

การผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลในยีสต์เพื่อใช้เสริม
ในอาหารปลา

นางสาวศุภมาศ ถนอมมัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2555

**PRODUCTION OF NILE TILAPIA DELTA 6 DESATURASE
IN YEAST FOR SUPPLEMENTATION
IN FISH FEED**

Supamas Tanomman

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2012

การผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลในยีสต์เพื่อใช้เสริมในอาหารปลา

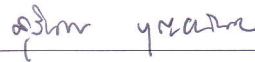
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสาร)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(รศ. ดร.มารีนา เกตุทัต-คาร์นส์)

กรรมการ



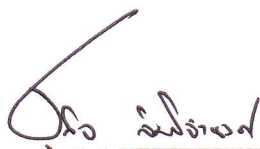
(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)

กรรมการ



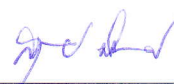
(ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)

กรรมการ



(ศ. ดร.สุกิจ ลิ้มปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ศุภมาส ถนอมมัน : การผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลในยีสต์เพื่อใช้เสริมในอาหารปลา (PRODUCTION OF NILE TILAPIA DELTA 6 DESATURASE IN YEAST FOR SUPPLEMENTATION IN FISH FEED) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตนาสาร, 69 หน้า.

ปลานิลเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เอนไซม์ delta 6 desaturase เป็นเอนไซม์ตัวแรกในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว มีหน้าที่เปลี่ยนกรดไขมัน linoleic acid (C18:2n6) และ alpha-linolenic acid (C18:3n3) เป็น gamma-linolenic acid (C18:3n6) และ stearidonic acid (C18:4n3) ตามลำดับ การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล และการแสดงออกของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ นอกจากนี้ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่มีการนำเอาเอนไซม์ delta 6 desaturase ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *Gal1* เข้าสู่เซลล์และศึกษาถึงศักยภาพการนำไปใช้เป็นสารเสริมชีวณะ

cDNA ของยีน delta 6 desaturase มีส่วนของ coding sequence เท่ากับ 1,338 bp เมื่อทำการแปลรหัสจะมีจำนวนกรดอะมิโนเท่ากับ 445 ตัว พบการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ในไข่ปลาที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ และในทุกระยะการพัฒนาการของตัวอ่อน จากการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR และพบว่ายีสต์ที่มีการถ่ายยีน delta 6 desaturase (ยีสต์ RY) มีการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกาแลคโตสที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการทำงานของยีน delta 6 desaturase ภายใต้อิทธิพลของการเหนี่ยวนำด้วยกาแลคโตสนั้น พบว่า delta 6 desaturase มีอัตราการการเปลี่ยนกรดไขมัน C18:2n6 เป็น C18:3n6 และ C18:3n3 เป็น C18:4n3 เท่ากับ 39 เปอร์เซ็นต์ และ 7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน dihomogamma-linolenic acid (C20:3n6) ได้เท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลสามารถทำหน้าที่ของเอนไซม์ delta 5 desaturase ได้ด้วยจึงจัดเป็น bifunctional enzyme

เพื่อศึกษาถึงผลของการเสริมยีสต์ RY ต่อการเพิ่มปฏิกิริยาการเอนไซม์ delta 6 desaturase เมื่อเสริมลงในอาหารปลานิล ได้ทำการทดลองเลี้ยงปลาได้อาหารที่เสริม ยีสต์ RY หรือยีสต์ที่ไม่ได้มีการถ่ายยีน (ยีสต์ NT) เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์โดยมี 5 กลุ่มการทดลอง ประกอบด้วย 1. อาหารสูตรพื้นฐาน 2. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ NT และให้ทุกวัน 3. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ NT และให้วันเว้นวัน 4. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ RY และให้ทุกวัน 5. อาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมยีสต์ RY และให้วันเว้นวัน ผลการศึกษาพบว่า สมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของปลาทุกกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน และไม่พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าองค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา ค่าโลหิตวิทยา และค่ากลูโคสในเลือด การ

เสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลมีผลทำให้แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio spp.* มีจำนวนลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีสต์ NT และ ยีสต์ RY สามารถใช้เป็นสารเสริมชีวณะได้ จากผลที่สามารถแยกเชื้อยีสต์ RY จากลำไส้ปลาได้นั้น แสดงว่ายีสต์ RY สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมของลำไส้ปลา การเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลทำให้มีกรดไขมัน C18:4n3 และ C18:3n6 สะสมในเนื้อปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้เห็นว่ายีสต์ RY สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase และการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลทำให้มีปริมาณของกรดไขมัน docosahexaenoic acid (C22:6n3) ในเนื้อปลานิลเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการเสริมยีสต์ NT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ายีสต์ RY สามารถเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวตัวอื่นได้ในปลาได้ด้วย



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา ศรภมาศ กนอมมัน
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา จ.ดร. จ.ดร.
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม จ.ดร.

SUPAMAS TANOMMAN : PRODUCTION OF NILE TILAPIA DELTA 6
DESATURASE IN YEAST FOR SUPPLEMENTATION IN FISH FEED.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN,
Ph.D., 69 PP.

DELTA 6 DESATURASE ENZYME/LONG CHAIN POLYUNSATURATED
FATTY ACID/RECOMBINANT YEAST/*Saccharomyces cerevisiae*/*Oreochromis
niloticus*

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is an economically important freshwater fish. Fatty acid delta 6 desaturase enzyme ($\Delta 6$), which converts linoleic acid (C18:2n6) and alpha-linolenic acid (C18:3n3) to gamma-linolenic acid (C18:3n6) and stearidonic acid (C18:4n3), respectively, is the first enzyme in the biosynthesis pathway of long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). This study aimed to investigate $\Delta 6$ mRNA expression during embryogenesis. In addition, its biological functions were determined using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (RY). Furthermore, the potential use of RY as probiotic was investigated.

Cloned $\Delta 6$ gene from Nile tilapia comprised of 1,338 bp coding sequence which encoded $\Delta 6$ of 445 amino acid residues. RT-PCR was performed to evaluate the expression of $\Delta 6$ in unfertilized egg and embryos during middle blastula, late blastula, gastrula, body segment formation, pharyngula, and hatching stages. The expression of $\Delta 6$ was detected in all stages tested, indicating that $\Delta 6$ is essential for embryo development.

RY was generated by transformation of *S.cerevisiae* with a plasmid containing $\Delta 6$ driven by *Gal1* promoter. The expression of $\Delta 6$ in RY was detected by RT-PCR after 24 h induction with galactose. It exhibited 39% and 7% of $\Delta 6$ activity toward

C18:2n6 and C18:3n3, respectively. It also displayed 4% of fatty acid delta 5 desaturase ($\Delta 5$) toward dihomogamma-linolenic acid (C20:3n6), indicating that Nile tilapia $\Delta 6$ had $\Delta 5$ and $\Delta 6$ bifunction.

In order to investigate whether RY could increase $\Delta 6$ activity when used as feed additive, Nile tilapia was fed with basal diet (B) supplemented with RY or nontransformed yeast (NT) for 12 weeks. Completely randomized designed experiment with five treatments consisting of the basal diet (T1), every day B+NT-feeding (T2), every other day B+NT-feeding (T3), every day B+RY-feeding (T4), every other day B+RY-feeding (T5) was carried out. The growth performance and survival rate of fish were not significantly different among treatments. There were no significant variations in body composition, hematological blood parameters and blood glucose among experimental groups. Fish fed with diet supplemented with RY or NT showed significant reduction in *Vibrio spp.*, demonstrating that both RY and NT could have probiotic effect. RY could be isolated from the intestine of Nile tilapia, which suggested that RY survived in the intestinal environment of the fish. Fish fed with the RY supplemented diet had higher C18:4n3 and C18:3n6 than that fed with B and B+NT. The result suggested that RY could increase $\Delta 6$ activity when it was used as feed additive in Nile tilapia. Moreover, the amount of docosahexaenoic acid (C22:6n3) in fish fed with the RY supplemented diet was higher when compared with that in fish fed with the NT supplemented diet, indicating that dietary RY could also increase other LC-PUFA in fish.

School of Animal Production Technology

Academic Year 2012

Student's Signature Supamas Tanomman

Advisor's Signature Sm D

Co-advisor's Signature Mani Kuttu

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนจาก โครงการทุนวิจัย มหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปี 2553 โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่สัญญา MRG-WII53S016 ชื่อโครงการ การผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลในยีสต์เพื่อใช้เสริมในอาหารปลา และทุนการศึกษาสำหรับผู้มีศักยภาพเข้าศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาส การศึกษาให้คำแนะนำและแนวคิดที่เป็นประโยชน์ทั้งด้านวิชาการ ด้านการดำเนินการวิจัยตลอดจน การช่วยตรวจแนะนำในการเขียน และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ อีกทั้งการสนับสนุนงบประมาณ ในการดำเนินการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์สันส์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อ. ดร.วิฑูรย์ โมฬี อ. ดร.สมร พรชิ่งชูวงศ์ ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี ที่ได้สละเวลาเป็นกรรมการใน การสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยตรวจทานและแก้ไข วิทยานิพนธ์เล่มนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อ.ศุณย์ พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้านสถานที่ทดลอง และให้คำปรึกษามาโดยตลอด และ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่น้องสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ระหว่างการทำวิทยานิพนธ์และกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ทุกคนในครอบครัวซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จ ในการศึกษา

ศุภมาส ถนอมมัน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชีววิทยาของปลานิล	4
2.2 กระบวนการผลิตกรดไขมัน LC-PUFA (Long chain polyunsaturated fatty acid).....	7
2.3 โครงสร้างของยีนและโปรตีนของยีน delta 6 desaturase ในปลาต่าง ๆ	9
2.4 ชีววิทยาของยีสต์	9
2.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
3.1 ปลานิลที่ใช้ในการศึกษา.....	16
3.2 สถานที่ทำการทดลอง	16
3.3 แผนการทดลองที่ 1 ผลิตยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ให้มีการผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิล (<i>O. niloticus</i>)	16
3.3.1 การโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase.....	16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2	การผลิตรีคอมบิแนนท์ยีสต์.....	20
3.3.3	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ในยีสต์ RY.....	29
3.3.4	การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลานิลโดยใช้ เทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)	30
3.4	แผนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง.....	31
3.4.1	การวางแผนการทดลอง	31
3.4.2	การเตรียมอาหาร	32
3.4.3	การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	34
3.4.4	การเก็บข้อมูลวัดอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอด.....	34
3.4.5	การเก็บตัวอย่าง.....	35
3.4.6	การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา.....	35
3.4.7	การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา.....	37
3.4.8	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของปลา.....	37
3.4.9	การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา	38
3.4.10	การวิเคราะห์ทางสถิติ	38
4	ผลการศึกษา.....	39
4.1	การทดลองที่ 1 ผลิตยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ให้มีการผลิตเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิล (<i>O. niloticus</i>).....	39
4.1.1	การโคลน delta 6 desaturase cDNA จากปลานิล (<i>O. niloticus</i>)	39
4.1.2	การศึกษการแสดงออกของ mRNA delta 6 desaturase ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)	44
4.1.3	การผลิต recombinant yeast	45

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.4	ตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในยีสต์ RY.....	50
4.1.5	ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ RY.....	51
4.2	การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน delta 6 desaturase ในอาหารปลานิล	53
4.2.1	ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิล ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอด	53
4.2.2	ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิล ต่อค่าโลหิตวิทยา	53
4.2.3	ผลของการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา.....	54
4.2.4	ผลของการศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาของปลา.....	55
4.2.5	ผลของการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา.....	56
4.2.6	ผลของการตรวจสอบเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหาร SC-agar.....	58
5	สรุปและข้อเสนอแนะ.....	60
	รายการอ้างอิง	62
	ภาคผนวก	65
	ประวัติผู้เขียน.....	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตารางเปรียบเทียบขนาดของ Coding Sequence (CDS) ของยีน Delta 6 desaturase ในปลาชนิดต่างๆ.....	11
2.2 การใช้ยีสต์ชนิดต่าง ๆ เสริมในอาหารปลานิลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต.....	12
2.3 การใช้ยีสต์ชนิดต่าง ๆ เสริมในอาหารปลานิลต่อโลหิตวิทยาและค่ากลูโคสในเลือดปลา.....	13
2.4 การใช้ยีสต์ชนิดต่าง ๆ เสริมในอาหารปลานิลต่อค่าองค์ประกอบโภชนะของปลานิล.....	14
2.5 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase ที่มีการเปลี่ยนกรดไขมัน สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันผลผลิตในปลาต่าง ๆ	15
3.1 โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา	21
3.2 การจัดกลุ่มการทดลอง	32
3.3 ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารปลา และองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร	32
3.4 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง.....	32
3.5 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง	34
4.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ RY (mg/g ไขมัน) ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร ที่ glucose และ galactose.....	52
4.2 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในยีสต์ RY.....	52
4.3 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตรา อัตราการรอด.....	53
4.4 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อค่าโลหิตวิทยา.....	54
4.5 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา.....	54
4.6 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อองค์ประกอบทางโภชนะของปลา	56
4.7 ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อประชากรจุลินทรีย์ ในลำไส้ปลานิล.....	57

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ปลานิล (Nile tilapia) ชื่อวิทยาศาสตร์ <i>Oreochromis niloticus</i>	4
2.2 ผลผลิตและมูลค่าปลานิล ปี 2540-2551	6
2.3 มูลค่าผลผลิตของสัตว์น้ำในกลุ่มปลานิลระดับโลก ระหว่างปี พ.ศ. 2540-2549	7
2.4 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง	8
2.5 ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Delta 6 desaturase ของปลานิลและการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการโคลน cDNA	20
3.2 แผนภาพพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy ลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM [®] -T Easy	22
3.3 แผนภาพพลาสมิดเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO [®] ลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His TOPO [®]	27
3.4 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดง	36
3.5 ปริมาตรเลือดทั้งหมด และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นใน microhematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว	36
4.1 การโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase ด้วยวิธี PCR	40
4.2 ผลการแยกและการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase	40
4.3 การตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิด recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)	41
4.4 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase	41
4.5 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มี cDNA ของยีน delta 6 desaturase โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco RI</i>	42
4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนยีน delta 6 desaturase ของปลานิล	43
4.7 ผลการทำนายตำแหน่งโครงสร้างของยีน delta 6 desaturase ของปลานิลจาก ลำดับของกรดอะมิโน	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.8 การแสดงออกของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนที่ระยะต่าง ๆ ของปลาโดยใช้เทคนิค RT-PCR.....	45
4.9 การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิด recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking).....	46
4.10 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase เมื่อนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO.....	46
4.11 การตรวจสอบ recombinant plasmid DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GAL1 คู่กับ V5 c-term จะได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,497 bp.....	47
4.12 การตรวจสอบ recombinant plasmid DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FADd6_1 คู่กับ ART_R2 จะได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 635 bp	47
4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน delta 6 desaturase ของปลา.....	48
4.14 ผลการตรวจสอบ recombinant yeast ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NiFad6_F2 คู่กับ primer NiFad6_R1 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,338 bp	49
4.15 ผลการตรวจสอบ recombinant yeast ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FADd6_1 คู่กับ primer ART_R2 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 635 bp	50
4.16 การตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase ของยีสต์ RY ใน D6	51
4.17 การตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase ของยีสต์ RY ใน D6-S.....	51
4.18 ผลการตรวจสอบเชื้อยีสต์ในลำไส้ปลาที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ NT และยีสต์ RY ด้วยวิธี PCR.....	58
4.19 ผลการตรวจสอบเชื้อยีสต์ในลำไส้ปลาที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ NT และยีสต์ RY ด้วยวิธี PCR.....	59

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่เลี้ยงง่าย สามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพเจริญเติบโตเร็ว ราคาส่งดี ปลานิลจึงเป็นปลาเนื้อขาวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีการขยายตัวในด้านการผลิตอย่างต่อเนื่องในตลาดโลก มีปริมาณการเพาะเลี้ยงเป็นอันดับหนึ่งในปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมด และมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกไปขายยังต่างประเทศมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตสัตว์น้ำจืดของประเทศไทย

ปลาเป็นเนื้อสัตว์ที่คนทั่วโลกทุกเพศทุกวัยนิยมบริโภค เพราะว่ามีโปรตีนคุณภาพดีที่คนสามารถนำไปใช้ได้มากเมื่อเทียบกับเนื้อสัตว์อื่น ๆ เนื่องจากมีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์หลายชนิด มนุษย์สามารถดูดซึมกรดอะมิโนไปใช้ประโยชน์ได้มาก นอกจากนี้เนื้อปลาเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว (Long chain polyunsaturated fatty acid; LC-PUFA) ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA; 20 : 5n-3), docosahexaenoic acid (DHA; 22 : 6n-3) และ arachidonic acid (AA; 20 : 4n-6) ที่จะพบในเนื้อปลาหลายชนิด แต่จะมีมากในปลาทะเล และปลาที่จับจากธรรมชาติ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้ต้องได้รับจากอาหาร กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของสมอง ตับ และระบบประสาทเกี่ยวกับการพัฒนาการเรียนรู้ ช่วยในการมองเห็น ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอล และไตรเอซิล กลีเซอรอล (triethylglycerol) ในพลาสมา ควบคุมระดับไลโปโปรตีน (lipoprotein) และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและหน้าที่ของเกล็ดเลือด (Mozaffarian and Rimm, 2006; วันเพ็ญ, 2541) โดยทั่วไปอาหารที่เป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว คือ ปลาทะเลและปลาน้ำจืดบางชนิด แต่เนื่องจากปลาทะเลมีราคาสูง และไม่สามารถเพาะเลี้ยงในปริมาณมากให้เพียงพอต่อการบริโภค ดังนั้นจึงมีการพยายามทำให้ปลาน้ำจืดมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวเพิ่มสูงขึ้น การเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวในปลาน้ำจืดปัจจุบันทำได้โดยเสริมน้ำมันปลาทะเลลงในอาหารปลาที่ใช้เลี้ยงปลาน้ำจืด ทำให้ปลาน้ำจืดมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวเพิ่มสูงขึ้น (บัณฑิต, 2546) ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวให้กับผู้บริโภคมากขึ้น โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ห่างไกลทะเล กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวพบมากใน

น้ำมันจากปลาทะเล จึงมีการนำน้ำมันปลาทะเลมาเสริมในอาหารสัตว์ แต่เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวเป็นกรดไขมันที่สลายตัวได้ง่ายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดความยุ่งยากในการจัดการ และนอกจากนี้การใช้น้ำมันปลาทะเลซึ่งมีราคาสูงมาใช้เสริมในอาหารส่งผลให้มีต้นทุนสูง ดังนั้นการใช้น้ำมันปลาทะเลเป็นแหล่งเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวให้กับเนื้อสัตว์ ไม่สามารถจะพัฒนาไปเป็นกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบยั่งยืนได้ การศึกษาวิจัยในปัจจุบันจึงเริ่มให้ความสำคัญการนำเอาองค์ความรู้พื้นฐานในด้านกระบวนการเปลี่ยนกรดไขมันอิ่มตัวไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยการเพิ่มพันธะคู่ในอะตอมของคาร์บอน (desaturation) โดยการทำงานของเอนไซม์ desaturase ต่าง ๆ และกระบวนการเพิ่มสายยาวของกรดไขมัน (elongation) โดยการทำงานของเอนไซม์ elongase มาใช้เพื่อต่อยอดถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มปฏิกิริยาต่าง ๆ เหล่านี้

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) เนื่องจากมีโปรตีนทั้งหมดปริมาณสูงและมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน โดยเฉพาะมีไลซีน ปริมาณสูง นอกจากนั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิด เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิด โดยเฉพาะวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์ ยิ่งกว่านั้นยีสต์ยังมีกลิ่นหอม รสชาติดี ช่วยเพิ่มความน่าบริโภคของอาหาร และอีกในแง่หนึ่งคือเป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือที่เราเรียกว่า เป็นโปรไบโอติก (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง มีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น (Jonewell, 1993) ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเซลล์เดี่ยวที่มีกลไกภายในเซลล์เช่นเดียวกับสัตว์ ยังมีคุณสมบัติในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อผลิตโปรตีนที่สนใจซึ่งคุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนโปรตีนธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาตัดต่อยีนของโปรตีน และนำเข้าดีเอ็นเอพาหะเข้าไปในยีสต์ เพื่อยีสต์ผลิตโปรตีนที่ต้องการให้มีปริมาณสูงในระยะเวลาอันสั้น

ในงานวิจัยนี้จึงจะนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ ในการตัดต่อยีนเอนไซม์ delta 6 desaturase ของปลานิลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยน C_{18} -PUFA เป็น LC-PUFA ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ แล้วนำดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์ยีสต์เพื่อให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ในยีสต์ และศึกษาการใช้ประโยชน์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์โดยการเสริมในรูปสารเสริมชีวณะ เพื่อให้รีคอมบิแนนท์ยีสต์ผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวในระบบทางเดินอาหารของปลา โดยคาดหวังว่า delta 6 desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง จะส่งผลต่อปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไปเพื่อให้ได้กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวเพิ่มขึ้นและการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะเป็นการเพิ่มความสามารถในการใช้ประโยชน์ไขมันจากพืชในอาหารปลา ซึ่งน่าจะส่งผลต่อการเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในเนื้อปลานิลเพิ่มขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 เพื่อโคลนยีน Delta 6 desaturase ของปลานิล
- 1.2.2 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนต์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ของปลานิล
- 1.2.3 เพื่อศึกษาผลของการเสริมรีคอมบิแนนต์ยีสต์ในอาหารปลานิล และผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลานิลที่บริโภคอาหารผสมรีคอมบิแนนต์ยีสต์

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

- 1.3.1 เมื่อนำยีน Delta 6 desaturase ที่ได้จากปลานิลมาตัดต่อพันธุกรรมเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase
- 1.3.2 เมื่อนำยีสต์ที่มีการผลิตเอนไซม์มาเสริมในอาหารปลานิลแล้ว ปลานิลมีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเพิ่มขึ้น

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะทำการโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase จากปลานิลและนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO[®] ซึ่งเป็น Expression vector จากนั้นทำการถ่ายโอนเข้าสู่ยีสต์ *S. cerevisiae* แล้วจึงนำยีสต์ดังกล่าวไปเสริมในอาหารปลานิลเพื่อดูองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในเนื้อปลานิล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 สามารถพัฒนาสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ที่มีบทบาทในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในระบบทางเดินอาหารของปลา
- 1.5.2 เมื่อนำรีคอมบิแนนต์ยีสต์ไปใช้เสริมในอาหารปลานิลสามารถเพิ่มองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในเนื้อปลานิล

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของปลานิล

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืด เนื้อขาว รสชาติดี สามารถเลี้ยงได้ทุกสภาพ จัดอยู่ในครอบครัวปลาหมอสี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus*



ภาพที่ 2.1 ปลานิล (Nile tilapia) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus*

ที่มา : www.thaikasetsart.com.

2.1.1 ลักษณะทางด้านอนุกรมวิธาน (Nelson, 2006)

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Class : Actinopterygii

Order : Perciformes

Family : Cichlidae

Genus : *Oreochromis*

Species : *niloticus*

2.1.2 ความเป็นมา

ปลานิลได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ทรงจัดส่งปลานิลขนาดความยาว ประมาณ 9 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 14 กรัม จำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เมื่อวันที่ 25

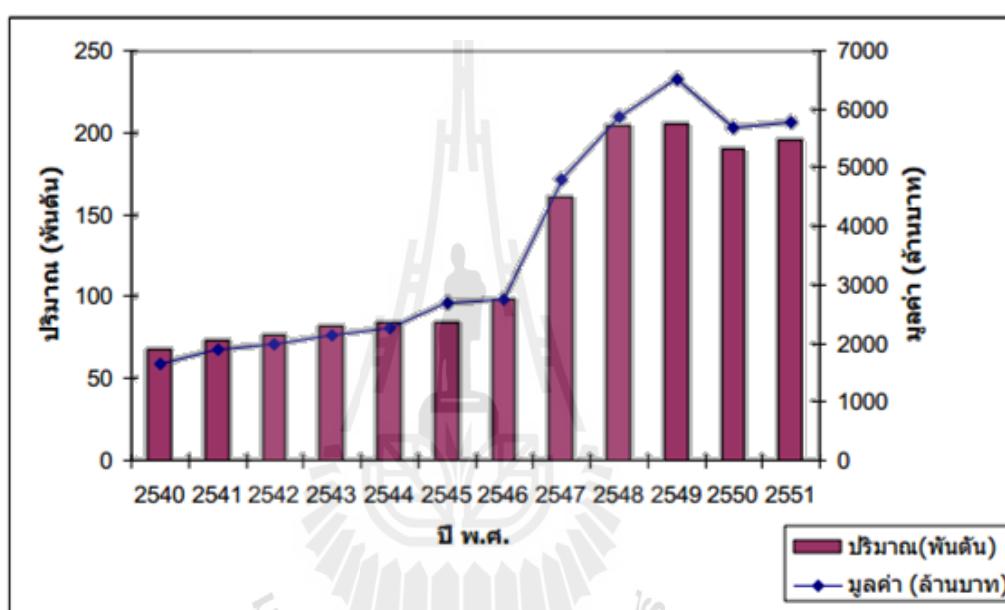
มีนาคม 2508 ในระยะแรกได้ทรงพระกรุณา โปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยง ในบ่อดินในบริเวณสวน จิตรลดา พระราชวังดุสิต เมื่อเลี้ยงมา 5 เดือนเศษ ปรากฏว่ามีลูกปลาเกิดขึ้นเป็นจำนวน ทรงพระ กรุณาโปรดเกล้าฯ ให้กรมประมง จัดส่งเจ้าหน้าที่วิชาการมาตรวจสอบการเจริญเติบโต เป็นประจำ ทุกเดือน โดยในระยะเวลา 1 ปี จะมีน้ำหนักประมาณครึ่งกิโลกรัม และมีความยาวประมาณ 1 ฟุต จึง ได้มีพระราชประสงค์ที่จะให้ปลาชนิดนี้แพร่ขยายพันธุ์ อันจะเป็นประโยชน์แก่พสกนิกรของ พระองค์ต่อไป ดังนั้นเมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2509 จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลา ชนิดนี้ว่า "ปลานิล" และได้พระราชทานปลานิล ขนาดยาว 3-5 เซนติเมตร จำนวน 10,000 ตัว ให้แก่ กรมประมงนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ ที่แผนกทดลองและเพาะเลี้ยง ในบริเวณเกษตรกลางบางเขน และที่สถานีประมงต่าง ๆ ทั้งพระราชอาณาจักร รวม 15 แห่ง เพื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ พร้อมกัน ซึ่งเมื่อปลานิลแพร่ขยายพันธุ์ออกไปได้มากเพียงพอแล้ว จึงได้แจกจ่ายให้แก่ราษฎรนำไป เพาะเลี้ยงตามความต้องการต่อไป (ประเทือง เชาวน์วันกลาง, 2536)

2.1.3 ลักษณะทั่วไปและพฤติกรรมของปลานิล

มีลักษณะลำตัวแบนข้าง รูปร่างลักษณะของปลานิลคล้ายกับปลาหมอเทศ แต่ลักษณะ พิเศษของปลานิลมีดังนี้คือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลาย พาดขวางจำนวน 9-10 แถบ ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้น เวลาสืบพันธุ์) มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับ สภาพแวดล้อมได้ดี ปลานิลทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพัน ทนต่อค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH) ได้ดีในช่วง 6.5-8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส ปลานิลกินอาหารได้ทุกประเภทตั้งแต่อาหารธรรมชาติจนถึงอาหารสำเร็จรูป กิน ได้ทั้งบนผิวน้ำ กลางน้ำ และก้นบ่อ ปลานิลเป็นปลาที่กินอาหารตลอดเวลา ปลานิลสามารถผสม พันธุ์ได้ตลอดปีโดยใช้เวลา 2-3 เดือน/ครั้ง ขนาดอายุและช่วง การสืบพันธุ์ของปลาแต่ละตัวจะ แตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม และสภาพทางสรีรวิทยาของปลาเอง โดยปกติปลานิลที่ยังโต ไม่ได้ขนาดผสมพันธุ์หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมเพื่อการวางไข่ ปลาจะรวมกันอยู่เป็นฝูง แต่ ภายหลังที่ปลามีขนาดที่จะสืบพันธุ์ได้ปลาตัวผู้จะแยกออกจากฝูงแล้วเริ่มสร้างรัง ตัวเมียจะวางไข่ ครั้งละประมาณ 50-600 ฟอง โดยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อลงไปในไข่ แล้วปลาตัวเมียเก็บไข่ที่ได้รับการ ผสมโดยการอมไว้ในปาก ไข่ปลาที่อมไว้โดยปลาตัวเมียจะวิวัฒนาการขึ้นตามลำดับ แม่ปลาจะขยับ ปากให้น้ำไหลเข้าออกในช่องปากอยู่เสมอ ระยะเวลาฟักไข่ที่ใช้แตกต่างกันตามอุณหภูมิของน้ำ ไข่ จะมีวิวัฒนาการเป็นลูกปลาวัยอ่อนภายใน 8 วัน ซึ่งในระยะเวลาดังกล่าวลูกอาหารยังไม่ขยับ และจะ ขยับเมื่อลูกปลาเมื่ออายุครบ 13-14 วัน นับจากวันที่แม่ปลาวางไข่ เมื่อลูกอาหารขยับลงลูกปลานิลจะเริ่ม กินอาหารจำพวกพืชและไร่น้ำขนาดเล็กได้ และหลังจาก 3 สัปดาห์แล้วลูกปลาก็จะสามารถหากิน ด้วยตัวเองได้ (Philippart and Ruwat, 1982)

2.1.4 การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย

ประเทศไทยเป็นแหล่งการผลิตปลานิลที่สำคัญประเทศหนึ่งของโลก โดยมีการผลิตเป็นอันดับที่ 3 รองจากประเทศจีนและประเทศอียิปต์ (FAO, 2002) การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยนั้น มีอัตราการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น โดยมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปจากปี 2540-2545 และมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วในปี 2546 โดยในปี 2551 มีผลผลิตปลานิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากถึง 195,900 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2546 ร้อยละ 99 ซึ่งมีมูลค่าผลผลิตปลานิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากถึง 5,770 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปี 2546 ร้อยละ 110 (ภาพที่ 2.2)

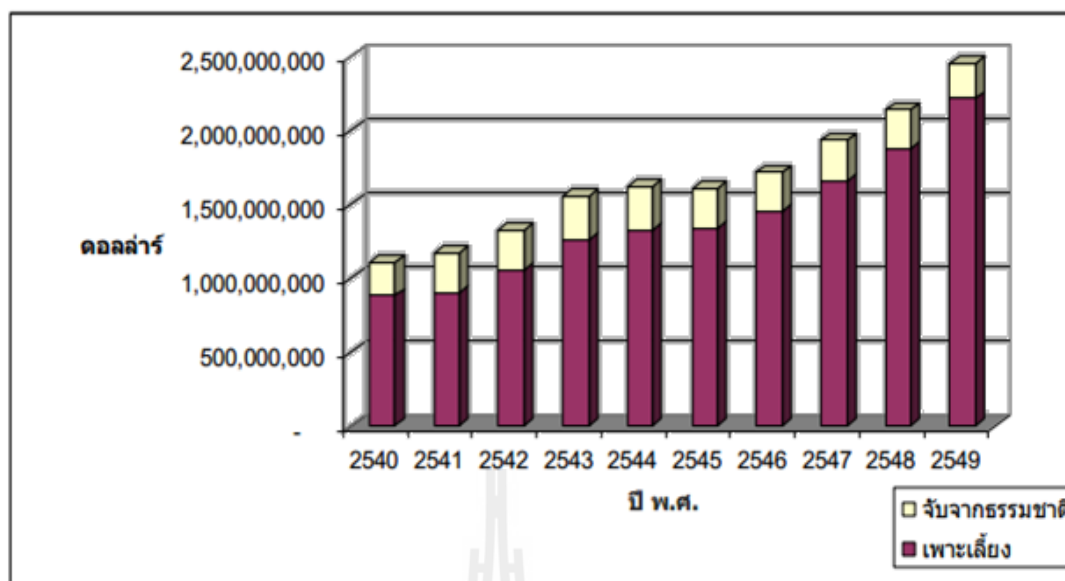


ภาพที่ 2.2 ผลผลิตและมูลค่าปลานิล ปี 2540-2551

ที่มา : กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง (รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร)

2.1.5 การเพาะเลี้ยงปลานิลในระดับโลก

การเพาะเลี้ยงปลานิลนั้นมีการเพาะเลี้ยงมายาวนานและได้มีการเพาะเลี้ยงไปทั่วโลก พ.ศ. 2549 มีผลผลิตของปลานิลจำนวน 1,988,726 ตัน โดยประเทศจีนเป็นผู้นำทางด้านการผลิตปลานิลในระดับโลก มูลค่าผลผลิตของปลานิลในระดับโลกนั้นมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2549 มีมูลค่าผลผลิตของกลุ่มปลานิล 2,451 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ซึ่งแยกเป็นปลานิลจากการเพาะเลี้ยงมูลค่า 2,220 ล้านดอลลาร์สหรัฐ คิดเป็นร้อยละ 90.58 และเป็นปลานิลที่มาจากการจับจากธรรมชาติมูลค่าประมาณ 231 ล้านดอลลาร์สหรัฐ คิดเป็นร้อยละ 9.42 ของมูลค่าผลผลิตปลานิลทั้งหมด



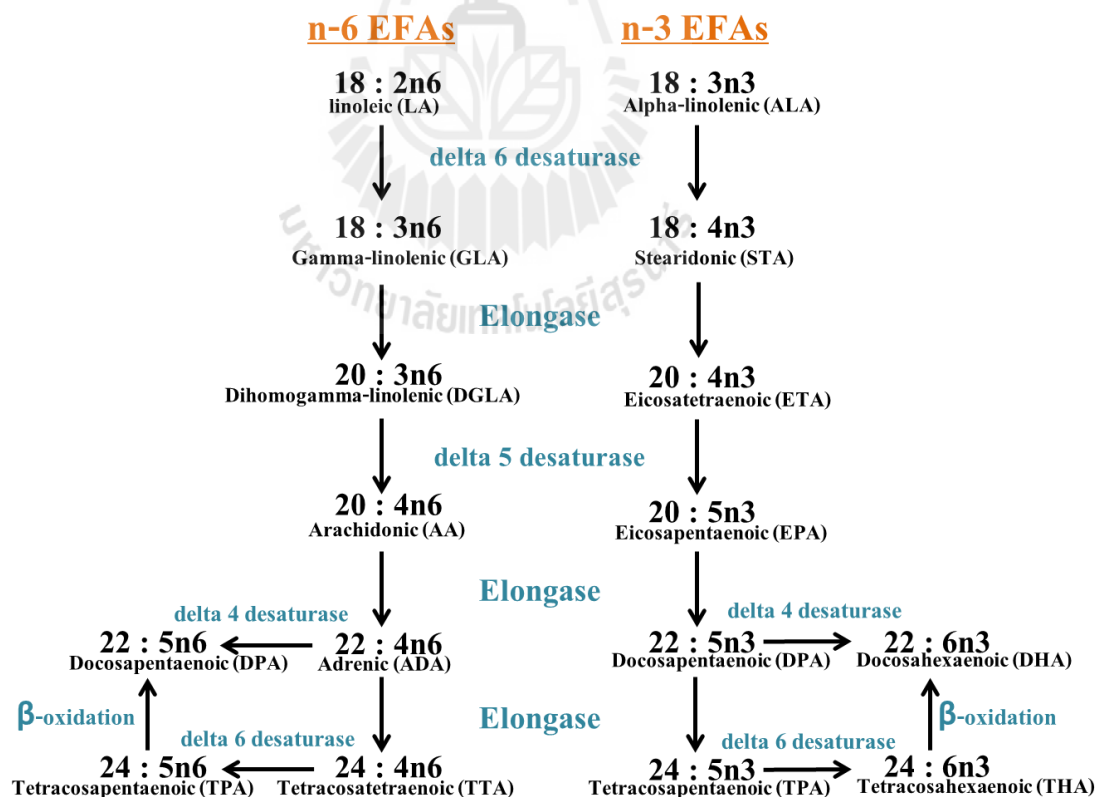
ภาพที่ 2.3 มูลค่าผลผลิตของสัตว์น้ำในกลุ่มปลาน้ำจืดระดับโลก ระหว่างปีพ.ศ. 2540-2549

ที่มา : กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง
(รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร)

2.2 กระบวนการผลิตกรดไขมัน LC-PUFA (Long chain polyunsaturated fatty acid)

กระบวนการเปลี่ยนกรดไขมัน C_{18} -Polyunsaturated Fatty Acid (C_{18} -PUFA) ได้แก่ linoleic acid ($18 : 2n-6$) และ linolenic acid ($18 : 3n-3$) ไปเป็น LC-PUFA ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA; $20 : 5n-3$), docosahexaenoic acid (DHA; $22 : 6n-3$) และ arachidonic acid (AA; $20 : 4n-6$) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสรีรวิทยาระบบต่างของร่างกายสัตว์ โดยจะมีเอ็นไซม์เข้ามาเกี่ยวข้องหลัก ๆ 4 ชนิดด้วยกัน (ภาพที่ 2.4) ได้แก่ delta 4 desaturase ($\Delta 4$), delta 5 desaturase ($\Delta 5$), delta 6 desaturase ($\Delta 6$) และ elongase กลไกการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงสายยาวจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เป็นกรดไขมันในกลุ่ม ω -6 มีกรดไขมันต้นแบบคือ Linoleic acid ($18 : 2n-6$) และกลุ่ม ω -3 มีกรดไขมันต้นแบบคือ α -Linolenic acid ($18 : 3n-3$) ในการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวในเนื้อเยื่อของสัตว์ เริ่มแรกเอ็นไซม์ delta 6 desaturase จะเข้าไปเปลี่ยน Linoleic acid ได้ grama-linolenic acid (GLA) ต่อจากนั้นจะเข้าสู่ elongation ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์ dihomograma-linolenic acid (DGLA) ส่วนกรดไขมันในกลุ่ม ω -3 เริ่มแรกเอ็นไซม์ delta 6 desaturase จะเข้าไปเติมพันธะคู่ α -Linolenic acid ได้ stearidonic acid (STA) ต่อจากนั้นจะเข้าสู่ elongation ซึ่งจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ทำให้เกิดสังเคราะห์ eicosatetraenoic acid (ETA) หลังจากเอ็นไซม์ delta 5 desaturase จะเข้าไปเปลี่ยน DGLA และ ETA จะได้ Arachidonic acid (AA) และ eicosapentaenoic acid (EPA) ตามลำดับ ต่อจากนั้นจะเข้าสู่

กระบวนการ elongation โดยจะมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ ω 3-docosapentaenoic acid (DPA) เกิดขึ้น และ DPA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ delta 4 desaturase ทำให้ได้ DHA และมีทางเลือกอีกทางที่จะสามารถสังเคราะห์ DHA ได้ โดยมีกระบวนการ elongation 2 steps จาก EPA ไปยัง DPA และจาก DPA ไปยัง ω 3-tetracosapentaenoic acid (TPA) หลังจากนั้น TPA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ delta 6 desaturase ได้ ω 3-tetracosahexaenoic acid (THA) และในที่สุด THA ก็จะเปลี่ยนกลับไปเป็น DHA โดยกระบวนการ β -oxidation ใน peroxisome ส่วนกรดไขมันในกลุ่ม ω -6 ก็เช่นเดียวกัน AA จะเข้าสู่กระบวนการ elongation โดยมีการเติมคาร์บอนเข้าไป 2 ตัว ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ adrenic acid (ADA) เกิดขึ้น และ ADA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ delta 4 desaturase ทำให้ได้ ω 6-docosapentaenoic acid (DPA) และได้มีทางเลือกอีกทางที่จะสามารถสังเคราะห์ DPA ได้ โดยมีกระบวนการ elongation 2 steps จาก AA ไปยัง ADA และจาก ADA ไปยัง ω 6-tetracosatetraenoic acid (TTA) หลังจากนั้น TTA จะถูกเติมพันธะคู่ด้วยเอนไซม์ delta 6 desaturase ได้ ω 6-tetracosapentaenoic acid (TPA) และสุดท้าย TPA ก็จะเปลี่ยนกลับไปเป็น DPA โดยกระบวนการ β -oxidation เหมือนกัน (Sprecher, 2000) (ภาพที่ 2.4)



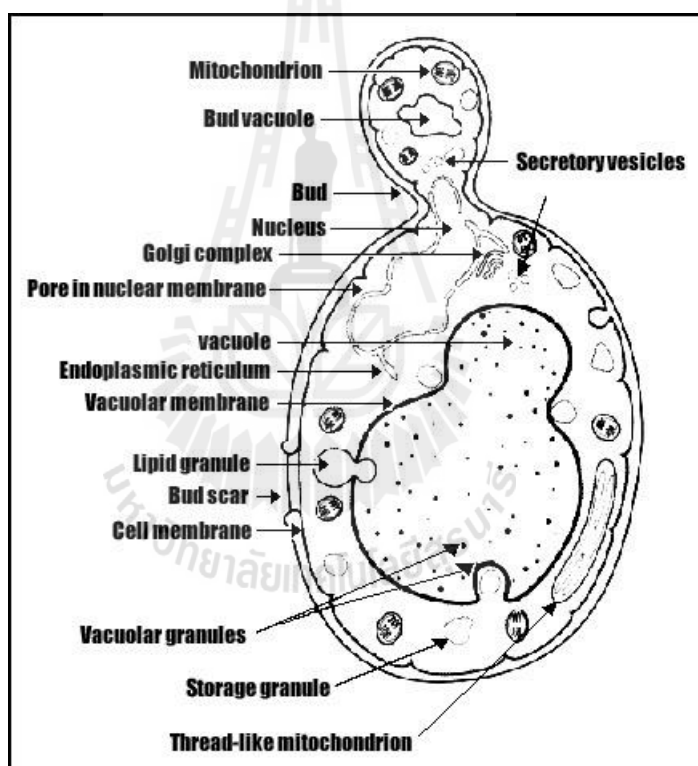
ภาพที่ 2.4 แสดงกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง

ที่มา : (Sprecher, 2000)

2.3 โครงสร้างของยีนและโปรตีนของยีน delta 6 desaturase ในปลาต่าง ๆ

เอนไซม์ delta 6 desaturase เป็นเอนไซม์ตัวแรกในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวจึงได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน delta 6 desaturase โดยพบว่า ส่วนของ Coding sequence (CDS) มีนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,329-1,365 bp มีส่วนของ 5'untranslated region (5'UTR) อยู่ในช่วง 261-284 bp และส่วนของ 3'untranslated region (3'UTR) อยู่ในช่วง 375-494 bp และมีลำดับกรดอะมิโนของยีน delta 6 desaturase อยู่ในช่วง 442-454 residues (ตารางที่ 2.1)

2.4 ชีวิตวิทยาของยีสต์



ภาพที่ 2.5 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์พวักยูคาริโอต มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีหลายรูปแบบ คือ กลม (round, spheroidal, spherical) รี (ellipsoidal) รูปไข่ (oval, ovoidal) รูปแหลม (apiculate) สามเหลี่ยม (triangular) ยาว (elongated) และเป็นสาย (filamentous) ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ในยีสต์ที่ได้มีการศึกษานี้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างรี ความกว้าง

ประมาณ 1-7 ไมโครเมตร และความยาวของเซลล์ 5-10 ไมโครเมตร เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโครงสร้างต่าง ๆ เช่น ผนังเซลล์ (Cell wall) ส่วนใหญ่เป็นกลูแคน (glucan) และ แมนแนน (mannan) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ส่วนใหญ่เป็นพวกไขมันและโปรตีน คาร์โบไฮเดรตในปริมาณเล็กน้อยมีบางส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยื่นเข้าไป (invagination) ในไซโทพลาสซึม นิวเคลียส (Nucleus) มีรูปร่างกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ไมโครเมตร จะเห็นนิวเคลียสของยีสต์ได้ในเซลล์ที่กำลังมีการแตกหน่อ ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) มีรูปร่างกลมหรือรูปท่อน หน้าที่สำคัญของไมโทคอนเดรีย คือการสร้างพลังงานในรูปของ ATP จากการหายใจในสภาวะที่มีออกซิเจน เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) เป็นโครงสร้างภายในไซโทพลาสซึม มีหน้าที่ช่วยในช่วงเริ่มต้นของการแตกหน่อโดยการสร้างเวสิเคิล (vesicle) ที่บรรจุเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ แวกิวโอล (Vacuole) ขนาดของแวกิวโอลเปลี่ยนแปลงตามการเจริญของเซลล์ ทำหน้าที่คล้ายไลโซโซม (lysosome) ในการย่อยโปรตีนทั่ว ๆ ไปในเซลล์ ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) เป็นของเหลวที่มีลักษณะคล้ายวุ้นและมีความเป็นกรด ส่วนที่พบแขวนลอยอยู่ในไซโทพลาสซึมคือ ไมโครบอดี (microbody) ไรโบโซม (ribosome) โปรทีโซม (proteasome) อนุภาคลิพิด (lipid particle) (สาวิตรี, 2549)

ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ยีสต์เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) เนื่องจากมีโปรตีนทั้งหมดปริมาณสูงและมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน โดยเฉพาะมีไลซีนปริมาณสูง นอกจากนั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิด เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์ยิ่งกว่านั้นยีสต์ยังมีกลิ่นหอม รสชาติดี ช่วยเพิ่มความน่าบริโภคของอาหารและ อีกในแง่หนึ่งก็เป็นตัวช่วยเสริมสุขภาพของสัตว์หรือที่เราเรียกว่าเป็น โปรไบโอติก (probiotic) ให้กับสัตว์เลี้ยง ซึ่งจะทำให้สัตว์แข็งแรง มีภูมิคุ้มกันโรคสูงขึ้น (Jonewell, 1993)

2.4.1 การเสริมยีสต์ในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

การศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต ซึ่งการเจริญเติบโตเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพของการใช้อาหาร พบว่า การใช้ยีสต์เสริมในอาหารปลานั้นส่งผลทำให้ปลามีสมรรถนะการเจริญเติบโตสูงขึ้น แต่ไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดของปลา (Ebrahim and Abou-seif, 2008; Tawwab, Rahman and Ismael, 2008 and Osman, Ibrahim, Soliman and Monier, 2010) (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 ตารางเปรียบเทียบขนาดของ Coding Sequence (CDS) ของยีน delta 6 desaturase ในปลาชนิดต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง	ชนิดปลา	CDS	จำนวนกรดอะมิโน	Cytochrome b ₅	Fatty acid desaturase domain	% Identities
Morais et al. (2011)	Atlantic Bluefin tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	1,338 bp	445	21-95	158-417	89
Zheng et al. (2009)	Cobia(<i>Rachycentron canadum</i>)	1,329 bp	442	18-92	155-413	83
González-Rovira et al. (2009)	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	1,338 bp	445	21-95	158-416	84
Tocher et al. (2006a)	Atlantic Cod (<i>Gadus morhua</i>)	1,344 bp	447	23-97	161-419	76
Zheng et al. (2004a)	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1,365 bp	454	30-104	167-425	75
Zheng et al. (2004a)	Seabream (<i>Sparus aurata</i>)	1,338 bp	445	21-95	158-416	83
Zheng et al. (2004a)	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	1,338 bp	445	21-95	158-416	82
Zheng et al. (2005b)	Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	1,365 bp	454	30-104	167-425	75
Gen bank XM_003440470	Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>)	1,338 bp	445	21-95	158-417	99
Zheng et al. (2004a)	Common Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	1,335 bp	444	20-94	157-416	70
Hastings et al. (2001)	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	1,590 bp	444	21-94	157-416	71

หมายเหตุ : a, b, c และ d ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวดัง ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2.2 การใช้ยีสต์ชนิดต่างๆเสริมในอาหารปลานิลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต

เอกสารอ้างอิง	ชนิดของ ยีสต์	Yeast Level (%)	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)	SGR (%/day)	FCR	Survival rate (%)
Ebrahim and Seif (2008)	Brewer's yeast	0	1.57±0.18	10.17±0.53 ^b	8.60±0.53 ^b	1.67±0.16 ^b	-	90.00±0.52
		25	1.57±0.24	10.00±0.52 ^b	8.43±0.52 ^b	1.65±0.20 ^b	-	88.33±0.40
		50	1.50±0.17	12.33±0.40 ^a	10.83±0.40 ^a	1.82±0.15 ^a	-	91.65±0.56
		75	1.53±0.25	12.33±0.65 ^a	10.80±0.65 ^a	1.82±0.19 ^a	-	93.33±0.40
		100	1.53±0.20	9.87±0.53 ^b	8.34±0.53 ^b	1.64±0.16 ^b	-	86.65±0.40
Osman et al. (2010)	Beaker's yeast	0	77.39±15.46	82.79±4.14	5.4±0.27 ^c	0.17±0.017 ^c	-	96.7±4.83
		10	76.93±15.38	86.23±4.31	8.1±0.40 ^b	0.29±0.015 ^a	-	95.0±4.75
		20	77.20±15.44	86.58±4.33	9.3±0.47 ^b	0.26±0.013 ^b	-	100.0±5.0
		30	77.10±15.42	87.78±4.39	10.68±0.53 ^a	0.29±0.015 ^a	-	98.2±4.91
		60	77.30±15.46	86.80±4.34	9.5±0.48 ^b	0.26±0.013 ^b	-	99.1±4.95
Tawwab et al. (2008)	Beaker's yeast	Control	0.33±0.088	7.22±0.11 ^d	6.89±0.098 ^d	3.673 ± 0.015 ^c	1.72 ± 0.028 ^a	96.7 ± 1.7
		2.5	0.34±0.033	8.00±0.06 ^c	7.66±0.061 ^c	3.760 ± 0.019 ^{bc}	1.61 ± 0.073 ^{ab}	95.0 ± 2.9
		5	0.34±0.033	8.50±0.23 ^{bc}	8.16±0.228 ^{bc}	3.832 ± 0.023 ^b	1.55 ± 0.052 ^b	100.0 ± 0.0
		10	0.33±0.088	9.90±0.29 ^a	9.57±0.028 ^a	4.049 ± 0.011 ^a	1.48 ± 0.034 ^c	95.0 ± 2.9
		20	0.33±0.012	10.05±0.11 ^a	9.72±0.089 ^a	4.067 ± 0.030 ^a	1.39 ± 0.045 ^{cd}	100.0 ± 0.0

หมายเหตุ : a, b, c และ d ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P < 0.05$)

2.4.2 การเสริมยีสต์ในอาหารต่อค่าทางโลหิตวิทยา และค่ากลูโคสในเลือดปลา

นอกจากนี้การศึกษาการเสริมยีสต์ในอาหารปลาต่อค่าทางโลหิตวิทยา ซึ่งค่าทางโลหิตวิทยาเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญที่ใช้ประเมินสภาพทางกายภาพและชีวภาพของปลา การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเลือดขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อายุ ระยะเจริญพันธุ์และสุขภาพของปลา การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ สารพิษที่ปนเปื้อน การให้อาหารหรือวิตามินเสริมหรือความผิดปกติในระบบใดระบบหนึ่งของร่างกายจะส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบของเลือด (Puangkaew et al., 2004 and Hrubec, Cardinale, and Smith, 2000) ดังนั้นการศึกษาค่าโลหิตวิทยาบางประการจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของปลา และสุขภาพของปลาได้ พบว่าการเสริมยีสต์ในอาหารปลานั้นส่งผลทำให้ค่าโลหิตวิทยาได้แก่ จำนวนเม็ดเลือด ค่าฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริต และค่ากลูโคสในเลือดปลาสูงขึ้นตามระดับการเสริมยีสต์ และค่ากลูโคสในเลือดโลหิตวิทยา (Tawwab et al., 2008 and Osman et al., 2010) (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 การใช้ยีสต์ชนิดต่าง ๆ เสริมในอาหารปลานิลต่อโลหิตวิทยาและค่ากลูโคสในเลือดปลา

เอกสารอ้างอิง	ชนิดของยีสต์	Yeast Level (%)	RBC (cell $\times 10^{12}$ /L)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Glucose (mg/L)
Tawwab et al. (2008)	Brewer's yeast	Control	1.74 $\pm$ 0.138 ^b	50.3 $\pm$ 2.93 ^b	12.67 $\pm$ 0.917 ^b	122.0 $\pm$ 9.8 ^d
		0.25	1.81 $\pm$ 0.087 ^b	54.3 $\pm$ 2.89 ^b	13.43 $\pm$ 0.921 ^b	196.3 $\pm$ 9.8 ^c
		0.5	1.59 $\pm$ 0.045 ^b	48.0 $\pm$ 3.21 ^b	12.23 $\pm$ 0.984 ^b	231.7 $\pm$ 16.3 ^b
		1.0	2.54 $\pm$ 0.142 ^a	75.0 $\pm$ 4.07 ^a	16.90 $\pm$ 0.322 ^a	399.0 $\pm$ 18.8 ^a
		2.0	2.58 $\pm$ 0.170 ^a	77.8 $\pm$ 3.05 ^a	16.70 $\pm$ 0.153 ^a	241.7 $\pm$ 11.7 ^b
		5.0	2.41 $\pm$ 0.058 ^a	84.3 $\pm$ 4.88 ^a	16.87 $\pm$ 0.406 ^a	258.0 $\pm$ 11.1 ^b
Osman et al. (2010)	Beaker's yeast	0	1.43 $\pm$ 0.15 ^c	4.30 $\pm$ 0.15 ^c	12.45 $\pm$ 0.75 ^d	-
		10	1.89 $\pm$ 0.09 ^b	5.43 $\pm$ 0.15 ^b	17.51 $\pm$ 0.90 ^c	-
		20	1.85 $\pm$ 0.11 ^b	5.43 $\pm$ 0.15 ^b	21.62 $\pm$ 0.90 ^b	-
		30	2.39 $\pm$ 0.15 ^a	6.95 $\pm$ 0.26 ^a	23.23 $\pm$ 0.93 ^a	-
		60	2.00 $\pm$ 0.14 ^a	6.51 $\pm$ 0.24 ^a	21.45 $\pm$ 1.03 ^b	-

หมายเหตุ : a, b, c และ d ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแถวตั้ง ($P < 0.05$)

2.4.3 การเสริมยีสต์ในอาหารต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีของปลา

จากการศึกษาการใช้ยีสต์เสริมในอาหารปลาต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีของปลา พบว่าการใช้ยีสต์เสริมในอาหารปลานั้นไม่ส่งผลกระทบต่อค่าองค์ประกอบโภชนะของปลานิล (Ebrahim and Abou-seif, 2008 and Tawwab et al., 2008) (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 การใช้ยีสต์ชนิดต่าง ๆ เสริมในอาหารปลานิลต่อค่าองค์ประกอบโภชนาของปลานิล

เอกสารอ้างอิง	ชนิดของ ยีสต์	Yeast Level (%)	Dry matter (%)	Crude protein (%)	Crude lipid (%)	Ash (%)
Ebrahim and Seif (2008)	Brewer's yeast	0	27.60± 0.53	56.70± 0.48	23.10 ±0.52	20.20± 0.60
		25	28.40 ±0.51	57.00± 0.49	22.71± 0.47	20.29±0.41
		50	27.97± 0.37	57.75± 0.43	23.04±0.18	19.21 ±0.38
		75	28.40± 0.39	57.40 ±0.41	23.16± 0.27	19.44 ±0.45
		100	27.80 ±0.53	56.60 ±0.33	23.04± 0.42	20.36± 0.57
Tawwab et al. (2008)	Brewer's yeast	Control	73.8±0.42	55.2±2.28	26.1±1.32	11.9±0.22
		0.25	74.4±0.50	56.1±1.37	25.1±0.75	12.1±0.28
		0.5	74.7±0.41	56.4±0.69	25.3±1.08	12.6±0.40
		1.0	74.2±0.71	57.2±0.61	25.5±0.67	13.0±1.09
		2.0	74.6±0.49	57.6±1.65	23.8±0.83	13.6±0.34
		5.0	74.3±0.4	57.7±1.19	23.9±0.58	14.4±0.34

2.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงเซลล์เดียวที่มีกลไกภายในเซลล์เช่นเดียวกับสัตว์ มีคุณสมบัติในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์เซลล์เจ้าบ้าน เพื่อผลิตโปรตีนที่สนใจซึ่งคงคุณสมบัติทางชีวภาพเหมือนโปรตีนธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาตัดต่อยีนของโปรตีน และนำเข้าดีเอ็นเอพาหะเข้าไปในเซลล์ยีสต์ เพื่อยีสต์ผลิตโปรตีนที่ต้องการให้มีปริมาณสูงขึ้นภายในระยะเวลาอันสั้น จากการศึกษาของ Lu, Li, Chai and Zhang 2010; Zheng et al., 2009; González-Rovira et al., 2009; Zheng et al., 2005; และ Tocher et al., 2006 ได้ทำการตัดต่อยีน delta 6 desaturase ในปลาต่าง ๆ พบว่ายีสต์มีการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase และเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากยีสต์สามารถทำงานได้ (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase ที่มีการเปลี่ยนกรดไขมันสารตั้งต้นเป็นกรดไขมันผลผลิตในปลาต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง	ยีนที่นำมาสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์		FA substrate	Product	Conversion (%)	Activity
	ชนิดปลา	ยีน				
Li et al. (2010)	Whitespotted spinefoot <i>Siganus canaliculatus</i>	fatty acyl desaturase	18 : 3n3	18 : 4n3	59	D6
			18 : 2n6	18 : 3n6	35	D6
			20 : 3n6	20 : 4n6	12	D5
Zheng et al.(2009)	Cobia	fatty acyl delta 6 desaturase/ <i>elovl5</i> elongase	18 : 3n3	18 : 4n3	50.8	D6
			18 : 2n6	18 : 3n6	36.5	D6
			20 : 4n3	20 : 5n3	2.4	D5
			20 : 3n6	20 : 4n6	0.2	D5
González-Rovira et al. (2009)	Sea bass	fatty acyl delta 6 desaturase	18 : 3n3	18 : 4n3	14.5	D6
			18 : 2n6	18 : 3n6	5.6	D6
Zheng et al. (2005b)	Atlantic salmon	fatty acyl delta 6 desaturase	18 : 3n3	18 : 4n3	60	D6
			18 : 2n6	18 : 3n6	14	D6
Tocher et al. (2006a)	Atlantic Cod	fatty acyl delta 6 desaturase	18 : 3n3	18 : 4n3	33	D6
			18 : 2n6	18 : 3n6	18	D6

หมายเหตุ : D6 คือ delta 6 desaturase

D5 คือ delta 5 desaturase

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้แบ่งเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลิตยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ของปลานิล (*O. niloticus*)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ในอาหารปลานิล

3.1 ปลานิลที่ใช้ทำการศึกษา

ปลานิลเพศผู้ขนาดประมาณ 30 g จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ) นำมาพักเลี้ยงเพื่อปรับสภาพในบ่อซีเมนต์เพื่อลดความเครียดเนื่องจากการขนย้ายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยทำการเลี้ยงปลาในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด $5 \times 10 \times 1 \text{ cm}^3$ โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ที่เวลา 10.00 น. และ 16.00 น.

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ) และอาคารเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 แผนการทดลองที่ 1 ผลิตยีสต์ *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ของปลานิล (*O. niloticus*)

3.3.1 การโคลน cDNA ของยีน Delta 6 desaturase

การเก็บตัวอย่างตับปลานิล

นำปลานิลที่มีน้ำหนักประมาณ 50 g มาทำการเก็บตับ โดยทำการสลบปลานิลใน 2-phenoxyethanol หลังจากนั้นทำการเปิดช่องท้องและทำการเก็บตับประมาณ 50-100 mg ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml แล้วนำตัวอย่างตับไปเก็บในตู้ -80°C

การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างตับของปลานิลที่เก็บในตู้ -80°C มาพักในถังน้ำแข็ง โดยตัวอย่างตับปลานิลมีน้ำหนักประมาณ 50-100 mg และใส่สาร Trizol 500-1000 μl แล้วทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังจากนั้นใส่ chloroform 1 ส่วนต่อ 5 ส่วน ของสารละลายใน

หลอด ทำการผสม (vortex) และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้น โดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol โดยใส่สาร isopropanol เท่ากับสารละลายอาร์เอ็นเอที่ย้ายมา ทำการ vortex สารละลาย และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของ อาร์เอ็นเอ ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol ใส่เป็น 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำ DEPC 225 µl ทำการผสมเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ DNase I (5 U/µl) 1 µl และ 10x DNase buffer 25 µl เพื่อกำจัดดีเอ็นเอให้เหลือไว้แต่อาร์เอ็นเอ นำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และทำลายเอนไซม์ DNase I ด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใส่ phenol : chloroform (1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารละลายที่มีอยู่) ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้น โดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย 3M sodium acetate pH 5.2 ใส่ 0.1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารละลายที่อยู่ในหลอด และสาร absolute ethanol โดยใส่ 3 เท่าของสารในหลอด และทำการ vortex สารละลาย นำหลอดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เมื่อครบเวลานำหลอดไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ และทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ในน้ำ DEPC 30 µl และเก็บ total RNA ในตู้เย็น -80°C โดยทำการแบ่ง total RNA ออกเป็นส่วน ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและละลายหลาย ๆ ครั้ง

การสังเคราะห์ First stand cDNA

นำ total RNA ของต้นปาล์มที่ได้ส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ first strand cDNA จาก total RNA โดยใช้ First-stand cDNA synthesis Kit (GE Healthcare) โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับ

สังเคราะห์ first strand cDNA ดังนี้ Total RNA ความเข้มข้น 1-5 µg/µl ใส่ bulk first-strand cDNA reaction mix 5 µl ใส่ 20 mM DTT solution 1 µl ใส่ Oligo-dT primer มีความเข้มข้น 0.2 µg ต่อ µl ใส่ 1 µl และน้ำ Deionized เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายทั้งหมดเท่ากับ 15 µl ทำการผสม Total RNA และน้ำ Deionized ที่คำนวณปริมาตรแล้วในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที และแช่ลงในถังน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,957×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งที่อุณหภูมิ 3°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และเก็บตัวอย่าง cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การออกแบบไพรเมอร์

ทำการการค้นข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล (*O. niloticus*) ในเว็บไซต์ของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับการโคลน coding sequence (CDS) ของยีน delta 6 desaturase (ตารางที่ 3.1)

การโคลน cDNA ยีน Delta 6 desaturase โดยวิธีการ PCR

นำ primer ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR โดยแบ่งออกเป็น 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 ใช้ primer Nifad6F2 คู่กับ primer Nifad6R1 และใช้ primer Nifad6F2 คู่กับ primer Nifad6R2 ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ LA Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 5 U/µl LA Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan), 10x buffer LA Taq, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 10 µM primer forward, 10 µM primer reverse โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็น first strand cDNA จากตับปลานิล สำหรับการทำ PCR โดยมีสถานะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59°C 45 วินาที และ 72°C 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis และการทำขึ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์

ทำการเตรียม agarose gel ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้วเทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล เมื่อเจลแข็งตัวแล้วนำมาวางใน chamber และเท 0.5X TBE buffer ให้มีระดับสูงกว่าเจล หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ผสมกับสีติดตาม (loading dye) ในอัตราส่วน 3 : 1 จากนั้นจึงโหลดลงในหลุม (well) เมื่อโหลดตัวอย่างเสร็จแล้วจึงทำการต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) โดยตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ 100 โวลต์ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือ 1 ชั่วโมง หรือจนสีน้ำเงินของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนมาใกล้ถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง หลังจากนั้นนำ

ออกมาตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล โดยดูภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ หลังจากนั้นการทำชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลให้บริสุทธิ์โดยในขั้นตอนนี้จะใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูง เช่น 2% agarose gel เพื่อที่จะทำให้สามารถแยกขนาดของดีเอ็นเอได้ดีและชัดเจนยิ่งขึ้น และเมื่อทราบขนาดของดีเอ็นเอเป็นไปตามที่คาดการณ์แล้ว จึงทำการตัดเจลตรงบริเวณของดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับที่ต้องการ ทำการแยกดีเอ็นเอจาก agarose gel ด้วย Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.) โดยการชั่งน้ำหนักเจลที่อยู่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร Ultra TBE melt 0.5 เท่าของน้ำหนักเจล และใส่ Ultra salt 0.5 เท่าของน้ำหนักเจล นำหลอดไปตั้งที่อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเขย่า (vortex) หลอดเป็นครั้งคราว หลังจากเจลละลายหมดแล้ว หลังจากนั้นใส่ Ultra bind 6 µl เขย่าสารให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติม Ultra Wash 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาทีทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นใส่น้ำ DI 12 µl วางไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที และนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย pGEM®-T Easy vector 50 ng/ µl, 2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 3 U/µl และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) 4 ng/ µl หลังจากนั้นผสมเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงมาที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำหลอดไปตั้งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

Primer Nifad6F2	
GGACATGGGAGGTGGAAGCCAGCAGACGG	
ATGGGAGGTGGAAGCCAGCAGACGG	60
TGCCGGGAGAGCCGGACAGCGGGAAAGCTAAAGGT	120
GTTTACACCTGGGAGGAGGTGCAGAGCCACTGCAGCAGGAATGATCAATGGCTGGTCATC	180
GATCGAAAGGTTTACAACATCACTCAGTGGGCCAAAAGGCATCCAGGAGGGTTTCAAGTC	240
ATCAGCTTCTATGCTGGAGAGGATGCCACGGAGGCATTCAGTGCTTTTCATCCTGATCCT	300
AAGTTTGTGCATAAGTTTCTGAAGCCGCTGCTGATCGGAGAGTTGGCAACGACAGAGCCG	360
AGCCAGGACCGGGACAAAATGCAGCCATCGTGCAGGATTTCGAAACATTACGAGCTCAG	420
GTGGAGAAAAGGGTCTGTTTCGAGCTCAGCCTTTGTTTTTCTTCCCTCCACCTCAGTCAC	480
ATCCTGCTGCTAGAAAGCCCTCGGATGGCTGACCGTCTGGATGTGGGGCACAGGCTGGATA	540
CAAACACTTGTGTGCTCTGTGTTTCTCGCAACCGCTCAGGCACAGGCTGGATGGCTGCAG	600
CATGACTTTGGTCACCTGTCTGTCTTTAAAAAGTCCAGCTGGAATCACCTCGCCCAACAG	660
TTTGTCATTGGTCATTTAAAGGGAGCTTCTTCCAACGGTGGAATCACCGACATCTCAGG	720
CATCAGCTAAACCAACATTTTCATTAAGGACCCAGATATCAACACGTTGCACCTCTTC	780
GTACTTGGCCGAACCTCAACCAGTGGAATACGGGATAAAGAAGATCAAACACATGCCTTAC	840
AATCGTCAGCACCATTACTTCTTTCTCGTGGGACCACCGCTGATCATTCCAGTTTCTTC	900
AACATTCATGTAATGCAGACCATGGTATCCCGCGTGACTGGGTGGATCTGGCTTGGTTC	960
ATCTCATCTACCTTCGCTTCTTCTCCTGTTATTTACCCCTGTATGGCCTGGTTGGCTCA	1020
TTGGTGCTCATAAGCATAGTCAGGTTTTTGGAGAGTCACTGGTTTGTGTGGGTGACTCAG	1080
ATGAATCACATACCGATGGACATCGATCATGAAAAGCACAAGGACTGGGTGACCATGCAG	1140
TTACAATCCACCTGTAATATCGAGCAGTCCTTCTTCAACGACTGGGTGAGTGGACACCTC	1200
AACTTTCAAATCGAGCACCACCTTGTTTCCAATGATGCCGCGGCACAACCTACCACCTGGT	1260
GGCCCCGAGTCCGTGCGCTCTGCGAGAAACACGGGATTCTTACCAGGAGAAAACCTTTG	
TGGCGAGGCTTCGCTGATATTGTACGTCAGTCACTGAAAACCTCTGGGGACCTCTGGCT	1320
CGTATAGAGGTATTTACT	
GCATATCTCCATAAATGA	1338
Primer Nifad6R1	

ภาพที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Delta 6 desaturase ของปลานิล และการออกแบบไพรเมอร์

สำหรับการโคลน cDNA

หมายเหตุ : ตัวอักษรขีดเส้นใต้ = ส่วนที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์

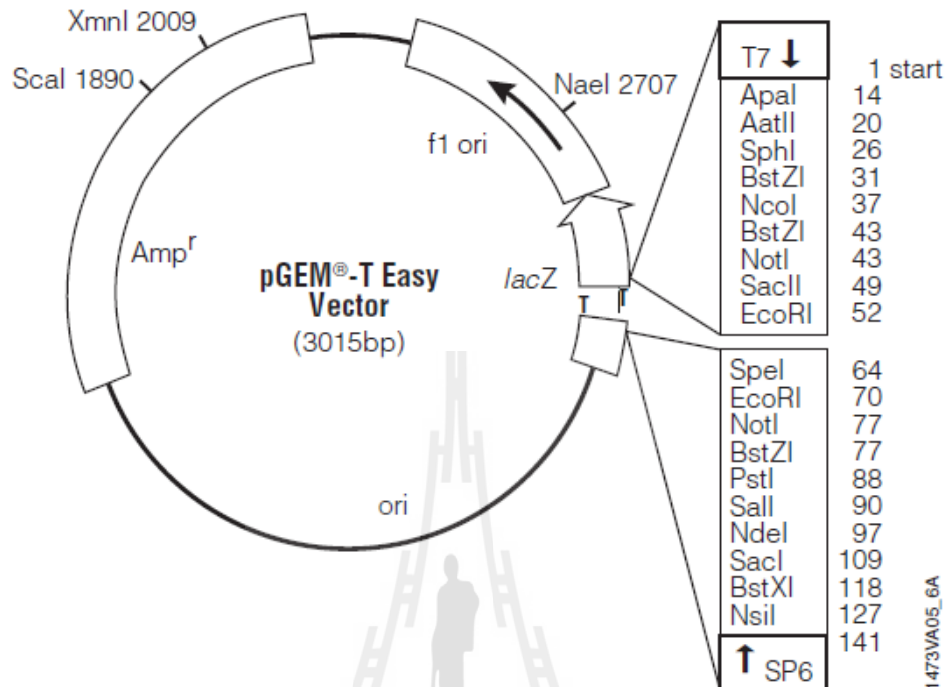
กล่องสีดำ = ไพรเมอร์ Nifad6F

กล่องสีเทา = ไพรเมอร์ Nifad6R

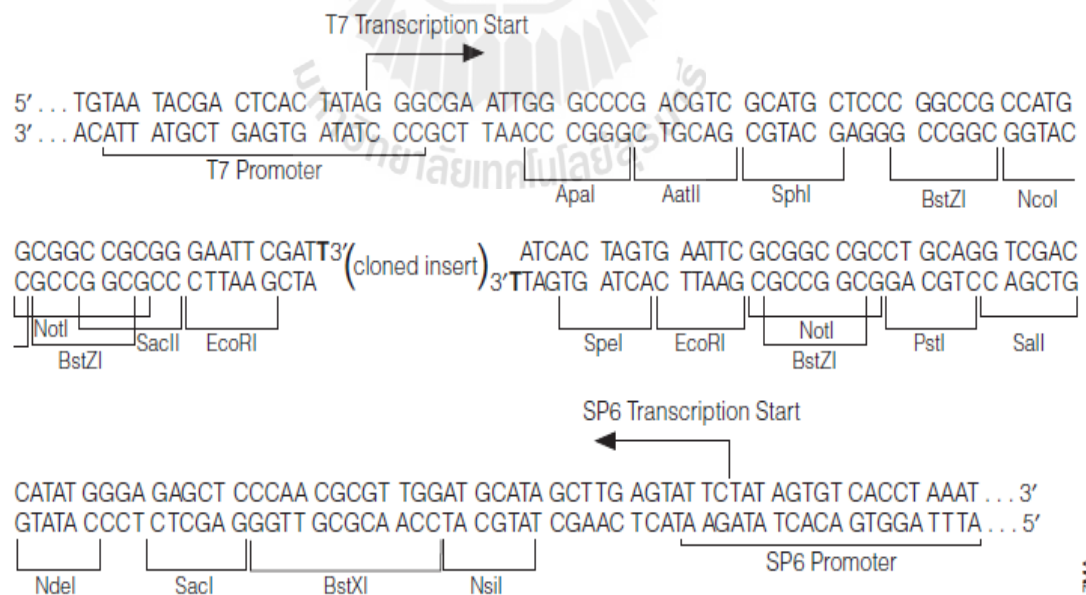
ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	Sequence	PCR	Primer order
Nifad6F1	5'-ATGGGAGGTGGAAGCCAGCAGACGG-3'	RT-PCR	Sense
Nifad6F2	5'-GGACATGGGAGGTGGAAGCCAGCAGACGG-3'	RT-PCR	Sense
Nifad6R1	5'-TCATTTATGGAGATATGCATCC-3'	RT-PCR	Antisense
Nifad6R2	5'-TTTATGGAGATATGCATCC-3'	RT-PCR	Antisense
FADd6_1	5'-TGCAGCATGACTTTGGCCACCTGTC-3'	RT-PCR	Sense
ART_R1	5'-GTTGTGVCGNGGCATKGT-3'	RT-PCR	Antisense
Sc-actin-F	5'-GACGACGCTCCTCGTGCTGTCTTC-3'	RT-PCR	Sense
Sc-actin-R	5'-GGGGCAACTCTCAATTCGTTGTAGA-3'	RT-PCR	Antisense
GAL1	5'-AATATACCTCTATACTTTAACGTC-3'	RT-PCR	Sense
V5 c-term	5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'	RT-PCR	Antisense
B6R1	5'-CCACCCAGTCATGGCGGGAGATCA-3'	RT-PCR	Sense
B6R2	5'-GAGTTCGGCCAAGTACGAAGAGGT-3'	RT-PCR	Sense
D6F1	5'-CGAGCAGTCCTTCTTCAACGACTG-3'	RT-PCR	Sense
D6R1	5'-CTCTCCGATCAGCAGCGGCTTCAGA-3'	RT-PCR	Antisense
TiFAD6_F	5'-CTATGCTGGAGAGGATGCCACGG-3'	RT-PCR	Sense
TiFAD6_R	5'-CAGCAGGATGTGACTGAGGTGGAG-3'	RT-PCR	Antisense
Actin-RT-F	5'-TGCTATGTGCGCCCTTGACTTC G-3'	RT-PCR	Sense
Actin_RT-R	5'-GAGTATTTACGCTCAGGTGGGGC-3'	RT-PCR	Antisense

A



B



ภาพที่ 3.2 แผนภาพพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T Easy (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T Easy (B) (Promega)

การสร้างคอมพีเทนท์เซลล์ (Competent cell)

นำเชื้อ *E. coli* JM109 (Promega) มา streak บน LB plate และนำไปบ่มเชื้อในตู้ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำโคโลนีเดี่ยวจาก LB plate มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำเชื้อแบคทีเรียจากหลอดทดลองมา 100 μ l ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ที่เตรียมอยู่ในขวดรูปชมพู่ 30 ml และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 5-7 ชั่วโมง ซึ่งจะเป็นเวลาที่เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตถึงระยะ log phase หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงเท่าไร้หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 ml และแช่ใน น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 704 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นใส่สาร transformation buffer (ภาคผนวก ก) 1 ส่วนต่อ 3 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการ ละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่น เหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 704 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้ง เหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย และใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 12.5 ส่วน ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาใส่สาร DMSO 168 μ l โดยทำการหยดทีละหยดและทำการเขย่าตลอดเวลาเป็น เวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็น ส่วน ๆ ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 μ l เก็บ competent cell ในตู้ -80°C

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน

นำ competent cell 100 μ l ออกจากตู้ -80°C วางในถังน้ำแข็ง และใส่ดีเอ็นเอที่มีการ เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (recombinant DNA) แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ และนำ หลอดไปตั้งในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบ แห้งที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที และเมื่อครบเวลาริบนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันทีตั้งทิ้ง ไว้ 3 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว SOC 900 μ l ลงในหลอด และนำหลอดไปวางในตู้ เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยภายในตู้มีอุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในหลอดออกมา 500 μ l spread ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT agar ที่เป็น selective media (ที่มี X-gal, IPTG และ ampicillin) เพื่อทำการแยกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่พลาสมิด มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (insert) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็น เวลา 16-18 ชั่วโมง และจากการที่ spread เชื้อลงบน plate ที่มี ampicillin, IPTG และ X-gal จะทำให้ สามารถคัดโคโลนีที่ต้องการได้ ซึ่งโคโลนีของเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ ต้องการจะเป็นโคโลนีสีฟ้า ส่วนโคโลนีสีขาว นั้นแสดงว่าเซลล์แบคทีเรียได้รับพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอ

ที่ต้องการ วันต่อมาทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดการณ์ว่าไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 1-2 โคโลนี และเลือกโคโลนีที่คาดการณ์ว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำเป็น plate ต้นฉบับไว้ (master plate)

การวิเคราะห์ Recombinant DNA ด้วยวิธีการอย่างง่าย (Cracking)

นำไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) ไปแช่เชื้อใน master plate นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่สาร CB และสาร 10 mM EDTA ในอัตรา 1 ต่อ 1 และหยดสาร LB ลงบนฝาหลอดประมาณ 1 μ l จากนั้นนำหลอดไป vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (spin down) เพื่อให้สาร LB ตกลงมาที่ก้นหลอด จากนั้นนำไป vortex และวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ภายในหลอดจะมีส่วนของตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และ recombinant DNA ที่อยู่ในส่วนของสารละลาย โดยนำสารละลายในหลอด 7 μ l มาตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis

การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis

เมื่อทราบว่าโคโลนีของแบคทีเรียใดมีชิ้นส่วนของ recombinant DNA แล้ว จึงนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อขยายจำนวนแบคทีเรีย โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว 2XYT 3 ml หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเก็บ glycerol stock และสกัดพลาสมิด การเก็บในส่วนของ glycerol stock นำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 μ l ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่ 30% glycerol 700 μ l แล้วทำการ vortex และเก็บรักษาเซลล์ในตู้ -80°C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนที่เหลือใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนลอย (supernatant) ทิ้ง จากนั้นใส่สาร solution I 200 μ l แล้วนำไป vortex ให้ตะกอนละลายจะได้สารละลายสีขุ่น ต่อมาใส่สาร solution II 200 μ l ทำการผสมเบาๆ ประมาณ 5-10 ครั้ง จะได้สารละลายสีใสและหนืด และใส่สาร solution III 200 μ l ทำการผสมเบาๆ ประมาณ 5-10 ครั้ง จะได้สารละลายสีใสและมีตะกอนขาวขุ่น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการย้ายส่วนของ supernatant ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการย้ายส่วนของ supernatant ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่อีกครั้ง หลังจากนั้นใส่ isopropanol 1 เท่าของสารละลายในหลอด และนำไป vortex วางตั้งในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของดีเอ็นเอ และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้ Isopropanol

ระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ใส่ 1 ส่วนต่อ 2 ส่วนของสารละลายและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยในระหว่างนี้ทำการผสม (mix) เบาๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ RNase (10 mg/ml) 3 μ l (ใส่ RNase 1 μ l ต่อสารละลายในหลอด 100 μ l) และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที โดยในระหว่างนี้ทำการผสม (mix) เบา ๆ ทุก 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้องแล้วใส่ phenol และสาร chloroform ในอัตรา 0.5 ส่วนต่อ 0.5 ส่วนของสารละลายที่มีอยู่ในหลอด ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,826 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้น โดยส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอจะอยู่ชั้นบนทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวล์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 3 M sodium acetate pH 4.8 ใส่ 0.1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารที่อยู่ในหลอด และสาร absolute ethanol โดยใส่ 3 เท่าของสารในหลอด ทำการ vortex สารละลาย และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือเป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลาจึงทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของดีเอ็นเอ ทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 1 ml หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,226 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำ DI 30 μ l นำดีเอ็นเอมาตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis และนำพลาสมิดดีเอ็นเอส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นของ DNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) โดยใช้เครื่องวัดความเข้มข้น (nanodrop)

การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X buffer RE[®] act, *Eco*RI enzyme 4 U/ μ l, Plasmid DNA 1.5 μ g และน้ำ DI 5 μ l เพื่อปรับปริมาตรให้สารละลายเท่ากับ 10 μ l หลังจากนั้นทำการผสมสาร (mix) ด้วยมือเบา ๆ แล้ววางหลอดในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,957 $\times$ g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis หลังจากที่ได้ทราบผลว่าพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ recombinant DNA แล้วจึงทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase กับข้อมูลที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม BlastN และ BlastX และทำ

การเปรียบเทียบความตรงกัน (alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม EBI Tools Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

3.3.2 การผลิต recombinant yeast

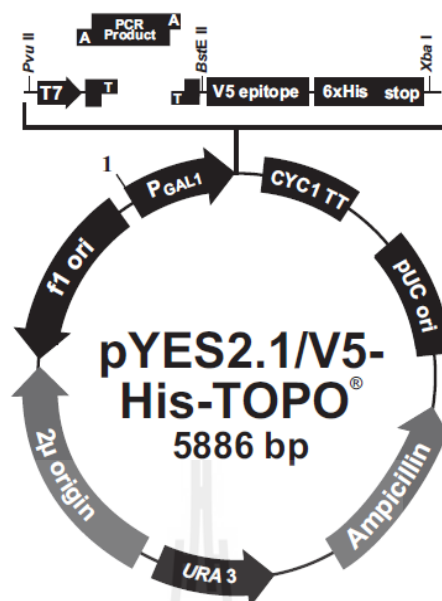
การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีน delta 6 desaturase เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO

ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีน delta 6 desaturase เข้ากับเวกเตอร์โดยใช้ pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 10 ng/μl pYES2.1/V5-His-TOPO 1 μl, Salt solution (1.2 M NaCl : 0.06 M MgCl₂) 1 μl, ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) ความเข้มข้น 1 ng/μl ใส่ปริมาตร 0.5-4 μl และ Sterile Water โดยใช้ปริมาตรของสารละลายทั้งหมดให้เท่ากับ 6 μl หลังจากนั้นผสมเบาๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงให้สารตกลงไปที่ก้นหลอด จากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง ที่อุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 30 นาที และเมื่อครบเวลาริบนนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันที เตรียมสำหรับการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน TOP10F' cells (*E. coli*)

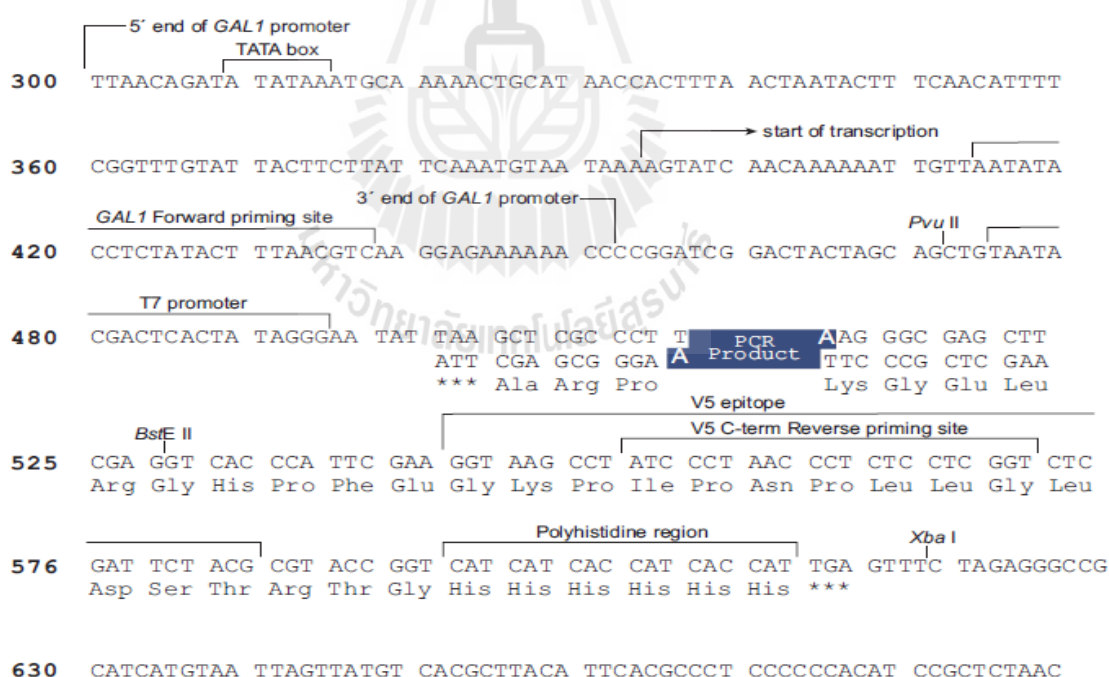
การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน TOP10F' cells (*E. coli*)

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน TOP10F' cells (*E. coli*) โดยใช้ pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit โดยนำ competent cell (TOP10 One Shot® Chemically Competent *E. coli*) ออกจากตู้ -80°C วางในถ้ำน้ำแข็ง และใส่ดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ (TOPO cloning reaction) 2 μl แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบาๆ และนำหลอดไปตั้งในถ้ำน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 1 นาที และเมื่อครบเวลาริบนนำหลอดไปวางในน้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว SOC 270 μl ลงในหลอด และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยภายในตู้มีอุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในหลอดออกมา 100 μl ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น LB (ที่มี ampicillin) แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีมาทำเป็น plate ต้นฉบับไว้ (master plate) ต่อจากนั้นทำการวิเคราะห์ Recombinant DNA ด้วยวิธีการอย่างง่าย (Cracking) การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis และวิเคราะห์ลำดับนิว คลีโอไทด์ตามขั้นตอนข้างต้น

A



B



ภาพที่ 3.3 แผนภาพพลาสมิดเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO® (A) และลำดับนิวคลีโอไทด์ และ Multi Cloning site ของพลาสมิดเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO® (B) (Invitrogen)

การสร้างคอมพีเทนท์เซลล์ยีสต์ (Competent *S. cerevisiae* cells)

เตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ยีสต์โดยใช้ *S. c.* EasyComp. Transformation Kit โดยนำเชื้อ *S. cerevisiae* มา streak บน YPD plate และนำไปบ่มเชื้อในตู้อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วันต่อมา นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เตรียมอยู่ในหลอดเลี้ยงเชื้อ และนำหลอดไปวางในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaker) อุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมา นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่า 3-5 แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ได้มาเจือจางให้เหลือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.2-0.4 และนำไปเลี้ยงต่อในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่มีอุณหภูมิ 30°C ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อยีสต์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.6-1 หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงเทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 10 ml ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 176×g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นทำการละลายตะกอนในสาร solution I (Wash solution) 10 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 176×g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ และทำการละลายตะกอนในสาร solution II (Lithium cation solution for making cells competent) 1 ml หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 50 µl เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและการละลายหลาย ๆ ครั้ง และเก็บ competent cell ในตู้ -80°C

การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

นำ Competent *S. cerevisiae* cells 50 µl ออกจากตู้ -80°C วางในถังน้ำแข็ง ใส่ดีเอ็นเอที่มีการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (recombinant DNA) 1-5 µg และใส่สาร solution III 500 µl แล้วใช้มือเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ หลังจากนั้นนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการเขย่า (mix) หลอดเบา ๆ ทุก 15 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ที่อยู่ในหลอดออกมา 150 µl ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น SC-minimal medium agar ที่ไม่มี Uracil แล้วทำการเกลี่ยเชื้อ (spread) ให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2-4 วัน ต่อมาทำการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อยีสต์มาทำเป็น plate ดันฉบับไว้ (master plate)

การวิเคราะห์ Recombinant Yeast (ยีสต์ RY) ด้วยวิธีการ Colony lysate

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) นำไปเขี่ยเชื้อยีสต์ใน master plate นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ หลังจากนั้นใส่ Zymolase buffer 50 µl และ Zymolase 1 µl (20 หน่วยต่อ µl) จากนั้นนำหลอดไป vortex และนำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,226×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที ภายในหลอดจะมีส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์และ recombinant DNA ที่อยู่ใน

ส่วนของสารละลาย โดยนำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำ DI ในอัตราส่วน 1 : 10 เท่า แล้วนำไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ GAL1 คู่กับ V5 c-term, Nifad6F1 คู่กับ Nifad6R1 และ FADd6_1 คู่กับ ART_R2 ทำการเตรียมสารละลายผสมสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย 5X GoTaq[®] Flexi Buffer, 25 mM MgCl₂, 1 mM dNTP Mix, 10 μ M primer forward, 10 μ M primer reverse, 5 U/ μ l GoTaq[®] DNA polymerase และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μ l โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ต่อจากนั้นทำการ การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามขั้นตอนข้างต้น

3.3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Delta 6 desaturase ใน ยีสต์ RY

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Delta 6 desaturase ใน ยีสต์ RY

นำยีสต์ RY มาเลี้ยงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose 2 ml ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อและนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose 60 ml ในขวดรูปชมพู่และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ได้มาเจือจางให้เหลือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4 หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงได้เทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,957 $\times$ g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นล้างตะกอนด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose 3 ml จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose เพื่อให้ น้ำตาล galactose induce ทำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase โดยทำการเลี้ยงที่ระยะเวลา 0, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลาต่างๆ จะทำการเก็บรวบรวมเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปทำ RT-PCR โดยการนำไปสกัด Total RNA และ ทำการสังเคราะห์ First stand cDNA ของยีน Delta 6 desaturase โดยใช้ Hexamers และ Specific primer (V5 c-term) ตามวิธีการข้างต้น

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ β -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Delta 6 desaturase ในยีสต์ RY ที่ทำการเลี้ยงใน

อาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose ที่ระยะต่างๆ จากนั้นทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ FADd6_1 คู่กับ ART_R2 สำหรับยีน Delta 6 desaturase และ Sc-actin-F คู่กับ Sc-actin-R สำหรับยีน β -actin ทำการเตรียมสารละลายผสมสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย 5X GoTaq[®] Flexi Buffer, 25 mM MgCl₂, 1 mM dNTP Mix, 10 μ M primer forward, 10 μ M primer reverse, 5 U/ μ l GoTaq[®] DNA polymerase, DNA template เป็น cDNA ของ recombinant yeast ที่ได้ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose ที่ระยะต่างๆ และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μ l โดยมีสถานะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

การสกัดกรดไขมันจากยีสต์ RY

ทำการชั่งยีสต์ RY 5 g ลงโถปั่น ขนาด 30 ml เติม Chloroform : Methanol (2 : 1) 30 ml ปั่นละเอียด ที่ 1,957×g 5 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน Buchner funnel ด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 จี๊ด ล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform : Methanol (2 : 1) แล้วนำส่วนที่กรองได้เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel) แล้วเติม 0.03M MgCl₂ 24 ml แล้วเติม 1% BHT 1 ml ทำการเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดวาล์วเพื่อให้แก๊สออก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่ที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อแยกชั้นแล้วจึงไขส่วน chloroform ชั้นล่างออกใส่ในขวดแก้วกันกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกใน Rotary evaporator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก แล้วใส่ Isooctane ลงไป 2 ml และ internal standard 1 ml เพื่อนำไปทำ saponification โดยการไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน และเติม 0.5 N NaOH ใน methanol 1.5 ml เขย่าให้ผสมกันนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 7 นาที มีการเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 14% BF₃-MeOH 2 ml แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วต้มที่ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 30-40°C จึงเติม Isooctane 1 ml เขย่าให้ผสมกัน และดูดส่วนของ Isooctane ไปใส่ในขวดใหม่ แล้วนำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม Hexane 1 ml แล้วนำไปจี๊ด Gas Chromatography

3.3.4 การวิเคราะห์การแสดงของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของปลานิลโดยใช้เทคนิค Reverse transcription PCR (RT- PCR)

การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ และการเก็บตัวอย่างของตัวอ่อนปลานิล

นำปลานิลที่มีความสมบูรณ์พันธุ์จากที่ฟักเลี้ยงในบ่อดิน มาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 2×2.5×0.8

ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งมีอัตราการปล่อยคือ ปลานิลเพศผู้ 1 ตัว ต่อ ปลานิลเพศเมีย 2 ตัว หลังจากการปล่อยให้ปลาผสมพันธุ์กัน หลังจากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างของไข่ปลานิลที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) และตัวอ่อนปลานิลในระยะ middle blastula (MB), late blastula (LB), gastrula (G), body segmentation (BS), pharyngula (P) และ hatching (H) จากนั้นนำไปสกัด total RNA และสังเคราะห์ first stand cDNA ตามวิธีการข้างต้น

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ β -actin เป็นอินอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ในไข่ปลานิลที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) และตัวอ่อนปลานิลในระยะ middle blastula (MB), late blastula (LB), gastrula (G), body segmentation (BS), pharyngula (P) และ hatching (H) จากนั้นทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบในขั้นต้นตามตารางที่ 3.1 มาใช้ในการทำ RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ TiFAD6 สำหรับยีน delta 6 desaturase และ Actin-RT-F คู่กับ Actin-RT-R สำหรับยีน β -actin ทำการเตรียมสารละลายผสมสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย 5X GoTaq® Flexi Buffer, 25 mM MgCl₂, 1 mM dNTP Mix, 10 μ M primer forward, 10 μ M primer reverse, 5 U/ μ l GoTaq® DNA polymerase, DNA template เป็น cDNA ตัวอ่อนระยะต่างๆ ของปลานิล และน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 μ l โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 60°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

3.4 แผนการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง

3.4.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design (CRD)) โดยมีจำนวนกลุ่มการทดลอง 5 กลุ่ม กลุ่มการทดลองมีจำนวนละ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 16 ตัว ใช้ปลานิลเพศผู้ขนาดประมาณ 30 กรัม โดยมีระดับการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY (ตารางที่ 3.2) ทำการเลี้ยงปลานิลเป็นเวลาทั้งหมด 12 สัปดาห์

ตารางที่ 3.2 การจัดกลุ่มการทดลอง

กลุ่มทดลอง	ยีสต์ NT	ยีสต์ RY	จำนวนปลา (ตัว)					
	(เซลล์/กรัม	(เซลล์/กรัม	ซ้ำที่					
	อาหาร)	อาหาร)	1	2	3	4	5	6
กลุ่มที่ 1 (T1)	0	0	16	16	16	16	16	16
กลุ่มที่ 2 (T2)	10^7	0	16	16	16	16	16	16
กลุ่มที่ 3 (T3)	10^7 (วันเว้นวัน)	0	16	16	16	16	16	16
กลุ่มที่ 4 (T4)	0	10^7	16	16	16	16	16	16
กลุ่มที่ 5 (T5)	0	10^7 (วันเว้นวัน)	16	16	16	16	16	16

3.4.2 การเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองนี้คำนวณให้มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ ตามส่วนผสมในตารางที่ 3.3 และทำการวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 3.4 จากนั้นนำอาหารที่อัดเม็ดแล้ว มาทำการผสมเชื้อยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ตามกลุ่มการทดลองต่าง ๆ และผสมให้ทั่วแล้วผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำอาหารในสูตรพื้นฐาน(ไม่ได้เสริมยีสต์) และอาหารที่ได้ผสมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY มาเคลือบด้วยน้ำมันพืชปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร โดยการฉีดพ่นบนอาหารและผสมให้ทั่ว ผึ่งลมให้แห้ง เก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4°C

ตารางที่ 3.3 ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารปลา

วัตถุดิบ	ร้อยละของอาหารทั้งหมด
ปลาป่น (%CP = 59)	30
กากถั่วเหลือง(%CP = 42)	27
รำข้าว	15
ข้าวโพด	14.5
มันสำปะหลัง	12
ฟอสฟอรัส	1
วิตามินซี	0.5

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง

	สูตรพื้นฐาน	เสริมยีสต์ NT	เสริมยีสต์ RY
Proximate Composition (%)			
Moisture	81.83±0.21	81.37±0.51	81.54±0.31
Crude protein	32.91±0.34	32.48±0.58	32.10±0.25
Ether extract	6.11±0.05	6.21±0.12	6.19±0.18
Crude fiber	3.55±0.21	3.51±0.19	3.48±0.32
Ash	9.23±0.08	9.57±0.11	9.48±0.14
Fatty acid (mg/g lipid)			
C16 : 0	1.12±0.12	1.49±0.22	1.76±0.31
C16 : 1	0.67±0.03	0.58±0.03	0.65±0.03
C18 : 0	1.29±0.13	0.93±0.13	1.66±0.15
C18 : 1	23.93±1.25	24.76±1.53	21.37±1.46
C18 : 2n6	41.4±5.87	43.67±7.17	43.3±7.23
C18 : 3n6	0.30±0.05 ^b	0.31±0.04 ^b	28.72±1.25 ^a
C18 : 3n3	18.25±0.87	18.11±0.91	18.86±0.92
C18 : 4n3	0.025±0.001 ^b	0.024±0.001 ^b	1.55±0.001 ^a
C20 : 0	0.73±0.09	0.82±0.04	0.93±0.04
C20 : 1	0.71±0.07	0.85±0.07	0.94±0.11
C20 : 2	0.42±0.04	0.52±0.04	0.63±0.04
C20 : 3N3	5.42±0.76	6.24±0.39	8.40±0.31
C20 : 3N6	8.13±0.94	8.26±0.91	8.45±0.92
C20 : 4N6	0.014±0.001 ^b	0.014±0.001 ^b	0.40±0.05 ^a
C20 : 5N3	0.08±0.005 ^b	0.09±0.005 ^b	0.12±0.005 ^a
C22 : 0	0.93±0.18	1.17±0.19	1.30±0.17
C22 : 1	0.85±0.11	1.25±0.21	1.51±0.21
C22 : 2	0.93±0.15	1.16±0.15	3.50±0.25
C22 : 6N3	0.17±0.01	0.16±0.01	0.59±0.12

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

	สูตรพื้นฐาน	เสริมยีสต์ NT	เสริมยีสต์ RY
Fatty acid (mg/g lipid)			
C24 : 0	0.73±0.11	0.67±0.11	0.68±0.11
PUFA	74.69±8.23 ^b	77.40±8.01 ^b	112.10±11.02 ^a
MUFA	26.16±2.20	32.44±4.12	24.47±3.23
SFA	4.80±1.12	5.28±1.53	6.63±2.01
n6	50.44±6.56 ^b	52.25±5.26 ^b	80.87±6.56 ^a
n3	23.83±3.25	24.62±3.45	30.60±5.14
n6/n3	2.12±0.21	2.12±0.23	2.64±0.31

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวนอน ($P < 0.05$)

3.4.3 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ทำการวัดอุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิในน้ำทุกวัน ตรวจวัดค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ และ pH ของน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จากการบันทึกผลสามารถแสดงค่าเฉลี่ยของค่าที่ทำการตรวจวัดดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

ข้อมูล	ค่าที่วัดได้
อุณหภูมิอากาศ	30.32 ± 0.75°C
อุณหภูมิในน้ำ	28.08 ± 0.55°C
ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ	5.22 ± 0.47 mg/L
ค่า pH	8.43 ± 0.58

3.4.4 การเก็บข้อมูลวัดอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอด

ก่อนการทดลองจะทำการชั่งน้ำหนักและวัดยาวของปลา เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักและความยาวของปลาเริ่มต้นการทดลอง ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 12 สัปดาห์ ทำการชั่งอาหารปลาที่ใช้ไปในทุกวัน เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักอาหารที่ใช้ไป และบันทึกการตายของปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอด โดยมีค่าที่ใช้วัดอัตราการเจริญเติบโตในการทดลองดังนี้

$$\text{Daily weight gain, DWG (g/day)} = \frac{(\text{น้ำหนักสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง}}$$

$$\text{Daily length gain, DLG (cm/day)} = \frac{(\text{ความยาวสุดท้าย} - \text{ความยาวเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง}}$$

$$\text{Specific growth rate, SGR (\%/day)} = \frac{[(\text{Lnน้ำหนักสุดท้าย} - \text{Lnน้ำหนักเริ่มต้น})] \times 100}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง}}$$

$$\text{Feed conversion ratio, FCR} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

3.4.5 การเก็บตัวอย่าง

ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลา จากเส้นเลือด caudal vein ด้วย เข็มขนาด 21G ความยาว 1 นิ้ว ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 3 ml ใส่เลือดลงในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) วางบนน้ำแข็งก่อนจะนำไปวิเคราะห์ค่าเคมีในเลือด เก็บตัวอย่างเนื้อปลาโดยใช้มีดผ่าตัดแล้วเอาเฉพาะเนื้อปลา แล้วนำไปบดให้ละเอียด เก็บในตู้ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา เก็บปลาทั้งตัว นำไปบดละเอียด เก็บในตู้ -20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของปลา และเก็บลำไส้ปลา เพื่อนำไปศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา

3.4.6 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

การวัดค่ากลูโคส

ใช้ชุดทดสอบ Accutrend Glucose (Roche) ซึ่งเป็นแถบทดสอบสำหรับการตรวจหาปริมาณกลูโคส

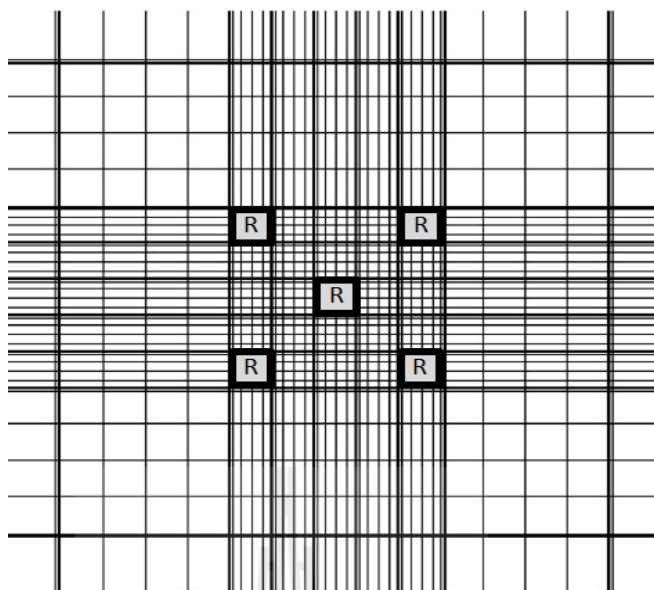
การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง

นำเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวมาเจือจางด้วยสารละลาย Gower's solution ในอัตราส่วน 1 : 200 เขย่าให้เข้ากัน 2-3 นาที จากนั้นหยดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (hemocytometer chamber) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับในช่องพื้นที่ใหญ่ตรงกลาง ซึ่งมีพื้นที่เล็ก 25 ช่อง นับเพียง 5 ช่อง ตรงมุมบน ล่าง ซ้าย ขวา และตรงกลาง ดังตัวอักษร R ในภาพที่ 3.4

การคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดง

จำนวนเม็ดเลือดแดงต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

$$= \text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ทั้งหมดใน 5 ช่อง} \times 10 \times 5 \times 200$$

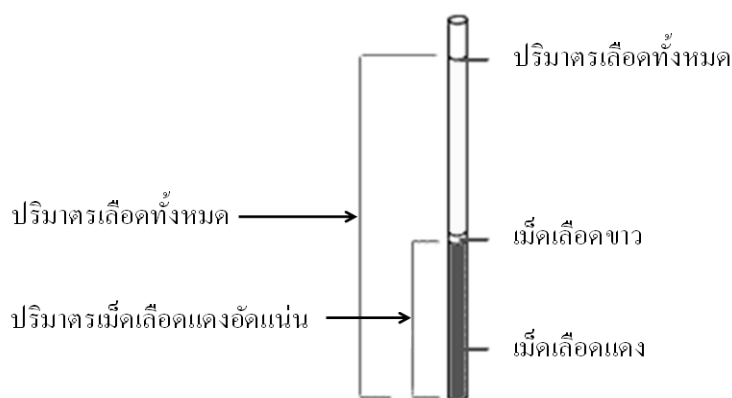


ภาพที่ 3.4 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดง

การวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

บรรจุเลือดปลาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวใน microhematocrit capillary tube ประมาณ 4 ใน 5 ของความยาว tube แล้วปิดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คำนวณเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต โดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด (ภาพที่ 3.5)

$$\% \text{ ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เซนติเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (เซนติเมตร)}}$$



ภาพที่ 3.5 ปริมาตรเลือดทั้งหมด และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นใน microhematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว

การวัดค่าฮีโมโกลบิน

ใช้ชุด Hemoglobin set (Cyanmethemoglobin Method) เติมน้ำยา Drabkin Reagent ลงในหลอดแก้ว 5 ml ใส่เลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ลงในหลอด 20 μ l เขย่าให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ Drabkin Reagent เป็น Blank ปรับ 0 จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณหาฮีโมโกลบินจากกราฟมาตรฐานซึ่งอยู่ในชุด Hemoglobin set

3.4.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา

ทำการชั่งเนื้อปลาที่ทำการบดละเอียดแล้ว 10 g ลงโถปั่น ขนาด 1000 ml เติม Chloroform : Methanol (2 : 1) 60 ml ปั่นละเอียด ที่ 1,957×g 5 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน Buchner funnel ด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform : Methanol (2 : 1) แล้วนำส่วนที่กรองได้เทลงในกรวยแยก (Separatory funnel) แล้วเติม 0.03M $MgCl_2$ 24 ml แล้วเติม 1% BHT 1 ml ทำการเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดวาล์วเพื่อให้แก๊สออก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อแยกชั้นแล้วจึงไขส่วน chloroform ชั้นล่างออกใส่ในขวดแก้วกันกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกใน Rotary evaporator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก แล้วใส่ Isooctane ลงไป 2 ml และ internal standard (C17 : 0) 1 ml เพื่อนำไปทำ saponification โดยการไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน และเติม 0.5 N NaOH ใน methanol 1.5 ml เขย่าให้ผสมกันนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 7 นาที มีการเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 14% BF_3-MeOH 2 ml แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วต้มที่ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 30-40°C จึงเติม Isooctane 1 ml เขย่าให้ผสมกัน และดูดส่วนของ Isooctane ไปใส่ในขวดใหม่ แล้วนำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม Hexane 1 ml แล้วนำไปฉีด Gas Chromatography (GC) โดยใช้เครื่อง GC รุ่น GC2014 (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ RESTEK Rtx®-Wax (Restek, Bellefonte, PA, USA) ขนาด 30 m×0.25 mm ID×0.25 μ m โดยใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็น carrier gas ที่ความเร็ว 20 เซนติเมตรต่อวินาที อัตราส่วนการปล่อยสาร 25 : 1 อุณหภูมิ injector เท่ากับ 230°C อุณหภูมิ detector เท่ากับ 250°C และมีสภาวะการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์โดยเริ่มต้นที่ 140°C เพิ่มอุณหภูมิเป็น 220°C ด้วยอัตรา 4 °C ต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ปริมาณสารที่ฉีด 1 μ l คัดแปลงวิธีจาก Morrison and Smith (1964) ใช้ 37 component FAME standard (Supelco, Sigma, USA) เป็น standard ทำการวิเคราะห์ fatty acid โดยการเปรียบเทียบกับ standard

3.4.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของปลา

นำตัวอย่างปลาทั้งตัวมาบดละเอียด แล้วทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโภชนา

ได้แก่ ความชื้น (Moisture) โปรตีนหยาบ (Crude Protein) ไขมัน (Crude lipid) เยื่อใย (Crude fiber) และเถ้าทั้งหมด (Total Ash) โดยใช้วิธีการของ AOAC (1995)

3.4.9 การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา

ทำการเปิดช่องท้องปลาและเก็บลำไส้ปลา จากนั้นบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งลำไส้ที่บดละเอียดแล้ว 0.5 g ใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml ทำการเจือจางด้วยสารละลาย 0.85% NaCl 4.5 ml เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม 2 ระดับ แล้วนำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อคัดเลือกเฉพาะ (Selective media) ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Regosa and Sharp (MRS) agar สำหรับแบคทีเรียที่ใช้กรดแลกติก โดยการทำให้ serial dilution ที่ 10^1 และ 10^2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count agar สำหรับตรวจวัดปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดของตัวอย่างทำให้ serial dilution ที่ 10^4 และ 10^5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud agar สำหรับเชื้อยีสต์และราทำให้ serial dilution ที่ 10^1 และ 10^2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar สำหรับเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. ทำให้ serial dilution ที่ 10^2 และ 10^3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium agar สำหรับเชื้อกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. ทำให้ serial dilution ที่ 10^4 และ 10^5 อาหารเลี้ยงเชื้อ SC minimal medium + Uracil และ อาหารเลี้ยงเชื้อ SC minimal medium - Uracil สำหรับเชื้อยีสต์และรีคอมบิแนนท์ยีสต์ทำให้ serial dilution ที่ 10^3 และ 10^4 จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ใส่ในถุงพลาสติกและใส่ Anaerobic bag system (Merck) และนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4.10 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ มาทำการวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 ซึ่งวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ one way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's multiple range test และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

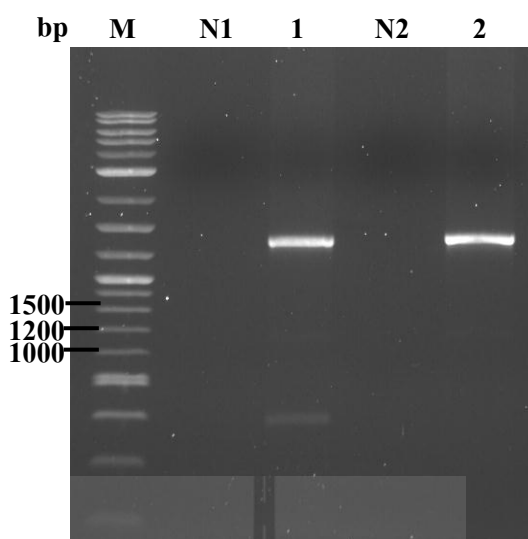
บทที่ 4

ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

4.1 การทดลองที่ 1 ผลิตภัณฑ์ *S. cerevisiae* ให้มีการผลิตเอนไซม์ Delta 6 desaturase ของปลานิล (*O. niloticus*)

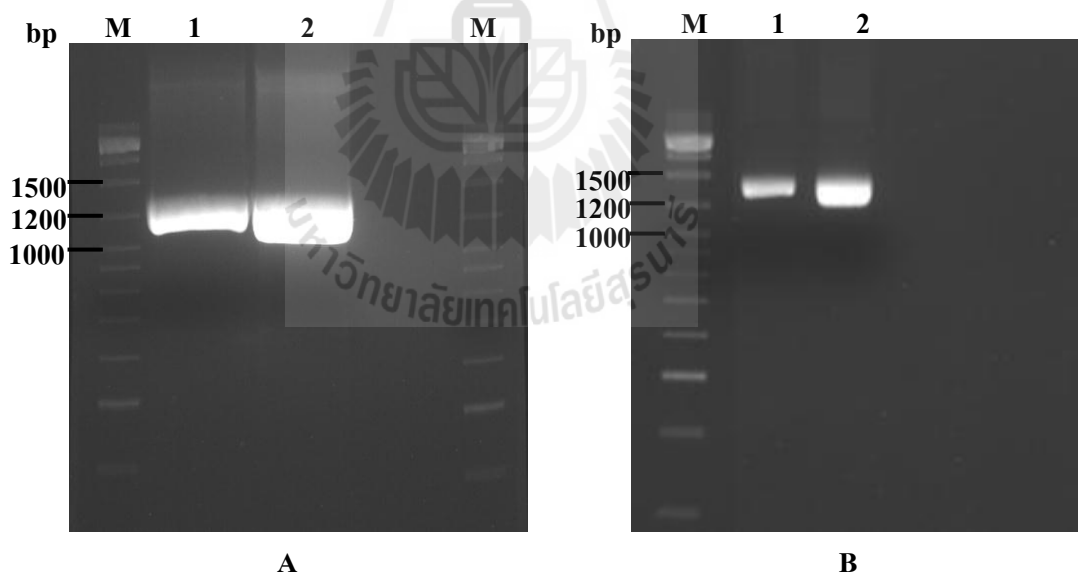
4.1.1 การโคลน delta 6 desaturase cDNA จากปลานิล (*O. niloticus*)

การโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase พบว่าได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,338 bp (ภาพที่ 4.1) หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล (ภาพที่ 4.2B) และมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy และเคลื่อนย้ายเข้าสู่ competent cell (*E. coli*) และทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าโคโลนีที่พลาสมิดไม่มี recombinant DNA (ภาพที่ 4.3) หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนของ *E. coli* แล้วนำไปสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 4.4) หลังจากตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าพลาสมิดที่มี recombinant DNA จะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดประมาณ 3,015 bp คือ ส่วนของเวกเตอร์ pGEM-T Easy และขนาดประมาณ 1,338 bp คือส่วนของดีเอ็นเอที่คาดการณ์ว่าน่าจะเป็นยีน delta 6 desaturase (ภาพที่ 4.5) จากนั้นส่งตัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการสรุปลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 4.6) สามารถสรุปได้ว่าจากการโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase มีส่วนของ Coding sequence (CDS) เท่ากับ 1,338 bp ซึ่งเมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะมีจำนวนเท่ากับ 445 ซึ่งยีน delta 6 desaturase ที่ได้จากปลานิลมีความคล้ายคลึงในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับปลาชนิดต่าง ๆ อยู่ในช่วง 70-99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.1) cDNA ที่โคลนได้ในครั้งนี้จะเป็น cDNA ของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล โดยมีโครงสร้างประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของ Cytochrome b5 domain ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transfer) เพื่อผลิตพลังงานในการกระบวนการ desaturation และ ส่วนของ Fatty acid desaturase domain ทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ในขบวนการการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว



ภาพที่ 4.1 การโคลน cDNA ของยีน delta 6 desaturase ด้วยวิธี PCR

หมายเหตุ : M = DNA ladder, N1= negative control, หมายเลข 1 = cDNA ที่ได้จากตับปลานิล โดยใช้ primer NiFad6_F2 คู่กับ primer NiFad6_R1(D6), N2 = negative control, หมายเลข 2 = cDNA ที่ได้จากตับปลานิล โดยใช้ primer NiFad6_F2 คู่กับ primer NiFad6_R2 (D6-S)

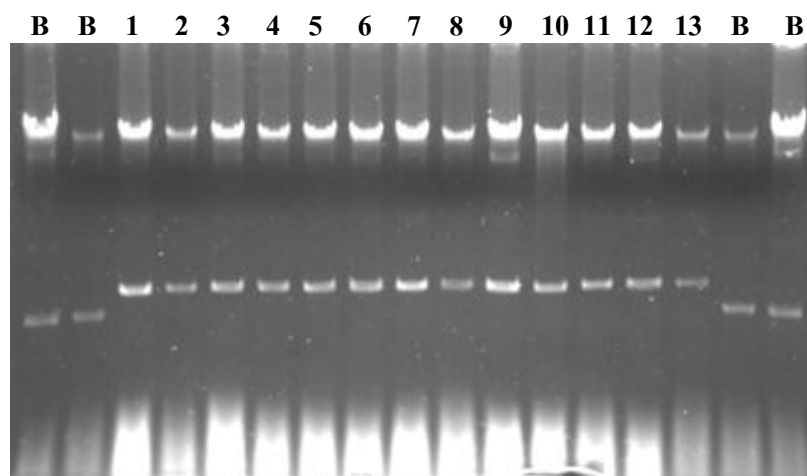


ภาพที่ 4.2 ผลการแยกและการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase

ภาพ A ผลการแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสเจลเพื่อทำการตัดเจล

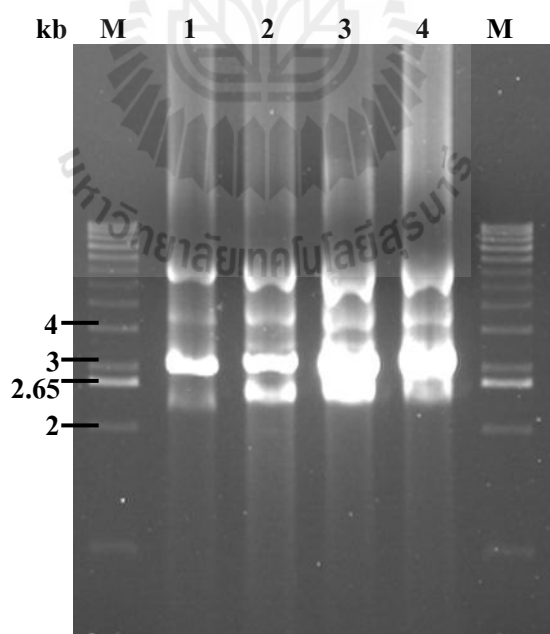
ภาพ B ผลการทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์

หมายเหตุ : M= DNA marker, หมายเลข 1 = cDNA ที่ได้จากตับปลานิล โดยใช้ primer NiFad6_F2 คู่กับ primer NiFad6_R1(D6), หมายเลข 2 = cDNA ที่ได้จากตับปลานิล ซึ่งมีการใช้ primer NiFad6_F2 คู่กับ primer NiFad6_R2(D6-S)



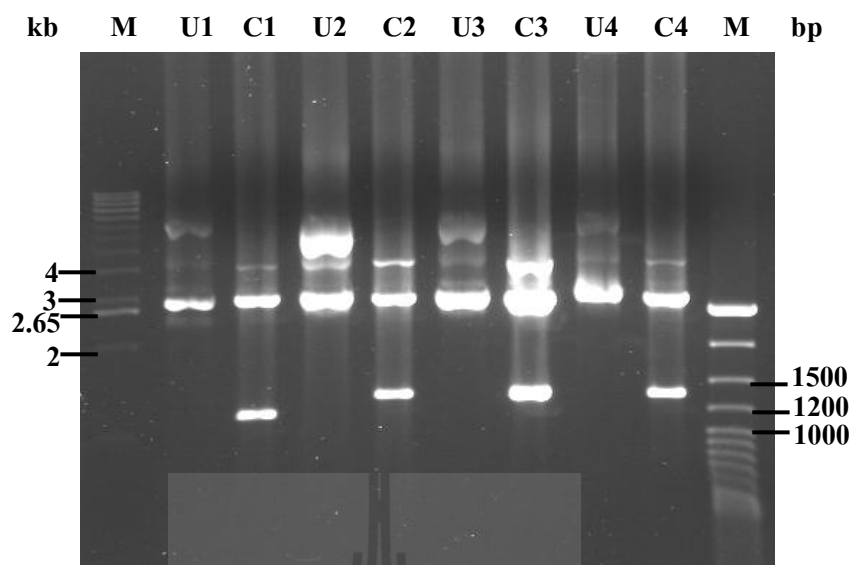
ภาพที่ 4.3 การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิด recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)

หมายเหตุ : B คือ โคลนที่ไม่มีชิ้นส่วนของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล, หมายเลข 1 ถึง 7 คือ โคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล (D6), หมายเลข 8 ถึง 13 คือ โคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล (D6-S)



ภาพที่ 4.4 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 และ 2 คือ recombinant plasmid DNA (pGD6), หมายเลข 3 และ 4 คือ recombinant plasmid DNA (pGD6-S)



ภาพที่ 4.5 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของพลาสมิดที่มี cDNA ของยีน delta 6 desaturase โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

หมายเหตุ : M = DNA marker, U1 และ U2 คือ Uncut recombinant plasmid DNA (pGD6), U3 และ U4 คือ Uncut recombinant plasmid DNA (pGD6-S), C1 และ C2 คือ Cut recombinant plasmid DNA (pGD6), C3 และ C4 คือ Cut recombinant plasmid DNA (pGD6-S)

	ATGGGAGGTGGAAGCCAGCAGACGGTGCCGGGAGAACC GGACAGCGGGAAAAGCTAAAGGT	60
1	M G G G S Q Q T V P G E P D S G K A K G	
	GTTTACACCTGGGAGGAGGTGCAGAGCCACTGCAGCAGGAATGATCAATGGCTGGTCATC	120
21	V Y T W E E V Q S H C S R N D Q W L V I	
	GATCGAAAGGTTTACAACATCACTCAGTGGGCCAAAAGGCATCCAGGAGGGTTTCAAGTC	180
41	D R K V Y N I T Q W A K R H P G G F Q V	
	ATCAGCTACTATGCTGGAGAGGATGCCACGGAGGCATTCACTGCTTTTCATCCTGATCCT	240
61	I S Y Y A G E D A T E A F T A F H P D P	
	AAATTTGTGCAAAAAGTTTCTGAAGCCGCTGCTGATCGGAGAGTTGGCAACGACAGAGCCG	300
81	K F V Q K F L K P L L I G E L A T T E P	
	AGCCAGGACCGGGACAAAAATGCAGCCATCGTGCAGGATTTGAAACATTACGAGCTCAG	360
101	S Q D R D K N A A I V Q D F E T L R A Q	
	GTGGAGAAAAGGGTCTGTTTCGAGCTCAGCCTTTGTTTTTCTTCTCCACCTCAGTCAC	420
121	V E K R G L F R A Q P L F F F L H L S H	
	ATCCTGCTGCTAGAAGCCCTCGGATGGCTGACCCTGCTGGATGTGGGGCACAGGCTGGATA	480
141	I L L L E A L G W L T V W M W G T G W I	
	CAAACACTTGTGTGCTCTGTGTTTCTCGCAACC GCTCAGGCACAGGCTGGATGGCTGCAG	540
161	Q T L V C S V F L A T A Q A Q A G W L Q	
	CATGACTTTGGTCACCTGTCTGTCTTTAAAAAGTCCAGCTGGAATCACCTCGCCACAAG	600
181	H D F G H L S V F K K S S W N H L A H K	
	TTTGTGCTTGGTCATTTAAAGGGAGCTTCTTCCAACTGGTGGAAATCACCGACATTTTCAGG	660
201	F V I G H L K G A S S N W W N H R H F R	
	CATCAGCTAAAACCAACATTTTCATTAAGGACCCAGATATCAACACGTTGCACCTCTTC	720
221	H H A K P N I F I K D P D I N T L H L F	
	GTACTTGGCCAACTCAACCAGTGAATACGGGATAAAGAAGATCAAACACATGCCTTAC	780
241	V L G Q T Q P V E Y G I K K I K H M P Y	
	AATCGTCAGCACCATTACTTCTTCTCGTGGGACCACCGCTGATCATTCCAGTTTTCTTC	840
261	N R Q H H Y F F L V G P P L I I P V F F	
	AACATTTCATGTAATGCAGACCATGGTATCCCGGCGTGACTGGGTGGATCTGGCTTGGTTC	900
281	N I H V M Q T M V S R R D W V D L A W F	
	ATCTCATCTACCTTCGCTTCTTCTCCTGTTATTTACCCCTGTATGGCCTGGTTGGCTCA	960
301	I S F Y L R F F S C Y L P L Y G L V G S	
	TTGGTGCTCATAAGCATAGTCAGGTTTGGAGAGTCACTGGTTTGTGTGGGTGACTCAG	1020
321	L V L I S I V R F L E S H W F V W V T Q	
	ATGAATCACATACCGATGGACATCGATCATGAAAAGCACAGGGACTGGGTGACCATGCAG	1080
341	M N H I P M D I D H E K H R D W V T M Q	
	TTACAATCCACCTGTAATATCGAGCAGTCCCTTCTTCAACGACTGGTTCAGTGGACACCTC	1140
361	L Q S T C N I E Q S F F N D W F S G H L	
	AACTTTCAAATCGAGCACCATTGTTTCCAATGATGCCGCGGCACAACCTACCACCTGGTG	1200
381	N F Q I E H H L F P M M P R H N Y H L V	
	GCCCCGCAGGTCCGTGCGCTCTGCGAGAAACACGGGATTCCTTACCAGGAGAAAACCTTTG	1280
401	A P Q V R A L C E K H G I P Y Q E K T L	
	TGGCGAGGCTTCGCTGATATTGTCACGTCACTGAAAACCTCTGGGGACCTCTGGCTGGAT	1340
421	W R G F A D I V T S L K T S G D L W L D	
	GCATATCTCCATAAATGA	1338
441	A Y L H K *	

ภาพที่ 4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนยีน delta 6 desaturase ของปลานิล

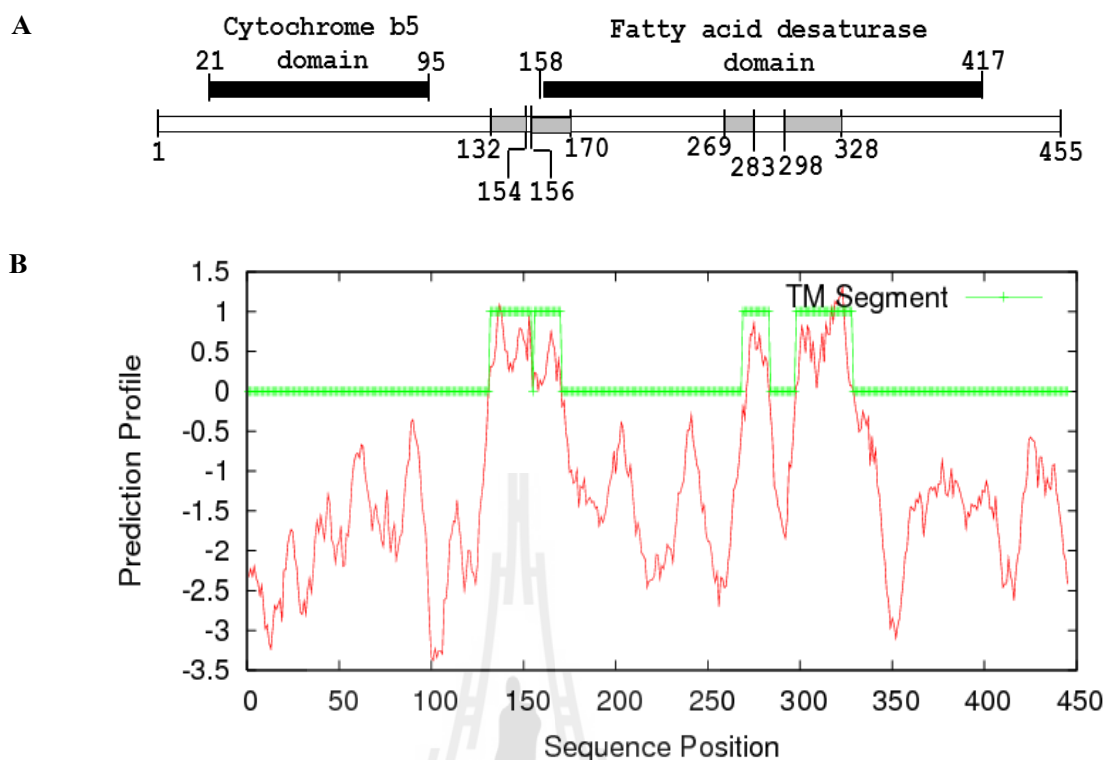
หมายเหตุ : ตัวอักษรขีดเส้นใต้ = Cytochrome b5

ตัวอักษรขีดเส้นประ = Fatty acid desaturase domain

กล่องสีเทา = Transmembrane domain

กล่องสีขาว = Histidine rich area

กล่องสีดำ = Cytochrome b5-like haem-binding motif



ภาพที่ 4.7 ผลการทำนายตำแหน่งโครงสร้างของยีน delta 6 desaturase ของปลานิลจากลำดับของกรดอะมิโน

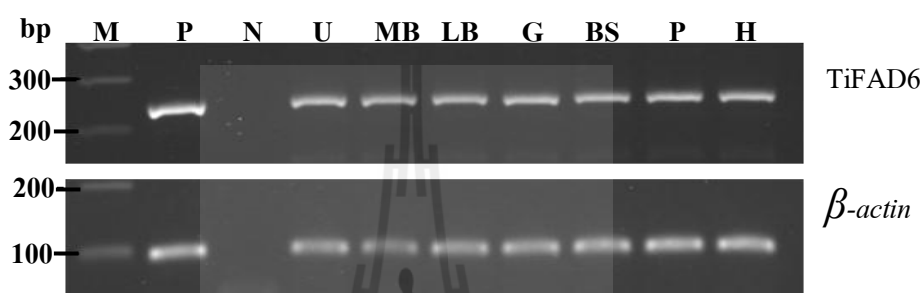
ภาพ A ส่วนของ Cytochrome b5 และ fatty acid desaturase domains ทำนายโดยใช้โปรแกรม IntroProScan software (<http://www.ebi.ac.uk>)

ภาพ B ส่วนของ Transmembrane ทำนายโดยใช้โปรแกรม SVMtm Transmembrane Domain Predictor (<http://ccb.imb.uq.edu.au/svmtm/>)

4.1.2 การศึกษาการแสดงออกของ mRNA delta 6 desaturase ในระหว่างการพัฒนาการที่ระยะต่าง ๆ ของปลานิล โดยใช้เทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR)

การศึกษาการแสดงของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ในตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของปลานิล พบว่า mRNA ของยีน delta 6 desaturase มีการแสดงออกในไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิและในทุกระยะของการพัฒนาการของตัวอ่อนในปลานิล ได้แก่ ระยะmiddle blastula (MB) late blastula (LB) gastrula (G) body segmentation (BS) pharyngula (P) และ hatching (H) (ภาพที่ 4.8) โดยอ้างอิงระยะการพัฒนาการดังกล่าวข้างต้นกับรายงานการศึกษาของ Fujimura และ Okada (2007) จากผลการศึกษาพบว่า ยีน delta 6 desaturase ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว มีการแสดงออกในทุกระยะของการพัฒนาการตัวอ่อนของปลานิลนั้น น่าจะอธิบายได้ว่าในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวเกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อน และผลการศึกษาที่พบการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ในไข่ที่ยังไม่ได้รับการ

ผสม น่าจะอธิบายได้ว่า delta 6 desaturase mRNA นี้จัดเป็น maternal RNA ซึ่งสร้างโดยแม่ปลาในระหว่างกระบวนการพัฒนาการของไข่ปลา สร้างและเก็บสะสมไว้ในไข่ปลาเพื่อให้ลูกปลาไปใช้ ในระหว่างการพัฒนาการ จนถึงระยะ mid blastula ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวนี้อีกปลาจะยังไม่มีกระบวนการแสดงออกของยีน ซึ่งจากผลการศึกษาทั้งหมดนี้นำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า กระบวนการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาวนั้น เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในปลานิลตั้งแต่ระยะการพัฒนาการของตัวอ่อน

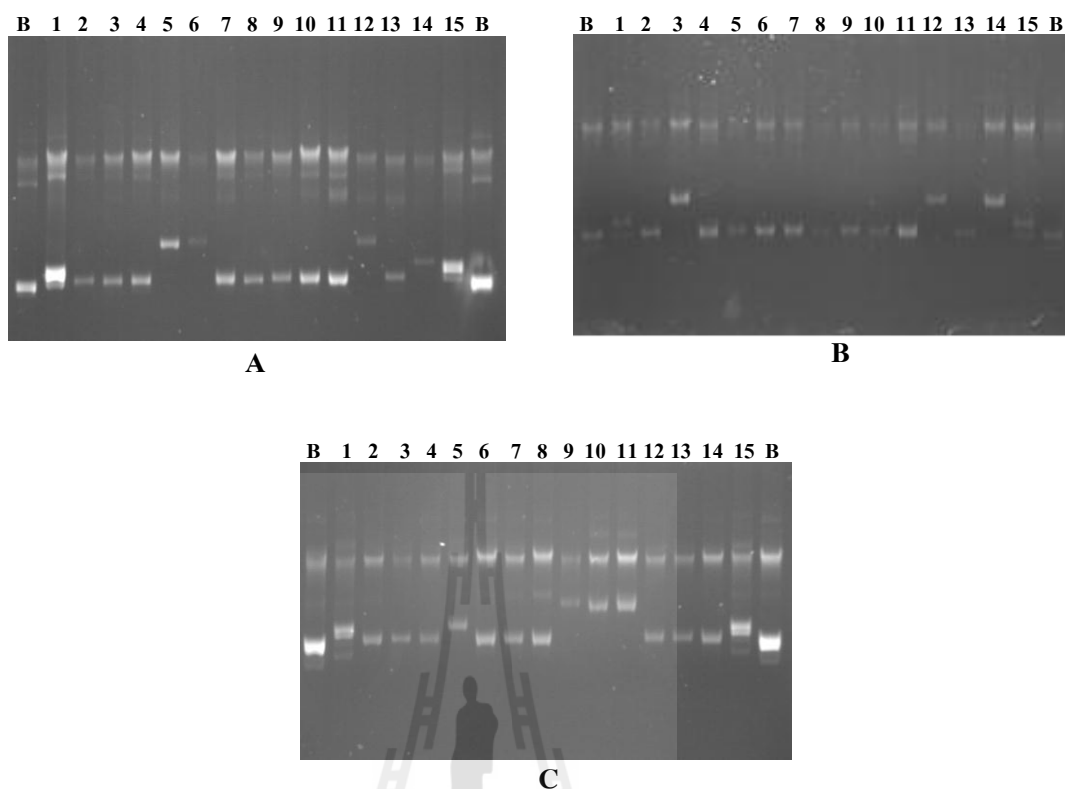


ภาพที่ 4.8 การแสดงออกของ mRNA ของยีน delta 6 desaturase ในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนที่ระยะต่าง ๆ ของปลานิลโดยใช้เทคนิค RT-PCR

หมายเหตุ : M = DNA Marker, N = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control ซึ่งใช้ recombinant plasmid DNA (pYD6) และ β -actin ของปลานิล U = ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg), MB = middle blastula, LB = late blastula, G = gastrula, BS = body segmentation, P = pharyngula และ H = hatching

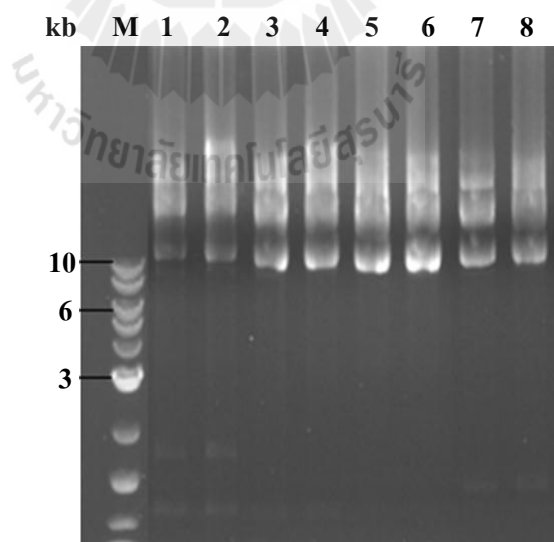
4.1.3 การผลิต recombinant yeast

นำยีน delta 6 desaturase ของปลานิลเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO และย้ายเข้าสู่ TOP10F' cells (*E. coli*) คัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking) พบว่าโคโลนีที่พลาสมิดมี recombinant DNA จะมีชิ้นส่วนของพลาสมิดดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าโคโลนีที่พลาสมิดไม่มี recombinant DNA (ภาพที่ 4.9) จากนั้นจึงนำไปสกัดพลาสมิดและนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 4.10) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ recombinant plasmid DNA โดยการทำให้ PCR (ภาพที่ 4.11 และ 4.12) และส่งพลาสมิดดีเอ็นเอวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สรุปลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับนิกรดอะมิโน (ภาพที่ 4.13) จากนั้นนำ recombinant plasmid DNA ที่ทำการตรวจสอบ sequence แล้วเข้าสู่ *S. cerevisiae* (ยีสต์ RY) ทำการตรวจสอบอย่างง่ายด้วยวิธีการ Colony lysate แล้วทำ PCR (ดังภาพที่ 4.14 และ 4.15)



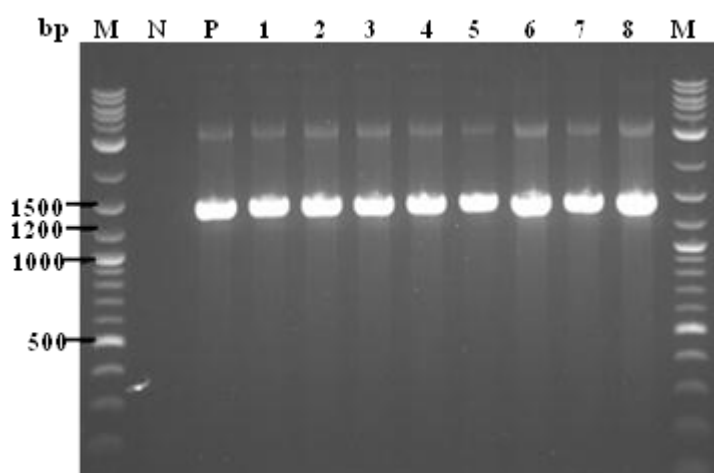
ภาพที่ 4.9 การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิด recombinant DNA ด้วยวิธีอย่างง่าย (cracking)

ภาพ A, B และ C คือ การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิด recombinant DNA



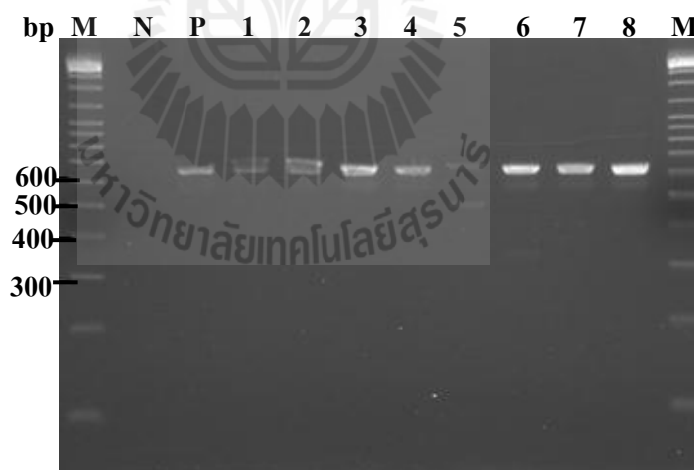
ภาพที่ 4.10 พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase เมื่อนำมาเชื่อมต่อกับ
เวกเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO

หมายเหตุ : M = DNA marker, หมายเลข 1 ถึง 4 คือ recombinant plasmid DNA (pYD6),
หมายเลข 5 ถึง 8 คือ recombinant plasmid DNA (pYD6-S)



ภาพที่ 4.11 การตรวจสอบ recombinant plasmid DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GAL1 คู่กับ V5 c-term จะได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,497 bp

หมายเหตุ : M = DNA marker, N = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control คือ PCR reaction ใช้ pGD6, หมายเลข 1 ถึง 4 = recombinant plasmid DNA (pYD6), หมายเลข 5 ถึง 8 = recombinant plasmid DNA (pYD6-S)



ภาพที่ 4.12 การตรวจสอบ recombinant plasmid DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FADd6_1 คู่กับ ART_R2 จะได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 635 bp

หมายเหตุ : M = DNA marker, N = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control คือ PCR reaction ใช้ pGD6, หมายเลข 1 ถึง 4 = recombinant plasmid DNA (pYD6), หมายเลข 5 ถึง 8 = recombinant plasmid DNA (pYD6-S)


```

      10      20      30      40      50      60
ATGGGAGGTGGAAGCCAGCAGACGGTGCCGGGAGAACCGGACAGCGGGAAAGCTAAAGGT
M G G G S Q Q T V P G E P D S G K A K G
      70      80      90     100     110     120
GTTTACACCTGGGAGGAGGTGCAGAGCCACTGCAGCAGGAATGATCAATGGCTGGTCATC
V Y T W E E V Q S H C S R N D Q W L V I
      130     140     150     160     170     180
GATCGAAAGGTTTACAACATCACTCAGTGGGCCAAAAGGCATCCAGGAGGGTTTCAAGTC
D R K V Y N I T Q W A K R H P G G F Q V
      190     200     210     220     230     240
ATCAGCTACTATGCTGGAGAGGATGCCACGGAGGCATTCAGTCTTTTCATCCTGATCCT
I S Y Y A G E D A T E A F T A F H P D P
      250     260     270     280     290     300
AAATTTGTGCAAAAGTTTCTGAAGCCGCTGCTGATCGGAGAGTTGGCAACGACAGAGCCG
K F V Q K F L K P L L I G E L A T T E P
      310     320     330     340     350     360
AGCCAGGACCGGGACAAAAATGCAGCCATCGTGCAGGATTTTCGAAACATTACGAGCTCAG
S Q D R D K N A A I V Q D F E T L R A Q
      370     380     390     400     410     420
GTGGAGAAAAGGGTCTGTTTCGAGCTCAGCCTTTGTTTTTCTTCCTCCACCTCAGTCAC
V E K R G L F R A Q P L F F F L H L S H
      430     440     450     460     470     480
ATCCTGCTGCTAGAAGCCCTCGGATGGCTGACCGTCTGGATGTGGGGCACAGGCTGGATA
I L L L E A L G W L T V W M W G T G W I
      490     500     510     520     530     540
CAAACACTTGTGTGCTCTGTGTTTCTCGCAACCGCTCAGGCACAGGCTGGATGGCTGCAG
Q T L V C S V F L A T A Q A Q A G W L Q
      550     560     570     580     590     600
CATGACTTTGGTCACCTGTCTGTCTTTAAAAAGTCCAGCTGGAATCACCTCGCCACAAG
H D F G H L S V F K K S S W N H L A H K
      610     620     630     640     650     660
TTTGTCAATTGGTCATTTAAAGGGAGCTTCTTCCAACCTGGTGAATCACCGACATTTAGG
F V I G H L K G A S S N W W N H R H F R
      670     680     690     700     710     720
CATCACGCTAAACCCAACATTTTCATTAAGGACCCAGATATCAACACGTTGCACCTCTTC
H H A K P N I F I K D P D I N T L H L F
      730     740     750     760     770     780
GTACTTGGCCAAACTCAACCAGTGAATACGGGATAAAGAAGATCAAACACATGCCTTAC
V L G Q T Q P V E Y G I K K I K H M P Y
      790     800     810     820     830     840
AATCGTCAGCACCATTAATTCTTTCTCGTGGGACCACCGCTGATCATTCCAGTTTTCTTC
N R Q H H Y F F L V G P P L I I P V F F
      850     860     870     880     890     900
AACATTTCATGTAATGCAGACCATGGTATCCCGGCGTGACTGGGTGGATCTGGCTTGGTTC
N I H V M Q T M V S R R D W V D L A W F
      910     920     930     940     950     960
ATCTCATTCTACCTTCGCTTCTTCTCCTGTTATTTACCCCTGTATGGCCTGGTTGGCTCA
I S F Y L R F F S C Y L P L Y G L V G S
      970     980     990    1000    1010    1020
TTGGTGCTCATAAGCATAGTCAGGTTTTTGGAGAGTCACTGGTTTGTGTGGGTGACTCAG
L V L I S I V R F L E S H W F V W V T Q

```

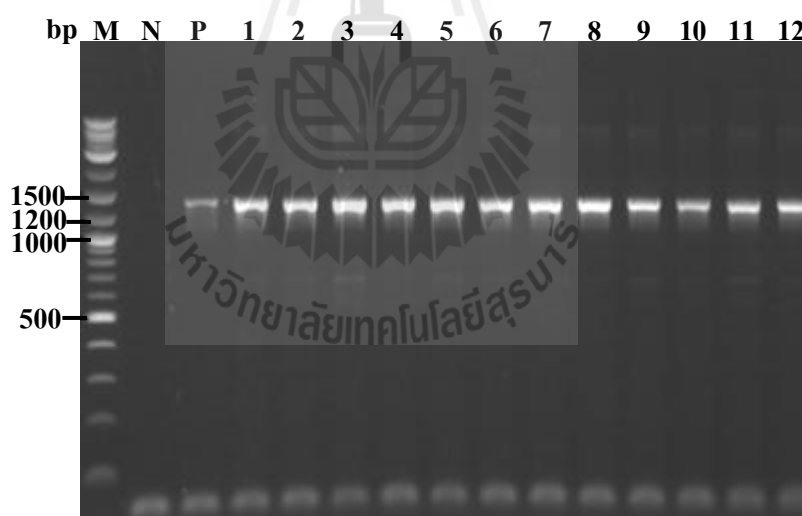
ภาพที่ 4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล

```

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
ATGAATCACATACCGATGGACATCGATCATGAAAAGCACAGGGACTGGGTGACCATGCAG
M N H I P M D I D H E K H R D W V T M Q
      1090      1100      1110      1120      1130      1140
TTACAATCCACCTGTAATATCGAGCAGTCCTTCTTCAACGACTGGTTCAGTGGACACCTC
L Q S T C N I E Q S F F N D W F S G H L
      1150      1160      1170      1180      1190      1200
AACTTTCAAATCGAGCACCACCTTGTTTCCAATGATGCCGCGGCACAACCTACCACCTGGTG
N F Q I E H H L F P M M P R H N Y H L V
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GCCCCGAGGTCCGTGCGCTCTGCGAGAAACACGGGATTCCTTACCAGGAGAAAACCTTTG
A P Q V R A L C E K H G I P Y Q E K T L
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
TGCGAGGCTTCGCTGATATTGTCACGTCACCTGAAAACCTCTGGGGACCTCTGGCTGGAT
W R G F A D I V T S L K T S G D L W L D
      1330      1340
GCATATCTCCATAAATGA
A Y L H K *

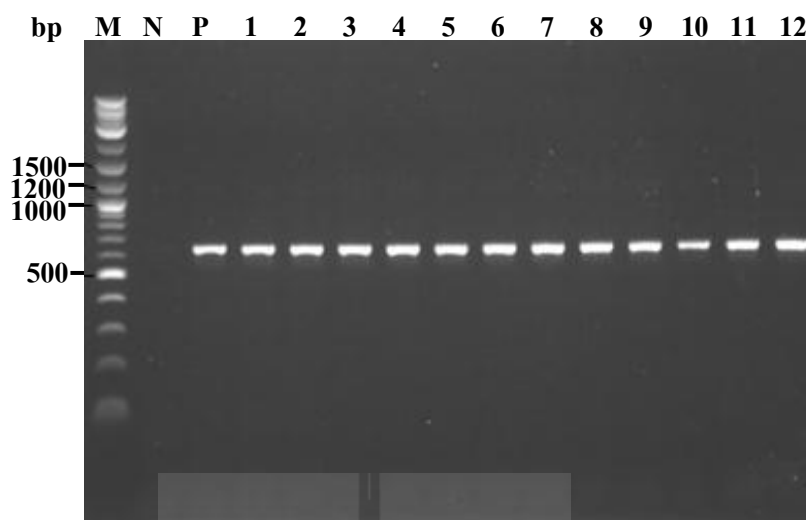
```

ภาพที่ 4.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน delta 6 desaturase ของปลานิล(ต่อ)



ภาพที่ 4.14 ผลการตรวจสอบ recombinant yeast ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NiFad6_F2 คู่กับ primer NiFad6_R1 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,338 bp

หมายเหตุ : M = DNA marker, N = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control คือ PCR reaction ใช้ pGD6, หมายเลข 1 ถึง 6 = recombinant plasmid DNA (pYD6), หมายเลข 7 ถึง 12 = recombinant plasmid DNA (pYD6-S)

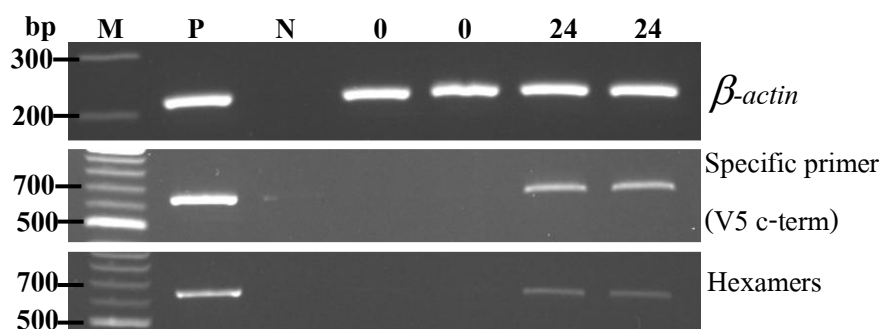


ภาพที่ 4.15 ผลการตรวจสอบ recombinant yeast ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FADd6_1 คู่กับ primer ART_R2 ได้ผลิต PCR ที่มีขนาด 635 bp

หมายเหตุ : M = DNA marker, N= negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control คือ PCR reaction ใช้ pGD6, หมายเลข 1 ถึง 6 = recombinant plasmid DNA (pYD6), หมายเลข 7 ถึง 12 = recombinant plasmid DNA (pYD6-S)

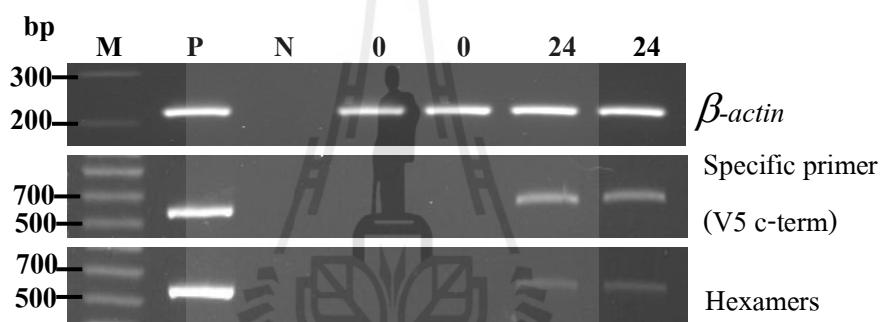
4.1.4 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเอนไซม์ delta 6 desaturase ในยีสต์ RY

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเอนไซม์ delta 6 desaturase โดยได้ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบตามระยะเวลาต่างๆ จะทำการเก็บรวบรวมเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ด้วยวิธีทำ RT-PCR พบว่ายีสต์ RY มีการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ β -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน Delta 6 desaturase ในยีสต์ RY (ภาพที่ 4.16 และ 4.17)



ภาพที่ 4.16 การตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase ของยีสต์ RY ใน D6

หมายเหตุ : M = DNA Marker, N = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control, 0 = ยีสต์ RY เลี้ยงที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 = ยีสต์ RY เลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.17 การตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ delta 6 desaturase ของยีสต์ RY ใน D6-S

หมายเหตุ : M = DNA Marker, N = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control, 0 = ยีสต์ RY เลี้ยงที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 = ยีสต์ RY เลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.5 ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ RY

จากการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมัน พบว่ายีสต์ RY ที่เลี้ยงในอาหารที่มี galactose ทำให้มีสัดส่วนของ C18:4n3 สูงกว่ายีสต์ RY ที่เลี้ยงในอาหารที่มี glucose อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) และการตรวจสอบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase พบว่าสามารถเปลี่ยน C18:3n3 เป็น C18:4n3 เท่ากับ 7.07 เปอร์เซ็นต์ และ C18:2n6 เป็น C18:3n6 เท่ากับ 39.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในปลาต่างๆ พบว่า เอนไซม์มีการเปลี่ยนกรดไขมันจาก C18:3n3 เป็น C18:4n3 อยู่ระหว่าง 14.5-60 เปอร์เซ็นต์ และจาก C18:2n6 เป็น C18:3n6 อยู่ระหว่าง 14-36.5 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการศึกษาที่พบว่าสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C20:3n6 เป็น C20:4n6 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงานเช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ delta 5 desaturase ซึ่งชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์ delta 6 desaturase เป็น Bifunctional enzyme

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ RY (mg/g ไขมัน) ที่ทำการเลี้ยงในอาหารที่ Glucose และ Galactose

Growing medium	C16 : 0	C16 : 1	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2n6	C18 : 3n6	C18 : 3n3	C18 : 4n3
Glucose SC-Ura	252.49 ± 34.25	310.10 ± 22.36	70.35 ± 5.67	213.09 ± 23.39	7.10 ± 0.47	0.36 ± 0.11	1.00 ± 0.20	0.32 ± 0.09 ^a
Galactose SC-Ura	197.24 ± 6.56	353.79 ± 31.49	51.48 ± 1.57	225.23 ± 11.20	8.04 ± 0.27	0.55 ± 0.08	1.27 ± 0.22	15.32 ± 0.60 ^b

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแถวตั้ง ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase ในยีสต์ RY

Fatty acid substrate	Product	Conversion (%)	Activity
C18 : 3n3	C18 : 4n3	7.07	D6
C18 : 2n6	C18 : 3n6	39.5	D6
C20 : 3n6	C20 : 4n6	4.5	D5

หมายเหตุ : D6 = Delta 6 desaturase

D5 = Delta 5 desaturase

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริมยีสต์ที่มีการตัดต่อยีน Delta 6 desaturase ในอาหารปลานิล

4.2.1 ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอด

จากการศึกษาการเสริมยีสต์ที่ไม่ได้มีการถ่ายยีน (ยีสต์ NT) และ ยีสต์ที่มีการถ่ายยีน (ยีสต์ RY) ในอาหารปลานิลต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอด พบว่า การใช้ยีสต์ NT และ ยีสต์ RY เสริมในอาหารปลานิลนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลา และอัตราการรอดของปลา ซึ่งการเจริญเติบโตเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อการประเมินประสิทธิภาพของการใช้อาหารของปลา จึงแสดงให้เห็นว่า ปลาสามารถใช้อาหารจากอาหารสูตรพื้นฐาน อาหารที่มีการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ได้ไม่แตกต่างกัน

(ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอด

Experimental Diet	Initial weight (g)	Final weight (g)	DWG (g/day)	SGR (%/day)	FCR	Survival Rate (%)
T1	34.29±0.09	130.28±17.27	1.14±0.09	1.58±0.08	1.98±0.16	83.33±2.64
T2	34.50±0.49	143.06±13.43	1.29±0.06	1.69±0.05	1.57±0.04	82.29±1.04
T3	35.71±1.62	150.00±15.20	1.36±0.06	1.71±0.03	1.58±0.06	86.46±1.04
T4	34.13±1.21	140.28±22.79	1.26±0.10	1.67±0.06	1.73±0.13	85.42±1.32
T5	33.55±0.32	144.17±20.65	1.32±0.10	1.73±0.07	1.63±0.13	86.46±1.04

4.2.2 ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อค่าโลหิตวิทยา

จากการศึกษาการเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อค่าโลหิตวิทยา พบว่าการเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อค่าโลหิตวิทยา และค่ากลูโคสในเลือด ซึ่งองค์ประกอบเลือดนั้น เป็นตัวแปรที่มีความสำคัญที่ใช้ประเมินสภาพทางกายภาพและชีวภาพของปลา จึงแสดงให้เห็นว่าสภาพทางกายภาพและชีวภาพของปลาที่ใช้อาหารจากสูตรพื้นฐาน อาหารที่มีการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY นั้นไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อค่าโลหิตวิทยา

Experimental Diet	Glucose (mg/L)	RBC (cell*10 ¹² /L)	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)
T1	47.17±4.07	1.89±0.09	11.55±0.38	29.33±1.20
T2	68.33±6.10	1.78±0.09	10.98±0.57	31.00±2.08
T3	86.83±15.43	1.89±0.13	10.40±0.54	31.33±0.88
T4	78.33±12.27	1.92±0.12	11.55±0.32	31.67±1.26
T5	84.33±12.57	2.15±0.09	12.40±0.60	33.00±1.06

4.2.3 ผลของการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา

จากการศึกษาการเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลเพื่อศึกษากรดไขมันที่สะสมในเนื้อปลานิลพบว่า การเสริมยีสต์ RY ทำให้กรดไขมัน C18 : 4n3 และ C18 : 3n6 ในเนื้อปลาเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการเสริมยีสต์ NT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น่าจะมีเหตุผลอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ delta 6 desaturase โดยการเปลี่ยน กรดไขมัน C18 : 3n3 เป็น C18 : 4n3 และเปลี่ยน กรดไขมัน C18 : 2n6 เป็น C18 : 3n6 นอกจากนี้ยังทำให้เพิ่มการเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันขึ้นต่อเนื่องต่อไป ดังจะเห็นได้จากปลาที่เสริมยีสต์ RY มีกรดไขมัน C22 : 6n3 (DHA) สูงกว่าปลาที่เสริมยีสต์ NT (ตารางที่ 4.5) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มกรดไขมันสารตั้งต้นของกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในกลุ่ม n-3 pathway สามารถมีผลต่อการเพิ่มกรดไขมันผลผลิตตัวสุดท้ายได้ เช่นเดียวกับรายงานของ Justi, Hayashi, Visentainer, Souza and Matsushita, 2003 and Visentainer, Souza, Makoto, Hayashi and Franco, 2005 ที่ทำการเสริมน้ำมัน flaxseed ในอาหารปลานิลซึ่งมีองค์ประกอบของกรดไขมัน C18 : 3n3 สูง ส่งผลทำให้มี กรดไขมัน C20 : 5n3 (EPA) และ C22 : 6n3 (DHA) สูงกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา

Fatty acid (mg/g)	T1	T2	T3	T4	T5
C16:0	42.61±5.87	43.93±7.17	44.93±7.69	45.33±7.23	41.36±7.17
C16:1	0.70±0.14	0.76±0.13	0.85±0.17	0.71±0.16	0.70±0.15
C18:0	13.20±1.83	13.25±2.36	14.83±1.37	13.26±2.22	14.17±1.41
C18:1	52.95±7.31	49.04±6.64	55.49±7.02	49.45±9.01	51.85±6.76
C18:2n6	15.34±0.73 ^d	16.90±0.52 ^c	16.90±0.97 ^c	19.49±0.52 ^a	17.93±0.83 ^b

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลา (ต่อ)

Fatty acid (mg/g)	T1	T2	T3	T4	T5
C18:3n6	0.11±0.003 ^c	0.12±0.002 ^b	0.12±0.003 ^b	0.16±0.002 ^a	0.16±0.005 ^a
C18:3n3	1.29±0.14 ^c	1.45±0.14 ^b	1.52±0.10 ^{ab}	1.68±0.05 ^a	1.58±0.11 ^a
C18:4n3	0.0502±0.002 ^c	0.0553±0.003 ^b	0.0525±0.002 ^b	0.0637±0.003 ^a	0.0628±0.002 ^a
C20:0	0.66±0.09	0.53±0.07	0.54±0.08	0.53±0.09	0.54±0.09
C20:1	2.94±0.23 ^c	3.18±0.25 ^{ab}	3.26±0.20 ^b	3.56±0.13 ^a	3.56±0.27 ^a
C20:2	1.54±0.28	1.78±0.48	1.17±0.48	1.16±0.69	1.33±0.51
C20:3N6	1.41±0.24	1.38±0.24	1.52±0.18	1.66±0.21	1.61±0.24
C20:3N3	3.07±0.75	3.14±0.35	3.56±0.69	3.24±0.44	3.74±0.45
C20:4N6	0.34±0.05	0.35±0.04	0.32±0.07	0.33±0.07	0.35±0.05
C20:5N3	0.51±0.09	0.45±0.04	0.39±0.11	0.44±0.14	0.51±0.11
C22:0	0.27±0.04	0.29±0.08	0.28±0.04	0.27±0.04	0.24±0.03
C22:1	0.17±0.06	0.17±0.04	0.18±0.04	0.150.04	0.14±0.03
C22:2	0.25±0.04	0.26±0.03	0.27±0.09	0.25±0.11	0.34±0.09
C22:6N3	6.50±0.56 ^b	7.18±0.93 ^b	7.16±0.37 ^b	8.38±0.31 ^a	7.91±0.56 ^a
C24:0	0.27±0.07	0.30±0.07	0.37±0.11	0.34±0.08	0.34±0.07
PUFA	30.54±2.94 ^c	33.20±2.83 ^b	33.11±3.04 ^b	36.94±2.58 ^a	35.59±2.98 ^a
MUFA	3.94±0.45	4.25±0.45	4.45±0.45	4.58±0.39	4.54±0.48
SFA	66.31±9.40	67.40±10.69	70.56±11.06	70.07±11.67	66.06±9.85
n6	17.21±1.03 ^d	18.76±0.80 ^c	18.86±1.16 ^c	21.63±0.81 ^a	20.04±1.12 ^b
n3	11.42±1.54 ^c	12.29±1.47 ^b	12.68±1.28 ^b	13.81±0.94 ^a	13.79±1.24 ^a
n6/n3	1.51±0.67	1.53±0.55	1.49±0.91	1.57±0.86	1.45±0.91

หมายเหตุ: a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวนอน ($P < 0.05$)

4.2.4 ผลของการศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาของปลา

จากการศึกษาการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อค่าองค์ประกอบโภชนาของปลานิลพบว่า การใช้ยีสต์ NT และยีสต์ RY ที่เสริมในอาหารปลานั้นไม่ส่งผลกระทบต่อค่าองค์ประกอบโภชนาของปลานิล (ตารางที่ 4.6) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Ebrahim และ Seif (2008) (ตารางที่ 2.4) การเสริมยีสต์มีชีวิต ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาอย่างมีนัยสำคัญ จากผลดังกล่าวนี้สามารถสรุปได้ว่าการเสริมยีสต์มีชีวิตในอาหารปลาไม่มี

ผลต่อการเพิ่มการใช้ประโยชน์จากอาหาร ดังนั้นการเสริมยีสต์เซลล์มีชีวิตจึงไม่ส่งผลต่อค่าองค์ประกอบทางเคมีของปลา

ตารางที่ 4.6 ผลของการเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อองค์ประกอบทางโภชนาของปลา

Experimental Diet	Dry matter	Crude Protein	Ether extract	Ash
T1	68.89±1.69	12.32±0.45	3.11±0.94	4.85±0.92
T2	71.04±2.43	12.06±0.43	4.92±0.90	4.63±0.97
T3	69.56±1.62	12.08±0.36	4.59±0.90	4.26±0.99
T4	68.71±1.28	12.35±0.51	4.27±0.61	4.54±0.73
T5	69.98±0.77	12.93±0.95	4.60±1.19	4.75±0.91

4.2.5 ผลของการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลา

ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิล พบว่าไม่ส่งผลต่อประชากรรวมของจุลินทรีย์ (Total aerobic bacteria) ในลำไส้ปลานิล แต่ส่งผลทำให้มีประชากรของยีสต์และเชื้อรา (Yeast and fungi) ในลำไส้ปลานิลเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเสริม recombinant yeast ยังส่งผลต่อจำนวนของแบคทีเรียที่ใช้กรดแลคติก (Lactic acid bacteria) และแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ปลานิลเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อธิบายได้ว่า ยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ที่เสริมในอาหารปลา มีองค์ประกอบของ MOS ซึ่งสามารถใช้เป็นสารอาหารของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ และดังจะเห็นได้จากรายงานการศึกษาถึงผลของ Mannan oligosaccharides (MOS) ต่อการเพิ่มจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้นอกจากนี้การเสริมยีสต์ปกติ และ recombinant yeast ทำให้เชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อก่อโรค มีจำนวนลดลงแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการตรวจสอบการมีชีวิตของยีสต์ปกติ และ recombinant yeast ที่เสริมลงในอาหารปลาโดยการนำเชื้อจากลำไส้ปลามาเลี้ยงบนอาหาร SC-agar พบว่ายีสต์ปกติ และ recombinant yeast ที่เสริมลงในอาหารปลานิลสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ปลาได้ (ตารางที่ 4.7)

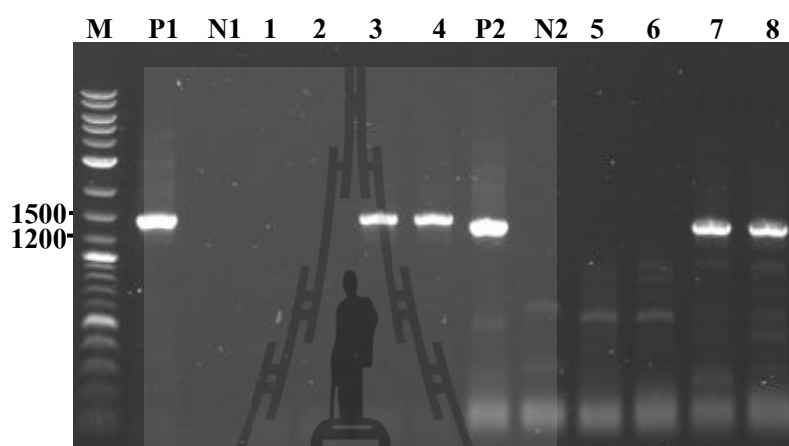
ตารางที่ 4.7 ผลของการเสริมยีสต์ NT และยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ปลานิล (CFU/g)

Experimental Diet	Total aerobic bacteria	Yeast and fungi	Lactic acid bacteria	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.	SC-agar
T1	6.30 ± 0.04	2.68 ± 0.19 ^b	3.17 ± 0.06 ^b	5.97 ± 0.03 ^b	5.21 ± 0.04 ^a	nd
T2	6.28 ± 0.06	3.06 ± 0.13 ^a	3.21 ± 0.07 ^{ab}	6.08 ± 0.10 ^{ab}	4.98 ± 0.04 ^b	6.25 ± 0.13 ^a
T3	6.27 ± 0.06	3.05 ± 0.22 ^a	3.20 ± 0.08 ^{ab}	6.07 ± 0.10 ^{ab}	4.96 ± 0.03 ^b	6.21 ± 0.04 ^a
T4	6.27 ± 0.03	3.08 ± 0.021 ^a	3.28 ± 0.08 ^a	6.10 ± 0.14 ^a	4.98 ± 0.03 ^b	5.96 ± 0.04 ^b
T5	6.26 ± 0.03	3.04 ± 0.021 ^a	3.27 ± 0.06 ^a	6.09 ± 0.05 ^a	4.96 ± 0.06 ^b	5.93 ± 0.07 ^b

หมายเหตุ : a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแถวตั้ง ($P < 0.05$)

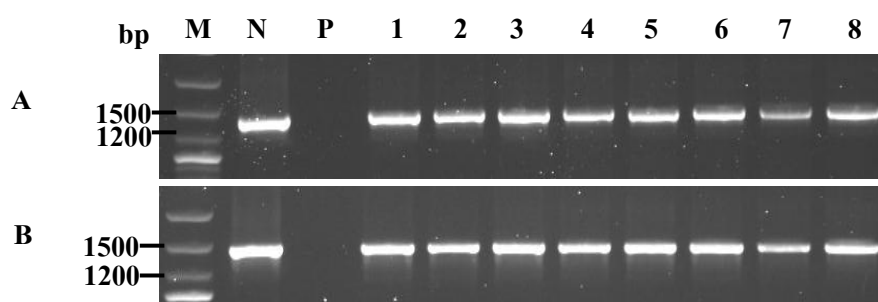
4.2.6 ผลของการตรวจสอบเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหาร SC-agar

ผลการตรวจสอบเชื้อยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SC-agar พบว่ายีสต์ที่ได้จากลำไ้ปลานิลที่ได้รับการเสริมยีสต์ RY ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SC-agar เป็น recombinant yeast โดยแสดงผลได้จากการทำ PCR ซึ่งพบว่า เชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการเสริมยีสต์ RY จะให้ผล PCR product ประมาณ 1,433 bp และ 1,398 bp ตามลำดับ ส่วนเชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการอาหารผสมยีสต์ปกติจะไม่แสดงผล PCR product (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.18 ผลการตรวจสอบเชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการอาหารผสมยีสต์ NT และยีสต์ RY ด้วยวิธี PCR

หมายเหตุ : M = DNA marker, N1 และ N2 = negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P1 และ P2 = positive control คือ PCR reaction ใช้ pGY6, หมายเลข 1 และ 2 = เชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการอาหารผสมยีสต์ปกติตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ GAL1 คู่กับ Nifad6_R1 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,433 bp, หมายเลข 3 และ 4 = เชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการอาหารผสม recombinant yeast ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ GAL1 คู่กับ Nifad6_R1 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,433 bp, หมายเลข 5 และ 6 = เชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการอาหารผสมยีสต์ปกติตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ Nifad6_F1 คู่กับ V5 c-term ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,398 bp, หมายเลข 7 และ 8 = เชื้อยีสต์ในลำไ้ปลานิลที่ได้รับการอาหารผสม recombinant yeast ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ Nifad6_F1 คู่กับ V5 c-term ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,398 bp

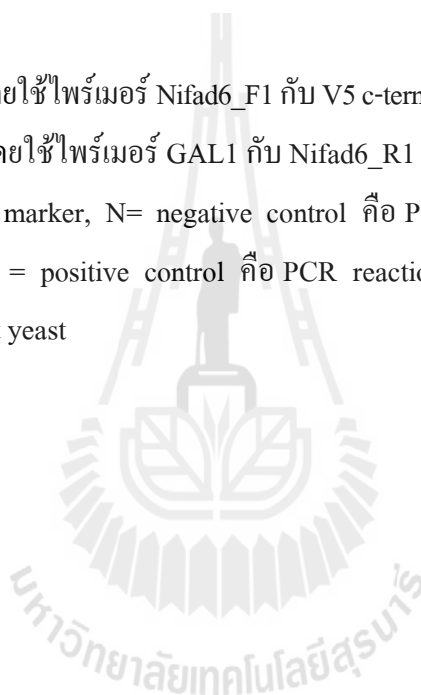


ภาพที่ 4.19 ผลการตรวจสอบเชื้อยีสต์ในลำไส้ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมยีสต์ NT และยีสต์ RY ด้วยวิธี PCR

ภาพ A ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ Nifad6_F1 กับ V5 c-term ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,398 bp

ภาพ B ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ GAL1 กับ Nifad6_R1 ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาด 1,433 bp

หมายเหตุ : M = DNA marker, N= negative control คือ PCR reaction ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template, P = positive control คือ PCR reaction ใช้ pGY6, หมายเลข 1 ถึง 8 = recombinant yeast



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

1. จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ cDNA ของยีน delta 6 desaturase มีความยาวเท่ากับ 1,466 bp ประกอบไปด้วยส่วนของ Coding sequence (CDS) มีนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,338 bp มีส่วนของ 5' untranslated region (UTR) เท่ากับ 5 bp และส่วนของ 3' untranslated region (UTR) เท่ากับ 123 bp ซึ่งเมื่อทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจะมีจำนวนเท่ากับ 445 residues ยีน delta 6 desaturase ที่ได้จากปลานิลมีความคล้ายคลึงในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับปลาชนิดต่างๆ อยู่ในช่วง 70-99 เปอร์เซ็นต์ และมีความคล้ายคลึงในส่วนลำดับอะมิโนอยู่ในช่วง 63-99 เปอร์เซ็นต์ cDNA ของยีน delta 6 desaturase ของปลานิลโดยมีโครงสร้างประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของ Cytochrome b5 domain และ Fatty acid desaturase domain

2. ยีน delta 6 desaturase มีการแสดงออกในทุกระยะการพัฒนารวมทั้งของตัวอ่อนปลานิล ได้แก่ ไข่ปลาที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized egg) middle blastula (MB) late blastula (LB) gastrula (G) body segmentation (BS) pharyngula (P) และ hatching (H) ซึ่งยีน delta 6 desaturase ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว และยีน delta 6 desaturase เป็นยีน maternal ซึ่งสร้างโดยแม่ปลาในระหว่างกระบวนการพัฒนารวมทั้งของไข่ปลา สร้างและเก็บสะสมไว้ในไข่ปลาเพื่อให้ลูกปลานำไปใช้ในระหว่างการพัฒนา จนถึงระยะ mid blastula ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวนี้ ลูกปลาจะยังไม่มีกระบวนการแสดงออกของยีน

3. ยีสต์ RY มีการแสดงออกของยีน delta 6 desaturase ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเลือกเวลาที่ 24 ชั่วโมงในการผลิตยีสต์ RY สำหรับการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase และการใช้ยีสต์ RY เป็นสารเสริมในอาหารปลา

4. เอนไซม์ delta 6 desaturase ที่โคลนได้จากปลานิล มีอัตราการเปลี่ยน C18 : 3n3 เป็น C18 : 4n3 เท่ากับ 7.07 เปอร์เซ็นต์ และ C18 : 2n6 เป็น C18 : 3n6 เท่ากับ 39.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเปลี่ยนกรดไขมัน C20 : 3n6 เป็น C20 : 4n6 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงานเช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ delta 5 desaturase ซึ่งชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์ delta 6 desaturase เป็น Bifunctional enzyme

5. การเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลไม่ส่งผลกระทบต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลา อัตราการกินอาหาร FCR และ อัตราการรอดของปลา

6. การเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลต่อค่าโลหิตวิทยาไม่ส่งผลกระทบต่อค่าโลหิตวิทยาได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ ค่าการอัดแน่นของเม็ดเลือดแดง และ ค่ากลูโคสในเลือดปลา

7. การเสริมยีสต์ RY ในอาหารปลานิลทำให้มีกรดไขมัน C18 : 4n3, C22 : 6n3 (DHA) และ C18 : 3n6 สะสมในเนื้อปลาเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการเสริมยีสต์ NT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

8. การเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลไม่ส่งผลกระทบต่อค่าองค์ประกอบโภชนาของปลานิล

9. การเสริมยีสต์ NT และ ยีสต์ RY ในอาหารปลานิลมีผลทำให้ประชากรของยีสต์แบคทีเรียที่ใช้กรดแลคติก (Lactic acid bacteria) แบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ปลาเพิ่มขึ้น และลดแบคทีเรียที่เป็น โทษ คือเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp.

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในข้างต้นสามารถนำข้อมูลจากการศึกษานี้ไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยในอนาคตได้ ซึ่งสามารถศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ของยีน delta 6 desaturase ในปลาชนิดอื่น ๆ เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิต และสามารถทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของปลาชนิดอื่น ๆ ได้ สามารถนำยีสต์ RY ไปเสริมในอาหารของปลาและสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นๆเพื่อศึกษาการสะสมกรดไขมันในเนื้อปลาและสัตว์เศรษฐกิจอื่นๆต่อไปสัตว์ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงระดับการเสริมยีสต์ RY ในระดับที่เพิ่มสูงขึ้นในปลานิล เพื่อหาแนวทางในการเพิ่มการสะสมกรดไขมันในเนื้อปลานิลต่อไป

รายการอ้างอิง

- กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง [ออนไลน์].
ได้จาก <http://www.fisheries.go.th/it-stat/>
- ประเทือง เชาว์วันกลาง. (2536). การเลี้ยงปลาน้ำจืด. กรุงเทพฯ: ฟิสิกส์เซ็นเตอร์.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2549). ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ebrahim, M. S. M. and Abou-seif R. A. (2008). Fish meal replacement by yeast protein (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with biogenic l-carintine as a source of methionine plus lysine mixture in feed for nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Central Laboratory for Aquaculture Research, Agriculture Research Center, Cairo, Egypt.
- FAO, (2002). Antibiotics residue in aquaculture products. **The State of World Fisheries and aquaculture**. Rome, Italy. 74-82 pp.
- González-Rovira, A., Mourente, G., Zheng, X., Tocher, D.R. and Pendon, C. (2009). Molecular and functional characterization and expression analysis of a delta-6 fatty acyl desaturase cDNA of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture**. 298: 90-100.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R. and Teale, A.J. (2001). A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98: 14304-14309.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L. and Smith, S.A. (2000). Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). **Vet Clin Pathol**. 29: 7-12.
- Jonewell, S. (1993). The Use of Yeast Cultures in Animal Feeds. **Feed Mix**. 1(4):550-562.
- Justi, K.C., Hayashi, C., Visentainer, J.V., Souza, N.E. and Matsushita, M. (2003). The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. **Food Chemistry**. 80: 489-493.
- Koji, F. and Okada, N. (20007). Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile

- tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. **Develop. Growth Differ.** 49: 301-324.
- Lu, H., Li, J.N., Chai, Y.R. and Zhang, X.K. (2009). Identification and characterization of a novel Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Rhizopus nigricans*. **Mol. Biol. Rep.** 36: 2291-2297.
- Morrison, W. and Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. **J. Lipid Res.** 5: 600-608.
- Nelson, J.S. (2006) Fishes of the world, 4th Edition. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA. 601 pp.
- Osman, H.A.M., Ibrahim, T.B., Soliman, W.E. and Monier, M.M. (2010). Influence of dietary commercial Beaker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, survival and immunostimulation of *Oreochromis niloticus* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Nature and Science.** 8(3): 96-103.
- Philippart, J.C.L., and Ruwat, J.C. (1982). Ecology and Distribution of tilapia. Page 15-19 in R.S.V. pullin and R.H. Lowe-McConell, Editor. **The biology and culture of tilapia** ICLARM Conference Proceedings 7. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. and Watanabe, T. (2004). Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish & Shellfish Immunology.** 16: 25 – 39.
- Qiu, X., Hong, H., Datla, N., MacKenzie, S.L., Taylor, D.C. and Thomas, T.L. (2002). Expression of borage Δ^6 desaturase in *Saccharomyces cerevisiae* and oilseed crops. **Can. J. Bot.** 80: 42-49.
- Sprecher, H., (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochim. Biophys. Acta.** 1486: 219-231.
- Tawwab, M.A., Rahman, A.M. and Ismael, N.E.M. (2008). Evaluation of commercial live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture.** 280: 185-189.
- Teoh, C.Y., Turchini, G.M. and Ng, W.K. (2011). Genetically improved farmed Nile tilapia and

- red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend. **Aquaculture**. 312: 126-136.
- Tocher, D., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J. and Teale, A. (2006a). Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl Δ^6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Lipids**. 41(11): 1003-1016.
- Visentainer, J.V., Souza, N.E., Makoto, M., Hayashi, C. and Franco, M.R.B. (2005). Influence of diet enriched with flaxseed oil on the α -linolenic eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**. 90: 557-560.
- Yuangsoi, B., Jintasataporn, O., Tabthipwon, P., Mahasawasde, S. (2003). Increasing of omega 3 fatty acid in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using tuna oil. Proceedings of 41st Kasetsart University Annual Conference. 86-93.
- Zerai, D.B., Fitzsimmons, K.M., Collier, R.J. and Duff, G.C. (2008). Evaluation of Brewer's Waste as Partial Replacement of Fish Meal Protein in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Diets. **J. World Aquac. Soc.** 39: 556-564.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P. and Teale, A.J. (2004a). Characterization and comparison of fatty acyl Δ^6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. **Comp. Biochem. Physiol.** 139: 269-279.
- Zheng, X., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Dick, J.R., Bell, J.G. and Teale, A.J. (2005b). Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a Δ^6 desaturase of Atlantic salmon. **Lipids**. 40: 13-24.
- Zheng, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O., Morais, S. and Tocher, D.R. (2009). Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl Δ^6 desaturase and *elovl5* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**. 290: 122-131.
- www.thaikasetsart.com.
- www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB (100 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	1 g
	Tryptone	1 g
	Yeast extract	0.5 g
	Agar	1.5 g (สำหรับ plate)

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave จากนั้นทำการเท plate สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

2. 2XYT (100 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	0.5 g
	Tryptone	1.6 g
	Yeast extract	1 g
	Agar	1.5 g (สำหรับ plate)

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave หลังจากนั้นวางรอให้อุ่น ๆ แล้วใส่ IPTG 100 μ l, X-gal 100 μ l และ ampicillin 100 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากันและทำการเท plate สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

3. SOB (60 ml)

ประกอบด้วย	NaCl	0.0351 g
	Tryptone	1.2 g
	Yeast extract	0.3 g
	KCl	0.0111 g

ใส่น้ำ DI 60 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave หลังจากนั้นวางรอให้อุ่น ๆ แล้วใส่ 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 600 μ l, 1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 600 μ l ผสมสารละลายให้เข้ากัน (หากต้องการเตรียมสาร SOC มีกระบวนการและส่วนประกอบเหมือนกับ SOB ยกเว้นจะต้องมีการใส่สาร 2 M glucose 600 μ l)

4. SC-minimal medium plate (100 ml)

ประกอบด้วย	Yeast nitrogen base	0.67 g
	(Without amino acids with ammonium sulfate)	
	Glucose or raffinose	2 g

Adenine	0.01 g
Arginine	0.01 g
Cysteine	0.01 g
Leucine	0.01 g
Lysine	0.01 g
Threonine	0.01 g
Tryptophan	0.01 g
Uracil	0.01 g (สำหรับ SC-minimal medium + Uracil)
Aspartic acid	0.005 g
Histidine	0.005 g
Isoleucine	0.005 g
Methionine	0.005 g
Phenylalanine	0.005 g
Proline	0.005 g
Serine	0.005 g
Tyrosine	0.005 g
Valine	0.005 g
Agar	2 g (สำหรับ plate)

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จะไม่ผสม Glucose หรือ raffinose ลงไปในอาหารที่นำไป autoclave เพราะจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหนียว จะผสมหลังจาก autoclave โดยรอให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุ่น ๆ แล้วเติม Glucose ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นทำการเท plate

5. Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) (100 ml)

ประกอบด้วย	Yeast extract	1 g
	Peptone	1 g
	Dextrose (D-glucose)	1 g

ใส่น้ำ DI 100 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไป autoclave สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง จะไม่ผสม Glucose ลงไปในอาหารที่นำไป autoclave เพราะจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเหนียว จะผสมหลังจาก autoclave โดยรอให้อาหารเลี้ยงเชื้ออุ่น ๆ แล้วเติม Glucose ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากันจากนั้นทำการเท plate

การเตรียมสารละลายและบัฟเฟอร์

1. TE buffer (10 ml)

ประกอบด้วย	1 M Tris-HCl, pH 7.5	0.1 ml
	0.5 M EDTA	0.02 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 ml ด้วยน้ำ DI

2. สาร Solution I (2 ml)

ประกอบด้วย	25% sucrose	0.8 ml
	1 M Tris-HCl, pH 8	0.05 ml
	0.5 M EDTA	0.04 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 2 ml ด้วยน้ำ DI

3. สาร Solution II (2 ml)

ประกอบด้วย	25% sucrose	0.8 ml
	25% SDS	0.16 ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 2 ml ด้วยน้ำ DI

4. สาร Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) (100 ml)

ชั่งสาร potassium acetate 29.46 g ละลายในน้ำ DI 60 ml เติม glacial acetic acid 11.5 ml และใส่น้ำ DI 28.5 ml

5. สาร transformation buffer (100 ml)

ประกอบด้วย	PIPES	0.3 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.22 g
	KCl	1.86 g

ใส่น้ำ DI (ที่ผ่านการ autoclave มาแล้ว) 80 ml ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน และปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7-6.8 ด้วย 5 N KOH และใส่ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.09 g หลังจากนั้นทำการปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 ml ด้วยน้ำ DI และทำการ sterilization ด้วยการกรอง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุกมาส ถนอมมัน เกิดเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดเชียงใหม่ เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนรัตนาวีวิทยา และชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนฝางชนูปถัมภ์ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ต่อมาเข้าศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2551

