ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุวิศวกรรม | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การโคลน การแสดงออกและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis*)

Cloning, Expression Gene and Enzyme Activity Analysis of α-*amylase* from Oyster (*Saccostrea commercialis*)

นามผู้วิจัย นางสาววิมลศิริ สีหะวงษ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์อัญชณี คูเบอร่า, ปร.ด.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลน การแสดงออกและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis*)

Cloning, Expression Gene and Enzyme Activity Analysis of α-amylase from Oyster (*Saccostrea commercialis*)

โดย

นางสาววิมลศิริ สีหะวงษ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิมลศิริ สีหะวงษ์ 2554: การโคลน การแสดงออกและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D. 79 หน้า

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full Length) ของยีน *alpha-amylase* (*ScAmy*) จากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis)* โดยใช้เทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACEs) พบว่ายีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,729 คู่เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame, ORF) ที่มีความยาว 1,563 คู่เบส แปลเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 520 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57.763 kDa และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.36 ซึ่งพบลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) ได้แก่ FEW, GYCGVQISP, DVIINHM, HNYN, LVDLK, GFRVDTAKH, EVID, FTDNHD, GLTRVMSSY เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ ScAMY มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของหอยนางรมสายพันธุ์ *Crassostrea gigas* (CgAMY) พบว่ามีความเหมือนกัน 88 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (ScAMY) สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 40 °C และ 6.00 ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอ็นไซม์คือ น้อยกว่า 0.5 M ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในแต่ละเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสมากที่สุดในเนื้อเยื่อส่วนของต่อมน้ำย่อย (digestive grand) ปาก (labia Palps), เหงือก (gill), เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) ตามลำดับและไม่พบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อยึดติด (muscle) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์การแสดงออกโดยเทคนิค Real-time PCR มีผลตรงกับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wimonsiri Sehawong 2011: Cloning, Expression Gene and Enzyme Activity Analysis of α-*amylase* from Oyster (*Saccostrea commercialis*). Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program.
Thesis Advisor: Associate Professor Lertluk Ngernsiri, Ph.D. 79 pages.

The study reports the full length nucleotide sequence of α-*amylase* (*ScAmy*) cDNA gene from the oyster, *S. commercialis,* using Rapid Amplification of cDNA End (RACE) technique. The obtained *ScAmy* cDNA was 1,729 bp long. The cDNA contained a 1,563 bp open reading frame (ORF) encoding 520 amino residuess. The predicted ScAmyI molecular mass of mature protein was 57.763 kDa and the estimated isoelectric point (pI) was 6.36. The α-amylase (ScAMY) protein had 9 conserved domains (FEW, GYCGVQISP, DVIINHM, HNYN, LVDLK, GFRVDTAKH, EVID, FTDNHD, GLTRVMSSY). The ScAMY sequence was BLAST with the CgAMY of *Crassostrea gigas* and showed 88 % identity. The optimum temperature and pH of ScAMY were found at 40 °C and 6.00, respectively. The enzymes were active at 0.5 M NaCl. Tissue-specific *ScAmy* mRNA expression was examined by Real-Time PCR technique and RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) techniques. We found that two techniques showed the same results.The *ScAmy* was expressed at the highest levels in the digestive gland, Labia Palps, gill, mantel respectively and not expressed in muscel.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เลิศลักษณ์ เงินศิริ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ที่ประสิทธิประสาทความรู้ ให้คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณ อาจารย์ อัญชณี คูเบอร่า กรรมการ ที่ให้คำแนะนำในการวิจัยเป็นอย่างสูง และอาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นอย่างสูง ที่สนับสนุนห้องปฏิบัติการเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณ อาจารย์ ประดิษฐ์ แสงทอง และพี่ธนพร พิณพาท เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำในการวิจัยและให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย และคุณ พิษณุกร มะกลาง ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างหอยนางรมเพื่อใช้วิจัย และพี่ๆ เพื่อนๆ ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการวิจัย ด้วยดีตลอดมา

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว ที่เสียสละสนับสนุนทุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจเป็นอย่างดี ตลอดระยะเวลาการศึกษาความดีทั้งหลายแห่งวิทยานิพนธ์ ขอมอบแด่ บิดา-มารดา ครู อาจารย์ทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทความรู้ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

วิมลศิริ สีหะวงษ์

พฤษภาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	37
สรุป	66
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	67
ภาคผนวก	75
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	79

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Sc*AMY) เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ	49
2	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Genetic Distance ของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ	50
3	แสดงความเหมือน (Conservation) ของกรดอะมิโนแอลฟาอะไมเลส (*Sc*AMY) บริเวณ side-chains ในกระบวนการเข้าไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาและบริเวณของ Substrate และไอออน	53
4	ค่า Melting curve ของ Primer ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนแอคตินของหอยนางรมในเนื้อเยื่อต่างๆ	59

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หอยนางรมสายพันธุ์ *Crassostrea Saccostrea* ที่พบในประเทศไทย	6
2	ลักษณะของหอยนางรม	7
3	วงจรชีวิตของหอยนางรม	8
4	ระบบทางเดินอาหารของหอยนางรม	9
5	บริเวณที่พบหอยนางรมสายพันธุ์ *Crassostrea belchen, Crassostrea lugubris, Saccostrea commercialis*	11
6	การย่อยสลายซับสเตรตบริเวณพันธะไกลโคซิล	13
7	การทำงานของเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลส	15
8	แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) pGEM-T Easy vector	28
9	ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อเยื่อต่อมน้ำย่อยของหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*)	38
10	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ AMYF, AMYR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส	39
11	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ 3′ RACE PCR product โดยใช้ไพรเมอร์ Amy3R ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส	40
12	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ 5′ RACE PCR product โดยใช้ไพรเมอร์ Amy5F ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส	40
13	(a) การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full length) ของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลส ที่ได้จาก 3′, 5′ RACE และช่วงกลางของยีนแอลฟาอะไมเลส (b) แผนผังการออกแบบไพรเมอร์ (ตำแหน่งของ Specific primer) ของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ	42 42
14	แถบ PCR Produces ของยีนแอลฟาอะไมเลสโดยใช้ไพรเมอร์ AMY2F คู่กับ AMY2R ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส	44
15	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ	46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ส่วนของ secondary-structure element ของ (β/α) ในยีน แอลฟาอะไมเลส ของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ	48
16	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแอลฟาอะไมเลส ของหอยนางรม (*Sc*AMY)	51
17	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟา-อะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม Vertebrates และกลุ่ม Invertebrates	54
18	การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ	57
19	Melting curve แสดงค่า Melting temperature ของดีเอ็นเอในยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบมาใช้เป็นแม่แบบ โดยใช้เทคนิค Relative Real-Time PCR	59
20	การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ	60
21	ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส	61
22	ผลการแสดงออกของค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับต่างๆที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส	62
23	ผลของความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส	62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
cDNA	=	complementary DNA
Da	=	dalton
dNTP	=	deoxynucleotide-5-triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
LB	=	lulia-Bertani medium
M	=	molar
mM	=	milimolar
ng	=	nanogram
ml	=	mililitre
O.D.	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
pI	=	isoelectric point
IPTG	=	isopropyl thiogalactoside
RNA	=	ribonucleic acid
RACE-PCR	=	Rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction
Rnase	=	ribonuclease
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
TAE	=	Tris acetate EDTA electrophoresis buffer
TE	=	Tris EDTA
Tm	=	melting temperature
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	=	unit

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

UV	=	ultraviolet
V	=	volt
W/V	=	weigth by volume
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranosid
Ala (A)	=	alanine
Arg (R)	=	arginine
Asn (N)	=	asparagine
Asp (D)	=	aspartic acid
Cys (C)	=	cysteine
Glu (E)	=	glutamic acid
Gln (Q)	=	glutamine
Gly (G)	=	glycine
His (H)	=	histidine
Leu (L)	=	leucine
Lys (K)	=	lysine
Met (M)	=	methionine
Phe (F)	=	phenylalanine
Pro (P)	=	proline
Ser (S)	=	serine
Thr (T)	=	threonine
Trp (W)	=	tryptophan
Tyr (Y)	=	tyrosine
Val (V)	=	valine
Asx (B)	=	asparagine หรือ aspatic acid
Glx (Z)	=	glutamine หรือ glutamic acid
Xle (J)	=	Leucine หรือ Isoleucine

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การโคลน การแสดงออกและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis*)

Cloning, Expression Gene and Enzyme Activity Analysis of α-*amylase* from Oyster (*Saccostrea commercialis*)

คำนำ

"หอยปากจีบ" หรือ "หอยเจาะ" มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccostrea commercialis* เป็นหอยนางรมที่มีขนาดเล็กเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีรสชาดดี มีคุณค่าทางโภชนาการและยังสามารถนำมาประกอบเป็นอาหารได้หลากหลาย และเป็นวัตถุดิบป้อนโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (กรมประมง, 2536) จัดว่าเป็นหอยทะเลที่มีคุณค่าและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับชุมชนใกล้เคียงหรืออยู่ติดกับชายฝั่งทะเล ทั้งนี้เพราะสามารถนำหอยนางรมมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งใช้เป็นอาหารโดยตรง นอกจากนี้เปลือกของหอยนางรมยังนำมาบดเป็นปูนขาวเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการก่อสร้าง (พัฑยารัตน์, 2550)

หอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ *(Saccostrea commercialis)* เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรมอาหารชนิดหนึ่งของประเทศไทย จากข้อมูลทางสถิติของกรมประมง พบว่าในปี ค.ศ. 2000 ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทย 0.7 ล้านตัน (เป็นอันดับที่ 5 ของโลก) อุตสาหกรรมการเลี้ยงหอยนางรมตั้งแต่อดีตจนปัจจุบันมีการขยายตัวสูงขึ้นและมีแนวโน้มขยายตัวได้อีกมากเพราะผลผลิตในปัจจุบันยังไม่เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ หอยนางรมจึงเป็นสัตว์น้ำที่มีผู้สนใจศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ กลไกที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของหอย รวมทั้งกลไกการย่อยอาหารและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอาหาร เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งมีการศึกษาถึงในระดับโมเลกุล

แอลฟาอะไมเลส *(alpha*-Amylase) นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบการย่อยอาหารของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ต่างๆ โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทำหน้าที่ย่อยสลายอาหารจำพวกแป้งไกลโคเจน (Glycogen) ให้มีขนาดเล็กลงท้ายสุดของกลไกจะได้น้ำตาลมอลโทส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(maltose) และเด็ซทริน (dextrin) ผลผลิตที่ได้จะมีขนาดเล็กลงมาก และท้ายสุดของกลไกจะได้น้ำตาลมอลโทส ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต จากนั้นก็จะมีการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป ดังนั้นการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลส อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาประสิทธิภาพในการทำงานของเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนแอลฟาอะไมเลสจากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (Full Length)

2.เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมโดยเทคนิค RT-PCR และ Real-Time PCR เพื่อดูระดับการแสดงออกของเนื่อเยื่อในอวัยวะส่วนต่างๆ

3. เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเนื่องมาจาก อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของเกลือ ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอ็นไซม์

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆโดยศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสและลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

หอยนางรม (oyster) เป็นหอยสองฝาที่เกาะอยู่กับที่ ในประเทศไทยมีการเลี้ยงหอยนางรมอยู่มี 3 สายพันธุ์ คือ หอยตะโกรมกรามขาว *(Crassostrea belcheri)* หอยตะโกรมกรามดำ *(Crassostrea lugubris)* และหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) ซึ่งหอยแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันดังภาพที่ 1 หอยนางรมแต่ละสายพันธุ์มีบริเวณที่เลี้ยงดังนี้คือ

หอยตะโกรมกรามขาว *(Crassostrea belcheri)* นิยมเลี้ยงกันมากทางภาคใต้ชายฝั่งตะวันออก คือ จังหวัดชุมพรและจังหวัดสุราษฎร์ธานี และชายทะเลฝั่งอันดามัน คือ จังหวัดระนอง จังหวัดพังงา จังหวัดตรังและจังหวัดสตูล เป็นต้น จังหวัดที่เลี้ยงหอยตะโกรมกรามขาวกันมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี นอกจากนี้ยังพบว่ามีการนำเอาลูกหอยจากภาคใต้มาเลี้ยงกันบ้างเล็กน้อย ในเขตจังหวัดชลบุรี เช่น ตำบลอ่างศิลาและตำบลแหลมแท่น เป็นต้น

หอยนางรมตะโกรมดำ *(Crassostrea lugubris)* เป็นหอยนางรมที่ไม่ได้รับการส่งเสริมให้มีการเลี้ยงมากนักเนื่องจากลักษณะของตัวหอยมีสีดำทำให้ไม่เป็นที่นิยมบริโภคมากนัก แต่จะพบในแถบชายฝั่งตะวันออกบริเวณจังหวัดสุราษฎร์ธานี

"หอยปากจีบ" หรือ "หอยเจาะ" (*Saccostrea commercialis)* นิยมเลี้ยงกันมากที่แถบภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดจันทบุรี จังหวัดระยอง (ทรงชัย, 2546)

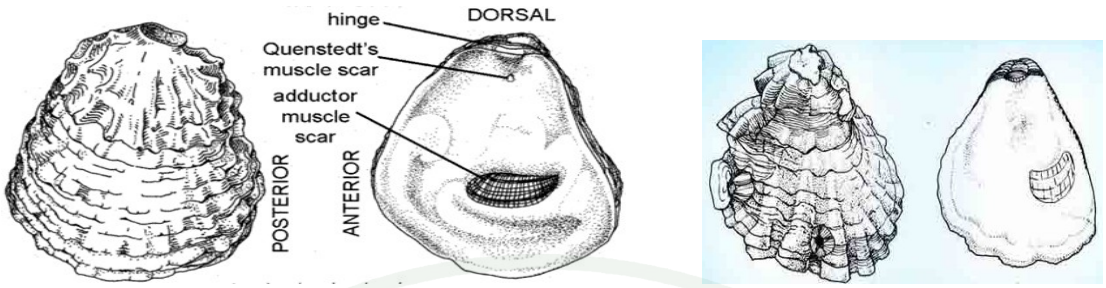
หอยนางรมปากจีบมีขนาดเล็กเป็นที่รู้จักกันดีแพร่หลายทั่วไป เนื้อมีรสชาดดี มีคุณค่าทางโภชนาการและยังสามารถนำมาประกอบเป็นอาหารได้หลายชนิด (กรมประมง, 2536) จึงจัดว่าเป็นหอยทะเลที่มีคุณค่าและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับชุมชนใกล้เคียงหรืออยู่ติดกับชายฝั่งทะเล ทั้งนี้เพราะสามารถนำหอยปากจีบมาใช้ประโยชน์ได้อย่างเต็มที่ ทั้งใช้เป็นอาหารโดยตรง ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและอุตสาหกรรมการก่อสร้างจากปูนขาวที่ได้จากเปลือกหอยบด (พัฑยารัตน์, 2550) หอยปากจีบอาศัยอยู่ตั้งแต่บริเวณปากแม่น้ำตลอดไปจนถึงบริเวณชายฝั่งทะเล ซึ่งในบริเวณดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงกว้าง มีการเปลี่ยน แปลงทางกายภาพ เช่น ความขุ่นใสของน้ำอันเนื่องจากสารแขวนลอยประเภท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์อยู่ตลอดเวลา (พิทักษ์, 2540) หอยปากจีบมีความสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้นอยู่เป็นประจำ (ศุภพงศ์, 2532) ทำให้หอยปากจีบเป็นหอยนางรมที่มีศักยภาพสำหรับการนำมาเพาะเลี้ยงในลักษณะครบวงจร

อุตสาหกรรมการเลี้ยงหอยนางรมตั้งแต่อดีตจนปัจจุบันนับว่ามีการขยายตัวในการลงทุนสูงขึ้น จากข้อมูลสถิติทางการประมงที่รายงานโดย FAO ในปี ค.ศ. 2000 ผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำรวมทั่วโลกมีปริมาณมากกว่า 45.7 ล้านตัน ผลผลิตสัตว์น้ำประเภทหอยจากการเพาะเลี้ยงรวมทั่วโลกมีประมาณ 10.7 ล้านตัน เป็นหอยนางรมมากที่สุดคือประมาณ 4 ล้านตัน ในประเทศไทยมีผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงหอยประมาณ 0.7 ล้านตัน คิดเป็นอันดับที่ 5 ของโลก (Food and Agriculture Organization [FAO], 2005) โดยในปี พ.ศ. 2518 มีพื้นที่การเพาะเลี้ยงหอยนางรมโดยรวม 2,042 ไร่ ผลผลิต 5,457 ตันต่อปี ส่วนในปี พ.ศ. 2528 มีพื้นที่การเลี้ยงโดยรวมเพิ่มมากขึ้นเป็น 6,053 ไร่ ในขณะที่ได้ผลผลิตเพียง 5,241 ตันต่อปีเท่านั้น (กรมประมง, 2536) จนกระทั่งในช่วงระยะหลังจากปี พ.ศ. 2531 การเลี้ยงหอยนางรมเริ่มได้รับการสนใจจากชาวประมงที่มีถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ตามเขตจังหวัดชายทะเลเพิ่มมากขึ้น ทำให้พื้นที่การเลี้ยงหอยนางรมขยายเพิ่มมากขึ้นประมาณในอัตราร้อยละ 14 ต่อปี ผลผลิตที่ได้จากฟาร์มเพิ่มขึ้นในอัตราร้อยละ 73 ต่อปี และปัจจุบันมีผู้เลี้ยงหอยนางรมอยู่ประมาณ 4,745 ราย เนื้อที่การเลี้ยง 8,184 ไร่ ผลิตหอยนางรมได้ประมาณปีละ 19,274 ตัน ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2542 พบว่า หอยปากจีบเป็นทั้งเปลือกซื้อจากฟาร์มในท้องที่การเลี้ยงทางภาคใต้ เมื่อเทียบกับผลผลิตประมาณ 5,000 - 6,000 ตัวต่อไร่ จะได้ค่าตอบแทนประมาณ 60,000.- 96,000. บาทต่อไร่และราคาขายเมื่อ วันที่ 30 ตุลาคม 2552 หอยปากจีบสดซื้อขายกันในเขตจังหวัดชลบุรีจะมีราคากิโลกรัมละประมาณ 20-25 บาท นับว่าหอยนางรมเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญต่อ การสร้างรายได้ให้กับชุมชนชาวประมงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน (ประจิต, 2540)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A) (B)

ภาพที่ 1 หอยนางรม *Crassostrea* และ *Saccostrea* ที่พบในประเทศไทย

(A) Genus *Crassostrea* และ (B) Genus *Saccostrea*

ที่มา: ธีระชาติ (2539)

อนุกรมวิธานของหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมนั้นจัดลำดับทางอนุกรมวิธานตามฐานข้อมูล NCBI (จรวย, 2543) ได้ดังนี้

Superkingdom : Eukayota
Kingdom : Metazoa
Phylum : Mollusca
Class : Bivalvia or Pelecypoda
Order : Ostreoida
Family : Ostraeidae
Genus : *Saccostrea*
Species : *commercialis*

ลักษณะของหอยนางรม

หอยนางรมเป็นหอยทะเลสองฝาที่เกาะอยู่กับที่ โดยฝาทั้งสองข้างไม่เท่ากัน (ภาพที่ 2) บางชนิดมีสีน้ำตาล หรือสีเทา โดยมีกาบบนใหญ่และแบนกว่ากาบล่าง ส่วนกาบล่างซึ่งมีลักษณะโค้งเว้าจะเป็นส่วนที่มีตัวหอยติดอยู่ ด้านที่มีเนื้อฝังอยู่จะเว้าลึกลงไปคล้ายรูปถ้วย เปลือกหอยนางรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประกอบด้วยหินปูนร้อยละ 95 เปลือกข้างซ้ายติดอยู่กับวัสดุที่เป็นของแข็งหรือจานยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้หลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล ดังนั้นหอยที่ลงยึดเกาะจึงไม่มีการเคลื่อนที่อีกตลอดชีวิตของมันด้วยเหตุนี้หอยนางรมจึงไม่มีเท้า (foot) ซึ่งผิดกับหอยสองฝาส่วนมาก ส่วนอวัยวะที่เหลือก็ไม่แตกต่างจากหอยสองฝาอื่น ๆ มากนัก โดยจะไม่มีฟัน ไม่มีท่อน้ำและไม่มีเส้นใย นอกจากนี้หอยนางรมยังมีกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) เพียงอันเดียว (คเชนทร์, 2544) หอยที่พบในธรรมชาติมักจะอยู่กันอย่างเบียดเสียดจึงมีรูปร่างบิดเบี้ยวไปตามพื้นที่ที่เกาะอาศัยอยู่ เปลือกหอยนางรมประกอบด้วยหินปูนร้อยละ 95 รสชาติของหอยนางรมขึ้นอยู่กับแหล่งอาศัย หรือแหล่งเพาะเลี้ยงมากกว่าสายพันธุ์ (จรวย,2543)

ภาพที่ 2 ลักษณะของหอยนางรม

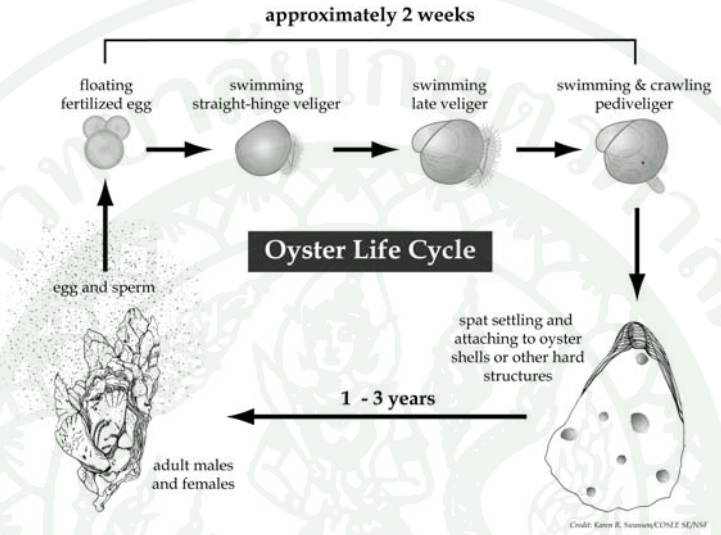
ที่มา : ธีระชาติ (2539)

วงจรชีวิตของหอยนางรม

วงจรชีวิตของหอยนางรมเริ่มจากตัวเต็มวัยจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม หอยตัวผู้จะปล่อยไข่และตัวเมียจะปล่อยสเปิร์มออกมาในน้ำ ออกมาผสมกัน จากนั้นไข่ที่ได้รับการผสมสมบูรณ์แล้วไข่จะพัฒนาไปเป็น planktonic ว่ายอยู่ในน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วจึงเป็นตัวอ่อน trochophore เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมงจะเกิดการพัฒนาอวัยวะส่วนบานพับเปลือกหอยเป็นเส้นตรง (straight hinge) ลูกหอยในระยะนี้มีรูปร่างลักษณะคล้ายตัวดี ทำให้เรียกลูกหอยในระยะนี้ว่าอักษรดี (D-stage)ในระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง หลังจากมีเปลือกบานพับแล้วลูกหอยในระยะอักษรดีเริ่มกินสาหร่ายเซลล์เดียวหรือแพลงต์ตอนที่มีขนาดเล็กไม่เกิน 5 ไมโครลิตร เป็นอาหาร เช่น monochrysis หรือ isochrysis ในช่วงนี้ลูกหอยนางรมจะว่ายน้ำเพื่อหาอาหารเป็นเวลา 3 อาทิตย์ (คมน์, 2533) ภายใต้สภาพอุณหภูมิและอาหารที่เหมาะสมลูก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หอยนางรมจะเจริญเป็น เพดิวีลิเจอร์ (pediveliger) ที่มีจุดสีดำเรียกว่าตาหรืออายสปอต (eyespot) ซึ่งเป็นอวัยวะรับแสงที่กึ่งกลางของลำตัวทั้งสองข้าง ตัวอ่อนของหอยบางชนิดเท่านั้นที่มีอายสปอต หลังจากนั้นเปลือกของลูกหอยเกาะยึดติดกับวัสดุแวดล้อมที่มีอาหารที่สมบูรณ์ เช่น โขดหินใต้ทะเล ท่อนไม้ เสาซีเมนต์ (ชัยวัฒน์, 2540) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของหอยนางรม

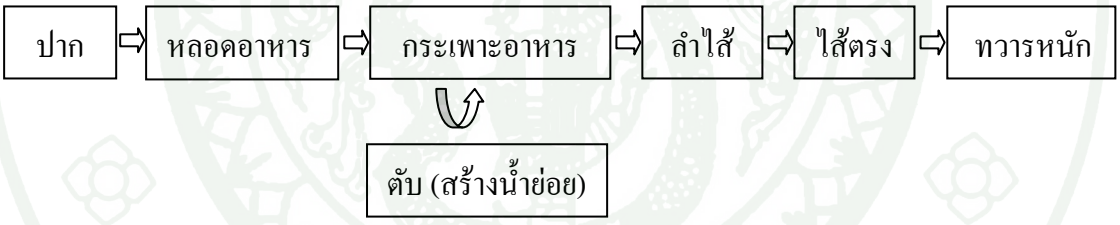
ที่มา: Ward (1998)

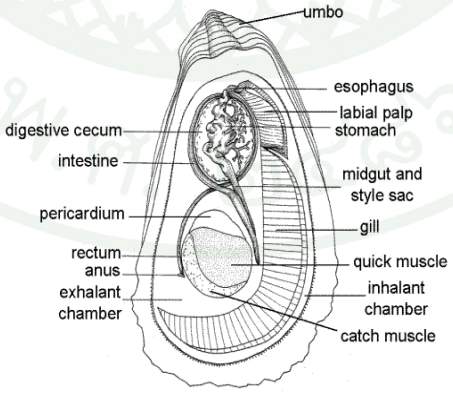
เมื่อลูกหอยนางรมกำลังจะเริ่มเกาะ ผู้เพาะเลี้ยงจะนำวัสดุที่ใช้ล่อหอยลงเกาะเรียกว่า คัลช (cultch) ตัวอ่อนของหอยนางรมที่ลงเกาะเรียกว่า ลูกหอยระยะเป็นเกล็ดหรือสแปทท์ (spat) เนื่องจากการที่ลูกหอยนางรมต้องมีวัสดุสำหรับเกาะ จะทำให้ขั้นตอนการเลี้ยงในช่วงต่อไปต้องใช้แรงงานและพื้นที่ในการเลี้ยงมาก ดังนั้นจึงมีผู้คิดค้นวิธีทำให้ลูกหอยแปรสภาพเป็นหอยวัยเกล็ดโดยไม่ต้องใช้วัสดุลงเกาะซึ่งสามารถทำได้โดยใช้สารเคมีได้แก่ เอพิเนฟริน (epinephrin) หรือ นอเอพิเนฟริน (norepinephrin) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในการส่งสัญญาณในระบบประสาท การที่ลูกหอยนางรมเจริญเติบโตโดยไม่ต้องมีวัสดุเกาะทำให้เลี้ยงสะดวกและรูปร่างของหอยเมื่อถึงเวลาขายเหมือนกัน มีลักษณะสวยงาม เป็นที่ต้องการของภัตตาคารในสหรัฐอเมริกาและยุโรป จนลูกหอยมีขนาดประมาณ 6 เซนติเมตรขึ้นไป ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงประมาณ 10-15 เดือน (เสาวภา และคณะ, 2529)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบทางเดินอาหารของหอยนางรม

ระบบทางเดินอาหารประกอบด้วยส่วนที่เป็นปาก ซึ่งอยู่ใต้กล้ามเนื้อยึดฝาทางด้านหัว ประกอบด้วยช่องปากเล็ก ๆ ข้างของปากมีแผ่นเนื้อรูปสามเหลี่ยมเรียกว่า เลเบียลพัลพ์ (labial palp) ช่วยโบกพัดให้อาหารตกลงไปในหลอดอาหาร ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อสั้น ต่อจากปากเข้าสู่กระเพาะอาหารกระเพาะอาหารเป็นถุงเล็ก ๆ ผนังหนาโดยกระเพาะอาหารจะฝังอยู่ในตับ (digestive gland) ซึ่งตับจะสร้างน้ำย่อยปล่อยลงสู่กระเพาะอาหาร แล้วเข้าสู่ลำไส้มีลักษณะเป็นท่อยาวขดไปขดมา ส่วนปลายของลำไส้วกกลับขึ้นมาข้างบนในระดับเดียวกับกระเพาะอาหาร ส่วนที่ต่อจากลำไส้เป็นไส้ตรง มีลักษณะเป็นท่อตรงยาวไปตามความยาวของลำตัวด้านหลัง ทวารหนัก เป็นส่วนปลายของไส้ตรงอยู่เหนือกล้ามเนื้อยึดกาบทางตอนท้ายของลำตัวโดยทวารหนักเปิดออกตรงช่องน้ำออก (excurrent siphon) ของหอยนางรม กากอาหารที่ย่อยไม่ได้ก็จะถูกขับออกทางทวารหนัก (ภาพที่ 4) กำจัดออกจากตัวหอยพร้อมกับน้ำที่ไหลออกทางช่องน้ำออกต่อไป ทางเดินอาหารของหอยนางรมเรียงตามลำดับได้ดังนี้





ภาพที่ 4 ทางเดินอาหารของหอยนางรม

ที่มา: Richard Fox, Lander University (2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การดำรงชีวิตของหอยนางรม

หอยนางรมดำรงชีวิตอยู่ได้โดยการดูดน้ำรอบ ๆ ตัวเข้าไปทางด้านหนึ่ง และปล่อยทิ้งออกอีกด้านหนึ่ง อาหารและก๊าซออกซิเจนจะเข้าไปพร้อมกับน้ำ อาหารของหอยนางรมได้แก่ แพลงค์ตอนพืช, แพลงค์ตอนสัตว์ที่ล่องลอยอยู่ในน้ำ และสาหร่ายเซลล์เดียว หอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยตัวเมียจะปล่อยไข่และหอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาผสมกันในน้ำ หอยนางรมที่พบในประเทศไทยจะวางไข่ตลอดปี แต่จะพบมากในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนเมษายน หอยนางรมวางไข่ครั้งหนึ่งประมาณ 1-9 ล้านฟอง อยู่ได้ทั้งในน้ำทะเลและในบริเวณเขต น้ำกร่อย (ปิยะพงศ์ ,2525)

แหล่งที่พบหอยนางรมในประเทศไทย

แหล่งที่พบโดยทั่วไปคือตามบริเวณน้ำตื้นชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำลำคลอง ในแถบภาคตะวันออกและภาคใต้ เช่น ชลบุรี และ สุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นแหล่งที่เลี้ยงหอยนางรมใหญ่ที่สุด (ภาพที่ 5) ได้แก่บริเวณอ่าวที่ตำบลท่าทอง อำเภอกาญจนดิษฐ์ นอกจากนี้ก็มีการเลี้ยงอีกที่บริเวณแหลมซุย อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ปัจจุบันมีผู้เลี้ยงหอยนางรมในพื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีประมาณ 741 ราย เนื้อที่ประมาณ 4,866 ไร่ หอยนางรมที่พบในประเทศไทยจะวางไข่ตลอดปี มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งที่อยู่ เช่น หอยตะโกรม ที่แม่น้ำเวฬุ จังหวัดจันทบุรี วางไข่มากที่สุดในเดือน ตุลาคม-ธันวาคม หอยนางรมปากจีบขนาดเล็กที่ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรีวางไข่เป็น 3 ช่วง คือช่วงแรกเดือนมีนาคม-เมษายน ช่วงที่ 2 เดือนมิถุนายน-กรกฎาคมและช่วงที่ 3 เดือนกันยายน-ตุลาคม ผลผลิตของหอยนางรมส่วนใหญ่จะเก็บได้จากฟาร์มเลี้ยงที่มีการล่อลูกหอยนางรมจากแหล่งธรรมชาติ (สุภาพร, 2538)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 แสดงบริเวณพบหอยนางรมสายพันธุ์ *Crassostrea belchen, Crassostre lugubris, Saccostrea commercialis*

ที่มา: เสาวภา และคณะ (2529)

การเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทย

การเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยเริ่มขึ้นครั้งแรกที่จังหวัดจันทบุรี เมื่อประมาณปี พ.ศ. 2485 หอยนางรมเป็นอาหารทะเลที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เป็นอาหารที่จัดได้ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการแปรรูปอุตสาหกรรมอาหารด้วย (กรรณิกา, 2530) การเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงแบบครอบครัว ไม่ได้ทำเป็นธุรกิจใหญ่เหมือนในต่างประเทศ วิธีการเลี้ยงเป็นแบบดั้งเดิมมีการพัฒนาการเลี้ยงไม่มากนัก ทำให้ผลผลิตมีแนวโน้มว่าจะลดลงในช่วงปีพุทธศักราช 2549 ถึง 2551 แม้ว่าพื้นที่เพาะเลี้ยงจะยังสามารถขยายได้อีกมาก ทั้งนี้การลดลงของผลผลิตอาจมีผลสืบเนื่องมาจากปัญหาการขาดความรู้ด้านวิชาการ (ไพโรจน์, 2533) ทั้งด้านการรวบรวมลูกหอยจากธรรมชาติ วิธีการเลี้ยงและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ต่อมามีการนำเทคโนโลยีการเลี้ยงแบบใหม่ๆ มาใช้ในการเลี้ยงบนแพและการขยายพื้นที่ในการเลี้ยง ทำให้ผลผลิตเริ่มเพิ่มขึ้นจากปีพุทธศักราช 2552 เป็นต้นมา (ยุทธ, 2521) ชนิดของหอยนางรมที่เลี้ยงในประเทศไทยสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ หอยนางรมปากจีบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

S. commercialis ที่เลี้ยงกันมากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศ ส่วนหอยนางรมอีก 2 ชนิด เป็นหอยนางรมที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่เรียกว่า หอยตะโกรมกรามขาว *C. belcheri* และหอยตะโกรมกรามดำ *C. lugubris* (ทรงชัย, 2536)

การแพร่กระจายตามธรรมชาติของหอยนางรมทั้งสามชนิด พบทั่วไปทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน (ภาพที่ 5) การเลี้ยงหอยนางรม ได้รับการส่งเสริมให้มีการเลี้ยงราวปีพุทธศักราช 2503 ในสมัยนั้นมีผู้แนะนำในการเลี้ยงหอยโดยการเลี้ยงหอยบนกระบะไม้ ซึ่งต่อมารูปแบบการเลี้ยงหอยได้มีการพัฒนาขึ้นเป็นอันมาก การเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยยังคงอาศัยพันธุ์หอยจากธรรมชาติเพื่อการใช้เลี้ยง ดังนั้นวัสดุล่อลูกหอยจึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการเริ่มต้นของธุรกิจการเลี้ยงหอยนางรม วัสดุล่อลูกหอยที่นิยมใช้ในปัจจุบันได้แก่ ไม้เป้ง ไม้ไผ่ ก้อนหิน หลอดซีเมนต์ เปลือกหอยนางรม ยางรถยนต์ ฯลฯ การใช้วัสดุประเภทไม้ต่าง ๆ มักมีอายุการใช้งานไม่มากนัก ทำให้เกษตรกรเป็นจำนวนมากหันมานิยมใช้วัสดุที่มีความคงทนถาวรกว่าเช่น ก้อนหินและหลอดซีเมนต์ในการล่อลูกหอยนางรม ดังนั้นวิธีการเลี้ยงหอยนางรมจึงมีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความเหมาะสมที่จะใช้ตามลักษณะภูมิประเทศและดิน ฟ้า อากาศของแต่ละพื้นที่ (มณีย์ และคณะ, 2540)

ประโยชน์ของหอยนางรม

สถาบันหัวใจและปอดแห่งชาติของแคนาดา ระบุว่า หอยนางรมอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร คือเป็นแหล่งของวิตามินเอ, บีหนึ่ง (ไทอามิน), บีสอง (ไรโบฟลาวิน), บีสาม (ไนอาซิน), ซี (กรดแอสคอร์บิค) และดี (แคลซิฟีรอล) การบริโภคหอยนางรมตัวที่มีขนาดกลาง 4-5 ตัว ช่วยให้ร่างกายได้รับแร่ธาตุประเภท แร่เหล็ก คอปเปอร์ ไอโอดีน แมกนีเซียม แคลเซียม ซิงค์ แมงกานีส และฟอสฟอรัส อย่างไรก็ตาม อาหารดิบ อาจมีแบคทีเรีย ผู้ที่ป่วยด้วยโรคตับ โรคมะเร็ง โรคระบบภูมิคุ้มกัน ควรหลีกเลี่ยงการรับประทานหอยนางรมสด (กรมประมง, 2536 ข.)

ทั้งนี้จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่าในหอยนางรมน้ำหนัก 100 กรัม ประมาณ 8-10 ตัว จะมีโคเลสเตอรอลสูงถึง 231 มิลลิกรัม ให้สารอาหารอื่น ๆ เช่น โปรตีนประมาณ 6 กรัม แคลเซียม 147 มิลลิกรัม ธาตุเหล็กประมาณ 6 มิลลิกรัม สังกะสี 7.6 มิลลิกรัม โพแทสเซียม 36 มิลลิกรัม วิตามินเอ 113 หน่วยอาร์อี โดยปริมาณโคเลสเตอรอลในหอยนางรมนี้ ใกล้เคียงกับโคเลสเตอรอลในไข่ไก่ 1 ฟอง ซึ่งมีประมาณ 213 มิลลิกรัม (วิสุทธิ์ และคณะ, 2547)

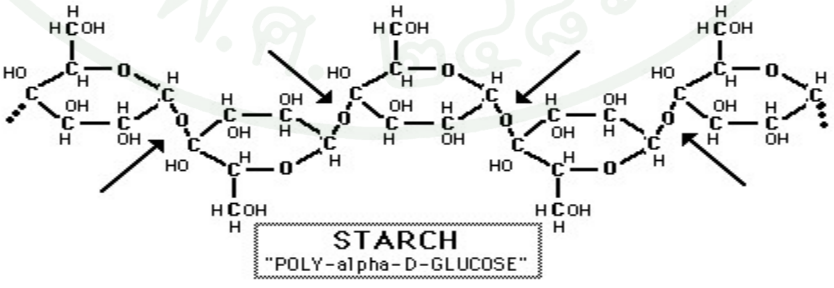
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคในหอยนางรม

การศึกษาเกี่ยวกับโรคของหอยนางรมในประเทศไทย นับว่ามีการศึกษากันอยู่ในวงแคบ ในขณะที่การระบาดของโรคในหอยนางรม พบว่ามีรายงานในต่างประเทศโดยทั่วไป โดยเฉพาะในแหล่งเลี้ยงที่มีการเลี้ยงอย่างหนาแน่นยาวนานและสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรม ซึ่งผลจากการระบาดดังกล่าวก่อให้เกิดการระบาดของโรคทั้งที่เป็นแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และรวมไปถึงโปรโตซัว (*Bonamia ostreae*) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญต่อระบบย่อยอาหารโดยตรวจพบในส่วน digestive gland ของหอย ก่อให้เกิดการสูญเสียอย่างมากพบภายในทางเดินอาหารหอยนางรม มีรายงานว่าเป็นผลให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเนื้อหอยนางรมลดลง (ศุภชัย, 2543)

เอนไซม์อะไมเลส

Amylases เป็น extracellular enzyme ที่สามารถย่อยสลายซับสเตรตจำพวกแป้ง ไกลโคเจน โดยชนิดของเอ็นไซม์แบ่งได้ตามตำแหน่งของพันธะที่ถูกไฮโดรไลซ์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Endoamylase และกลุ่ม Exoamylase (nigam and Singh, 1995) ซึ่งเอนไซม์กลุ่ม Endoamylase เป็นกลุ่มที่ไฮโดรไลซ์พันธะ α-1,4 ภายในโซ่แบบสุ่ม ทำให้ได้ dextrin ที่เป็นลูกโซ่กลูโคสขนาดต่างๆกัน เอ็นไซม์ประเภทนี้คือ Alpha-Amylase หรือ amylo (1-4) dextrinase ส่วนกลุ่ม Exoamylase ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์โมเลกุลของแป้งที่ปลาย non-reducing end โดยจะไฮโดรไลซ์ที่พันธะ α-1,4 α-1,6 ตัวอย่างของเอ็นไซม์ประเภทนี้คือ beta- amylase หรือ amylo (1-4) maltosidase และ gamma-amylase หรือ amylo (1-4,1-6) glucosidase จะย่อยสลายซับสเตรตที่มีพันธะไกลโคซิล (กล้าณรงค์ และ เกื้อกูล, 2543) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 6 แสดงการย่อยสลายซับสเตรตบริเวณพันธะไกลโคซิล

ที่มา: ปราณี (2547)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Beta-Amylase

มีชื่อเรียกตามระบบว่า α-1,4-glucan maltohydrolase ซึ่งพบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลต์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ ซึ่งเอนไซม์นี้มักพบร่วมกับแอลฟา-อะไมเลส โดยมีมวลโมเลกุล 152,000 (กรณีจากมันเทศ) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีค่าสูงกว่าแอลฟาอะไมเลส มี pH optimum ที่ 5.6 จากการพิจารณาจาก pH activity profile มีลักษณะแบบรูประฆังคว่ำที่มีหมู่ที่แตกไอออนได้ที่บริเวณเร่งอยู่ 2 หมู่ นอกจากนี้มีสารพวกซัลไฟดริลเป็นตัวยับยั้ง

ปฏิกิริยาการย่อยสลายของบีตา-อะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละ 1 หน่วยของมอลโทส หรือทีละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่ α-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็น กลูแคน, เดกซ์ทริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโทสที่มีโครงรูปที่ต่างไปจากเดิม คือได้ Beta-configuration หรือ บีตามอลโทส

Grammar - Amylase

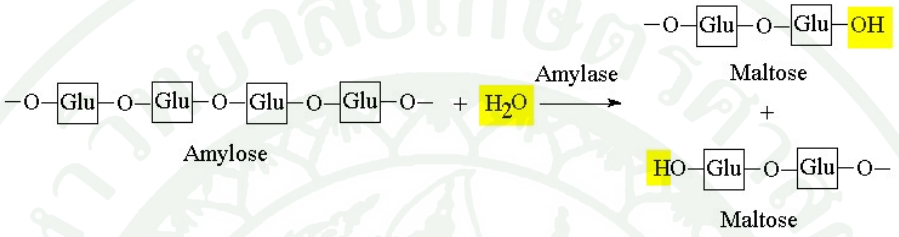
เป็นเอ็นไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและรา ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น α-1,4 α-1,6 α-1,3 แต่จะช้ากว่า α-1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับบีต้า-อะไมเลส แต่ตัดปลายสายเข้าไปทีละ1หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่โครงรูปต่างไปจากเดิม คือ ได้ Beta-configuration หรือ บีตา-ดี-กลูโคส และส่วนของกลูแคน ลิมิตแดกซ์ทริน

Alpha - Amylase

Alpha-Amylase มีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) และ มีชื่อตามระบบว่า (1,4-α-D-glucan glucanohydrolase) พบทั่วไปทั้งในพืช, สัตว์, แบคทีเรีย รวมทั้งในคน โดยจะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งซึ่งเป็นโอลิโกและไดแซ็กคาไรด์ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังเซลล์ของลำไส้สู่ร่างกาย เป็นเอ็นไซม์ที่มวลโมเลกุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50,000 มี Ca^{+2} 1 ตัว ต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล (Douglas and Mitchinson, 1997) จะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนไอออน ลักษณะที่สำคัญของเอ็นไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α- 1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์อย่างได้ผลผลิตเป็นกลูแคน (glucan) และลิมิตเดกซ์ทรินที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงรูปเดิม (α-configuration) (Van Wormhoudt *et al*., 1995)



ภาพที่ 7 การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ที่มา: Winona State University (2008)

Amylase จะพบมากในอวัยวะที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบย่อย เช่น ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำย่อย ซึ่งในสัตว์บางชนิดจะพบกระจายในบริเวณต่างๆแตกต่างกันออกไป เช่น ช่องปาก เหงือก ช่องลำเลียง ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ เป็นต้น (Marianne *et al*., 2006)

กลไกการทำงานของ Alpha-Amylase

alpha-Amylase จะย่อยแป้งให้มีขนาดเล็กลง และอยู่ให้รูป maltose และ dextrin รูปแบบการทำงานของ alpha-Amylase แบบนี้เรียกว่า ptyalin โดย ptyalin จะทำให้โมเลกุลของแป้งที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ ให้อยู่ในรูปที่สามารถย่อยสลายได้ เช่น amylodextrin, erythrodextrin, achrodextrin ซึ่ง ผลผลิตที่ได้จะมีขนาดเล็กลงมาก และท้ายสุดของกลไกจะได้มอลโทส ซึ่ง Ptylin จะมีปฏิกิริยากับสายที่เชื่อม1,4-α-D-glucosidic ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยสลายด้วยน้ำที่ต้องการเอ็นไซม์เข้ามารวมในปฏิกิริยาเพื่อไม่ให้มีการแตกกิ่งก้านสาขา ทำให้ได้ ผลผลิตที่เป็นกลูโคสสายสั้นๆ (ภาพที่ 7) เป็นการป้องกันการถูกทำลายจากกรดที่เกิดขึ้นในสภาพแวดล้อมของอวัยวะ เช่นในกระเพาะอาหาร (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล, 2543)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษายีนแอลฟาอะไมเลส

ยีนแอลฟาอะไมเลสเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยแป้ง เป็นยีนที่มีความสำคัญที่มีการศึกษาค้นคว้าอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิตมากมายหลายชนิดตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลัง ไปจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้แก่ แมลง สัตว์ปีก สัตว์น้ำ สำหรับหอย (Mollucs) ก็เช่นกันได้มีการศึกษายีนแอลฟาอะไมเลสในหอยหลายชนิดเช่น หอยเป๋าฮื้อ หอยเซลล์ หอยนางรม โดยพบว่าหอยนางรม (*Crassostra gigas*) (Sellos *et al*., 2000) พบว่ามีความยาวในส่วนที่กำหนดการสร้างยีน (Open reading frame : ORF) เท่ากับ 1,561 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยนางรมดังกล่าวมาแปลงเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 520 อะมิโน พบว่าเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอ็นไซม์หลักที่พบในส่วนของต่อมน้ำย่อย (digestive gland) ซึ่งเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรม *(C. gigas*) มาหามวลโมเลกุลพบว่ามีขนาดเท่ากับ 57.71 กิโลดาลตัน และเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของคนมาหาค่ามวลโมเลกุล พบว่ามีขนาดเท่ากับ 55 กิโลดาลตัน โดย (Keller *et al*., 1971) ต่อมา (Strobl *et al*., 1997) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของยีนแอลฟาอะไมเลส (Primary structure) ของหนอนนก Tenebrio molitor ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีขนาดเท่ากับ 471 อะมิโน โดยคิดค่ามวลโมเลกุลได้เท่ากับ 51.3 กิโลดาลตัน และคำนวณค่า pI ได้เท่ากับ 4.3 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลสมาหาบริเวณอนุรักษ์จะต้องพบบริเวณหลักๆอย่างน้อย 5 บริเวณซึ่ง (Nakajima *et al*., 1986) และ (Janececk., 1992) ได้ทำการศึกษาไว้ แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจะพบ 9 บริเวณ ได้แก่ FEW,GFAGVQVSP, DAVINH, NYND, LNDLN, GFRIDASKH, EVID, FIDNHD และ GYTRVMSSY (Van and Sellos, 1995) ได้ทำการศึกษาของหอยนางรม *(C. gigas*) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ conserve กับ domain หลักมีส่วนที่ conserve ทั้ง 9 Domain ด้วย เอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร จากการศึกษาของ (Hirata, 1974) พบกิจกรรมเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลสในระบบหมุนเวียนโลหิตด้วย ซึ่งกิจกรรมของเอ็นไซม์แอลฟาอะไมเลสอาจมีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อโรคและจากการศึกษาของ (Ngernyuang, 2007) พบว่าไหมมีเอนไซม์อะไมเลสสูงทั้งในระบบทางเดินอาหารและในระบบหมุนเวียนโลหิตจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลสในไหมพันธุ์พื้นเมืองไทยพบว่ามีความยาวในส่วนที่กำหนดการสร้างยีน (Open Reading Frame): ORF จำนวน 1,503 คู่เบส และกรดอะมิโนที่เป็นไปได้จำนวน 500 เรซิดิวส์ เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนแอลฟาอะไมเลสของไหมอื่นในฐานข้อมูลพบว่ายีนแอลฟาอะไมเลสในไหมพันธุ์พื้นเมืองนี้มีความเหมือนกับในฐานข้อมูล 97 ถึง 99 % ทั้งระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของไหมพันธุ์พื้นเมืองนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ไหมให้มีความต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงต่อไป

ยีนแอลฟาอะไมเลสมีลำดับนิวคลีโอไทด์มีตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่มีความคล้ายคลึงกันมากของสิ่งมีชีวิตต่างๆตั้งแต่สัตว์มีกระดูกสันหลังจนถึงสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ดังนั้นหากเราทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบเป็นข้อมูลพื้นฐานในงานด้านต่างๆอาจจะนำไปสู่การพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอ็นไซม์ได้และอาจมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต เพิ่มน้ำหนัก เพื่อผลผลิตของเกษตรกรที่สูงมากขึ้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณพิษณุกร มะกลาง ซึ่งเป็นเจ้าของฟาร์มเลี้ยงหอยนางรม จากอำเภออ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์

1. หอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) น้ำหนักประมาณ 80-150 กรัม
2. เครื่องชั่ง
3. -20 °C Freezer
4. -80 °C Freezer
5. Microwave oven
6. Microcentrifuge
7. Centrifuge
8. Waterbath shaker
9. Incubater 37 oC
10. Vortex
11. Pipette
12. Plastic box for tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
13. Centrifuge tube
14. Pipette tips ขนาด 1,000, 200 และ 20 ไมโครลิตร
15. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
16. Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 และ 0.6 มิลลิลิตร
17. PCR system gradient thermal cycler
18. Mastercycler realplex, real-time PCR system (Eppendorf, USA)
19. Spectrophotometer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. สารเคมีสำหรับงานทางอณูชีวโมเลกุล

1. Absolute ethanol (Merck, Germany)
2. Chloroform (Merck)
3. Diethyl pyrocarbonate (DEPC) (Sigma)
4. Sodium chloride; NaCl (Merck)
5. TRIZOL reagent (Gibco BRL, USA)
6. Amphicillin (Bio Basic INC.)
7. Sterile distilled water
8. Oligonucleotide M13 primer
9. DNA marker: lampda DNA, 1 Kb plus DNA Ladder (Fermentas)
10. Isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)
11. 100 mM dNTP (Fermentas, USA)
12. 5-bromo-4-cholo-3-indoyl-β-D-galactopyranoside; X-gal (Frementas)
13. Agarose (Amresco, USA)
14. Ethidium bromide, EtBr(Sigma, USA)
15. 2X Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene)

3. ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับงานด้าน Molecular Cloning

1. BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)
2. cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)
3. Plasmid DNA Extraction kit (BioExcellence)
4.Reverse transcription System Kit (Promega. USA)
5.Plasmid Miniprep Kit (Eppendope)
6.Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. เอนไซม์,เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) และ Vector

1. Taq DNA polymerase (Fermentas)
2. *Eco*RI (Fermentas)
3. pGEM-T Easy vector (Promega. USA)
4.RNase A (Sigma, USA)

5. สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

Escherichia coli สายพันธุ์ JM109

6. สารเคมีและอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Technical agar (Difco, USA)
2. Bacto trypetone (BD, France)
3. Yeast extract (Scharlau)

7. โปรแกรมคอมพิวเตอร์

1. BLASTN program
   http://www.ncbi.nih.gov/blast/BlastN
2. CLUSTALW program
   http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html
3. Sequense alignment และ Multiple sequence alignment
   http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
   http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html
4. VecScreen
   http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html
5. Compute pI/Mw tool program
   http://br.expasy.org/tools/pi_tool.html

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer

ตารางที่ 1 Primer และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers ที่ใช้ในการทดลอง

Oligonucleotide primers	Sequences 5′ ⟶ 3′
AmyF	CCGGYGTCCCTTTYTCTTCCTGG
AmyR	GCGATGGCGTAGTYACCRTTGTCCC
Amy3'RACE	CGGAGTTCATGTGGCGCATCCTTACGG
Amy5'RACE	GGCCCTGCCAGTTATTGCGATCCTCCCC
Amy2F	ACGTCATATGATGTTCCAAGAGTTACTATC
Amy2R	ACGTCTCGAGTCAGGAGTCAAAGTAGTTG
β-ActinF	GACGCCCCAGACATCAGGGT
β-ActinR	GTGATGACCTGACCGTCGGG
UMP*	CTAATACGACTCACTATAGGGC
RT_AmyF	GGGCACACGTGTCAGTACAGCGTT
RT_AmyR	AAGCCAGACCCTTGCTTGCTCCTC

UMP* = Universal primer of SMARTM RACE cDNA Amplification kit

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การโคลนยีนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

หอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) น้ำหนัก 80-150 กรัม

1.2 การแยกสกัด total RNA

นำชิ้นเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อย (digestive gland) จากหอยนางรม 0.1 กรัม นำตัวอย่างบดในไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ TRIzol reagent (Gibco BRL, USA) 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติม chloroform 200 ไมโครลิตร (200 ไมโครลิตร/ trizol) พลิกหลอดไปมาเบาๆ 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอน RNA โดยใช้ Isopropanol alcohol 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง เหลือไว้เฉพาะตะกอนของ total RNA ที่บริเวณด้านล่างของหลอด แล้วล้างตะกอน Total RNA จำนวน 2 รอบ ด้วย 75 เปอร์เซนต์ ethanol 300 ไมโครลิตร โดยแต่ละครั้ง vortex เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ผึ่งตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC หรือ น้ำ ตัวอย่างที่ใช้ต้องเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส เมื่อได้ total RNA ทำการตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้น ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis และ spectrophotometric determination ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA

นำสารละลายที่ได้ไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA ที่สกัดได้ การตรวจสอบคุณภาพของ total RNA ที่ได้นั้น จะใช้ เทคนิค agarose gel electrophoresis โดยการเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ซึ่งเตรียมจากการใช้ agarose gel 0.2 กรัม ผสมกับ 1X TAE buffer (242 กรัม ของTris base , 57.1 มิลลิลิตร ของ Glacial acetic acid ,100 มิลลิลิตร ของ 0.5โมล EDTA) ปริมาตร 19.8 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มจนได้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน เทลงในแม่พิมพ์แล้วทิ้งไว้จนกระทั้ง gel แข็งตัว จากนั้นนำตัวอย่างของ total RNA ที่ได้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปหยดลงบนเจลที่เตรียมไว้ ในเครื่อง Electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วตรวจสอบผลที่ได้ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวเลต เปรียบเทียบผลที่ได้กับขนาดของแถบ DNA มาตรฐาน (DNA ladder 100 bp plus)

ส่วนการวัดความเข้มข้นของ Total RNA นั้นใช้สารละลาย Total RNA 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nano Drop) โดยดูค่าที่วัดจากอัตราส่วน A260:A280 ถ้าค่าที่วัดได้มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่ามี DNA ปนอยู่ แต่ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าได้ RNA บริสุทธิ์และถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือสารฟีนอลปนอยู่ในตัวอย่างของ Total RNA ที่สกัดได้

1.4 การสังเคราะห์ cDNA

First strand cDNA จะถูกสังเคราะห์จาก 1 ไมโครลิตร ของ total RNAของหอยนางรมปากจีบ โดยใช้ Reverse transcription System Kit (Promega) หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.5 การทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อหาส่วนกลางยีน

นำ cDNA ที่ได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพร์เมอร์ Forward(AmyF) : 5′-CCGGYGTCCCTTTYTCTTCCTGG-3′ และReverse(AmyR): 5′-GCGATGGCGTAGTYACCRTTGTCCC-3′ ที่ออกแบบขึ้นจากโปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Oligo โดยออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนแอลฟาอะไมเลสในส่วนกลางยีนแอลฟาอะไมเลส โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) 1.2 ไมโครลิตร, dNTP (10 mM) 1.6ไมโครลิตร, forward primer (AmyF) 1.6 ไมโครลิตร, reverse primer (AmyR) 1.6 ไมโครลิตร, DNA polymerase (5 unit/µl) 0.2 ไมโครลิตร, น้ำ ultrapure 11 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ 0.8 ไมโครลิตร นำมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycle) โดยมีการตั้งโปรแกรมการเปลี่ยนอุณหภูมิไว้ดังนี้ Predenaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที Annealing อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 45 วินาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีทำขั้นตอนการทำ Denaturation ถึง Extension ซ้ำทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วย Final extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาทีและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค eletrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 0.5x TAE buffer โดยแบ่งผลผลิต PCR ที่ได้มา 2 ไมโครลิตร ผสมกับ น้ำกลั่นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ 3 ไมโครลิตร loading dye 1 ไมโครลิตรแล้วนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำการทำบริสุทธิ์โดยใช้ชุด kit (NucleoSpin® Extract II, BIOSCIENCE,USA) ทำตามวิธีการของผู้ผลิต หลังจากนั้นส่งผลผลิต PCR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทมาโครเจน ประเทศเกาหลี จากนั้นนำมาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นยีนแอลฟาอะไมเลส

1.6 การสังเคราะห์ 5′ First stand cDNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแอลฟาอะไมเลส ด้วยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

นำ mRNA ที่ได้จากข้อ 1.2 มาทำการสังเคราะห์ 5′ First strand cDNA โดยใช้ BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) ตามวิธีการของบริษัทดังนี้ ในการเตรียม 5′First strand cDNA จะใช้ mRNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 5′-CDS primer ปริมาตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1 ไมโครลิตร, Smart II A oligo ปริมาตร 1 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด PCR tube ขณะเดียวกันถ้าเป็นการเตรียม 3′ First strand cDNA จะใช้ mRNA ปริมาตรเท่ากับ 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 3′-CDS primer Aปริมาตร 1 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอด PCR tube หลังจากนั้นจึงนำสารที่ได้ทั้งสองหลอดมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แช่น้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นจึงเตรียมสารละลาย Master mix ของปฏิกิริยา ซึ่งประกอบไปด้วย 5x First Strand Buffer, DTT, dNTP Mix (10 มิลลิโมล), MMLV Reverse Transcriptase ดังนี้คือ

5x First Strand Buffer	2.0	ไมโครลิตร
DTT	1.0	ไมโครลิตร
dNTP Mix (10 มิลลิโมล)	1.0	ไมโครลิตร
MMLV Reverse Transcriptase	1.0	ไมโครลิตร

โดยปฏิกิริยารวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายดังกล่าวลงในหลอด PCR หลอดเดิม ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันแล้วทำการปั่นเหวี่ยงให้สารละลายทั้งหมดรวมกันอยู่ที่บริเวณก้นหลอดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 1.5 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง cDNA ด้วย Tricine-EDTA buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บรักษา cDNA ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากการทำ Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) เพื่อให้ได้ผลที่ดีขึ้นอยู่กับคุณภาพและความสมบูรณ์ของ RNA

เมื่อได้ 5′และ3′ First strand cDNA แล้ว จะนำ 5′, 3′ First strand cDNA นี้มาใช้เป็น Template ในการทำปฏิกิริยา 5′, 3′RACE โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสจากหอยนางรมแล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ทางด้าน 5′ และ 3′ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5′ ของยีน *ScAmy* cDNA ซึ่งจะใช้

ไพรเมอร์สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5′ของยีนแอลฟาอะไมเลส

Amy5R primer 5′ GGCCCTGCCAGTTATTGCGATCCTCCCC 3′

ไพรเมอร์สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 3′ของยีนแอลฟาอะไมเลส

Amy3R primer 5′ CGGAGTTCATGTGGCGCATCCTTACGG 3′

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน ในหอยนางรมบริเวณกลางยีน ร่วมกับ Universal primer (UPM) ในการทำปฏิกิริยาโดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

5′, 3′ RACE First strand cDNA	2.5	ไมโครลิตร
10X Universal primer	5	ไมโครลิตร
10 μM Gene-specific primer	2	ไมโครลิตร
10X BD Adventage 2 PCR Buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTP mix	1	ไมโครลิตร
5 U/UI *Taq* DNA polymerase	2	ไมโครลิตร
PCR Grade Water	32.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 5 รอบ ส่วนช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 70 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 5 รอบ และช่วงที่สามใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ แล้วเก็บรักษา 5′ RACE PCR Product ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบผล 5′ RACE PCR Product ที่ได้ ด้วยวิธีการ 1 % Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TAE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.7 การสกัด DNA จาก Agarose gel และการทำให้ชิ้น DNA บริสุทธิ์

การสกัด DNA จาก Agarose gel และทำให้ชิ้น DNA บริสุทธิ์ โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extratction kit ทำตามวิธีการของบริษัท (Geneaid, Taiwan) โดยทำการตัด Agarose gel ซึ่งมีแถบ DNA ที่ต้องการ ใส่ลงใน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตรประมาณ 500 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักของ Agarose gel 300 มิลลิกรัม นำไป Vortex แล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยต้องทำการกลับหลอดไปมาทุกๆ 3 นาที หลังจากนั้นนำ DF columnใส่เข้าไปใน Collection Tube นำเจลที่ละลายสมบูรณ์แล้วดูดใส่ DF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที จากนั้นเติม Wash Buffer ลงใน DF column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ขั้นตอน Wash Buffer ทำ 2 รอบ แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้าย DF column มาไว้บน Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดใหม่ หลังจากนั้นเติม Elution Buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จะได้สารละลาย DNA แล้วเก็บรักษา DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลของ Purified product ที่ได้ ด้วย 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TAE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.8 การเชื่อมต่อ PCR product ชิ้นยีนอะไมเลส (*ScAmy*) กับพลาสมิด cloning vector (ligation)

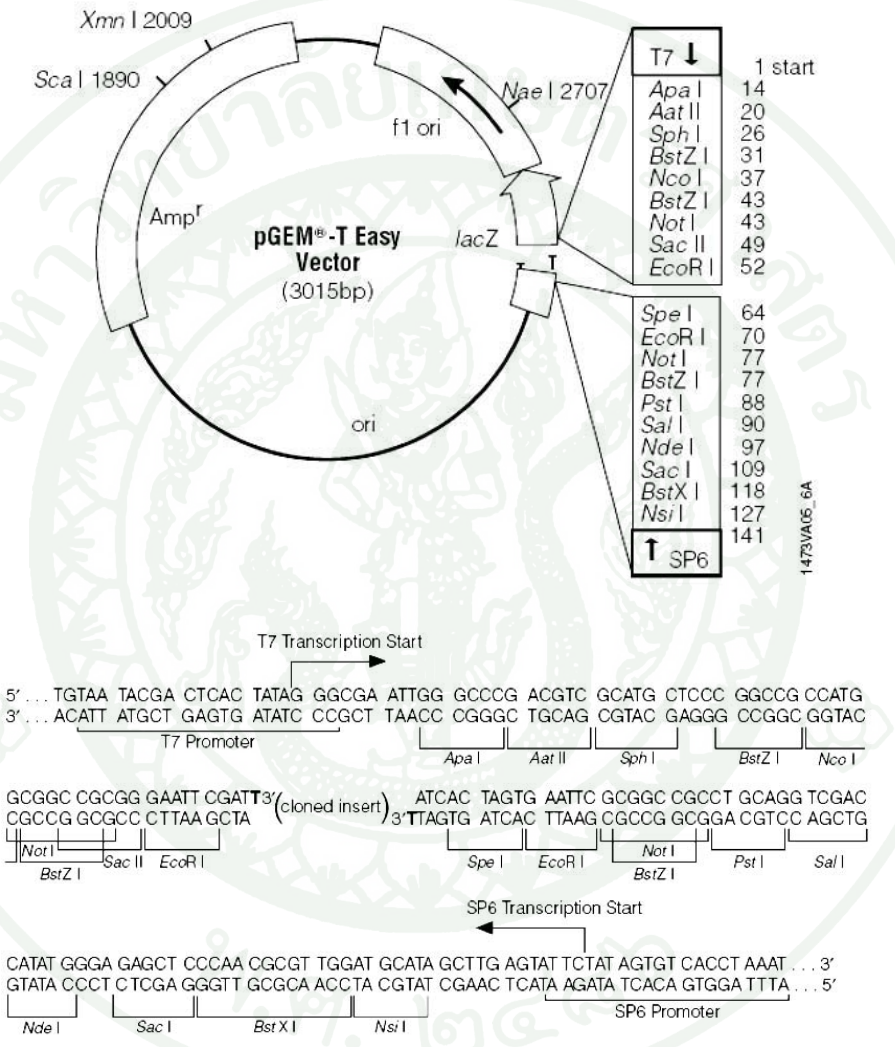
การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ของยีนแอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการทำ RT-PCR มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extratction kit ทำตามวิธีการของบริษัท (Geneaid, Taiwan) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด เพื่อสร้าง พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมทำได้โดยนำสารละลาย DNA ที่บริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 1.5 จำนวน 1.5 ไมโครลิตร ผสมกับ T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร 2X Rapid ligation buffer 2.5 ไมโครลิตร และ pGEM-T Easy vector (ภาพที่ 1) 0.5 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน(เวลา 16-18 ชั่วโมง)

1.9 การเตรียม competent Cell

การเตรียม competent cells จากเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ตามวิธีของ (Sambrook *et al*., 1989) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดูดเชื้อแบคทีเรีย 600 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง นำเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงไปวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสง (optical density;OD) โดยใช้เครื่องสเปค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำ competent ประมาณ 0.3-0.6 นาโนเมตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 rpmที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส เติม TSS solution เพื่อทำให้ผนังเซลล์เปิด ทำการตกตะกอนเซลล์และล้างเซลล์ด้วย TSS อีกรอบ ถ้ายังไม่นำไปใช้ให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1 แผนที่ของ DNA พาหะ (Cloning vector) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในตำแหน่ง Polylinker ของ pGEM-T Easy vector

ที่มา: http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.10 การชักนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Transformation)

ใช้วิธี Heat shock transformation โดยนำ competent cell ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.9 จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Ligation product 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการดีดเบา ๆแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที นำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติม Luria-Bertani Culture medium (LB medium) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ปิดปาก Microcentrifuge tubes ด้วย Parafilm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที (เขย่า) หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ลดปริมาตรของสารละลายลงให้เหลือเพียง 100 ไมโครลิตร ผสมตะกอนกับสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำสารละลาย 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงบนอาหาร LB Ampicilin, IPTG, X-Gal plate ที่ทำการเกลี่ย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside) เข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LB Agar ไว้ก่อนแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันหรือ Micropipette tip ที่ปลอดเชื้อมาทำการคัดเลือกเอาโคโลนีที่คาดว่าจะมีชิ้น Insert คือเลือกเอาเฉพาะแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว (Blue-white colony screening) มาเขี่ยลงบนอาหาร LB Ampicilin ใหม่ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อทำการตรวจสอบพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ด้วยวิธี PCR หรือตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

1.11 การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลน

ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA insert) เบื้องต้น โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอลและคลอโรฟอร์ม หรือคัดเลือกโดยการตัดพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM-T® easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction digestion)

โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยฟีนอลและคลอโรฟอร์ม เป็นตรวจสอบพลาสมิดสายผสมเบื้องต้นเพื่อการคัดเลือกโคโลนีที่มีคาดว่ามีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใส่สารละลาย TE ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างแรง เติมสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (1:1) โดยการเติมการละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์มปริมาตร 25 ไมโครลิตร เท่ากับสารละลายกรดนิวคลีอิก เขย่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ให้เข้ากันอย่างแรงและเซนตริฟิวจ์เพื่อแยกชั้น โดยกรดนิวคลีอิกซึ่งละลายอยู่ในน้ำจะอยู่ชั้นบน ส่วนฟีนอลจะอยู่ชั้นล่างและมีโปรตีนสีขาวขุ่นอยู่ระหว่างกลาง ปะปนมา ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบนมาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค Electrophoresis นำ ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ 1 % agarose gel ใน 0.5x TAE buffer ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามีชิ้นดีเอ็นเอไปทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดต่อไป

การตัดพลาสมิดพาหะสายผสม pGEM-T® easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction digestion) ทำการตัดดีเอ็นเอพาหะสายผสมด้วยเอนไซม์ *EcoR*I โดยใช้ พลาสมิด 1 ไมโครลิตร 10xbuffer *EcoR*I 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I ความเข็มข้น 10 ยูนิต 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 7 ไมโครลิตร ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยเอนไซม์จะตัดตรง polycloning site ก็จะทำให้ทราบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าไปในเว็คเตอร์ ตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค Electrophoresis นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ 1 % agarose gel ใน 0.5x TAE buffer ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์โครงสร้าง open reading frames (ORFs) หน้าที่ของยีนและ ผลผลิตของยีน สัญญาณการแสดงออก (expression signals) และโครงสร้างของโปรตีนแอลฟาอะไมเลส ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ExPASy-Tool (http://www.expasy.ch/tools)

1.12 การสกัด Plasmid เพื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุด FastPlasmid Mini kit ตามวิธีการของผู้ผลิต(eppendorf,USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 30 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ดูดเซลล์ใส่ในหลอด microtube 1 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ละลายตะกอนแบคทีเรียและทำให้เซลล์แตกด้วย lysis solution ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที ย้ายสารละลายไปที่ spin column หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เติม DILUTED Wash Bufer 400 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที เทส่วนใสทิ้ง หมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วเท่าเดิม เพื่อเอาบัฟเฟอร์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ล้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ โดยเติมบัฟเฟอร์ Elution Bufer 25 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.13 การทำ Restriction enzyme digestion

pGEM-T Easy เป็น Vector ที่มีจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ชนิด *Eco*RI ซึ่งอยู่ขนาบข้างของชิ้น Insert บน Recombinant DNA จึงใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการตัด Recombinant DNA ที่ได้จากการโคลน เพื่อยืนยันผล ซึ่งส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา มีดังนี้

Plasmid DNA	2	ไมโครลิตร
10X Buffer *Eco* RI	2	ไมโครลิตร
Eco RI	0.5	ไมโครลิตร
Distilled water	5.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดใน Microcentrifuge tubes จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลของปฏิกิริยาด้วย วิธีการ 1% Agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

1.14 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

เลือก Plasmid ที่คาดว่าจะมีชิ้นของ Insert ขนาดความยาวใกล้เคียงกับ 5′และ 3′ RACE PCR Product มาทำหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้าน 5′และ3′ ของ cDNA โดยหน่วยงาน Macrogen, Inc. (Korea)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (*ScAmy*) ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ของหอยนางรม โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

สกัด RNA จากเนื้อเยื่อส่วนปาก (labia palps) เนื้อเยื่อส่วนเหงือก (gills) เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อส่วนต้อมน้ำย่อย (digestive gland) ของหอยนางรมแล้วนำมาทำ first strand cDNA โดยเทคนิค RT-PCR นำ cDNA มาเป็น template ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AMY Forward primer คือ 5′ -GGGCACACGTGTCAGTACA GCGTT- 3′กับ AMY Reverse primer คือ 5′ -AAGCCAGACCCTTGCTTGCTCCTC- 3′ แล้วเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β-actin ซึ่งจะใช้เป็น Internal control โดยใช้ไพรเมอร์ β-actin Forward primer คือ 5′ -CATCGTTACTAACTGGGACG- 3′β-actin Reverse primer คือ 5′ -AGGATTCCATACCCAGGAAG- 3′

โดยส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา มีดังนี้

First strand cDNA	1	ไมโครลิตร
10X *Taq* Buffer	2	ไมโครลิตร
10 μM Forward Primer	1.5	ไมโครลิตร
10 μM Reverse Primer	1.5	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2	ไมโครลิตร
5 U/UI *Taq* DNA polymerase	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	21.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	30	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดใน PCR tubes นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ target DNA ด้วยเครื่อง thermal cycler ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเป็นดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวล 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บรักษา PCR products ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผล PCR product ที่ได้ของยีน AMY และ β-actin ด้วยวิธีการ 1% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 1X TAE ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ตรวจสอบแถบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

DNA ด้วยการย้อมใน ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วถ่ายภาพแถบ DNA ที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยถ้าอวัยวะใดมีแถบ DNA เกิดขึ้น แสดงว่าที่อวัยวะดังกล่าวมีการแสดงออกของยีนชนิดนั้นๆส่วนปริมาณการแสดงออกจะสังเกตได้จากระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น กล่าวคือ ถ้ามีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากก็แสดงว่าที่อวัยวะนั้นมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวมากด้วย ในทางกลับกันถ้ามีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อย ก็แสดงว่าที่อวัยวะนั้นๆมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวน้อยตามไปด้วย

3. การศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (*ScAmy*) โดยใช้วิธี Relative Real-time PCR

นำ first strand cDNA ของตัวอย่างจากอวัยวะต่างๆของหอยนางรม ประกอบด้วย เนื้อเยื่อส่วนปาก (labia Palps) เนื้อเยื่อส่วนเหงือก (gills) เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อส่วนต้อมน้ำย่อย (digestive gland) ในแต่ละเนื้อเยื่อมาวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสโดย Mastercycler® ep realplex,real-time thermal cycler (Eppendorf ,USA) และใช้ SYBR green dye เป็นตัวตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงของยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนเบต้าแอคติน (β-actin) เป็น internal control

สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครกรัม, SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA), 10 ไมโครโมล Forward primers, 10 ไมโครโมล Reverse primers และ water ionizer โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ

First strand cDNA	1	ไมโครลิตร
10 μM Forward Primer	1	ไมโครลิตร
10 μM Reverse Primer	1	ไมโครลิตร
SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA)	12.5	ไมโครลิตร
Distilled water	9.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงใน polypropylene plates จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา Mastercycler® ep realplex, real-time thermal cycler (Eppendorf ,USA) ที่กำหนดให้มีสภาวะการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำงานเป็นดังนี้ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ และในช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 1 รอบ แล้วบันทึกผลค่า threshold cycle หรือ CT ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (*ScAmy*) ภายหลังจากที่ได้ทำการกระตุ้นหลัง จากนั้นทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (*ScAmy*)

4. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

สกัดเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสตามวิธีของ (Hashini *et al*., 2003) โดยชั่งเนื้อเยื่อส่วน Digestive gland 0.1 กรัม บดให้ละเอียดภายในโกร่งโดยใช้ในโตรเจนเหลว เพื่อรักษาสภาพของเอ็นไซม์ จากนั้นใส่ Phosphate buffer ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (20 มิลลิโมล,พีเอช 6.5) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่ของเอนไซม์ต่อไป

4.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

นำเอนไซม์ที่สกัดได้ในเบื้องต้นมาทดสอบหาช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยการนำเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งต้มสุก (แป้ง 1%) บ่มไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม DNS reagent (3,5-dinitrosalisylate) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที นำไปวิเคราะห์ผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมนาโนดรอป

4.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการสกัดใน Phosphate buffer ที่มี pH ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2-12 มาทดสอบหาช่วง pH ที่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยการนำเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอลฟาอะไมเลสทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งต้มสุก (แป้ง 1%) บ่มไว้ในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม DNS reagent (3,5-dinitrosalisylate) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที นำไปวิเคราะห์ผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

4.3 การศึกษาผลกระทบของเกลือต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการสกัดใน Phosphate buffer ที่มี pH 6.0 และมีความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-5 โมล แล้วนำเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสทำปฏิกิริยากับน้ำแป้งต้มสุก (แป้ง 1%)ที่ละลายในน้ำกลั่น บ่มไว้ในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม DNS reagent (3,5-dinitrosalisylate) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที นำไปวิเคราะห์ผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรม (*ScAmy*)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละโคลนมาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ vector จากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบ (Blast) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้มีการบันทึกไว้แล้วไป Genbank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blastn) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรม (*ScAmy*)

5.1 การทำ Phylogenetic Tree

ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแอลฟาอะไมเลสกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆโดยคัดเลือก full-length ของยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆจากฐานข้อมูล Genbank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดมาทำ Alignment ด้วยวิธี Multiple alignment โดยใช้โปรแกรม (ClustalW) แล้วจึงอาศัยโปรแกรม Mega version 3.1 ในการสร้างและอ่านผลความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีนแอลฟาอะไมเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำงานวิจัยเดือนมกราคม 2552 และสิ้นสุดงานวิจัยในเดือนมีนาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (full-length) ของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสจากหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*ScAmy*)

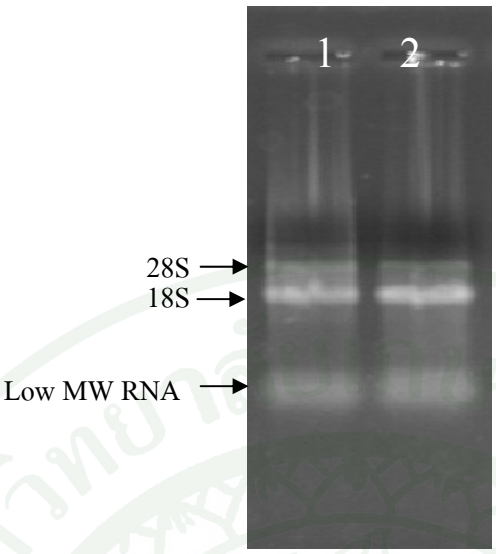
1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอของหอยนางรม

การสกัดอาร์เอ็นเอของหอยนางรมจากเนื้อเยื่อของต่อมน้ำย่อย (digestive gland) ด้วย Trizol Reagent จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยการวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอโดยเครื่องวัดสารพันธุกรรมนาโนดร๊อป และนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) พบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 5,390.30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่ได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 260/280 พบว่ามีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 2.1 ซึ่งค่าที่ได้จากการดูดกลืนแสง 260/280 นี้สามารถบอกความบริสุทธิ์ได้ดังนี้ (สุรินทร์, 2545)

ค่าที่วัดได้	1.65-1.85	แสดงว่ามี DNA ปนอยู่
แต่ถ้าได้ค่า	>1.85	แสดงว่าได้ RNA บริสุทธิ์
ถ้าได้ค่า	<1.65	แสดงว่ามีโปรตีนหรือสารฟีนอลปน

จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์พบว่าอาร์เอ็นเอยังมีคุณภาพปกติ (ภาพที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อต่อมน้ำย่อยของหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ช่องที่ 1 และ 2 คือ อาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อของต่อมน้ำย่อยของหอยนางรม

1.2 การเพิ่มปริมาณของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรม (*ScAmy*)

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ไพรเมอร์ AMYF, AMYR หลังจากผ่านการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (ภาพที่ 9) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบความคล้ายคลึงโดยใช้โปรแกรม BlastN เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไดท์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารนั้นคือยีนแอลฟาอะไมเลสของสัตว์ประเภทหอย (Mollusks) หลายชนิดซึ่งหนึ่งในจำนวนนั้นคือพบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ DNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสชนิดเอ ในหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* (Accession number AF320688.1)

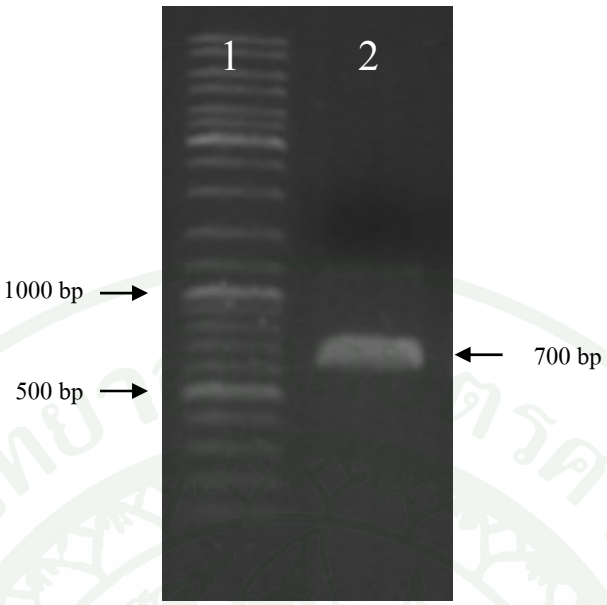
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 9 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ AMYF, AMYR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ช่องที่ 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ AMYF, AMYR ขนาดประมาณ 650 คู่เบส

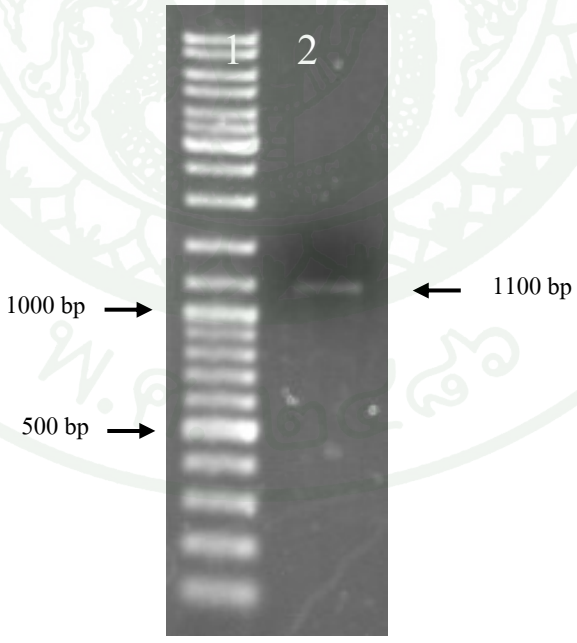
1.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' และ 3' โดยเทคนิค Rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE PCR)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนแอลฟาอะไมเลส ที่ได้มีขนาดความยาวเท่ากับ 650 คู่เบส ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวยังไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังขาดส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งทางด้าน 5' และทางด้าน 3' ดังนั้นจึงใช้เทคนิค 5' และ 3' Rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (5' และ 3' RACE PCR) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสที่สมบูรณ์โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมพันธุ์ปากจีบ ไพรเมอร์ที่ใช้กับ 3' RACE PCR คือ Amy3'RACE เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ได้แถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 10) ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้กับ 5' RACE PCR คือ Amy5'RACE ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1100 คู่เบส (ภาพที่ 11) นำดีเอ็นเอที่ได้ไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ 3' RACE PCR product โดยใช้ไพรเมอร์ Amy3R ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ ช่องที่ 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ Amy3R ขนาด 700 คู่เบส



ภาพที่ 11 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ 5' RACE PCR product โดยใช้ไพรเมอร์ Amy5R ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์ช่องที่ 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb,ช่องที่ 2 คือชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ Amy5R ขนาด 1,100 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

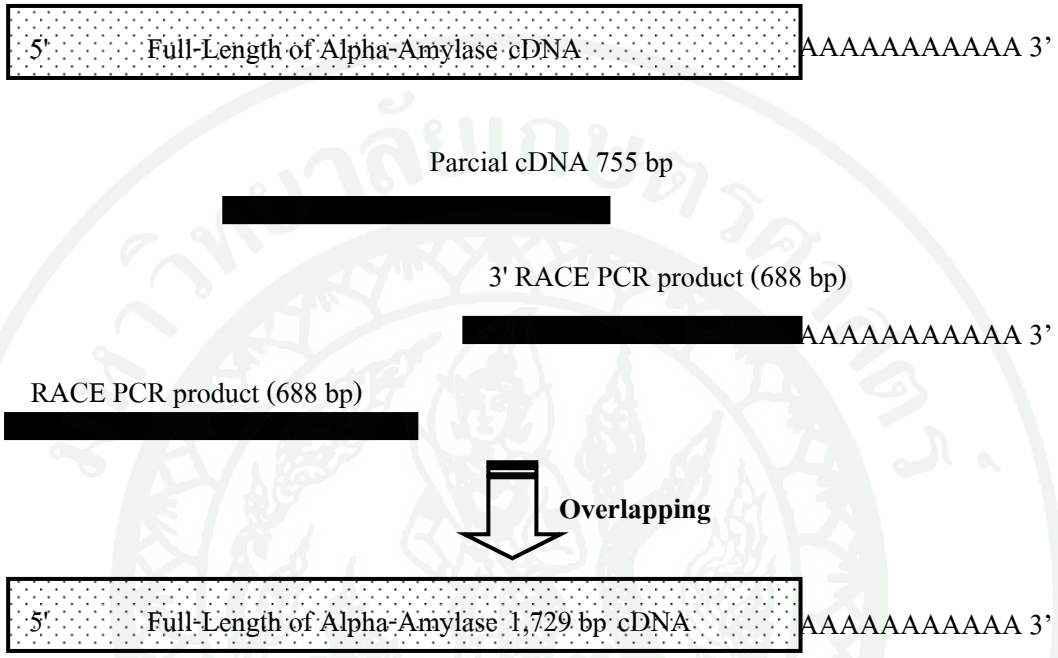
เมื่อทำการ Sequencing จากพลาสมิดที่บรรจุลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5' และ 3' RACE PCR products โดยการใช้ Universal primer ชนิด T7 และ SP6 ตามลำดับจึงทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5' RACE PCR product ที่มีขนาดความยาว 931 คู่เบส และ 3' RACE PCR product ที่มีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 531 คู่เบส อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ 5' และ 3' RACE PCR products ดังกล่าวโดยการใช้โปรแกรม BlastN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแอลฟาอะไมเลสเอมากที่สุด ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่บรรจุลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 5' RACE PCR product นั้นมีตำแหน่งของกรดอะมิโน Methionine (M: ATG) ตรงกับกรดอะมิโนลำดับที่1 ของยีนแอลฟาอะไมเลสชนิดเอ ในหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* (Accession number AF320688.1) ด้วย แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ดังกล่าวน่าจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตำแหน่งของ Start codon ของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบด้วยเช่นกัน ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่บรรจุลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' RACE PCR products นั้นมีตำแหน่งของ Poly-A-tail บริเวณส่วนปลายของ cDNA ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' RACE PCR products แสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวน่าจะเป็นส่วนปลายทางด้าน 3' ของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสชนิดเอ

1.4 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสที่ได้จากการโคลน

หลังจากนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสามส่วนคล้ายกับยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* (Accession number AF320688.1) หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากทั้ง 3 ส่วนได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจาก cDNA ของเนื้อเยื่อส่วน digestive gland และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้มาจากการใช้เทคนิค 5' และ 3' RACE เมื่อนำมา Alignment โดยการใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly Program (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php) เพื่อเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full-length) ของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ ที่มีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,729 คู่เบส (ภาพที่ 12(a))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank database อีกครั้ง พบว่าลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรม *C.gigas* (Accession number AF320688.1) มากที่สุด



(a)

```
>Saccostrea commercialis

CGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAG
AGTACGCGGGGGCAGTCAGTTCAGTGAATATGTTCCAAGAGTTACTATCAGTACTGTTGT
CCGTTGGTTTGGTACAGGGTGGTACGTGGAGTAACCCGACCTGTGCTCCTGGCCGCCACA
CCATCACACATTTGTTTGAGTGGAAATGGAGTGACATTGCCGCGGAGTGTGAGCGCTTTC
TCGGTCCTCACGGCTACTGTGGAGTACAGATTTCACCACCCAGTGAGAATCGAGAAGTTA
CTAGTCCCAACAGGCCATGGTATGAGAGGTACCAACCTGTGTCGTACAAGTTGACGACTA
GAAGTGGAAACGAGGCTGACCTCAGGGACATGATACAGAGATGCAATAAGGTCAATGTTA
GAATCTACGCTGATGTCATCATCAATCACATGACCGGTGGCGATGGAACAGGAACAGGCA
                                        AMY1F
CGGGCGGATCTCACTGGGACGGGTACAAATTGAGCTATCCCGGGGTACCCTATTCTGCCT
```

ภาพที่ 12 การโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (Full-length) ของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสโดยใช้เทคนิค RACE PCR (a) แผนผังเป็นการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก 5' RACE, 3' RACE และช่วงกลางของยีนแอลฟาอะไมเลส (b) ภาพแสดงการออกแบบไพรเมอร์ (ตำแหน่งของ Specific primer) ของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(b)

ภาพที่ 12 (ต่อ)

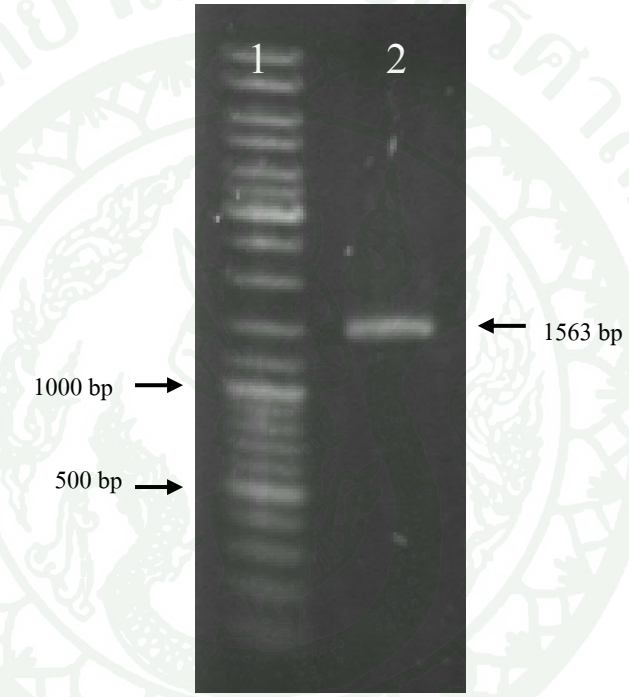
1.5 ยืนยันผลด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนแอลฟาอะไมเลสส่วน Open Reading Frame (ORF)

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้นมาต่อกันพบว่า เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลส ของหอยนางรม เพื่อเป็นการยืนยันผลที่ได้ จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแอลฟาอะไมเลสโดยใช้ cDNA ของเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อย (digestive gland) มาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์AMY2F,AMY2R

ที่มีความจำเพาะต่อยีน (ภาพที่12(b)) โดยเมื่อทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เวลา 40 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้มีความจำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลส โดยสามารถเพิ่มปริมาณยีนในส่วนของ Start Codon จนถึงปลายทางด้าน Stop Codon นำผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 แถบ PCR Produces ของยีนแอลฟาอะไมเลสโดยใช้ไพรเมอร์ AMY2F คู่กับ AMY2R ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส 1 เปอร์เซ็นต์,ช่องที่ 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb, ช่องที่ 2 คือ ยีนแอลฟาอะไมเลสโดยใช้ไพรเมอร์ AMY2F คู่กับ AMY2R ขนาด 1,563 คู่เบส

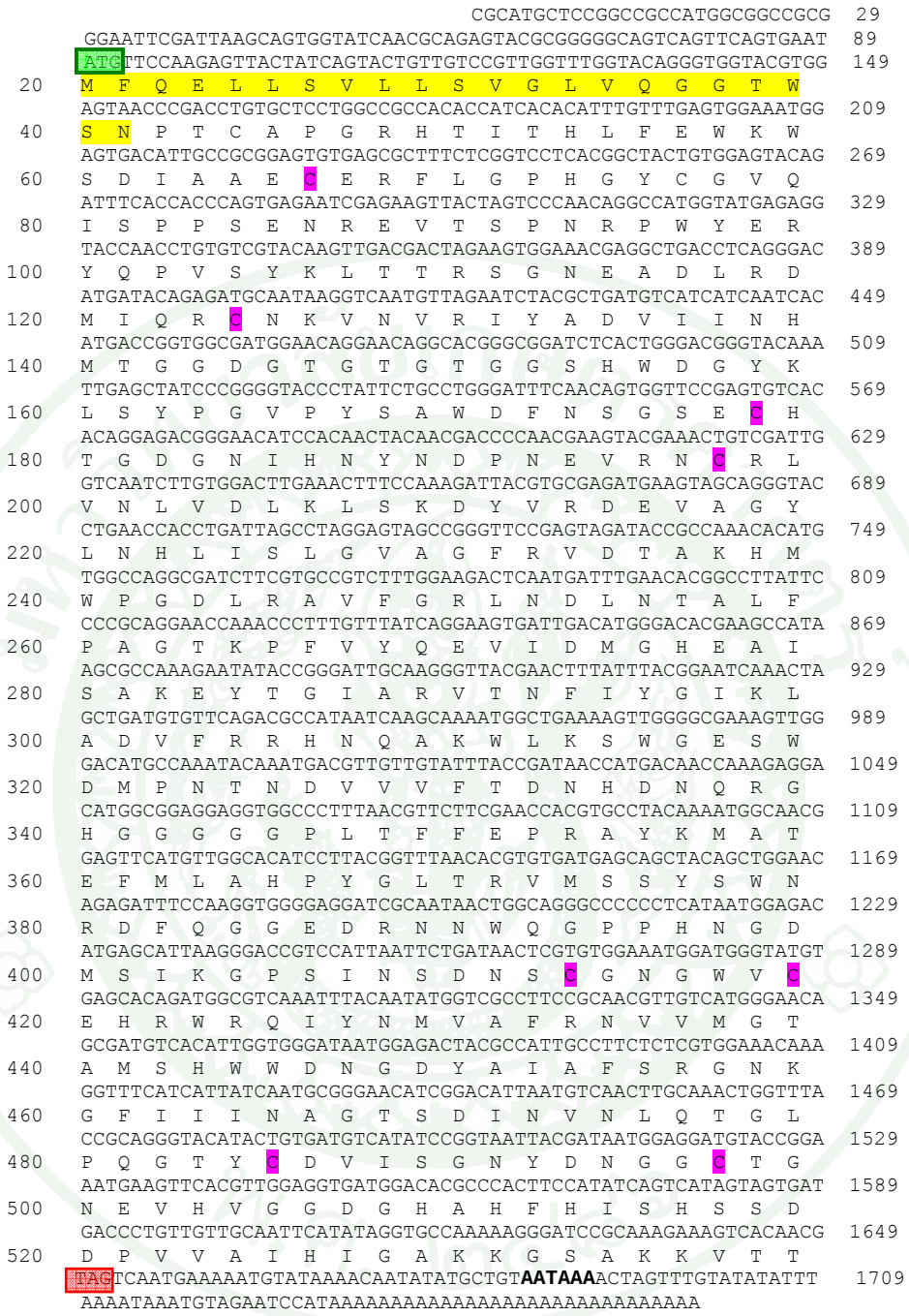
1.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลส ของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) แล้วนำมาวิเคราะห์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมที่มีความยาว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากับ 1,759 คู่เบส ซึ่งเมื่อทำการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดนั้นจะประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame, ORF) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 1,563 คู่เบส และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (5' Untranslated region, 5' UTR) และทางด้านปลาย 3' ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (3' Untranslated region, 3' UTR) ที่มีความยาวเท่ากับ 89 คู่เบสและ107 คู่เบส ตามลำดับ อีกทั้งยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น ATTTA หรือที่เรียกว่า AU rich element motif (ARE) อยู่ในส่วนของ 3' UTR จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งของ AU rich element motif (ARE) นี้จะมีความสำคัญต่อการคงสภาพของ mRNA (mRNA stabilizing function) (Bakheet *et al.,* 2001 และ Nagoshi *et al*., 2006) และยังพบตำแหน่งของ Polyadenylation signal (AATAAA) จำนวน 1 ตำแหน่ง ก่อนถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Poly A tail ประมาณ 14 bp (ภาพที่ 14) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) ที่มีความยาวทั้งสิ้น 1563 bp นี้ มาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ทำให้ได้ลำดับของกรดอะมิโนที่มีความยาวทั้งสิ้น 520 Residues

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟา-อะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบโดยแถบสีชมพูแสดงถึงตำแหน่งของกรดอะมิโน Cysteines จำนวน 8 ตำแหน่ง แถบสีเหลืองแสดงตำแหน่งของ signal peptide กรอบสีเขียวแสดงตำแหน่งของ start codon:ATG กรอบสีแดงแสดงตำแหน่งของ stop codon: TAG แถบสีฟ้าแสดงตำแหน่งของ conserved domains ตัวอักษรที่เป็นตัวหนาแสดงถึงตำแหน่งของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Polyadenylation signal (AATAAA) และตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้แสดงถึงส่วนของ AU rich element motif (ARE) (ATTTA)

2. การวิเคราะห์โปรตีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Sc*AMY)

2.1 การหาน้ำหนักโมเลกุล

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของ cDNA ของยีนแอลฟาอะไมเลสแล้ว พบว่าโปรตีนของแอลฟาอะไมเลส ของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ (MW) 57.763 kDa และมีค่า Theoretical isoelectric point (pI) เท่ากับ 6.36 โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ (http://au.expasy.org/tools/ protparam.html) ซึ่งค่า Theoretical isoelectric point หรือ pI ดังกล่าวคือค่า pH ที่ทำให้กรดอะมิโนหรือโปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (Xuhua, 2007)

2.2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*ScAmy*) ที่สมบูรณ์กับยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีนแอลฟา-อะไมเลส ของหอยนางรมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) นำลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม Vertebrates และ กลุ่ม Invertebrates โดยเริ่มจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟา-ไมเลสในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษา มาทำการถอดรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนพบว่ากรดอะมิโนของยีนแอลฟา-อะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*ScAmy*) มีส่วนของ secondary-structure element ของ (β/α) และสามารถจัดลำดับกรดอะมิโนตาม binding domain ได้ 10 domain (Janecek, 1992) ได้แก่ FEW (β1), GYCGVQISP (β2), DVIINHM (β3), HNYN (loop3), LVDLK (loop3), GFRVDTAKHM (β4), QEVIDMG (β5), GIARVTNFIY (β6), FTDNHD (β7), GLTRVMSSY (β8), KWSDIAAECE (α1), DLRDMIQRCNKVNVR (α2), KDYVRDEVAGY (α3), PGDLRAVFGRLND (α4), AISAK (α5), KLADVFRRHN (α6a), RAYKMATEFMLA (α6b), NMVAFRNVVMG (α7) (ภาพที่ 15) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลส (*ScAmy*) มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ สิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่ CAA68065 (*Pecten maximus*) หอยเชลล์, ABO26610(*Haliotis discusdiscus*) หอยเป๋าฮื้อ, AAL37183.1 (*Crassostrea gigas*) หอยนางรม, BAA04586.1 (*Drosophila simulans*) แมลงหวี่, ACT64133 (*Bombyx mori*) หนอนไหม, 1JAE_A (*Tenebrio molitor* Larval) หนอนนก, NP_001107848.1 (*Tribolium castaneum*) มอดแป้ง, AAM20738.1 (*Apis mellifera*) ผึ้ง, AAA29357.1 (*Anopheles gambia*) ยุงก้นปล่อง, AAH09121 (*Mus musculus*) หนู, NP_998176.1 (*Danio rerio*) ปลาม้าลาย, AAF02828.1(*Sus scrofa*) หมูป่า และ NP_000690.1 (*Homo sapiens*) มนุษย์ พบว่า ประกอบไปด้วยตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved domain) ทั้งหมด 9 ตำแหน่ง ได้แก่ FEW, GYCGVQISP, DVIINHM, HNYN, LVDLK, GFRVDTAKH, EVID, FTDNHD, GLTRVMSSY พบว่าบางตำแหน่งมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในหลายๆตำแหน่ง (ภาพที่ 17)

```
MFQELLSVLLSVGLVQGGTWSNPTCAPGRHTITHLFEWKWSDIAAECERFLGPHGYCGVQ        60
                                    β1    α1              β2

ISPPSENREVTSPNRPWYERYQPVSYKLTTRSGNEADLRDMIQRCNKVNVRIYADVIINH       120
                                          α2                β3

MTGGDGTGTGTGGSHWDGYKLSYPGVPYSAWDFNSGSECHTGDGNIHNYNDPNEVRNCRL       180
                                                 loop3

VNLVDLKLSKDYVRDEVAGYLNHLISLGVAGFRVDTAKHMWPGDLRAVFGRLNDLNTALF       240
  loop3      α3                  β4          α4

PAGTKPFVYQEVIDMGHEAISAKEYTGIARVTNFIYGIKLADVFRRHNQAKWLKSWGESW       300
          β5       α5        β6        α6a

DMPNTNDVVVFTDNHDNQRGHGGGGGPLTFFEPRAYKMATEFMLAHPYGLTRVMSSYSWN       360
           β7                          α6b     β8

RDFQGGEDRNNWQGPPHNGDMSIKGPSINSDNSCGNGWVCEHRWRQIYNMVAFRNVVMGT       420
                                                 α7

AMSHWWDNGDYAIAFSRGNKGFIIINAGTSDINVNLQTGLPQGTYCDVISGNYDNGGCTG       480

NEVHVGGDGHAHFHISHSSDDPVVAIHIGAKKGSAKKVTT*                          520
```

ภาพที่ 15 แสดงให้เห็นในส่วนของ secondary-structure element ของ (β/α) ในยีนแอลฟาอะไมเลส ของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ โดยแถบสีเหลืองแสดงส่วนแอลฟาและแถบสีเขียวแสดงส่วนของเบต้า

3. การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

หลังจากทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม ClustalW (http://clustal.org) ในภาพที่ 17 พบว่า ผลจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในหลายๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่ง (ภาพที่ 17) ส่งผลให้เกิดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยจากการสุ่มค่า Bootstrap Value 1000 replicates จากโปรแกรม MEGA 3.1 พบว่า Phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆที่ได้ประกอบด้วย 13 interior branch โดยมีผลการทดสอบ bootstrap อยู่ระหว่าง 56-100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16) เมื่อนำมาหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic Distance) (ตางรางที่ 3) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%Identity) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น 13 ชนิด (ตารางที่ 2) พบว่าลำดับอะมิโนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากมีความเหมือนกับเอนไซม์อะไมเลสของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นตั้งแต่ 48-88 เปอร์เซนต์โดยเหมือนกับหอยนางรมสายพันธุ์ *Crassostrea gigas* 88 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับ *Anopheles gambia* น้อยที่สุด 48 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์อะไมเลสของสัตว์ต่างๆจะมีความเหมือนกันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Da Lage, 2002)

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

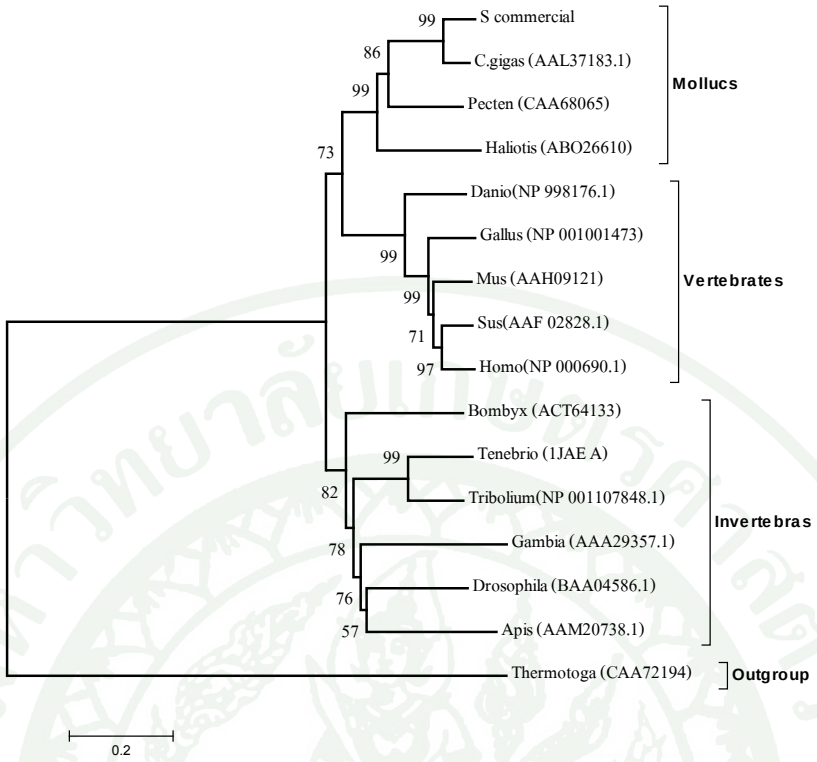
ชื่อ	ความยาวของกรดอะมิโน	%ความเหมือน
Crassostrea gigas	520	88
Pecten maximus	508	69
Haliotis discusdiscus	511	63
Danio rerio	512	58
Drosophila simulans	492	54
Bombyx mori	500	52
Tenebrio molitor	471	55
Tribolium castaneum	490	55
Anopheles gambia	509	48
Apis mellifera	493	50
Mus musculus	509	55
Sus scrofa	511	55
Homo sapiens	511	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม Genetic Distance ของหอยนางรมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. *Homo sapiens*	0.000															
2. *Sus scrofa*	0.016	0.000														
3. *Mus musculus*	0.097	0.154	0.000													
4. *Gallus gallus*	0.145	0.147	0.138	0.000												
5. *Danio rerio*	0.109	0.260	0.292	0.348	0.000											
6. *Saccostrea commercialis*	0.274	0.405	0.342	0.281	0.394	0.000										
7. *Crassostrea gigas*	0.314	0.360	0.434	0.321	0.396	0.104	0.000									
8. *Pecten maximus*	0.369	0.543	0.561	0.511	0.290	0.265	0.251	0.000								
9. *Haliotis discusdiscus*	0.353	0.360	0.468	0.416	0.432	0.396	0.287	0.563	0.000							
10. *Drosophila simulans*	0.719	0.581	0.719	0.643	0.957	0.805	0.541	1.007	0.333	0.000						
11. *Anopheles gambia*	0.903	0.756	0.839	0.842	1.172	0.946	0.860	0.993	1.181	1.158	0.000					
12. *Apis mellifera*	0.231	0.330	0.219	0.396	0.362	0.475	0.557	0.620	0.577	0.894	1.183	0.000				
13. *Tenebrio molitor*	0.604	0.550	0.579	0.527	0.622	0.654	0.581	0.552	0.466	0.534	0.955	0.891	0.000			
14. *Tribolium castaneum*	0.690	0.679	0.654	0.622	0.674	0.681	0.663	0.676	0.627	0.724	0.756	0.977	0.174	0.000		
15. *Bombyx mori*	0.799	0.842	0.914	0.776	0.867	0.665	0.695	0.523	1.176	1.475	0.704	1.145	1.027	0.885	0.000	
16. *Thermotoga maritima*	1.475	1.762	1.661	1.738	1.584	1.871	1.860	1.776	1.656	2.063	2.423	1.400	2.088	2.217	3.041	0.000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรม (*Sc*AMY) กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ได้มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank database

3. การหาตำแหน่งจับของคลอไรด์ (Chloride Binding), แคลเซียม (Calcium Binding), ฮิสติดีน (Histidine Binding), บริเวณกระตุ้น (Active site), ตำแหน่ง Cysteine Residues และ β/α-Barrel ของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

เมื่อได้ลำดับกรดอะมิโนมาแล้วสามารถแบ่งลำดับกรดอะมิโนของแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*Sc*AMY) พบลักษณะความเหมือนของเรสิดิวส์ของ active site บริเวณ subsite ที่ 3 ได้แก่ H120 (ฮิสติดีน), D185 (แอสพาติค) และ H286 (ฮิสติดีน) บริเวณ subsite ที่ 4 ได้แก่ H203 (ฮิสติดีน), E241 (กลูตามิค) และ D307 (แอสพาติค) บริเวณ subsite ที่ 5ได้แก่ K188 (ไลซีน) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของแอลฟาอะไมเลสในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด พบว่าเรสิดิวส์ที่อยู่บริเวณ active site ของกรดอะมิโนในหอยนางรมมีความคล้ายคลึงกันกับแอลฟาอะไมเลสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ยกเว้นกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสที่อยู่ active site บริเวณ subsite ที่ 5 ใน *Aspergillus niger* (ยีสต์) และ barley (ข้าวบาร์เล่ย์) ดังตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนในตำแหน่งจับของแคลเซียม Calcium binding site มีทั้งหมด 4 ตำแหน่งประกอบไปด้วย N106 (แอสพาราจีน), D152 (แอสพาร์ติค), D162 (แอสพาร์ติค) และ H203 (ฮิสติดีน) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของแอลฟาอะไมเลสในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด พบว่าเรสิดิวส์ที่อยู่บริเวณตำแหน่งจับของแคลเซียม Calcium binding site ในหอยนางรมมีความคล้ายคลึงกันกับแอลฟาอะไมเลสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ยกเว้นกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสที่ตำแหน่งจับของแคลเซียม Calcium binding site ใน *Bacillus licheniformis* ซึ่งมีเพียง 3 ตำแหน่งเท่านั้นและความแตกต่างในชนิดของกรดอะมิโนในสิ่งมีชีวิต *Aspergillus niger* (ยีสต์) และbarley (ข้าวบาร์เล่ย์) พบว่ามีความแตกต่างของกรดอะมิโนจาก แอสพาติค (D) เป็น กลูตามิค (E) และฮิสติดีน (H) เป็นกลูตามิค (E) ใน *Aspergillus niger* (ยีสต์) ส่วนใน barley (ข้าวบาร์เล่ย์) มีความแตกต่างจากกรดอะมิโนจาก ฮิสติดีน (H) เป็นไกลซีน(G) ส่วน Calcium binding ตำแหน่งอื่นๆนั้นมีกรดอะมิโนเป็นรูปแบบเดียวกัน (Stefan *et al* .,1998) ดังตารางที่ 4

สำหรับส่วนของตำแหน่งจับของครอไรด์ Chloride binding site มีทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ประกอบไปด้วย R194 (อาร์จินิน), R318 (อาร์จินิน) และS295 (เซรีน) เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของแอลฟาอะไมเลสในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด พบว่าเรสิดิวส์ที่อยู่บริเวณตำแหน่งจับของครอไรด์ Chloride binding site ในหอยนางรมมีความคล้ายคลึงกันกับแอลฟาอะไมเลสในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ยกเว้นกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสบริเวณตำแหน่งที่ 3 ในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบมีความแตกต่างของประเภทกรดอะมิโน N (แอสพาราจีน) เป็นกรดอะมิโน S295 (เซรีน) เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 4

ตำแหน่งจับของฮิสติดีน ประกอบไปด้วย H119, H216 และH315 และพบจำนวนกรดอะมิโนซิสเตอินทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ประกอบด้วย C47, C105, C159, C177, C394, C400, C466 และ C478 (ภาพที่ 18) ตำแหน่งของซิสเตอินทั้ง 8 ตำแหน่งนี้เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ที่พบใน เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของสัตว์ทุกชนิด (Janacek, 1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 แสดงความเหมือน (conservation) ของกรดอะมิโนแอลฟาอะไมเลส บริเวณ side-chains ในกระบวนการเข้าไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาและบริเวณของการเข้าจับของ substrate และไอออน

	TMA	BLA	ANA	BAA	SCA
			Residues at the active site		
Subsite					
3	H99	H105	H122	H92	H120
3	D185	D231	D206	D179	D185
5	K188	K234	K209	K182	K188
4	H189	H235	**E210**	**G183**	H203
4	E222	E261	E230	E204	E241
3	H286	H327	H296	H288	H286
4	D287	D328	D297	D289	D307
			Residues involved in chloride binding		
	R183	R229	R204	R177	R194
	N285	N326	N295	N287	**S295**
	R321	**E300**	**I326**	**-**	R318
			Residues involved in calcium binding		
	N98	N104	N121	N91	N106
	D146	-	**E162**	**D138**	D152
	D155	D200	D175	D148	D162
	H189	H235	**E210**	**G183**	H203
				A141	

TMA, *Tenebrio molitor* α -amylase SCA, *S.commercial* α -amylase

BLA, *Bacillus licheniformis* α -amylase ANA, *Aspergillus niger* α -amylase

BAA, barley α -amylase

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟา-อะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม Vertebrates และ กลุ่ม Invertebrates ดังนี้คือ CAA68065(*Pecten maximus*) หอยเชลล์, ABO26610(*Haliotis discusdiscus*) หอยเป๋าฮื้อ, AAL37183.1 (*Crassostrea gigas*) หอยนางรม, BAA04586.1 (*Drosophila simulans*) แมลงหวี่, ACT64133 (*Bombyx mori*) หนอนไหม, 1JAE_A (*Tenebrio molitor* Larval) หนอนนก, NP_001107848.1 (*Tribolium castaneum*) มอดแป้ง, AAM20738.1 (*Apis mellifera*) ผึ้ง, AAA29357.1 (*Anopheles gambia*) ยุงก้นปล่อง, AAH09121(*Mus musculus*) หนู, NP_998176.1 (*Danio rerio*) ปลาม้าลาย, AAF02828.1(*Sus scrofa*) หมูป่า และ NP_000690.1 (*Homo sapiens*) มนุษย์กรอบสีฟ้าที่ปรากฏเป็นการแสดงลักษณะของการเกิดพันธะ Disulfide ระหว่างกรดอะมิโน Cysteine กรอบสีชมพู คือบริเวณตำแหน่งของ Consensus pattern และเส้นใต้ตัวอักษรคือ Histidine binding ส่วน (*) คือตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน และ (.) คือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 (ต่อ)

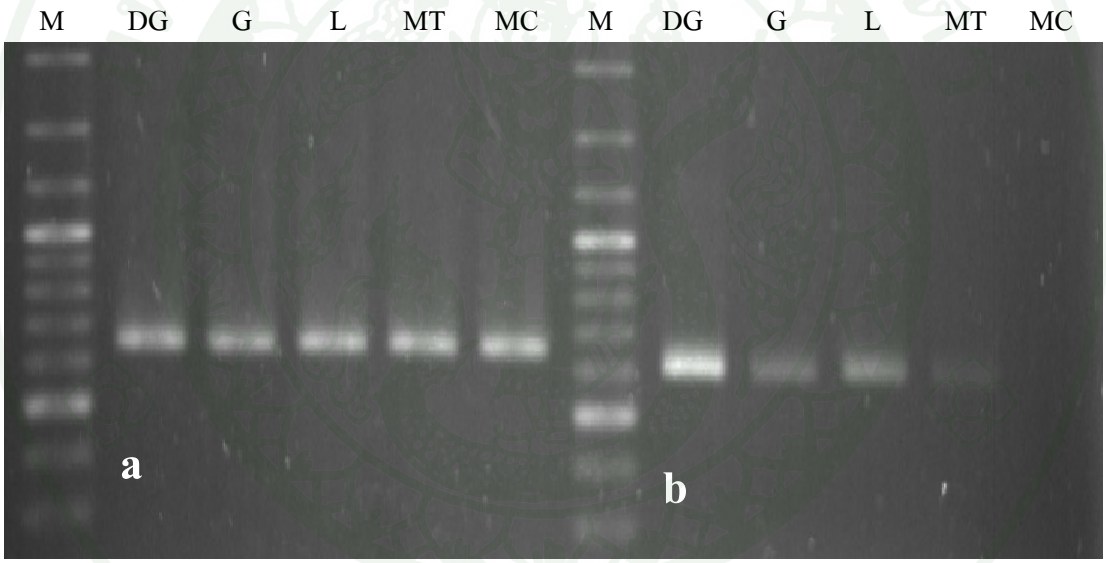
4. การศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อต่างๆของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบโดยใช้เทคนิค Revererse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสจาก First strand cDNA ของตัวอย่างในอวัยวะต่างๆของหอยนางรม ประกอบด้วย เนื้อเยื่อส่วนปาก (labia palps) เนื้อเยื่อส่วนเหงือก (gills) เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อส่วนต้อมน้ำย่อย (digestive) ในแต่ละเนื้อเยื่อมาวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสโดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน β-actin ซึ่งจัดเป็น (house keeping gene) ที่ใช้เป็นยีนเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนอื่นๆ (Internal control) เพื่อยืนยันว่าเซลล์หรือเยื้อเยื่อของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบระหว่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำการศึกษายังมีชีวิตและยังคงมีกิจกรรมของเซลล์อยู่ ทั้งนี้พบว่าในทุกอวัยวะมีการแสดงออกของยีน β-actin ที่ใกล้เคียงกันมาก โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเอของ PCR products เท่ากับ 670 คู่เบส (ภาพที่ 18)

การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบมีขนาดแถบดีเอ็นเอของ PCR product เท่ากับ 620 คู่แบส โดยมีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อย (Digestive grand) รองลงมาคืออวัยวะส่วนปาก เหงือก เนื้อเยื่อส่วนปกคลุม และกล้ามเนื้อที่ไม่มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสเลยแต่อย่างใด คาดว่าเนื่องจากอวัยวะดังกล่าวไม่มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสและเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบการย่อยอาหาร (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ โดย (a) PCR product ของยีน β-actin มีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 670 คู่เบสและ (b) ยีนแอลฟาอะไมเลสมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 620 คู่เบส โดย M คือ Marker 1 kb, DG คือ (digestive gland) ต่อมน้ำย่อย, G คือ (gill) เหงือก, L คือ (labia palps) ปาก, MT คือ (mantle) กล้ามเนื้อปกคลุม, MC คือ (muscle) กล้ามเนื้อยึดติด

จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้แตกต่างจากรายงานของ (Huvet *et al*., 2003) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* พบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรม พบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสมากในส่วนของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อมน้ำย่อย เหงือก ปาก กล้ามเนื้อปกคลุม ตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกในกล้ามเนื้อยึดติด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในครั้งนี้

5. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค relative real-time PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในอวัยวะต่างๆของหอยนางรม โดยใช้เทคนิค relative real-time PCR นั้นต้องพิจารณา melting curve แสดงค่า melting temperation ของดีเอ็นเอในยีนแอลฟาอะไมเลสเพื่อให้ทราบความจำเพาะเจาะจงของผลที่ได้จากการศึกษาโดยจะทำการพิจารณาจากอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลว (melting temperature หรือ Tm) ที่ควรมีจุดสูงสุดเพียง 1 จุดเท่านั้นเพราะจุดที่คู่ base pair ของ nucleotide จะแยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด ทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างเฉียบพลัน ณ จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G และ C ที่มีในดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละชนิด (อโณทัย, 2549) ดังนั้นด้วยเหตุนี้ในการเพิ่มจำนวนของ DNA ที่เกิดขึ้นจะต้องเป็นกระบวนการที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและต้องไม่มีการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนอื่นใด (non-specific product) หรือจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจาก primer dimers (กุลยา, 2547)

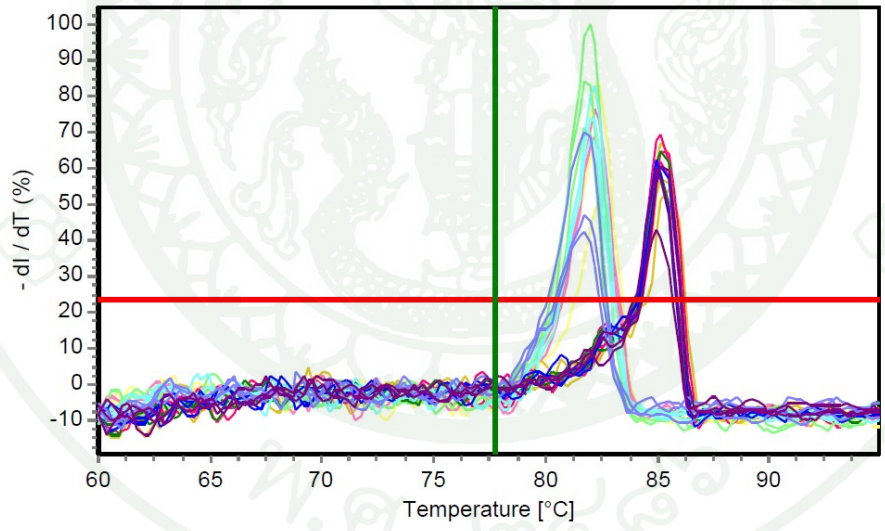
ซึ่งเมื่อทำการพิจารณา melting curve ของ Specific primers ของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมที่นำมาทำการศึกษา พบว่า melting curve ของ primers ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมที่ได้จากการศึกษาในเนื้อเยื่อต่างๆพบว่ามีอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลวเท่ากับ 82 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5) และไม่มีส่วนของ primer dimers เกิดขึ้นรวมถึงไม่เกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอต้นแบบชนิดอื่นๆ โดยดูได้จากการเกิดจุดสูงสุดของเส้นกราฟขึ้นเพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า primers ที่ใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนแอลฟาอะไมเลสเท่านั้น (ภาพที่ 19)

และเมื่อทำการพิจารณากราฟ melting curve ของ specific primers ของยีนแอคตินก็พบว่า melting curve ของ primers ที่จำเพาะต่อยีนแอคตินของหอยนางรมที่ได้จากการศึกษาในเนื้อเยื่อต่างๆพบว่ามีอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลวเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 5) และไม่มีส่วนของ primer dimers เกิดขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Primers ที่ใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนแอลฟาอะไมเลสเท่านั้น (ภาพที่ 19)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 แสดง melting curve ของ primers ที่จำเพาะต่อยีนแอลฟาอะไมเลสและยีนแอคตินของหอยนางรมในเนื้อเยื่อต่างๆมีอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลวต่างๆดังนี้

ชนิดเนื้อเยื่อ	Amylase	Actin
Digestive	82.27	85.23
Gill	82.17	85.10
Lap	81.93	85.07
Mantle	82.07	85.05
Muscle	81.86	85.10
ค่าเฉลี่ยของMelting temperature (Tm)	82.06	85.03



ภาพที่ 19 melting curve แสดงค่า melting temperature ของดีเอ็นเอในยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบมาใช้เป็นแม่แบบ โดยใช้เทคนิค relative real-time PCR

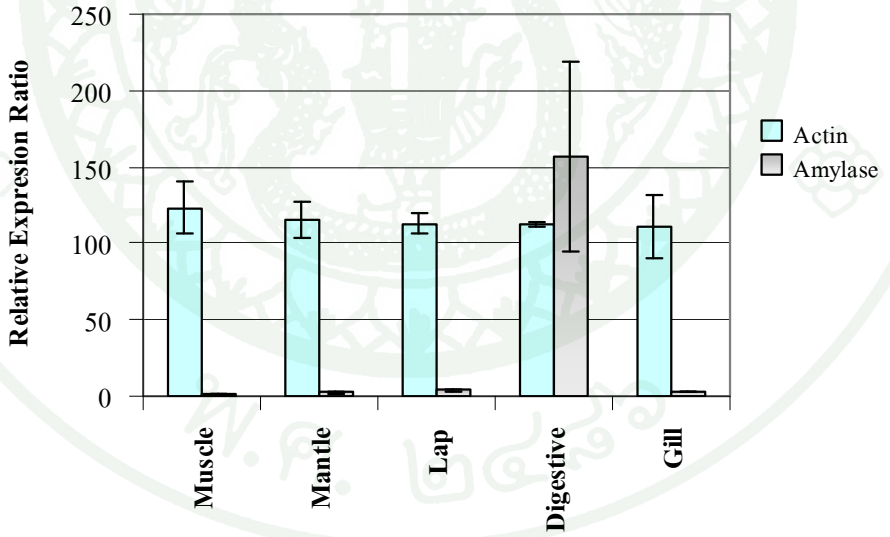
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมด้วยโปรแกรม realplex 1.5 software (eppendorf, Mondo Tech, USA) ผลที่ได้แสดงออกมาในรูปค่า Ct ในทุกๆ เนื้อเยื่อที่นำมาเปรียบเทียบการแสดงออก และเมื่อนำค่า Ct ที่ได้จากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนอวัยวะที่ทำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองมาทำการ calibrate กับค่า Ct ที่ได้จากเนื้อเยื่อยึดติดเนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลส (normalize)

เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรม พบว่าในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกมากที่สุดคือ เนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อยมีการแสดงออกสูงกว่าเนื้อเยื่อชนิดอื่นๆ ที่นำมาศึกษาอย่างเห็นได้ชัดเจนคิดเป็นระดับการแสดงออกที่สูงกว่าเนื้อเยื่ออื่นประมาณ 37, 45, 20 เท่าของเนื้อเยื่อปาก, เหงือก, เนื้อเยื่อส่วนปกคลุม ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อยึดติดไม่พบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสเลย (ภาพที่ 20)

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมในเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆพบว่ามีปริมาณการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในระดับที่แตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อส่วนของต่อมน้ำย่อยกับเนื้อเยื่อทั้งหมดที่นำมาทำการทดลองได้แก่ เนื้อเยื่อปาก, เหงือก, เนื้อเยื่อส่วนปกคลุม ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อยึดติดไม่พบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสเลย โดยมีค่า relative expression level เท่ากับ 148, 4.19, 3.24, 2.32 และ 0 ตามลำดับ (ภาพที่ 20)



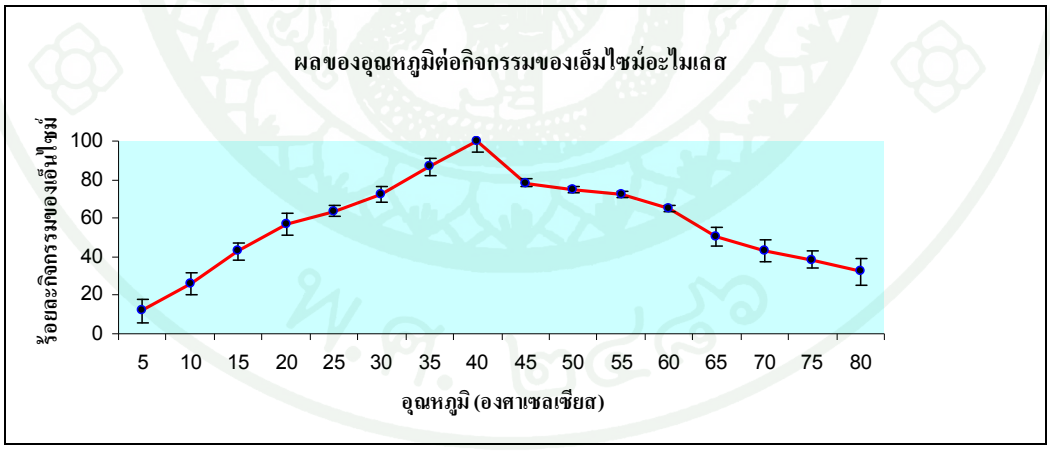
ภาพที่ 20 การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆได้แก่ เนื้อเยื่อส่วนปาก (labia palps) เนื้อเยื่อส่วนเหงือก (gills) เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อยึดติด (muscle) และเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อย (digestive) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ยีน β-actin ด้วยเทคนิค relative real-time PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อยของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

หลังจากการสกัดเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเนื้อเยื่อต่อมน้ำย่อย (digestive gland) ในหอยนางรมสายพันธุ์กปากจีบแล้วนำมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในอุณหภูมิ, pH และความเข้มข้นของเกลือในระดับที่แตกต่างกันดังนี้

จากการวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์กับอุณหภูมิ หลังจากบ่มเอนไซม์ที่สกัดได้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี pH 6 แล้วทำปฏิกิริยากับแป้ง 1% (substrate) ที่ละลายในน้ำกลั่น ทดสอบในอุณหภูมิที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส ถึง 80 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 5 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว 3 นาที เพื่อให้เกิดกิจกรรมการย่อยแป้ง วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ที่เกิดจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารละลาย จากการวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงและแปลผลแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการทำงานในเอนไซม์ที่ระดับมากกว่า 50 % คือช่วงอุณหภูมิ 17-65 องศาเซลเซียส และที่ 5 องศาเซลเซียสพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีเพียง10 % เท่านั้นดังภาพที่ 21

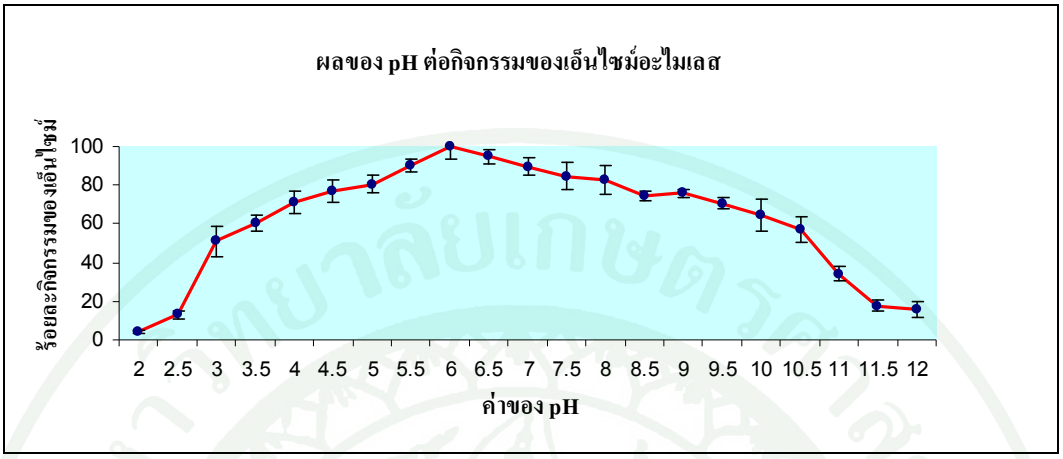


ภาพที่ 21 ผลของระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อร้อยละกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสโดยจากการวิเคราะห์ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสนั้นพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดคือ pH เท่ากับ 6.00 (ภาพที่ 22) จะเห็นว่าเอนไซม์อะไมเลสสามารถทำงานได้

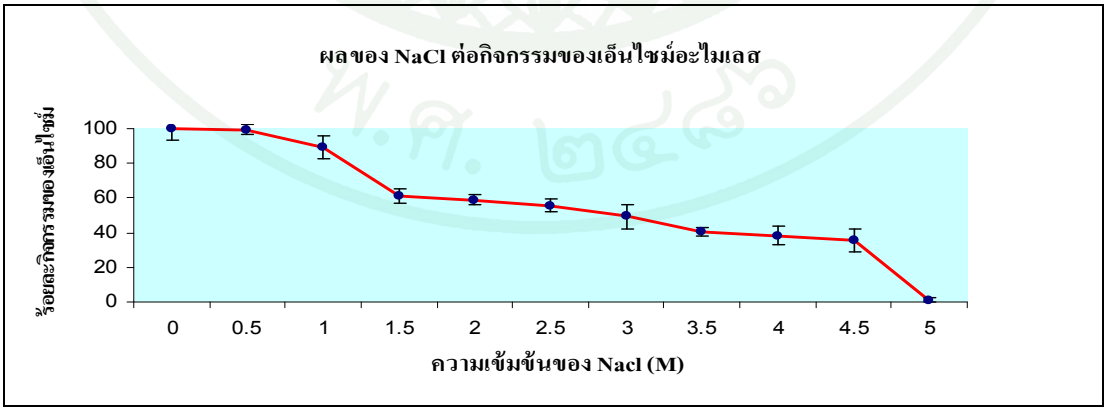
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากกว่า 50 % ในช่วง pH 3-10.75 และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำกว่า 20% ที่ระดับ pH ต่ำกว่า 2.75 และ 11.5



ภาพที่ 22 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างในระดับต่างๆที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการวิเคราะห์ผลของสารละลายเกลือ (NaCl) ต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีการทำงาน 80 % และ 50 %ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 1.25 M และ 4.75 M ตามลำดับ (ภาพที่ 23) กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีการทำงานต่ำกว่า 20 % ที่ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) สูงกว่า 4.75 M และพบว่าเอนไซม์อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ต่ำกว่า 0.5 M (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ผลของเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ในระดับความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์อะไมเลส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *ScAmy* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมีความยาวทั้งสิ้น เท่ากับ 1729 คู่เบส โดยมีส่วนของ Open reading frame เท่ากับ 1563 คู่เบส สามารถถอดรหัสแป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 520 Amino acids มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาของ (Sellos *et al*., 2000) ที่ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* พบว่ามีความยาวในส่วนของ (ORF) ขนาด1561 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 520 Amino acids และใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยชนิดอื่นๆ เช่นหอยเป๋าฮื้อ ที่มีความยาว 1650 คู่เบส ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 511 Amino acids (Nikapittiya *et al*., 2009) ในหอยเชลล์พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนยาว 1524 คู่เบส สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 508 (Le Moine *et al.,* 1997) เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยชนิดต่างๆมีเปอร์เซนต์ความเหมือน 63-88 เปอร์เซนต์

2. วิเคราะห์โปรตีน

การวิเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ของกรดอะมิโนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจ *ScAmy* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 57.763 kDa และค่า pI ที่คำนวณได้เท่ากับ 6.36 โดยใช้โปรแกรม expasy (http://au.expasy.org)

จากรายงานการการวิเคราะห์สายโพลีเปปไทด์ที่มีการหาค่ามวลโมเลกุล (MW) และค่า pI ในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่ม mollucs พบว่ามีรายงานการศึกษาดังนี้ การศึกษาของ (Nikapittiya *et al.,* 2009) ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยเป๋าฮื้อพบว่ามีรายงานการหาค่ามวลโมลกุลเท่ากับ 54 กิโลดาลตัน และคำนวณค่า pI เท่ากับ 8.3 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *ScAMY* และการศึกษาในหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* นำยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยนางรมมาหาค่ามวลโมเลกุล พบว่ามีขนาดเท่ากับ 57.713 kDa และเมื่อคำนวณค่า pI ได้เท่ากับ 6.65 โดยจากรายงานการศึกษาของ Sellos *et al.,* 2000 สอดคล้องกับค่ามวลโมเลกุลของ *ScAMY* คือ 57.763 กิโลดาลตันมากที่สุด และเมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม vertebrae ที่มีการศึกษามวลโมเลกุลและค่า pI พบว่ามีการศึกษาในคนสามารถมาหาค่ามวลโมเลกุล ขนาดเท่ากับ 55

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิโลดาลตันโดย (Keller *et al*., 1971) ถือว่าค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ (*ScAmy*) เมื่อนำยีนแอลฟาอะไมเลสของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม invertebrae ที่มีการศึกษามวลโมเลกุลและค่า pI พบว่ามีรายงานใน (Strobl *et al.,* 1997) ที่ได้ทำการศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิของยีนแอลฟาอะไมเลส (primary structure) ของหนอนนก *Tenebrio molitor* (TMA) ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีขนาดเท่ากับ 471 อะมิโน โดยคิดค่ามวลโมเลกุลได้เท่ากับ 51.3 กิโลดาลตัน และในการศึกษาของ (Kanakatsu., 1978) เป็นการศึกษาในหนอนไหม *Bombyx mori* (*Bm*α-Amylase) ที่ได้จากส่วนของน้ำย่อยของ polyvoltine strains พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55 kDa ซึ่งพบว่ามวลโมเลกุลของทั้งสองสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม invertebrate มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

3. การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในหอยนางรม

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสจากตัวอย่างในอวัยวะต่างๆของหอยนางรม ประกอบด้วย เนื้อเยื่อส่วนปาก (labia palps) เนื้อเยื่อส่วนเหงือก (gills) เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อ (muscle) และเนื้อเยื่อส่วนต้อมน้ำย่อย (digestive) โดยใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ เทคนิค Relative Real-Time PCR ผลที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมีค่าตรงกัน คือโดยมีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อย (digestive gland) รองลงมาคืออวัยวะส่วนปาก (labia palps) เหงือก (gills) เนื้อเยื่อส่วนปกคลุม และกล้ามเนื้อที่ไม่มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสเลยแต่อย่างใด ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ (Huvet *et al.,* 2003) ที่ได้ทำการศึกษาผลการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของหอยนางรมสายพันธุ์ *C.gigas* การศึกษาของ (Huvet *et al.,* 2003) พบว่ามีการมีการแสดงออกมากที่สุดในต่อมน้ำย่อย (digestive gland) รองลงมาคือ เหงือก (Gills) และ ปาก (labia palps) แต่ในการทดลองการแสดงออกของนางรมสายพันธุ์ปากจีบครั้งนี้พบว่า มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสมากที่สุดใน ต่อมน้ำย่อย (digestive gland) ซึ่งให้ผลตรงกัน แต่ในลำดับถัดมาที่มีการแสดงออกรองลงมาพบว่ามีความแตกต่างกันคือ แสดงออกของนางรมสายพันธุ์ปากจีบครั้งนี้พบว่ามีการแสดงออกของปาก (labia palps) เหงือก (gills) จากการศึกษาของ (Darnis *et al.,* 1999) ได้ทำการศึกษาการโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิของยีนแอลฟาอะไมเลสพบว่ามีการแสดงออกในตับสูงในคน หนู mouse และหนู rat เช่นเดียวกับรายงานของ (Bompard-Gilles *et al.,*1996) พบว่าหมู (pig) หรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆก็มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในเนื้อเยื่อในส่วนอวัยวะตับ ส่วนในการศึกษาของ (Chamilani *et al.,* 2009) การแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสของหอยเป๋าฮื้อในเนื้อเยื่อต่างๆพบว่า ยีนแอลฟาอะไมเลสมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแสดงออกมากที่สุดใน ตับ (hepatopancreas) และ ต่อมน้ำย่อย (digestive) ส่วนในเหงือก (gills) เนื้อเยื่อปกคลุม (mantle) เนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อ (muscle) พบว่ามีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในปริมาณที่น้อยมากซึ่งจากผลการรายงานดังกล่าวถือว่าสอดคล้องกับการทดลองการแสดงออกของหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบคือมีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อชิ้นส่วนของต่อมน้ำย่อย (digestive) เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการศึกษาการแสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนตับ (hepatopancreas)

4. กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียส, pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดคือ pH เท่ากับ 6.00 และเอนไซม์อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ในปริมาณที่ต่ำกว่า 0.5 M ในการศึกษาของ (Tapan *et al.,* 2005) ที่ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ, pH และความเข้มข้นของเกลือต่อเอนไซม์อะไมเลสใน Copepoda พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสคือ 35 องศาเซลเซียส ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสคือ 5.5-6.00 และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ ความเข้มข้นของเกลือที่ต่ำกว่า 0.5 พบว่าปัจจัยต่างๆต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีความใกล้เคียงกันกับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในหอยนางรม โดยจากการรายงานของ (Chamilani *et al.,* 2009) ที่มีการศึกษาการแสดงออกของเนื้อเยื่อต่างๆของหอยเป๋าฮื้อ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 40-55 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสคือ 6.00-7.5 ในรายงานการศึกษาครั้งนี้พบว่า pH และอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีอยู่ในช่วง 40 เช่นเดียวกันกับในหอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุป

จากการศึกษาการโคลนและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีน *Sc*Amy สามารถค้นพบดีเอ็นเอที่บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของยีน *Sc*Amy มีความยาวทั้งสิ้นเท่ากับ 1729 คู่เบส โดยส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (ORF) มีความยาวเท่ากับ 1563 คู่เบสและเมื่อนำมาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้กรดอะมิโนที่มีความยาวเท่ากับ 520 Residues

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *Sc*Amy ในอวัยวะต่างๆของหอยนางรมพันธุ์ปากจีบด้วยเทคนิค Revererse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อส่วนต่อมน้ำย่อย (digestive grand) รองลงมาคืออวัยวะส่วนปาก เหงือก เนื้อเยื่อส่วนปกคลุม และกล้ามเนื้อที่ไม่มีการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสเลยแต่อย่างใด ส่วนในเทคนิค relative real-time PCR พบว่ามีปริมาณการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสในระดับที่แตกต่างกันระหว่างเนื้อเยื่อส่วนของต่อมน้ำย่อยกับเนื้อเยื่อทั้งหมดที่นำมาทำการทดลองได้แก่ เนื้อเยื่อปาก, เหงือก, เนื้อเยื่อส่วนปกคลุม ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อยึดติดไม่พบการแสดงออกของยีนแอลฟาอะไมเลสเลย โดยมีค่า Relative expression level เท่ากับ 148, 4.19, 3.24, 2.32 และ 0 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน *ScAmy* พบว่าประกอบไปด้วยบริเวณอนุรักษ์ทั้งหมด 9 ตำแหน่งได้แก่ได้แก่ FEW, GYCGVQISP, DVIINHM, HNYN, LVDLK, GFRVDTAKH, EVID, FTDNHD, GLTRVMSSY การศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของยีน ScAMY เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้มีการบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank database พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนแยกออกจากกลุ่ม vertebrates, invertebrates และแบคทีเรีย แล้วพบว่ามีความใกล้ชิดในเชิงวิวัฒนาการกับยีน AMY ในกลุ่มของ mullucs

กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากอยนางรมสายพันธุ์ปากจีบพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 40 องศาเซลเซียส, pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดคือ pH เท่ากับ 6.00 และเอนไซม์อะไมเลสสามารถทำงานได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ในปริมาณที่ต่ำกว่า 0.5 M

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. **เทคโนโลยีแป้ง**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมประมง. 2548. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย เอกสารฉบับที่ 6/2548.** ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ

กรมประมง. 2544. **75 ปี กรมประมง.** กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมประมง. 2550. **ข้อมูลจากกลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ วิเคราะห์จากข้อมูลสถิติกรมศุลกากร.** เอกสารประกอบการสัมมนาคณะอนุกรรมการข้อมูลเพื่อการจัดทำแผนแม่บทการจัดการ ประมงทะเล วันที่ 21-23 กุมภาพันธ์ 2550 ณ โรงแรมชลพฤกษ์รีสอร์ท จังหวัดนครนายก, กรุงเทพฯ.

กรมประมง. 2536 ก. **การเพาะเลี้ยงหอยนางรม**. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมประมง. 2536 ข. **การเลี้ยงหอยนางรม**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

กรมประมง. 2540. **คู่มือการเลี้ยงหอยตะโกรมเชิงการค้า**. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.

กรรณิกา อินทชัย. 2530. **การวิเคราะห์เศรษกิจการเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**, กรุงเทพฯ.

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2544. **การเพาะเลี้ยงหอย**. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี**.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คมน์ ศิลปาจารย์ . 2533. การเพิ่มผลผลิตการเลี้ยงหอยนางรม: เทคนิคการล่อลูกหอยนางรมจากธรรมชาติ. **วารสารการประมง**, กรุงเทพฯ.

จรวย สุขแสงจันทร์. 2543. **การจำแนกชนิดของหอยนางรมบริเวณสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชัยวัฒน์ วิชัยวัฒนะ. 2540. **การทดลองเพาะพันธุ์หอยตะโกรม**.ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี, สุราษฎร์ธานี.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. 2548. **หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**. สำนักพิมพ์โฟร์เพซ, กรุงเทพฯ.

ทรงชัย สหวัชรินทร์. 2536. **คู่มือการเพาะเลี้ยงหอยนางรม**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กรมประมง**, กรุงเทพฯ.**

นวลมณี พงศ์ธนา. 2540. **คู่มือการเพาะเลี้ยงหอยตะโกรมเชิงการค้า**. โครงการพัฒนาการผลิตหอยตะโกรมเชิงพาณิชย์. กรมประมง และกองทุนสนับสนุนงานวิจัย, กรุงเทพฯ.

ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์. 2525. **การเจริญเติบโตของหอยนางรมปากจีบ (*Crassostrea commercialis*)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์, อุดมสิทธิ ภู่ประเสริฐ, ธีรนันท์ บัวเพชร, ปรเมษฐ์ พลอยประดับ และขจรเดช รักเดช. 2525. **การเจริญเติบโตของหอยนางรมปากจีบบนแผ่นเกาะในระดับน้ำที่แตกต่างกัน**. ภาควิชาชีววิทยาทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประชีพ ชูพันธ์, และสุวัจน์ ธัญรส. 2542. **การศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารและความเค็มต่ออัตราการกรองของหอยนางรม (*Crassostrea belcheri*)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพโรจน์ พรหมานนท์. 2533. การทดลองเลี้ยงหอยนางรมในกระบะไม้. **วารสารการประมง**. กรุงเทพฯ.

.

เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์. 2546. **คู่มือการเพาะและอนุบาลหอยนางรมสำหรับการเลี้ยง**. สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มณีย์ กรรณรงค์, อนุวัฒน์ รัตนโชติ และสุภาพร ทศพร้อม. 2540. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในหอยตะโกรม น้ำทะเลและตะกอนดิน บริเวณแหล่งเลี้ยงอ่าวบ้านดอน เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี, สุราษฎร์ธานี.

วัฒนา ภู่เจริญ. 2522. การเลี้ยงหอยนางรมในท้องที่จังหวัดชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย. **วารสารการประมง**,กรุงเทพฯ.

วิสุทธิ์ ถิรสัตยวงศ์ และจันทิมา เจริญศรี. 2547. **การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ของสัตว์ทะเล จำพวกหอยในบริเวณป่าชายเลนและริมฝั่งรอบเกาะยอ**. รายงานการวิจัย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2538. **การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. กรุงเทพฯ.

เสาวภา อังสุพานิช, สมหมาย เชี่ยววารีสัจจะ และจารุณี จันทร์ประมุข. 2529. **ศึกษาความชุกชุมและการแพร่กระจายของลูกหอยนางรม(*Crassostrea* sp.)** ที่คลองนาทับ, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, วิทยาเขตหาดใหญ่, สงขลา.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภพงศ์ ภูวพัฒนะพันธ์.2525.**การพัฒนาการผลิตหอยนางรมขนาดใหญ่**.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภชัย นิลวานิช. 2543. คัมภีร์ชาวบ้านเลี้ยงสัตว์ทะเล ปลา ปู หอย หมึก เพิ่มรายได้. **สำนักพิมพ์มติชน**, กรุงเทพฯ.

Abraham, E.G.,J. Nagaraju and R.K.,Datta. 1992. Biochemuical studies of amylase in the silkworm, *Bombyx mori* L.: comparative analysis in diapausing and nondiapausing trains. **Insect Biochem Mol. Biol.** 22(8): 867-873

Amparyup, P 1999. M.Sc. thesis. Bangkok Classification of oysters genera Crassostrea, Saccostrea and Striostrea in Thailandutilizing RAPD markers.**Thesis (M.Sc.) Chulalongkorn University**.145-175

Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty. 1944. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types; Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. ***J. Exp***.137 – 158.

Bahieldin, A., I. A. Ahmed, Gh. A. Gad El-Karim, H. F. Eissa, H. T. Mahfouz and O.M. Saleh. 2006. DGGE-RAPD analysis as a useful tool for cultivar identification. **African Journal of Biotechnology** 5 (8): 566-569.

Bakheet T. Bakheet, M. Frevel, B.R. Williams, W. Greer and K.S. Khabar,ARED.2001. human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. **Nucleic Acids Res**. **29**. 246–254.

Brito, R.,M.E. Chimal, G. Gaxiola and C.Rosas. 2000. Growth, metabolic rate, and digestive Enzyme activity in the white shrimp *Litopenaeus setiferus* early postlarve fed different Diets. **Exp Marine Biol Ecol.** 255 : 21-36

Bivalves. 1997. Protein and cDNA characterization; quantification of the expression in the digestive Gland/Mol. **Marine Biol.** Biotechnol. 6 (3), 228-237.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bompard-Gilles, C., P. Rousseau, P. RougeA and F. Payan. 1996. Substrate mimicry in the active center of a mammalian alpha-amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex.**Structure**. 4: 1441-1452.

Carl, W and S. Gabriela. 2003. **PCR Primer: Laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

Chamilani Nikapitiya, Chulhong Oh, Ilson Whang, Choong-Gon Kim, Youn-Ho Lee, Sang-Jin Kim, Jehee Lee. 2009. Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of alpha-amylase from the disk abalone, *Haliotis discus discus*.**Comparative Biochemistry and Physiology**.Part B 152, 271-281.

Chatterjee, S. N., C.G.P. Rao, G.K. Chatterjee and S.K. Aswata. 1992. Genetic variability of amylase activity in thw mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., and its significance. **Sericologia.** 31(4): 671-685

Colorado State University. 2009. **Alpha (1→4) bond starch, glycogen**. Available Source: http://www.vivo.colostate.edu, June 3, 2009.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** 19: 11-15.

Douglas, C.W and C. Mitchinson. 1997. Enzymes involved in the processing of Staarch to sugars.**Trend Biotechnol**. 15: 349-352.

Da Lage,Alain Van Wormhoudt,Marie-Louise Cariou. 2002. Diversity andevolution of the alpha-amylase gene in animals**. Biologia**.11: 181-189.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fernandez, A.V.G.,F.L.G.Carreno, M.A.N. del Toro and J.L. Fenucci. 2001. Digestive Proteinases of red shrimp *Pleoticusmuelleri* (Decapoda,Penaeidae) : partial characterization and relationship with molting. **Comp Biochem Physiol B.** 130 : 331-338

Huveta, A.,J.-Y. Daniela, C. Quéréa, S. Duboisa, M. Prudencea, A. Van Wormhoudtb, D. Selloosb, J.-F. Samina and J. Mola. 2003. Tissue expression of two α-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas.* Effects of two different food rations. **Aquaculture.** 228: 321-333

Jaccard, P. 1908. Nouvelles researche sur la distribution flore. **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.** 44:223-270.

Janecek, S. 1992. Sequence similarities in $(\alpha/\beta)_8$-barrel enzymes revealed by conserved regions of α – amylase. **FEBS.** 316: 23-26

Janecek, B. Svensson and B. Henrissat. 1997. Domain evolution in the α – amylase family. **J. Mol. Evol.** 45:322-331.

Janecek, New conserved aminoacid region of a-amylase in the third loop of their (b/a) 8 barrel domain. **Biochem** J.1069-1075.

Keller, P., DL. Kaufman, BJ. Allan and BL. Williams. 1971. Isoenzymes of human parotid alpha-amylase. **Biochemistry**. 10: 4867-4874.

Le Moullac, G. 1995. Adaptation des enzymes digestive à l'alimentation chez la crevette *Penaeus va,,amei* (Crustacea Decapoda). **EPHE**, 120 p.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Le Moullac, Sellos D, Moal J, Daniel JY, San Juan Serrano F,Samain JF, Van Wormhoudt A.1997.Amylase in Pecten maximus (Mollusca, bivalves):protein and cDNA characterization;quantification of the expression in the digestive gland.**Mol Mar Biotechnol.** 228-237.

Levy, J.N.,R.M.Gemmil and W.W.D oane.1995. Molecular cloning of alpha-amylase gene from *Drosophila melanogaster*.II. Clone organization and verification. **Genetics.** 110: 313 – 324.

Mamuris, Z., A.P. Apostolidis, A.J. Theodorou and C. Triantaphyllidis. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Biology** (132): 171-178.

Marianne,K.F.,E.Lilleeng,A. Sundby and Å. Krogdahl. 2006. Cloning and characterization of α–amylase. **Appl Microbiol Biotecnol.** 23: 353-360.

Nakamura Y, Ogama M, Nishida T, Emi M, Kosaki G, Himeno S, Matsubara K (1984) Sequence of cDNAs for human salivary and pancreatic a-amylases. **Gene** .263-270.

Nigam P. and D. Singh. 1995. Enzyme and microbial system involved in starch processing. **Enz Microbial Technol**. 17: 770-778.

Nikapitiya, C.,C. Oh, I. Whang, C . Kim, Y. Lee, S. Kim and J. Lee. 2009. Molecular Characterization, gene expression analysis and biochemical properties of α –amylase from the disk abalone, Haliotis discus. **Comp Biochem Physiol B.** 152: 271-281.

Ngernyuang, N. 2007. **Full-Length *Alpha-Amylase* cDNA of Local Silkworm,*Bombyx mori.*** M.S. Thesis, Kasetsart Universiy.

Peakall, R. and P. E. Smouse. 2006. GENELEX 6: genetic analysis in excel population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes.** 6: 288-295.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Promboon, A., A. Engkakul, L. Ngernsiri and P. Saksong. 1993. Amyalse of the polyvoltine Silkworm (*Bombyx mori)*: variation of activity in the Thai local race. **Sericologia.** 33(4) 603-609.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989 .Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. **Molecular Cloning**.243-256

S. Klinbunga, B. Khamnamtong, N. Puanglarp, P. Jarayabhand,W. Yoosukh, P. Menasveta1. 2005.National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).Molecular Taxonomy of Cupped Oysters (Crassostrea, Saccostrea,and Striostrea) in Thailand Based on COI, 16S, and 18S rDNA Polymorphism.**Marine Biotechnology** .306-317.

Sellos, D and A. Van Wormhoudt. 1992. Molecular clonig of a cDNA that encodes a Serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hapatopancrease of The shrimp *Penaeus vanamei*(Crustacea, Decapoda). **FEBS.** 309: 219-224

Strobl, S., F.-X. Gomis-RuE th, K. Maskos, G. Frank, R. Huber and R. Glockshuber. 1997. The alpha-amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. **FEBS**. 409: 109-114.

Tapan Kr. DUTTA, Malabendu JANA, Priti R. PAHARI, Tanmay BHATTACHARYA. 2006. The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodiaptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida).**Turk J Zool**. 187-195.

Van Wormhoudt, A., G. Bourreau and G. Le Moullac. 1995. Amylase polymorphism in crustacean, Metridia pacifica. **Gene**. 425: 28-35

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานทางด้าน Molecular cloning

อะกาโรสเจล อิเล็คโตรโฟรีซีส

1. 50X TAE Buffer (ต่อลิตร)

242	กรัม	ของ Tris-base
57.1	มิลลิลิตร	ของ Glacial acetic acid
100	มิลลิลิตร	ของ 0.5 M Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)(pH 8.00)

ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร หลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. เอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

250	ไมโครกรัม	ของเอธิเดียมโบรไมด์
500	ไมโครลิตร	ของน้ำ

เก็บให้พ้นจากแสงแดด

Transformation

1. IPTG 10 มิลลิลิตร

0.238	กรัม	ของ Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG)

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. X-gal 1 มิลลิลิตร

20	มิลลิกรัม	ของ 5-bromo-4-cholo-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)
1	มิลลิลิตร	ของ N,N-dimethyl-formamide

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Luria-Bertani (LB) Broth (ต่อลิตร)

25 กรัม ของ LB broth

จากนั้นทำการเติม H_2O ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 1 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. Luria-Bertani (LB) Agar (ต่อลิตร)

เตรียม LB Broth ปริมาตร 1 ลิตร

เติม 15 กรัม ของ Agar

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ในปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตรและปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3. LB Ampicillin Agar (ต่อลิตร)

เตรียม LB Agar ปริมาตร 1 ลิตร

นำไปฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และปล่อยให้อาหารเย็นลงที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม Ampicillin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) ในปริมาตรประมาณ 25 มิลลิลิตรและปล่อยให้แข็งตัว จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทำ Completent Cell

1. PEG 40% stock

0.4	กรัม	ของ PEG
1000	มิลลิลิตร	ของ dH_2O

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. 10N NaOH

400	กรัม	ของ NaOH
800	มิลลิลิตร	ของ dH_2O

3. 1M Mg_2Cl (1000 มิลลิลิตร)

203.3	กรัม	ของ Mg_2Cl
800	มิลลิลิตร	ของ dH_2O

ละลายสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปกรอง และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

4. TSS solution (100 มิลลิลิตร)

10	กรัม	ของ 10%PEG
5	มิลลิลิตร	ของ 5% Dimethyl sulfoxide
2	มิลลิลิตร	ของ 20 มิลลิโมล Mg_2Cl

เติม LB ให้ได้ 100 มิลลิลิตร และนำไปกรอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาววิมลศิริ สีหะวงษ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 25 เดือน เมษายน พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดศรีสะเกษ
ประวัติการศึกษา	วท.บ (เทคโนโลยีการผลิตพืช) สถาบันเทคโนยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (พ.ศ. 2551)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์