาออกเป็นกลุ่ม 3 ย่อยที่มีความสัมพันธ์กันของอันดับ (Order) ทางอนุกรมวิธานอีกด้วยเช่นกัน ซึ่งได้แก่ Perciformes, Tetraodontiformes, Cypriniformes และ Siluriformes ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกันตามลักษณะ ทางอนุกรมวิธาน (Figure 2)

ปัจจุบันความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์โมเลกุลมีการพัฒนาไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วมาก การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างและคุณสมบัติหน้าที่ของยีน BVR ได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวางเช่นกัน ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในสัตว์ชั้นสูง เนื่องจากเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการเร่งการสลายฮีมในเลือดเพื่อให้ได้สารประกอบที่มีสีเหลืองคือ Bilirubin เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ จึงถูกขนย้ายผ่านเลือดโดยอาศัยโปรตีนขนส่งชนิด Albumin ไปยังตับและส่งผลทำให้ Bilirubin ละลายน้ำได้ดีขึ้นเพื่อให้ง่ายต่อการขับถ่ายออกทางน้ำดี ในกรณีที่มีปริมาณ Bilirubin ในเลือดสูงมากเกินไป เป็นสภาวะที่บ่งบอกถึงความบกพร่องของตับในการสร้าง Bilirubin หรือเป็นการแสดงถึงภาวะอุดตันของท่อน้ำดี หรืออาจแสดงว่ามีการทำลายของเม็ดเลือดแดงในร่างกายที่มากเกินกว่าที่ตับจะทำหน้าที่กำจัดออกได้ทันจึงส่งผลทำให้มี Bilirubin ในเลือดสูง และเนื่องจาก Bilirubin มีคุณสมบัติในการไม่ละลายน้ำจึงมักเคลื่อนย้ายจากเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อรอบ ๆ และสะสมในเนื้อเยื่อเหล่านั้นทำให้ตับมีสีเหลืองซีด (Kapitulnik and Maines, 2009) ด้วย

คุณสมบัติและหน้าที่ของยีนชนิดนี้ จึงนิยมใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการตอบสนองจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative response) กลไกการตายของเซลล์ (apoptosis) และเป็นองค์ประกอบในกลไกการแสดงออกของยีน (gene expression) (Maines *et al*., 1996; Ahmad *et al*., 2002; Kim *et al*., 2011) เช่น ใช้เป็นดัชนีชีวภาพพื้นฐานในการศึกษาการตอบสนองจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative response) โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ BVR และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (enzyme activity) รวมถึงกลไกการตายของเซลล์ (apoptosis) และหรือรูปแบบการแสดงออกของยีน (gene expression) โดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาขั้นสูงเช่น Reverse transcription PCR (RT-PCR) หรือ Quantitative real-time PCR (qPCR) ในปลานิลสภาวะปกติและปลาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคร่วมกับการสังเคราะห์เป็น recombinant protein ของยีน BVRA โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ได้จริงและเกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการสร้างภูมิคุ้มกันของปลานิลต่อเชื้อก่อโรคได้ในอนาคตต่อไปอีกทางหนึ่ง

สรุป

การศึกษาคุณลักษณะทางอณูชีววิทยาของยีน Biliverdin reductase (BVR) ของปลานิลในครั้งนี้ พบคุณลักษณะพื้นฐานโดยทั่วไปมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันกับยีน Biliverdin reductase A (BVRA) ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่ได้รายงานไว้โดยอาศัยตำแหน่งอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโน (motif) ที่สำคัญ ๆ หลายตำแหน่ง ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนรวมถึงความใกล้ชิดในเชิงวิวัฒนาการกับกลุ่มของปลาจากการสร้าง phylogenetic tree ข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญที่สามารถใช้เป็นองค์ความรู้ในการหาแนวทางป้องกัน ควบคุมและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. agalactiae* หรือเชื้อโรคชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลานิลต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับบุคลากร คณะสัตวแพทยศาสตร์และสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554

เอกสารอ้างอิง

เอกพล วังคะฮาต. 2551. การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Ahmad, Z., M. Salim, and M.D. Maines. 2002. Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-bindingprotein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. J. Biol Chem 267: 9226-9232.

Eldar, A., A. Horovitcz, and H. Bercovier. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Vet. Immunol. Immunopathol. 56: 175-183.

Fakhrai, H. and D. Maines. 1992. Expression and Characterization of a cDNA for Rat Kidney Biliverdin Reductase.. J. Biol Chem 267: 4023-4029.

Kapitunik, J., and D. Maines. 2009. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. Trend Pharmacol Scienes 3: 129-137

Kim, S. Y., H. T. Kang, H. R. Choi, and S. C. Park. 2011. Biliverdin reductase A in the prevention of cellular senescence against oxidative stress. Exp. Mol. Med. 43: 15-23

Komuro, A., T. Tobe, Y. Nakano, T. Yamaguchi, and M. Tomita. 1996. Cloning and characterization of the cDNA encoding human biliverdin-IX□ reductase. Biochim Biophys Acta, 1309: 89-99.

McCoubrey, W.K., M.A. Cooklis, and D. Maines. 1995. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. Gene 160: 235–240.

Maines, M. D., V. B. Polevoda, T. Huang, and W. K. McCoubrey. 1996. Human biliverdin IX□ reductase is a zinc-metalloprotein Characterization of purified and Escherichia coli expressed enzymes. Eur. J. Biochem. 235: 372-381

Maines, D., J. F. Ewing, T.J. Huang, and N. Panahian. 2001. Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. J. Pharmacol. Exp.Ther. 296: 1091-1097.

Perera, R. P., S. K. Johnson, and D. H. Lewis. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. Aquaculture 152: 25-33.

Schluchter, W.M. and A.N. Glazer. 1997. Characterization of cyano-bacterial biliverdin reductase. Conversion of biliverdin to bilirubin is important for normal phycobiliprotein bio-synthesis. J. Biol Chem 272: 13562-13569.

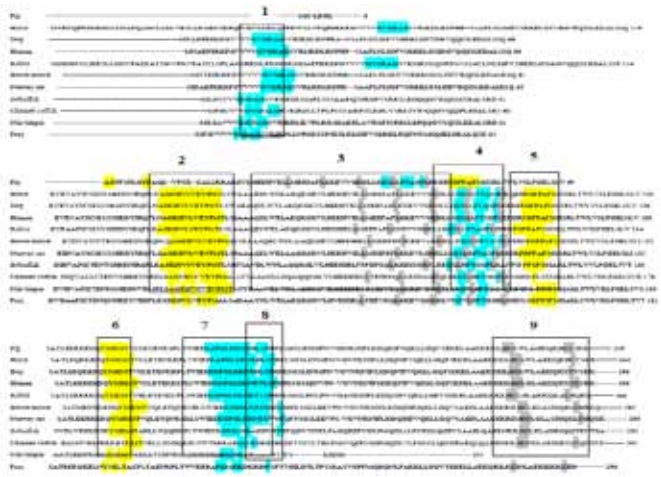

Figure 1 Alignment of the deduced amino acid sequence of Nile tilapia BVR with the sequences of other vertebrate BVR. Dashes indicate gaps introduced for maximal alignment. Alignment gaps are indicated by "-". Domains/motifs/residues that are known or are predicted to be involved in cell signaling are highlighted and numbered as follows: 1, adenine binding site; 2, oxidoreductase motif; 3, leucine zipper (bzip) motif; 4, serine-threonine kinase domain; 5, Erk1 binding motif; 6, SH2 (p85) binding site; 7, myristylation motif; 8, recognition motif for tyrosine phosphatase SHP-1; 9, docking site for hetero- or homodimerization.

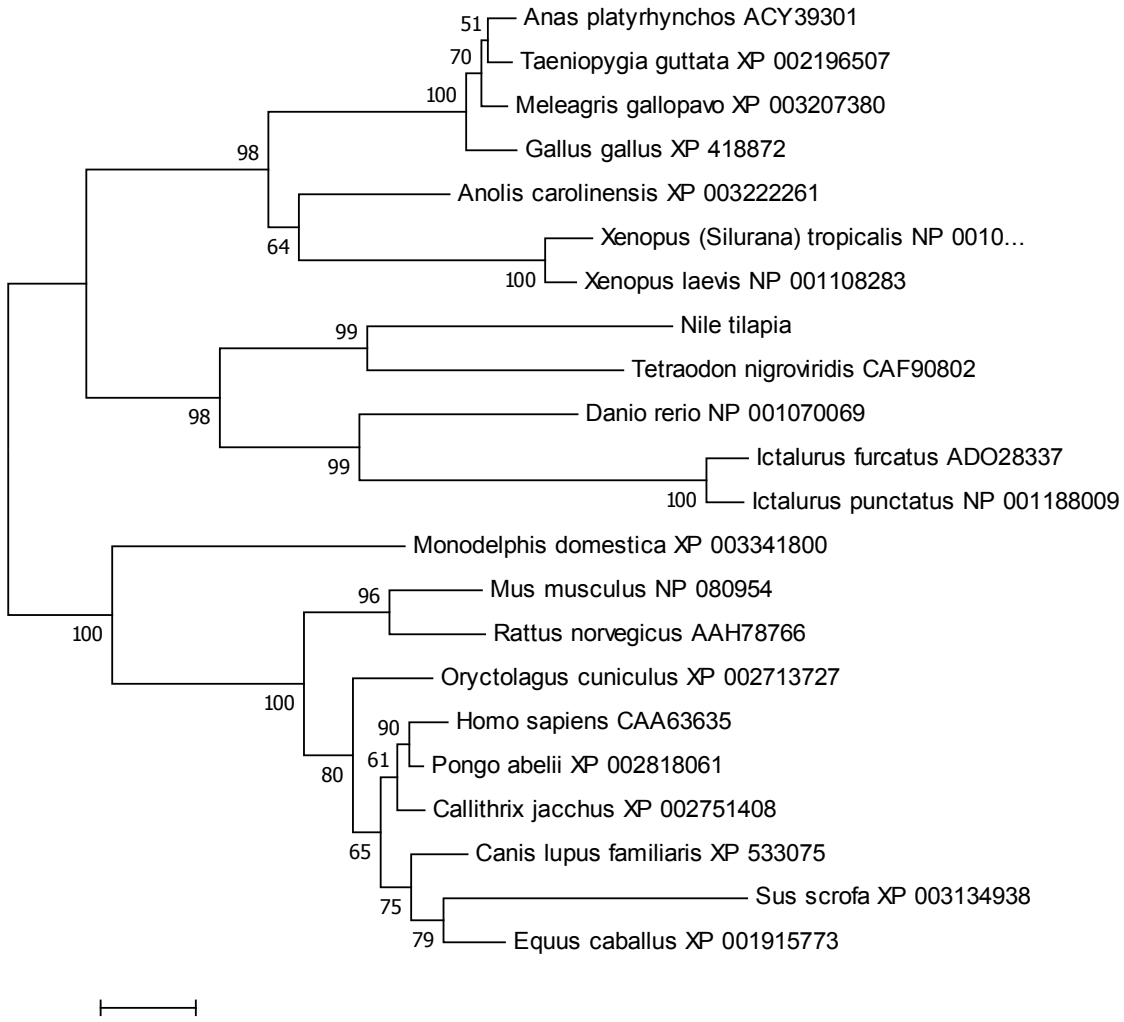

Figure 2. Phylogenetic tree showing the relationships between the Nile tilapia BVR nucleotide sequences with 22 vertebrates BVR sequences. The tree was constructed by the neighbour-joining method using MEGA 4.0. The numbers at the relevant branches refer to bootstrap values of 1,000 replicates.