บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง คือการโคลนยีน *fads 2* ที่ทำหน้าที่ในการผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase โดยในขั้นต้นจะทำการสำรวจการแสดงออกของยีน *fads 2* ในอาร์ทีเมีย เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของยีน *fads 2* ในอาร์ทีเมีย จึงเป็นการนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง ดังนั้นการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ
การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย และ
การทดลองที่ 2 การนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

การทดลองที่ 1 การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงในอาร์ทีเมีย

1. ตัวอย่างอาร์ทีเมีย

1.1 อาร์ทีเมียในระยะ nauplii

นำไข่อบแห้งของอาร์ทีเมียมาเพาะให้เป็น Artemia nauplii โดยการนำมาใส่ในน้ำทะเลที่มี การปรับ ความเค็มที่เหมาะสม (ประมาณ 25-30 ส่วนในพันส่วน; ppt) ให้อากาศในน้ำอย่างแรง เพื่อให้ไข่อาร์ทีเมียมีการลอยวนอยู่ในน้ำสม่ำเสมอ ไม่กองทับกัน จนไข่อาร์ทีเมียฟักเป็นตัว ทำการแยกเปลือกไข่ออกจากอาร์ทีเมีย โดยทำให้ระดับน้ำด้านบนมืด เพื่อให้อาร์ทีเมียเคลื่อนที่เข้าหาแสงที่ระดับน้ำด้านล่าง แล้วเก็บตัวอย่างอาร์ทีเมียวัยอ่อนไปใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

1.2 อาร์ทีเมียระยะโตเต็มวัย

ตัวอย่างอาร์ทีเมียโตเต็มวัยได้จากแหล่งเลี้ยงปลาสวยงาม นำมาเก็บตัวอย่าง 2 ส่วน ได้แก่ 1) ส่วนหัวและส่วนอกรวมกัน 2) ส่วนของลำตัว

2. การวิเคราะห์หา mRNA ของเอนไซม์ delta-6-desaturase ($\Delta 6$) ในอาร์ทีเมีย

1. ทำการศึกษารวบรวมข้อมูล cDNA และลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ delta-6-desaturase ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ เพื่อนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการทำ alignment ของกรดอะมิโน และ cDNA แล้วทำการเปรียบเทียบเพื่อหาส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด เพื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 2.1

2. ทำการสกัด Total RNA จากตัวอย่างอาร์ทีเมียในข้อที่ 1

โดยตัวอย่างเนื้อเยื่อต้องมีน้ำหนักประมาณ 50-100 มิลลิกรัม (mg) และใส่สาร Trizol 500-1000 µl แล้วทำการบดตัวอย่างให้ละเอียด และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หลังจากนั้นใส่ chloroform 1 ส่วนต่อ 5 ส่วน ของสารละลายในหลอด ทำการผสม (vortex) และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยกชั้นโดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol โดยใส่สาร isopropanol เท่ากับสารละลายอาร์เอ็นเอที่ย้ายมา ทำการ vortex สารละลาย และวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป หลังจากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำ DEPC 225 µl ทำการผสมเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นใส่ DNase I (5U/µl) 1 µl และสาร RQ 1 DNase 10x buffer 25 µl เพื่อกำจัดดีเอ็นเอให้เหลือไว้แต่อาร์เอ็นเอ นำหลอดไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง โดยตั้งอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และทำลายเอนไซม์ DNase I ด้วยอุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยใส่ phenol : chloroform (1 ส่วนต่อ 1 ส่วนของสารละลายที่มีอยู่) ทำการ vortex และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะแยก

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ยีน	เอ็นไซม์ที่ยีนผลิต
NiFad6-F1(start)	5'- ATG GGA GGT GGA AGC CAG CAG ACG G -3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
NiFad6-R1 (stop)	5'- TCA TTT ATG GAG ATA TGC ATC C-3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
FADd6_1	5'- TGC AGC ATG ACT TTG GCC ACC TGT C-3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
FADd6_2	5'-GGT GGA ACC ATC GAC ACT TCC AGC A-3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
B6R1	5'- CCA CCC AGT CAT GGC GGG AGA TCA -3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
B6R2	5'- GAG TTC GGC CAA GTA CGA AGA GGT -3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
ART-R1	5'- GTT GTG VCG TGG CAT KGT -3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
ART-R2	5'- GGA AAY AGR TGR TGY TCR AT-3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
D6-F1	5'-CGA GCA GTC CTT CTT CAA CGA CTG G-3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
D6-R1	5'-CTC TCC GAT CAG CAG CGG CTT CAG A-3'	*fads2*	Delta-6 desaturase
D5F1	5'- CTC AAY TWT CAA ATM GAA CAC CAT T -3'		Delta-5 desaturase
D5F2	5'- ATT ACC MCH HGG TGG CYC CNA TTG T -3'		Delta-5 desaturase
D4F1	5'- CGT BWC HMG GAC VGA TTT CGA ATG G -3'		Delta-4 desaturase
D4F2	5'- CNY TBA TGY TAG CYG TTC AYG AAA T -3'		Delta-4 desaturase
D4R1	5'- T RTA RTG CTC VGA DAT AAA ATG MCC -3'		Delta-4 desaturase
D4R2	5'- C MAC RGG GTG NAA TCC CAT BGC CAT -3'		Delta-4 desaturase
D3F1	5'- G RAC CAT GWT BTG GGC TCT CTT TGT -3'		Delta-3 desaturase
D3F2	5'- CAT GAC TGC GGW CAT GGW WSY TTC T -3'		Delta-3 desaturase

ชั้นโดยส่วนของอาร์เอ็นเอจะอยู่ชั้นบน ทำการดูดสารส่วนบนย้ายไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วย 3 M sodium acetate pH 5.2 (อัตรา 1: 10 ของสารละลาย) และ absolute ethanol (3เท่าของxib,k9iสารละลาย) และทำการ vortex สารละลาย นำหลอดไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน RNA ด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ และทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 2 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดสารละลายทิ้งอีกครั้ง และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยออกไป จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) ในน้ำ DEPC 30 µl และเก็บ total RNA ในตู้เย็น -80°C

3. การสังเคราะห์ The first strand cDNA และการโคลน cDNA ของยีน *fads 2* ด้านปลาย 3' ด้วยเทคนิค 3'RACE

3.1 การสังเคราะห์ The first strand cDNA

นำ total RNA จากข้อ 2. ไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) หลังจากนั้นทำการสังเคราะห์ the first strand cDNA จาก total RNA ข้อ 2 โดยใช้ SMART™ RACE cDNA amplification kit และตามวิธีการของชุดสารละลาย

3.2 การโคลน cDNA ของยีน *fads 2* ด้านปลาย 3'

การโคลน cDNA ของยีน *fads 2* ใช้เทคนิค 3'RACE (3'Rapid amplification of cDNA end) ซึ่งเป็นการโคลนโดยการทำ nested PCR ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 ครั้ง ได้แก่ primary PCR และ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์เส้นต่าง ๆ จากตารางที่ 2.1 ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR โดยใช้ LA Taq kit (Takara) โดยให้มีปริมาณทั้งหมดเท่ากับ 10 µl ประกอบไปด้วย

- 5 U/µl LA Taq (Takara Shuzo, Shiga, Japan)
- 10x buffer LA Taq
- 25 mM $MgCl_2$
- 2.5 mM dNTP
- 10 µM primer forward และ 10 µM primer reverse

สภาวะการทำ PCR เป็นดังนี้ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59 °C 45 วินาที และ72°C 90 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis และทำการแยกผลผลิต PCR ที่มีขนาดที่น่าจะเป็นไปได้ ไปทำการเชื่อมต่อ (ligation) กับพลาสมิด pGEM

3.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ มีปฏิกิริยาประกอบไปด้วย pGEM®-T Easy vector 50 ng/ µl, 2X Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 3 U/µl และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) บ่ม ที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์เข้าสู่เชื้อเซลล์เจ้าบ้าน ต่อจากนั้นทำการสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนได้

4. การศึกษาเบื้องต้นของโครงสร้างยีน *Onifads* 2

การวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *Onifads* 2 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IntroProScan (http://www.ebi.ac.uk) ในการทำนายส่วนของ Cytochrome b 5, fatty acid desaturase domains และส่วนของ transmembrane และวิเคราะห์ hydrophobicity ด้วยโปรแกรม SVMtm TRansmembrane Domain Predictor (http://ccb.imb.uq.edu.au/svmtm/) และวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกับยีน *fads2* ในปลาอื่น ๆ โดยใช้ Clustal X2.1

5. การเลี้ยงรีคอมบีแนนท์ยีสต์

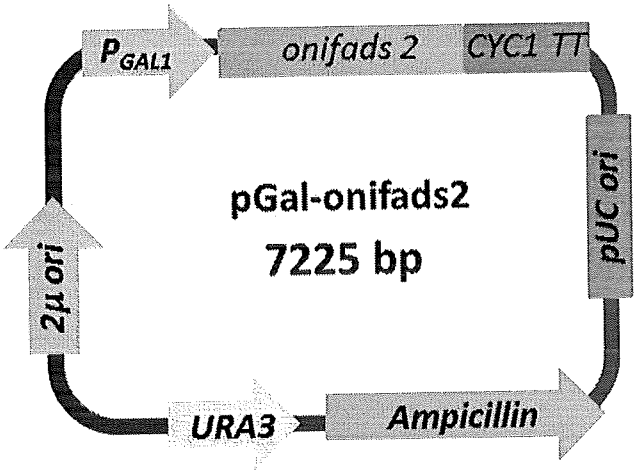
รีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีรีคอมบีแนนท์พลาสมิด pGal-onifads2 (ภาพที่ 2.1) โดยมีส่วนของยีน *Onifads* 2 ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *GAL 1* ดังนั้นการเลี้ยงรีคอมบีแนนท์ยีสต์ให้มีการผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase ของปลานิล จะต้องมีการเหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) ดังนี้

นำ ยีสต์ RY มาเลี้ยงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose 2 ml ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อและนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose 60 ml ในขวดรูปชมพู่และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ต่อมานำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm แล้วนำเชื้อยีสต์ที่ได้มา

เจือจางให้เหลือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.4 หลังจากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงได้เทใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 1,957×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ยีสต์ จากนั้นล้างตะกอนด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose 3 ml จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose เพื่อให้น้ำตาล galactose เหนี่ยวนำทำให้เกิดการแสดงออกของเอ็นไซม์ delta-6 desaturase โดยทำการเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปใช้

6. การเลี้ยงยีสต์ปกติ

นำยีสต์ปกติ (wt) มาเลี้ยงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose + uracil 2 ml ในหลอดสำหรับเลี้ยงเชื้อและนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากหลอดทดลองมาขยายเชื้อเพิ่มลงในอาหาร sc-minimal medium + 2% glucose + uracil 60 ml ในขวดรูปชมพู่และนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บเซลล์ยีสต์เพื่อนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 รีคอมบีแนนท์พลาสมิด pGal-onifads 2 ประกอบด้วยยีน *fads 2* ของปลานิล (*onifads 2*) ซึ่งถูกขับเคลื่อนด้วยโปรโมเตอร์ *GAL1*

7. การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ด้วย Reverse transcription PCR (RT-PCR)

นำเซลล์รีคอมบีแนนท์ยีสต์ (RY) มาสกัด Total RNA และ ทำการสังเคราะห์ the first stand cDNA ของยีน *onifads2* โดยใช้ Hexamers และ Specific primer (V5 c-term) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ *β-actin* เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเป็นตัวมาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *onifads2* ในยีสต์ RY ที่ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ sc-minimal medium + 2% galactose ที่ระยะ 0 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FADd6_1 และ ART_R2 สำหรับยีน *onifads2* และไพรเมอร์ Sc-actin-F คู่กับ Sc-actin-R สำหรับยีน *β-actin* โดยใช้ชุดสารเคมีสำหรับการทำ PCR GoTaq® (Promega) โดยมีสภาวะการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (PCR condition) ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อมา 95°C เป็นเวลา 45 วินาที, 59°C เป็นเวลา 45 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที ติดต่อกันจำนวน 40 รอบ และเข้าสู่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด ดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

8. การวิเคราะห์องค์ประหอบกรดไขมัน

ทำการชั่งตัวอย่าง (ยีสต์ RY ใช้ 5 กรัม , อาร์ทีเมียใช้ 5 กรัม) ลงโถปั่น ขนาด 30 ml เติม Chloroform : Methanol (2 : 1) 30 ml ปั่นละเอียด ที่ 1,957×g 5 นาที แล้วนำไปกรองผ่าน Buchner funnel ด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 ฉีดล้างส่วนที่ค้างอยู่ในโถปั่นและกระดาษกรองด้วย Chloroform : Methanol (2 : 1) แล้วนำส่วนที่กรองได้เทลงในกรวยแยก แล้วเติม 0.03 M $MgCl_2$ 24 ml แล้วเติม 1% BHT 1 ml ทำการเขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเปิดวาล์วเพื่อให้แก๊สออก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อแยกชั้นแล้วจึงไขส่วน chloroform ชั้นล่างออกใส่ในขวดแก้วก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไประเหย chloroform ออกใน Rotary evaporator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนัก

การทำ saponification โดยใส่ Isooctane ลงไป 2 ml และ internal standard 1 ml นำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน และเติม 0.5 N NaOH ใน methanol 1.5 ml เขย่าให้ผสมกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 7 นาที มีการเขย่าเป็นครั้งคราว แล้วนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 14% BF_3-MtOH 2 ml แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วต้มที่ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนได้อุณหภูมิประมาณ 30-40°C จึงเติม Isooctane 1 ml เขย่าให้ผสมกัน และดูดส่วนของ Isooctane ไปใส่ในขวดใหม่ แล้วนำไปทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน จากนั้นเติม Hexane 1 ml แล้วนำไปฉีด Gas Chromatography

การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันโดยใช้ Gas Chromatography (GC) ใช้ปริมาณสารที่ฉีด 1 µl โดยใช้เครื่อง GC รุ่น GC2014 (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ RESTEK Rtx®-Wax (Restek, Bellefonts, PA, USA) ขนาด 30 m×0.25 mm ID×0.25 µm โดยใช้แก๊สไฮโดรเจนเป็น carrier gas

ที่ความเร็ว 20 เซนติเมตรต่อวินาที อัตราส่วนการปล่อยสาร 25 : 1 อุณหภูมิ injector เท่ากับ 230°C อุณหภูมิ detector เท่ากับ 250°C และมีสภาวะการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์โดยเริ่มต้นที่ 140°C เพิ่มอุณหภูมิเป็น 220°C ด้วยอัตรา 4 °C ต่อนาที และให้อุณหภูมิคอลัมน์อยู่ที่ 220 °C เป็นระยะเวลา 40 นาที สำหรับสารมาตรฐาน (standard FAME) ใช้ 37 component FAME standard (Supelco, Sigma, USA) ทำการวิเคราะห์ชนิด fatty acid โดยการเปรียบเทียบกับ retention time และ พื้นที่ peak กับสารมาตรฐาน

การทดลองที่ 2 การนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีพลาสมิดเวกเตอร์ที่มียีน *fads 2* ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ delta-6 desaturase จากปลานิล มาเลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันพืชที่มีกรดไขมันโอเมก้า 3 สูง เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

การทดลองนี้เป็นการนำเอารีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่มีการแสดงออกยีน *Onifads* 2 ซึ่งเป็นยีน *fads 2* ของปลานิลมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย โดยมีการให้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชโดยในขั้นต้นจะมีการวิเคราะห์ถึงโครงสร้างของยีน *Onifads* 2 วิเคราะห์ความคล้ายคลึงกับยีน *fads 2* ของปลาต่าง ๆ ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว และทำการวิเคราะห์ถึงการแสดงออกของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ที่ระดับการ transcription ตามด้วยองค์ประกอบของกรดไขมันของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ แล้วจึงนำไปใช้เลี้ยงอาร์ทีเมียร่วมกับน้ำมันเมล็ดลินิน

1. การเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

1.1 แผนการทดลอง

กลุ่มที่	ชนิดยีสต์และความหนาแน่น
1	ยีสต์ปกติ (wt) 5×10^3
2	ยีสต์ปกติ (wt) 5×10^4
3	ยีสต์ปกติ (wt) 5×10^5
4	ยีสต์รีคอบมีแนนท์ (RY) 5×10^3
5	ยีสต์รีคอบมีแนนท์ (RY) 5×10^4
6	ยีสต์รีคอบมีแนนท์ (RY) 5×10^5

1.2 การเตรียมยีสต์

ทำการเตรียมรีคอมบีแนนท์ยีสต์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2 และยีสต์ปกติเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 ข้อ 3 แล้วนับจำนวนยีสต์ แล้ว

1.3 การเตรียมอาร์ทีเมีย

นำอาร์ทีเมียมา 2 กรัมแช่ในน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน 100 มิลิลิตร ประมาณ 1.5-2 ชั่วโมง เตรียมน้ำเค็ม (น้ำทะเลเข้มข้นแล้วนำมาเจือจาง) ให้ได้ความเข้มข้น 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) ปริมาณ 600 มิลลิลิตร แล้วให้อากาศแบบเต็มที่ เมื่ออาร์ทีเมียฟักออกมา (ประมาณ 18-24 ชั่วโมง) ทำการแยกอาร์ทีเมียออกจากเปลือกไข่ ล้างด้วยน้ำทะลเที่สะอาดก่อนเข้าสู่การทดลอง

ทำการใส่ยีสต์ลงในน้ำทะเลปริมาณ 1 ลิตร โดยปรับความหนาแน่นของอาร์ทีเมียที่ใช้ในการทดลองให้เท่ากับ 25,000 ตัวต่อลิตร และยีสต์ตามที่ระบุไว้ในข้อที่ 2.1.2 ที่ระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันตามวิธีการที่อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 ข้อ 5

2. การเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันลินินและน้ำมันปลาต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

2.1 แผนการทดลอง

กลุ่มที่	
1	อาร์ทีเมีย
2	อาร์ทีเมีย + น้ำมันปลา
3	อาร์ทีเมีย + น้ำมันลินิน

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันน้ำมันลินินและน้ำมันปลา

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของน้ำมันปลาและน้ำมันลินินตามวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อที่ 5 ของการทดลองที่ 1 พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันดังแสดงในตารางที่ 2.1

2.3 การทดลองเลี้ยงอาร์ทีเมีย

- ทำการปั่นน้ำมันปลา 0.25 กรัมต่อลิตรในน้ำทะเล หรือนำมันลินิน 0.25 กรัมต่อลิตรในน้ำทะเล เพื่อทำให้เป็นอิมัลชัน (emulsion) น้ำมันลินินและน้ำมันปลา แล้วจึงเตรียมอาร์ทีเมียตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.1.3 แล้ว เลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยน้ำมันปลาหรือน้ำมันลินิน เป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในระหว่างการเลี้ยงมีการให้อากาศอย่างเต็มที่ แล้วจึงกรองเก็บอาร์ทีเมีย เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันดังรายละเอียดในข้อที่ 5 ของการทดลองที่ 1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลา และน้ำมันลินิน

กรดไขมัน (มิลลิกรัมต่อกรัมไขมัน)	น้ำมันปลา	น้ำมันลินิน
C14:0	0.23	0.11
C16:0	1.39	11.46
C16:1	0.57	0.16
C18:0	1.47	4.88
C18:1n9	1.44	6.29
C18:2n6	0.52	18.14
C18:3n6	0.06	0.08
C20:3n6	0.17	nd
C20:4n6	0.07	0.11
C18:3n3	8.73	51.49
C18:4n3	0.74	0.08
C20:3n3	1.00	0.08
C20:5n3	31.30	1.37
C22:6n3	23.74	0.14
C20:0	0.19	0.04
C20:1	0.46	0.04
C20:2	0.13	0.09
C22:0	0.10	0.17
C22:1n9	0.12	0.05
C22:2	0.72	0.05
C24:0	1.65	0.72

3. การเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์หรือรีคอมบีแนนท์ยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย

3.1 แผนการทดลอง

กลุ่มที่	ชนิดยีสต์และความหนาแน่น
1	ยีสต์ปกติ (wt) 5 x 10^3 + น้ำมันลินิน
2	ยีสต์ปกติ (wt) 5 x 10^4 + น้ำมันลินิน
3	ยีสต์ปกติ (wt) 5 x 10^5 + น้ำมันลินิน
4	ยีสต์รีคอบมีแนนท์ (RY) 5 x 10^3 + น้ำมันลินิน
5	ยีสต์รีคอบมีแนนท์ (RY) 5 x 10^4 + น้ำมันลินิน
6	ยีสต์รีคอบมีแนนท์ (RY) 5 x 10^5 + น้ำมันลินิน

3.2 การเลี้ยงอาร์ทีเมีย

ทำการเตรียมยีสต์ปกติทำการเตรียมรีคอมบีแนนท์ยีสต์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 2 และยีสต์ปกติเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 ข้อ 3 แล้วนับจำนวนยีสต์ และเตรียมอาร์ทีเมียเช่นเดียวกับข้อที่ 2.1.3 และทำอิมัลชัน (emulsion) น้ำมันลินินเช่นเดียวกับข้อที่ 2.2.3 แล้วเลี้ยงอาร์ทีเมียด้วยยีสต์ร่วมกับน้ำมันลินินเป็นระยะเวลา 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในระหว่างการเลี้ยงมีการให้อากาศอย่างเต็มที่ แล้วจึงกรองเก็บอาร์ทีเมีย เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันดังรายละเอียดในข้อที่ 5 ของการทดลองที่ 1