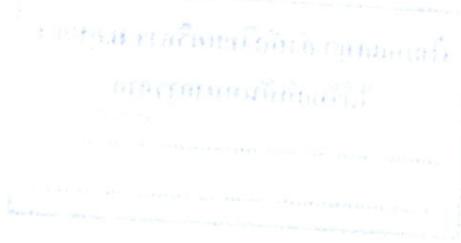




การแสดงออกของยีน *Fatty acyl desaturase* และ *Fatty acyl elongase*
และการสร้างกรดไขมันที่ไม่มีอิ่มตัวสูงที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืช
ในปลาดุกอย (Clarias macrocephalus Günther, 1864)



กนกวรรณ สารสมคร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต^๑
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี^๒

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



**FATTY ACYL DESATURASE AND FATTY ACYL ELONGASE
EXPRESSION AND BIOSYNTHESIS OF HIGHLY UNSATURATED
FATTY ACID RESPONSE ON SOURCE OF FATTY ACID OF
VEGETABLE OILS IN BIGHEAD CATFISH
(*CLARIAS MACROCEPHALUS* GÜNTHER, 1864)**

KANOKWAN SANSAMAK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN AGRICULTURE FACULTY OF AGRICULTURE
UBON RATCHATHANI UNIVERSITY
YEAR 2013
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY**



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

เรื่อง การแสดงออกของยีน Fatty acyl desaturase และ Fatty acyl elongase และการสร้างกรดไขมันที่ไม่ไขมันตัวสูงที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืชในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864)

ผู้วิจัย นางสาวกนกวรรณ สารสมัคร

คณะกรรมการสอน

รองศาสตราจารย์ ดร.ทวนทอง จุฑากेतุ	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาทิพย์ แผลมคง	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต ขวงศร้อย	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กานุจนา พยุหะ	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณีต งามเสน่ห์	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

นายอร แผลมคง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาทิพย์ แผลมคง)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณีต งามเสน่ห์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กานุจนา พยุหะ)

(รองศาสตราจารย์ธีระพล บันสิติพิช)

(ดร.จุฑามาศ ทรงทอง)

คณะศึกษาศาสตร์

รักษาราชการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอรับของขบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาทิพย์ แหลมคม ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ถ่ายทอดความรู้ ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนा พยุหะ และรองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมท งามเสน่ห์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น รองศาสตราจารย์ ดร.ทวนทอง จุฑากุตุ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต ยวงศร้อย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอรับของขบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และบุคลากรห้องปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพ ห้องปฏิบัติการ โภชนาศาสตร์ รวมถึงบุคลากรในฟาร์มประมง บุคลากรใน โรงพยาบาลคณาจารย์ ที่อนุมัติให้ดำเนินการ สำหรับการทดลองทางวิจัย ตลอดจนงานวิจัยเสรี สมบูรณ์

สุดท้ายข้าพเจ้าขอรับของขบพระคุณ คุณพ่อส่ง่าพงษ์ คุณแม่วิลัย สารสมัคร พี่สาว น้องสาว และคุณพริษฐ์ ม่วงมิตร ที่ช่วยเหลือในด้านการศึกษาและค่อยเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดมา

ไนแวนดา อรุณรัตน์
(นางสาวกนกวรรณ สารสมัคร)

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การแสดงออกของยีน *Fatty acyl desaturase* และ *Fatty acyl elongase*
และการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืช
ในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864)

โดย : กนกวรรณ สารสมัคร

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เกษตรศาสตร์

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาทิพย์ แรมกุน

ศัพท์สำคัญ : *Fatty acyl desaturase* *Fatty acyl elongase* กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ปลาดุกอุย

ปลาดุกอุยเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการเปลี่ยน LA และ LNA ให้เป็น HUFA โดยการทำงานของ *FAdes* และ *FAelon* การศึกษารังนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบ และการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* และการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืช จากการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีอ�다ทด้วยหนักเฉลี่ย 9.8 ± 0.37 กรัมต่อตัว เลี้ยงด้วยอาหาร 7 ชุดการทดลอง (น้ำมันปลาหมึก 100 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันถั่วเหลือง 100 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันทานตะวัน 100 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำมันทานตะวันผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 5 เดือน วิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พนการแสดงออกของยีน *FAelon* มีระดับที่สูงกว่ายีน *FAdes* และตรวจสอบการสร้าง HUFA ด้วยวิธี Gas chromatography (GC) พนว่ามีการสร้าง DHA มีค่าอยู่ในช่วง 0.64-1.19 มิลลิกรัมโดยปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 5 (น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์) มีค่ามากที่สุด 1.19 มิลลิกรัม และปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 6 (น้ำมันทานตะวัน 100 เปอร์เซ็นต์) มีค่าน้อยที่สุด 0.60 มิลลิกรัม และ EPA มีค่าอยู่ในช่วง 0.18-0.26 มิลลิกรัม พนในปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 3 (น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุด 0.26 มิลลิกรัม สรุปได้ว่าปลาดุกอุยมีความสามารถในการสร้าง และสามารถกระตุ้นระดับของ HUFA โดยการใช้แหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกัน

ABSTRACT

TITLE : *FATTY ACYL DESATURASE AND FATTY ACYL ELONGASE EXPRESSION AND BIOSYNTHESIS OF HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID RESPONSE ON SOURCE OF FATTY ACID OF VEGETABLE OILS IN BIGHEAD CATFISH (*CLARIAS MACROCEPHALUS* GÜNTHER, 1864)*

BY : KANOKWAN SANSAMAK

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : AGRICULTURE

CHAIR : ASST. PROF. THANATHIP LAMKOM, Ph.D

KEY WORDS : FATTY ACYL DESATURASE / FATTY ACYL ELONGASE / HIGHLY UNSATURATED FATTY ACID / BIGHEAD CATFISH

Bighead catfish (*Clarias macrocephalus*) is a freshwater economic fish in Thailand. With the function of *FAdes* and *FAelon*, they can change LA and LNA into HUFA. The objectives of this study were to characterize the full length of *FAdes* and *FAelon* and their tissue distribution and biosynthesis of HUFA. The full length of *FAdes* and *FAelon* was 1,760 and 1,218 bas pair (deduced amino acid = 445 and 294), respectively. The *FAdes* and *FAelon* expression were found similarly in liver and brain tissues. Experiment of bighead catfish initial average weight of 9.8 ± 0.37 g. The experiment of HUFA synthesis was carried out into 7 treatments (100% squid oil, 100% palm oil, 50% palm and squid oil, 100% soybean oil, 50% soybean and squid oil, 100% sunflower oil, 50% sunflower and squid oil) for 5 months. The expression of gene was analyzed using RT-PCR results of *FAelon* expressed high than *Fades*. The composition of fatty acid in muscle was analyzed using gas chromatography (GC). The DHA was found rang of 0.64-1.19 mg. This treatment 5 (50% soybean and squid oil) highest valuable 1.09 mg. and treatment 6 (100% sunflower oil) lowest of 0.60 mg., while the EPA was found in the treatment 1, 2 and 3 (100% squid oil, 100% palm oil, 50% palm and squid oil) rang of 0.18-0.60 mg. this treatment 3 (50% palm and squid oil) highest valuable 0.26 mg. It can be concluded that there is the pathway of HUFA synthesis in bighead catfish and can be stimulate the level of HUFA using the different sources of fatty acid.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	ภ
บทที่	

1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3

2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวิทยาของปลาคุกอุย	4
2.2 กระบวนการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในปลา	7
2.3 องค์ประกอบของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i>	9
2.4 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในปลาแต่ละชนิด	10

3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาองค์ประกอบของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i>	13
3.1.1 ปลาคุกอุยที่ใช้ในการศึกษา	13
3.1.2 การออกแบบ Degenerate primer	13
3.1.3 การสกัด Total RNA	13
3.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ด้วยวิธี RT-PCR	17
3.1.5 การสกัดผลผลิตพีซีอาร์จากօร์แกโนส ให้บริสุทธิ์	17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า	
18	3.1.6 ปฏิกริยาไลเกชั่น (Ligation)
18	3.1.7 การ转化ฟอเมชั่น (Transformation)
18	3.1.8 การโคลนนิ่ง (Cloning)
19	3.1.9 การเตรียมพลาสมิดีเอ็นเอ
20	3.1.10 การตรวจสอบพลาสมิดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยวิธี PCR
21	3.1.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)
21	3.1.12 การสังเคราะห์ First strand cDNA (3'RACE-cDNA)
22	3.1.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ด้วยวิธี 3'RACE-PCR
23	3.1.14 การสังเคราะห์ First strand cDNA (5'RACE-cDNA)
24	3.1.15 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ด้วยวิธี 5'RACE-PCR
25	3.1.16 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี 5'RACE Nested PCR
26	3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อปلاคุกอุย (Tissue distribution)
26	3.2.1 ปลาคุกอุยที่ใช้ในการศึกษา
26	3.2.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก Total RNA
26	3.2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อปلاคุกอุย
27	3.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ใน ปลาคุกอุยหลังจากได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่ แตกต่างกันในแต่ละเดือน
27	3.3.1 ปลาคุกอุยที่ใช้ในการศึกษา
28	3.3.2 วัตถุคุณภาพอาหารทดลอง
28	3.3.3 อาหารทดลอง

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.4 การวางแผนการทดลอง	29
3.3.5 การเตรียมตัวอย่าง Total RNA	32
3.3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในแต่ละเดือนหลังจากได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมัน จากพืชที่แตกต่างกัน	32
3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในกล้ามเนื้อ ปลาดุกอุบ	32
4 ผลการศึกษา	
4.1 องค์ประกอบของยีน <i>Fatty acyl desaturase (FAdes)</i>	33
4.1.1 ปริมาณและคุณภาพ Total RNA จากเนื้อเยื่อตับ	33
4.1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> จากปฏิกิริยา RT-PCR	33
4.1.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> ปลาย 3' (3' end)	35
4.1.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> ปลาย 5' (5' end)	37
4.1.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full length) ของยีน <i>FAdes</i>	39
4.2 องค์ประกอบของยีน <i>Fatty acyl elongase (FAelon)</i>	41
4.2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAelon</i> จากปฏิกิริยา RT-PCR	41
4.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAelon</i> ปลาย 3' (3' end)	43
4.2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAelon</i> ปลาย 5' (5' end)	45
4.2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full length) ของยีน <i>FAelon</i>	46
4.3 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อของปลาดุกอุบ	48
4.4 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในปลาดุกอุบหลังจาก ได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกันในแต่ละเดือน	49
4.4.1 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในปลาดุกอุบ ได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกัน ในแต่ละเดือน	49

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.2 องค์ประกอบของกรดไฮมันที่ไม่ominตัวสูงในกล้ามเนื้อ	
ปลาดุกอุย	52
5 วิจารณ์ผลการทดลอง	
5.1 การศึกษาองค์ประกอบของเยื่อน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i>	53
5.2 การแสดงออกของเยื่อน <i>FAdes</i> ในเนื้อเยื่ออของปลาดุกอุย	59
5.3 การแสดงออกของเยื่อน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในปลาดุกอุยที่	
ตอบสนองต่อแหล่งกรดไฮมันจากพืช	60
6 สรุปผลการทดลอง	61
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	69
ประวัติผู้วิจัย	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 กรณ์ไบมันในกล้ามเนื้อปลาคุกจากธรรมชาติและการเลี้ยง	5
2 ปริมาณกรณ์ไบมันในน้ำมันพีช	6
3 ปริมาณกรณ์ไบมันในน้ำมันปลาทะเล	6
4 ไฟรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของยีน <i>FAdes</i>	15
5 ไฟรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของยีน <i>FAelon</i>	16
6 พารามิเตอร์ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	28
7 สัดส่วนของแหล่งกรณ์ไบมันจากพีชและน้ำมันปลาหมึก	29
8 วัตถุคุณที่ใช้ในสูตรอาหารทดลอง	30
9 โภชนาทางเคมีอาหารทดลองจากการวิเคราะห์	31
10 คุณภาพน้ำในบ่อทดลอง	49
11 ปริมาณกรณ์ไบมันในเนื้อปลาคุกอุ่ยที่ได้รับอาหารที่มีแหล่งกรณ์ไบมันจากพีชที่ระยะเวลาเดียวกัน 5 เดือน	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะภายนอกของปลาคุกอุย	4
2 การสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในปลา	8
3 ยีน <i>FAdes</i> ในรูปแบบกรดอะมิโนของปลาแซลมอน	10
4 ยีน <i>FAelon</i> ในรูปแบบกรดอะมิโนของปลาแซลมอน	10
5 แผนที่ของ pGEM®-T Easy Vector และลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์	19
6 แผนภาพกระบวนการ 3'RACE PCR	22
7 แผนภาพกระบวนการ 5'RACE PCR	24
8 Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อยื่อตับปลาคุกอุย	33
9 ผลผลิต PCR ในปฏิกริยา RT-PCR ของยีน <i>FAdes</i>	34
10 พลาสมิดดีเอ็นเอของยีน <i>FAdes</i> ที่ตรวจสอบด้วยวิธี PCR	34
11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAdes</i> จากปฏิกริยา RT-PCR	35
12 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน <i>FAdes</i>	36
13 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR	36
14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน <i>FAdes</i>	37
15 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน <i>FAdes</i>	38
16 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR	38
17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน <i>FAdes</i>	39
18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของยีน <i>FAdes</i> ในปลาคุกอุย	40
19 ผลผลิต PCR ในปฏิกริยา RT-PCR ของยีน <i>FAelon</i>	41
20 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยวิธี PCR	42
21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FAelon</i> จากปฏิกริยา RT-PCR	42
22 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน <i>FAelon</i>	43
23 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR	44
24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน <i>FAelon</i>	44
25 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน <i>FAelon</i>	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 พลาสมิคดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR	46
27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน <i>FAelon</i>	46
28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของยีน <i>FAelon</i> ในปลาดุกอุย	47
29 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> ในเนื้อเยื่ออ่อนของปลาดุกอุย	48
30 การแสดงออกของยีน <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่ออ่อนของปลาดุกอุย	48
31 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 1	50
32 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 2	50
33 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 3	51
34 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 4	51
35 การแสดงออกของยีน <i>FAdes</i> และ <i>FAelon</i> ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 5	51
36 ลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>FAdes</i> ในปลาดุกอุย	55
37 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน <i>FAdes</i> ในปลาดุกอุย	56
38 ลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>FAelon</i> ในปลาดุกอุย	58
39 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน <i>FAelon</i> ในปลาดุกอุย	59

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	ความหมาย
HUFA	Highly unsaturated fatty acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
ARA	Arachidonic acid
LA	Linoleic acid
LNA	Linolenic acid
<i>FAdes</i>	<i>Fatty acyl desaturase</i>
<i>FAelon</i>	<i>Fatty acyl elongase</i>
ER	Endoplasmic reticulum
ORF	Open reading frame

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญ

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864) เป็นปลาหน้าจีดของไทยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากสามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ง่าย และทนต่อสภาพแวดล้อมน้ำธรรมชาติได้ดี ประกอบกับเนื้อปลาดุกอุยที่มีสีเหลือง และเนื้อมีรสมชาติที่ดี ทำให้เป็นที่นิยมในการนำมาบริโภคในครัวเรือน ซึ่งผลผลิตของการเพาะเลี้ยงปลาดุกมีปริมาณการเพาะเลี้ยงเป็นอันดับสองรองจากปลานิล โดยมีปริมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณผลผลิตปลาหน้าจีดทั้งหมด (สถิติประจำปี, 2554) ปลาดุกอุยจึงจัดว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ นอกจากโปรตีนในกล้ามเนื้อยังพบว่ามีกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid, FFA) ต่อร่างกาย โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (Highly unsaturated fatty acid, HUFA) ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่ Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) และ Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) และกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 ได้แก่ Arachidonic acid (ARA, 20:4n-6) (Steffens, 1997) ในปลาหน้าจีดส่วนใหญ่จะพบว่ามีกรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 6 มากกว่ากรดไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 ทั้งนี้เนื่องจากปลาหน้าจีดและปลาทะเลมีความสามารถในการสังเคราะห์ HUFA ได้น้อยมาก (บันทิต ยวงศรีอุย, 2545) จากการที่ปลาทะเลมีการสะสม HUFA มากกว่าปลาหน้าจีดเนื่องจากปลาทะเลได้รับ HUFA จากแพลงก์ตอนในทะเลจึงทำให้มีการสะสมของ HUFA สูง (Steffens, 1997) ดังนั้นปลาหน้าจีดและปลาทะเลจึงจำเป็นต้องได้รับกรดไขมันที่จำเป็นจากอาหาร

โดยอาหารที่เป็นแหล่งสำคัญของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงส่วนใหญ่ได้มาจากสัตว์ทะเลซึ่งกลไกการสะสมของกรดไขมันในปลาทะเลและปลาหน้าจีดมีรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปปลาทะเลจะมีปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงสายยาว เช่น EPA และ DHA ในปริมาณมาก เนื่องจากปลาทะเลมีการสะสม HUFA ได้โดยตรงจากอาหาร จำพวกแพลงก์ตอน ในขณะที่ปลาหน้าจีดมีการใช้ Linoleic acid (LA, 18:2n-6) และ Linolenic acid (LNA, 18:3n-3) ที่มีอยู่ในอาหารเพื่อนำมาสังเคราะห์เป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในปลาหน้าจีด โดยการเสริมน้ำมันจากปลาทะเลในอาหาร แต่ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากน้ำมันปลา มีราคาแพง จึงส่งผลต่อต้นทุนในการเพาะเลี้ยง จากการที่ปลาหน้าจีดมีความสามารถเปลี่ยนกรดไขมันที่จำเป็นโดยเฉพาะ LA และ LNA ที่มีอยู่ในน้ำมันจากพืชในการใช้เป็นแหล่งกรดไขมันในอาหารกระตุ้นให้

ปลาสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์ให้เป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงได้ โดยมียิน *Fatty acyl desaturase (FAdes)* และ *Fatty acyl elongase (FAelon)* ทำหน้าที่สร้างเออนไซม์ *Fatty acyl desaturase* และ *Fatty acyl elongase* เปลี่ยน LA ให้เป็น ARA และ LNA ให้เป็น EPA และ DHA

ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบของยืน *FAdes* และ *FAelon* การแสดงออกของยืน การศึกษาเหล็กของกรดไขมันที่มีผลต่อการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง และปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในกล้ามเนื้อจัดเป็นแนวทางที่สำคัญในการเพิ่มคุณภาพเนื้อและประสิทธิภาพการเลี้ยงรวมทั้งการเพิ่มมูลค่าของปลาดุกอุย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของยืน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุย
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยืน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อปลาดุกอุย
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยืน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุยที่ได้รับแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกัน
- 1.2.4 เพื่อศึกษาปริมาณของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในกล้ามเนื้อปลาดุกอุยที่สร้างขึ้นจากแหล่งอาหารได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาองค์ประกอบของยืน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อตับปลาดุกอุย
- 1.3.2 ศึกษาการแสดงออกของยืน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อปลาดุกอุย
- 1.3.3 ออกแบบสูตรอาหารทดลอง 7 สูตร โดยเตรียมสูตรอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชในแต่ละสูตรที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันทานตะวัน และใช้น้ำมันปalm oil เป็นแหล่งกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง
- 1.3.4 ทดลองเลี้ยงปลาดุกอุยที่มีอายุ 3 เดือนด้วยสูตรอาหารทดลอง ระยะเวลา 5 เดือน โดยมีอัตราปล่อย 30 ตัวต่อกระชัง จำนวน 21 กระชัง
- 1.3.5 ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของปลาทดลองทุก 1 เดือน บันทึกปริมาณอาหารที่ปลากินทั้งหมดทุกวัน และวัดคุณภาพน้ำเดือนละ 2 ครั้ง
- 1.3.6 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยทุกเดือน เป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยเก็บตัวอย่างตับชุดการทดลองละ 3 ช้ำ และทำการศึกษาการแสดงออกของยืน *FAdes* และ *FAelon* ในตับปลาดุกอุย ด้วยวิธี Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

1.3.7 เมื่อเลี้ยงปลาดุกอุยด้วยสูตรอาหารแต่ละสูตร ครบ 5 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อนำมาวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ด้วยวิธี Gas chromatography (GC)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงองค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon* ที่ควบคุมการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในปลาดุกอุย

1.4.2 ทราบถึงเนื้อเยื่อหลักที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในปลาดุกอุย

1.4.3 ทราบถึงแนวทางในการใช้แหล่งกรดไขมันจากพืช และสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในระดับยีน

1.4.4 ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในกล้ามเนื้อของปลาดุกอุยหลังจากได้รับกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกัน

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของปลาดุกอุย

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864) เป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย ลักษณะลำตัวเรียวยาว ไม่มีเกล็ด มีหนวดสี่เส้นที่บริเวณริมฝีปาก (ภาพที่ 1) จัดเป็นปลาหัวเขี้ดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถพบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศไทย ปลาดุกอุยมีนิสัยการกินอาหารตามหน้าดิน โดยใช้หนวดหาอาหาร และมีนิสัยว่องไวในการกินอาหาร แต่การเลี้ยงปลาดุกอุยนั้นมีข้อจำกัดในด้านอัตราการระดูตายต่อๆ กัน และมีการเจริญเติบโตช้าในปลาวยอ่อน (Petkam and Moodie, 2001) แต่เนื่องจากคุณภาพเนื้อของปลาดุกอุยมีคุณภาพค่อนข้างดี และมีรสชาติอร่อยจึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ซึ่งเกษตรกรมีการเลี้ยงปลาดุกอุยมากขึ้น เนื่องจากเป็นปลาที่สามารถเพาะและขยายพันธุ์ได้ง่าย สามารถเลี้ยงได้ในสภาพแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิตามที่ระบุไว้ รวมทั้งปลาดุกอุยเพศเมียใช้เป็นแม่พันธุ์ในการผลิตปลาดุกบึงอุย



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864)

จากสถิติผลผลิตการเลี้ยงปานั้นจีด ปี พ.ศ. 2554 พบว่าปลาดุกมีผลผลิตสูงเป็นอันดับที่ 2 รองจากปลานิล โดยมีปริมาณผลผลิตเท่ากับ 100,900 ตัน หรือ 28 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณปลาหัวเขี้ดทั้งหมด โดยมีมูลค่าผลผลิต 4,546,901 ล้านบาท (สถิติประจำปี 2554) ดังนั้นปลาดุกจึงขึ้นเป็น

แหล่งโปรตีนที่สำคัญ และเป็นแหล่งของกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับร่างกายมุขย์จากการศึกษาของ อัมรัตน์ ณูนแก้ว และคณะ (2552) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในกล้ามเนื้อปลาดุกในแหล่งน้ำธรรมชาติ และปลาดุกจากการเลี้ยงในบ่อคิน พนวักกล้ามเนื้อปลาดุกที่ได้จากการเลี้ยงมี ไตรกลีเซอไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก 76.44 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลาดุกจากแหล่งน้ำธรรมชาติมีไขมัน ประเภทฟอฟอลิปิดเป็นองค์ประกอบหลัก 90.42 เปอร์เซ็นต์ และไตรกลีเซอไรด์ 7.98 เปอร์เซ็นต์ นอกนี้ยังพบว่าปลาดุกมีไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอยู่ในปริมาณที่สูง (47.68-58.15 เปอร์เซ็นต์) แต่อย่างไรก็ตามกล้ามเนื้อปลาดุกจากธรรมชาติมีกรดไขมัน DHA 7.57 เปอร์เซ็นต์ และ EPA 12.18 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณที่สูงกว่าในกล้ามเนื้อปลาดุกที่ได้จากการเลี้ยงโดยมีกรดไขมัน DHA และ EPA 5.43 เปอร์เซ็นต์ และ 0.96 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาดุกจากธรรมชาติและการเลี้ยง (หน่วย: เปอร์เซ็นต์ของ กรดไขมันทั้งหมด) (อัมรัตน์ ณูนแก้ว และคณะ., 2552)

กรดไขมัน	กล้ามเนื้อปลาดุกธรรมชาติ	กล้ามเนื้อปลาดุกเลี้ยง
LA	8.49	14.29
EPA	12.18	0.73
DHA	7.57	4.27
Saturated fatty acid	35.29	38.92
Monounsaturated fatty acid	25.73	35.45
Polyunsaturated fatty acid	31.08	21.22

กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงบางชนิดที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น เรียกว่า กรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid, EFA) มี 2 ชนิด คือ LA และ LNA ซึ่งจัดเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีความสำคัญต่อร่างกาย ซึ่งมีจำนวนการบอนอะตอนสูงขึ้น และมีจำนวนพันธะคู่เพิ่มขึ้น (Tocher, 2002) โดย LA และ LNA สามารถพบได้ในน้ำมันจากพืช (ตารางที่ 2) และน้ำมันจากปลาทะเล (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันพีช (หน่วย: เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) (Tacon et al., 2009)

ชนิด กรดไขมัน	น้ำมันพีช				
	น้ำมันปาล์ม	น้ำมันอั่วหลือง	น้ำมันทานตะวัน	น้ำมันมะพร้าว	น้ำมันข้าวโพด
18:2n-6	11	57	64	-	58
18:3n-3	-	7	-	-	1
20:4n-6	-	-	-	-	-
20:5n-3	-	-	-	-	-
22:6n-3	-	-	-	-	-
SFA	50	13	13	94	13
MUFA	40	24	23	7	24
PUFA	11	64	64	0	59
n-3 FA	0	7	0	0	1
n-6 FA	11	57	64	0	58

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันปลาทะเล (หน่วย: เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด) (Tacon et al., 2009)

ชนิด กรดไขมัน	น้ำมันปลาทะเล				
	Anchovy (Engraulidae)	Mackerel (Scomber japonicas)	Cod (Anoplopoma fimbria)	Capelin (Mallotus villosus)	Squid
18:2n-6	1	4	2	2	2
18:3n-3	1	1	1	1	2
20:4n-6	1	1	1	-	1
20:5n-3	12	13	9	5	11
22:6n-3	12	8	9	3	12
SFA	30	37	49	62	35
MUFA	40	24	23	7	24
PUFA	5	6	6	4	8
n-3 FA	30	26	24	11	31
n-6 FA	2	5	3	2	3

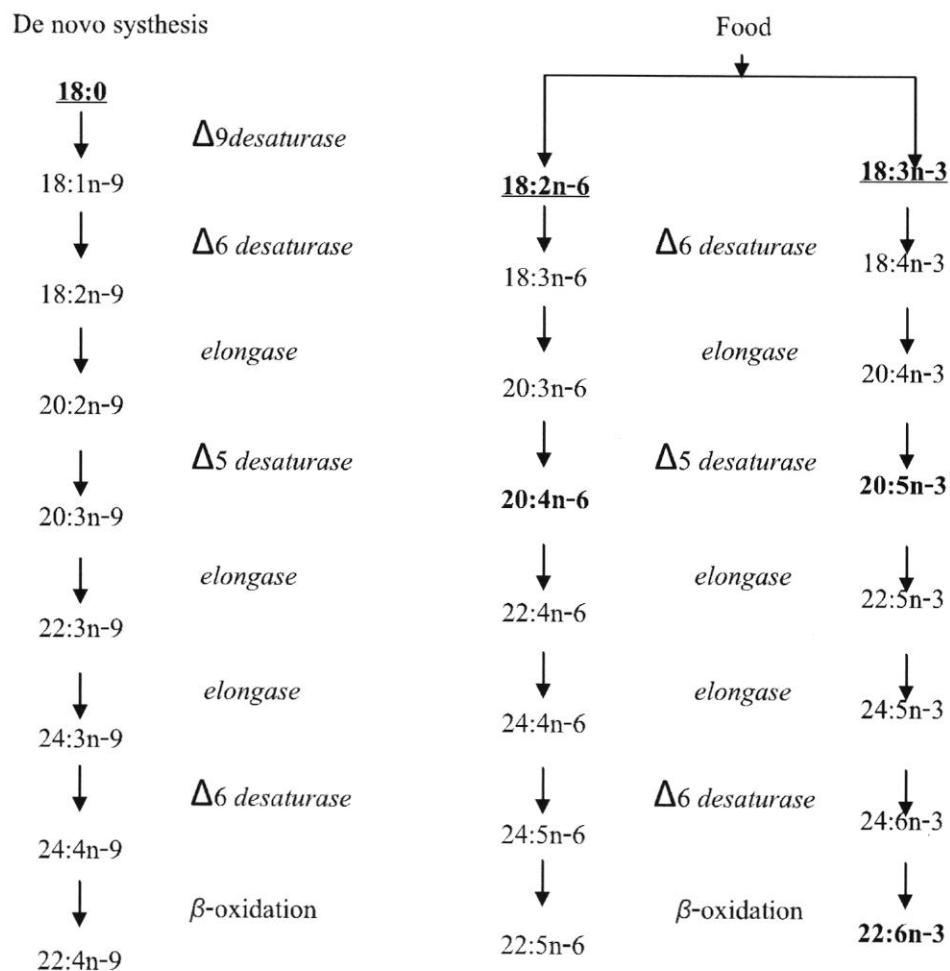
2.2 กระบวนการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในปลา

ปลาเป็นเนื้อสัตว์ที่คนนิยมบริโภค เนื่องจากเป็นโปรตีนที่หาได้ง่ายและมีคุณภาพดี นอกจากนี้เนื้อปลาบางเป็นแหล่งของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (Highly unsaturated fatty acid, HUFA) ได้แก่ EPA, DHA และ ARA ซึ่งจะพบมากในปลาทะเล และปลาหน้าจีดบางชนิด โดยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงมีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างร่างกายของมนุษย์ และมีส่วนช่วยในการพัฒนาสมอง และการมองเห็น (Sargent et al., 2002) รวมไปถึงลดอาการอักเสบของกล้ามเนื้อ (Chronic inflammation) บำบัดรักษาโรคหัวใจ (Heart disease) โรคเบาหวาน (Diabetes) และโรคมะเร็ง (Cancer) (Libby, 2007)

ปลาไม่สามารถสร้าง HUFA กลุ่ม โอมาก 3 และ โอมาก 6 จากกรดไขมันกลุ่ม โอมาก 9 ได้ (ภาพที่ 2) (Vagner and Santigosa, 2011) ปลาทะเลได้รับ HUFA จากแพลงก์ตอนและสัตว์น้ำที่เป็นอาหารได้โดยตรง ทำให้มีการสะสมบริเวณกล้ามเนื้อในปริมาณที่สูงกว่าปลาหน้าจีด ในขณะที่ปลาหน้าจีดมีกลไกที่สามารถสังเคราะห์ HUFA ได้จากกรดไขมันที่มีจำนวนcarbon 18 อะตอมที่พบในอาหาร (Sargent et al., 2002) ได้แก่ LA และ LNA โดยอาศัยกลไกการทำงานของยีน *FAdes* และ *FAelon* ที่ทำหน้าที่สร้างoen ไซม์ *Fatty acyl desaturase* และ *Fatty acyl elongase* ที่สามารถเปลี่ยน LA ให้เป็น ARA และ LNA ให้เป็น EPA และ DHA (Bell et al., 2001) โดยอาศัยกระบวนการเพิ่มพันธะคู่ (Desaturation) จากoen ไซม์ *Fatty acyl desaturase* และการเพิ่มจำนวนcarbon (Elongation) จากoen ไซม์ *Fatty acyl elongase*

กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจะเกิดขึ้นที่เยื่อโคลลาเจนิกเตติคูลัม (Endoplasmic reticulum, ER) (Tocher, 2002) จากกรดไขมันตั้งต้น คือ LA และ LNA โดย LA จะเปลี่ยนเป็น Gamma-linolenic (18:3n-6) โดยอาศัยoen ไซม์ Δ_6 desaturase ทำให้เกิดการเพิ่มพันธะคู่ 1 พันธะ จากนั้นoen ไซม์ *Fatty acyl elongase* จะทำหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนcarbon 2 carboxylic acid ทำให้เกิดการสังเคราะห์เป็น Dihomogamma-linolenic (20:3n-6) และ LNA เปลี่ยนเป็น Stearidonic (18:4n-3) โดยอาศัยoen ไซม์ Δ_6 desaturase ในการเพิ่มพันธะคู่ 1 พันธะ จากนั้นoen ไซม์ *Fatty acyl elongase* ทำหน้าที่เพิ่มจำนวนcarbon 2 carboxylic acid ทำให้เกิดการสังเคราะห์เป็น Eicosatetraenoic (20:4n-3) จากนั้นมีการสร้างoen ไซม์ Δ_5 desaturase เข้ามาทำหน้าที่เพิ่มพันธะคู่ทำให้กรดไขมัน Dihomogamma-linolenic (20:3n-6) และ Eicosatetraenoic (20:4n-3) เป็น ARA และ EPA ตามลำดับ ต่อจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการ Elongation โดยมีoen ไซม์ *Fatty acyl elongase* เข้ามาเพิ่มจำนวนcarboxylic acid ทำให้ ARA และ EPA เปลี่ยนเป็น Tetracosatetraenoic (24:4n-6) และ Tetracosapentaenoic (24:5n-3) ตามลำดับ ต่อจากนั้นกรดไขมันจะถูกเติมพันธะคู่ด้วยoen ไซม์ Δ_6 desaturase ได้กรดไขมัน Tetracosapentaenoic (24:5n-6) และ Tetracosahexaenoic (24:6n-3) ตามลำดับ และจะเข้า

สู่กระบวนการ β -oxidation ซึ่งผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการจะได้กรดไขมัน Docosapentaenoic (22:5n-6) และ DHA (Sargent et al., 2002) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในปลา (Sargent et al., 2002)

2.3 องค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon*

สัตว์มีกระดูกสันหลังสามารถเปลี่ยน LA และ LNA ที่มีอยู่ในอาหารไปเป็น HUFA ได้โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Fatty acyl desaturase และ Fatty acyl elongase ที่ถูกควบคุมโดยยีน *FAdes* และ *FAelon* โดยเฉพาะเอนไซม์ $\Delta 6$ desaturase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ HUFA ในลำดับแรกของกระบวนการเพิ่มพันธะคู่ (Desaturation) และการเพิ่มจำนวนคาร์บอน (Elongation) (Vagner and Santigosa, 2011)

Zheng et al. (2004) ได้ศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAdes* จากเนื้อเยื่อด้านของปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) และปลาใน (*Cyprinus carpio*) ด้วยวิธี RACE-PCR พบร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* จำนวน 1,335 คู่เบส (ลำดับกรดอะมิโน 444 ตัว) ในขณะที่ปลาในมีลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 1,338 คู่เบส (ลำดับกรดอะมิโน 445 ตัว) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon* ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,362 และ 888 คู่เบส (Hastings et al., 2005) (ภาพที่ 3 และ 4)

องค์ประกอบของยีน *FAdes* ประกอบด้วย Histidine boxes จำนวน 3 ส่วน, Transmembrane region จำนวน 2 ส่วน และ N-terminal cytochrome b_5 domain ที่มีส่วนของ Heme binding motif (H-P-G-G) จำนวน 1 ส่วน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน (Seiliez et al., 2003) เช่นเดียวกับรายงานของ Hastings et al. (2005) ที่ศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ด้วยวิธี PCR และ RACE-PCR จากเนื้อเยื่อด้าน

Tanomman et al. (2013) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *FAdes* ในปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*) ด้วยวิธีการ RACE-PCR พบร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* มีจำนวน 1,338 คู่เบส (ลำดับกรดอะมิโน 445 ตัว) โดยโครงสร้างยีนประกอบด้วยส่วนของ Cytochrom b_5 domain ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอน (Electron transfer) เพื่อผลผลิตพลังงานในกระบวนการ Desturation และส่วนของ Fatty acid desaturase domain ทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ในกระบวนการ การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงสายยาว

MGGGGQQTESSEPAKGDGVGPDGGRGGSAYTWEEVQKHCRSDKWLVIDRKVYNITQWAKRHPGGIRVI
SHFAGEDATDAFVAFHDPNFVRKFLKPLLIGELATTEPSQDHGKNAVLVQDFQALRDRVEREGLLRARP
LFFSLYLGHILLLEALALGLLWWGTSWSLTLLCSMLATSQSQAGWLQ**HDYGH**LSVCKTSSWNHVLHKF
VIGHLKGASANWWNHR**HFQHH**AKPNVFSKDPDVNSLHVFLGDKQPVEYGIKKLYMPYHHHQYFFLIG
PPLVIPVFFTIQIFQTMFSQRNWVDLAWAMTFYLRFFCCYYPFFGFFGSVALISFVRFLESHWFVWVTQM
NHLPMEIDHERHQDWLTMQLSATCNIEQSTFNDWFSGHLNF**QIEHH**LFPTMPRHNYHLVAPLVRALCEKH
GLPYQVKTLQKAIIDVVGSLKKSGDLWLDAYLHK-

ภาพที่ 3 ยีน *FAdes* ในรูปแบบกรดอะมิโนของปลาแซลมอนที่แสดงส่วนของ Histidine box
 (ตัวอักษรหนา) Cytochrome b_5 domain (เส้นทึบ) ซึ่งมีส่วนของ Heme-binding motif,
 H-P-G-G (ดอกจัน) และ Transmembrane region (เส้นประ)

METFNYKLNMYIDSWMGPRDERVQGWLLLNDNPPTFALTVMYLLIVLGPKYMRHRQPVSCRGLLLVYNL
 GLTILSFYMFYEMVSAYWHGDYNFYCQDTHSAGETDTKIINVLWWYYFSKLIEFMDTFFFILRKNNHQIT
 FL**HIYHH**ASMLNIWWFVMNWVPCGHSYFGASLNSFIHVLMSYYGLSAVPALRPYLWWKKYITQQQLIQF
 FLTMSQTICAVIWPCGFPRGWLYFQIFYVVTLIALFSNFYIQTYYKKHLVSQKKECHQNGSVASLNGHVNG
 VTPTE_{*}TITHRKVRGD-

ภาพที่ 4 ยีน *FAelon* ในรูปแบบกรดอะมิโนของปลาแซลมอนซึ่งประกอบด้วย Histidine box
 (ตัวอักษรหนา) ER retention signal (ดอกจัน) และ Transmembrane region (เส้นประ)

2.4 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาแต่ละชนิด

ในกระบวนการสร้างกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง่อนใช้ม์ *Fatty acyl desaturase* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกจะถูกสร้างจากยีน *FAdes* ที่ถูกกระตุ้นให้มีการทำงานของยีนเพื่อทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ เช่นเดียวกับเอนไซม์ *Fatty acyl elongase* เพื่อสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Morais et al., 2011) จากการรายงานของ Supamas et al. (2013) กล่าวว่าเนื้อเยื่อตับเป็นเนื้อเยื่อหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง และการ

สร้างกรดไขมันในร่างกาย จากการศึกษาของ Li et al. (2008) ศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* ในเนื้อเยื่อปลาสลิดหิน (*Siganus canaliculatus*) ด้วยวิธีการ RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน สูงมากในเนื้อเยื่อตับและสมอง ส่วนเนื้อเยื่อเหงือก ลำไส้ และกล้ามเนื้อมีการแสดงออกน้อยมาก ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Ren et al. (2013) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* ในเนื้อเยื่อ ตับ ลำไส้ หัวใจ ไต กล้ามเนื้อ และสมองของปลาในด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกสูงมาก ในเนื้อเยื่อตับ และสมอง แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อตับมีความสำคัญและเป็นเนื้อเยื่อตำแหน่งแรกที่มี การสร้างกรดไขมันไม่อิมตั้วสูง จึงมีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนในปลาแต่ละชนิด และ ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อปัจจัยภายนอกที่ทำให้มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสอง รูปแบบ

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* คือองค์ประกอบของ กรดไขมันในอาหาร ได้แก่ LA และ LNA จากรายงานการศึกษาของ Zheng et al. (2004) ศึกษาการ แสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี Q-PCR โดยทดลองเลี้ยงปลาแซลมอนเป็นเวลา 20 สัปดาห์ ด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันลินซีด (Linseed oil) ที่มีส่วนประกอบหลักเป็น LA และ LNA ต่อน้ำมันปลาแคปลิน 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีน *FAdes* และ *FAelon* มีการแสดงออกมากที่สุดในปลาที่ทดลองเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ผสมน้ำมันลินซีด 100 เปอร์เซ็นต์

Zheng et al. (2005) ศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี Q-PCR โดยทดลองเลี้ยงปลาแซลมอน เป็นเวลา 2 ปี ด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันพีชได้แก่ น้ำมัน เรเปรชีด น้ำมันปาล์ม และน้ำมันลินซีด ในอัตราส่วน 3:7:2 เป็นส่วนประกอบหลักของ LA และ LNA ต่อน้ำมันปลาแคปลิน 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีน *FAdes* มีการแสดงออกมากที่สุดในปลา ที่ทดลองเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ผสมน้ำมันจากพีช 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยีน *FAelon* มีการแสดงออกมากในปลาที่ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมันปลาแคปลิน 100 เปอร์เซ็นต์

Ling et al. (2006) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี Q-PCR โดยทดลองเลี้ยงปลาทางดาน (*Xiphophorus helleri*) ด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำมัน ปลาหมึก 100 เปอร์เซ็นต์, น้ำมันปลาหมึกต่อน้ำมันลินซีด 1:1 และน้ำมันลินซีด 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 26 สัปดาห์ พบว่ายีนทั้งสองรูปแบบมีการแสดงออกมากที่สุดในปลาที่ ทดลองเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่ผสมน้ำมันลินซีด 100 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสม ของน้ำมันลินซีดจะส่งผลทำให้มีการสะสมของ LA และ LNA สูงขึ้น

Almaida-Pagán et al. (2007) ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ใน ปลากรายแดง (*Diplodus puntazzo*) ด้วยวิธี Q-PCR โดยเลี้ยงปลาด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งกรดไขมัน

ที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำมันปลา ซึ่งประกอบด้วย HUFA เป็นองค์ประกอบหลัก น้ำมันถั่วเหลืองมี LNA เป็นองค์ประกอบหลัก และน้ำมันละหุ่งมี LA เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* จากปลาที่ถูกทดลองเลี้ยงด้วยสูตรอาหารแต่ละสูตรมีการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ที่อาศัยกระบวนการเปลี่ยน LA และ LNA ให้เป็น HUFA ในสัตว์น้ำหลายชนิดเพื่อเป็นแนวทางในการนำแหล่งของกรดไขมันจากพืชมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon*

3.1.1 ปลาดุกอุยที่ใช้ในการศึกษา

สุ่มตัวอย่างป้าดุกอุยจำนวน 3 ตัว นำหักเฉลี่ย 9.16-10.39 กรัมต่อตัว นำมาทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ โดยแยกเนื้อเยื่อลงในหลอดเก็บตัวอย่าง (Eppendorf tube) เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.2 การออกแบบ Degenerate primer

นำสาขานิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ของปลาแต่ละชนิดในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) นำมาเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ (Alignment) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Clustalw2 (<http://www.ebi.ac.uk>) เพื่อนำริเวณที่มีค่าเบสเหมือนกันในทุก ๆ สายนิวคลีโอไทด์ (Conserved region) มาออกแบบ Degenerate forward primer และ Degenerate reverse primer สำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* จากปลาทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ *Sparus aurata* (AY055749), *Epinephelus coioides* (EU715405), *Lates calcarifer* (GU047383), *Oncorhynchus mykiss* (AF301910), *Cyprinus carpio* (AF309557), *Labeo rohita* (EF634246), *Danio rerio* (AF309556) และสำหรับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *FAelon* ในปลาทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Danio rerio* (AF532782), *Clarias gariepinus* (AY660880), *Salmo salar* (AY170327), *Oreochromis niloticus* (AY170326), *Scophthalmus maximus* (AF465520) และ *Gadus morhua* (AY660881) จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาประเมินคุณสมบัติด้วยโปรแกรม FastPCR เวอร์ชัน 6.1

3.1.3 การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุย ซึ่งเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ใส่ในโกร่งบดเดินในโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างบดให้เป็นผงละเอียดตักตัวอย่างเนื้อเยื่อที่บดละเอียดใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรประมาณ 50 มิลลิกรัม ทำการสกัด Total RNA ด้วยชุดสกัด Trizol reagent (Invitrogen) โดยเติมน้ำยาไทรโซล 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างอีกครั้งในน้ำยาไทรโซล จากนั้นตั้งตัวอย่างทึบไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นให้วิ่งด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที คุณสารละลายน้ำในส่วนที่

Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายนอกโรฟอร์ม (Chloroform) 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นให้วุ่นเร็วเป็นเวลา 15 วินาที ตั้งสารละลายทึบไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 นาที นำไปปั่นให้วุ่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คุตสารละลายส่วนใสลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอโซโพรพานอล (Isopropanol) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ตั้งทึบไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นให้วุ่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทึบถังตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปปั่นให้วุ่นที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทึบจะเห็นชิ้นส่วนของ Total RNA ตกแห้งตะกอนเป็นเวลา 10 นาที ละลายด้วย DEPC-water 25 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่าง Total RNA ไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของ Total RNA

ตรวจวัดปริมาณ Total RNA โดยนำตัวอย่าง Total RNA ที่สักด้วยการทำการเจือจางด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วัดค่าการคูดกลืนแสง (Absorbance) ในอัตราส่วนของ Total RNA 2 ในไมโครลิตร และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 98 ในไมโครลิตร (อัตราส่วน 1 : 50) ด้วยเครื่องวัดคูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Eppendorf Biophotometer) จะได้ความเข้มข้นของ Total RNA ที่มีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/uL)

วัดคุณภาพ Total RNA ด้วยวิธี Formaldehyde agarose gel electrophoresis โดยใช้ Total RNA 3 ในไมโครลิตร ผสมกับ Loading dye เพื่อให้เกิดสี 2 ในไมโครลิตร เตรียม 1% formaldehyde agarose gel ผสม Ethidium bromide รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง หยดตัวอย่างลงแผ่นเจลโดยใช้ความต่างศักยภาพที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจดูแบบ RNA ภายใต้เครื่อง UV transilluminator เพื่อประเมินความเข้มข้นและคุณภาพของ RNA ด้วยเครื่อง Gel document (Dolphin-1D, Wealtec Bioscience Co.,Ltd)

ตารางที่ 4 ลิสต์ของSEQUENCE ในการศึกษาองค์ประกอบของ RNA ใน *FAdes*

PCR reaction	Primer name	Forward primer name	Primer name	Reverse primer name	Annealing Temperature (°C)
RT-PCR					
DF-1	5'-AGCAYGACTWCGGYCAYCTGTC-3'	DR-1	5'-GTSACCCAHACAAACCAGTG-3'		55
DF-2	5'-CACGTTACCTCTCGTCTATGTTCCC-3'	AUAP	5'-GGCCACCGCGTCGACTAGTAC-3'		55
5'RACE-PCR	5'-CTAATACGACTCACTATAAGGCAAAG	DR-2	5'-GTGATCACATTGGCTTAG		58
	CAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'		CATGGTGC-3'		
5'RACE-Nested PCR	NUP	5'-AAGCACTGGTATCAACGCCAGAGT-3'	DR-2	5'-GTGATCACATTGGCTTAGCATGGTGC-3'	58
Expression <i>FAdes</i>	DT-F	5'-GCATGACTTCGGTCATCTGTCAAG-3'	DT-R	5'-GCTGATGGTTATAGGGCATGTTTC-3'	55
Expression <i>b-actin</i>	BT-F	5'-AGAGAGAAATTGTCCCGTGACATC-3'	BT-R	5'-CTCCGATCCAGACAGAGTATTG-3'	56

ຕາວອັດ 5 ລ່ວມມອງທີ່ນຳກາຊື້ກໍາອົກຈະອົກຫຼັງການປຸດງົມໃໝ່ໄລ້ *FAelon*

PCR reaction	Primer name	Forward primer name	Primer name	Reverse primer name	Annealing Temperature (°C)
RT-PCR	EF-1	5'-CMTGGATGGDCCMAGAGAT-3'	ER-1	5'-AGSCCRTARTAVGARTACAT-3'	53
3'RACE	EF-2	5'-GAACTGGGTGCCATGTGGACAGTCC-3'	AUAP	5'-GCCACGGCTGACTAGTAC-3'	56
5'RACE-PCR	UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	ER-2	5'-GCCCATCACACGATCAGGAGGTAC-3'	60
5'RACE-Nested PCR	NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAAACGCAGAGT-3'	ER-2	5'-GCCCATCACACGATCAGGAGGTAC-3'	60
Expression <i>FAelon</i>	ET-F	5'-GAACTGGGTGCCATGTGGACACTCC-3'	ET-R	5'-CTGATCTGGAAATACAGCCAACCC-3'	58
Expression <i>b-actin</i>	BT-F	5'-AGAGAGAAATTGTCCCGTGACATC-3'	BT-R	5'-CTCCGATCCAGACAGAGTATTG-3'	56

3.1.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไฮด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี RT-PCR

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไฮด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* จากตัวอย่าง Total RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อดับปลาคุอกุย โดยใช้ Forward primer และ Reverse primer DF-1 และ DR-1 สำหรับยีน *FAdes* และ ไพรเมอร์ EF-1 และ ER-1 สำหรับยีน *FAelon* (ตารางที่ 4) วิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR โดยเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาปรามาตร 20 ไมโครลิตร ตามวิธีการจากชุดคิท SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum®Taq (Invitrogen) ประกอบด้วย 2x reaction mix 10 ไมโครลิตร, 10 uM forward primer 0.4 ไมโครลิตร, 10 uM reverse primer 0.4 ไมโครลิตร, Total RNA 1 ไมโครกรัม, Superscript III 0.8 ไมโครลิตร และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปรับปรามาตรให้ครบ 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณโดยตั้งโปรแกรมสำหรับการศึกษาดังนี้ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที และอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที อุณหภูมิ Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาใน *FAdes* และอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาใน *FAelon* อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิสุดท้าย 68 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็ก tro โฟร์ซีสในอะกาโรสเจล ความขึ้นขัน 1 เบอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นกับ 100 bp DNA marker (invitrogen) โดยใช้ความต่างสักยีไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator และสกัด PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์ นำไปผ่านกระบวนการไลแกชั่น โคลนนิ่ง และตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไฮด์ จากนั้นนำนิวคลีโอไฮด์ที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำพาะของยีนสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไฮด์ทางด้านปลาย 3' และ 5' ต่อไป

3.1.5 การสกัดผลผลิตพีซีอาร์จากอะกาโรส ให้บริสุทธิ์

สกัด PCR product จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุดคิท FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (FAVORGREN Biotech CORP) โดยนำแผ่นอะกาโรสเจลตรวจแอน PCR product ภายใต้เครื่อง UV transilluminator จากนั้นตัดชิ้นส่วนของ PCR product ที่ตำแหน่งเป้าหมายลงใน Eppendorf tube 1.5 มิลลิลิตร เติม FADF Buffer 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่างผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือจนกว่าชิ้นเจลจะละลายหมด จากนั้นนำมาพักให้เย็น เตรียมหลอด FADF Column วางในหลอด Collection tube ฉุดสารละลายตัวอย่างประมาณ 800 ไมโครลิตร ที่เย็นแล้วลงในหลอด FADF Column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน Collection tube ทิ้ง เติม Wash Buffer

750 ไมโครลิตรลงใน FADF Column นำไปปั่นให้ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสาระละลายที่อยู่ใน Collection tube ทึ้ง นำไปปั่นให้ยงอีกรั้งด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำหลอด FADF Column วางใน Eppendorf tube 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 40 ไมโครลิตร หยดลงกลางหลอด FADF Column ตั้งทึ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นให้ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.6 ปฏิกิริยาไอลเกชัน (Ligation)

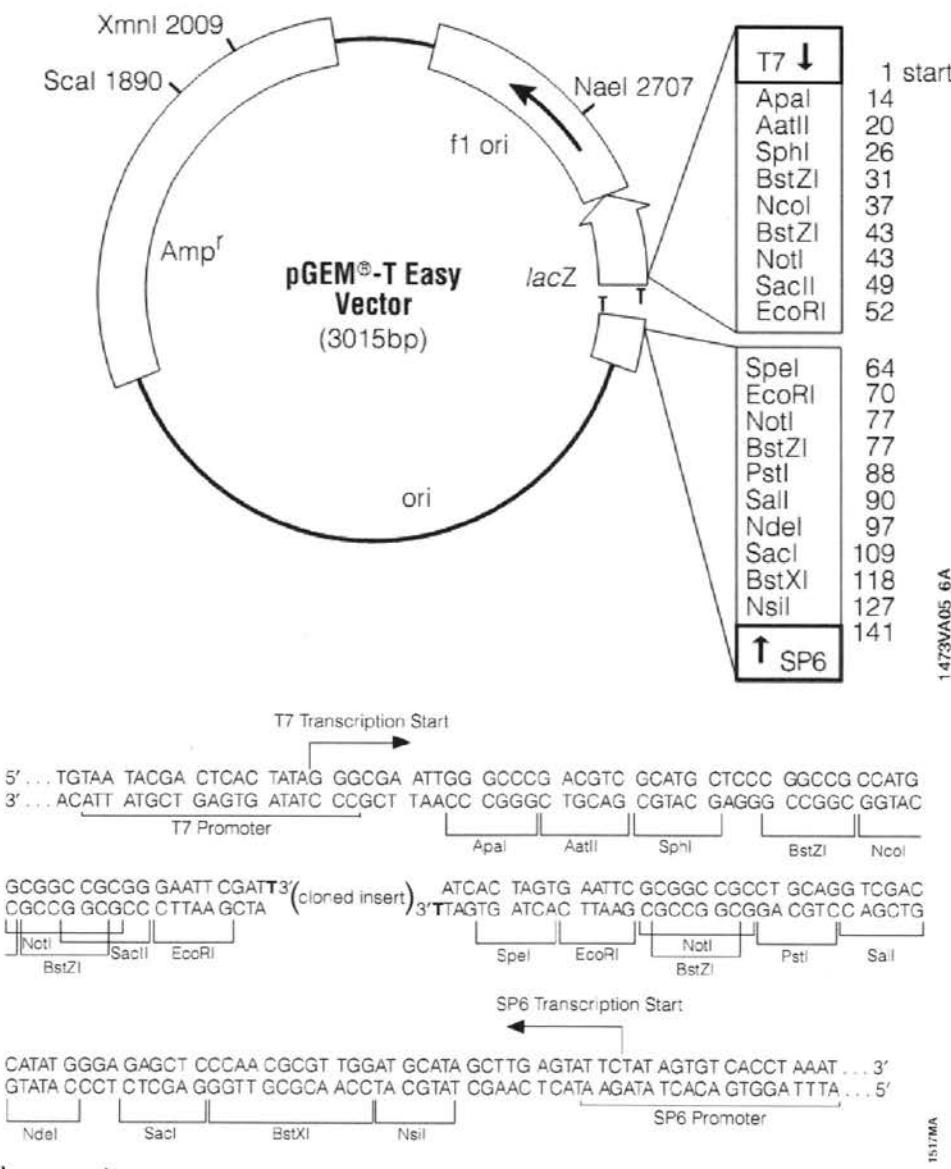
เตรียมสารละลายในการเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy Vector (Promega) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x reaction buffer 5 ไมโครลิตร, pGEM-T vector 1 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร, PCR product 3 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง ข้ามคืน (Overnight) จากนั้นเก็บด้วยห้องเวกเตอร์ลูกผสมไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3.1.7 การ转化ฟอเมชัน (Transformation)

นำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่ Competent cell : *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM 109 ด้วยวิธี Heat shock transformation โดยนำ Competent cell 30 ไมโครลิตร ที่แช่ -80 องศาเซลเซียส วางบนน้ำแข็งให้ละลาย จากนั้นนำเวกเตอร์ลูกผสม 3 ไมโครลิตร ผสมลงไปใน Competent cell แล้วด้วยห้องย่างไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำหลอดด้วยห้องย่างมาแช่ในอ่างแช่ (Incubator) ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (SOC media) 250 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง เพื่อนำไปโคลนนิ่งต่อไป

3.1.8 การโคลนนิ่ง (Cloning)

นำแบนค์ที่เรียกว่าเวกเตอร์ที่ผ่านกระบวนการ transformation ฟอเมชันมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (LB agar) โดยเตรียมอาหารที่ผสมยาปฎิชีวนะแอนพิซิลลิน (Ampicillin) สารละลาย IPTG 4 ไมโครลิตร และสารละลาย X-gal 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นคัดสารละลายแบนค์ที่เรียกว่าเวกเตอร์ 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบโคลนนิ่งเซลล์แบนค์ที่เรียกโดยพลาสมิดที่ไม่มีชีนส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการจะมีโคลนนีที่เป็นสีฟ้า ส่วนโคลนนีที่มีสีขาวแสดงว่าเป็นเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่มีชีนดีเอ็นเอที่ต้องการนำเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนทำการคัดเลือกโคลนนี



ภาพที่ 5 แผนที่ของ pGEM[®]-T Easy Vector และลำดับนิวคีโอลิคของพลาสมิดเวกเตอร์

pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)

3.1.9 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

กัดเลือกโภคไลน์ที่มีสีขาว (Blue-white colony screening) ประมาณ 3 โภคไลน์มาเลี้ยงในหลอดแก้วที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth) 2 มิลลิลิตร ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิชิลิน 4 ไมโครลิตร บ่มในอ่างแขกหกหน่วย 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างออกมานักด้วยชุดคิท FavorPrepTM Plasmid DNA Extraction Mini Kit (FAVORGREN

Biotech CORP) ดูดแบนกที่เรีย 2 มิลลิลิตร ลงใน Eppendorf tube นำไปปั่นเหวี่งที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทึ้ง เติม FAPD1 Buffer ที่เติม RNase A 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม FAPD2 Buffer 200 ไมโครลิตร กลับหลอด Eppendorf tube 10 ครั้ง ตั้งทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที เติม FAPD3 Buffer 300 ไมโครลิตร กลับหลอด Eppendorf tube 10 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่งเร็วที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการวางหลอด FAPD Column ในหลอด Collection Tube แล้วดูดส่วนไขของสารละลายอย่างระมัดระวังลงใน FAPD Column นำไปปั่นเหวี่งเร็วที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสในหลอด Collection Tube ทึ้ง เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตร ลงในหลอด FAPD Column นำไปปั่นเหวี่งเร็วที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสในหลอด Collection Tube ทึ้ง เติม Wash Buffer ที่เติม Ethanol 600 ไมโครลิตร ลงในหลอด FAPD Column นำไปปั่นเหวี่งเร็วที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสในหลอด Collection Tube ทึ้ง ปั่นเหวี่งเร็วอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำหลอด FAPD Column วางในหลอด Eppendorf tube เติม Elution Buffer 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางหลอด FAPD Column ตั้งทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่งเร็วที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บคัวย่างพลาสมิดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.1.10 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยวิธี PCR

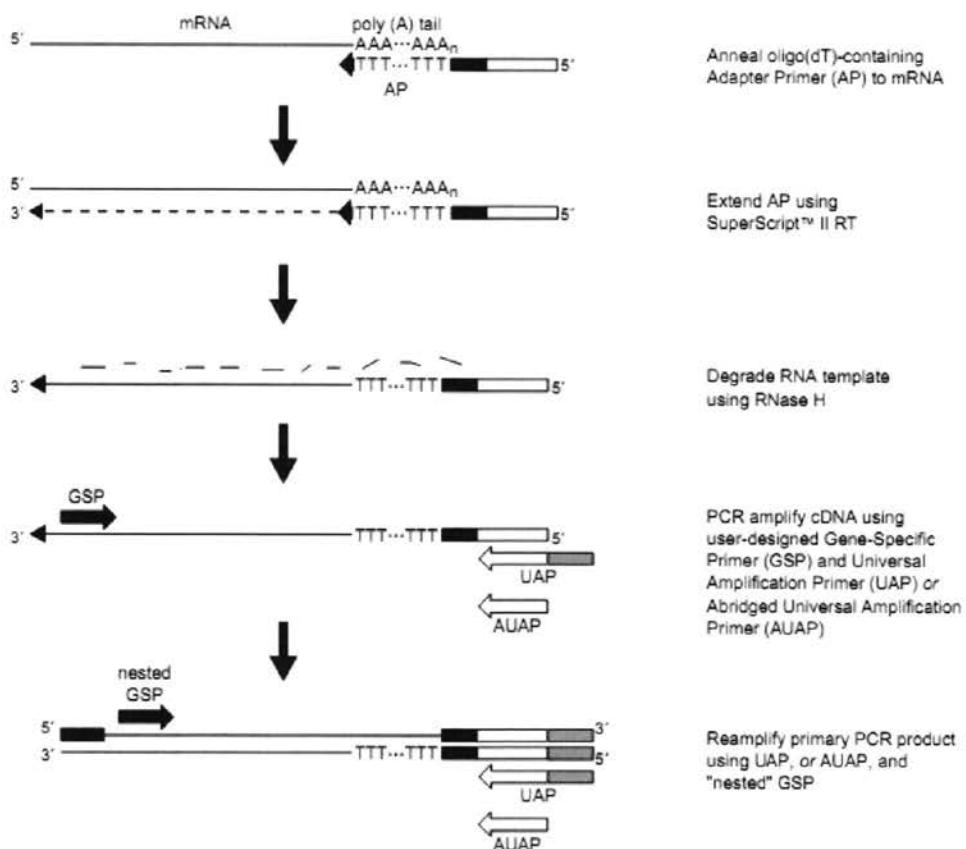
นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มารวบรวมลงในหลอดด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DF-1 และ DR-1 สำหรับยีน *FAdes* และไพรเมอร์ EF-1 และ ER-1 สำหรับยีน *FAelon* (ตารางที่ 4) โดยเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีชีอาร์บีเมต้าร์ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM forward 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM reverse 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5U/μl) ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร, พลาสมิดดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาณครบ 25 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยดึงโปรแกรมสำหรับการศึกษาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยโปรแกรมเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับยีน *FAdes* และอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับยีน *FAelon* อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็ก tro ไฟฟ์ชีสในอุตสาหกรรม เทคนิคความเร็วเข้มข้น 1 เบอร์เซนต์ เปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp DNA marker (Invitrogen) โดยใช้ความต่างสกัดไฟฟ์ 100 วอลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณ 10 ไมโครลิตร เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

3.1.11 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

เตรียมพลาสมิดีอีนเอป्रิมัต 10 ไมโครลิตร เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Macrogen โดยใช้ไฟรเมอร์ Sp6 ที่มีความเฉพาะกับเวคเตอร์ จากนั้นเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำมาตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.13 ทำการตัดเวคเตอร์ด้วยโปรแกรม Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน FAdes และ FAelon ด้วยโปรแกรม BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการออกแบบไฟรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน FAdes และ FAelon ทางด้านปลาย 3' และ 5' ต่อไป

3.1.12 การสังเคราะห์ First strand cDNA (3'RACE cDNA)

สร้างสาย First-strand cDNA ตามวิธีการจากชุดคิท 3' Rapid Amplification of cDNA Ends ของบริษัท Invitrogen นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อยื่อตับปลาดุกอุย 1 ไมโครกรัม ผสมกับน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 11 ไมโครลิตร เติมไฟรเมอร์ 10 μ M AP 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมาวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 10x PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร และ 0.1 M DDT 2 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ SuperScript II reverse transcriptase 1 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงโดยนำมาระบายน้ำแข็ง จากนั้นเติม RNase H 1 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บตัวอย่างไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 แผนภาพกระบวนการ 3'RACE (Invitrogen)

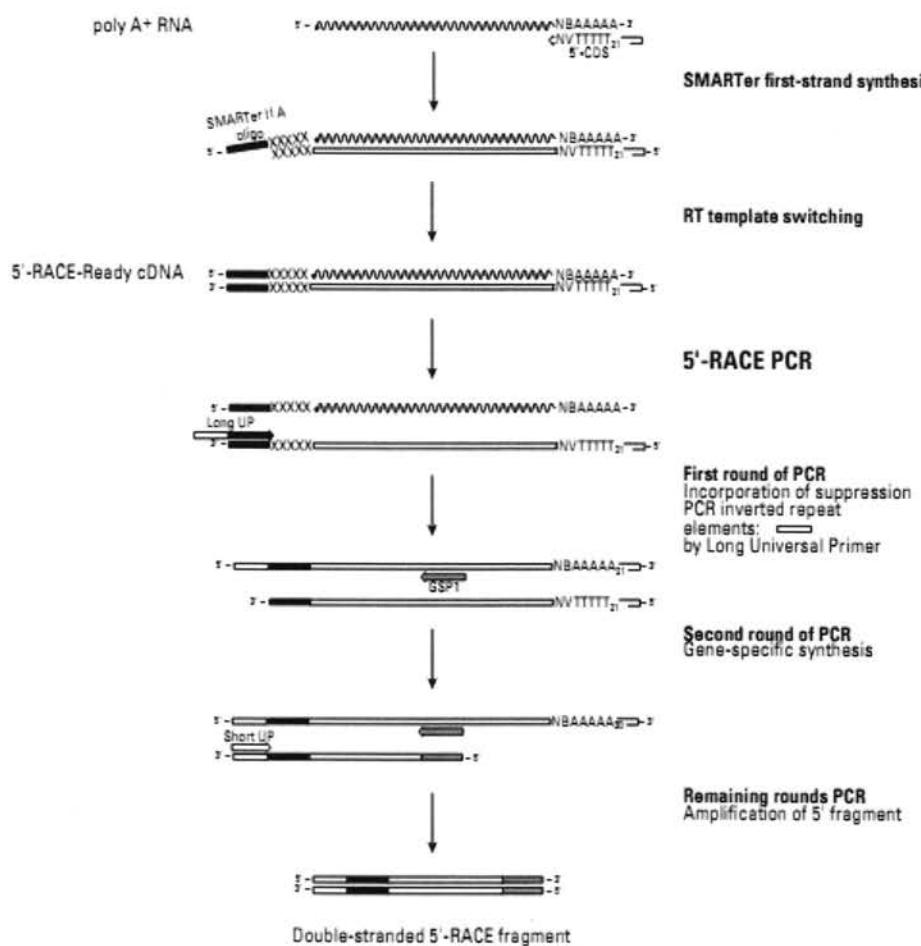
3.1.13 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี 3'RACE-PCR

เตรียม cDNA เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี 3'RACE-PCR โดยใช้ไฟรเมอร์ DF-2 (Forward primer) สำหรับการศึกษายีน *FAdes* และ EF-2 (Forward primer) สำหรับการศึกษายีน *FAelon* ที่ออกแบบได้จากบริเวณที่จำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR และใช้ไฟรเมอร์ AUAP (Reverse primer) จากชุดคิท 3'RACE-PCR ของบริษัท Invitrogen (ตารางที่ 4) เตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมาณตัวอย่าง 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM forward 0.5 ไมโครลิตร, 10 μM reverse 0.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (2U/ul) 0.25 ไมโครลิตร, cDNA (3'RACE cDNA) 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาณด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาณครบ 25 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมสำหรับการศึกษาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยโปรแกรม

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาใน *FAdes* และอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาใน *FAelon* อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็ก tro PCR ในการต่อสequel ความเข้มข้น 1 เบอร์เซ็นต์ เมริยันเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp DNA marker (Invitrogen) โดยใช้ ความต่างสักคีย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator และสกัด PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์ และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วยวิธี nested PCR อีกครั้งโดยใช้ไฟรเมอร์ชุดเดียวกัน และสกัด PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์นำไปผ่านกระบวนการไลแกชั่น โคลนนิ่ง และตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.1.14 การสังเคราะห์ First strand cDNA (5'RACE-cDNA)

สร้างสาย First-strand cDNA ตามวิธีการจากชุดคิท SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit ของบริษัท Clontech โดยนำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับปลาดุกอย 1 ไมโครกรัม ผสมกับไฟรเมอร์ 5'CDS primer A 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตร 3.75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ลดอุณหภูมิลง 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็น และนำไปบ่ม เทวียงเร็ว 10 วินาที วางบนน้ำแข็งติม SMART IIA oligo 1 ไมโครลิตร และเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 5x First strand buffer 2 ไมโครลิตร, 20 mM DTT 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร, RNase inhibitor (40 U/ไมโครลิตร) 0.25 ไมโครลิตร และ SMARTScribe reverse transcriptase (100 U) 1 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไมโครไปเปตคุณสารขึ้นลงให้เข้ากันจะได้ ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มเทวียงเร็ว และบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ในเครื่อง thermal cycler เพิ่มความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตัวอย่างด้วย Tricine-EDTA buffer 100 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่าง 5' RACE cDNA ไว้ที่ตู้แช่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็น Template ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธีการ 5'RACE-PCR ต่อไป



ภาพที่ 7 แผนภาพกระบวนการ 5'RACE (Clontech)

3.1.15 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี 5'RACE-PCR

เตรียม cDNA เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี 5'RACE-PCR โดยใช้ ไฟรเมอร์ DR-2 (Reverse primer) สำหรับการศึกษา yein *FAdes* และ ER-2 (Reverse primer) สำหรับ การศึกษา yein *FAelon* ที่ออกแบบได้จากนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR และใช้ไฟรเมอร์ UPM (Forward primer) จากชุดคิท SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit ของบริษัท Clonetech (ตารางที่ 4) เตรียม องค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมาณ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR-greade water 17.25 ไมโครลิตร, 10x Advantage 2 PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร , 50x Advantage 2 polymerase 0.5 ไมโครลิตร, 5'RACE-cDNA 1.25 ไมโครลิตร, 10x UPM primer 2.5 ไมโครลิตร และ Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมสำหรับการศึกษาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาใน *FAdes* และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ Annealing 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็ก tro ไฟฟ์รีสในของการโรมเจล ความเข้มข้น 1 เบอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp DNA marker (Invitrogen) โดยใช้ความต่างศักยภาพไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator และสกัด PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์ และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี 5'RACE-nested PCR

3.1.16 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* และ *FAelon* ด้วยวิธี

5'RACE-Nested PCR

นำ PCR product ที่ได้จากปฏิกริยา 5'-RACE-PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี 5'RACE-Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DR-2 (Reverse primer) สำหรับการศึกษาใน *FAdes* และ ER-2 (Reverse primer) สำหรับการศึกษาใน *FAelon* และใช้ไพรเมอร์ NUP (Forward primer) จากชุดคิท SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit ของบริษัท Clonetech (ตารางที่ 4) เตรียมองค์ประกอบของปฏิกริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR-grade water 17.25 ไมโครลิตร, 10x Advantage 2 PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร, 50x Advantage 2 polymerase 0.5 ไมโครลิตร, PCR product 1.25 ไมโครลิตร, 10x UPM primer 2.5 ไมโครลิตร และ Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมสำหรับการศึกษาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาใน *FAdes* และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ Annealing 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็ก tro ไฟฟ์รีสในของการโรมเจล ความเข้มข้น 1 เบอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ 100 bp DNA marker (invitrogen) โดยใช้ความต่างศักยภาพไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator และสกัด PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์ และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วยวิธี nested PCR อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกัน และสกัด PCR product ที่ได้ให้บริสุทธิ์นำไปผ่านกระบวนการไลแกชั่น โคลนนิ่ง และตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อปลาคุกอย (Tissue distribution)

3.2.1 ปลาคุกอยที่ใช้ในการศึกษา

สูมตัวอย่างปลาคุกอยน้ำหนักเฉลี่ย 9.16-10.39 กรัมต่อตัว จำนวน 3 ตัว นำมาแยกเนื้อเยื่อ ได้แก่ เหงือก ทางเดินอาหาร ม้าม สมอง ต่อมใต้สมอง กล้ามเนื้อ และตับ โดยแยกเนื้อเยื่อลงใน Eppendorf tube เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแต่ละเนื้อเยื่อมาสักด้วย Total RNA ด้วย Trizol reagent (Invitrogen) นำมาสร้าง cDNA และศึกษาการแสดงออกของยีนในแต่ละเนื้อเยื่อด้วยวิธี Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

3.2.2 การสร้างกระแทก cDNA จาก Total RNA

สร้าง cDNA ตามวิธีการจากชุดคิท ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) โดยเตรียม Total RNA ของแต่ละเนื้อเยื่อ 1 ไมโครกรัม ผสมกับ Primer oligo (dT)₁₅ 0.25 ไมโครกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นให้เร็ว 10 วินาที จากนั้นเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย ImProm-II™ 5X Reaction Buffer 2 ไมโครลิตร, 1.5 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 0.5 mM dNTP mix 0.5 ไมโครลิตร, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (10 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร) 0.25 ไมโครลิตร, ImProm-II™ Reverse Transcriptase 0.5 ไมโครลิตร และ Nuclease-Free Water ปรับปริมาตรสารละลายสุดท้ายเท่ากัน 7 ไมโครลิตรผสมให้สารละลายเข้ากัน นำไปปั่นด้วยเครื่อง Thermal cycle ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำ cDNA ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น Template ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในแต่ละเนื้อเยื่อต่อไป

3.2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อปลาคุกอย

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในแต่ละเนื้อเยื่อด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DF-T (Forward primer) และ DR-T (Reverse primer) สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และไพรเมอร์ EF-T (Forward primer) และ ER-T (Reverse primer) สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAelon* ที่ออกแบบได้จากบริเวณที่จำเพาะของสายนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *FAdes* และ *FAelon* (ตารางที่ 4) เตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 1.0 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 0.8 ไมโครลิตร, 10 μM forward primer 0.4 ไมโครลิตร, 10 uM reverse primer 0.4 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร, cDNA template 0.4 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal

cycler โดยตั้งโปรแกรมสำหรับการศึกษาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 30 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAelon* อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีอิเล็ก tro-ฟอร์เมซินในอุปกรณ์ PCR เครื่อง เปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA marker (Invitrogen) โดยใช้ความต่างศักยภาพฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำมาตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อ

3.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุยหลังจากได้รับอาหารที่มีแหล่งการได้มาจากการพืชที่แตกต่างกันในแต่ละเดือน

3.3.1 ปลาดุกอุยที่ใช้ในการศึกษา

ปลาดุกอุยที่ใช้ในการทดลอง ได้จากการเพาะด้วยวิธีการผสมเทียม จากฟาร์ม ประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และทำการอนุบาลในบ่อคิน ด้วยอาหารปลา ดุกขนาดเล็ก โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จนมีอายุ 3 เดือน จากนั้นทำการสุ่มคัดปลาหนังก เคลื่อนเริ่มต้น 9.8 ± 0.37 กรัมต่อตัว จำนวน 630 ตัว แบ่งลงในกระชังทดลองขนาด $1 \times 1 \times 1.2$ เมตร ทำ ด้วยตาข่ายในล่อนถักตาถัก 16 ตาต่อตารางนิ้ว จำนวน 21 กระชัง ตั้งอยู่ในบ่อขนาด 40×40 เมตร โดย มีอัตราการปล่อย 30 ตัวต่อกระชัง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำที่ระดับความลึกของน้ำที่ 30 เซนติเมตร เดือนละ 2 ครั้ง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 พารามิเตอร์ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

พารามิเตอร์	อุปกรณ์
ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ละลายน้ำ (ppm O ₂)	เครื่องวัดคุณภาพน้ำหลายตัวแปร (YSI-556 MPS)
ความเป็นกรดเป็นด่าง	เครื่องวัดคุณภาพน้ำหลายตัวแปร (YSI-556 MPS)
ความเป็นด่าง (ppm as CaCO ₃)	Titrimetric to pH = 4.5
แอนโโนเนียมที่เป็นพิษ (ppm NH ₃ -N)	Phenate spectrophotometric
ไนโตรท (ppm NO ₂ ⁻ -N)	Sulphanilamide spectrophotometric
ไนเตรท (ppm NO ₃ ⁻ -N)	Cadmium reduction spectrophotometric
อุณหภูมิของน้ำ (°C)	เครื่องวัดคุณภาพน้ำหลายตัวแปร (YSI-556 MPS)

3.3.2 วัตถุ din อาหารทดลอง

3.3.2.1 ปลาป่น

3.3.2.2 กากถั่วเหลือง

3.3.2.3 รำละเอี๊ยด

3.3.2.4 มันสำปะหลังบด

3.3.2.5 วิตามินและแร่ธาตุ

3.3.2.6 น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันปลาหมึก

3.3.3 อาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองได้จากการออกแบบสูตรอาหารที่มีการใช้น้ำมันจากพืช เป็นแหล่งไขมันที่แตกต่างกัน 7 สูตร (ตารางที่ 7) นำวัตถุ din มาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ความชื้น ไขมัน เยื่อไข และเล้า ตามวิธีการของ AOAC (1995) เพื่อกำหนดสูตรอาหาร โดยกำหนดให้สูตรอาหารทดลองทุกสูตรมีโปรตีนประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และไขมันประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำส่วนผสมของวัตถุ din แต่ละสูตร (ตารางที่ 8) ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องผสมอาหารแบบถังนอน (Horizontal mixer) เติมน้ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ลูกเคล้าให้ส่วนผสมเข้ากันทั้งหมดจากนั้นนำไปอัดด้วยเครื่องบดอาหารแบบมินเชอร์ (Mincer) ผ่านรูหน้ากว้างขนาด 6 มิลลิเมตร อาหารจะมีลักษณะเป็นแท่งยาว นำมาผสานแล้ว และหักให้เป็นห่อห่อเล็กๆ โดยให้มีขนาด 1-2 เซนติเมตร เก็บอาหารไว้ที่ห้องเย็นเพื่อทำการทดลองต่อไป

3.3.4 การวางแผนการทดลอง

จัดแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง (Completely Randomized Design, CRD) โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 7 ชุดการทดลอง (Treatment) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ช้ำ (Replication) โดยชั้งน้ำหนัก และวัดความยาวปลาทดลองก่อนปล่อยลงในกระชังทดลอง ทดลองเลี้ยงปลาดุกอุยก้าวย สูตรอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 5 เดือน โดยให้อาหารในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวปลา วันละ 2 ครั้ง คือเวลา 09.00 น. และเวลา 15.00 น. หลังจากให้อาหารปลาเป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บอาหารเหลือมาอน Häng และชั้งน้ำหนัก เพื่อนำน้ำหนักที่ได้หักจากปริมาณอาหารที่ให้ไปในแต่ละครั้ง เมื่อครบกำหนดการทดลองทุก ๆ 1 เดือน นำปลาทดลองทุกด้วยชั้งน้ำหนัก และวัดความยาวเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโต เมื่อทำการทดลองเลี้ยงจนเสร็จสิ้นระยะเวลา 5 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อปลาดุกอุยกานำไปทำการวิเคราะห์รูปแบบและปริมาณกรดไขมัน ตลอดระยะเวลาของการทดลองทำการควบคุมระดับน้ำให้มีความลึกของน้ำ 1.2 เมตร และตรวจวัดคุณภาพน้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง

ตารางที่ 7 สัดส่วนของแหล่งกรดไขมันจากน้ำมันพืชและน้ำมันปลาหมึก

สูตรอาหาร ทดลอง	จำนวนปลา(ตัว) /กระชัง	สัดส่วนของแหล่งกรดไขมันจากน้ำมันพืชและแหล่ง
		กรดไขมันจากน้ำมันปลาหมึก
1	30	น้ำมันปลาหมึก 100 เปอร์เซ็นต์
2	30	น้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์
3	30	น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์
4	30	น้ำมันถั่วเหลือง 100 เปอร์เซ็นต์
5	30	น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์
6	30	น้ำมันทานตะวัน 100 เปอร์เซ็นต์
7	30	น้ำมันทานตะวันผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 วัตถุดินที่ใช้ในสูตรอาหารทดลอง (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง)

วัตถุดิน	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7
ปลาป่น	35	35	35	35	35	35	35
ากลั่วเหลือง	44	44	44	44	44	44	44
มันสำปะหลัง	8	8	8	8	8	8	8
รำ	7	7	7	7	7	7	7
วิตามินและแร่ธาตุ	2	2	2	2	2	2	2
น้ำมันปลาหมึก	4	0	2	0	2	0	2
น้ำมันปาล์ม	0	4	2	0	0	0	0
น้ำมันถั่วเหลือง	0	0	0	4	2	0	0
น้ำมันพานตะวัน	0	0	0	0	0	4	2

หมายเหตุ วิตามินรวมในอาหาร 1 กก. ประกอบด้วย วิตามินเอ 0.04 ส้านหน่วยสาгал, วิตามินอี 20 หน่วยสาгал, วิตามินเค 4 มก., วิตามินซี 100 มก., กรดโฟลิก 30 มก., เลซิทิน 60 มก., โคลีน 200 มก., วิตามินดี 8 มก. และวิตามินบีรวม 40 มก.

ตารางที่ 9 โภชนาคมีอาหารลดลงจากภาระ (ประโยชน์ต่อบาหมี่หนักแน่น)

วัตถุใน	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6	สูตร 7
โปรตีน (ประโยชน์ต่อ)	49.22±0.08 ^{ns}	49.38±0.54 ^{ns}	49.37±0.23 ^{ns}	49.27±0.11 ^{ns}	49.53±0.11 ^{ns}	49.27±0.03 ^{ns}	49.27±0.05 ^{ns}
โปรตีน (ประโยชน์ต่อ)	8.04±0.08 ^{ns}	8.05±0.01 ^{ns}	8.00±0.03 ^{ns}	8.01±0.02 ^{ns}	8.01±0.01 ^{ns}	8.00±0.06 ^{ns}	8.02±0.05 ^{ns}
ไขมัน (ประโยชน์ต่อ)	14.17±0.05 ^{ns}	14.06±0.13 ^{ns}	14.02±0.05 ^{ns}	14.06±0.12 ^{ns}	14.08±0.13 ^{ns}	14.03±0.20 ^{ns}	14.10±0.11 ^{ns}
ความชื้น (ประโยชน์ต่อ)	3.49±0.14 ^{ns}	3.45±0.09 ^{ns}	3.50±0.11 ^{ns}	3.46±0.08 ^{ns}	3.36±0.06 ^{ns}	3.38±0.11 ^{ns}	3.42±0.06 ^{ns}
เกล้า (ประโยชน์ต่อ)	13.40±0.04 ^{ns}	13.38±0.04 ^{ns}	13.41±0.09 ^{ns}	13.39±0.04 ^{ns}	13.39±0.02 ^{ns}	13.37±0.07 ^{ns}	13.43±0.04 ^{ns}
ผลิตงานที่อยู่ได้ (กิโลแคลอรี่/กิโลกรัม) ¹	290.43±0.02 ^{ns}	291.11±1.32 ^{ns}	290.77±1.12 ^{ns}	290.67±0.23 ^{ns}	291.27±0.01 ^{ns}	290.94±0.89 ^{ns}	290.63±0.69 ^{ns}

หมายเหตุ

¹ พลังงานที่อยู่ได้ = (ประโยชน์ต่อรดิน x 4.0) + (ประโยชน์ต่อไขมัน x 8.0) + (ประโยชน์ต่อ NFE x 2.5)

ประโยชน์ต่อ NFE = 100 - (ประโยชน์ต่อปรติน + ประโยชน์ต่อไขมัน + ประโยชน์ต่อเยื่อ + ประโยชน์ต่อตัวตน) (NRC, 1983)

ns บวกกันในแนวนอนแสดงถึงค่าที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

3.3.5 การเตรียมตัวอย่าง Total RNA

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาทดลองจำนวน 3 ตัวต่อชุดการทดลอง ทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 5 เดือน นำมาแยกเนื้อเยื่อที่ใช้สำหรับทำการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยแยกเนื้อเยื่อเก็บไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาสกัด Total RNA และเตรียมสาย cDNA ตามวิธีการตามวิธีการจากชุดคิท ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) เพื่อใช้เป็น Template ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในขั้นตอนต่อไป

3.3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในแต่ละเดือนหลังจากได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกัน

เตรียม cDNA ที่ได้จากการ จากชุดคิท ImProm-II™ Reverse Transcription System นำมาศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* เทียบกับยีน *b-actin* เป็นยีนอ้างอิงมาตรฐาน (ตารางที่ 4) ในการวิเคราะห์การแสดงออก โดยคำนวณการตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.2.3

3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในถั่วเนื้อปลาดุกอุย

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำปลาดุกอุยจำนวน 6 ตัวต่อการทดลอง มาทำให้สลบด้วยน้ำแข็ง ทำการแยกถั่วเนื้อทั้งหมดของปลาจำนวน 100 กรัม วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC)

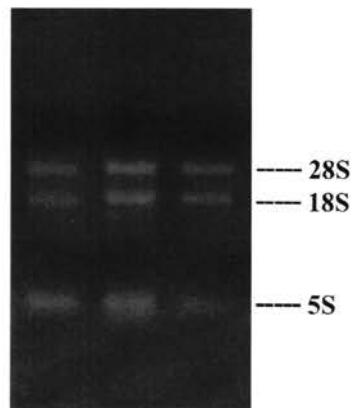
บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 องค์ประกอบของยีน *Fatty acyl desaturase (FAdes)*

4.1.1 ปริมาณ และคุณภาพ Total RNA จากเนื้อเยื่อตับ

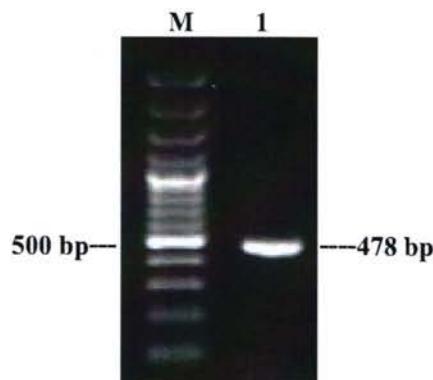
ตัวอย่าง Total RNA ที่ได้จากการสกัดจากเนื้อเยื่อตับปลาดุกอุย เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.78-2.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาตรวจสอบคุณภาพโดยใช้เจลอะกาโรส (Agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายน้ำ 1x TBE buffer สามารถแยกขนาด 28S และ 18S rRNA ได้ชัดเจน (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับปลาดุกอุย

4.1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* จากปฏิกิริยา RT-PCR

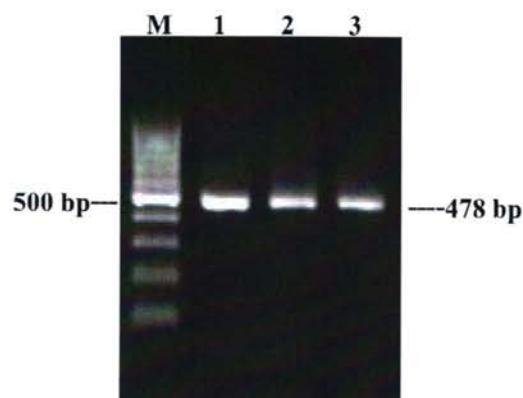
เมื่อนำ Degenerate forward primer (DF1) และ Degenerate reverse primer (DR1) ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR คำนวณการตามชุดคิทของบริษัท Invitrogen โดยใช้ Total RNA ที่สกัดจากตับของปลาดุกอุยเป็นต้นแบบพบว่า ผลผลิต PCR มีความยาว 478 คู่เบส (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา RT-PCR ของยีน *FAdes* (M) 100 bp DNA marker,

(1) ผลผลิต PCR

หลังจากสกัดผลผลิต PCR แล้ว นำไปผ่านกระบวนการขบวนการไลเกชั่น, โคลนนิ่ง, และทราบส์ฟอยเมชั่น เพื่อให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอ และนำไปทดสอบคุณภาพ PCR (ภาพที่ 10) เพื่อยืนยันผลผลิตก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)



ภาพที่ 10 พลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *FAdes* ที่ตรวจสอบคุณภาพ PCR (M) 100 bp DNA marker,

(1-3) ผลผลิต PCR

เมื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชั่น 2.33 และทำการตัดเฉพาะร่องสายนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Vecscreen พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* จากปฏิกริยา RT-PCR มีความยาว 478 คู่เบส (ภาพที่ 11) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Blastx พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *FAdes* ในปลาเทโพ

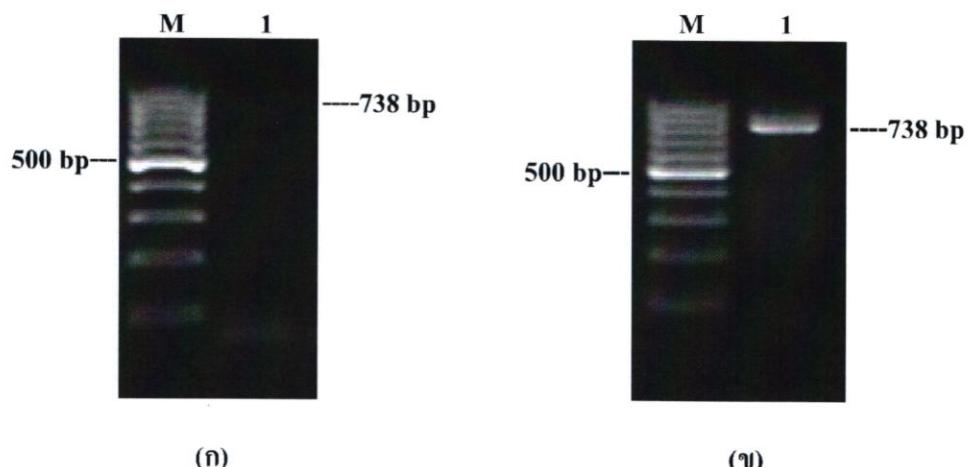
(*Pangasius larnaudii*, KC994461) 94 เปอร์เซ็นต์, ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*, JX035811) 90 เปอร์เซ็นต์, ปลาแซลมอน (*Salmo salar*, GU29489) 70 เปอร์เซ็นต์ และปลานิล (*Oreochromis niloticus*, KF268464) 70 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำไปเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ด้วยวิธีการ 3' RACE-PCR และ 5' RACE-PCR ต่อไป

```
5' AGCATGACTTCGGTCATCTGCAGTCTTAAAAATTCCACCTGGGATCACATTGTGCA  
TAAATTGTCATTGGACACCTGAAGGGGGCTTCTGCAAATTGGTGGAACATCGGCAC  
TCAGCACCAGCTAAGCCAATGTGATCACTAAGGACCTGATGTCAACATGATTAAC  
ACTGGTCTGGAAACATCCTGCCTGTTGAGTATGGGTTAAAAGGTGAAGAACATGCC  
CTATAACCACATCAGCACAAGTACTTCTTTGATTGGCCCTCCCCTGCTCATACCC  
CTTCAACCTACACATTTGCAAACATATGTATTACAACGGGATTGGGTGGATT  
GTATCTGTCCTCTATGCACGTTACCTCTCGTGTATGTTCCCTATTATGGAATT  
TTCTTGTTGGTGTCTGACTTTGTAAGGTTCTAGAGAGTCACTGGTTGTATGGGTGAC 3'
```

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* จากปฏิกริยา RT-PCR

4.1.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* ปลาย 3' (3' end)

สาย First-strand cDNA จาก Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อด้านของปลาดุกอุบลรัตน์ นำมาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 3' โดยสังเคราะห์ First-strand cDNA ตามวิธีการ 3'RACE (Invitrogen) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ "พรเมอร์ที่จำเพาะของยีน *FAdes* กีอี DF-2 (Specific forward primer) ร่วมกับ AUAP จากชุดคิท หลังจากตรวจสอบแคนดี้เอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีของการโรสเจลอิเล็ก tro ไฟรีซิส ปรากฏแคนดี้เอ็นเอที่มีความยาว 738 คู่เบส (ภาพที่ 12-ก) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากองค์การโรสเจลให้ บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Nested PCR อีกครั้งโดยใช้พรเมอร์ชุดเดียวกัน พบว่าผลผลิต PCR มีความยาว 738 คู่เบส (ภาพที่ 12-ข)

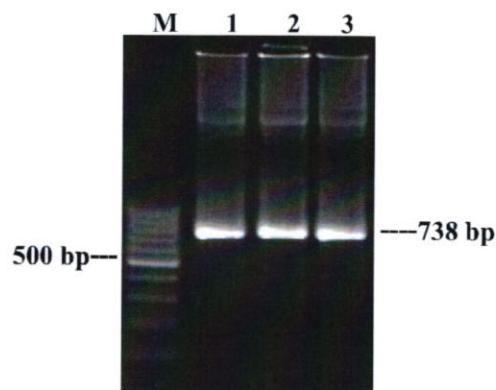


ภาพที่ 12 ผลผลิต PCR ของยีน *FAdes* ปลาย 3'

(ก) ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา PCR (M) 100 bp DNA marker. (1) ผลผลิต PCR

(ข) ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา nested PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากօรงไรஸเจลให้บริสุทธิ์ นำผลผลิต PCR ไปผ่านกระบวนการขบวนการไลเกชั่น, โคลนนิ่ง, และ ทรานส์ฟอร์เมชั่น เพื่อให้ได้พลาสมิด ดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 13) เพื่อยืนยันผลผลิตก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 13 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR (M) 100 bp DNA marker, (1-3) ผลผลิต PCR

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR มาตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.33 ทำการตัดเวกเตอร์ของสายนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบร่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* จากปฏิกิริยา 3'RACE-PCR มีความยาว 738 คู่เบส (ภาพที่ 14) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน

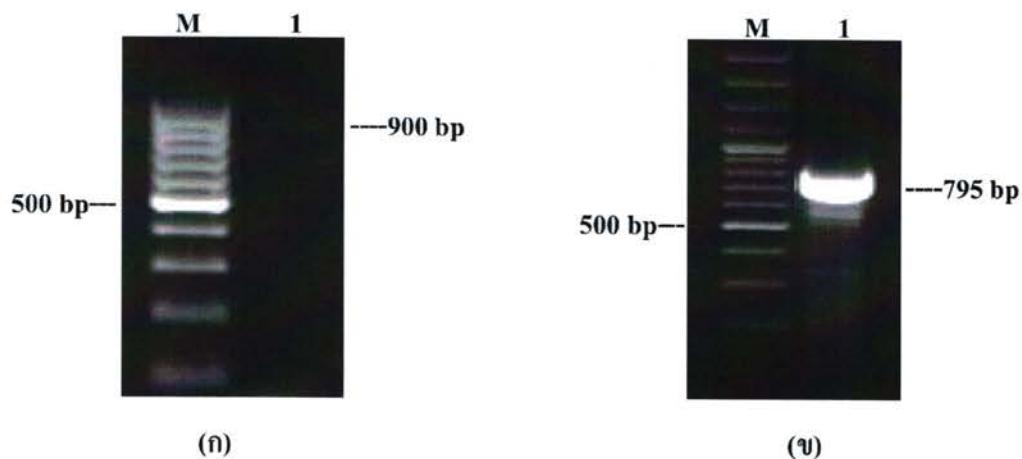
ฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Blastx พนวันนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *FAdes* ในปลาชนิดอื่น ได้แก่ ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*, KC994461) 99 เปอร์เซ็นต์, ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*, JX035811) 92 เปอร์เซ็นต์, ปลานิล (*Oreochromis niloticus*, KF268464) 76 เปอร์เซ็นต์ และปลากระพง (*Lates calcarifer*, GU047383) 75 เปอร์เซ็นต์

```
5' CACGTTACCTCTCGTCTATGTTCCCTATTATGGAATTCTGGGTTCTTGCTTCT  
GACTTTGTAAGGTTCTAGAGAGTCAGTGGTTGTGGGTGACCCAAATGAACCACAT  
TCCCAGGACATTGACCATGACAAAAATGATGACTGGCTCAGCATGCAGTTGAAAGCTAC  
TTGTAATATTGAGCAGTCGCCATTCAACGATTGGTCAGTGGCCACCTTAACCTTCAGAT  
TGAACACCATCTCTTCCCAGTGCCTCGCCATAACTATAGCCGTGCAGCTCCTCATGT  
ACAAAAACTTGTGAGAAGTATGGTGTGTATCAGGTCAAAGGCCGTGGGAATCCTG  
GTGTGACATTGTCACGTCTTGAAGAAGTCTGGTAGCTGGCTAGATGCATAACCTCCA  
CAAATAATCATCTCCTGTTTCCCTCAGTGCCTGTTCAAACATATATACATTGTA  
ACCACAGTTCAACAATATTGACCTAGGATTTAATTAAATACAGGAATATCCATAACAA  
TTCTGAAATTCACATGTTAACCTCATGTTATATCTGTCCATATGCTGGAACATAATGT  
GGTATTTGGTACTTTATTGTAAGTGAATTGGGACCACAGATCTCTTGAATGAAAAT  
GTTTTTTATCTTCCATGCTGTTGTTACTCCGACACAAATAAAATCAAATTATAGTGC  
TGGAAAAAAAAAAAAAA3'
```

ภาพที่ 14 สำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน *FAdes*

4.1.4 สำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* ปลาย 5' (5' end)

สาย First-strand cDNA จาก Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุบ โดยถูกนำมารีโนเวทแบบในการวิเคราะห์สำดับเบสทางด้านปลาย 5' โดยวิธีการ 5'RACE-PCR ผลลัพธ์ที่ได้ถูกนำไปเพิ่มปริมาณยีน *FAdes* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไฟรเมอร์ที่จำเพาะที่ออกแบบจากสำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *FAdes* คือ DR-2 (Specific reverse primer) ร่วมกับ UPM จากชุดคิก หลังจากตรวจสอบแคนดี้อีนเอดดี้วิธีของการโรมสเจลอิเล็ก tro-ฟอร์ซิส ปรากฏแคนดี้อีนเอที่มีความยาว 900 คู่เบส (ภาพที่ 15-ก) จากนั้นสกัดดีอีนเอจากဓาร์มสเจลให้บริสุทธิ์นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Nested PCR อีกครั้งโดยใช้ไฟรเมอร์ DR-2 (Specific reverse primer) ร่วมกับไฟรเมอร์ NUP จากชุดคิก พนวจผลผลิต PCR มีความยาว 795 คู่เบส (ภาพที่ 15-ข)

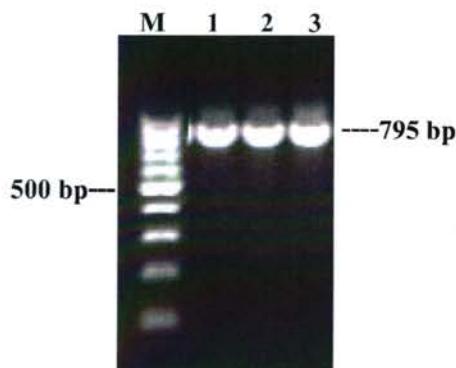


ภาพที่ 15 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน *FAdes*

(ก) ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

(v) ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา nested PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

จากนั้นสกัดดีอีนอาจก่อการโกรสเจลให้บริสุทธิ์นำผลผลิต PCR ไปผ่านกระบวนการขบวนการไลเกชั่น, โคลนนิ่ง, และ ทรานส์ฟอร์เมชั่น เพื่อให้ได้พลาสมิด ดีอีนເອ จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 16) เพื่อยืนยันผลผลิตก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 16 พลาสมิดีเอ็นโซท์ทดสอบด้วยวิธี PCR (M) 100 bp DNA marker, (1-3) ผลผลิต PCR

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR มาตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.33 ทำการตัดเวกเตอร์ของสายนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบร้า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* จากปฏิกิริยา 5'RACE-PCR มีความยาว 795 คู่เบส (ภาพที่ 17) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน

ฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Blastx พบร่วมนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *FAdes* ในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*, JX035811) 90 เปอร์เซ็นต์, ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*, KC994461) 89 เปอร์เซ็นต์, ปลาแซลมอน (*Salmo salar*, GU294489) 73 เปอร์เซ็นต์ และปลากระพง (*Lates calcarifer*, GU047383) 75 เปอร์เซ็นต์

5' ACATGGGGACTGATAACACCGAGGACACGCACTCAGCACGGAGGACTGAGCTCCGTTA
AATGCGCGTCACGTCTACGTGCATGCAAAGAACGGCACCCGAACGAAGAGATGGCGGC
GGAAGACACCGGGGCGAGCAACTGGGGTCAGGAGAGACAAGTTATGCCAAACAGTACACC
TGGGAGGAAGTGCAAGAACACAATCGCAGGGGTGATCAGTGGTTGTGATCGAGAGAAAAA
GTGTACAATGTGACTGAGTGACAAAAAGACATCCTGGAGGACACAGAGTTCTGGCAC
TATGCTGGAGAGGATGCAACGGAAGCCTTACAGCCTCCATCCAGATCAGCGTTTG
CGGAAATACATGAAGCCGCTGCTGGTGGAGAGTTGGCGTCCTCAGAGCCCAGTCAAGAC
CACGGAAAAAACGTTGCTTAGTGGAAAGATTGGAGACTTGCCTAAGCAGTTGGAGGCA
CAGGGCTTATTCCGCACCAGGCCATTGTTTATCCTATATCTTGGCCACATTCTTCTC
TTGGAGGCCCTGTCTTAGCACTACTTGGACATTGGCAATGGCTGGATTATTACAGCA
CTAATATCTGTCACTAGCAACTGCACAGGCTCAGGCTGGATGGCTTCAGCATGACTTT
GGCCATCTGTCAGTCTTAAAAATTCCACCTGGATCACATTGTGCATAAATTGTCATT
GGACACCTGAAGGGGGCTCTGCAAATTGGTGGAACCATCGGCACTTCAGCACCATGCT
AAGCCCAATGTGATCAC3'

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน *FAdes*

4.1.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full length) ของยีน *FAdes*

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ RT-PCR (ตัวอักษรหนา), 3'RACE-PCR (เส้นทึบ) และ 5'RACE-PCR (เส้นประ) นำมาเทียบกันพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *FAdes* ในปลาดุกอุข มีความยาวทั้งหมด 1,760 คู่เบส (ภาพที่ 18)

ACATGGGACTGATAACACCGAGGACACGCACTCAGCACGGAGGACTGAGCTCCGTTAAATGCGCGTCACGT 72
 CTACGTGCATGCAAAGAACGGCACCCGAACGAAGAGATGGGGCCGGAGAACACCCGGCGAGCAACTG 142
 M G G G R H R G E Q L
 GGGTCAGGAGAGACAAGTTCATGCAAACAGTACACCTGGGAGGAAGTGCAGAAACACAATCGCAGGGTGAT 214
 G S G E T S S C K Q Y T W E E V Q K H N R R G D
 CAGTGGGTTGATCGAGAGAAAAGTACAATGTGACTGAGTGGACAAAAGACATCTGGAGGACACAGA 286
 Q W V V I E R K V Y N V T E W T K R H P G G H R
 GTTCTTGGGACTATGCTGGAGAGGATGCAACCGAACGCCCTTACAGCCTTCATCCAGATCAGCGTTGTG 358
 V L G H Y A G E D A T E A F T A F H P D Q R F V
 CGGAAATACATGAAGCCGCTGCTGGAGAGTTGGCTCCTCAGAGCCCAGTCAGAACACCACGGAAAAAAC 430
 R K Y M K P L L V G E L A S S E P S Q D H G K N
 GTTCTTGTGGAGACTTGCAGACTTGCAGTCAGGGCTTACAGCCTTCAGAGCCCAGTCAGAACACCACGGCCA 502
 V A L V E D F E T L R K Q L E A Q G L F R T R P
 TTGTTTTATCCTATATCTGGCCACATTCTCTGGAGGCCCTGTCTTAGCACTACTTTGGACATTT 574
 L F F I L Y L G H I L L E A L S L A L L W T F
 GGCAATGGCTGGATTATTACAGCACTAATATCTGCATACTAGCAACTGCACAGGCTCAGGCTGGATGGCTT 646
 G N G W I I T A L I S V I L A T A Q A Q A G W L
 CACCATGACTTCGGTCATCTGTCAGTCTTAAAAATTCCACCTGGATCACATTGTGCAATAATTGTCATT 718
 Q H D F G H L S V F K N S T W D H I V H K F V I
 GGACACCTGAAGGGGGCTCTGCAAATTGGGAACCATCGGCACCTTCAGCACCATGCTAACGCCATGTG 790
 G H L K G A S A N W W N H R H F Q H H A K P N V
 ATCACTAAGGACCCCTGATGTCACATGATTAACATACTGGCTTGGAAACATCCTGCCCTGTTGAGTATGGG 862
 I T K D P D V N M I N I L V L G N I L P V E Y G
 GTTAAAAAGGTGAAGAACATGCCCTATAACCACAGCACAAGTACTCTTTGATTGGCCCTCCCCCTGCTC 934
 V K K V K N M P Y N H Q H K Y F F L I G P P L L
 ATACCCCTGTACTTCACACATTGCAAACACTATGTATTCAACACGGGATTGGGTTGGATTCGCGCTGG 1006
 I P L Y F N L H I L Q T M Y S Q R D W V D F A W
 TATCTGCTCTATGCACTGCTTACCTCGTCTGCTATGTTCCCTATTATGGAATTCTGGTTCTTGGTGCTT 1078
 Y L S F Y A R Y L S C Y V P Y Y G I L G S L V L
CTGACTTTGTAAAGGTTCTAGAGAGTCACTGGTTGTATGGGTGACCCAATGAACCACATTCCATGGAC 1150
 L T F V R F L E S H W F V W V T Q M N H I P M D
 ATTGACCATGACAAAATGATGACTGGCTCAGCATGCAGTTGAAAGCTACTTGTAAATATTGAGCAGTCGCCA 1222
 I D H D K N D D W L S M Q L K A T C N I E Q S P
 TTCAACGATTGGTTCACTGGCCACCTTAACCTTCAGATTGAACACCACCTCTTCCCATGATGCCCTGCCAT 1294
 F N D W F S G H L N F Q I E H H L F P M M P R H
 AACTATAGCCGTGCAGCTCTCATGTACAAAAACTTGTGAGAAGTATGGTGTGTATCAGGTCAAAGGC 1366
 N Y S R A A P H V Q K L C E K Y G V V Y Q V K G
 CTGTGGGAATCTGGTGTGACATTGTCACTGCTTGAAGAAGTCTGGTGAGCTGGCTAGATGCATAACCTC 1438
 L W E S W C D I V T S L K K S G E L W L D A Y L
 CACAAATAATCATCTCCTGTTTCTTCACTGTGTTCAAAACTATATACATTGTAACCACAGTTC 1510
 H K
AACAATATTGACCTAGGATTTAATTAAATCAGGAATATCCATAACAATTCTGAATTCAACATGTAAATC 1582

CTCATGTTATATCTGTCTATATGCTGAACTAATGTGGTATTTGGTACTTTATTTGTAAGTGAATTGGG 1654

ACCACAGATCTCTTGAATGAAAATGTTTTATCTTCCATGCTGTTGGTACTCCGACACAAATAAAA 1726

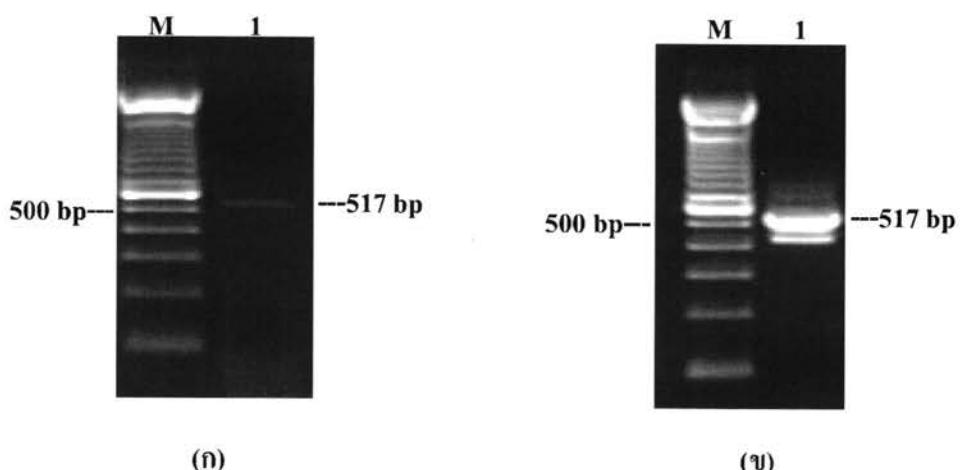
TCAAATTATAGTGCTGGAAAAAAAAAAAAAA 1760

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดและลำดับกรดอะมิโนของยีน *FAdes* ในปลาดุกอุย

4.2 องค์ประกอบของยีน *Fatty acyl elongase (FAelon)*

4.2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* จากปฏิกิริยา RT-PCR

เมื่อนำ Degenerate forward primer (EF1) และ Degenerate reverse primer (ER1) ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR ดำเนินการตามชุดคิทของบริษัท Invitrogen โดยใช้ Total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อตับปลาดุกอยเป็นต้นแบบพบว่าได้อีนเออที่ได้จากการ RT-PCR มีความยาว 517 คู่เบส (ภาพที่ 19-ก) ซึ่งผลผลิตจากวิธี RT-PCR มีปริมาณน้อยมาก จึงสกัดดีอีนออกจากโซกราโนส เจลให้บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Nested PCR อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกัน พบว่า ของผลผลิตจากวิธี Nested PCR มีความยาว 517 คู่เบส (ภาพที่ 19-ข)

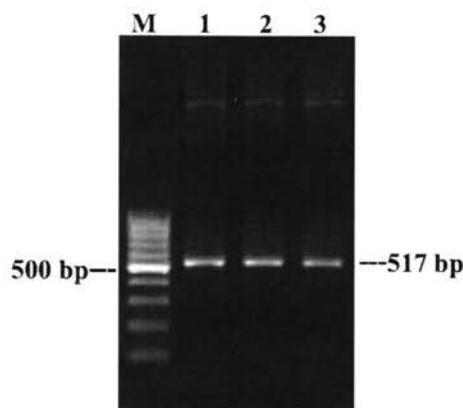


ภาพที่ 19 ผลผลิต PCR ในปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *FAelon*

(ก) ผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา RT-PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

(ข) ผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา Nested-PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

หลังจากสกัดผลผลิต PCR แล้ว นำไปผ่านกระบวนการ ไลเกชั่น, โคลนนิ่ง และ ทรานส์ฟอร์เมชั่นเพื่อให้ได้พลาสมิด ดีอีนเอ จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 20) เพื่อ ยืนยันผลผลิตก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)



ภาพที่ 20 พลาสมิคดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยวิธี PCR (M) 100 bp DNA marker, (1-3) ผลผลิต PCR

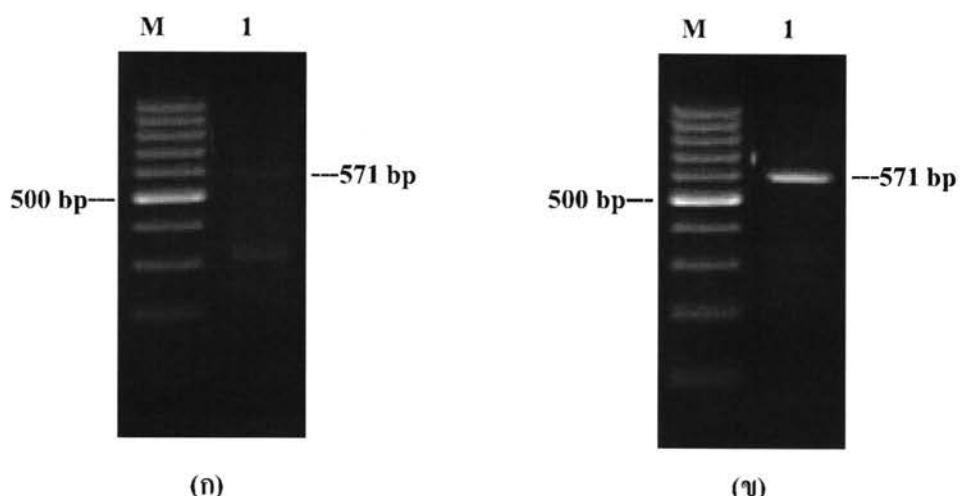
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR มาตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.33 และทำการตัดเฉพาะต่อร่องสายนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* จากปฏิกริยา RT-PCR มีความยาว 517 คู่เบส (ภาพที่ 21) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Blastx พบว่านิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *FAelon* ในปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*, KC994461) 94 เปอร์เซ็นต์, ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*, JX035811) 90 เปอร์เซ็นต์, ปลาแซลมอน (*Salmo salar*, GU29489) 70 เปอร์เซ็นต์ และปลา尼ล (*Oreochromis niloticus*, KF268464) 70 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำไปเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full length) ด้วยวิธีการ 3' RACE-PCR และ 5' RACE-PCR ต่อไป

```
5' CATGGATGGGTCCAAGAGATCCTCGTGTGAGAGGCTGGCTACTGCTGGACAGCTATCT
ACCCACTCTGGCCTTCACCACATGTACCTCCTGATCGTGTGGATGGGCCAAAGTACAT
GAGGAACAGGCAGCCTTTCTGCCGGGAATCTTAGTGCTGTATAATCTGGCACTCAC
TTTCTCTCCCTTACATGTTTATGAGCTTGACTGGTGTGGCAAGGTGGCTATAA
CTTCTCTGCCAAGACACTCACAGTGGAGGAGAACGCTGACACCAGGATTATTACGTGCT
GTGGTGGTACTACTTCTCCAAGCTCATGAGTTATGGATACCTTCTCCTCATCCTGCG
CAAAAACAACCACCAAGATCACCTCCTGCACATCTACCACCATCCACAATGCTGAACAT
CTGGTGGTTGTGATGAAGTGGTGCCATGTGGACACTCCTATTCGGAGGCCACCTTAA
CAGCTTCATTGCTCATGTATTCCATTATGGGCT3'
```

ภาพที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* จากปฏิกริยา RT-PCR

4.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* ปลาย 3' (3' end)

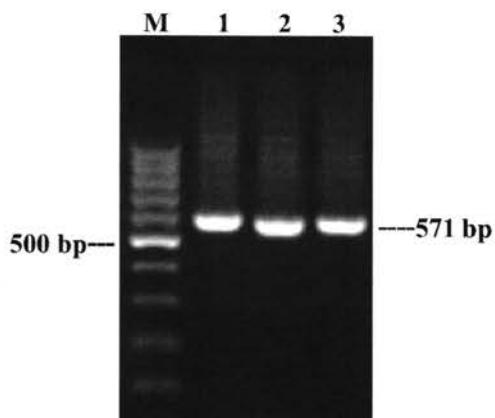
สาย First-strand cDNA จาก Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุย โดยสังเคราะห์ First-strand cDNA ตามวิธีการ 3'-RACE (Invitrogen) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะของยีน *FAelon* คือ EF-2 (Specific forward primer) ร่วมกับไพรเมอร์ AUAP จากชุดคิก หลังจากตรวจสอบแคนดี้เอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีของการใส่เจลอะลีกโทร์ โฟร์ซิส ปรากฏแคนดี้เอ็นเอมีความยาว 571 คู่เบส (ภาพที่ 22-ก) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากองค์การสสจ.ให้บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Nested PCR อีกรอบโดยใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกัน พนว่าผลผลิต PCR มีความยาว 571 คู่เบส (ภาพที่ 22-ข)



ภาพที่ 22 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน *FAelon*

- (ก) ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR
- (ข) ผลผลิต PCR จากปฏิกริยา Nested PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากองค์การสสจ.ให้บริสุทธิ์ นำผลผลิต PCR ไปผ่านขบวนการไลเกชั่น, โคลนนิ่ง, และ ทรานส์ฟอร์เมชั่นเพื่อให้ได้พลาสมิด ดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 23) เพื่อยืนยันผลผลิตก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 23 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR (M) 100 bp DNA marker, (1-3) ผลผลิต PCR

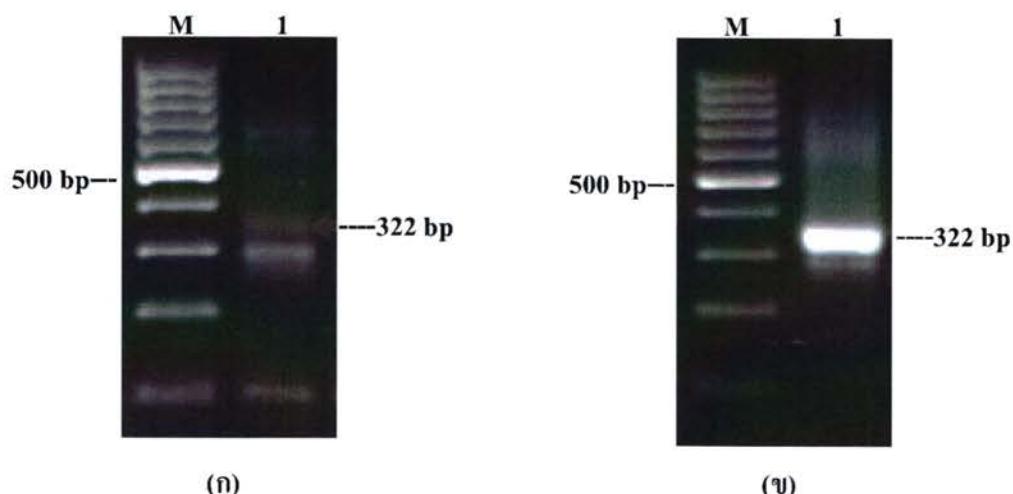
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไฮด์ของผลผลิต PCR มาตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไฮด์ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.33 ทำการตัดเฉพาะร่องของสายนิวคลีโอไฮด์ด้วยโปรแกรม Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไฮด์ของยีน *FAelon* จากปฏิกริยา 3'RACE-PCR มีความยาว 571 กูเบส (ภาพที่ 24) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไฮด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Blastx พบว่านิวคลีโอไฮด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *FAelon* ในปลาชนิดอื่น ได้แก่ ปลาคุกรสเซีย (*Clarias gariepinus*, AY660880) 95 เปอร์เซ็นต์, ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*, KC994462) 88 เปอร์เซ็นต์ และปลาไน (*Cyprinus carpio*, JF836160) 74 เปอร์เซ็นต์

```
5' GAACTGGGTGCCATGTGGACACTCCTATTCCGGAGCCACCTTAACAGCTTCATTCA
TGCTCATGTTACTTATTACGGGCTTCAGCCATTCCGCCATGGCACCGTACCTTG
TGGAAAGTATAAACACAATGCCACTGATCCAGTTCTGACCAGATGCAGACA
TCCTGTGCTGTGGTGTGGCCTTGCCTTCCCTAAAGGTTGGCTGTATTCCAGATCAGT
TATATGATCACCCATTATTCTTCTCAAACCTCTACAAACAGACTTATAAGAACGCG
GGGGATGCTCTGAAAAGCGATCACCAACACAACGCCGTTAAGTCTGTGAATGCCACTCG
AATGGGGCGACTCCTAAAGACACAGTTAACAAAGGAAGCCGAGGGGTGACTAAGGACCT
GTACATTCTGTCAGTTCTCTTAGCTGTAACTTCTGCGAATGTGTTGATCGACTT
CCCGAGTCTACACACTGCAGAGACAGGAGCAAAATAAAAGTGAAGGGATTTATTGTTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA3'
```

ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไฮด์ด้านปลาย 3' (3' end) ของยีน *FAelon*

4.2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* ปลาย 5' (5' end)

สาย First-strand cDNA จาก Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อด้านของปลาดุกอุย โดยถูกนำมาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบสทางด้านปลาย 5' โดยวิธีการ 5'RACE-PCR ผลผลิตที่ได้ถูกนำไปเพิ่มปริมาณยีน *FAelon* ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไฟรเมอร์ที่จำเพาะที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา RT-PCR ของยีน *FAelon* คือ ER-2 (Specific reverse primer) ร่วมกับไฟรเมอร์ UPM จากชุดคิท หลังจากการตรวจสอบแคนดี้เอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏแคนดี้เอ็นเอที่มีความยาว 322 คู่เบส (ภาพที่ 25-ก) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากกระเพาะปัสสาวะ บริสุทธิ์นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Nested PCR อีกครั้งโดยใช้ไฟรเมอร์ ER-2 (Specific reverse primer) ร่วมกับไฟรเมอร์ NUP จากชุดคิท พนว่าผลผลิต PCR มีความยาว 322 คู่เบส (ภาพที่ 25-ข)

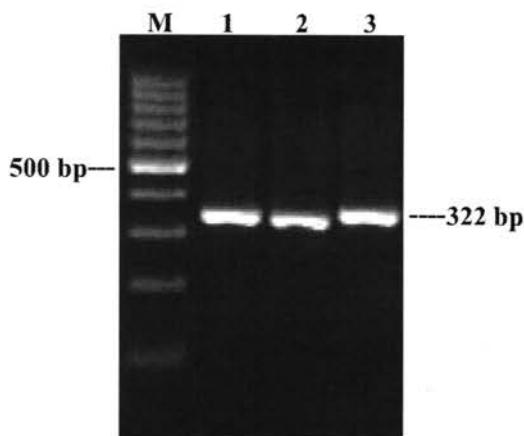


ภาพที่ 25 ผลผลิต PCR ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน *FAelon*

(ก) ผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

(ข) ผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา Nested PCR (M) 100 bp DNA marker, (1) ผลผลิต PCR

จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากกระเพาะปัสสาวะให้บริสุทธิ์นำผลผลิต PCR ไปผ่านกระบวนการไลเกชั่น, โคลนนิ่ง, และ ทรานส์ฟอร์เมชั่นเพื่อให้ได้พลาสมิด ดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี PCR (ภาพที่ 26) เพื่อยืนยันผลผลิตก่อนส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 26 พลาสมิดดีเอ็นเอที่ทดสอบด้วยวิธี PCR (M) 100 bp DNA marker, (1-3) ผลผลิต PCR

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR มาตรวจสอบความสมบูรณ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชัน 2.33 ทำการตัดเฉพาะร่องสายนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* จากปฏิกิริยา 5'RACE-PCR มีความยาว 322 คู่เบส (ภาพที่ 27) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Blastx พบว่า นิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *FAelon* ในปลาชนิดอื่น ได้แก่ ปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*, AY660880) 96 เปอร์เซ็นต์, ปลาไน (*Cyprinus carpio*, JF836160) 86 เปอร์เซ็นต์, ปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*, KC994462) 82 เปอร์เซ็นต์, ปลาแซลมอน (*Salmo salar*, GU324549) 80 เปอร์เซ็นต์ และปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*, FJ440239) 80 เปอร์เซ็นต์

```
5' ACATGGGGACGCAATGGTTCCGTGTGGAAAGTGATTGTCTAACATGATGGAGAGAA
AAGTTACAGCCGGAGCAACACGTGTTACTGTTACAGAATACCGAGATCTCCTTATATGGT
AAAATAGTTCTAATAAATATCAAGGAAATCCATGCCACTTCATAAGAGTAAAAACATGG
AAATCTTAACCACAGACTGAACAACTATATTGACTCATGGATGGTCCCAGGGATCCTC
GTGTGAGAGGGCTGGCTACTGCTGGACAACATCTACCCACTCTGGCCTTCACCATCATGT
ACCTCCTGATCGTGTGGATGGGC3'
```

ภาพที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' (5' end) ของยีน *FAelon*

4.2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full length) ของยีน *FAelon*

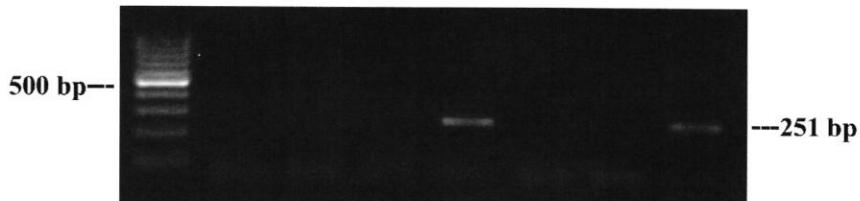
จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากวิธีการ RT-PCR (ด้วยยารหานา), 3'RACE-PCR (เส้นทึบ) และ 5'RACE-PCR (เส้นประ) นำมาเทียบกันพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *FAelon* ในปลาดุกรุย มีความยาวทั้งหมด 1,218 คู่เบส (ภาพที่ 28)

ACATGGGACGCAATGGTTCCGTGGAAAGTGATTGCTAACATGATGGAGAGAAAAGTTACAGCCGA 72
 GTTACAGCCGGAGCAACACGTGTTACTGTTACAGAATACCGAGATCTCCTTATGGTAAAATAGGTTCTAA 144
 TAAATATCAAGGAAATCCATGCCACTTCATAAGAGTAAAAACATGGAAATCTTAACCACAGACTGAACAAC 216
 M E I F N H R L N N
 TATATTGACTCATGGATGGGTCCAAGAGATCCTCGTGTGAGAGGCTGGCTACTGCTGGACAACATCTACCC 288
 Y I D S W M G P R D P R V R G W L L L D N Y L P
ACTCTGGCCTTCACCATCATGTACCTCCTGATCGTGTGGATGGGCCAAAGTACATGAGGAACAGGCAGCCT 360
 T L A F T I M Y L L I V W M G P K Y M R N R Q P
TTTCCTGCCGGGAAATCTTAGTGCTGTATAATCTGGCACTCACTTTCTCCCTTACATGTTTATGAG 432
 F S C R G I L V L Y N L A L T F L S L Y M F Y E
CTTGTGACTGGTGTGGCAAGGTGGCTATAACTCTCTGCCAAGACACTCACAGTGGAGGAGAACGCTGAC 504
 L V T G V W Q G G Y N F F C Q D T H S G G E A D
ACCAGGATTATTACACGTGCTGGTGGTACTACTCTCCAAGCTCATCGAGTTATGGATAACCTTCTCCCTC 576
 T R I I H V L W W Y Y F S K L I E F M D T F F L
ATCCTGCGAAAAACAACCACCAAGATCACCTTCTGACATCTACCACATTCCACAATGCTGAACATCTGG 648
 I L R K N N H Q I T F L H I Y H H S T M L N I W
TGGTTTGTGATGAACTGGGTGCATGTGGACACTCTTATTCCGAGCCACCTTAACAGCTTCATTGATGTG 720
 W F V M N W V P C G H S Y F G A T F N S F I H V
CTCATGTACTCTTATTACGGCTTTCAGCCATTCCCGCCATGCGACCGTACCTTGGTGAAGAAGTATATA 792
 L M Y S Y Y G L S A I P A M R P Y L W W K K Y I
ACACAATGCCAACTGATCCAGTCGTTCTGACCATGATGCAGACATCCTGIGCTGTGGCTTGCGGT 864
 T Q C Q L I Q F V L T M M Q T S C A V V W P C G
TTCCCTAAGGGTTGGCTGTATTCCAGATCAGTTATATGATCACCCATTATTATTTCTCTAAACTCTAC 936
 F P K G W L Y F Q I S Y M I T L I I F F S N F Y
AAACAGACTTATAAGAAGCGCGGGATGCTCTGAAAAGCGATACCAACACAACGCCGTTAAGTCTGTGAAT 1008
 K Q T Y K K R G D A L K S D H Q H N A V K S V N
GGCCACTCGAATGGGCGACTCCTAAAGACACAGTTAAACAAAGGAAGCCAGGGGTGACTAAGGACCTGTA 1080
 G H S N G A T P K D T V K Q R K P R G D
CATTGTCAGTTCCCTTTAGCTGTAAACACTCTGCGAATGTGTTGATCGACTTCCCAGTCTACACAC 1152
TGCAGAGACAGGAGCAAAATAAAAGTGAAGGATTTATTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1218

ภาพที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด และลำดับกรดอะมิโนของยีน *FAelon* ในปลาดุกอุบ

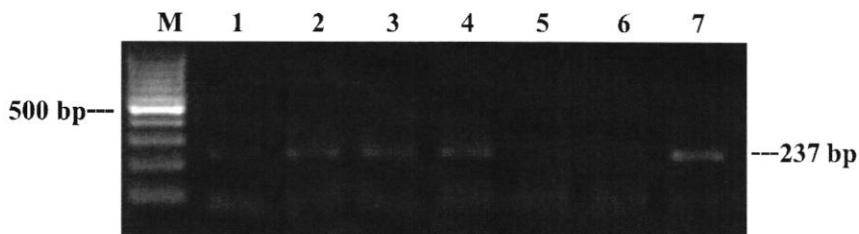
4.3 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อของปลาดุกอุย

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาดุกอุย ได้แก่ เหงือก ทางเดินอาหาร ม้าม สมองต่อมใต้สมอง กล้ามเนื้อ และตับ มาสักด์ Total RNA ด้วย Trizol reagent (Invitrogen) ตรวจสอบปริมาณด้วย เครื่องวัดการดูดกลืนแสง มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.65-1.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบคุณภาพโดยใช้เจลอะgarose (Agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1x TBE buffer จากนั้นนำ Total RNA ที่สักด์ในแต่ละเนื้อเยื่อ สร้างสาย cDNA ตามวิธีการของชุดคิท Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega) จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน *FAdes* สามารถพบร้าในเนื้อเยื่อสมองตับ และสมอง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Aliyu-Paiko et al., (2013) ดังนั้น จึงคัดเลือกเนื้อเยื่อตับสำหรับนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 การแสดงออกของยีน *FAdes* ในเนื้อเยื่อของปลาดุกอุย ($M=100$ bp ladder, 1=เหงือก, 2=กระเพาะอาหาร, 3=ม้าม, 4=สมอง, 5=ต่อมใต้สมอง, 6=กล้ามเนื้อ, 7=ตับ)

จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน *FAelon* มีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อตับ สมอง ม้าม กระเพาะอาหาร และเหงือก ตามลำดับ เนื้อเยื่อตับมีการแสดงออกมากกว่าวัยอ่อนและถูกพน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zheng et al., (2009) ดังนั้นจึงคัดเลือกเนื้อเยื่อตับสำหรับนำมาศึกษา การแสดงออกของยีน *FAelon* (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 การแสดงออกของยีน *FAelon* ในเนื้อเยื่อของปลาดุกอุย ($M=100$ bp ladder, 1=เหงือก, 2=กระเพาะอาหาร, 3=ม้าม, 4=สมอง, 5=ต่อมใต้สมอง, 6=กล้ามเนื้อ, 7=ตับ)

4.4 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุยหลังจากได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกันในแต่ละเดือน

จากการทดลองเลี้ยงปลาดุกอุยน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มนั้น 9.80 ± 0.37 กรัมต่อตัว จำนวน 630 ตัว แบ่งลงเลี้ยงในกระชังทดลองขนาด $1x1x1x1.2$ ลูกบาศก์เมตร จำนวน 21 กระชัง ตั้งอยู่ในบ่อขนาด $40x40x40$ เมตร โดยมีอัตราการปล่อย 30 ตัวต่อกระชัง ทำการวัดคุณภาพน้ำในบ่อทดลองเดือนละสองครั้ง และเติมน้ำเข้าบ่อทุก ๆ 2 วัน จากการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่า คุณภาพน้ำในบ่อทดลองตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองมีปริมาณก้าซอกซิเจนที่ละลายน้ำ มีค่า อยู่ระหว่าง 5.32 ± 0.87 มิลลิกรัมต่อลิตร (ppm O_2) อุณหภูมิของน้ำ มีค่า 26.55 ± 1.54 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ มีค่าอยู่ระหว่าง 6.62 ± 0.31 บริมาณแอมโมเนียที่เป็นพิษมีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตรของแอมโมเนีย-ในไตรเจน ($\text{ppm NH}_3\text{-N}$) ซึ่งอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาทดลอง (โซคชัย เหลืองธุวประณิต, 2548)

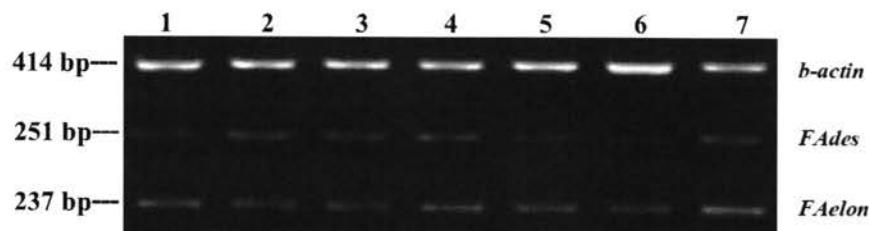
ตารางที่ 10 คุณภาพน้ำในบ่อทดลอง

พารามิเตอร์	คุณภาพน้ำ
ปริมาณก้าซอกซิเจนที่ละลายน้ำ (ppm O_2)	5.32 ± 0.87
ความเป็นกรดเป็นด่าง	6.62 ± 0.31
ความเป็นด่าง (ppm as CaCO_3)	46.50 ± 13.75
แอมโมเนียที่เป็นพิษ ($\text{ppm NH}_3\text{-N}$)	0.01 ± 0.00
ไนโตริก ($\text{ppm NO}_2^-\text{-N}$)	0.01 ± 0.00
ไนเตรต ($\text{ppm NO}_3^-\text{-N}$)	1.27 ± 0.26
อุณหภูมิของน้ำ ($^{\circ}\text{C}$)	26.55 ± 1.54

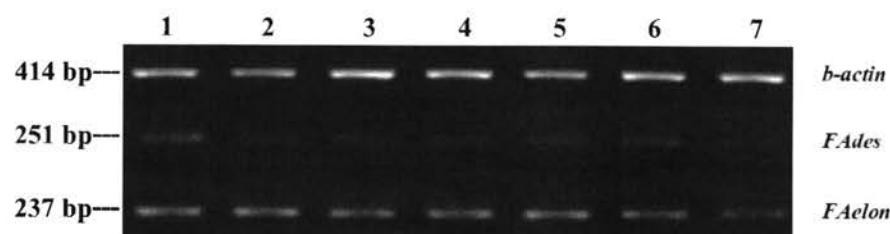
4.4.1 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุยได้รับอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกันในแต่ละเดือน

จากเลี้ยงปลาดุกอุยด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 5 เดือน โดยนำตัวอย่างปลาดุกอุยในแต่ละชุดการทดลอง ถูกนำมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวทั้งหมด ทำการสลบ เพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อด้าน เป็นเวลา 5 เดือน ในตู้แช่แข็ง -80°C จากนั้นนำเนื้อเยื่อด้านปลาดุกอุยมาสกัด Total RNA ตรวจสอบปริมาณด้วยเครื่องวัดการคูดกลืนแสง มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $1.65\text{-}1.80$ ในโครงการนั้นต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบคุณภาพโดยใช้กล่องการทดสอบ

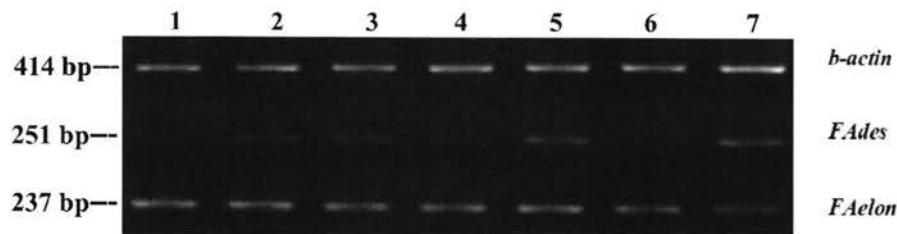
(Agarose gel) ความเข้มข้น 1 เบอร์เซ็นต์ ในสารละลายน้ำ Total RNA ที่สกัดในแต่ละเนื้อเยื่อ สร้างสาย cDNA ตามวิธีการของชุดคิท Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega) นำ cDNA ที่ได้ไปทดสอบการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* เทียบกับยีนเบต้า-แอคทิน (*b-actin*, housekeeping gene) ด้วยวิธี PCR ทั้งนี้พบว่ายีน *b-actin* มีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันมากในทุกตัวอย่าง โดยมีขนาดของผลผลิต PCR เท่ากับ 414 คู่เบส และการแสดงออกของยีน *FAdes* ในเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 5 พบว่า มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืชที่ใกล้เคียงกันในปลาที่ได้รับสูตรอาหารทั้ง 7 สูตร เช่นเดียวกันกับยีน *FAelon* ที่มีการแสดงออกมากและมีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกันในทุกสูตรอาหาร (ภาพที่ 31-35)



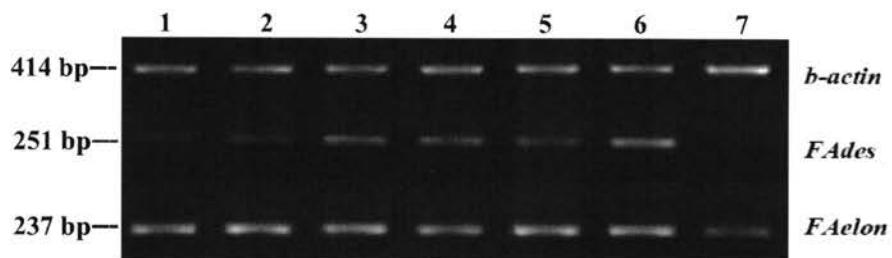
ภาพที่ 31 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 1 เทียบกับ *b-actin* (1=อาหารสูตรที่ 1, 2=อาหารสูตรที่ 2, 3=อาหารสูตรที่ 3, 4=อาหารสูตรที่ 4, 5=อาหารสูตรที่ 5, 6=อาหารสูตรที่ 6, 7=อาหารสูตรที่ 7)



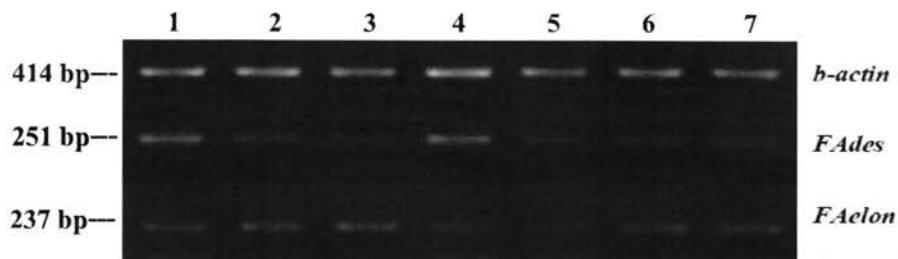
ภาพที่ 32 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 2 เทียบกับ *b-actin* (1=อาหารสูตรที่ 1, 2=อาหารสูตรที่ 2, 3=อาหารสูตรที่ 3, 4=อาหารสูตรที่ 4, 5=อาหารสูตรที่ 5, 6=อาหารสูตรที่ 6, 7=อาหารสูตรที่ 7)



ภาพที่ 33 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 3 เทียบ กับ *b-actin* (1=อาหารสูตรที่ 1, 2=อาหารสูตรที่ 2, 3=อาหารสูตรที่ 3, 4=อาหารสูตรที่ 4, 5=อาหารสูตรที่ 5, 6=อาหารสูตรที่ 6, 7=อาหารสูตรที่ 7)



ภาพที่ 34 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 4 เทียบ กับ *b-actin* (1=อาหารสูตรที่ 1, 2=อาหารสูตรที่ 2, 3=อาหารสูตรที่ 3, 4=อาหารสูตรที่ 4, 5=อาหารสูตรที่ 5, 6=อาหารสูตรที่ 6, 7=อาหารสูตรที่ 7)



ภาพที่ 35 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุยในเดือนที่ 5 เทียบ กับ *b-actin* (1=อาหารสูตรที่ 1, 2=อาหารสูตรที่ 2, 3=อาหารสูตรที่ 3, 4=อาหารสูตรที่ 4, 5=อาหารสูตรที่ 5, 6=อาหารสูตรที่ 6, 7=อาหารสูตรที่ 7)

4.4.2 องค์ประกอบของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในกล้ามเนื้อปลาดุกอุย

จากการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาดุกอุย ที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหาร ที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 5 เดือน เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำเนื้อปลาจาก ทุกชุดการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง พบว่า องค์ประกอบของกรดไขมันใน เนื้อปลาดุกอุยพบกรดไขมัน LA มีค่าอยู่ระหว่าง 0.78-1.85 มิลลิกรัม โดยปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วย อาหารสูตรที่ 7 ใช้น้ำมันทานตะวันผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยที่สุด 0.78 มิลลิกรัม และปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 4 ใช้น้ำมันถั่วเหลือง 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากที่สุด 1.85 มิลลิกรัม ปริมาณ DHA มีค่าอยู่ระหว่าง 0.64-1.19 มิลลิกรัม โดยปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหาร สูตรที่ 6 ใช้น้ำมันทานตะวัน 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้อยที่สุด 0.60 มิลลิกรัม และปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วย อาหารสูตรที่ 5 ใช้น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่ามากที่สุด 1.19 มิลลิกรัม และ EPA มีค่าอยู่ระหว่าง 0-0.26 มิลลิกรัม โดยพบในกล้ามเนื้อปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 1 ใช้น้ำมันปลาหมึก 100 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตรที่ 2 ใช้น้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตรที่ 3 ใช้น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากัน 0.19, 0.18 และ 0.26 มิลลิกรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณกรดไขมัน (มิลลิกรัม / กรัม น้ำหนักแห้ง) ในเนื้อปลาดุกอุยที่ได้รับอาหารที่มี แหล่งกรดไขมันจากพืชที่ระยะเวลาเลี้ยง 5 เดือน

สูตรอาหาร	LA	DHA	EPA
1. น้ำมันปลาหมึก 100 เปอร์เซ็นต์	0.87	0.64	0.19
2. น้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์	1.50	0.66	0.18
3. น้ำมันปาล์มผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์	1.58	0.67	0.26
4. น้ำมันถั่วเหลือง 100 เปอร์เซ็นต์	1.85	0.87	0.00
5. น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์	1.10	1.19	0.00
6. น้ำมันทานตะวัน 100 เปอร์เซ็นต์	1.76	0.60	0.00
7. น้ำมันทานตะวันผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์	0.78	1.09	0.00

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAdes* และ *FAelon*

จากการศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAdes* ในปลาดุกอุย โดยวิธีการโคลน cDNA ของยีน *FAdes* พบว่ามีส่วนของยีนทั้งหมด (Full length) เท่ากับ 1,760 คู่เบส (Accession number KF006248) เมื่อแปลเป็นรหัสกรดอะมิโนมีส่วน Open reading frame (ORF) เท่ากับ 445 ตัว (Accession number AGR45589) โดยมีโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยส่วนของ Histidine boxes จำนวน 3 ตำแหน่ง, Transmembrane regions จำนวน 2 ตำแหน่ง และ Cytochrome b_5 domain จำนวน 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 36) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Vagner and Santigosa (2004) รายงานว่าองค์ประกอบของยีน *FAdes* ประกอบด้วยส่วนของ Histidine boxes, Transmembrane regions และ Cytochrome b_5 domain เป็นโครงสร้างโปรตีนหลัก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hsieh et al. (2004) พบว่ายีน *FAdes* ในปลาหมา舅 (*Oreochromis mossambicus*) ประกอบด้วยโครงสร้างโปรตีนทั้งสามส่วนนี้เช่นเดียวกัน โดยมีส่วนของ Histidine boxes ในปฏิกริยาทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ (Marquardt et al., 2000) ในขณะเดียวกันพบว่าจำนวนของกรดอะมิโนของยีน *FAdes* มีความใกล้เคียงกันในกลุ่มปลาหน้าจีดได้แก่ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีส่วน ORF เท่ากับ 445 ตัว (González-Rovira et al., 2009) ปลาไน (*Cyprinus carpio*) 444 ตัว (Zheng et al., 2009) และปลาเม่น (*Danio rerio*) 444 ตัว (Hastings et al., 2001) และในกลุ่มปลาตะเลได้แก่ ปลาแซลมอน (*Salmo salar*) 454 ตัว (Zheng et al., 2005) และปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) 454 ตัว (Zheng et al., 2004) เมื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงลำดับกรดอะมิโนของยีน *FAdes* ปลาดุกอุยในฐานข้อมูล GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้โปรแกรม Protein blast พบว่ามีความคล้ายคลึงกับปลาเทโพ (Accession number AFN21428) 92 เปอร์เซ็นต์ และปลานิล (Accession number AGV52807) 90 เปอร์เซ็นต์ และปลานิล (Accession number AGV52807) 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

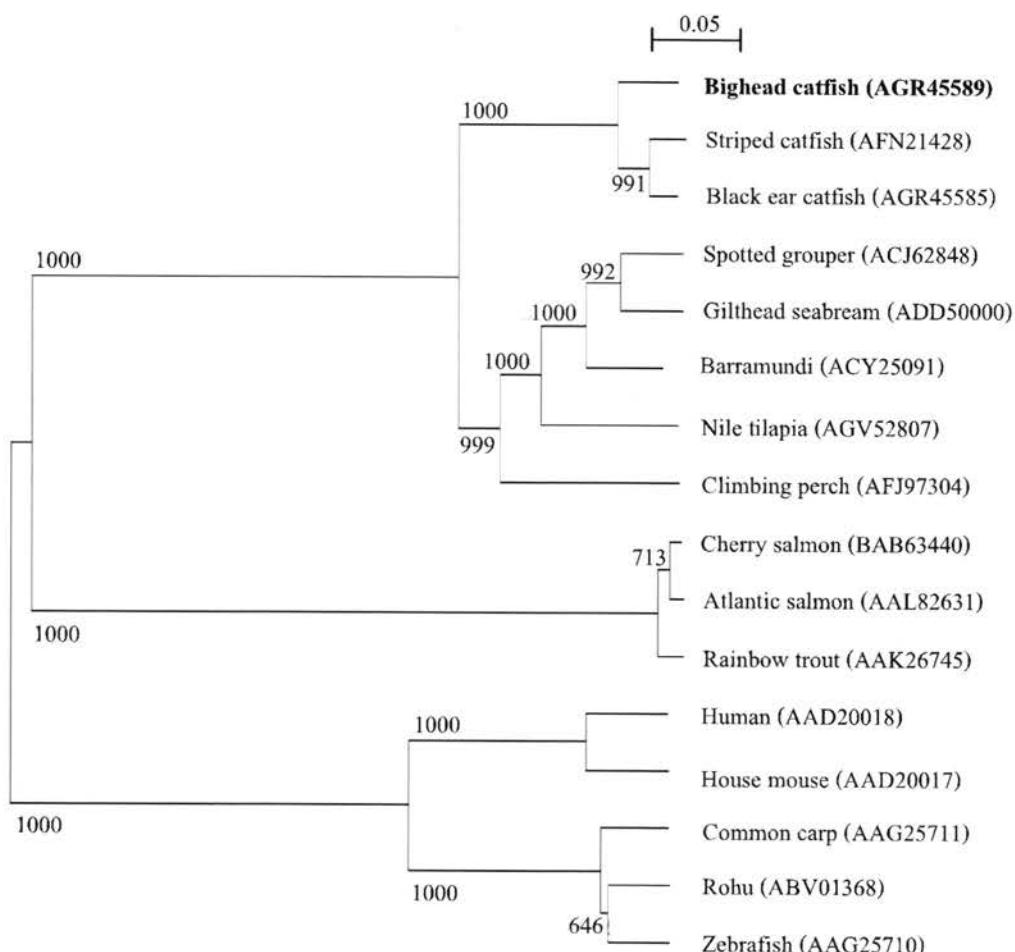
การศึกษาวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *FAdes* ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดโดยใช้โปรแกรม ClustalX และการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม NJ plot พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งปลาดุกอุยมีความสัมพันธ์ที่คล้ายคลึงกันในกลุ่มปลาหน้าจีดกลุ่มแคทฟิช (Catfish) ได้แก่ ปลาสวาย และปลาเทโพ

ในขณะที่มีความแตกต่างไปจากกลุ่มปลาทะเลได้แก่ ปลาแซลมอน ปลาเรนโบว์ทราย และสั่งมีชีวิต นอกกลุ่มปลา (Outgroup) ได้แก่ หนูบ้าน (Accession number AAD20017) และมนุษย์ (Accession number AAD20018) (ภาพที่ 37)

		* * *
Bighead catfish	MGGGRHRGEQLGSGETSSCK-----QYTWEVOKHNRQDQWVVTERKYINVTEWKRPGGHRVLTGHYAGEDATEAFTAFPHDORFVKYMKPLIVGELASSEPSQDHGRNVALVEDFETLRKOLEAQGL	126
Black ear catfish	MGGGGHRGEOLGSGESCT-----QYTWEVOKHNRQDQWVVTERKYKVTEWMKRPGGRRVLAHTYAGEDATAAFMAFHFDORFVRERMKPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALMEDFRLRKOLEAQGL	126
Striped catfish	MGGGGHRGEQLGSGESCT-----QYTWEVOKHNRQDQWVVTERKYKVTEWMKRPGGRRVLAHTYAGEDATAAFMAFHFDORFVRERMKPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALMEDFRLRKOLEAQGL	126
Common carp	MGGGGQQTDRI-TGTNGRF-----TYTWEVOKHTRKFSDOWLVEVKYVNSQWVYKWRPGGGRVLTGHYAGEDATEAFTAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALMEDFRLRKOLEAQGC	125
Zebrafish	MGGGGQQTDRI-TDTNGRF-----SYTWEVOKHTRKFSDOWVVEVKYVNSQWVYKWRPGGGRVLTGHYAGEDATEAFTAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALMEDFRLRKOLEAQGC	125
Atlantic salmon	MGGGGQONDSEPAKGDRRGGPGIGLSGSAYVTEEWYQHSHRGDQWMLVDRKYKNTITOWAKRPGGIRVTISHEAGEDATAAFYAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALVQDFQALRNRYVEREGL	135
Rainbow trout	MGGGSQTVSEPPDSACKG-----VYTWEVQSHCSRNDDQMLVDRKYKNTITOWAKRPGGIRVTISHEAGEDATAAFYAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALVQDFQALRNRYVEREGL	135
Nile tilapia	MGGGSQTVSEPPDSACKG-----VYTWEVQSHCSRNDDQMLVDRKYKNTITOWAKRPGGIRVTISHEAGEDATAAFYAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALVQDFQALRNRYVEREGL	126
Humen	MKGKGNQGEAEREVSVPT-----FSWEIQRHNLRDTRMLVTDRKYKNTITOWAKRPGGIRVTISHEAGEDATAAFYAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALVQDFQALRNRYVEREGL	125
Mouse	MKGKGNQGEAEREVSVPT-----FRWEELQKNHLTDTRMLVTDRKYKNTITOWAKRPGGIRVTISHEAGEDATAAFYAFPHDPLPVKYMPLIJGELEAPSEPSODHGRNVALVQDFQALRNRYVEREGL	125
Bighead catfish	FRTPLFLFLYGHILLLEALSLALLWTCGNGWITALISVLTATAAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENITKDPDNMMINLVLGNLIPVEYGVKKVKNMPYN	261
Black ear catfish	FRTPLFLFLYGHILLLEALSLALLSTFGNGWMTLISVLTATAAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENPVVKEDPDINLNLLVLGNTLPVEYCITKLKLNMPYN	261
Striped catfish	FRTPLFLFLYGHILLLEALSLALLSTFGNGWMTLISVLTATAAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENPVVKEDPDINLNLLVLGNTLPVEYCITKLKLNMPYN	261
Common carp	FKTQPLFLFLYGHILLSHILLEALTAALMAMWYLGETWINTATAVLILATATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	260
Zebrafish	FKTQPLFLFLYGHILLSHILLEALTAALMAMWYLGETWINTATAVLILATATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	260
Atlantic salmon	LARPLFLFLYGHILLSHILLEALTAALMAMWYLGETWINTATAVLILATATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	270
Rainbow trout	LARPLFLFLYGHILLSHILLEALTAALMAMWYLGETWINTATAVLILATATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	270
Nile tilapia	FRQPLFLFLYGHILLSHILLEALTAALMAMWYLGETWINTATAVLILATATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	261
Humen	EKTNHVFLLLASHIATALESTWTFYFGNGWTPITLAFATVATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	260
Mouse	EKTNHVFLLLASHIATALESTWTFYFGNGWTPITLAFATVATOSAQAGWILDFEGFLSVEFKNSTWDHTVHKVIGHLGASANWNHWFQHJAKENFKEKDPDVNMLNAFVAGKTOPVEYGVKKIKHLPYN	260
Bighead catfish	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLNHLILOTMYSORDWDFAWYLSEVARYLSCCYVPYGYLGSVLILTFVRELESHWFQWWTQMNHI	396
Black ear catfish	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLNHLILOTMYLORDWDFAWYLSEVARYLSCCYVPYGYLGSVLILTFVRELESHWFQWWTQMNHI	396
Striped catfish	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLNHLILOTMYLORDWDFAWYLSEVARYLSCCYVPYGYLGSVLILTFVRELESHWFQWWTQMNHI	396
Common carp	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	396
Zebrafish	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	395
Atlantic salmon	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	395
Rainbow trout	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	395
Nile tilapia	RQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	405
Humen	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	396
Mouse	HQHKEYFFLIGPPLIPLYFLYFLCUTQYGVWAVLNFQVWTFVRELESHWFQWWTQMNHI	395
Bighead catfish	YSRAAPHVQKLCEKYGVYQYVGLWESWCDIVTSRKSGELWLDAYLHK	445
Black ear catfish	YSRAAPHVQKLCEKYGVYQYVGLWESWCDIVTSRKSGELWLDAYLHK	445
Striped catfish	YSRAAPHVQKLCEKYGVYQYVGLWESWCDIVTSRKSGELWLDAYLHK	445
Common carp	YWRRAEPVRALCEKYGVYQYVGLWESWCDIVTSRKSGELWLDAYLHK	444
Zebrafish	YWRRAEPVRALCEKYGVYQYVGLWESWCDIVTSRKSGELWLDAYLHK	444
Atlantic salmon	YHLVAPLVRILCEKHGLPYQVTKLQKAIDIVVRSLSRKSGELWLDAYLHK	454
Rainbow trout	YHLVAPLVRALCEKHGLPYQVTKLQKAIDIVVRSLSRKSGELWLDAYLHK	454
Nile tilapia	LPPGGFAVRALCEKHGLPYQVTKLQKAIDIVVRSLSRKSGELWLDAYLHK	445
Humen	LHKTAAPLVKSICAKHGIEYQEKPLRALLDIRSLRSRKSGELWLDAYLHK	444
Mouse	LHKTAAPLVKSICAKHGIEYQEKPLRALLDIRSLRSRKSGELWLDAYLHK	444

ภาพที่ 36 ลำดับกรดอะมิโนของรูป Fades ในปลาดุกอุป

ตัววิถีการหนาแน่นประคั่งคือส่วน Cytochrome *b5* domain, ตัววิถีการหนาแน่นที่สำคัญคือส่วน Cytochrome *b5*-like heme-binding motif, ตัววิถีการหนาแน่นที่สำคัญคือส่วนของ Transmembrane regions



ภาพที่ 37 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *FAdes* ในปลาดุกอุย

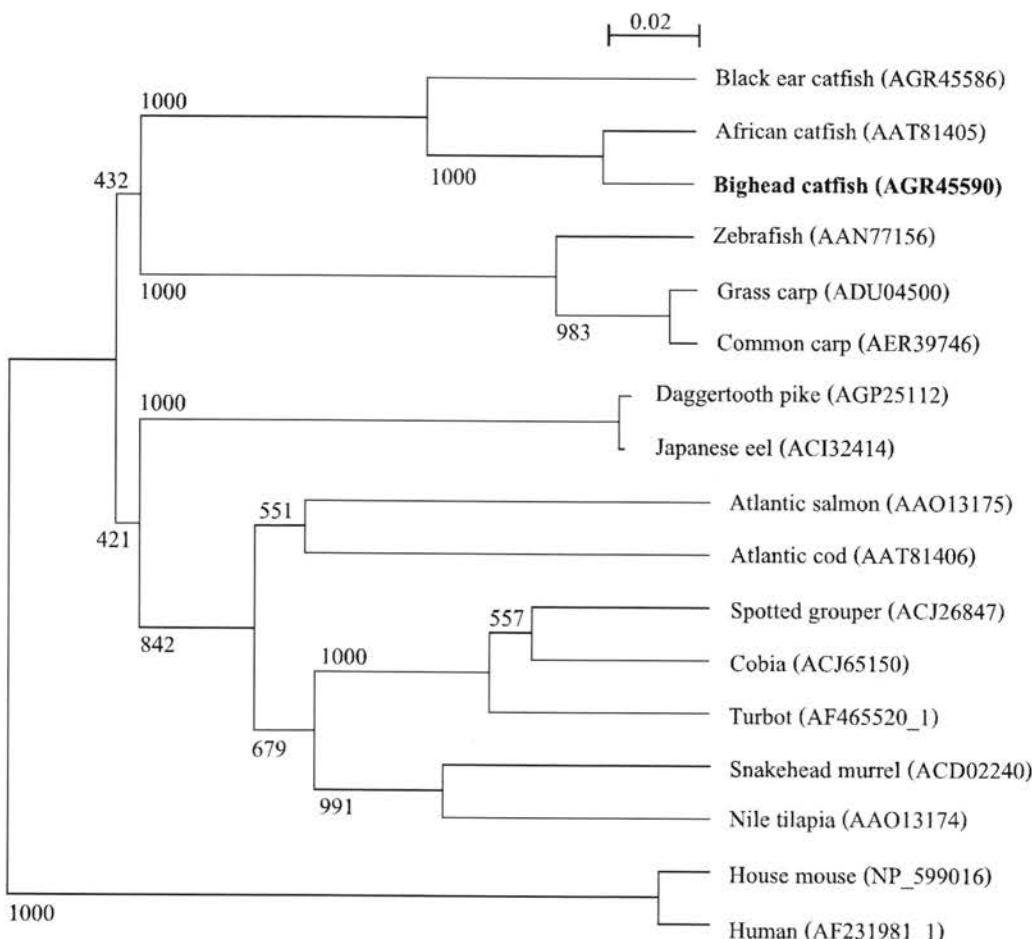
(จำนวนรอบของการทำซ้ำ, bootstrapping = 1,000 ครั้ง)

จากการศึกษาองค์ประกอบของยีน *FAelon* ในปลาดุกอุยโดยวิธีการโคเลน cDNA ของยีน *FAelon* พบว่ามีส่วนของยีนทั้งหมด (Full length) เท่ากับ 1,218 คู่เบส (accession number KF006249) เมื่อแปลเป็นรหัสกรดอะมิโนมีส่วน ORF เท่ากับ 294 ตัว (accession number AGR45590) โดยมีโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยส่วนของ Histidine box จำนวน 1 ตำแหน่ง Transmembrane regions จำนวน 2 ตำแหน่ง และ ER retention signal จำนวน 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 38) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hastings et al. (2005) รายงานว่ากรดอะมิโนของยีน *FAelon* ในปลา น้ำจืดประกอบด้วยส่วนของ Histidine box, Transmembrane regions และ ER retention signal เป็นโครงสร้างหลัก โดยในปลาป่าแซลมอนมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 888 คู่เบส และมีส่วน ORF จำนวน 295 ตัว (Hastings et al., 2005) ซึ่งมีส่วนที่เป็นโครงสร้างโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน โดยพบว่ากรดอะมิโนของยีน *FAelon* มีความใกล้เคียงกันในกลุ่มปลา�น้ำจืดได้แก่ ปลาดุกรัสเซีย (294 ตัว) ปลาเทโพ

(293 ตัว) ปลา尼ิต (293 ตัว) และปลาแม่น้ำลาย (291 ตัว) และในกลุ่มปลาทะเลได้แก่ ปลาแซลมอน (295 ตัว) และปลาโคด (288 ตัว) เมื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนของยีน *FAdes* ปลาดุกอุยในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Protein blast พบว่ามีความคล้ายคลึงกับปลาดุกรัสเซีย (Accession number AAT81405) 95 เปอร์เซ็นต์ ปลาเทโพ (Accession number AGR45586) 89 เปอร์เซ็นต์ และปลาไน (Accession number AAT81405) 79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาวิัฒนาการของปลาดุกอุยโดยใช้โปรแกรม ClustalX และการสร้างแผนภูมิต้นไม้พบว่า ปลาดุกอุยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลาดุกรัสเซีย มากที่สุด (ภาพที่ 39)

Bighead catfish	M E I F H R L N Y I D W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O D H T S G G E A D T R I I H V W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
African catfish	M E I F H R L N Y I D W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O D H T S G G E A D T R I I H V W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Black ear catfish	M E I F H R L N K H I E S W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O D H T S G G E A D T R I I H V W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Common carp	M E A P H R V N T Y I D W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R A L V P Y N G L L S L M Y F L V M S V Y Q G G Y N F F C O N T H S G G A D R M M V N L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Zebrafish	M E T F S H R V N S Y I D S W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q A S S C R A L V P Y N C L L S L M Y F L V M S V Y Q G G Y N F F C O N T H S G G A D R M M V N L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Turbot	M E T F N H K L N Y I D W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O D H T S A E V D N K I I N V L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Cobia	M E T F N H K L N Y I D S W M G P R D P R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R A M V F T N G L I T T L S E T M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O Q G T R A G E S D M K I I R V L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Nile tilapia	M E H F D A S I S T Y E A L L G R D T R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O Q G T R S A G E S D M K I I R V L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Humen	M E H F D A S I S T Y E A L L G R D T R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O Q G T R S A G E S D M K I I R V L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Mouse	M E H F D A S I S T Y E A L L G R D T R V G W L L D N V N P T A F T I V M L L I V W M G P K Y M R U Q P F S C R G I L V N L A T L P S L M Y F L V T G W Q G G Y N F F C O Q G T R S A G E S D M K I I R V L W Y Y F S K L I E F M D T F F L 1.30
Bighead catfish	I L R K N H Q L T F L V Y H E S T M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V L M Y S Y G L S A P A M R P Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C A V V W P C G F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
African catfish	I L R K N H Q L T F L V Y H E S T M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V L M Y S Y G L S A P A M R P Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C A V V W P C G F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Black ear catfish	I L R K N H Q L T F L V Y H E A T M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V L M Y S Y G L S A P A M R P Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C A V V W P C G F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Common carp	I L R K N H Q L T F L V Y H E A T M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V L M Y S Y G L S A P A M R P Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C A V V W P C G F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Zebrafish	I L R K N H Q L T F L V Y H E A T M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V L M Y S Y G L S A P A M R P Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C A V V W P C G F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Turbot	I L R K N H Q L T F L V Y H E A S M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V M Y S Y C L S S P M R M Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C M C A V I W P C D F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Cobia	I L R K N H Q L T F L V Y H E A S M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V M Y S Y C L S S P M R M Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C M C A V I W P C D F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Nile tilapia	I L R K N H Q L T F L V Y H E A S M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V M Y S Y C L S S P M R M Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C M C A V I W P C D F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Humen	I L R K N H Q L T F L V Y H E A S M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V M Y S Y C L S S P M R M Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C M C A V I W P C D F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Mouse	I L R K N H Q L T F L V Y H E A T M L N I W W F Y M N W P G H S Y F G A T I N S I H V M Y S Y C L S S P M R M Y L W M K Y I T Q C L I Q V U T M M Q T S C M C A V I W P C D F P R G W L Y Q O I S M T I L I F F S N Y K O T Y K R G D A 2.60
Bighead catfish	L K S ---- D H Q H A V K S Y N G H S H N G A T P K D - V Q R K P R G D 2.94
African catfish	L K S ---- D H R H A V K S Y N G H S H N G A T P K D - V Q R K P R G D 2.94
Black ear catfish	L K R ---- D E R H N I V K S Y N G H S H N G A T H T E T - V Q R K P R G D 2.93
Common carp	R K T ---- D Y S N -- G S I N G H T S G M S E K - V Q R K P R G D 2.91
Zebrafish	R K S ---- D Y N -- G S I N G H T S G M S E K - I H R K P R G D 2.91
Turbot	L O K ---- C H P Q N G S V S T I N G H A T P S M E Y - M A H K K I R V D 2.94
Cobia	L K K ---- E H P Q N G S V S T I N G H A T P S M E Y - N V H R K I R V D 2.94
Nile tilapia	O R K ---- D H P O N S S M A V G H T S P L E N N Y P R K R D 2.93
Humen	B R K D L H D H Q N G S V A V G H T S P L E N N Y P R K R D 2.93
Mouse	B R K D L H D H Q N G S V A V G H T S P L E N N Y P R K R D 2.93

กีฬาที่ 38 ถือเป็นการต่อสู้ที่มีมาอย่างยาวนาน *Eelot* นี้ก็ตาม



ภาพที่ 39 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *FAelon* ในปลาดุกอุย

5.2 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อยื่อของปลาดุกอุย

การศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในเนื้อยื่อของปลาดุกอุย ได้แก่ เหงือก กระเพาะอาหาร ม้าม สมอง ต่อมใต้สมอง กล้ามเนื้อ และตับ ด้วยวิธี Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกของยีน *FAdes* มากที่สุดที่เนื้อยื่อตับ รองลงมาคือ สมอง โดย ถูกพนเข่นเดียวกันกับปลาแซลมอน (Zheng et al., 2005) และปลาแม่น้ำลาย (Monroig et al., 2009) สอดคล้องกับการศึกษาของ Ren et al. (2013) ศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* ในเนื้อยื่อปลาในที่พนการแสดงออกของยีนมากที่สุดในเนื้อยื่อตับ และสมองเข่นเดียวกัน และพบว่ายีน *FAelon* ในปลาดุกอุยมีการแสดงออกที่เนื้อยื่อตับ สมอง ม้าม กระเพาะอาหาร และเหงือก ตามลำดับ โดย เนื้อยื่อตับมีการแสดงออกมากกว่าอวัยวะอื่นและถูกพนเข่นเดียวกันกับการศึกษาของ Zheng et al., (2009) ในปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) นอกจากนี้ Aliyu-Paiko et al. (2013) ศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในกล้ามเนื้อ ตับ สมอง รังไข่ ถุงน้ำเชื้อ ลำไส้ ไต และผนัง

กล้ามเนื้อของปลาช่อน (*Channa striata*) พบร่วมน้ำเนื้อเยื่อตับ และสมองมีการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* มากที่สุด ซึ่งการแสดงออกของยีนที่พบในเนื้อเยื่อตับ และสมองแสดงถึงตำแหน่งที่สำคัญในการสังเคราะห์ HUFA ไปสู่อวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Zheng et al., 2009) เช่นเดียวกับในปลาเรนโนบัวเทราต์ (Bell et al., 2001) โดยกล่าวได้ว่าเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนเป็นอวัยวะหลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง

5.3 การแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุยที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืช

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* ในปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกันพบว่าในเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 5 ยีน *FAdes* มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืชที่คล้ายคลึงกัน เช่นเดียวกันกับยีน *FAelon* ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในทุกสูตรอาหาร และคงให้เห็นว่ามีการทำงานของอนไซม์ของทั้งสองชนิดที่ทำหน้าที่ในระบบการเปลี่ยนกรดไขมันที่จำเป็นในอาหารให้เป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงได้ (Francis et al., 2009; Tocher et al., 2004) การศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ren et al. (2013) ที่รายงานว่าปลาในที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีการผสมน้ำมันปลาที่มี DHA, EPA และ ARA และสูตรอาหารที่ผสมน้ำมันข้าวโพดที่เป็นแหล่งของ LA มีการแสดงออกของยีน *FAdes* ไม่แตกต่างกันในขณะที่ Zheng et al. (2004) พบร่วมกับ LA ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมน้ำมันลินซีดมีการแสดงออกของยีนมากกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมน้ำมันปลาหมึก ซึ่งกลไกการทำงานของยีนทั้งสองรูปแบบ จึงขึ้นกับชนิดของปลา และการทำงานของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างอีนไซม์

เมื่อพิจารณาการสะสมของกรดไขมันในกล้ามเนื้อปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 4 ชนิด คือ กรดไขมัน LA, LNA, ARA, EPA และ DHA ในปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืช เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบร่วมกับกล้ามเนื้อปลาดุกอุยมีปริมาณ LA มากที่สุดในทุกชุดการทดลอง ในขณะที่ไม่พบว่ามีการสะสมของกรดไขมัน LNA และ ARA ในกล้ามเนื้อซึ่งน้ำมันพืชที่ใช้ในสูตรอาหารจะเป็นแหล่งของกรดไขมัน LA เป็นองค์ประกอบหลักทำให้มีการสะสมในเนื้อปลาในปริมาณสูงกว่ากรดไขมันชนิดอื่น ๆ Bahurmiz and Ng. (2007) กล่าวว่าการสะสมกรดไขมันในเนื้อปลาไม่ความสัมพันธ์กับปริมาณกรดไขมันในอาหาร นอกจากนี้มีการสะสม EPA ในกล้ามเนื้อปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมน้ำมันปลาหมึก 100 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันปาล์ม 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันปาล์มผสมน้ำมันปลาหมึก 50 เปอร์เซ็นต์ และมีการสะสม DHA ประมาณ 0.6-1 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ สุครารัตน์ บรรชุกิกิจกุล และคณะ (2551) รายงานว่า การสะสม EPA และ DHA ในตัวปลา และตับปลา EPA จะมีการสะสมในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย และมีค่าสูงเพียง 1 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* และปริมาณกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืชในอาหารปลาดุกอุยกสามารถสรุปผลการดำเนินการทดลองได้ดังนี้

(1) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAdes* ของปลาดุกอุยมีส่วนของยีนทั้งหมด 1,760 คู่เบส มีส่วน ORF เท่ากัน 445 ตัว (Accession number KF006248) ประกอบด้วยส่วนของ Histidine boxes จำนวน 3 ตำแหน่ง, Transmembrane regions จำนวน 2 ตำแหน่ง และ Cytochrome *b_s* domain จำนวน 1 ตำแหน่ง มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับปลาชนิดต่างๆ อุญี่ในช่วง 70-93 เปอร์เซ็นต์

(2) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FAelon* ของปลาดุกอุยมีส่วนของยีนทั้งหมด 1,218 คู่เบส มีส่วน ORF เท่ากัน 294 ตัว (Accession number KF006249) ประกอบด้วยส่วนของ Histidine box จำนวน 1 ตำแหน่ง Transmembrane regions จำนวน 2 ตำแหน่ง และ ER retention signal จำนวน 1 ตำแหน่ง มีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนกับปลาชนิดต่างๆ อุญี่ในช่วง 75-96 เปอร์เซ็นต์

(3) การศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* ในเนื้อเยื่ออ่อนของปลาดุกอุยกสามารถตรวจสอบการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับ และสมอง ตามลำดับ และการศึกษาการแสดงออกของยีน *FAelon* สามารถตรวจสอบการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อตับ สมอง ม้าม กระเพาะอาหาร และเหงือก ตามลำดับ

(4) การศึกษาการแสดงออกของยีน *FAdes* และ *FAelon* เพียบกับยีน *b-actin* ในปลาดุกอุยที่ทดลองเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งกรดไขมันจากพืชที่แตกต่างกันพบว่า ในทุกสูตรอาหาร ยีน *FAdes* มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อแหล่งกรดไขมันจากพืชเช่นเดียวกับกับยีน *FAelon* และให้เห็นว่า ปลาดุกอุยมีขบวนการการสังเคราะห์กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง ที่มียีน *FAdes* และ *FAelon* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างอีนไซม์ *Fatty acyl desaturase* และ *elongase*

(5) การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อปลาดุกอุยพน LA มีค่าอยู่ระหว่าง 0.78-1.85 มก DHA มีค่าอยู่ระหว่าง 0.64-1.19 มก และ EPA มีค่าอยู่ระหว่าง 0-0.26 มก ปลาดุกอุยที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลาหมึกและน้ำมันพืชในสัดส่วนที่แตกต่างกัน สามารถเปลี่ยน LA ให้เป็น DHA และ EPA ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพน DHA มีปริมาณสูงในสูตรอาหารที่มีการใช้น้ำมันถั่วเหลืองผสมน้ำมันปลาหมึก 50 % (1.19 มก) และน้ำมันทานตะวันผสมน้ำมันปลาหมึก 50 % (1.09 มก) แต่ไม่พบ EPA ในขณะที่ DHA และ EPA ถูกพบในสูตรอาหารที่มีการใช้น้ำมันปลาหมึก 100 % (0.64 และ 0.19 มก) น้ำมันปาล์ม 100 % (0.66 และ 0.18 มก) และ น้ำมันปาล์มผสมกับน้ำมันปลาหมึก 50 % (0.67 และ 0.26 มก)

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สตดิการประมง ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. บุคลากรผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจีดจำแนกเป็นรายชนิดและตามประเภทการเลี้ยง ปี 2554.

<http://www.fisheries.go.th/it-stat/>. มกราคม, 2557.

โฉกชัย เหลืองธุปรามีด. หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ : พิอาร์ บรีนดิ้ง : โพร์เพช, 2548.
บัณฑิต yaw สืบอย. การเพิ่มกรดไขมันโอเมก้า 3 ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยการใช้น้ำมันปลาทูน่า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2545.

สุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล และคณะ. “ชนิดของไขมันที่เหมาะสมในอาหารปลาหม้อ”, ในเอกสารวิชาการฉบับที่ 53/2551. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจีด. กรมประมง. 2551.

อมรรัตน์ ถนนแก้ว, ถาวร จันทโชติ และสุทธิรักษ์ เพชรรัตน์. 2552. “ผลของการหมักและการทำแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงของไขมันและโปรตีนในผลิตภัณฑ์ปลาดุกกร้าที่ผลิตจากปลาดุกเลี้ยงและปลาดุกธรรมชาติ”, วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 12(3): 219, ตุลาคม 2552- มกราคม 2553.

Aliyu-Paiko, M. and et al. 2013. “Estimation of Tissue Distribution of mRNA Transcripts for Desaturase and Elongase Enzymes in *Channa striata* (Bloch, 1793) Fingerlings using PCR Technique”, Taiwania. 58(2): 112-118.

Almaida-Pagán, P.F. and et al. 2007. “Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes”, Aquaculture. 272: 589-598.

AOAC. 1995. “Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analysis Chemists”, Association of Official Analytical Chemists. Arlington: USA.

Bahurmiz, O.M. and Ng, W. 2007. “Effects of dietary palm oil source on growth, tissue fatty acid composition and nutrient digestibility of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., raised from stocking to marketable size”, Aquaculture. 262: 382-392.

Bell, M.V., Dick, J.R. and Porter, A.E.A. 2001. “Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, Lipids. 36: 1153-1159.

ເອກສາຣ໌ອ້າງອີງ (ຕໍ່ອ)

- Bransden, M. P., Chris, G. C. and Nichols, P. D. 2003. "Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance", Comparative Biochemistry and Physiology. 611-625.
- Calder, P.C. and Grimble, R.F. 2002. "Polyunsaturated fatty acid, inflammation and immunity", Nutr. 56: 14-19
- Fonseca, M.J. and et al. 2005. "Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Aquaculture. 11: 241-250.
- Francis, D.S., Peters, D.J. and Turchini, G.M. 2009. "Apparent in vivodelta-6-desaturase activity, efficiency, and affinity are affected by total dietary C-18 PUFA in the freshwater fish Murray cod", Food chem. 57: 3481-4390.
- Glencross, B.D. 2009. "Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture Species", Reviews in Aquaculture. 1(2): 71-124.
- González-Rovira, A. and et al. 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 and et al. 2001. "A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities", Biochemistry. 98(25): 14304-14309.
- Hastings, N. and et al. 2005. "Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from α -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo solar*)", Mar.Biotechnol. 6: 463-474.
- Hsieh, S.L., Chang, H.T. and Kuo, C.M. 2004. "Cloning, tissue distribution and hormonal regulation of stearoyl-CoA desaturase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*", Aquaculture. 230: 527-546.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Libby, P. 2007. "Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease", Nutrition Reviews. 2: 140-153.
- Ling, S. and et al. 2006. "Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*", Aquaculture. 261: 204-214.
- Li, Y-Y. and et al. 2008. "The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ ambient salinities in *Siganus canaliculatus*", Comparative Biochemistry and Physiology. 151: 183-190.
- Marquardt, A. and et al. 2000. "cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family", Genomics. 66: 175-183.
- Masiha, A. and et al. 2013. "Effect of dietary flaxseed oil level on the growth performance and fatty acid composition of fingerlings of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*", A Springer Open Journal. 2: 1-7.
- Monroig, O. and et al. 2009. "Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids. 1791(11): 1093-1101.
- Morais, S. and et al. 2011. "Expression of fatty acyl desaturase and elongase genes, and evolution of DHA:EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.)", Aquaculture. 313: 129-139.
- Petkam, R. and Moodie, G.E. 2001. "Food particle size, feeding frequency, and the use of prepared food to culture larval walking catfish (*Clarias macrocephalus*)", Aquaculture. 194: 349-362.
- Ren, H-T. and et al. 2013. "Two $\Delta 6$ -desaturase-like genes in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Structure characterization, mRNA expression, temperature and nutritional regulation", Gene. 525: 11-17.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, J.G. 2002. The lipid, third edition. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, London, 182-259.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Steffens, W. 1997. "Effects of variation in essential fatty acids in fish feed on nutritive value of freshwater fish for humans", Aquaculture. 151: 97-119.
- Tacon, A.G.J., Metian, M. and Hasan, M.R. Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals sources and composition. Food and Agriculture Organization of the United nations Rome. 2009.
- Tanomman, S. and et al. 2013. "Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*", Comparative Biochemistry and Physiology. 166: 148-156.
- Tocher, D.R. 2002. "Lipid metabolism in teleost fishes", Reviews in Fisheries Science. 11(2): 73-94.
- Tocher, D.R. and et al. 2004. "Effects of water temperature and diet containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Comp. Biochem. Physiol. 137: 49-63.
- Vager, M. and et al. 2007. "Combined effect of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*D. labrax*) larvae development", Aquaculture. 266: 179-190.
- Vagner, M. and Santigosa, E. 2004. "Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review", Aquaculture. 315: 131-143.
- Zheng, X. and et al. 2004. "Characterization and comparison of fatty acyl Δ6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species", Comp.Biochem.Physiol. 139: 269-279.
- Zheng, X. and et al. 2004. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)", Aquaculture. 236: 467-483.
- Zheng, X. and et al. 2005. "Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*)", Biochimica et Biophysica Acta. 1734: 13-24.

ເອກສາຮອ້າງອີງ (ຕໍ່ອ)

- Zheng, X. and et al. 2005. "Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insight with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ desaturase of Atlantic salmon", Lipids. 40: 13-24.
- Zheng, X. and et al. 2009. "Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*)", Aquaculture. 290: 122-131.

ภาคผนวก ๓



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเพาะฟسمเทียมปลาดุกอุย



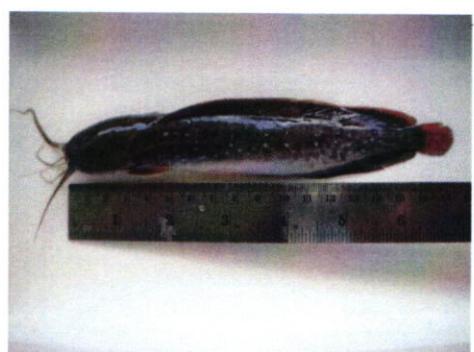
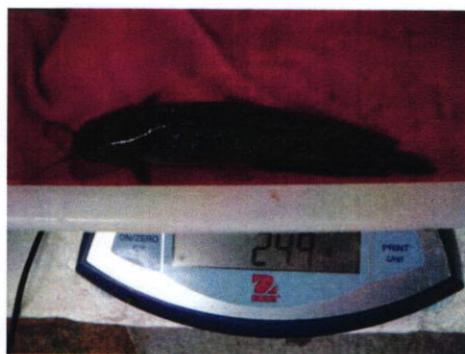
ภาพที่ 2 การผลิตอาหารทดลอง



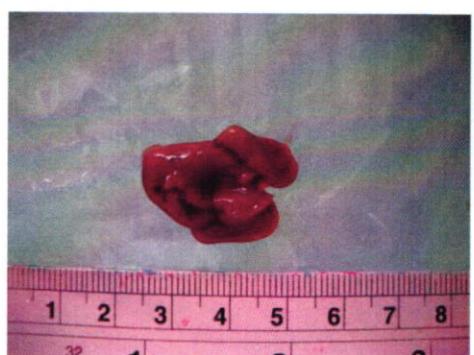
ภาพที่ 3 อุปกรณ์วิเคราะห์โภชนา (ซ้ายชุดอุปกรณ์วิเคราะห์โปรดีน, ขวาชุดอุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน)



ภาพที่ 4 การเตรียมปลาทดลอง



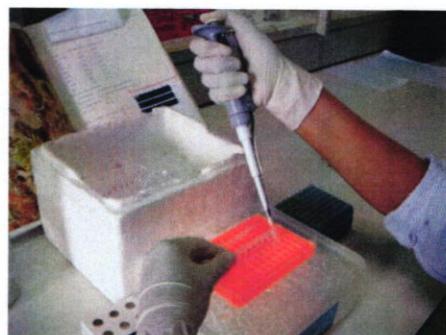
ภาพที่ 5 การชั่งน้ำหนักปลาทดลอง (ซ้าย), การวัดความยาวปลาทดลอง (ขวา)



ภาพที่ 6 การเก็บตัวอย่าง



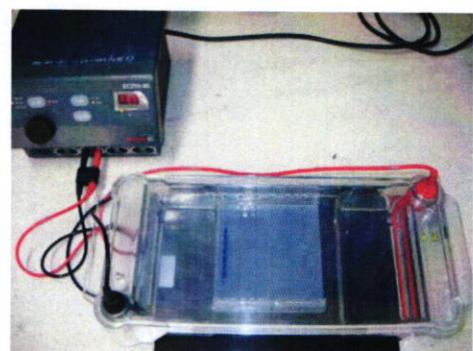
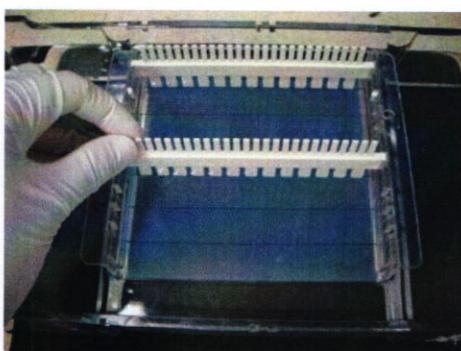
ภาพที่ 7 เครื่องวัดคุณลักษณะสำหรับวัดปริมาณสารอีนเอ



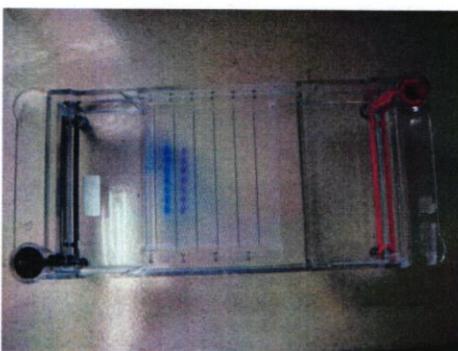
ภาพที่ 8 การเตรียมรีเจนสำหรับทำปฏิกริยาในเครื่อง Thermo cycle



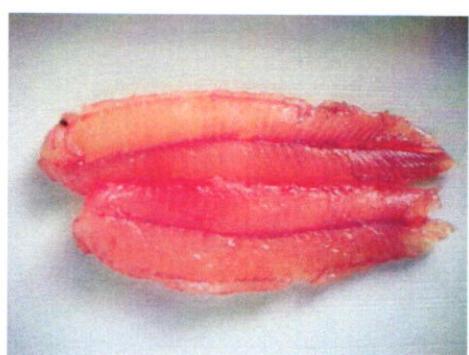
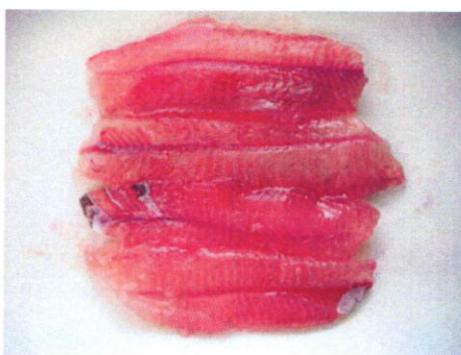
ภาพที่ 9 การเตรียมอาหารสำหรับโคลนพลาสมิด



ภาพที่ 10 การเตรียมอะการอยส์เจล และการแยกขนาดของผลผลิต PCR เครื่องอิเลคโต์ไฟเรซิสต์



ภาพที่ 11 ตรวจ PCR ในเครื่อง gel document (Dolphin-1D, Wealtec Bioscience Co., Ltd)



ภาพที่ 12 กล้ามเนื้อปลาดุกอุยสำหรับนำไปวิเคราะห์กรดไขมัน

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวกนกวรรณ สารสมัคร
วัน เดือน ปีเกิด	10 มีนาคม 2529
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ประมง) มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีการศึกษา 2551
ทุนการศึกษา	ทุนวิจัยบัณฑิตศึกษา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีการศึกษา 2554-2555
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2551-2553 นักวิชาการประมง (พนักงานราชการ) สถานบันนวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง จังหวัดปทุมธานี พ.ศ. 2554-2557 ผู้ช่วยนักวิจัย (จ้างเหมา) ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี พ.ศ. 2557-ปัจจุบัน นักวิชาการประมง (พนักงานราชการ) สำนักงานประมงจังหวัดสกลนคร กรมประมง จังหวัดสกลนคร
ผลงานวิจัย	กนกวรรณ สารสมัคร, ธนาพิพิช แหลมคง, กานุจนา พยุหะ, ชำนาญ แก้วมณี. 2556. ผลของการใช้น้ำมันพีช ทดแทนน้ำมันปลาหมึกในอาหารต่อการเจริญเติบโตใน ปลาดุกอย (<i>Clarias macrocephalus</i> Gunther, 1864). ประชุมวิชาการ นอบ. วิจัย ครั้งที่ 7. 25-26 กรกฎาคม 2556. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Thanathip Lamkom, Kanjana Payooha and Kanokwan Sansamak. 2557. **Characterization of Fatty acyl desaturase and elongase cDNAs and effects of**

replacement fish oil by vegetable oils on growth in the black ear catfish (*Pangasius larnaudii*). การ

ประชุมใหญ่โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุตสาหกรรมศึกษา ครั้งที่ 2 (HERP CONGRESS II). 22-24 มกราคม 2557.

กรุงเทพมหานคร