

องค์ประกอบของกรดไขมันและการแสดงออกของยีน methyl-end desaturases ในโคพีพอด *Apocyclops royi*

Fatty acid composition and gene expression of methyl-end desaturases in copepod *Apocyclops royi*

ศุภกานต์ สังข์แก้ว^a, วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี^{b,c}, ปิติ อ่ำพ่าย^{b,c}, จันทพรประภา อิ่มจงใจรัก^a

^aภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

^bศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

^cศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ

โคพีพอด *Apocyclops royi* จัดอยู่ในกลุ่มของครัสเตเชียนขนาดเล็ก มีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นอาหารมีชีวิตในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์กรดไขมันโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรสโกปี ค้นพบว่าทุกระยะของ *A. royi* ได้แก่ นอเพลียส โคพีพอดิต และตัวเต็มวัย ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. มี LC-PUFA ในปริมาณสูงรวมถึง DHA และ EPA นอกจากนี้ได้ค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน methyl-end desaturases ใหม่ 2 ยีน ได้แก่ ArO3D-1 และ ArO3D-2 จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตม เมื่อวิเคราะห์โปรตีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 พบว่ามีความเหมือนกับยีน O3D-1 และ O3D-2 ของโคพีพอด *Tigriopus californicus* เท่ากับ 72% และ 73% ตามลำดับ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ายีนมีการแสดงออกในทุกระยะพัฒนาการ และแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในระยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 ยีนอาจทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ของโคพีพอด *A. royi*

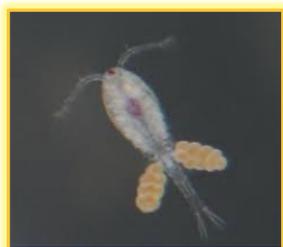
คำสำคัญ: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน, โคพีพอด, ดีแซตทูเรส

Copepod *Apocyclops royi* is a group of small crustaceans, which plays an important role as major live feed in the aquaculture industry. In this study, analysis of the fatty acid contents using gas chromatography/ mass spectroscopy analysis indicated that all copepod stages (nauplius, copepodid and adult stages) of a Thai culture of *A. royi* fed *Tetraselmis* sp. contained high levels of LC-PUFAs, including docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Moreover, two novel full-length cDNAs of methyl-end desaturases (ArO3D-1 and ArO3D-2) of *A. royi* were identified through transcriptome database. ArO3D-1 and ArO3D-2 proteins exhibited 72% and 73% similarity to O3D-1 and O3D-2 of the copepod *Tigriopus californicus*, respectively. Gene expression analysis showed that ArO3D-1 and ArO3D-2 were universally expressed in all different stages and also upregulated in the adult stages, suggesting the possible function of these genes in LC-PUFA biosynthesis pathway of copepod *A. royi*.

Keywords: Copepod, Desaturase, Polyunsaturated fatty acids (PUFA)

คำนำ

การอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนเป็นปัญหาของชาวที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตของอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย เนื่องจากอาหารอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนมีกรดไขมันโอเมกา-3 ที่ต่ำมาก ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตต่ำ



โคพีพอด *Apocyclops royi* มีขนาดตัวเล็กเหมาะสมกับขนาดของปากสัตว์น้ำวัยอ่อน มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สามารถผลิตกรดไขมัน PUFA โดยเฉพาะ DHA และ EPA ได้ ประกอบด้วย 3 ระยะคือ นอเพลียส (NP) โคพีพอดิต (CD) และตัวเต็มวัย (AD) โคพีพอด *A. royi* มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นอาหารมีชีวิตสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน (พงศธร, 2558)

จากการศึกษาค้นพบยีนในกลุ่ม fatty acid elongase (ELO) และ fatty acid desaturase (FAD) ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 (Nielsen et al., 2019) โดยโคพีพอดจะใช้เอนไซม์ FAD ในการสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นในกลุ่ม PUFA

งานวิจัยนี้ได้ศึกษายีนที่ประกอบของกรดไขมัน และการแสดงออกของยีน methyl-end desaturases (ArO3D-1 และ ArO3D-2) ซึ่งเป็นยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด โดยการแสดงออกในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอดจะช่วยบ่งบอกแนวทางการทำงานของเอนไซม์ FAD ที่มีความสำคัญในแต่ละระยะ ซึ่งจะช่วยให้สามารถเข้าใจความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันของโคพีพอดต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

Table 1 Fatty acid analysis in the three developmental stages of the cyclopoid copepod *A. royi* fed with *Tetraselmis* sp.

Fatty acids	Copepod <i>Apocyclops royi</i>		
	NP	CD	AD
ΣSC_PUFA	17.23±6.76	28.16±2.04	31.49±3.62
ΣLC_PUFA	5.27±0.20 ^a	9.43±0.35 ^b	10.51±1.01 ^b
Σn-3 PUFA	15.58±5.84	25.25±0.59	26.64±2.31
Σn-6 PUFA	6.92±0.72 ^a	12.34±2.98 ^{ab}	15.36±0.30 ^b
ΣPUFA	22.50±6.56 ^a	37.59±2.39 ^b	42.00±2.61 ^b

*Mean±SD with different superscript letter are significantly different ($P<0.05$). nauplius; NP, copepodid; CD, adult; AD. n.d. = Not detected.

อุปกรณ์และวิธีการ



การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi*

พบ PUFA ในโคพีพอด *A. royi* ทุกระยะ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในโคพีพอด *A. dengizicus* ที่เลี้ยงด้วย *Tetraselmis tetrahele* พบว่ามี PUFA 37.56% (Farhadian et al., 2009) โดยทั้งสามระยะพบ LC-PUFA ในปริมาณที่สูง พบกรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอดทั้ง 3 ระยะ โดยพบ DHA ใน AD มากที่สุด (4.85%) รองลงมาคือ CD (4.23%) และ NP (2.78%) และพบกรดไขมันโอเมกา-6 ในโคพีพอดทั้ง 3 ระยะ โดยพบ ARA ใน CD (1.11%) และ AD (1.31%) แต่ไม่พบใน NP แสดงดัง Table 1

การศึกษายีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 ของโคพีพอด *A. royi*

ยีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 มี Open reading frame (ORF) ขนาด 1,149 และ 1,233 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 382 และ 410 กรดอะมิโน ตามลำดับ และพบว่า ArO3D-1 และ ArO3D-2 มี FAD domain 1 โดเมน แสดงใน Fig. 1 และพบว่ายีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 เหมือนกับยีน methyl-end desaturase-1 (O3D-1) และ methyl-end desaturase-2 (O3D-2) ของโคพีพอด *Tigriopus californicus* 72% และ 73% ตามลำดับ

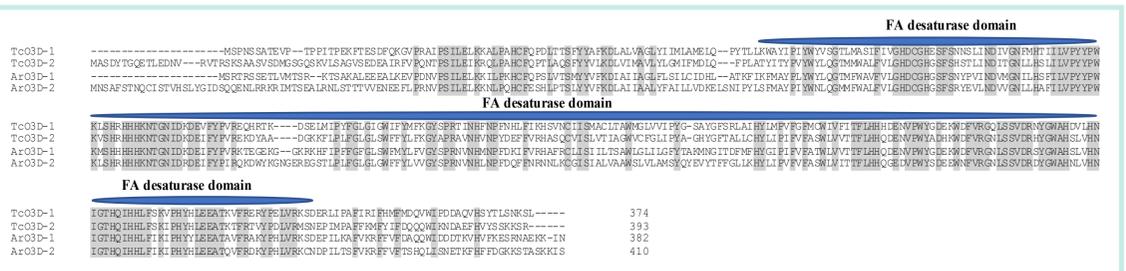


Fig. 1 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of methyl-end desaturases (ArO3D-1 and ArO3D-2) of copepod *A. royi* with TcO3D-1 and TcO3D-2 of copepod *T. californicus*.

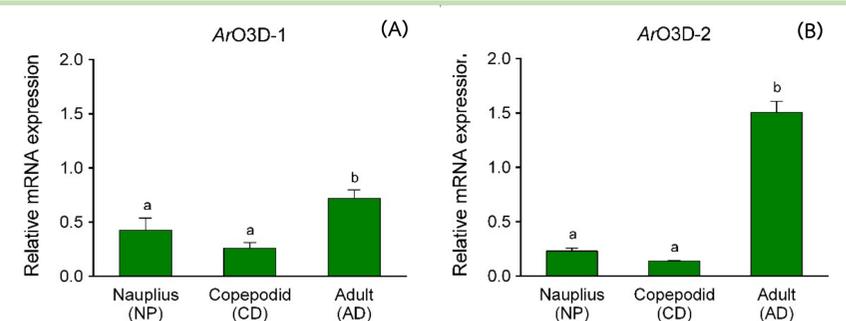


Fig. 2 Gene expression analysis of ArO3D-1(A) and ArO3D-2(B) mRNA in various developmental stages of copepod *A. royi*. Data represents the mean±SD with different letters are significantly different ($P<0.05$).

สรุป

โคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ NP, CD และ AD มี LC-PUFA อยู่ในปริมาณที่สูง 5.27%, 9.43% และ 10.51% ตามลำดับ และค้นพบยีนใหม่ 2 ยีน คือ ArO3D-1 และ ArO3D-2 ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในระยะ AD แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 ยีน อาจทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ของโคพีพอด *A. royi*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (P2050332), สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (สัญญาเลขที่ วช.อ.ว.(อ) (กลส)/49/2564) และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สัญญาเลขที่ RCU_F_64_004_23)

เอกสารอ้างอิง

พงศธร จันทรรัตน์. 2558. การเพาะเลี้ยงโคพีพอดเพื่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในโรงเพาะฟัก. วารสารเกษตร 32: 225-239.
Kabeya, N., Ogino, M., Ushio, H., Haga, Y., Satoh, S., Navarro, J.C., Monroig, Ó. 2021. A complete enzymatic capacity for biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22 : 6n-3) exists in the marine Harpacticoida copepod *Tigriopus californicus*. Open Biol. 11, 200402.
Lenz, P.H., Roncalli, V., Hassett, R.P., Wu, L.S., Cieslak, M.C., Hartline, D.K., Christie, A.E. 2014. De novo assembly of a Transcriptome for *Calanus finmarchicus* (Crustacea, Copepoda) – the dominant zooplankton of the North Atlantic Ocean. PLoS One 9, e88589.
Nielsen, B.L.H., Götterup, L., Jørgensen, T.S., Hansen, B.W., Hansen, L.H., Mortensen, J., Jepsen, P.M. 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. Biol. Open. 8, bio038331.

ติดต่อเพิ่มเติม

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

chanprapa.i@chula.ac.th