บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีน delta-6 desaturase (*fads2*) จากปลานิลเพื่อนำมาโคลนเข้าสู่ pYES 2.1 เพื่อสร้างพลาสมิด pY*oni-fads2* และนำเข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้มีการแสดงออกเอ็นไซม์ delta-6 desaturase เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตส พบว่ายีน *onifads 2* ที่ได้จากปลานิลมีโครงสร้างของยีนตรงกับโครงสร้างของยีน *fads 2* ในปลาต่าง ๆ และมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับปลาอื่น ๆ อยู่ในช่วง 72.6%–80.9% การวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ด้วยวิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) พบว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้แสดงออกด้วยน้ำตาลกาแลคโตสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการผลิต mRNA ของยีน *onifads 2* รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส (4.82 ± 0.59 mg g^{-1}) หรือน้ำตาลกาแลคโตส (5.63 ± 0.28 mg g^{-1}) มีปริมาณไขมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลกาแลคโตสมีกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ในปริมาณต่ำ และพบว่า RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาล กาแลตโตส มี C18:4n3 สูงกว่า C18:4n3 ใน RY ที่เลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงผลของการใช้ RY ต่อการเพิ่มปริมาณของ PUFA ในอาร์ทีเมีย โดยทำการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วย RY หรือ ยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (กลุ่มควบคุม, WT) เป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY มีกรดไขมันกลุ่ม n6 ได้แก่ C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6 และ C20:4n6 และ กรดไขมันกลุ่ม n3 ได้แก่ C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3 สูงกว่าอาร์ทีเมียกลุ่มควบคุม และพบว่าสัดส่วนของ C18:3n6 ต่อ C18:2n6 และ สัดส่วนของ C18:4n3 ต่อ C18:3n3 ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY มีค่าสูงกว่าค่าสัดส่วนดังกล่าวในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยยีสต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ยังพบ C22:6n3ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY ต่อมาได้ทำการศึกษาถึงผลของการใช้น้ำมันปลาและน้ำมันลินิน (FSO) ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย ผลการทดลองพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันลินินมีปริมาณกรดไขมัน C18:2n6 และ C18:3n3 สูงขึ้นมาก ในขณะที่อาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วยน้ำมันปลามีปริมาณกรดไขมัน C20:5n3 และ C22:6n3 สูงขึ้นมาก การทดลองต่อมาได้ทำการศึกษาผลของการเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วย RY ร่วมกับน้ำมันลินิน (RY+FSO) ต่อองค์ประกอบไขมันในอาร์ทีเมีย ผลการทดลองพบว่าอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY + FSO มีกรดไขมัน C18:3n6, C18:4n3 และ C20:5n3 สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย WT+FSO และการทดลองนี้ยังพบ C22:6n3ในอาร์ทีเมียที่เลี้ยงด้วย RY + FSO การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกของยีน *onifads2* สามารถเพิ่มปริมาณ PUFA ในอาร์ทีเมียได้

Abstract

In this study, heterogenous expression of delta-6 desaturase (*fads2*) from Nile tilapia was produced to increase polyunsaturated fatty acid (PUFA) in artemia. First, the full-length cDNA of *fads2* (*oni-fads2*) was cloned from Nile tilapia. The *oni-fads2* was cloned into pYES 2.1 to generate pY*oni-fads2* and subsequently expressed in *Saccharomyces cerevisiae* under galactose induction. The RT-PCR was conducted to determine the expression of the recombinant *S. cerevisiae* (RY) that carried pY*oni-fads2*. The result showed that the transcript of the *oni-fads2*was conspicuously detected 24 h after galactose induction. No significant difference ($P>0.05$) in the lipid content of RY was observed between RY grown in galactose (5.63 ± 0.28 mg g^{-1}) and glucose (4.82 ± 0.59 mg g^{-1}) as the carbon source. The endogenous substrates C18:2n6 and C18:3n3 were detectable when RY was grown in the presence of galactose and glucose. Futhermore, the level of C18:4n3 in the RY was higher in galacotse-induction than that in SC media-glucose.

In order to investigate whether RY could increase PUFA content in artemia, artemia nauplii were fed with RY or non-transformed yeast (control yeast; WT) for 12, 18 and 24 h. The result showed that RY enriched artemia had higher amount of n6-PUFA (C18:2n6, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6) and n3-PUFA (C18:3n3, C18:4n3, C20:3n3, C20:5n3) when compared with that of WT enriched artemia. Ratio of C18:3n6 to C18:2n6 and C18:4n3 to C18:3n3 in RY enriched artemia were higher than that in WT enriched artemia. In addition, C22:6n3 was detectable in the RY enriched artemia. Next, the artemia nauplii were fed with fish oil (oil rich in C20:5n3 and C22:6n3) or flax seed oil (FSO) (oil rich in C18:2n6 and C18:3n3) to compare the fatty acid composition of enriched artemia. Compared to the control artemia (artemia without enrichment), fish oil enriched artemia had high content of C20:5n3 and C22:6n3 while FSO enriched artemia had high content of C18:2n6 and C18:3n3. The last experiment was conducted to investigate the fatty acid composition of the combination enrichment of RY and FSO in artemia (RY+FSO). Comparing with WT and FSO enriched artemia (WT+FSO), RY+FSO enriched artemia had greater amount of C18:3n6, C18:4n3 and C20:5n3. Additionally, RY+FSO had higher ratio of C18:3n6 to C18:2n6 and C18:4n3 to C18:3n3 than that in WT+FSO enriched artemia. Moreover, C22:6n3 was detectable in the RY+FSO enriched artemia. Taken together, RY expression *onifads2* could increase PUFA amount in artemia.