โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi*

ชื่อนิสิต	นางสาวศิริวรรณ	ประเสริฐ	6032567523
	นางสาวสุภิดา	เกื้อกอบ	6032576123
	นางสาวหฤทัยชนก	จรรโลงเศวตกุล	6032580623

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi*

โดย

นางสาวศิริวรรณ ประเสริฐ

นางสาวสุภิดา เกื้อกอบ

นางสาวหฤทัยชนก จรรโลงเศวตกุล

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

ดร. ปิติ อ่ำพายัพ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2563

PUFA – RELATED GENE EXPRESSION ANALYSIS OF COPEPOD *Apocyclops royi*

Siriwan Praseart

Supida Kueakob

Haluethaichanok Junlongsawaitkul

Project Advisor

Assoc. Prof. Chanprapa Imjongjirak, Ph.D.

Piti Amparyup, Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

หัวข้องานวิจัย	การศึกษาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi*
โดย	นางสาวศิริวรรณ ประเสริฐ
	นางสาวสุภิดา เกื้อกอบ
	นางสาวหฤทัยชนก จรรโลงเศวตกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ปิติ อ่ำพายัพ
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประจำปีการศึกษา 2563

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การศึกษาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi*

โดย นางสาวศิริวรรณ ประเสริฐ
นางสาวสุภิดา เกื้อกอบ
นางสาวหฤทัยชนก จรรโลงเศวตกุล

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. ปิติ อ่ำพายัพ

ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

โคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่นิยมนำมาเป็นอาหารที่มีชีวิตสำหรับอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน เนื่องจากโคพีพอดเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) โดยเฉพาะ DHA, EPA และ ARA จากสาหร่ายที่ได้รับเข้าไปโดยตรง หรือจากการสังเคราะห์ DHA จาก α-linolenic acid (ALA;C18:3n3) ได้ โดยในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi* ทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะนอเพลียส ระยะโคพีโพดิด และระยะตัวเต็มวัยที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยจากผลการวิจัยพบว่า เมื่อเลี้ยงโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 10 วัน ด้วยสาหร่าย *T. suecica* และ *Chlorella sp.* ผลการทดลองพบว่า โคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* มีความหนาแน่นโคพีพอดทั้งหมดสูงสุด คือ 24,600 ตัว/ลิตร ซึ่งมากกว่าโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* นอกจากนี้จากผลการศึกษาด้วย sqRT-PCR ของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ได้แก่ ยีน ArD4D, ยีน ArD5Da, ยีน ArD5Db, ยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW มีการแสดงออกในทุกระยะของโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* และ *Chlorella sp.* นอกจากนี้พบว่าระดับการแสดงออกยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน มีการแสดงออกสูงในโคพีพอดระยะโคพีโพดิด และระยะตัวเต็มวัย ผลชี้ให้เห็นว่ามีการเพิ่มการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนใหม่ในโคพีพอด *A. royi* สองระยะพัฒนาการนี้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าโคพีพอด *A. royi* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* มีการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงกว่าโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* ซึ่งเป็นข้อมูลที่จะมีประโยชน์สำหรับระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสามารถประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์

Project Title	PUFA – related gene expression analysis of copepod *Apocyclops royi*	
Student	Siriwan	Praseart
	Supida	Kueakob
	Haluethaichanok	Junlongsawaitkul
Study Program	Bachelor of Science in Food Technology	
Advisor	Assoc. Prof. Chanprapa Imjongjirak, Ph.D.	
Co-advisor	Piti Amparyup, Ph.D.	
Academic Year	2020	

ABSTRACT

Copepod *Apocyclops royi* is one of the most zooplankton which has been used as live feed for fish larviculture. Accordingly, copepod is known as a source of polyunsaturated fatty acid, especially DHA, EPA and ARA which attains directly from feed or biosynthesize DHA from **α**-linolenic acid (ALA;C18:3n3). The primary aim of this study was to characterize LC-PUFA biosynthesis in three developmental stages (nauplius, copepodid, and adult) of copepod *Apocyclops royi.* reared on different diets (*Tetraselmis suecica* and *Chlorella sp.*) through PUFA-related gene expression analysis. The relative mRNA expression of these genes was determined by semi-quantitative RT-PCR technique. The experiments of copepod culture were conducted for 10 days. Our results showed that copepod *A. royi* fed with microalgae *T. suesica* had the maximum density of 24,600 ind./L. It was higher than copepod *A. royi* fed with microalgae *Chlorella sp.* Furthermore, the sqRT-PCR results of PUFA synthetic genes showed five transcripts (ArD4D, ArD5Da , ArD5Db , Aro3D_TH and Aro3D_TW) were expressed in all developmental stages of copepod *A. royi* fed with *T. suecica* and *Chlorella sp.* Additionally, high expression levels of PUFA–related genes in copepodid and adult stages suggested accretion of newly biosynthesised LC-PUFA in these developmental stages of copepod *A. royi.* Therefore, it was concluded that copepod *A. royi* cultured by *T. suecica* had higher PUFA biosynthesis than copepod *A. royi* fed with *Chlorella sp.* This result would be beneficial for aquaculture and could be adapted in the food and feed industry.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของอาจารย์ที่ปรึกษารองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.ปิติ อ่ำพายัพ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์สูงสุด ตลอดจนการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาของการทำงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยตระหนักถึงความทุ่มเทและตั้งใจจริงที่ต้องการให้ผู้วิจัยได้รับความรู้และสามารถนำไปปรับใช้ในการทำงานต่อไปในภายภาคหน้า ผู้วิจัยจึงของกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ศูนย์ปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ตลอดจนการให้ความรู้ การอำนวยความสะดวกและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และตัวผู้ทำงานวิจัย

และงานวิจัยฉบับนี้จะเกิดขึ้นไม่ได้เลย หากขาดทุนสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเสริมสร้างประสบการณ์ ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเสริมสร้างประสบการณ์ที่ได้อนุเคราะห์ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัยฉบับนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โคพีพอด *Apocyclops royi*	3
2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid : PUFA)	4
2.3 ชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA Biosynthesis)	6
2.4 ยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน	7
2.5 องค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญในโคพีพอด	8
2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)	9
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย	12
3.1 ตัวอย่าง	12
3.2 สารเคมี	12
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	13
3.4 การดำเนินการวิจัย	14
3.4.1 การเลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi*	14
3.4.2 การเก็บตัวอย่างโคพีพอด *Apocyclops royi*	14
3.4.3 การสกัด total RNA	14

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4.4 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) 15

3.4.5 การทำปฏิกิริยา PCR 16

3.4.6 การวิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis 20

3.4.7 การวัดค่าการแสดงออกของยีน 21

3.4.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 21

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 22

4.1 ผลการแสดงจำนวนโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* และสาหร่าย *Tetaselmis suecica* เป็นระยะเวลา 10 วัน 22

4.2 การสกัด RNA ของโคพีพอด *Apocyclops royi* 22

4.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Reverse Transcription PCR (RT-PCR) 23

4.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน fatty acid desaturase ในโคพีพอด *A. royi* 25

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 30

5.1 สรุปผลการทดลอง 30

5.2 ข้อเสนอแนะ 30

เอกสารอ้างอิง 31

ภาคผนวก 35

ประวัติผู้วิจัย 49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA)	5
2	ปริมาณกรดไขมันในโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยแพลงค์ตอนแต่ละชนิด	8
3	ปริมาณกรดไขมันในโคพีพอด โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย	9
4	จำนวนโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp*. และสาหร่าย *Tetaselmis suecica* เป็นระยะเวลา 10 วัน	22
5	ความเข้มข้นของ RNA ของโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยอาหาร 2 ชนิด	23

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของโคพีพอด *Apocyclops royi*	3
2	ลักษณะโครงสร้างของตัวอย่าง Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA)	5
3	วิถีหลักของการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์ยูคาริโอต	7
4	กลไกการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดโอเมก้า-6 (**ω** -6) และ โอเมก้า-3 (**ω** -3) ในยูคาริโอต	8
5	การจำลองดีเอ็นเอ (DNA Replication)	10
6	แสดงหลักการ Polymerase chain reaction	11
7	แสดงผลผลิตเฉลี่ยของโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* และสาหร่าย *Tetaselmis suecica* เป็นระยะเวลา 10 วัน	24
8	ผลการทำ PCR ของยีน CopAEEF1a, ArD4D, ArD5Da, ArD5Db, Aro3D_TH และ Aro3D_TW ของโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetaselmis suecica*	25
9	การแสดงออกของยีน ArD4D ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.*	26
10	การแสดงออกของยีน ArD5Da และ ArD5Db ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.*	26
11	การแสดงออกของยีน Aro3D-TH และ Aro3D-TW ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.*	28

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PUFA	Polyunsaturated fatty acid
mg	มิลลิกรัม
kg	กิโลกรัม
ng	นาโนกรัม
ppm	หนึ่งในล้านส่วน
ppt	หนึ่งในพันส่วน
g	กรัม
µL	ไมโครลิตร
rpm	รอบต่อนาที
ArD4D_F	Forward Ar_Delta-4 Desaturase Primer
ArD4D_R	Reverse Ar_Delta-4 Desaturase Primer
CopArEF1a _F	Forward CopAr_Elongation factor 1-alpha Primer
CopArEF1a _R	Reverse CopAr_Elongation factor 1-alpha Primer
Aro3D_TH_F	Forward Ar_omega-3 desaturase_Thailand Primer
Aro3D_TH_R	Reverse Ar_omega-3 desaturase_Thailand Primer
Aro3D_TW_F	Forward Ar_omega-3 desaturase_Taiwan Primer
Aro3D_TW_R	Reverse Ar_omega-3 desaturase_Taiwan Primer
ArD5Da_F	Forward Ar_Delta-5a Desaturase Primer
ArD5Da_R	Reverse Ar_Delta-5a Desaturase Primer
ArD5Db_F	Forward Ar_Delta-5b Desaturase Primer
ArD5Db_R	Reverse Ar_Delta-5b Desaturase Primer
bp	Base pair

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

โคพีพอด (Copepod) เป็นสิ่งมีชีวิตในไฟลัมอาร์โทรพอด (arthropod) จัดอยู่ในกลุ่มของครัสเตเชียน (crustacean) ขนาดเล็กที่เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่พบได้มากในธรรมชาติ โคพีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีความสำคัญในห่วงโซ่อาหาร และสามารถนำมาพัฒนาใช้เป็นอาหารที่มีชีวิตสำหรับอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ เนื่องจากโคพีพอดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (Farhadian et al., 2007) มีวงจรชีวิตสั้น ขนาดเล็ก และเลี้ยงง่าย (Yen-Ju Pan et al., 2016)

โคพีพอดเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) ที่ประกอบด้วย docosahexaenoic acid (DHA;C22:6n3), eicosapentaenoic acid (EPA;C20:5n3) และ arachidonic acid (ARA;C20:4n6) (พงศธร, 2558) ซึ่งได้รับจากสาหร่ายที่กินเข้าไป นอกจาก DHA ที่โคพีพอดได้รับจากสาหร่ายโดยตรง โคพีพอดยังมีความสามารถในการสังเคราะห์ DHA ได้จาก α-linolenic acid (ALA;C18:3n3) ได้อีกด้วย (Lee et al., 2006) จากการทำงานของเอนไซม์ delta 6 desaturase และ elongation เพื่อเติมคาร์บอน 2 โมเลกุล กลายเป็น C20:4n-3 แล้วจึงเกิดการ desaturation (โดย delta 5 desaturase) และ elongation อีก 2 ครั้ง กลายเป็น C24:5n-3 หลัง จากนั้นเกิด desaturation โดยเอนไซม์ delta 6 desaturase ทำให้เปลี่ยนเป็น C24:6n-3 และจะถูกเปลี่ยนเป็น DHA โดยกระบวนการ β-oxidation (Lee et al., 2006; Sprecher, 2000) ซึ่งการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณมากหรือน้อยของโคพีพอด อาจขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง (ปวีณา และคณะ, 2563)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสร้างได้เองจำเป็นต้องรับจากอาหาร ไขมันที่สำคัญคือ Omega-3 (Alpha-linolenic acid) และ Omega-6 (linolenic acid) ซึ่งเป็นไขมันที่ส่งผลดีต่อสุขภาพ เช่น ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ ลดระดับไตร-กลีเซอไรด์ในเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเกิดลิ่มเลือดในกระแสเลือด เป็นต้น (OSOTH INTER LABORATORIES, 2019) ในปัจจุบันมีน้ำมันปลาได้รับความสนใจจากผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากแหล่งของ Omega-3 และ Omega-6 โดยปลาที่นำมาสกัดน้ำมันปลาเป็นปลาทะเลธรรมชาติจากแหล่งน้ำลึกและน้ำเย็น และเป็นปลาที่มีไขมันสูง แต่เนื่องจากไขมันหรือน้ำมันที่ได้มาจากปลาทะเล มีต้นทุนการผลิตและราคาที่สูงขึ้น จึงต้องหาไขมันหรือ น้ำมันที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันและคุณค่าทางโภชนาการไม่แตกต่างจากน้ำมันปลาทะเลมาใช้ทดแทน

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโคพีพอด *Apocyclops royi* ผ่านการศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid : PUFA) ด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (gene expression analysis) ของโคพีพอดที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid : PUFA) ในโคพีพอด *Apocyclops royi*

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย

1.3.1 การศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในตัวโคพีพอด โดยเลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi* ด้วยอาหารที่แตกต่างกัน

1.3.2 ผู้วิจัยทำการศึกษาลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคพีพอด *A. royi*

1.3.3 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ เฉพาะโคพีพอด *A. royi* ใน 3 ระยะ คือ ระยะนอเพลียส , ระยะโคพีโพดิด และระยะโตเต็มวัย ด้วยอาหารที่แตกต่างกันคือ สาหร่าย *Tetraselmis suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.*

1.3.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ดำเนินการในภาคเรียนที่ 1 และ 2 ตั้งแต่วันที่ 10 สิงหาคม 2563 ถึง วันที่ 21 เมษายน 2564

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

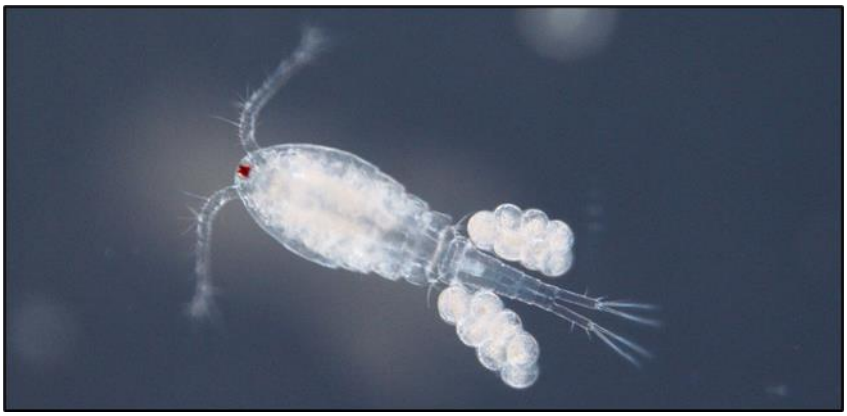
สามารถใช้โคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นทางเลือกในการใช้เป็นแหล่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นได้เอง ต้องได้รับจากอาหารที่รับประทานเข้าไป โดยหากโคพีพอด *A. royi* สามารถเป็นอีกทางเลือกที่เราสามารถสกัดกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) ได้ ก็จะสามารถลดต้นทุนการผลิตและสามารถใช้ทดแทนกรดไขมันที่มาจากปลาทะเลที่มีราคาค่อนข้างสูงและเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบัน แต่คุณค่าทางโภชนาการที่ได้รับมีคุณภาพไม่แตกต่างกับกรดไขมันที่มาจากปลาทะเล

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โคพีพอด *Apocyclops royi*

โคพีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มครัสเตเชียขนาดเล็กที่มีความหลากหลายเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม (Dahm, 2000) โคพีพอดมีลำตัวแบ่งเป็นปล้องและมีรยางค์เจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบตัว ตัวอ่อนของโคพีพอดมี 2 ระยะ ระยะแรกเรียกว่า นอเพียส ระยะหลังเรียกว่าโคพิโพดิด (Copepodid) หลังระยะโคพีโพดิดที่ 5 จะเป็นระยะโตเต็มวัย โคพีพอดมีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน โคพีพอดที่นิยมนำเพาะเลี้ยง ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ คาลานอยดา (Calanoida) , ไซโคลโพอิดา (Cyclopoida) และฮาแพดติคอยดา (Harpacticoida) ซึ่งฮาแพดติคอยดาเป็นกลุ่มที่ชอบกินซากพืช ซากสัตว์ และไม่ค่อยว่าย-น้ำ โคพีพอดหลายชนิดถูกนำมาเป็นอาหารสำหรับสัตว์น้ำในโรงเพาะฟัก เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการที่สูงกว่าโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย (Olivotto et al., 2010) และโคพีพอดระยะนอเพลียสมี ขนาดเล็กกว่า 100 ไมโครเมตร เหมาะสมกับขนาดปากของลูกปลาแรกฟักออกจากไข่ (McKinnon et al., 2003)



รูปที่ 1: ลักษณะของโคพีพอด *Apocyclops royi*

(แหล่งที่มา: https://www.hakaimagazine.com/news/is-this-tiny-copepod-the-key-to-sustainably-producing-omega-3s/)

โคพีพอด (Copepod) เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่สำคัญในอ่าวไทย เพราะพบปริมาณมากต่อปี เป็นห่วงโซ่อาหารสำคัญที่เชื่อมระหว่างแพลงก์ตอนพืชกับสัตว์น้ำวัยอ่อน โคพีพอดที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำของไทย โดยเฉพาะในแหล่งน้ำกร่อย รวมทั้งในบ่ออนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม โคพีพอดมีองค์ประกอบที่สำคัญทางโภชนาการที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่น โปรตีนและกรดไขมันที่จำเป็นซึ่งสัตว์น้ำหรือสัตว์ทะเลไม่

สามารถผลิตกรดไขมันเหล่านี้เองได้ (กรมประมง, 2559) นอกจากโคพีพอดจะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือ HUFA สูงแล้ว ยังมีวิตามินต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของลูกสัตว์น้ำอีกด้วย โคพีพอดระยะนอเพลียสมีขนาดเล็กกว่า 100 ไมโครเมตร จึงเหมาะสมกับขนาดปากของลูกปลาแรกฟักออกจากไข่ (McKinnon et al., 2003) ทำให้มีความน่าสนใจในการนำโคพีพอดระยะนอเพลียสมาใช้เป็นอาหารแก่ลูกปลาเพื่อเพิ่มอัตราการรอดและการเติบโต โดยคุณค่าทางโภชนาการของโคพีพอดนั้นเกิดจากอาหารที่โคพีพอดกินเข้าไป ซึ่งสาหร่ายหรือแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดที่โคพีพอดกินเข้าไปจะมีคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกัน

โคพีพอดมีองค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญและเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นอาหารให้สิ่งมีชีวิตตามความต้องการของสัตว์น้ำวัยอ่อน โคพีพอดมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Highly Unsaturated Fatty Acid หรือ HUFA) ที่ประกอบด้วย docosahexaenoic acid (DHA) , eicosapentaenoic acid (EPA) และ arachidonic acid (ARA) องค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่พบในโคพีพอดมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มอัตราการรอดของสัตว์น้ำวัยอ่อน อย่างไรก็ตามโคพีพอดมีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในปริมาณมากหรือน้อยอาจจะขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง (Res. J., 2014)

2.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated Fatty Acid , PUFA)

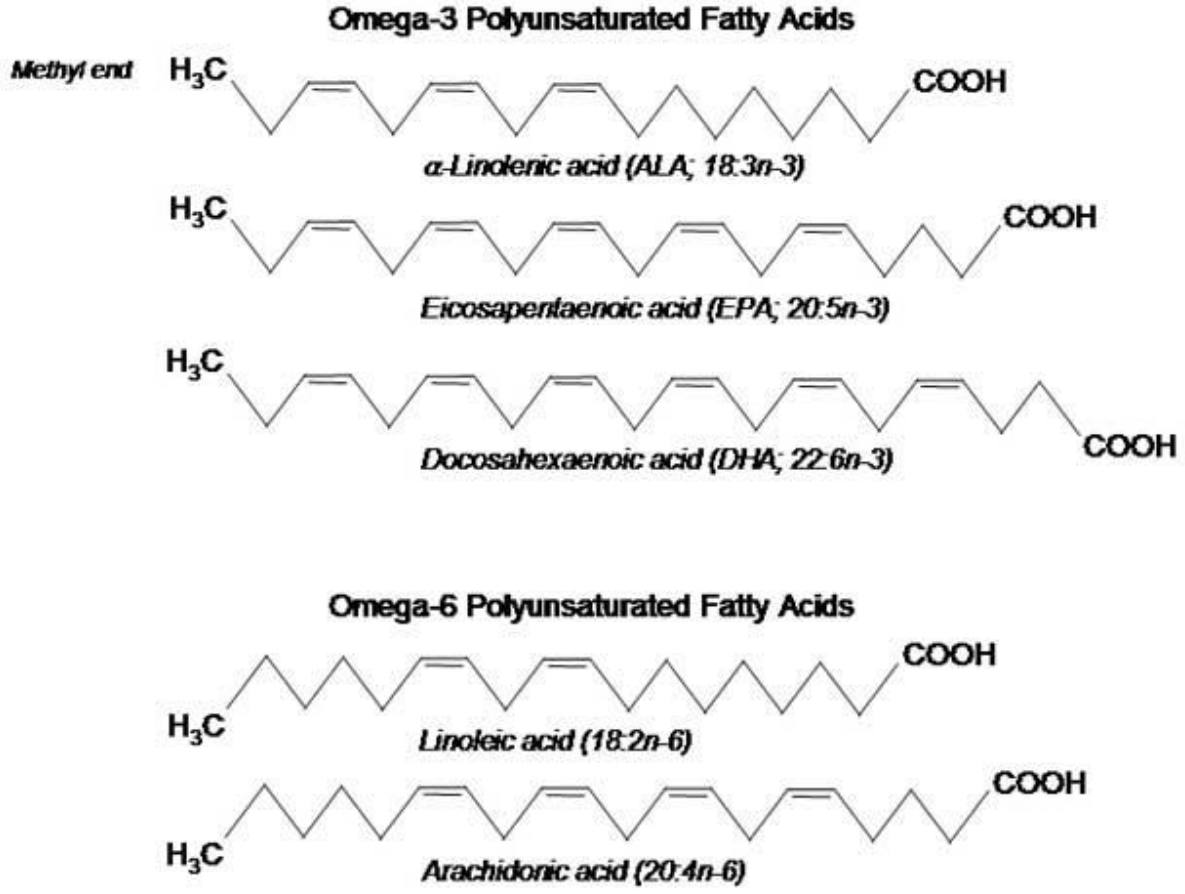
Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง เป็นกรดไขมัน (Fatty Acids) ที่มีอะตอมของธาตุไฮโดรเจนเกาะเต็มจำนวนเช่นเดียวกับกรดไขมันอิ่มตัว แต่มีจำนวนที่มากขึ้น และมีพันธะคู่ระหว่างอะตอมของคาร์บอนกับธาตุไฮโดรเจนมากกว่า 1 ตำแหน่ง ตัวอย่างของกรดไขมันประเภทนี้คือ กรดไลโนเลอิก นอกจากนี้กรดไขมันประเภทนี้ จะอยู่ในน้ำมันที่สกัดได้จากพืช เช่น น้ำมันเมล็ดคำฝอยมี 75% น้ำมันเม็ดทานตะวันมี 67% น้ำมันข้าวโพดมี 62% น้ำมันถั่ว-เหลืองมี 60% และน้ำมันถั่วลิสงมี 40% เช่นเดียวกับน้ำมันงา (Beermann et al., 2003)

กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่ร่างกายไม่สามารถสร้างได้เองจำเป็นต้องรับจากอาหาร ไขมันที่สำคัญคือ Omega-3 และ Omega-6 ซึ่งเป็นไขมันที่ส่งผลดีต่อสุขภาพ เช่น ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ ลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเกิดลิ่มเลือดในกระแสเลือด เป็นต้น (OSOTH INTER LABORATORIES, 2019)

ตารางที่ 1: ตัวอย่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA)

ชื่อกรดไขมัน	จำนวนพันธะคู่	จำนวนคาร์บอน
กรดลิโนเลอิก (linoleic acid)	2	18
กรดลิโนเลนิก (linolenic acid)	3	18
กรดอะราคิโดนิก (arachidonic acid, C 20:4)	4	20
กรดไอโคซาเพนตะอีโนอิก (Eicosapentaenoic acid ,EPA)	5	20
กรดโดโคซาเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic acid ,DHA)	6	22

(แหล่งที่มา: Pornchaloem et al., 2010)



รูปที่ 2: ลักษณะโครงสร้างของตัวอย่าง Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA)

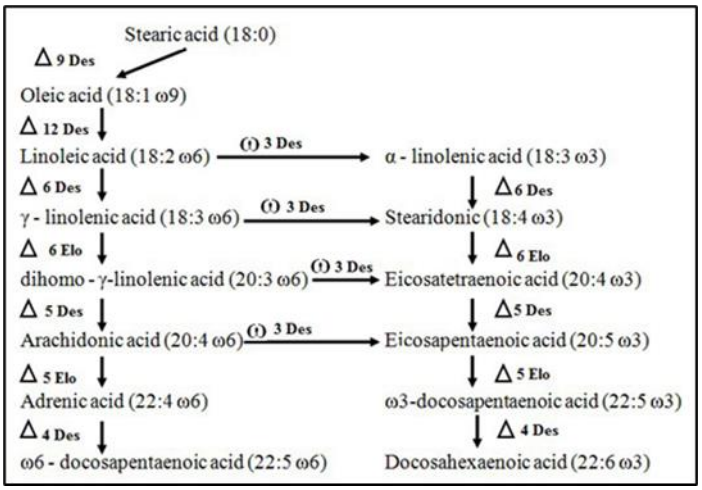
(แหล่งที่มา: Pornchaloem et al., 2010)

2.3 ชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA Biosynthesis)

ชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA Biosynthesis) ถูกค้นพบในปลาน้ำจืด ซึ่งปลาน้ำจืดมีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid; LC-PUFA) โดยมีสารตั้งต้นคือกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 อะตอม เช่น linolenic acids (LNA, 18:3n-3) และ linoleic acids (LA, 18:2n6) ในขณะที่ปลาทะเลถูกสันนิษฐานว่ามีความสามารถที่จำกัด ในการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid; LC-PUFA) จากกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 อะตอม (Sargent et al., 2002; Seiliez et al., 2003) โดยชีว-สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA Biosynthesis) ของ LC-PUFA จาก LNA และ LA จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ desaturase (fatty acyl desaturase enzyme; Fad) และ elongase (elongation of very long-chain fatty acids enzymes; Elovl) เช่น Δ6Fad, Δ5Fad, Elovl5 และ Elovl2 (Torstensen B.E. et al., 2010) ซึ่งความแตกต่างกันของกิจกรรมเอนไซม์เป็นส่วนหนึ่งของความแตกต่างของการชีวสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA Biosynthesis) ในปลา

PUFAs เกิดจากการสังเคราะห์ที่อาศัยปฏิกริยาการทำซ้ำของการเติมคาร์บอน (Elongation) และการเติมพันธะคู่ (Desaturation) ของกรดปาล์มิติก (Palmitic acid; PA; 16:0) (Jeong et al., 2003) หลังจากนั้นเกิดปฏิกริยาการเติมคาร์บอน ได้เป็นกรดสเตียริก (Stearic acid; SA; 18:0) แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาเติมพันธะคู่โดยอาศัยเอน ไซม์ Δ-12 desaturase และ **ω**-3 desaturase ตามลำดับ ทำให้เกิดกรดโอเลอิก (Oleic acid; OA; 18:1) (Pereira et al., 2003) ที่สังเคราะห์มาจาก อะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl Co-A) แล้วเกิดการเติมพันธะคู่ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum, ER) โดยเอนไซม์ fatty acyl Co A desaturase ทำให้เกิดพันธะคู่แรกสุดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 จากนั้นเกิดเติมพันธะคู่ ครั้งต่อไปทำให้ได้กรด-ไลโนเลอิก (Linoleic acid; LA; 18:2) และในที่สุดเกิดเป็น LA ซึ่งเป็นกรดไขมันที่เป็นต้นกำเนิดในกลุ่มของกรดไขมันโอเมก้า-3 สำหรับในพืชจะเกิด LA พันธะคู่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9 และ 12 และ ALA แต่ในคนและสัตว์การเติมพันธะคู่ครั้งต่อไปเกิดที่คาร์บอนลดลงจากเดิม 3 ตำแหน่งได้ ALA และ LA แต่สัตว์สามารถเปลี่ยน ALA ไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (**ω** -3 polyunsaturated fatty acids, PUFA) สายยาวขึ้น โดย ALA สามารถสังเคราะห์ให้เป็นกรดไขมันโอเมก้า-3 ตัวอื่นได้ โดยผ่านกระบวนการเติมคาร์บอนเกิดเป็นกรดอีโดซะ-เตรตะอีโนอิก (Eicosatetraenoic acid; ETA; 20:4) และจะเกิดปฏิกิริยาเติมพันธะคู่ซึ่งใช้เอนไซม์ Δ5-desaturase จนได้เป็น EPA นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ EPA จาก LA ได้โดยใช้เอนไซม์ Δ6-desaturase ได้เป็นกรดแกรมม่าไลโนเลอิก (**γ**-linolenic acid; GLA; 18:3) หลังจากนั้นเกิดปฏิกริยาการเติมคาร์บอนได้เป็นกรดไดโฮโม-แกมมา-ไลโนเลนิก (Dihomo- **γ**-linolenic acid; DGLA; 20:3) และเกิดเป็นกรดอะราคิโดนิก (Arachidonic acid; ARA; 20:4) และหลังจากนั้นจะสังเคราะห์กรดไขมัน EPA โดยเอนไซม์ **ω**-3 desaturase

แล้วจึงเกิดปฏิกิริยาการเติมคาร์บอน โดยอาศัยเอนไซม์ Δ5-elongase ได้เป็นกรดโอเมก้า-3 โดโคซาเพนตาอิโนอิก (**ω** -3 docosapentaenoic acid; DPA; 22:5) จากนั้นจึงเกิดปฏิกริยาเติมพันธะคู่ ซึ่งมีเอนไซม์ Δ4-desaturase เป็นตัวช่วยได้ DHA (Pereira et al., 2003; Wang et al., 2013)

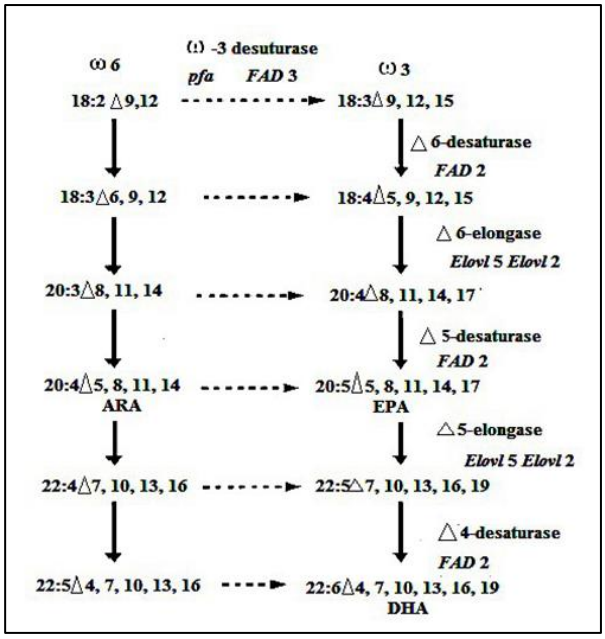


รูปที่ 3: วิถีหลักของการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์ยูคาริโอต

(แหล่งที่มา: Wang et al., 2013)

2.4 ยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน

ในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3 มีเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิดที่เกี่ยวข้อง คือ desaturase และ elongase ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะมียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยที่ยีน Fatty acid elongase 5 (Elovl 5) และ Fatty acid elongase 2 (Elovl 2) จะควบคุมการผลิตเอนไซม์ Δ5-elongase ในการเปลี่ยนกรดสเตียริกโดนิก (Stearidonic acid; SDA ; 18:4) ไปเป็น ETA และผลิตเอนไซม์ Δ6-elongase ในการเปลี่ยน EPA ไปเป็น DPA (Meyer et al, 2004) นอกจากนี้ในการผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ยังต้องอาศัยเอนไซม์ desaturase ที่มียีนควบคุมคือยีน Fatty acid desaturase 2 (FAD 2) ซึ่งผลิตเอนไซม์ desaturase ในการเปลี่ยน ALA ให้เป็น SDA โดยเอนไซม์ Δ6-desaturase หลังจากนั้นจะเปลี่ยนจาก ETA ให้เป็น EPA โดยอาศัยเอนไซม์ Δ5-desaturase (รูปที่ 3: วิถีหลักของการสังเคราะห์กรดไขมันในจุลินทรีย์ยูคาริโอต) (Gregory et al, 2011) ส่วนยีน Fatty acid desaturase 3 (FAD 3) จะควบคุมการผลิตเอนไซม์ Δ12-desaturase ในการเปลี่ยน OA ไปเป็น LA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกรผลิตกรดไขมันโอเมก้า-3 ชนิด ALA โดยเอนไซม์ **ω**-3 desaturase (Oura T. et al., 2004)



รูปที่ 4: กลไกการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงชนิดโอเมก้า-6 (**ω** -6) และโอเมก้า-3 (**ω** -3)

2.5 องค์ประกอบทางโภชนาการที่สำคัญในโคพีพอด

โคพีพอดมีองค์ประกอบทางโภชนการที่สำคัญ และเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตตามความต้องการของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Mckinnon et al., 2003) โดยโคพีพอดมีกรดไขมันอิ่มตัวสูงโดยเฉพาะ DHA, EPA, และ ARA ที่จำเป็นต่ออัตราการรอดสูงกว่าโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย (กรมประมง, 2559)

ตารางที่ 2: ปริมาณกรดไขมันในโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนแต่ละชนิด

Fatty acid (% Total FA)	*Nannochloropsis* sp.	*Chaetoceros* sp.	*Isochrysis sp.*	*Tetraselmis* sp.
n-3 HUFA	39.3	40.5	40.1	19.1
DHA	28.6	30.3	29.2	10
EPA	7.6	7.3	7.5	6.5
ARA	3.9	3.8	3.3	5.6
DHA:EPA:ARA	3.8:1.9:1	4.2:1.9:1	3.9:2.3:1	1.5:1.2:1

ตารางที่ 3: ปริมาณกรดไขมันในโคพีพอด โรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย

กรดไขมัน	% กรดไขมันทั้งหมด		
	โคพีพอด	**โรติเฟอร์**	**อาร์ทีเมีย**
n-3 HUFA	39.3-40.5	10.0-12.6	46.1-47.2
DHA	28.6-30.3	0.0-1.14	0
EPA	7.3-7.6	0.15-1.83	3.9-4.3
ARA	4.7-11.7	0.07-0.67	0.28-0.30

นอกจากนี้ยังพบว่าโคพีพอดมีสารอาหารอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่มีความสำคัญ และจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Yang and Hur,2014) อย่างไรก็ตามโคพีพอดมีการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอาจขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง (Lee et al., 2006)

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR หมายถึงปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของ DNA ชนิดใดชนิดหนึ่งได้ในหลอดทดลอง (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และธันยชัย สุระ,2534) ถูกคิดค้นขึ้นโดย Kary Mullis PCR มีความไวมากในการเพิ่มจำนวน DNA ที่มีปริมาณน้อยและใช้เวลาไม่นาน ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประโยชน์มาก (Debnath et al., 2010)

<u>หลักการของ PCR</u>

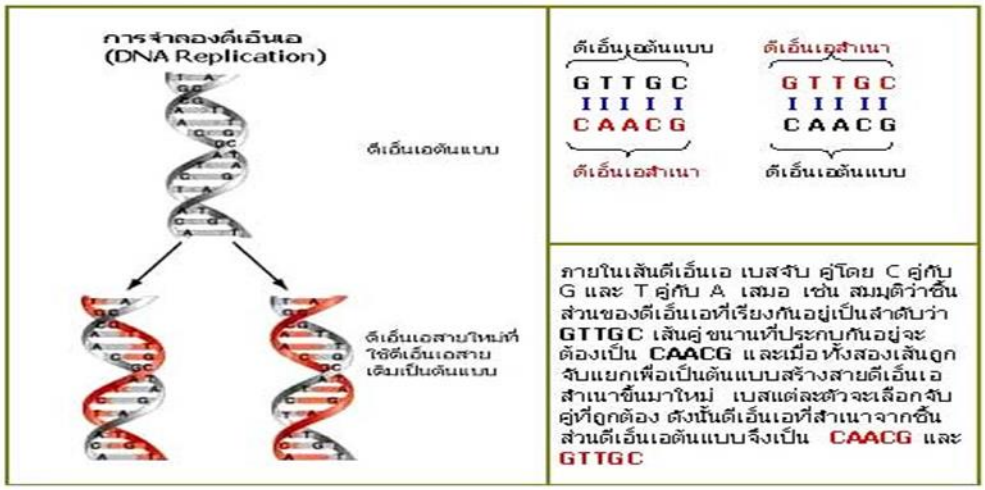
เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่เลียนแบบการสังเคราะห์ DNA ในธรรมชาติ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของ DNA ช่วงใดช่วงหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างส่วนของ DNA ที่ทราบลำดับเบสแล้ว เราเรียก DNA ส่วนที่ทราบลำดับเบสส่วนนี้ว่า primer เรียก DNA ที่เป็นต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณว่า template DNA หลักของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturing เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองประมาณ 91-96 องศาเซลเซียส template DNA สองสายที่พันกันเป็นเกลียวคู่ (double helix) จะแยกออกจากกัน กลายเป็น DNA สายเดี่ยว DNA สายเดี่ยวนี้จะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่

2. Primer annealing เมื่อลดอุณหภูมิในหลอดทดลองให้ต่ำลงเหลือ 50-55 องศาเซลเซียส primer จะจับกับ DNA สายเดี่ยว เรียกปฏิกิริยานี้ว่า primer annealing Primer จะจับกับ DNA สายเดี่ยวด้วยเบสที่

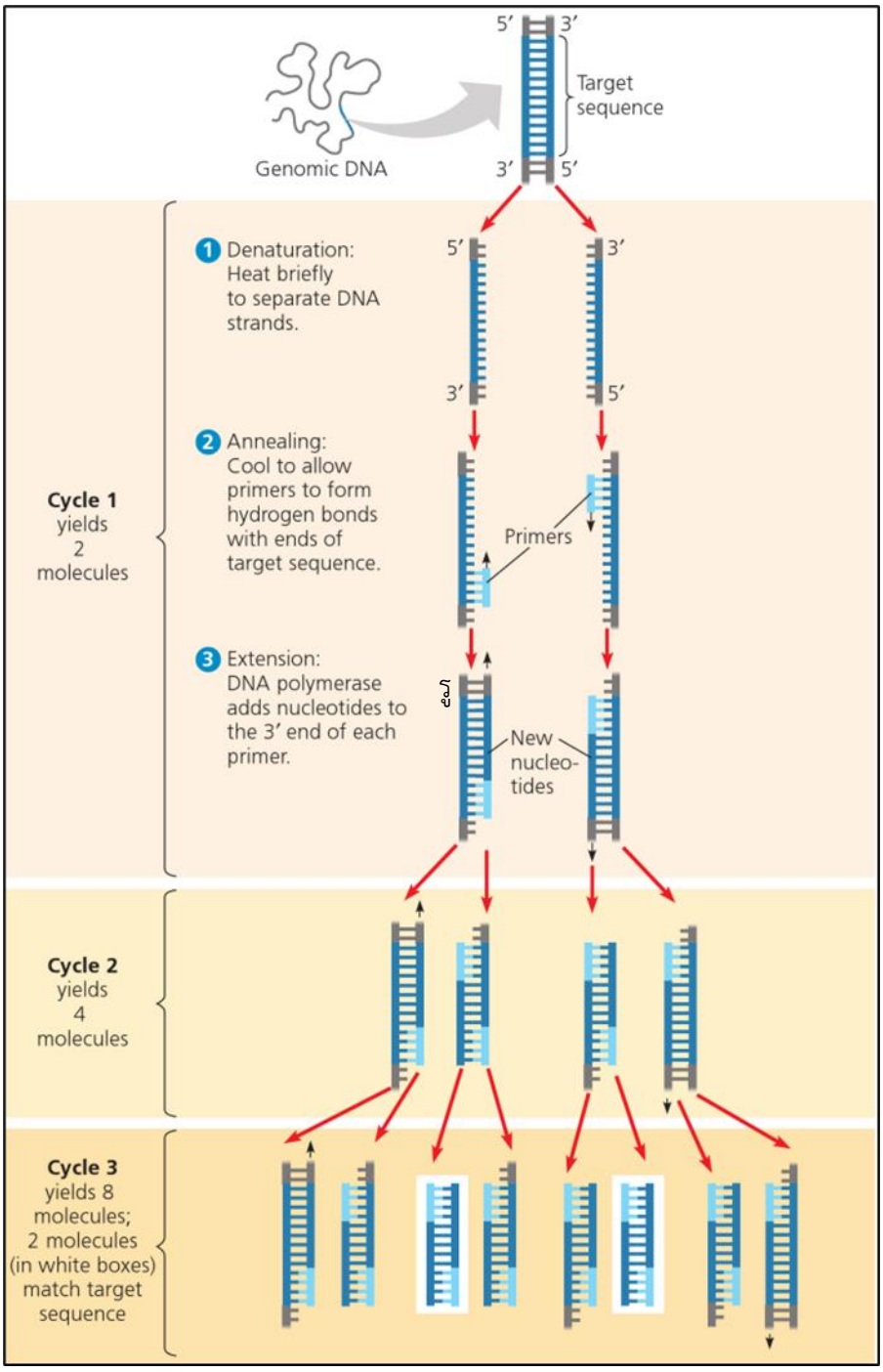
เป็นคู่สมกัน (complmentary) คือ adenine (A) จับกับ thymine (T) และ guanine (G) จับกับ cytosine (C)

3. Primer extension เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยมี DNA สายเดี่ยวเป็นต้นแบบ สร้างต่อออกไปจาก primer โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ทนความร้อนช่วยในการสร้าง DNA สายใหม่ และมีวัตถุดิบสำหรับการสร้าง DNA สายใหม่คือ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ซึ่งประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP อย่างละเท่าๆ กัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา primer extension คือ 70-75 องศาเซลเซียส primer จะถูกสร้างต่อไปในทิศทาง 5’ ไปหา 3’ และลำดับเบสของ DNA สายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกันกับเบสของ DNA สายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ (A=T,G=C) DNA สายใหม่จึงมีลักษณะ antiparallel กับ DNA ต้นแบบ



รูปที่ 5: การจำลองดีเอ็นเอ (DNA Replication)

(แหล่งที่มา: https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/thekhnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna)



รูปที่ 6: แสดงหลักการ Polymerase chain reaction

(แหล่งที่มา : https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/polymerase-chain-reaction-pcr.png)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่าง

3.1.1 โคพีพอด *Apocyclops royi*

3.1.2 *Chlorella sp.*

3.1.3 *Tetraselmis suecica*

3.2 สารเคมี

3.2.1 น้ำเกลือ 25 ppt

3.2.2 Trizol reagent

3.2.3 Chloroform

3.2.4 Isopropanol

3.2.5 70% Ethanol

3.2.6 Nuclease free water

3.2.7 5x reaction buffer

3.2.8 10mM dNTP mix

3.2.9 Ribolock

3.2.10 Revert Aid

3.2.11 OligodT

3.2.12 10X Taq.buffer + $(NH4)_2SO_4$

3.2.13 25 mM $MgCl_2$

3.2.14 1 mM dNTP

3.2.15 ArD4D_F

3.2.16 ArD4D_R

3.2.17 CopArEF1a _F

3.2.18 CopArEF1a _R

3.2.19 Aro3D_TH_F

3.2.20 Aro3D_TH_R

3.2.21 Aro3D_TW_F

3.2.22 Aro3D_TW_R

3.2.23 ArD5Da_F

3.2.24 ArD5Da_R

3.2.25 ArD5Db_F

3.2.26 ArD5Db_R

3.2.27 Taq (Thermo)

3.2.28 1X TBE

3.2.29 สีย้อม PCR Product

3.2.30 Agarose gel

3.2.31 Ethidium Bromine

3.2.32 water

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 auto-clave

3.3.2 ขวด Duran

3.3.3 ผ้ากรองขนาด 50-200 micron

3.3.4 ผ้ากรองขนาด 200-500 micron

3.3.5 ผ้ากรองขนาด 500-1000 micron

3.3.6 หัวทราย

3.3.7 สายยาง

3.3.8 ตู้เย็น

3.3.9 Micro tube 1.5 mL

3.3.10 เครื่อง centrifuge

3.3.11 เครื่องชั่งสาร

3.3.12 ขวดรูปชมพู่

3.3.13 เตาไมโครเวฟ (model Power Boost 900, HITASHI)

3.3.14 เครื่องชุดถ่ายภาพเจล ยี่ห้อ Syngene (U.K) รุ่น G.Box EF

3.3.15 Parafilm

3.3.16 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Nanodrop 2000c Spectrophotometer

3.3.17 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T100^{TM} Thermal Cycler

3.3.18 PCR tube with flat cap

3.3.19 High Speed Refrigerated Microcer

3.3.20 GELMATE TOYOBO electrophoresis

3.3.21 Vortex V-1 plus ยี่ห้อ biosan

3.3.22 Mini-Centrifuges ยี่ห้อ SCILOGEX รุ่น D1008

3.4 การดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi*

3.4.1.1 คัดเลือกโคพีพอด *Apocyclops royi*

3.4.1.2 แบ่งโคพีพอด *Apocyclops royi* เป็น 2 กลุ่ม นำมาเลี้ยงในน้ำเกลือเข้มข้น 25 ppt ปริมาตร 1000 mL โดยกลุ่มแรกให้อาหารเป็นสาหร่าย *Chlorella sp.* และกลุ่มที่สองให้อาหารเป็นสาหร่าย *Tetraselmis suecica* เป็นเวลา 10 วัน โดยเปลี่ยนน้ำ และเติมอาหารทุกๆ 2 วัน

3.4.2 การเก็บตัวอย่างโคพีพอด *Apocyclops royi*

3.4.2.1 ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง ทำการคัดแยกโคพีพอด *Apocyclops royi* 3 ระยะ ได้แก่ ระยะนอเพลียส ,ระยะโคพีพอดิด และระยะโตเต็มวัย โดยใช้ผ้ากรองขนาด 33 µm , 180 µm และ 250 µm ตามลำดับ

3.4.2.2 เลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi* แต่ละระยะในน้ำเกลือเข้มข้น 25 ppt โดยไม่ให้อาหาร เป็นเวลา 1 วัน

3.4.2.3 กรองโคพีพอด *Apocyclops royi* ทั้ง 3 ระยะ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโคพีพอด *Apocyclops royi* ลงหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 µL จากนั้นเติม Trizol reagent ปริมาตร 100 µL แล้วเก็บตัวอย่างแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ - 80 °C

3.4.3 การสกัด total RNA

3.4.3.1 บดตัวอย่างโคพีพอด *Apocyclops royi* จนละเอียด ถ่ายตัวอย่างใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 mL

3.4.3.2 เติม Trizol reagent 900 µL ลงในหลอด จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที

3.4.3.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บของเหลวใสส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่

3.4.3.4 เติมคลอโรฟอร์ม 200 µL นำไป vortex เป็นเวลา 2 นาที แล้ววางไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที

3.4.3.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที

3.4.3.6 ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่

3.4.3.7 เติม isopropanol 500 µL ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา 6 ครั้ง

3.4.3.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 80 °C เป็นเวลา 1 ชม.

3.4.3.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที

3.4.3.10 ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม 75% Ethanol 1,000 µL

3.4.3.11 นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 10 นาที

3.4.3.12 ดูดของเหลวใสส่วนที่เป็น Ethanol ทิ้ง และทำการเปิดฝาเพื่อระเหยของเหลวออกเป็นเวลา 5 นาที

3.4.3.13 ละลายตะกอน RNA ด้วยการเติม Nuclease Free Water ปริมาตร 20 µL

3.4.3.14 รอให้ตะกอนละลายประมาณ 10 นาที

3.4.3.15 นำไปวัดความเข้มข้น RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop

3.4.3.16 เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ – 80 ℃

3.4.4 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

3.4.4.1 นำ Total RNA 500 ng ที่แยกได้จากโคพีพอด *Apocyclops royi* มาสร้าง first-strand cDNA โดยผสมตามตาราง

ตัวอย่าง		**ความเข้มข้นของ RNA (ng/µL)**	**ปริมาณ RNA ที่ใช้ (µL)**	**ปริมาณน้ำใน kit (µL)**	**ปริมาณ OligodT (µL)**	**ปริมาณสุดท้าย (µL)**
อาหาร	**ระยะ**					
T. suecica	Nauplius	50.9	9.82	1.68	0.5	12
T. suecica	Copepodid	291.7	1.71	9.79	0.5	12
T. suecica	Adult	484.2	1.03	10.47	0.5	12
Chlorella sp.	Nauplius	69.9	7.15	4.35	0.5	12
Chlorella sp.	Copepodid	358.2	1.40	10.10	0.5	12
Chlorella sp.	Adult	175.6	2.85	8.65	0.5	12

3.4.4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 ℃ เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง PCR เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำแข็งอย่างน้อย 5 นาทีทันที

3.4.4.3 เตรียม master mix ตามตาราง

สาร	**จำนวนหลอด**	
	1x (µL)	**6x (µL)**
5x reaction buffer	4	24
10 mM dNTP mix	2	12
Ribolock	1	6
Revert Aid	1	6
ทั้งหมด (µL)	8	48

3.4.4.4 ปิเปต 8 µL master mix ลงในแต่ละตัวอย่าง

3.4.4.5 นำเข้าเครื่อง PCR โดยบ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที, 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที, 72 °C เป็นเวลา 15 นาที และ 12 °C เป็นเวลา 10 นาที

3.4.4.6 ปิเปตสารที่ได้ลงในไมโครทิวบ์หลอดละ 1.5 µL

3.4.4.7 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C

3.4.5 การทำปฏิกิริยา PCR

3.4.5.1 เจือจาง cDNA แต่ละตัวอย่างในอัตราส่วน 1:10

หลอดที่	**Sample**		**ปริมาตร cDNA (µL)**	**น้ำ (µL)**
	อาหาร	**ระยะ**		
1	*T. suecica*	Nauplius	1	9
2	*T. suecica*	Copepodid	1	9
3	*T. suecica*	Adult	1	9
4	*Chlorella sp.*	Nauplius	1	9
5	*Chlorella sp.*	Copepodid	1	9
6	*Chlorella sp.*	Adult	1	9

3.4.5.2 เตรียม master mix ของ ArD4D ลงในหลอด PCR

สารเคมี	**1X (µL)**
H_2O	10.3
10XTaq.buffer + $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
ArD4D_F	2.5
ArD4D_R	2.5
Taq (Thermo)	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	3
ปริมาตรรวม	**25**

3.4.5.3 เตรียม master mix ของ CopArEF1a ลงในหลอด PCR

สารเคมี	**1X (µL)**
H_2O	10.3
10XTaq.buffer + $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
CopArEF1a _F	2.5
CopArEF1a _R	2.5
Taq (Thermo)	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	3
ปริมาตรรวม	**25**

3.4.5.4 เตรียม master mix ของ Aro3D_TH ลงในหลอด PCR

สารเคมี	**1X (µL)**
H_2O	10.3
10XTaq.buffer + $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
Aro3D_TH_F	2.5
Aro3D_TH_R	2.5
Taq (Thermo)	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	3
ปริมาตรรวม	**25**

3.4.5.5 เตรียม master mix ของ Aro3D_TW ลงในหลอด PCR

สารเคมี	**1X (µL)**
H_2O	10.3
10XTaq.buffer + $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
Aro3D_TW_F	2.5
Aro3D_TW_R	2.5
Taq (Thermo)	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	3
ปริมาตรรวม	**25**

3.4.5.6 เตรียม master mix ของ AroD5Da ลงในหลอด PCR

สารเคมี	**1X (µL)**
H_2O	10.3
10XTaq.buffer + $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
AroD5Da_F	2.5
AroD5Da_R	2.5
Taq (Thermo)	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	3
ปริมาตรรวม	**25**

3.4.5.7 เตรียม master mix ของ AroD5Db ลงในหลอด PCR

สารเคมี	**1X (µL)**
H_2O	10.3
10XTaq.buffer + $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
AroD5Db_F	2.5
AroD5Db_R	2.5
Taq (Thermo)	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	3
ปริมาตรรวม	**25**

3.4.5.8 ทำ PCR ของยีน CopArEF1a โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ (^{o}C)**	**เวลา**	**จำนวนรอบ**
Initial denaturation	94	1 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	25 cycle
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Post amplification	72	5 นาที	

3.4.5.9 ทำ PCR ของยีน ArD4D โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	1 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	30 cycle
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Post amplification	72	5 นาที	

3.4.5.10 ทำ PCR ของยีน AroD5Da และ AroD5Db โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	1 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	28 cycle
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Post amplification	72	5 นาที	

3.4.5.11 ทำ PCR ของยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	1 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	32 cycle
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Post amplification	72	5 นาที	

3.4.6 การวิเคราะห์ PCR product ใน agarose gel electrophoresis

3.4.6.1 เตรียม agarose gel 1.5% ปริมาตร 50 mL โดยใช้ 1XTBE เป็นตัวทำละลาย

3.4.6.2 ย้อม PCR product 8 µL ด้วยสีย้อม 1.5 µL

3.4.6.3 หยด PCR product ที่ย้อมสีแล้วบน agarose gel

3.4.6.4 หยด Gene Ruler 100 bp Plus ซึ่งใช้เป็น marker 3 µL บน agarose gel

3.4.6.5 รันเจลโดยใช้เครื่อง electrophoresis ความต่างศักย์ 100 V เป็นเวลา 30 นาที

3.4.6.6 นำแผ่นเจลมาย้อมสีด้วย ethidium Bromine เป็นเวลา 1 นาที

3.4.6.7 นำแผ่นเจลแช่น้ำเป็นเวลา 10 นาที

3.4.6.8 ตรวจสอบแถบยีนด้วยเครื่องชุดถ่ายภาพเจล ยี่ห้อ Syngene (U.K) รุ่น G.Box EF

3.4.7 การวัดค่าการแสดงออกของยีน

3.4.7.1 นำแถบแบนที่ได้ไปวัดค่าการแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis

3.4.7.2 คำนวณค่าการแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression) ของยีน ArD4D, AroD5Da, AroD5Db, Aro3D_TH และ Aro3D_TW จากสูตร

$$\text{Relative mRNA expression} = \frac{\text{ค่าการแสดงออกของยีน}}{\text{ค่าการแสดงออกของยีน } \mathbf{CopArEF1\alpha}}$$

3.4.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในทุกๆขั้นตอน ใช้วิการวิเคราะห์ Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การคำนวณแบบ Duncan’s multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS statistical package version 22.0

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาจำนวนโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* และสาหร่าย *Tetraselmis suecica* เป็นระยะเวลา 10 วัน

จากการศึกษาการเลี้ยงโคพีพอด *A. royi* ด้วยสาหร่าย 2 ชนิด เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยได้ทำการนับจำนวนของโคพีพอด พบว่าเริ่มต้นการทดลองโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* และสาหร่าย *Tetaselmis suecica* มีจำนวนเท่ากันคือ 2,100 ตัวต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงโคพีพอดด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* วันที่ 3 และ 10 ของการทดลองมีจำนวนโคพีพอด เท่ากับ 4,000 และ 21,200 ตัวต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงโคพีพอดด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และทำการนับวันที่ 3 และ 10 ของการทดลองพบว่ามีจำนวนโคพีพอด เท่ากับ 3,600 และ 24,600 ตัวต่อลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4: แสดงจำนวนโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* และสาหร่าย *Tetaselmis suecica* เป็นระยะเวลา 10 วัน

วันที่ทำการทดลอง	*Chlorella sp.* (ตัว/ลิตร)	*Tetaselmis suecica* (ตัว/ลิตร)
0	2,100	2,100
3	4,000	3,600
10	21,200	24,600

4.2 การสกัด RNA ของโคพีพอด *Apocyclops royi*

ผลจากการสกัด RNA และการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ที่สกัดจากโคพีพอด *Apocyclops royi* ในแต่ละระยะที่เลี้ยงด้วยอาหาร 2 ชนิด ประกอบด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* และสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และทำการวิเคราะห์หาค่า A260/280 เพื่อหาปริมาณ และตรวจสอบค่าความบริสุทธิ์ RNA ผลพบว่า RNA ที่สกัดได้จากโคพีพอด ระยะ Nauplius ระยะ Copepodid และระยะ Adult ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* จะมีความเข้มข้นสูงเท่ากับ 50.9 ng/µL, 291.7 ng/µL และ 484.2 ng/µL ตามลำดับ ในขณะที่โคพีพอด ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* พบว่าในระยะ Nauplius ระยะ Copepodid และระยะ Adult จะมีความเข้มข้นสูงเท่ากับ 69.9 ng/µL, 358.2ng/µL และ 175.6ng/µL ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อวิเคราะห์ค่า A260/280 พบว่า RNA ในทุกระยะของโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 1.80 – 2.11 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า RNA ที่สกัดได้ มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

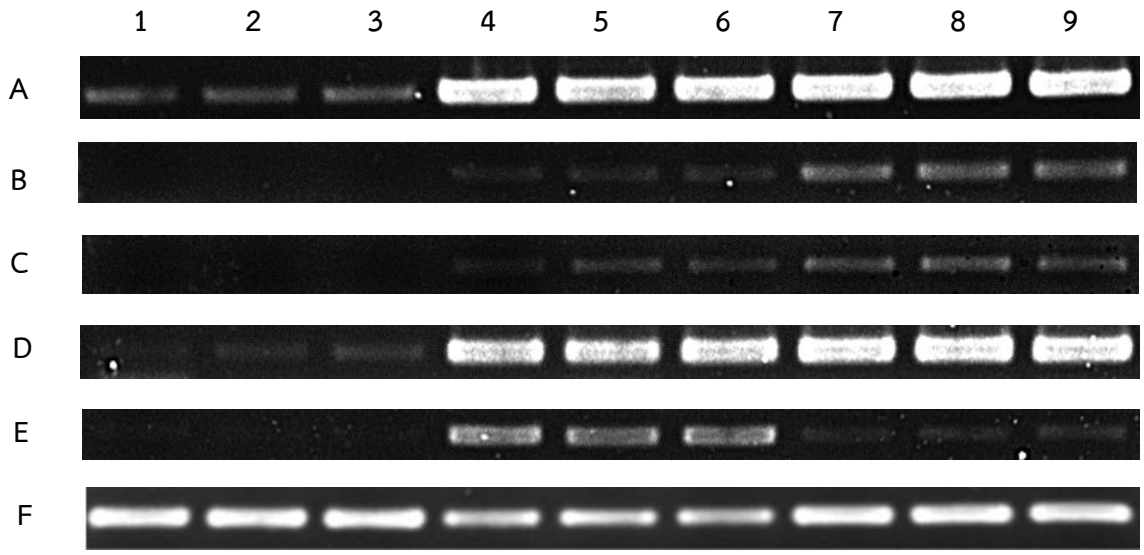
ตารางที่ 5: ความเข้มข้นของ RNA ของโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยอาหาร 2 ชนิด

Sample		Nucleic Acid Conc. (ng/µL)	A260	A280	260 / 280
ระยะโคพีพอด	อาหาร (สาหร่าย)				
Nauplius	*T. suecica*	50.9	1.273	0.705	1.80
Copepodid	*T. suecica*	291.7	7.294	3.929	1.86
Adult	*T. suecica*	484.2	12.104	5.746	2.11
Nauplius	*Chlorella sp.*	69.9	1.748	0.866	2.02
Copepodid	*Chlorella sp.*	358.2	8.956	4.561	1.96
Adult	*Chlorella sp.*	175.6	4.389	2.438	1.80

4.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

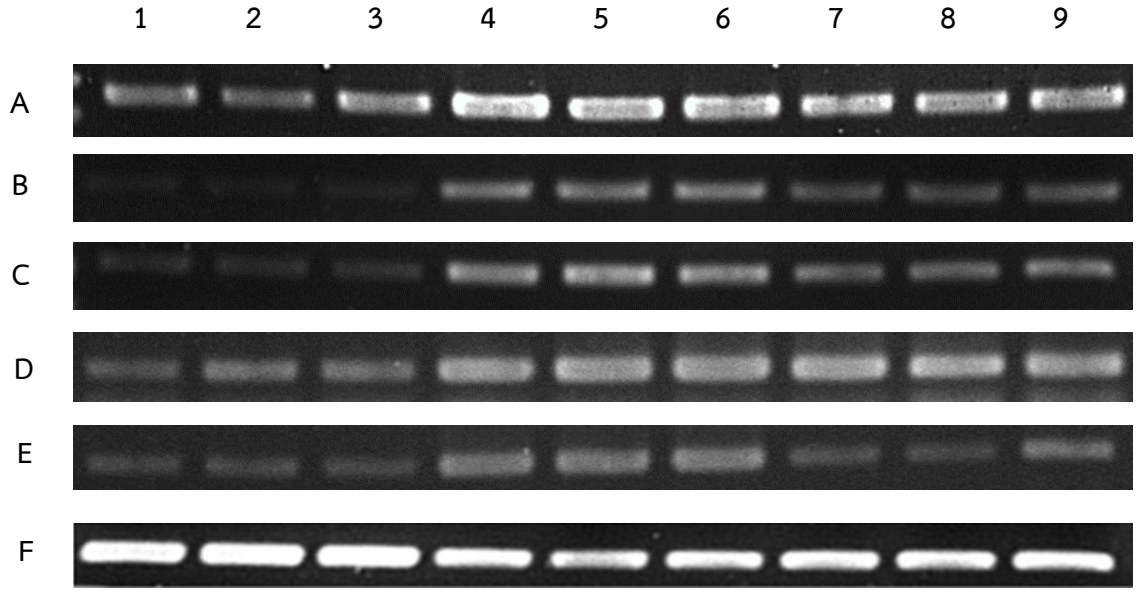
จากการศึกษาการแสดงออกของยีน fatty acid desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) ของโคพีพอด *Apocyclops royi* จำนวน 5 ยีน ประกอบด้วยยีน Delta-4 desaturase (ArD4D), Delta-5 desaturase a (ArD5Da), Delta-5 desaturase b (ArD5Db), Omega-3 desaturase_Thailand (Aro3D_TH) และ Omega-3 desaturase_Taiwan (Aro3D_TW) โดยใช้ยีน Elongation factor 1-alpha (CopArEF1a) เป็นยีนควบคุม โดยศึกษาแสดงออกในโคพีพอด *A. royi* ทั้ง 3 ระยะพัฒนาการ ประกอบด้วย (1) โคพีพอดระยะ Nauplius (2) โคพีพอดระยะ Copepodid และ (3) โคพีพอดระยะ Adult ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และ สาหร่าย *Chlorella sp*

โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน ArD4D , ยีน ArD5Da , ยีน ArD5Db , ยีน Aro3D_TH , และยีน Aro3D_TW แสดงดังรูปที่ 7A, 7B, 7C, 7D, และ 7E ตามลำดับ มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* ในขณะที่ยีน Elongation factor 1-alpha (CopArEF1a) มีการแสดงออกในโคพีพอด ทั้ง 3 ระยะพัฒนาการ (7F) จากผลแสดงให้เห็นว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคพีพอดทั้ง 5 ยีน มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาการของโคพีพอดเมื่อเปรียบเทียบกับยีนควบคุมเมื่อเลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica*



รูปที่ 7: ผลการทำ RT-PCR ของยีน ArD4D (A), ArD5Da (B), ArD5Db (C), Aro3D_TH (D), Aro3D_TW (E), และ CopArEF1a (F) ของตัวอย่างโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* โดยโคพีพอดระยะ Nauplius ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3; โคพีพอดระยะ Copepodid ตัวอย่างที่ 4, 5, และ6; โคพีพอดระยะ Adult ตัวอย่างที่ 7, 8, และ 9

ผลของการแสดงออกของยีนในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp*. พบว่าการแสดงออกของยีน ArD4D , ยีน ArD5Da , ยีน ArD5Db , ยีน Aro3D_TH , และยีน Aro3D_TW แสดงดังรูปที่ 8A, 8B, 8C, 8D, และ 8E ตามลำดับ มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi* (โคพีพอดระยะ Nauplius, ระยะ Copepodid และ ระยะ Adult) โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน CopArEF1a แสดงดังรูปที่ 8F ซึ่งใช้เป็นยีนควบคุม มีการแสดงออกในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* ทั้ง 3 ระยะ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีนที่ทำการศึกษาทั้ง 5 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน มีระดับการแสดงออกแตกต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาการของโคพีพอดทั้ง 3 ระยะ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับยีนควบคุมเมื่อเลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*



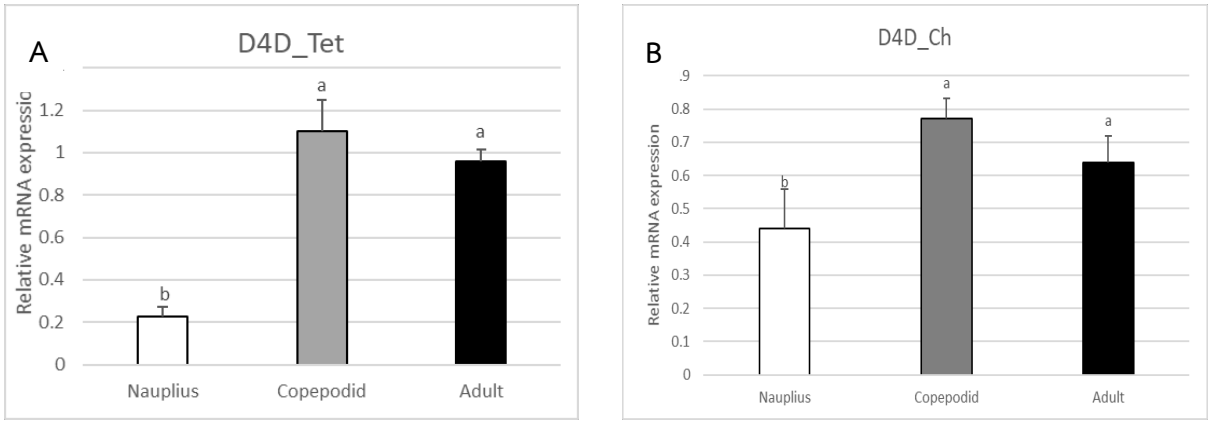
รูปที่ 8: ผลการทำ RT-PCR ของยีน ArD4D (A), ArD5Da (B), ArD5Db (C), Aro3D_TH (D), Aro3D_TW (E), และ CopArEF1a (F) ของตัวอย่างโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* โดยโคพีพอดระยะ Nauplius ตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3; โคพีพอดระยะ Copepodid ตัวอย่างที่ 4, 5, และ6; โคพีพอดระยะ Adult ตัวอย่างที่ 7, 8, และ 9

4.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน fatty acid desaturase ในโคพีพอด *A. royi*

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ArD4D ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* พบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติการแสดงออกของยีน ArD4D ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในโคพีพอดระยะ Adult และโคพีพอดระยะ Copepodid ($P \geq 0.05$) ในขณะที่โคพีพอดระยะ Nauplius มีค่าการแสดงออกของยีนน้อยกว่าโคพีพอดระยะ Adult และ ระยะ Copepodid อย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

ในส่วนผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ArD4D ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chorella sp.* พบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติการแสดงออกของยีน ArD4D ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระยะ Adult และระยะ Copepodid ($P \geq 0.05$) และการแสดงออกของยีน ArD4D ในโคพีพอดระยะ Nauplius มีค่าการแสดงออกของยีนน้อยกว่าระยะ Adult และ ระยะ Copepodid อย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

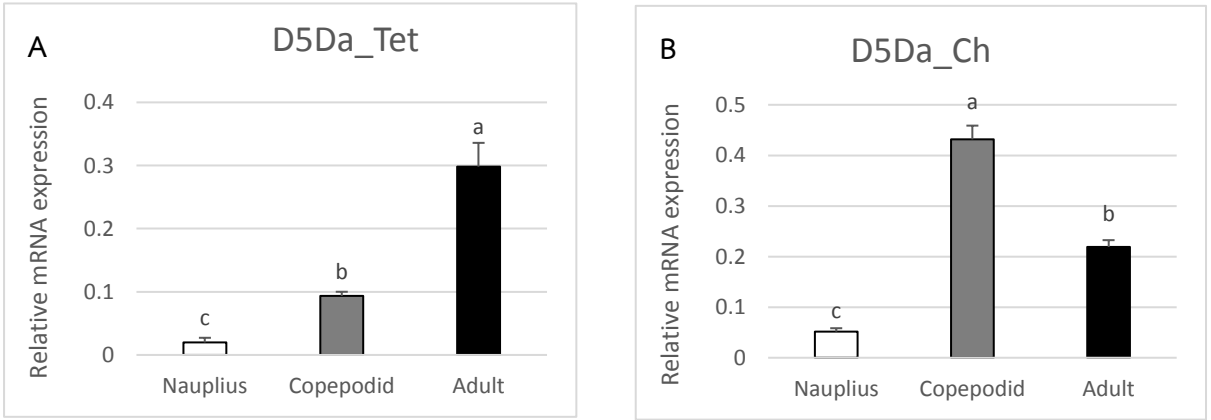
จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน ArD4D มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอดระยะ Copepodid และ ระยะ Adult มากกว่าในระยะ Nauplius ของโคพีพอด

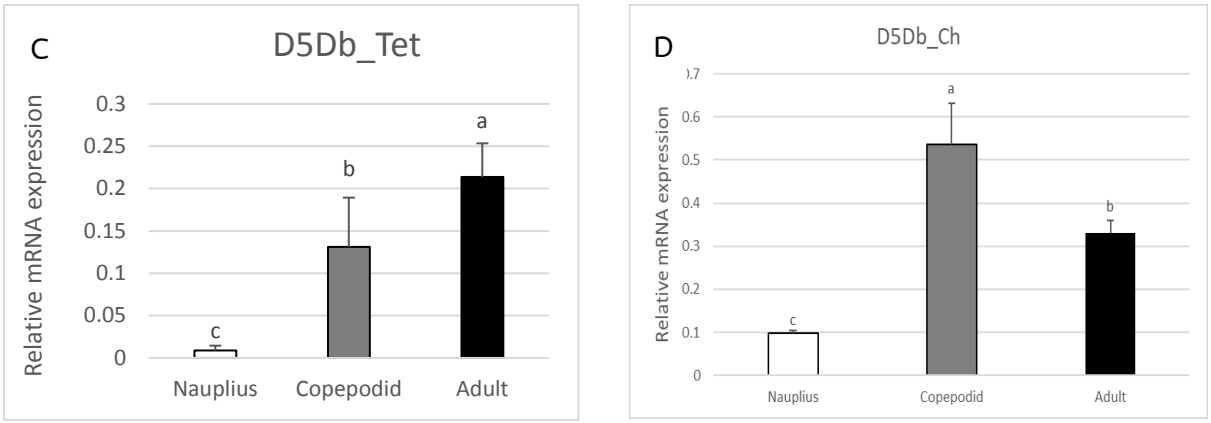


รูปที่ 9: การแสดงออกของยีน ArD4D (A) ตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* (B) ตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*

ผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ArD5Da และ ArD5Db ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในทั้ง 3 ระยะพัฒนาการของโคพีพอด โดยโคพีพอดระยะ Adult มีค่าการแสดงออกของยีนสูงสุด รองลงมาคือโคพีพอดระยะ Copepodid และโคพีพอดระยะ Nauplius ตามลำดับ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน ArD5Da และ ArD5Db มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามระยะพัฒนาการของโคพีพอด แสดงว่ายีนทั้งสองยีนอาจจะมีความสำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน

ในส่วนผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ArD5Da และ ArD5Db ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chorella sp.* พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในทั้ง 3 ระยะพัฒนาการของโคพีพอด โดยโคพีพอดระยะ Copepodid มีค่าการแสดงออกของยีนสูงสุด รองลงมาคือโคพีพอดระยะ Adult และ โคพีพอดระยะ Nauplius ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน ArD5Da และ ArD5Db มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอดระยะ Copepodid มากกว่า ระยะ Adult และระยะ Nauplius ของโคพีพอด ตามลำดับ



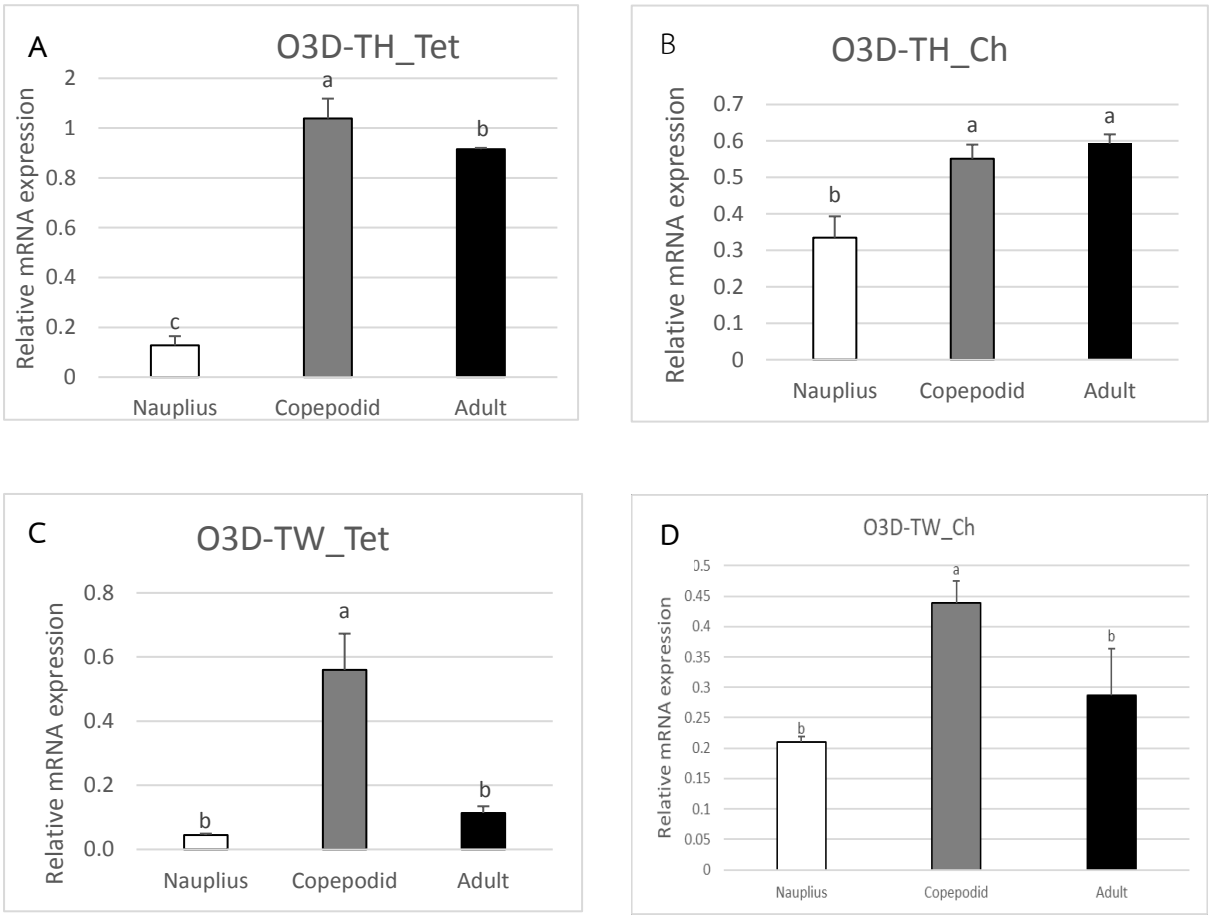


รูปที่ 10: การแสดงออกของยีน ArD5Da และ ArD5Db (A) การแสดงออกของยีน ArD5Da ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* (B) การแสดงออกของยีน ArD5Da ของตัวอย่างโคพี*พอด A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* (C) การแสดงออกของยีน ArD5Db ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* (D) การแสดงออกของยีน ArD5Db ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*

เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในทั้ง 3 ระยะพัฒนาการของโคพีพอด โดยโคพีพอดระยะ Copepodid จะมีค่าการแสดงออกของยีนสูงสุด รองลงมา คือ โคพีพอดระยะ Adult และโคพีพอดระยะ Nauplius ตามลำดับ ซึ่งจากผลแสดงให้เห็นว่ายีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอดระยะ Copepodid และ ระยะ Adult มากกว่าในระยะ Nauplius ของโคพีพอด

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* พบว่าจากการวิเคราะห์ทางสถิติการแสดงออกของยีน Aro3D_TH ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระยะ Adult และโคพีพอดระยะ Copepodid ($P \geq 0.05$) ในขณะที่โคพีพอดระยะ Nauplius มีค่าการแสดงออกของยีนน้อยกว่าโคพีพอดระยะ Adult และ ระยะ Copepodid อย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) ในส่วนผลจากการวิเคราะห์ทางสถิติการแสดงออกของยีน Aro3D_TW ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระยะ Adult และโคพีพอดระยะ Nauplius ($P \geq 0.05$) ในขณะที่โคพีพอดระยะ Adult และโคพีพอดระยะ Nauplius มีค่าการแสดงออกของยีนน้อยกว่าโคพีพอดระยะ Copepodid อย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) จากผลแสดงให้เห็นว่ายีน Aro3D_TH ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามระยะพัฒนาการของโคพีพอด และยีน Aro3D_TW มีความสำคัญ

ต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอดระยะ Copepodid มากกว่า ระยะ Adult และระยะ Nauplius ของโคพีพอด



รูปที่ 11: การแสดงออกของยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW (A) การแสดงออกของยีน Aro3D_TH ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* (B) การแสดงออกของยีน Aro3D_TH ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* (C) การแสดงออกของยีน Aro3D_TW ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* (D) การแสดงออกของยีน Aro3D_TW ของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*

จากผลการทดลองการแสดงออกของยีน ArD4D ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทในการเปลี่ยน กรดไขมัน omega 3 DPA เป็นกรดไขมัน DHA ซึ่งยีน ArD4D มีการแสดงออกในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* เนื่องจากในสาหร่าย *T.suecica* มีปริมาณกรดไขมัน DPA 4.15% (Pan Y.-J. et al.) ปริมาณของ DPA ส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ delta4-desaturase นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ได้จากโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ซึ่งมีปริมาณกรดไขมัน DHA 10% (กรมประมง ,2559)

จากผลการทดลองการแสดงออกของยีน ArD5Da และ ArD5Db ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนกรดไขมัน DGLA ไปเป็นกรดไขมัน ARA และ เปลี่ยนกรดไขมัน LA เป็นกรดไขมัน GLA ซึ่งยีน ArD5Da และ ArD5Db มีการแสดงออกน้อยในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* สอดคล้องงานวิจัยของปวีณาและคณะ(2563) พบว่า โคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T.suecica* มีปริมาณ ARA เพียง 0.68% และยีน ArD5Da และ ArD5Db มีการแสดงออกในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella sp.* มีปริมาณกรดไขมัน LA และ ALA สูง ซึ่งอาจส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ omega3-desaturase ในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*

จากผลการทดลองการแสดงออกของยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนกรดไขมัน ARA เป็น EPA และเปลี่ยนกรดไขมัน LA เป็น ALA ซึ่งยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW มีการแสดงออกในตัวอย่าง *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp*. พบว่ามีปริมาณ EPA สูงถึง 65%(กรมประมง ,2559) นอกจากนี้จากงานวิจัยของปวีณา และคณะ (2563) พบว่าในสาหร่าย *T. suecica* มีปริมาณ LA และ GLA สูงถึง 14.84% และ 16.26% ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของ LA และ GLA นี้อาจส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ omega3-desaturase เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยีน Aro3D_TH และ Aro3D_TW มีการแสดงออกในตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* เนื่องจากสาหร่าย *Chlorella sp.* มีปริมาณกรดไขมัน LA สูง ซึ่งอาจส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ omega3-desaturase ในตัวอย่าง โคพีพอด *A. royi*

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ผลจากการทดลองการเลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi* ด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.* เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยการเก็บเกี่ยวผลผลิตโคพีพอด 0.5 เปอร์เซ็นของปริมาณการเลี้ยง วันที่ 3 และ 10 ของการทดลอง พบว่า การเลี้ยงโคพีพอดด้วยสาหร่าย *Tetaselmis suecica* ทำให้โคพีพอด *Apocyclops royi* มีความหนาแน่นของประชากรสุดท้ายมากกว่าโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*

จากการศึกษายีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.* พบว่ายีน ArD4D, ArD5Da, ArD5Db, Aro3D_TH และ Aro3D_TW มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi* ซึ่งการแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนมีการแสดงออกสูงในระยะ Copepodid และระยะ Adult โดยยีน ArD5Da และยีน ArD5Db ของโคพีพอดที่เลี้ยงด้วย *Chlorella sp.* มีความสำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอดระยะ Copepodid ในขณะที่ยีน ArD5Da, ArD5Db ของโคพีพอดที่เลี้ยงด้วย *T. suecica* มีการแสดงออกเพิ่มตามพัฒนาการ ซึ่งเป็นข้อมูลใหม่ของการศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคพีพอด *A. royi* ด้วยเหตุนี้จึงสรุปได้ว่าโคพีพอด *A. royi* ที่เพาะเลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* มีการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงกว่าโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.* ซึ่งงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าชนิดของอาหารมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในโคพีพอด *A. royi* โดยจะเป็นข้อมูลที่จะมีประโยชน์สำหรับระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและสามารถประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมน้ำมันปลาในอนาคตได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันในโคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* และสาหร่าย *Chlorella sp.*

5.2.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันที่มีการถ่ายทอดจากสาหร่ายไปยังโคพีพอด

เอกสารอ้างอิง

กมลศิริ พันธนียะ. การเพาะเลี้ยงโคพีพอด (Copepod) . [ออนไลน์]. 2555. แหล่งที่มา:

http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id=508:2012-02-21-08-28-35&catid=39:2012-02-20-02-59-03&Itemid=121 [1 เมษายน 2563]

กรมประมง. การเพาะเลี้ยงโคพิพอดในบ่อดิน. [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา:

https://www4.fisheries.go.th/index.php/dof/activity_item/89 [1 กันยายน 2563]

กรมประมง. ข้อมูลพื้นฐานของโคพีพอด. [ออนไลน์]. 2559. แหล่งที่มา:

https://www.fisheries.go.th/cf-phuket/New/images/x.compressed.pdf [5 กันยายน 2563]

ธีระวัฒน์ รัตนพจน์, เกรียงศักดิ์ เม่งอ้าพัน, สุดาพร ตงศิริ และดวงพร อมรเลิศพิศาล. องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปลาน้ำจืดและผลของประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตในปลานิล. วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 35(2) (พิเศษ): 11-20.

ปวีณา ตปนียวรวงศ์, อภิญญา อยู่สบาย, ปรารถนา ปานทอง, ปาริชาติ ชุมทอง, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ และมะลิวัลย์ คุตะโค. (2563). องค์ประกอบกรดไขมันของไซโคลพอยด์โคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายชนิดแตกต่างกัน. แก่นเกษตร. 48 ฉบับพิเศษ (1): 101-108.

พงศธร จันทรัตน์. (2557). การเพาะเลี้ยงโคพีพอด เพื่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในโรงเพาะฟัก. วารสารเกษตร 31(2): 225 – 239.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และคณะ. (2010). Polyunsaturated fatty acid / กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายอัน.[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:
http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/001642/polyunsaturated-fatty-acid [1 กันยายน 2563]

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. น้ำมันปลา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/6582/fish-oil-%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%9B%E0%B8%A5%E0%B8%B2 [8 กันยายน 2563]

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. การสังเคราะห์กรดไขมันโอเมก้า-3. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2558/anim50558skm_ch2.pdf [7 กันยายน 2563]

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และธันยชัย สุระ. ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์ Polymerase Chain Reaction. วารสารโลหิตวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2534(4): 469-476

Beermann, C., J Jelinek, J., T Reinecker, T., A Hauenschild, A., G Boehm, G. and H-U Klör, H.U. (2003). Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. Lipids in Health and Disease. 2:10.

Dahm, H.U. (2000). Phylogenetic implications of the Crustacean Nauplius. Advance in copepod taxonomy. Hydrobiologia. 417: 91-99.

Debnath, M., Prasad, G., and Bisen, P.S. (2010). Molecular diagnostics. Dordrech Heidelberg London: Springer.

Farhadian, O., Yusoff, F.M. and A. Arshad, A. (2007). Ingestion rate of postlarvae Penaeus monodon fed *Apocyclops dengizicus* and Artemia. Aquaculture. 269: 265-270.

Gregory, M.K., Gibson, R.A., Cook-Johnson R.J., Cleland, L.G., and James, M.J. (2011) Elongase reactions as control points in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis. PLoS ONE 6(12): 1-9.

Jeong, S.E., Rosenfield, C.L., Marsella-Herrick, P., You, K.M., and Knipple, D.C. (2003). Multiple acyl-CoA deasturase-encoding transcripts in pheromone glands of Helvicoverpa assulta, the oriental tobacco budworm. Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 609–622.

Juntarut, P. (2014). Roles of copepods in larviculture. KKU Res. J. 49(6); 939-949

Lee, K.W., Park, H.G., and Lee,S.M. (2006). Effects of diets on the growth of the brackish water cyclopoid copepod Paracyclopina nana Smirnov. Aquaculture. 256: 346-353

McKinnon, A. D., S. Duggan, S., Nichols, P.D., Rimmer, M.A, Semmen, G. and Robino, B. (2003). The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. Aquaculture. 223: 89-106.

Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadi, A., Sperling, P., Bauer, J., Cirpus, P., Zank, T.K., Moreau, H., Roscoe, T.J., Zähringer, U., and Heinz, E. (2004). Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. J. Lipid Res. 45: 1899–1909.

Olivotto, I., N. E. Tokle, N.E., V. Nozzi, V., L. Cossignani, L., and O. Carnevali, O. (2010). Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: A feeding study. Aquaculture. 308:124-131.

Okuyama, H., Orikasa, Y., Nishida, T., and Morita N. (2007) Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression. Appl Environ Microbiol. 73: 665–670.

OSOTH INTER LABORATORIES. Omega-3. [Online]. 2019. Available from:

https://osi.co.th/%E0%B8%A1%E0%B8%B2%E0%B8%97%E0%B8%B3%E0%B8%84%E0%B8%A7%E0%B8%B2%E0%B8%A1%E0%B8%A3%E0%B8%B9%E0%B9%89%E0%B8%88%E0%B8%B1%E0%B8%81%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B8%9A%E0%B9%82%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%81/ [2020, September 1]

Oura T., and Kajiwara S. (2004). Saccharomyces kluyveri FAD3 encodes an **ω**3 fatty acid desaturase. Microbiology. 150: 1983–1990.

Pan, Y. J., I. Sadovskaya, I., J. S. Hwang, J.S., and S. Souissi, S.(2018). Assessment of the fecundity, population growth and fatty acid composition of *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda) fed on different microalgal diets. Aquaculture Nutrition. 24(2018): 970-978.

Pereira, S.L., Leonard, A.E., and Mukerji, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. Prostag. Leukotr. Ess. 68: 97–106.

Sargent, J.R., Tocher, D.R., and Bell, J.G. (2002). The lipids. In: Fish Nutrition (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds). San Diego: Academic Press.

Sprecher H. (2000). Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. Biochim. Biophys. Acta 1486: 219-231.

Tapaneeyaworawong, P., Prasopwong, A., Kutako, M. and Powtongsook, S. (2019). Growth of copepod *Apocyclops royi* (Lindberg, 1940) fed with *Tetraselmis suecica* and *Thalassiosira sp.* in semi-continuous and continuous culture systems. Khon Kaen Agr.J. 47:305-312

Torsseiliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., and Bergot, P. (2003). Cloning and nutritional regulation of a D6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (Sparus aurata). Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 135: 449–460.

Torstensen, B.E., and Tocher, D.R. (2010). The effects of fish oil replacement on lipid metabolism of fish. In: Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds (Turchini, G.M., Ng, W.K. & Tocher, D.R. eds). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis group.

Wang, M., Chen, H., Gu, Z., Zhang, H., Chen, W., Chen, Y-Q. (2013). **ω**3 fatty acid desaturases from microorganisms: structure, function, evolution, and biotechnological use. Appl Microbiol Biotechnol. 97: 10255–10262.

Yen-Ju Pan, Anissa Souissi, Sami Souissi, Jiang-Shiou Hwang. (2016). Effects of salinity on the reproductive performance of *Apocyclops royi* (Copepoda, Cyclopoida). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 475: 108-113.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ก.1 การแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro Analyzer

ตารางที่ 1 การแสดงของยีนของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica*

ยีน	ระยะ								
	Nauplius			Copepodid			Adult		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ArD4D	55.19	43.048	63.643	227.33	202.33	230.33	203.05	238.83	233.31
ArD5Da	4.1667	6.619	3.3095	18.952	18.667	18.595	77.476	67.952	63.762
ArD5Db	2.6905	3.0238	0.54762	13.238	33.762	31.452	43.643	62.238	44.714
Aro3D_TH	21.452	30.238	39.167	209	206.79	208.33	206.55	220.4	216.38
Aro3D_TW	10.143	11.786	9.9048	130.62	91.31	113.71	20.619	28.214	31.167
CopArEF1a	235.93	236.55	238.19	205.9	212.4	184.76	227.14	239.74	235.9

ตารางที่ 2 การแสดงของยีนของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*

ยีน	ระยะ								
	Nauplius			Copepodid			Adult		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ArD4D	97.6	78.125	131.73	184.75	173.97	158.93	170.25	145.38	136.9
ArD5Da	13.3	10.325	12.575	92.875	96.1	100.88	51.675	48.3	54.975
ArD5Db	23.025	21.975	24.025	105.98	136.85	116.6	74.475	73.65	86.375
Aro3D_TH	62.975	88.425	83.225	124.55	127.07	118.32	140.4	144.63	133.95
Aro3D_TW	50.15	50.85	46.575	92.325	100.8	100.7	61.125	53.5	88.65
CopArEF1a	235	234.63	231.55	231.82	213.55	226.88	233.93	235.8	237.53

ก.2 ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression)

ตารางที่ 3 ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีนของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica*

ยีน	ระยะ								
	Nauplius			Copepodid			Adult		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ArD4D	0.23393	0.18198	0.26719	1.10408	0.95259	1.24664	0.89394	0.99620	0.98902
ArD5Da	0.01766	0.02798	0.01389	0.09204	0.08789	0.10064	0.34109	0.28344	0.27029
ArD5Db	0.01140	0.01278	0.00230	0.06429	0.15895	0.17023	0.19214	0.25961	0.18955
Aro3D_TH	0.09093	0.12783	0.16444	1.01506	0.97359	1.12757	0.90935	0.91933	0.91725
Aro3D_TW	0.04299	0.04982	0.04158	0.63439	0.42990	0.61545	0.09078	0.11769	0.13212
CopArEF1a	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000

ตารางที่ 4 ค่าการคำนวณการแสดงออกของยีนของตัวอย่างโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chlorella sp.*

ยีน	ระยะ								
	Nauplius			Copepodid			Adult		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ArD4D	0.41532	0.33297	0.56891	0.79695	0.81466	0.70050	0.72778	0.61654	0.57635
ArD5Da	0.05660	0.04401	0.05431	0.40063	0.45001	0.44464	0.22090	0.20483	0.23144
ArD5Db	0.09798	0.09366	0.10376	0.45717	0.64083	0.51393	0.31836	0.31234	0.36364
Aro3D_TH	0.26798	0.37687	0.35943	0.53727	0.59504	0.52151	0.60018	0.61336	0.56393
Aro3D_TW	0.21340	0.21672	0.20114	0.39826	0.47202	0.44385	0.26130	0.22689	0.37322
CopArEF1a	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000

ก.3 ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน(PUFA) ในสาหร่าย *Chlorella sp.* และ *Tetraselmis suecica*

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน(PUFA) ในสาหร่าย *Chlorella sp.* และ *Tetraselmis suecica*

Fatty acid	*Chlorella sp.*	*Tetraselmis suecica*
n-3 PUFA		
C18: 3n-3 (ALA)	26.20	21.35
C20: 3n-3	-	-
C20: 5n-3 (EPA)	-	2.21
C22: 6n-3 (DHA)	-	-
Total	**26.20**	**23.56**
n-6 PUFA		
C18: 2n-6 trans	-	-
C18: 2n-6 cis	21.16	11.86
C18: 3n-6	0.26	0.36
C20: 2n-6	-	-
C20: 3n-6	-	-
C20: 4n-6	-	0.76
Total	**21.42**	**12.98**

ก.4 ส่วนประกอบของอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (g/L)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (g/L)

	สูตอาหารกิลลาร์ด	**สูตอาหารกิลลาร์ด F/2 (สูตรปรับปรุง)**
$NaNO_3$	0.075	-
Urea	-	84.15
$Na_2HPO_4.H_2O$	0.005	6.00
$FeCl_3.6H_2O$	3.15	2.90
$Na_2EDTA.2H_2O$	4.36	10.00
Vitamin B1	0.1	0.40
Vitamin B12	0.0005	0.002
Biotin	0.0005	0.10
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	1.96
$ZnSO_4.7H_2O$	0.022	4.40
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.006	1.26
$MnCl_2.4H_2O$	0.18	36.00
$CoCl_2.6H_2O$	0.01	2.00
$Na_2SiO_3.9H_2O$	0.03	33.00

ภาคผนวก ข

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้

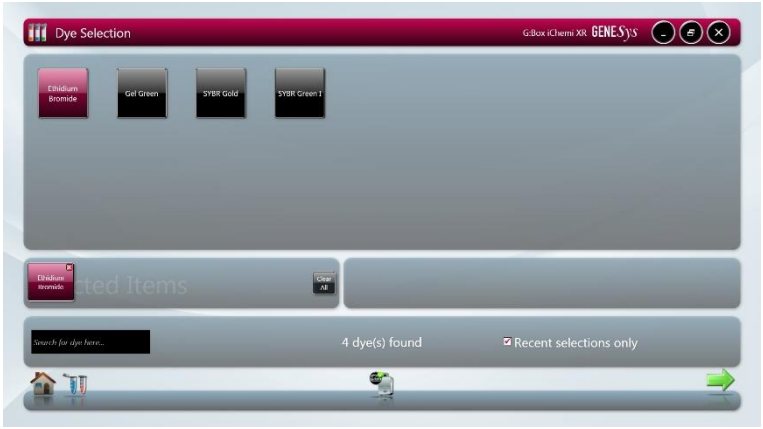
ข.1 Genesys

Genesys เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับตรวจสอบแถบยีนจากการรันเจล โดยจะเป็นโปรแกรมอัตโนมัติที่เชื่อมต่อกับเครื่อง Gel documentation มีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

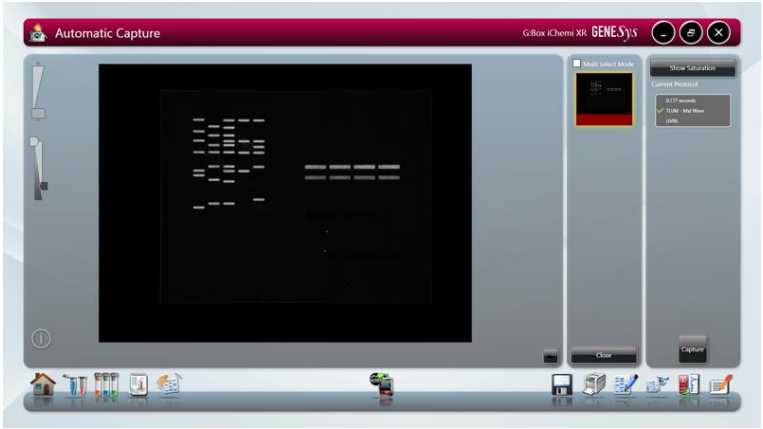
1) เปิดโปรแกรม จากนั้นเลือก Gels

2) เลือก DNA Agarose gel

3) เลือก Ethidium Bromide จากนั้นใส่แผ่นเจลที่รันแล้วเข้าเครื่อง Gel documentation จากนั้นกดลูกศรสีเขียว



4) เครื่อง Gel documentation จะถ่ายภาพเจลอัตโนมัติ



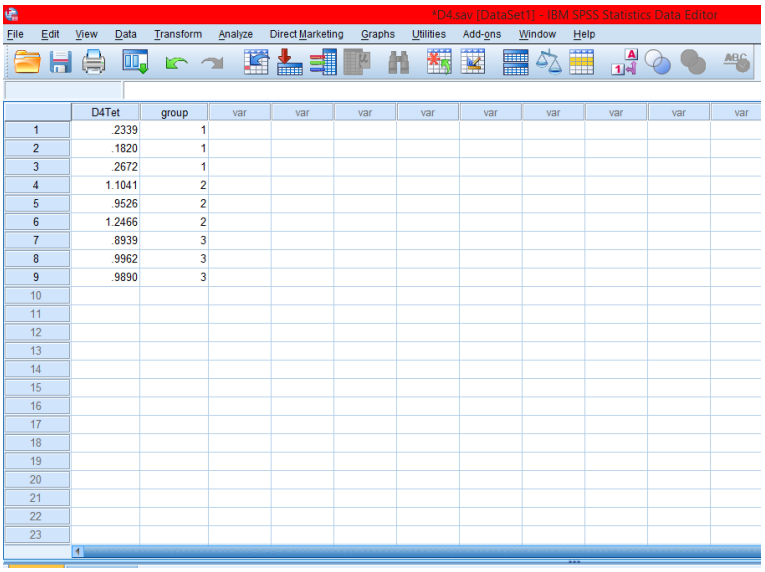
5) ปรับแต่งขนาด ความสว่าง ความคมชัด ของรูปภาพจากแถบเมนูด้านซ้าย

6) กดบันทึกรูปภาพ

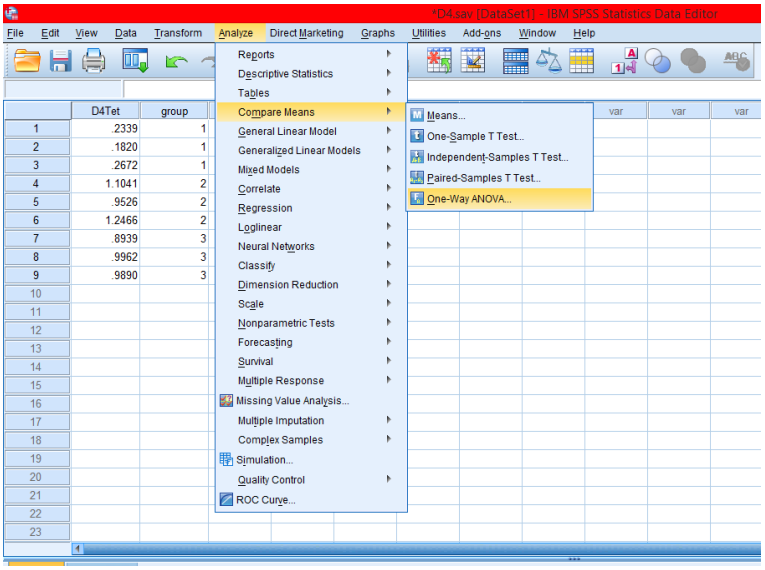
ข.2 SPSS

SPSS เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยในการทดลองใช้การวิเคราะห์ Analysis of variance (ANOVA) โดยใช้การคำนวณแบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

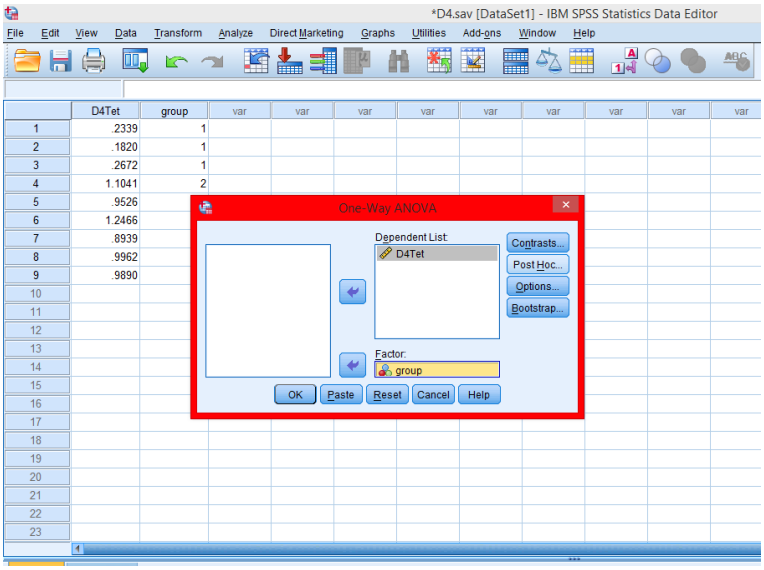
1) ใส่ข้อมูลในตาราง



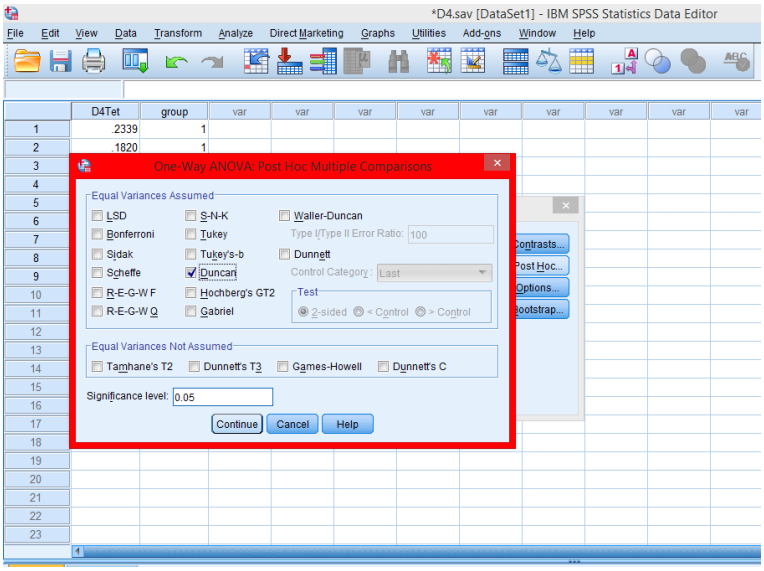
2) เข้าไปที่ Analysis จากนั้นไปที่ Compare Means และเลือก One-Way ANOVA



3) ตั้งค่าตัวแปร โดย Dependent คือ ตัวแปรที่ต้องการศึกษา และ Factor คือ ตัวแปรจำแนกกลุ่ม จากนั้นให้เลือก Post Hoc.



4) เลือกวิธีวิเคราะห์ที่ต้องการ โดยในการทดลองจะใช้การวิเคราะห์แบบ Duncan จากนั้นให้ใส่ระดับนัยสำคัญที่เราต้องการวิเคราะห์ โดยในการทดลองนี้วิเคราะห์ความแตกต่างที่ 95% จากนั้นเลือก Continue



5) กด OK จากนั้นโปรแกรมจะแสดงผลการวิเคราะห์

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

D4Tet

Duncan[a]

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	.227700	
3	3		.959720
2	3		1.101103
Sig.		1.000	.116

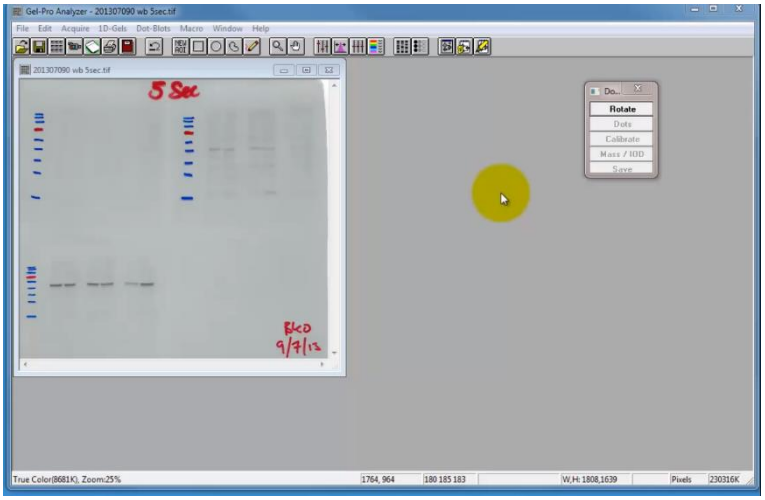
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

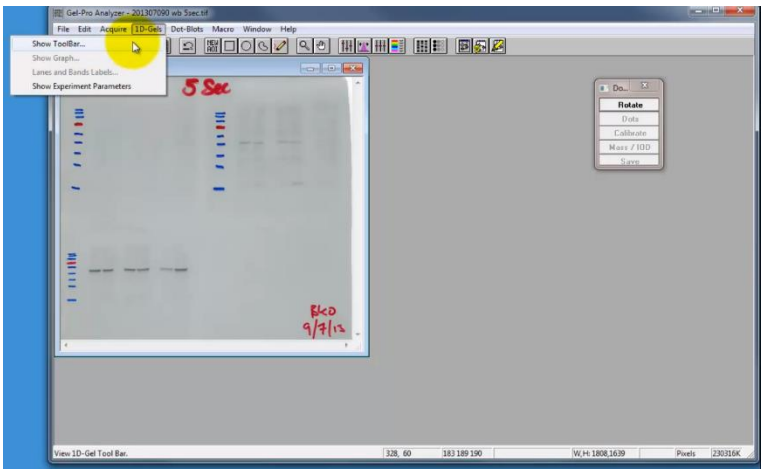
ข.3 Gel Pro 3.1 Simple Analysis

Gel Pro 3.1 Simple Analysis เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับวัดค่าการแสดงออกของยีน โดยการวัดความเข้มของแถบแบน มีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

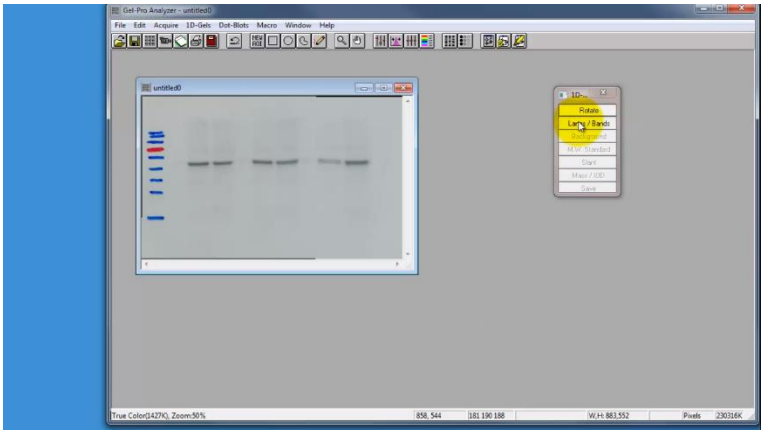
1) เปิดโปรแกรม จากนั้นนำภาพที่ได้จากการรันเจลเข้าโปรแกรม จากนั้นตัดส่วนที่จะต้องการวิเคราะห์



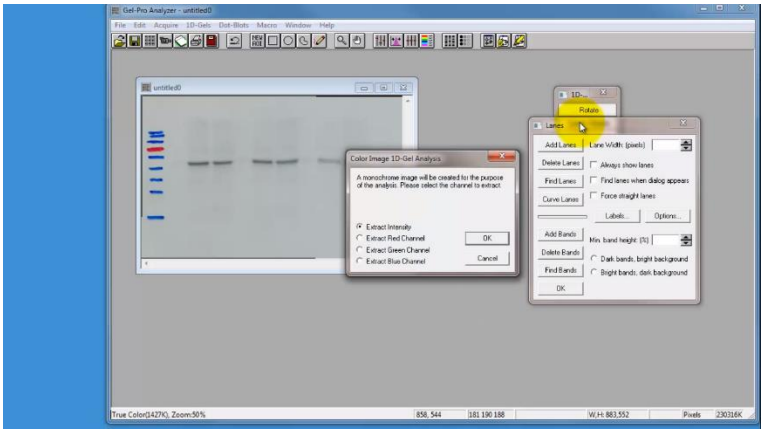
2) เลือก 1-D-gel จากนั้นไปที่ Show Toolbar



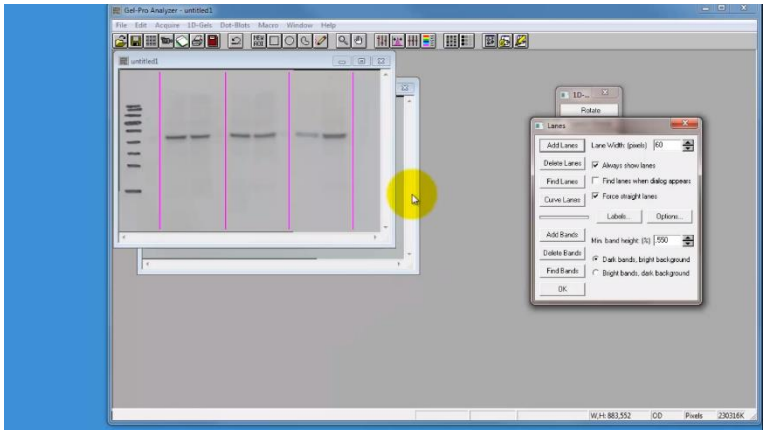
3) เลือก Lanes/Bands



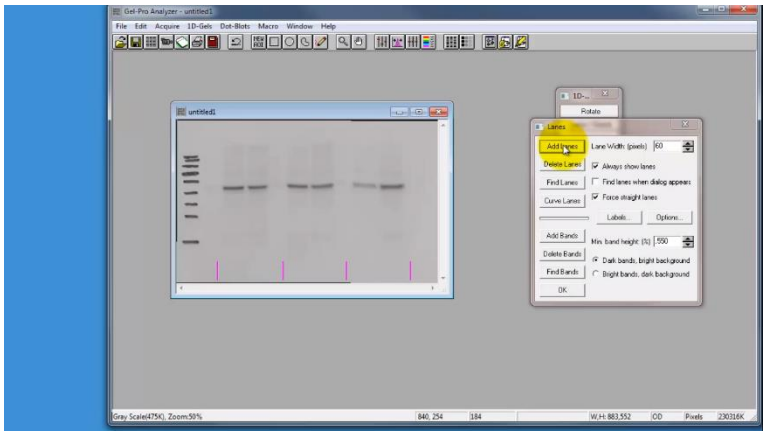
4) เลือก Extract intensity



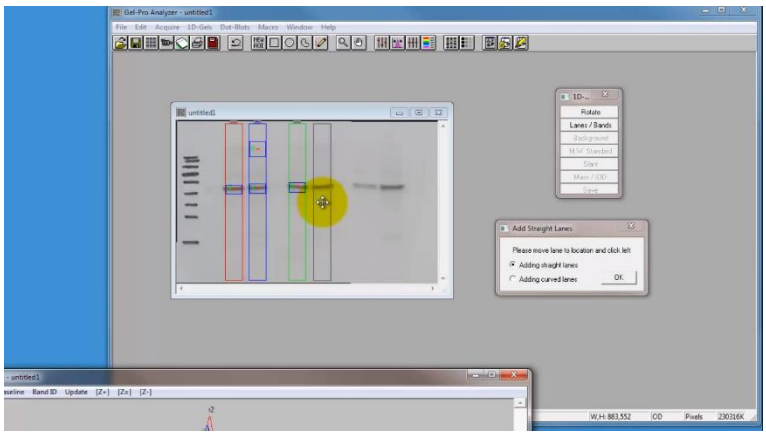
5) จะได้หน้าต่างดังรูป



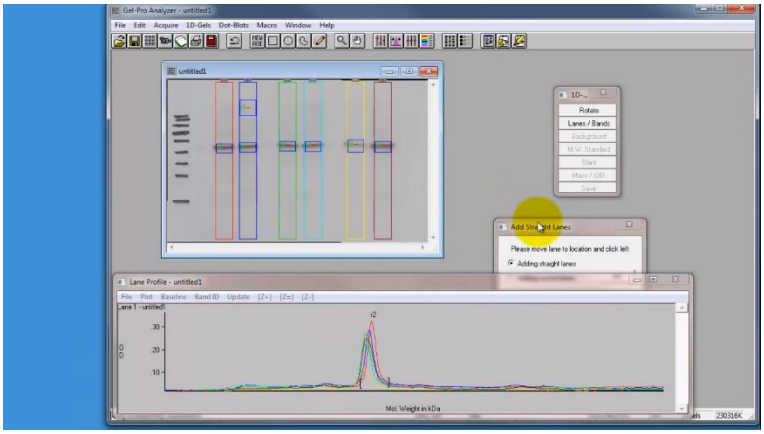
6) ไปที่ Add lane



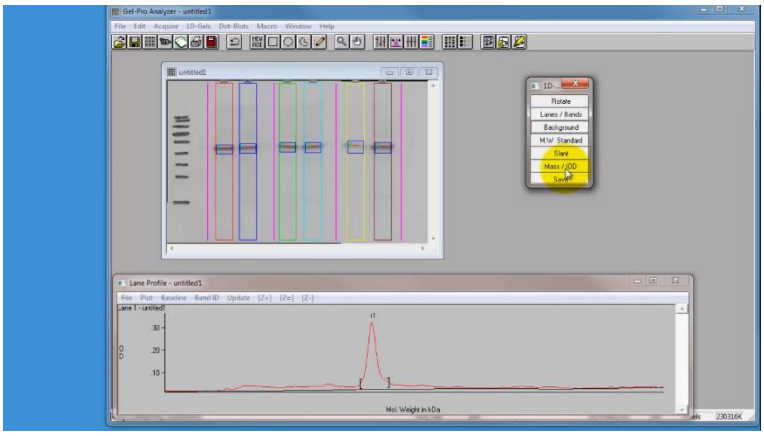
7) จากนั้นเลือก Straight lane จากนั้นกดเลือกเซลล์ที่ต้องการใช้



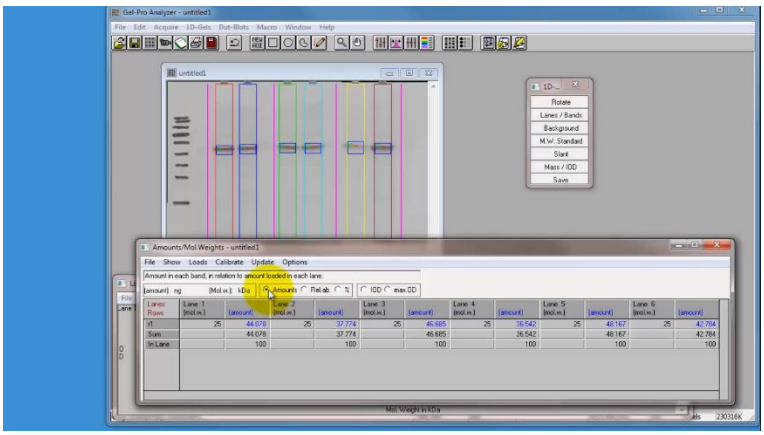
8) จะได้กราฟดังรูป



9) เลือกเมนู Mass/IOD



10) จะได้ค่าการแสดงออกของยีน



เอกสารอ้างอิง

AlphaMetrix Biotech. Gel imaging GeneSys. [Online]. 2020. Available from :

http://www.alphametrix.de/page/index.php?category=geldoc&pageid=330

[2021, April 13]

Clark, J. GelPro 3.1 simple analysis. [Video file]. 2015. Available from :

https://www.youtube.com/watch?v=kocnL9NesZ8&feature=youtu.be [2021, April 13]

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุภิดา เกื้อกอบ
ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2564
โทรศัพท์	097-1608798
Email	pinsupida@gmail.com

ประวัติผู้วิจัย (ต่อ)

ชื่อ-สกุล	นางสาวศิริวรรณ ประเสริฐ
ตำแหน่ง	ผู้ร่วมวิจัย
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2564
โทรศัพท์	082-6772547
Email	Meen_S_P@hotmail.com

ประวัติผู้วิจัย (ต่อ)

ชื่อ-สกุล	นางสาวหฤทัยชนก จรรโลงเศวตกุล
ตำแหน่ง	ผู้ร่วมวิจัย
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2564
โทรศัพท์	091-0169717
Email	name_no_name40@hotmail.com