<u>รายงานการไปศึกษาฝึกอบรม ณ ต่างประเทศ</u>

<u>ส่วนที่ 1</u> ข้อมูลทั่วไป

1.1 ชื่อ/นามสกุลดร.อรรชนีย์ บุญประกอบ อายุ 47ปี

ตำแหน่งอาจารย์พนักงาน

ระดับการศึกษาสูงสุดปริญญาเอก

1.2 ที่ทำงานภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยรามคาแหง

โทร. 086-9007066

1.3 ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) “ไดอะตอมพิษ และกรดอะมิโน นิวยูโรท็อกซินกรดโดโมอิก(DA)

ชื่อเรื่อง(ภาษาอังกฤษ) “Toxic diatom and amino acid neurotoxin domoic acid (DA)”

สาขาหลักชีววิทยา(Biology)

สาขาย่อยวิทยาศาสตร์ทางทะเล(Marine Science)

สาขาที่เกี่ยวข้องอณูชีววิทยา (Molecular Biology)

เพื่อ ☐ ประชุมเสนอบทความ ☐ ศึกษา ☑ ฝึกอบรมและดูงาน

แหล่งให้ทุนมหาวิทยาลัยรามคาแหง**ประเทศที่ไป**ราชอาณาจักรเดนมาร์ก

ระหว่างวันที่ 1กันยายน 2559 ถึง วันที่ 15 ตุลาคม 2559

ภายใต้โครงการ Diatom (Bacillariophyceae) species and domoic acid

ของหน่วยงาน Natural History Museum, University of Copenhagen, Denmark

<u>ส่วนที่ 2</u> สรุปย่อของหลักสูตร

เรียนรู้ด้านชีววิทยาและอนุกรมวิธานขอสาหร่ายขนาดเล็กที่มีพิษโดยเน้นกลุ่มไดอะตอมที่สร้างสารพิษกรดโดโมอิก (domoic acid: DA) รวมถึงการเตรียมอาหาร การคัดแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ตัวอย่างที่เก็บจากชายฝั่งประเทศไทย ซึ่งใช้อาหารเลี้ยง L1-medium ความเค็ม 31 ppt เลี้ยงที่อุณหภูมิ 22-26 องศาเซลเซียส รวบรวมเซลล์ที่เลี้ยงได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอม (diatom) ในสกุล *Pseudo-nitzschia* ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (phylogeny analysis: ribosomal DNA (ITS and LSU) + rbcL) ควบคู่กับการศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทั้งแบบใช้แสงธรรมดา (Light Microscope: LM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่งผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตอนแบบลำแสงส่งกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) เพื่อดูรายละเอียดโครงสร้างบนผนังเซลล์

<u>ส่วนที่ 3</u> ข้อมูลที่ได้รับจากการไปฝึกอบรม

3.1 วัตถุประสงค์

- เพื่อพัฒนาความรู้ในการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอมพิษด้วยดีเอ็นเอซึ่งยังขาดผู้เชี่ยวชาญในประเทศ รวมทั้งเป็นการแลกเปลี่ยนความรู้และเทคนิคต่าง ๆ กับอาจารย์ผู้มีความเชี่ยวชาญด้านไดอะตอมพิษ รวมทั้งสร้างความสัมพันธ์อันดีเพื่อความร่วมมือในการทำวิจัยร่วมกันในอนาคต อีกด้วย

- เพื่อเพิ่มพูนประสบการณ์การทำงานวิจัย ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำความรู้ที่ได้มาช่วยพัฒนาด้านการเรียนการสอนและการทำงานวิจัยเพื่อพัฒนาประเทศ

3.2 รายละเอียดเกี่ยวกับการไปฝึกอบรม

3.2.1 <u>แผนการฝึกอบรม</u>

"Toxic diatom and amino acid neurotoxin domoic acid (DA)"

- <u>1-4 September 2016:</u> Learn more about biology and taxonomy of toxic microalgae and harmful diatom species
- <u>5-9 September 2016:</u> Medium preparation, single cell isolations for establishing cultures of type species of diatoms from Thailand, maintained in L1-medium at a salinity of 31 ppt and a temperature of 22-26°C
- <u>10-11 September 2016:</u> Harvesting and concentrating cellular material from the cultures, to a frozen and stored for DNA analyses. This is to be continued during the following weeks
- <u>12-16 September 2016:</u> HPLC and LC/MS methods are applied for determination of the different toxin groups
- <u>17-18 September 2016:</u> Harvesting and concentrating cellular material from the cultures, to a frozen
- <u>19-23 September 2016:</u> Learn more about toxic species diversity and discussion about toxic diatom of Thai Sea, harvesting and concentrating cellular material from the cultures, to a frozen
- <u>24-30 September 2016, 1-2 October 2016</u>:
    - DNA extraction
    - PCR amplification
    - Cleaning DNA and measurement
    - Sequencing of PCR products
- <u>3-5 October 2016:</u> Learn more about domoic acid, mechanical damage due to cell morphology, a high biomass accumulation, the chemistry and chemical

methods for quantitative and qualitative determination of domoic acid, immunological method for detection

- 6-9 October 2016: Oceanic distribution of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid concentration, present in truly oceanic and coastal waters, the environmental factors that promote toxic blooms of *Pseudo-nitzschia*
- 10-14 October 2016: The methods for study domoic acid concentration in cell and water
- 15 October 2016: Discussion of data and other results for plans for the future

PCR Clean-up

1. 200 P pipette and tip
2. 96 chamber PCR- plate and paper sheet
3. 1x TE and double distill water
4. Vacuum and shaker and
5. PCR-product

Started: added all PCR-products in some tube (0.2 ml micro-tube)

Method

1. Write the name code of PCR-product on paper sheet, be careful! to do.
2. Take out a plastic on the chamber (with cutter) be equal to number of PCR-products.

3. Add 50 μl of 1xTE on each tube of PCR-product mix before put in near the bottom of each chamber (keep PCR-product) that correct the same name of PCR-product on paper sheet.

4. After finished all vacuum PCR-plate 15 minute check chambers try check--put PCR-hold up and see)

of PCR-products tubes go on use -45 of pressure about 10-it if have water in the again ~ 2-5 minute. (easy plate on tissue paper and

5. After absoluted dry add 50 μl of vand (water) in the chambers (not mix) and vibrate about 5 minute

6. Finished and keep cleaned PCR-products in 1.5 μl micro-tube that have name of PCR-products.
7. Measure DNA and prepare in 1.5 ml micro-tube and dye at room temperature for sent or add distill water to 20 μl.

<u>Measure DNA</u>

- Pipette 10P and 100P and Tip
- Measure's box and Eppendoaf biophotometer
- Distill water

ตั้งค่าเครื่องกดที่ dilution และตั้ง dilute เป็น 5+50 μl by <u>Enter each</u>

If not show detail select dsDNA

1. Blank with **50 μl** vand = 0.000 A and add **5 μl DNA** mixed with 200 μl and measure (set **machine 55 μl)** please take care**--0.000 A3204 < 0.100 A3204**
2. Clean box with vand and blank = 0.000 A again
3. Measure, clean box and blank, do the same way for all PCR-cleaned-product

A230 =
A260 =
A280 =
A320 =

<u>Sent to Macrogene</u>

1. Prepare DNA:

Use 500 ng/μl dsDNA of PCR-cleaned-product put in 1.5 tube and <u>dry in room temperature</u> if not dry put in 65 degree oven. (sent without parafilm)

80 ng/μl dsDNA use = 6.25μl
70 ng/μl dsDNA use = 7.1 μl
60 ng/μl dsDNA use = 8.33 μl
50 ng/μl dsDNA use = 10 μl

Another way can prepare PCR-cleaned-product **20 µl with vand** if not more time. (sent with parafilm)

2. Prepare Primer:

   Primer prepare 5 pM 20 µl that mean use 10 pm Primer + 10 µl vand and dry in room temperature

DNA analysis

Program CLC Main Workbench 5 (Vision 5.6.1 copyright 2009 CLC)

Make contigs; Start: Click Program CLC

1. **Make a new folder**: file > new> folder > write group and make subfolder in group > write name
2. **Import data** : looking for the result (data base) from Macrogene select all same sample and all difference primer in same group (LSU, SSU or ITS)
3. **Assemble sequence:** click Sequencing data analyses **>** Assemble sequence

Navigation area	⇨ ⇦	Selected elements

Next

Set assembly parameters

Trimming

√ Trim sequence ends before assembly

Minimum aligned read length 50

Alignment stringency **medium**

Conflicts

○

○

● Ambiguity nucleotides (R, V, etc.)

Out put options

√ Crete full contigs, including trace data

Next

Sequence trimming

Set trim parameters

Trimming

√ Ignore existing trim information

√ Trim using quality scores

limit: 0.05

√ Trim using ambiguous nucleotides

Residues: 2

Result handing

● Open

Finish

<u>Result</u>

- **มี Contig 1** เช็ค conflict และ save รวมกับ primer นั้น ๆ ตั้งชื่อตามชนิด
- **ไม่มี contig** แสดงว่า sequence ไม่ดีทั้งหมดจากทุก primer หรือ program อาจทำผิด ให้เรา trim ทีละ sequence ก่อนแล้วค่อยทำ assemble ทีหลังสำหรับ sequence ที่ไม่ดีมาก ๆ ก็ให้ลบทิ้งไปเลยแต่ถ้าบางส่วนดีก็ให้เก็บไว้เปรียบเทียบก่อน

Sequencing data analyses > **trim sequence** > set

Navigation area | Selected elements

Next

Set trim parameters

Trimming

☑ Ignore existing trim information

.... ☑ Trim using quality scores

limit: 0.05

☑ Trim using ambiguous nucleotides

Residues: 2

Next

Result handing

◉ Open

Finish

Result: sequence finished trim, check conflict by yourself because it have only one sequence

(not have sequence to compare)

Finished > save please have.... **ONEWAY** for make sure!

- เขียน base ไว้ดูด้วยเพื่อเปรียบเทียบว่ากลับด้านแล้วจริง ๆ เช่น ATGCC = TACGG
- ถ้าไม่แน่ใจเปรียบเทียบกับ sequence จาก GenBank ก็ได้เพราะจะเป็น correct way

Conflict

Program จะแก้ไขให้และแสดงคำว่า “conflict” บอกกรณีที่ base ไม่ตรงกันโดย program จะเลือก code ให้ซึ่งนั่นคือปัญหาให้เราดู peak เองและเปลี่ยนตามความเหมาะสมโดยเลือกใช้ ACGT ก่อนถ้าเชื่อไม่ได้ค่อยใช้ code ตามที่ program เลือกให้ และกรณีที่มีแค่ sequence เดียวไม่มีอีก sequence ให้เปรียบเทียบเราต้องตรวจดูเอง

1. Peak มี base > 1 base (มีสีมากกว่าหนึ่งสี) ให้เปลี่ยน base ดังนี้

Meaning	IUPC-IUB/GCG Code	Complement
A	**A**	T
C	**C**	G
G	**G**	C
T	**T/U**	A
A or C	**M**	K
A or G	**R**	Y
A or T	**W**	W
C or G	**S**	S
C or T	**Y**	R
G or T	**K**	M
A or C or G	**V**	B
A or C or T	**H**	D
A or G or T	**D**	H
C or G or T	**B**	V

G or A or T or C	**X/N**	X
Not G or A or T or C		

2. **Insert base:** กรณีที่มี peak มากกว่าจำนวน base แต่ถ้ามี 2 sequence ควรเลือกเชื่อ peak ที่ชัดเจน นั้นหมายความว่าควรเพิ่มกรณีที่มีแค่ sequence เดียวเท่านั้น
3.

Select base > click ขวา > edit selection > ok > พิมพ์เพิ่มเข้าไป > replace

4. **ใช้อักษรตัวเล็ก acgt** แทน ACGT กรณีที่ peak ไม่ชัดเจนหรือกว้างออกในระดับเดียวกันหรือใกล้เคลียงกัน
5. ลบ sequence ช่วงต้น ๆ และท้าย ๆ ทิ้งถ้าไม่ดี คือมีหลายสีซ้อนกันมากมายใน peak เดียวกัน, ไม่มี peak เรียบ ๆ และอื่น ๆ ** ก่อนลบสังเกตก่อนด้วยว่าลูกศรไปได้ไหนจะได้รู้ว่า wrong way หรือเปล่าเพราะถ้าลบแล้วเราจะไม่รู้

3.2.2 <u>ประโยชน์ที่ได้รับ</u>

1. ได้รับความรู้เรื่องสาหร่ายพิษกลุ่มต่าง ๆ ในทะเลโดยเฉพาะกลุ่มไดอะตอมสกุล *Pseudo-nitzschia* ซึ่งมีพิษรุนแรงถึงชีวิตได้ โดยได้เรียนรู้เทคนิคในการเพาะเลี้ยงและการตรวจสอบความเป็นพิษ
2. ได้เรียนรู้เพิ่มเติมถึงเทคนิคการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอมสกุล *Pseudo-nitzschia* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ซึ่ง การเรียนรู้ถึงเทคนิคการจำแนกชนิดทำให้ง่ายต่อความเข้าใจถึงข้อแตกต่างที่ควรสังเกตในแต่ละชนิด ทำให้ง่ายและแม่นยำมากยิ่งขึ้น
3. ได้เรียนรู้เพิ่มเติมถึงเทคนิคการวิเคราะห์ชนิดไดอะตอมโดยใช้เทคนิคสกัดดีเอ็นเอจาก *Pseudo-nitzschia* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง
4. ได้มีการแลกเปลี่ยนความรู้ความเข้าใจในการทำงานวิจัย รวมทั้งมีโอกาศสร้างเครือข่ายการทำวิจัยในต่างชาติอย่างต่อเนื่อง และทำให้ทราบเครือข่ายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการทำวิจัยทั้งในปัจจุบันและในอนาคต
5. มีการแลกเปลี่ยนความรู้ความเข้าใจขนบธรรมเนียมประเพณีต่าง ๆ ของประเทศไทยและประเทศเดนมาร์ก มีการสร้างสัมพันธไมตรีอันดีต่อกันระหว่างเพื่อนร่วมงานและเพื่อน ๆ ชาวต่างชาติอื่น ๆ ซึ่งมีคุณค่ายิ่ง คือ ทำให้ได้รับประสบการณ์ต่าง ๆ มากมายซึ่งสามารถนำมาปรับใช้เพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตได้ทั้งทางสายงานวิชาการและการดำเนินชีวิต

6. นำความรู้ที่ได้มาพัฒนาการเรียนการสอนให้ดียิ่ง ๆ ขึ้น โดยมุ่งพัฒนานักศึกษาเป็นสำคัญในหลาย ๆ ด้าน

3.2.3 การนำมาประยุกต์ใช้กับงานที่ปฏิบัติ

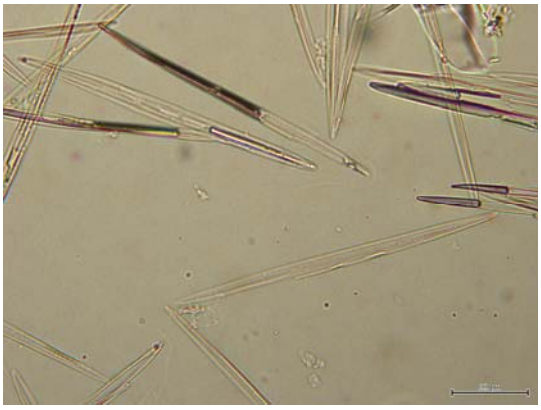
- สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนในกระบวนวิชา BID4803: แพลงก์ตอนวิทยา (Planktonology) และกระบวนวิชาBID4902: ปัญหาพิเศษด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Special Problem in Biodiversity) ในเรื่องการศึกษาสาหร่ายขนาดเล็กในกลุ่มที่สร้างสารพิษ การทำให้เกิดปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี (red tide) ซึ่งสามารถทำให้เกิดพิษต่อแหล่งน้ำ การสะสมสารพิษในสัตว์น้ำซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อมนุษย์ได้ รวมทั้งมีผลกระทบต่อเศษฐกิจของประเทศ

- สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการทำงานวิจัย เนื่องจากได้แลกเปลี่ยนทัศนคติ และเรียนรู้องค์ความรู้ใหม่ ๆ ที่ทันสมัย ทำให้จุดประกายความคิดในการวางแผนในการทำงานวิจัยที่ดีในอนาคตที่เป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติต่อไปได้เป็นอย่างดี

- สามารถมีผลงานวิจัยและตีพิมพ์ในระดับนานาชาติได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นผลจากความสัมพันธ์อันดีต่อกันที่เกิดจากการทำงานวิจัยร่วมกันมาอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งเป็นการเปิดโอกาสในการสร้างเครือข่ายในการทำวิจัยร่วมกันจากทั่วโลกในสาขาเดียวกันอีกด้วย

3.2.3 ภาพประกอบ

- ภาพประกอบการอบรม

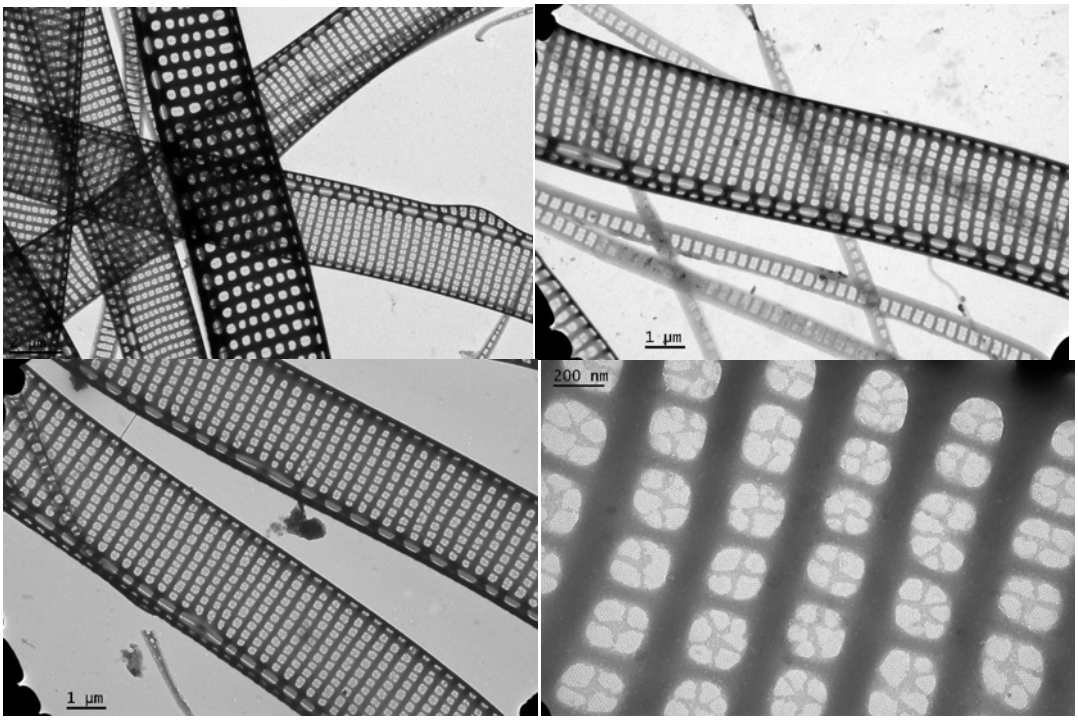


Pseudo-nitzschia caciantha Lundholm, Moestrup & Hasle

Pseudo-nitzschia caciantha Lundholm, Moestrup & Hasle

ตัวอย่างจากธรรมชาติ จังหวัดภูเก็ต ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา

(LM: Light Microscope, Zeiss AxioCam HRc, Zeiss, Oberkochen, Germany)



Pseudo-nitzschia caciantha Lundholm, Moestrup & Hasle

ตัวอย่างธรรมชาติ จังหวัดภูเก็ต ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

(TEM: Transmission Electron Microscope, JEOL-1010, Tokyo, Japan)

<u>ส่วนที่ 4</u> ข้อคิดเห็นและเสนอแนะ

จากการที่ได้ไปอบรมในครั้งนี้ได้นำตัวอย่างสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็กจากเมืองไทยไปศึกษาชนิดที่สามารถสร้างสารพิษได้ โดยเก็บตัวอย่างบริเวณชายฝั่งจังหวัดภูเก็ต ในพื้นที่ที่มีการทำกิจกรรมที่หลากหลาย และจากผลการศึกษาเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งโดยได้ตรวจพบไดอะตอม *Pseudo-nitzschia caciantha* Lundholm, Moestrup & Hasle จำนวนมากและเป็นชนิดเด่นเพียงชนิดเดียวในบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งไดอะตอมชนิดนี้สามารถผลิตสารพิษ domoic acid (DA) ซึ่งพิษชนิดนี้สามารถสะสมในสัตว์ทะเลที่เป็นอาหารของมนุษย์และส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาทของมนุษย์และสามารถเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็วได้ซึ่งพบพิษนี้แพร่กระจายในน่านน้ำยุโรป ในปี ค.ศ. 2006 มีรายงานพบพิษชนิดนี้สะสมในหอยนางรมหนาม (thorny oyster, *Spondylus versicolo*r Schreibers) ที่ประเทศเวียดนาม (Viet Ha et al, 2014) ซึ่งเป็น

สารจากไดอะตอม *Pseudo-nitzschia* cf. *caciantha* ซึ่งเป็นชนิดใกล้เคลียงกับชนิดที่พบที่จังหวัดภูเก็ต การศึกษาสาหร่ายพิษในบ้านเรายังมีการศึกษาอยู่น้อยมาก ดังนั้น หากทางมหาวิทยาลัยรามคำแหงสนับสนุนการศึกษาในเรื่องนี้ก็จะเป็นโอกาสที่ดีของการเริ่มต้นทำวิจัยสาหร่ายพิษอย่างจริงจัง รวมทั้งเป็นการสร้างฐานข้อมูลเพื่อเฝ้าระวังพิบัติภัยจากพิษชนิดนี้บริเวณชายฝั่งน่านน้ำของประเทศไทยด้วย

.....

(อาจารย์ ดร.อรรชนีย์ บุญประกอบ)

ผู้รายงาน

<u>ส่วนที่ 5</u> ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชาของเจ้าสังกัดและโครงการที่ดาเนินงานต่อไป (ยกเว้นผู้รายงานเป็นข้าราชการตั้งแต่ระดับอธิบดีหรือเทียบเท่าขึ้นไป)

5.1 ความเห็นของหัวหน้าภาควิชา

.....
.....
.....
.....

.....

(อาจารย์ ดร.มาฆมาส สุทธาชีพ)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา

5.2 ความเห็นของคณบดี

.....
.....
.....
.....

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปัญญา ศิริโรจน์)

รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์