สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำในประเทศไทย โดยใช้ RFLP

RFLP analysis of genetic diversity of seahorse (*Hippocampus spp.*) in Thailand

นางชูตา บุญภักดี

26 มี.ค. 2552
249239

เริ่มบริการ
31 มี.ค. 2552

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2540 และ 2541

ประกาศคุณูปการ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยการได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ หลายหน่วยงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา และได้รับการสนับสนุนและช่วยเหลือด้านสถานที่และอุปกรณ์เป็นอย่างดีจากภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวาริชศาสตร์ และโครงการจัดตั้งบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ประกอบการวิจัยครั้งนี้ และงานวิจัยนี้สมบูรณ์ได้ด้วยคุณ Marie-Annick Moreau แห่งมหาวิทยาลัย McGill ที่ยืนยันการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำ ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ชูตา บุญภักดี

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำที่พบในประเทศไทย ทำการศึกษาในม้าน้ำ 3 ชนิดคือ *Hippocampus spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* โดยเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากเลือดของม้าน้ำด้วยวิธีการเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (10 mM Tris-HCl, pH7.5; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% SDS; Urea 4 M) สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ลักษณะของดีเอ็นเอมีความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส เมื่อวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำในบริเวณยีน 18S rRNA พบว่า *H. spinosissimus* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 1 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอเข้ม 1 แถบ และจาง 3 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และต่ำกว่า 500 คู่เบส ตามลำดับ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ทำโดยวิเคราะห์ชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตั้งแต่บริเวณยีน cytochrome b จนถึง 12S rRNA ของม้าน้ำจาก จ. ชลบุรี, จ. ระยอง และ จ. ตราด โดยย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I เมื่อใช้ *Taq*I พบความแตกต่างทางพันธุกรรมในม้าน้ำจาก จ. ระยอง ซึ่งเกิดขึ้นภายในแหล่งเดียวกันและต่างจากแหล่งอื่นด้วย ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. kuda* ทำการศึกษาม้าน้ำจาก จ.ชลบุรี และ จ. ตราด โดยวิเคราะห์ในบริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและทดสอบเช่นเดียวกับม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda*

ABSTRACT

Three species of seahorse, *Hippocampus spinosissimus*, *H. kuda* and *H. trimaculatus* were studied on their genetic diversity. Total DNA was prepared from whole blood preserved in TNES-Urea buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% SDS; Urea 4 M). DNA yield was about 2-5 μg DNA/μl blood with high molecular weight and more than 23.1 kb. in length. The specific DNA pattern of each species was performed on PCR amplified DNA fragment of 18S rRNA gene. The results showed that *H. spinosissimus* has two intent bands approximately 900 and 650 bp. *H. kuda* has only one intent band approximately 900 bp. and *H. trimaculatus* has one intent band and three light bands approximately 900 and less than 500 bp., respectively. Genetic diversity within species of *H. spinosissimus* from Chonburi, Rayong, and Trad was investigated in PCR amplified mtDNA fragment from cytochrome b gene to 12S rRNA. After digestion those DNA fragments with *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I and *Taq*I, DNA pattern of Rayong samples digested with *Taq*I was not only distinct from other samples but also differed from those in the same locality. While genetic diversity within species of *H. kuda* from Chonburi and Trad investigated on ATPase gene of PCR amplified mtDNA fragment. After digestion those DNA fragments with *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I and *Taq*I, different DNA pattern of all samples was not found. This result indicated that genetic variation within species of *H. kuda* could not be detected.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง

สารบัญ..... จ

สารบัญตาราง..... ฉ

สารบัญภาพ..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์..... 16

วิธีดำเนินการศึกษา..... 18

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 24

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 33

เอกสารอ้างอิง..... 39

ภาคผนวก..... 43

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กัน..... 8
3.1 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR..... 21
4.1 ขนาดของผลิตผล PCR ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 25

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 แผนภาพไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหนู..... 7
3.1. ม้าน้ำตัวเต็มวัย..... 19
4.1 รูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของม้าน้ำ 27
4.2 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน 18S rRNA ของม้าน้ำ..... 27
4.3 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของ
ม้าน้ำ *H. spinosissimus*..... 28
4.4 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย
เรสทริกชันเอนไซม์..... 28
4.5 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *EcoR*I..... 29
4.6 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hae*III..... 29
4.7 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hha*I..... 30
4.8 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Msp*I..... 30
4.9 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Taq*I..... 31
4.10 ผลิตผล PCR ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณยีน ATPase
ของม้าน้ำ *H. kuda* 31
4.11 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์.. 32
4.12 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วย *Hae*III..... 32

บทที่ 1

บทนำ

จากสถานการณ์ปัจจุบันที่ทุกประเทศกำลังประสบปัญหากับสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลงทุกปี ทั้งจากธรรมชาติและจากการกระทำของมนุษย์โดยตรง ทำให้เกิดการสูญเสียทางความหลากหลายชีวภาพ (biodiversity) อย่างมากมาย นักชีววิทยาประมาณว่าสิ่งมีชีวิตที่ปรากฏในโลกนี้มีการสูญพันธุ์ไปแล้วกว่าร้อยละ 98 หรือประมาณว่าสูญหายไป 1 ชนิดทุก ๆ 1 ชั่วโมง (Quicke, 1993) ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญก็เนื่องมาจากมนุษย์มีการใช้ประโยชน์จากสิ่งมีชีวิตจนเกินกำลังการผลิตของธรรมชาติ จึงนำไปสู่การสูญพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งหลายเหล่านั้น

ประเทศไทยนับว่าเป็นแหล่งของความหลากหลายทางชีวภาพที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลกโดยเฉพาะทรัพยากรธรรมชาติทางทะเล แต่ผลจากการขยายตัวของชุมชนรวมทั้งกิจกรรมต่าง ๆ ทางการประมง การบุกรุกป่าชายเลน การปล่อยน้ำเสียจากอาคารบ้านเรือน โรงแรม หรือโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ลงสู่ทะเล เหล่านี้ทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณภาพน้ำและระบบนิเวศชายฝั่งที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำหลายชนิดรวมถึงสัตว์น้ำวัยอ่อนที่เป็นอาหารของสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ จนมีแนวโน้มทำให้ประชากรของสัตว์น้ำลดจำนวนลงเป็นลำดับ และจากผลดังกล่าวทำให้สัตว์น้ำหลายชนิดที่อดีตถูกจัดอยู่ในกลุ่มไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้กลายเป็นสัตว์ที่มีราคา เช่น ปลากระตัก แมงกระพรุน ปลิงทะเล รวมทั้งม้าน้ำ เป็นต้น โดยเฉพาะม้าน้ำซึ่งพบแพร่กระจายทั่วไปในบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกแถบจังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด จากผลการสำรวจในปัจจุบันพบว่ามีการประกอบอาชีพประมงม้าน้ำโดยตรงแต่ปริมาณม้าน้ำที่จับได้มีปริมาณลดลงเป็นลำดับทุกปี ม้าน้ำที่จับได้เหล่านี้จะถูกนำไปตากแห้งเพื่อการค้าโดยจะถูกนำไปใช้ในการบริโภคตามความเชื่อทางตำราจีนว่า ตัวม้าน้ำมีสรรพคุณทางยารักษาโรคได้หลายประการ เช่น บำรุงกำลัง รักษาอาการท้องอืด แผลเน่า แผลเปื่อย หรือใช้ปลูกผม เป็นต้น (สุรพล ฉลาดคิด และ ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน, 2536 อ้างจาก สโมสรนิสิตคณะประมง, 2535) อีกทั้งความนิยมที่นำมาเลี้ยงเพื่อความเพลิดเพลินสวยงาม หรือนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมการประดิษฐ์ เป็นต้น แต่เหตุที่การเพาะเลี้ยงม้าน้ำยังไม่ประสบความสำเร็จ จึงทำให้ต้องมีการจับม้าน้ำจากทะเลมาใช้ประโยชน์โดยตรง และมีความต้องการเป็นปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี จนม้าน้ำเจริญเติบโตไม่ทัน จึงคาดว่าม้าน้ำเป็นสัตว์อยู่ในข่ายจะสูญพันธุ์ในที่สุด (ทวี หอมชง, 2534)

การศึกษาม้าน้ำในประเทศไทยขณะนี้ยังมีข้อมูลน้อยมากทั้งที่เกี่ยวกับจำนวนและชนิดของสายพันธุ์ม้าน้ำ แหล่งอาศัย การแพร่กระจาย ลักษณะการดำรงชีวิต หรือพฤติกรรม เป็นต้น ดังนั้นเพื่อเป็นการรวบรวมข้อมูลสำหรับใช้ในการจัดการทรัพยากรของประเทศในอนาคต จึงควรมีการศึกษาในรายละเอียดต่างๆ รวบรวมเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้มากขึ้น ในหลายๆประเทศได้พยายามค้นคว้าวิจัยรวมถึงมีการส่งเสริมด้านการเพาะเลี้ยงม้าน้ำขึ้นเพื่อเพิ่มผลผลิตนอกเหนือจากการที่จะได้ม้าน้ำมาจากการทำประมงในธรรมชาติเพียงอย่างเดียว ดังเช่นในประเทศเวียดนามและฟิลิปปินส์จัดตั้งโครงการเลี้ยง อนุรักษ์ และผสมพันธุ์ม้าน้ำขึ้นแล้ว

(Lourie *et.al.*, 1999) แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานชีววิทยาต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านอนุกรมวิธาน พฤติกรรม นิเวศวิทยา และพันธุศาสตร์ประชากร เป็นต้น

งานอนุกรมวิธานการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ส่วนใหญ่นิยมศึกษาจากทางลักษณะสันฐานวิทยา ด้วยวิธีทางมอร์โฟเมตริก (morphometric) ซึ่งวิธีการนี้ต้องใช้เวลานานและผู้เชี่ยวชาญสูง (Rinderer, 1986) นอกจากนี้วิธีดังกล่าวเป็นการศึกษาทางลักษณะฟีโนไทป์ที่ปรากฏซึ่งได้รับอิทธิพลจากยีนหรือสารพันธุกรรมร่วมกับสิ่งแวดล้อม แต่ลักษณะที่วัดและนับได้ด้วยวิธีมอร์โฟเมตริกนี้ก็มิใช่ตัวบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันระหว่างชนิดและภายในชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ดีนัก ในปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่าง ๆ หลายวิธีการ มาใช้เพื่อการบ่งชี้และจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความละเอียดและถูกต้องสูง และยังเป็นข้อมูลในระดับพันธุกรรมซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของลักษณะฟีโนไทป์ โดยอาศัยหลักการที่สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะและแตกต่างกันในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับสารพันธุกรรมนั้นสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น ตรวจสอบความแตกต่างของขนาดความยาวของชิ้นส่วนของสายนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัดด้วย restriction enzyme หรือ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Hewitt *et.al.* 1989; Nugroho *et.al.*, 1997) หรือใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่จำเพาะให้มากขึ้น (Bardakci and Skibinski, 1994) เป็นต้น

ดังนั้นในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำครั้งนี้ จึงมีแนวทางในการนำเทคนิค PCR และ RFLP มาใช้วิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะของไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอของประชากรม้าน้ำแต่ละชนิด ซึ่งอาจพบว่ามีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถบ่งชี้ จัดจำแนกชนิด และเป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของม้าน้ำที่พบในประเทศไทยซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจัดการทรัพยากรม้าน้ำต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำที่พบในบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย
2. เพื่อศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของม้าน้ำ
2. เป็นแนวทางในการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำที่พบในประเทศไทย
3. เป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของม้าน้ำที่พบในประเทศไทย
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการจัดทรัพยากร การอนุรักษ์พันธุ์ รวมทั้งพัฒนาและปรับปรุงวิธีการขยายพันธุ์ม้าน้ำต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดลำดับอนุกรมวิธาน

ม้าน้ำ (seahorse) จัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Grzimek, 1973)

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Osteichthyes

Order: Gasterosterfomes

Family: Syngnathidae

Genus: *Hippocampus*

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของม้าน้ำ

ม้าน้ำจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลา มีรูปร่างลักษณะเด่นคือ ส่วนหัวคล้ายกับม้า มีถุงหน้าท้องเหมือนจิงโจ้ เกล็ดหุ้มลำตัวของม้าน้ำได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเปลือกแข็งคล้ายเกราะหุ้มที่มีผิวขรุขระมีตากลิ่งกลอกชำเลืองได้รอบด้าน แต่ละข้างยังทำยังทำงานได้อิสระ ขณะว่ายน้ำจะใช้ครีบหลังที่เป็นแผ่นบางใสโบกพริ้วตลอดเวลา ขณะเดียวกันครีบหาง 1 คู่ จะช่วยพยุงตัวให้ตรง และมีหางเรียวสำหรับยึดเกาะอยู่กับที่ในขณะที่คลื่นทะเลซัดอยู่ตลอดเวลา ม้าน้ำสามารถเปลี่ยนสีได้โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆเช่นสภาพแวดล้อม ความเค็ม อุณหภูมิ และสภาพธรรมชาติเพื่อเป็นการพรางศัตรูที่จะเข้ามาทำอันตราย เช่นปลาต่างๆ ที่มีขนาดใหญ่กว่า โดยจะเกาะนิ่งอยู่กับที่และมีการเคลื่อนไหวเป็นบางครั้งเท่านั้น (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2540) ม้าน้ำชอบอาศัยอยู่ตามเสาโป๊ะ โพงพาง หรือหลบซ่อนอยู่ตามใต้น้ำ ระดับน้ำไม่ลึกมากนัก อาหารของม้าน้ำได้แก่ ไรน้ำ กุ้ง เคย เป็นต้น ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียคือ ม้าน้ำเพศผู้จะมีถุงหน้าท้องที่มีลักษณะพองออกมีไว้สำหรับบรรจุไข่ของเพศเมีย หลังจากการผสมพันธุ์ ส่วนเพศเมียไม่มีถุงหน้าท้องและเว้าเข้าซึ่งความแตกต่างนี้สามารถเห็นได้ชัดเมื่อม้าน้ำมีอายุ 5-6 เดือนขึ้นไป ช่วงฤดูผสมพันธุ์ของม้าน้ำคือช่วงเดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์ ซึ่งช่วงนี้อุณหภูมิในน้ำทะเลจะต่ำลงอยู่ระหว่าง 20-28 องศาเซลเซียส

ม้าน้ำมีถิ่นแพร่กระจายอยู่ในน่านน้ำทั่วโลกใน 6 ทวีปด้วยกัน ทั้งทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป แอฟริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย จากการสำรวจม้าน้ำในปัจจุบันมีรายงานว่าพบอยู่ประมาณ 32 ชนิด (Lourie *et.al.*, 1999) มีขนาดแตกต่างกันเช่น *H. ingens* ที่พบในมหาสมุทรแปรซิฟิกฝั่งตะวันออก มีลำตัวยาว 40 เซนติเมตร ส่วน *H. bargibanti* พบที่ New Caledonian มีลำตัวยาว 1.5 เซนติเมตร หรือ *H. hudsonius* ซึ่งเป็นม้าน้ำที่นิยมเลี้ยงกัน ในสหรัฐอเมริกาและยุโรป มีลำตัวยาว 20 เซนติเมตร และม้าน้ำแคระ *H. zosterae* มีความยาวเพียง 2.5-5 เซนติเมตร เท่านั้น ส่วนในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนพบม้าน้ำ

หลายชนิดเช่นกันคือ *H. kuda*, *H. japonicus*, *H. trimaculatus* และ *H. histrix* เป็นต้น (ทวี หอมชง และคณะ, 2529).

สำหรับประเทศไทยและน่านน้ำใกล้เคียงมีรายงานอ้างถึงว่ามีอยู่ประมาณ 5 ชนิด คือ *H. abdominalis*, *H. trimaculatus*, *H. histrix*, *H. spinosissimus* และ *H. kuda* (คณะประมง, 2523) แต่ส่วนใหญ่พบอยู่ 3 ชนิด (ชนิษฐา เจริญวิจิตรศิลป์, 2536) คือ

H. kuda มีหัวขนาดใหญ่ จมูกหนาและยาว ลำตัวมีโครงร่างหนา และใหญ่ ครีบหูบางใสอยู่ทางด้านหลังของแก้ม และครีบหลังจำนวน 1 อัน ใช้โบกพัดในการเคลื่อนที่ ขนาดความยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร พื้นผิวลำตัวมีสีเหลือง สีดำ หรือสีม่วง และสามารถเปลี่ยนสีลำตัวได้ พบอยู่ในน้ำลึกระดับกลางและบริเวณน้ำลึกที่สุดอยู่ลึกกว่า

H. trimaculatus มีจุดสีดำ 3 จุดอยู่บนส่วนหลังของกระดูกวงแหวนบนลำตัวที่ 1, 4 และ 7 ตามลำดับ หัวมีขนาดเล็ก จมูกเล็กและหงายขึ้น ลำตัวบางและกว้าง หางม้วนงอได้ อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำหรือความลึกระดับกลาง ลูกม้าน้ำจะพบอยู่บริเวณผิวเป็นส่วนใหญ่ ลำตัวมีสีเหลืองซีด อาศัยอยู่ตามเสาโป๊ะหลักหอยแมลงภู่หรือตามดงสาหร่าย บริเวณชายฝั่ง พบบริเวณชายฝั่งทะเลในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น ปากีสถาน ออสเตรเลีย และมหาสมุทรแปรซิฟิก

H. histrix เป็นม้าน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณน้ำใสสะอาดห่างจากฝั่ง เช่น บริเวณเกาะที่มีแนวปะการังกัลปังหา เป็นม้าน้ำที่มีสีสันสวยงาม มักมีสีแดงออกน้ำตาลแดง มีหนามรอบหัว และข้อต่อของกระดูกวงแหวนทั้งหมด จะไม่พบหนามบริเวณท้องและใกล้ๆหาง มงกุฎไม่สูง จมูกบาง และหนามส่วนบนมีสีน้ำตาลดำ พบในบริเวณชายฝั่งอินโดแปรซิฟิก

สำหรับการแพร่กระจายของม้าน้ำในภาคตะวันออกของไทยนั้น มีรายงานจากศรัณย์ ขยันการนาวี (2540) ทำการสำรวจม้าน้ำที่ท่าเทียบเรือตำบลบางเสร่ อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบม้าน้ำ 2 ชนิดคือ *H. histrix* และ *H. trimaculatus* โดยเป็นม้าน้ำที่จับได้จากเรือประมงอวนลากกุ้งบริเวณเกาะริ้น เกาะมารวิชัย และเกาะไผ่มี 2 ชนิดซึ่งจะจับได้พร้อมกัน แต่ม้าน้ำที่จับได้ส่วนใหญ่เป็น *H. histrix* เนื่องจากพบในบริเวณเขตน้ำลึก ส่วน *H. trimaculatus* จะพบในบริเวณเขตน้ำตื้นและใกล้ชายฝั่ง ซึ่งเป็นเขตห้ามทำการประมงอวนลาก

สำหรับม้าน้ำ *H. spinosissimus* นั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทย แต่ปรากฏชื่ออยู่ในคู่มือวิเคราะห์พรรณปลาของคณะประมง (2523) เท่านั้น มีเพียงรายงานการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของ Lourie *et.al.*(1999) ที่ได้รายงานถึงการแพร่กระจายของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ว่ามีการแพร่กระจายอยู่ในน่านน้ำบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตามแนวชายฝั่งประเทศศรีลังกา มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และออสเตรเลีย ลักษณะของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ที่ Lourie *et.al* (1999) รายงานไว้คือมีจำนวนวงแหวนบนลำตัวเท่ากับ 11 วง และมีความยาวของจะงอยปากน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวของหัว นอกจากนี้ยังมีชนิดที่คล้ายกันกับม้าน้ำชนิดนี้คือ *H. barbouri* และ *H. histrix* โดยพบว่ามักมีการเรียกชื่อวิทยาศาสตร์สับสนในระดับชนิดระหว่างม้าน้ำชนิด *H. spinosissimus* และ *H. histrix*

ดีเอ็นเอ

เซลล์ คือ หน่วยย่อยของสิ่งมีชีวิตที่สามารถแสดงพฤติกรรมทางชีวเคมี ประกอบด้วยสองส่วนหลักคือ ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโครโมโซมซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ และโปรตีนบางชนิดนอกจากนี้ภายในนิวเคลียสยังมีส่วนที่เรียกว่านิวคลีโอลัส ซึ่งประกอบด้วยอาเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ โดยที่นิวเคลียสเป็นศูนย์ควบคุมกิจกรรมต่างๆของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และเป็นแหล่งสะสมพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ (วิโรจน์ โชติพิพัฒน์วรกุล, 2540)

โครงสร้างของดีเอ็นเอเกิดจากดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ได้แก่ dATP, dGTP, dTTP และ dCTP มาเชื่อมต่อกันเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สายยาว ความแตกต่างของดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวของเบสบนสายดีเอ็นเอนั้นๆ มีความแตกต่างกัน เบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอมี 4 ชนิดได้แก่ ไซโทซีน (C) ไธมีน (T) อะดีนีน (A) และ กัวนีน (G) ดีเอ็นเอของยูคาริโอตจะมีลักษณะเป็นเส้นคู่บิดเป็นเกลียว นอกจากดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ยูคาริโอตแล้ว ยังพบดีเอ็นเอปริมาณเล็กน้อยมากในส่วนของไซโตพลาสซึม ซึ่งมีองค์ประกอบแตกต่างจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ดีเอ็นเอในไซโตพลาซึมจะอยู่ในส่วนของไมโตคอนเดรีย ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีโมเลกุลที่เล็กมากเมื่อเทียบกับโครโมโซมของนิวเคลียส และปรากฏในลักษณะของวงแหวนเกลียวคู่ (circular double-stranded) ประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 14,000-26,000 คู่เบส ในสัตว์ทั่วไป ส่วนในปลามีขนาดประมาณ 15,200-19,800 คู่เบส (Billinhyon and Hebert, 1991) มียีนที่เป็นรหัสสังเคราะห์โปรตีน 13 ชนิด, tRNA 22 ชนิด, rRNA 2 ชนิด, และไม่ทราบรหัสประมาณ 1,000 คู่เบส เรียกว่า control region หรือ A-T rich region ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง หรือเรียกว่า D-loop region ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุกรรมมาใช้เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างชนิดและระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะวิเคราะห์จากความหลากหลายของรูปแบบเฉพาะตัวของไมโตคอนเดรียเนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นตัวแทนของดีเอ็นเอส่วนหนึ่งในจีโนม ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอประมาณ 5-10 เท่า (Thomas and Wayng, 1996)

การเตรียมดีเอ็นเอ

เซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ เช่น เส้นผม ตัวอสุจิ เลือด และน้ำลาย เป็นต้น การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เหล่านี้ต้องคำนึงถึงชนิดและส่วนประกอบของเซลล์นั้นๆ เพื่อที่จะสามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งต้องคำนึงถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ให้มีสภาพดีเอ็นเอสายยาวมากที่สุด การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด นับว่าทำได้ง่ายและสะดวกที่สุด ส่วนของเลือดที่นำมาสกัดดีเอ็นเอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส สำหรับเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ เช่น ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน และนกเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอเริ่มจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟท (sodium dodecyl sulfate, SDS) แล้วทำการย่อยโปรตีนต่างๆด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชื่อ proteinase K จากนั้นทำการตก

ตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายฟีนอลและ คลอโรฟอร์ม โดยที่ดีเอ็นเอจะอยู่ในชั้นน้ำซึ่งสามารถตกตะกอนโดยใช้เอทธานอล (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้การตรวจหาตำแหน่งของดีเอ็นเอหลังอิเล็กโตรโฟริซีสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอทธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการแวาแสง (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531) อิเล็กโตรโฟริซีสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของ ประจุ ขนาด และรูปร่าง ของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้นการแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531) โดยผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) ที่ใช้กันทั่วไปคือ อะกาโรสเจล (agarose gel) และโพลีเอคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) หรือส่วนผสมระหว่างอะกาโรสเจลและโพลีเอคริลาไมด์เจล โดยที่อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่ำจะสามารถแยกดีเอ็นเอ ที่มีขนาดใหญ่กว่า 500-1,000 คู่เบสได้ ในขณะที่อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นสูงและโพลีเอคริลาไมด์เจลส่วนใหญ่จะใช้ศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539)

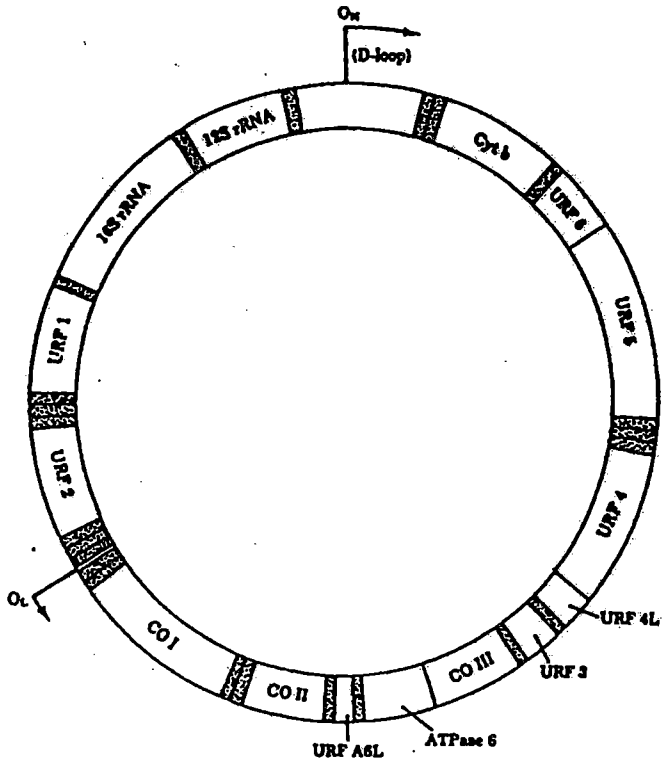
ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

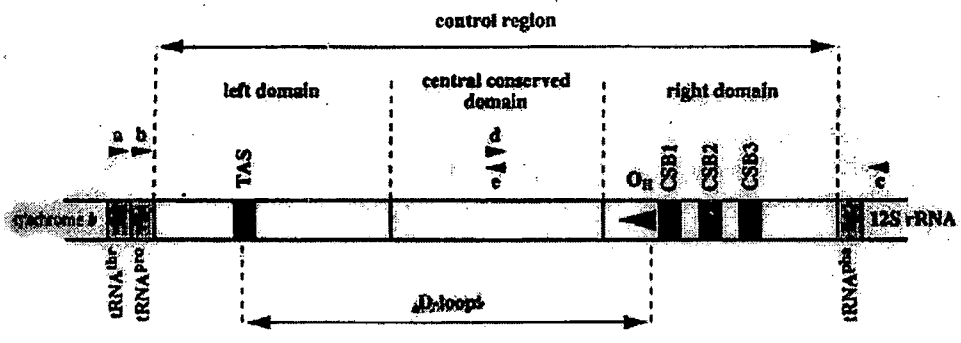
1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ

อัตราส่วนของประจุลบต่อมวลของดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอมีโครงรูปต่างๆกัน 3 แบบคือ ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (supertherlical circular) ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (liner DNA) และปลายเปิด (linear) หรือดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular) ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (supertherlical circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (liner DNA) และดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular)





ภาพที่ 2.1 แผนภาพไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหนู

CO I, CO II และ CO III : cytochrome oxidase subunits

Cyt b : cytochrome b

URFs : unidentified reading frames

O_H และ O_L : Origins of heavy and light strand DNA replication

3. ความเข้มข้นของเจล

เจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดั้งนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่เจลที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ความเข้มข้นของอะกาโรสที่เหมาะสมสำหรับแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆกัน

ความเข้มข้นของอะกาโรส (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของดีเอ็นเอ (คู่เบส)
0.5	1-30
0.5	0.8-12
0.5	0.5-10
0.5	0.4-7
1.5	0.2-3

ที่มา: วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539

4. อิเล็กโตรโฟริซีสบัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการอิเล็กโตรโฟริซีส ประกอบด้วย EDTA กับ Tris-acetate (TAE) หรือ Tris-borate (TBE) pH ประมาณ 7.5-8.0 การเลือกใช้บัฟเฟอร์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของบัฟเฟอร์โดยที่บัฟเฟอร์ TAE เป็นบัฟเฟอร์ชนิดที่มีความจุ (buffering capacity) ค่อนข้างต่ำ จะสูญเสียความเป็นบัฟเฟอร์ได้ง่ายเมื่อทำอิเล็คโตรโฟริซีสเป็นเวลานานส่วนบัฟเฟอร์ TBE เป็นบัฟเฟอร์ที่มี buffering capacity สูง และกรดบอริคสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

5. กระแสไฟฟ้า

โดยทั่วไปในการทำอิเล็กโตรโฟริซีส มักจะทำในสภาวะแรงดันคงที่ โดยมีค่าแรงดันไฟฟ้าที่เหมาะสม ความเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงจะแปรโดยตรงกับปริมาณค่าแรงดันไฟฟ้า ถ้าค่าแรงดันไฟฟ้าสูงเกินไปการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่มีขนาดใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ

การตรวจตำแหน่งของดีเอ็นเอ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

การตรวจตำแหน่งของดีเอ็นเอหลังการทำอิเล็กโตรโฟริซีสจะทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอทธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปจับระหว่างเบสคู่สมของดีเอ็นเอเกลียวคู่โดยการอินเตอร์

ข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15-16 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลที่ใช้หลังย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้ว ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อขจัดเอทธิเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอออก

การตรวจแถบดีเอ็นเอหลังย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ จะทำโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่นต่ำๆส่องอะกาโรสเจล สารเชิงซ้อนของเอทธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอมีคุณสมบัติดูดแสงที่ความยาวคลื่น 300 และ 360 นาโนเมตร และปล่อยแสงวาวสีส้มออกมาที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR))

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือที่เรียกว่า In vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ DNA เป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆคือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่เกิดขึ้นจากการแยกสายของดีเอ็นเอต้นแบบทั้งสองเส้นออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) ขั้นตอนนี้ทำให้เกิดขึ้นโดยอาศัยความร้อน สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่กัน (complementary strands) และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequences) ตรงกันข้าม ที่จะสามารถจับเข้าคู่กับสายเดิมได้ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ประการคือ (1) โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 2 สายซึ่งต้องใช้สำหรับตั้งต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยที่ ไพรเมอร์จะจับได้อย่างจำเพาะกับปลาย 3 ′ ของดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นคู่ของมัน (2) เอนไซม์ DNA polymerase และ (3) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบที่จำเป็นอื่นๆอีก เช่น บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิต่ำ 50-58 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม

3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ในทิศทางจาก 5 ′ ไป 3′ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียสการสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับทั้งสามขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งเรียกว่า amplified product หรือผลิตผล PCR (PCR products) จำนวนมากมาย ลักษณะการเพิ่มผลิตผล PCR จะเป็นแบบ exponential โดยหลังการทำ PCR จำนวน n รอบ ผลิตผล PCR ที่เกิดขึ้นจะเท่ากับ 2^n ถ้าการทำเทคนิค PCR มีประสิทธิภาพการผลิต 100 เปอร์เซ็นต์ (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539)

ปัจจัยที่เหมาะสมในการทำ PCR

ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการทำ PCR มีดังนี้ (มนตรี อัตถทิพพหลกุล และวัชรี อัตถทิพพหลกุล, 2536)

1. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ ควรมีขนาดความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วย G+C ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ และควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับทางปลาย 3′ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ควรมีความจำเพาะที่ไม่พบในบริเวณอื่นๆ ของสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ การเรียงนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3′ ของไพรเมอร์ในกรณีที่ใช้ทั้งคู่ไม่ควรจะเป็นคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer-dimer และแต่ละส่วนไม่ควรมี palindromic sequence เพื่อป้องกันการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของไพรเมอร์

2. ค่า melting temperature (Tm)

ค่า melting temperature ของแต่ละไพรเมอร์ ควรอยู่ใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ ถ้าปริมาณไพรเมอร์มากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) ได้

3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้โดยทั่วไปประมาณ 1.0-2.5 หน่วย ต่อ 100 ไมโครลิตร การใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงจนเกินไปจะทำให้เกิดผลิตผล PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น

4. ความเข้มของแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+})

Mg^{2+} มีผลต่อการจับของไพรเมอร์และความถูกต้องของเอนไซม์ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไป จะเกิดผลิตผล PCR ลดลง โดยทั่วไปเทคนิค PCR แบบไม่จำเพาะแต่ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไปจะทำให้ได้ผลิตผล PCR ลดลงโดยทั่วไปเทคนิค PCR ที่ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ Mg^{2+} ที่ใช้ประมาณ 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้ามีการใช้ dNTPs ในปริมาณสูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้น

5. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ใน PCR มี pH 7.0 ส่วนความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 ไมโครโมลาร์ การใช้ปริมาณ dNTPs ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จะก่อให้เกิด mispriming ของดีเอ็นเอตั้งต้น และ misincorporation ของ dNTPs

6. บัฟเฟอร์สำหรับ PCR

บัฟเฟอร์มาตรฐานที่นิยมใช้คือ Tris-HCl pH 8.3-8.8 ความเข้มข้น 10-50 มิลลิโมลาร์ และ KCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 มิลลิโมลาร์ โดยที่ KCl ทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้าความเข้มข้นของ KCl มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

7. Primer annealing

การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้น primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส ความยาวและความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้

8. Primer extension

เวลาที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่นี้ ขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

9. Denaturation

ช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการ denaturation ส่วนใหญ่คือ 94-95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือเวลาสั้นไป จะทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายมีการแยกสายที่ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณผลิตผล PCR ที่ควรได้ลดลง แต่ถ้าตั้งอุณหภูมิสูง หรือเวลายาวเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพเร็วเกินไป

10. ปัจจัยอื่นๆ

มีปัจจัยอื่นอีกหลายประการที่มีผลกระทบต่อเทคนิค PCR เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ควรล้างให้ปราศจากสารซักฟอก (detergent) โดยเฉพาะน้ำที่ใช้ในงานควรมีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสเป็นต้น

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นหนึ่งในหลายๆเทคนิคในการศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆซึ่งเกิดจาก deletion, insertion, inversion หรือ point mutation โดยการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction enzyme) ที่เหมาะสม ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งในสภาวะที่เหมาะสมก็จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เหมือนเดิมเสมอแต่ถ้าเป็นดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสที่ตำแหน่งจดจำต่างกันแม้เพียงตำแหน่งเดียวหรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าวเอนไซม์ก็จะไม่ตัดตำแหน่งนั้นทำให้เกิดแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (agarose gel electrophresis) เทคนิค RFLP สามารถนำมาบ่งบอกความแตกต่างของแต่ละชนิดและหรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆได้ (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2542)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

การเตรียมดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตเป็นวิธีการเบื้องต้นก่อนที่จะนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปใช้เพื่อวิเคราะห์ จึงมีงานวิจัยหลายงานที่พยายามปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอให้สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ง่าย สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังคิดวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ให้ได้นานที่สุด และดีเอ็นเอยังคงสามารถใช้วิเคราะห์พันธุกรรมได้ในลำดับต่อไป เช่น

Asahida *et.al.*(1996) ได้พัฒนาขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ โดยทำการทดลองกับปลาฟลาวเดอร์ *Paratichthys Olivaceus* และปลาเฮอริ่ง *Clupea harengus* ที่เก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อตับไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (6 M, 8 M Urea; 10 Mm Tris-HCl, pH 7.8; 125 NaCl;10 mM EDTA; 1 % SDS)

ซึ่งเก็บไว้เป็นเวลานาน 1 เดือนถึง 3 ปี ที่อุณหภูมิ 10-32 องศาเซลเซียส แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ พบว่าสามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ประมาณ 0.5-2.6 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อ 1 มิลลิกรัม

Gelbaus and Pirmez (1995) ได้ดัดแปลงขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ โดยการตกตะกอนดีเอ็นเอในที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงและเก็บรักษาเลือดไว้ในที่ที่เพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็น 8 โมลาร์ และใช้ EDTA, citric หรือ heperin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด พบว่าเลือดจำนวน 75 ไมโครลิตร สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ 1-2 ไมโครกรัม

Walsh *et.al.* (1991) ทำการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือด อสุจิ เยื่อบุข้างแก้ม และเส้นผม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Singer-Sam *et.al.* (1989) ซึ่งอาศัยการต้มเซลล์ในสารละลายคีเล็กซ์เรซิน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีคีเล็กซ์เรซินนั้นมีประสิทธิภาพดีแม้ว่าจะเป็นตัวอย่างเก่า และดีเอ็นเอที่เตรียมได้นั้นยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง HLA และDQ α ได้ด้วยเทคนิค PCR แต่พบว่าเซลล์บางชนิดเช่น อสุจิไม่สามารสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ด้วยวิธีต้มอย่างเดียวแต่ต้องอาศัยขั้นตอน pretreatment โดยการใส่ Proteinase K หรือทำ DTT treatment

Shedlock *et.al.* (1997) รายงานการเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลีน โดยการเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ไปเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งยีน 16 S rRNA และ cytochrome b พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เสียสภาพ (degrade) ได้

สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอเพื่องานศึกษาด้านพันธุกรรมของม้าน้ำนั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการทดลองเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของม้าน้ำเก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Asahida *et.al.* (1996) ดีเอ็นเอที่เตรียมได้นี้จะนำไปวิเคราะห์ด้านความแปรผันทางพันธุกรรมต่อไปด้วยเทคนิค PCR และ RFLP ดังตัวอย่างงานที่ทำการศึกษาในทำนองเดียวกัน เช่น

การศึกษาวิวัฒนาการของปลาสกุล *Euphausiids* ในมหาสมุทรแอนตาร์กติก และสับแอนตาร์กติกโดย Patarnello *et.al.* (1996) เตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของปลาที่เก็บรักษาในเอทธานอล70เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาวิเคราะห์โดยการเพิ่มปริมาณยีน 16 rRNA ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการแยกออกจากกันตามสายวิวัฒนาการ (divergence) ของปลา *Superba* และ *E. Crystallorophias* จากมหาสมุทรแอนตาร์กติค และ *E. Vallentini* จากสับแอนตาร์กติกเมื่อเวลาประมาณ 20 ล้านปีมาแล้ว

นอกจากนี้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของสิ่งมีชีวิตเดียวกันหรือต่างชนิดกันได้ด้วยเทคนิค RFLP (Restriction length polymorphism) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งในสภาวะเหมาะสมจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แบบเดิมเสมอ แต่ถ้าเป็นดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจดจำต่างกันแม้เพียงตำแหน่งเดียวก็จะไม่ตัดตำแหน่งนั้น ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะได้เป็นอย่างดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมักจะวิเคราะห์จากความหลากหลายของรูปแบบจำเพาะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ โดยเฉพาะบริเวณ control region และ ยีน ATPase

แต่ด้วยเหตุที่การตรวจแบบแผนที่จำเพาะหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RFLP ต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมากและต้องเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ แต่เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใช้บางครั้งมีปริมาณน้อย หรือมีดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่นปนเปื้อนทำให้ไม่สามารถนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ตรวจลายพิมพ์โดยเทคนิค RFLP ได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมนำเทคนิค PCR มาร่วมใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย โดยที่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณน้อยมาก นอกจากนี้ข้อดีของเทคนิค PCR คือใช้เวลาเพียง 1-2 วัน แปลผลง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541) สำหรับงานที่ใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์ความหลากหลายของรูปแบบจำเพาะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีตัวอย่างเช่น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เตรียมจากตับ และไข่ของปลาดุกอุย (*Clarius macrocephalus*) ที่อาศัยในแม่น้ำเจ้าพระยาใน 3 จังหวัดคือ อยุธยา ปทุมธานี และกรุงเทพฯ โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด คือ *EcoRI, HindIII, AvaII* และ *Sau I* ปรากฏว่าสามารถแบ่งรูปแบบดีเอ็นเอได้เป็น 18 แฮบโพไทป์ (haplotye) โดยตัวอย่างจากอยุธยามี 8 แฮบโพไทป์ ปทุมธานีมี 14 แฮบโพไทป์ กรุงเทพมี 7 แฮบโพไทป์ และค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทป์ของประชากรภายในแต่ละจังหวัดมีค่า 0.01062, 0.01079 และ0.00474 ตามลำดับ ส่วนค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างจังหวัดมีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาดุกอุยของอยุธยาและปทุมธานีมีค่าใกล้เคียงกันจนดูเหมือนว่ามาจากแหล่งเดียวกัน (นิภาพร ก้านทอง, 2539)

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของปลา Bream (*Pagrus major*) 5 สายพันธุ์ โดย Tabata *et.al.* (1997) ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่นทางภาคตะวันตก แล้วนำเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาจำนวน 50-100 มิลลิกรัม เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (10 mM Tris-HCl pH 7.5 , 10 mM EDTA, 125 Mm NaCl, 0.5 เปอร์เซนต์ SDS, 8 M Urea) แล้วทำการสกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน cytochrom b ถึงยีน 12 S rRNA ด้วยไพรเมอร์ L-15560 (CATATTAAACCCGAATATATTT) และ H1067 (ATAATAGGGTATCTAATCCTAGTTT) ได้ผลิตผล PCR ขนาด 2.1 กิโลเบส เมื่อย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 6 ชนิด คือ *HaeIII, HhaI, MspI, TaqI, RsaI* และ *HinfI* พบว่าเกิดรูปแบบจำเพาะ 61 แบบ

การศึกษาวิวัฒนาการของปลาเทราสีน้ำตาล (*Salmo trutta*) จากประเทศสเปน โดย Moran *et.al.* (1996) ทำการเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสีขาวที่เก็บไว้ในแอลกอฮอล์ แล้วนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ความแปรผันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยการใช้เรสทริกชันเอนไซม์จำนวน 4 ชนิดคือ *AvaII, EcoRI, BamHI* และ *XbaI* พบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นตัวติดตามทางพันธุกรรม (genetic marker) ในการจำแนกประชากรปลาเทราสีน้ำตาลสายพันธุ์ Hatchery ออกจากประชากรสายพันธุ์พื้นเมือง นอกจากนี้ยังสนับสนุนทฤษฎีวิวัฒนาการของปลาเทราสายพันธุ์ Hatchery ว่ามีสายวิวัฒนาการแยกมาจากบรรพบุรุษดั้งเดิม

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลาแอลบาคอร์ (*Thunnus alalunga*) โดย Chow and Ushima (1995) ทำการรวบรวมตัวอย่างจำนวน 620 ตัวอย่าง จากมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก

และแหลมกู๊ดโฮป และเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสด แช่แข็ง และตัวอย่างที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ นำผลิตผล PCR มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *MseI* และ *RsaI* พบว่าเกิดรูปแบบจำเพาะ 7 แบบ จากค่าการกระจายของแฮบโพลไทป์พบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างจากมหาสมุทรแปซิฟิกเหนือ และแปซิฟิกใต้ เช่นเดียวกับมหาสมุทรแอตแลนติกเหนือและแอตแลนติกใต้ รวมทั้งแหลมกู๊ดโฮป แต่พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างจากมหาสมุทรแอตแลนติกและแปซิฟิก

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลา Pilchards ในสกุล *Sardinops* โดย Okazaki *et.al.* (1996) เก็บตัวอย่างปลา Pilchards จำนวน 95 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจาก 9 แหล่ง และตัวอย่างปลาจะเก็บรักษาในเอทานอลหรือถูกแช่แข็งแล้วทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสีขาว แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน cytochrome b ถึงยีน 12 S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ CB3R-L (CATATTAAACCCGAATGATATTT) และ 12SAR-H (ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT) ได้ผลิตผล PCR ขนาด 2.0 กิโลเบส แล้วย่อยผลิตผล PCR ด้วยเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง จำนวน 10 ชนิด คือ *AciI*, *AfaI*, *AluI*, *BfaI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MboI*, *MseI*, *MspI* และ *TagI* ซึ่งให้เกิดรูปแบบจำเพาะทั้งสิ้น 78 แบบ ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปลา Pilchards จากประเทศญี่ปุ่น ออสเตรเลีย และแอฟริกาใต้มีต้นกำเนิดมาจากประชากรปลา Pilchards จากแปซิฟิกตะวันออก

Bremer *et.al.* (1996) ศึกษาโครงสร้างประชากรปลากะโทงแทงดาบ (*Xiphias gladius*)โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 247 ตัวอย่าง จากมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ทำการเตรียมดีเอ็นเอโดยสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (เอทานอล หรือไอโซโพพานอล) นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง control region ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำผลิตผลผล PCR ที่ได้ ไปหาลำดับเบสอัตโนมัติ (sequencing) และยืนยันผลด้วยการทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิดคือ *RsaI*, *DraI*, *MseI* ซึ่ง ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะ 68 แบบ และแบ่งประชากรเป็น 2 กลุ่ม

Rosel and Block (1996) ทำการศึกษาโครงสร้างประชากรของปลากะโทงแทงดาบ (*Xiphias gladius*) ที่เก็บตัวอย่างจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน มหาสมุทรแอตแลนติก มหาสมุทรแปซิฟิก จำนวนทั้งสิ้น 159 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และ DNA Sequence พบว่าตำแหน่ง control region ของปลากะโทงแทงดาบมีขนาดประมาณ 835 คู่เบส จากนั้นทำการประเมินลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ในตำแหน่ง control region ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ปลาย 5′ พบว่าตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่าง มีรูปแบบจำเพาะ121 แบบ และความหลากหลายของแฮบโพไทป์ทั้งหมดมีค่าประมาณ 0.994 แสดงว่ามีความหลากหลายในระดับสูง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในกลุ่มตัวอย่างที่มีรูปแบบจำเพาะนี้สามารถแบ่งตัวอย่างเป็นสองกลุ่มตามความแตกต่างของสภาพภูมิศาสตร์ และเมื่อวิเคราะห์ความแปรผันของโมเลกุลพบความหลากหลายใน 3 แหล่งนี้ แสดงว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมประชากรปลากะโทงแทงดาบมีกระจายอยู่ทั่วโลก ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมหาสมุทรสูงมาก

นอกจากนี้ Chow *et.al.* (1997) ได้ใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์รูปแบบจำเพาะของจีโนไทป์ตำแหน่ง control region ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของปลากะโทงเทง ดาบ (*Xiphias gladius*) ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆของมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก มหาสมุทรอินเดีย กู๊ดโฮ๊ป และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด แช่แข็ง หรือเก็บรักษาไว้ในเอทานอล แล้วเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ซึ่งผลิตผล PCR ที่ได้จะถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด คือ *AluI*, *DdeI*, *HhaI* และ *RsaI* ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะ 52 แบบ และสามารถแบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ประชากรจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และมหาสมุทรแอตแลนติกตะวันตกเฉียงเหนือ อีกกลุ่มคือประชากรที่เหลือทั้งหมด

จากรายงานวิจัยที่มีผู้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดังที่กล่าวมา ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเตรียมดีเอ็นเอของม้าน้ำได้ และใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์ตำแหน่งที่จำเพาะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในบริเวณยีน ATPase และบริเวณยีน cytrochrome b ถึงยีน12S rRNA หลังทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำที่พบแพร่กระจายอยู่ในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter); Beckman
2. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Microcentrifuge) GS-15; Beckman
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minimicrocentrifuge) DW-41; Qualitron
4. เจลแชมเบอร์ (Gel chamber) HE 33; Hoefer
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน (Autoclave) SS-240; Tomy
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); Memmert
7. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transluminator) UVTM-19; Hoefer
8. ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette) P20, P200, P1000; Gilson
9. กล้องโพลารอยด์ (Direct screen instant camera) PhotoMan DS-34; Hoefer
10. เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า (Power supply) PS 500 XT; Hoefer
11. ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) 808; Carbolite
12. เครื่อง Thermalcycler; Perkin Elmer

วัสดุภัณฑ์

1. ฟิล์มโพลารอยด์ (Polariod film) 667; Polarioad
2. ทิปสำหรับปิเปตต์อัตโนมัติ (Pipe tip)
3. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เคมีภัณฑ์

1. Isoamyl alcohol; Merck
2. Chloroform; Univar
3. Phenol; Riedel-de Hean
4. Sodium adetate; Fluka
5. Magnesium chloride; Fluka
6. Calciam chloride; Fluka
7. Boric acid; May & Baker
8. Sodium dodecyl sulfate; Fluka
9. Sodium chloride; Fluka

10. Trizma hydrochloride; Sigma
11. Ethylene diaine tetraacetate; Mallinckrodt
12. Sucrose; Fluka
13. Triton X-100; Fluka
14. Absolute ethanol; Fluka
15. Tricaine methane salfonate; Finquel
16. Standard DNA ((/Hind III); Promega
17. Bromophenol blue; Fluka
18. Xyline cyanol FF; Fluka
19. Glycerine; Merck
20. Agarose gel; USB
21. Ribonuclease A; Fluka
22. Proteinase K; Fluka
23. Ethidium bromide; Fluka

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สะอาดและปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส โดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หรือกรองผ่านกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตร

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตำแหน่งยีน 18S rRNA

   18S-GGGCAAGTCTGGTGCC

   18S-GGTCTGTGATGCCCTT

2. ตำแหน่งยีน cytochrome b จนถึงยีน 12S rRNA ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

   CB3R-L 5-CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT-3

   12SAR-H 5-ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT-3

3. ตำแหน่งยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

   L8562 5-CTT CGA CCA ATT TAT GAG CCC-3

   H943 5-GCC ATA TCG TAG CCC TTT TTG-3

ไพรเมอร์ทั้งหมดสังเคราะห์โดยหน่วยบริการศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Standard DNA Marker)

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

1. λ DNA/ *Hind* III หลังทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 7 ขนาด คือ 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 และ 0.7 กิโลเบส ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ โดยประมาณเท่ากับ 120, 49, 33.5, 24.5, 12, 10.5 และ 3 นาโนกรัม ตามลำดับ

2. 100 bp DNA ladder หลังทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 8 ขนาด คือ 1,500, 1,000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 ตามลำดับ

ม้าน้ำที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างม้าน้ำที่ใช้ในการทดลอง คือ *Hippocampus kuda*, *H. spinosissimus* และ *H. trimaculatus* เป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 3.1) ซึ่งเก็บรวบรวมจากชาวประมงในแหล่งต่าง ๆ ในภาคตะวันออกของประเทศไทย ดังนี้

H. kuda จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง คือจาก ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง และจาก ต.ท่าพริก อ.เมือง จ.ตราด จำนวน 4 ตัวอย่าง

H. spinossissimus จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง จาก ต.บางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี 18 ตัวอย่าง บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง 5 ตัวอย่าง และ ต. ท่าพริก อ.เมือง จ. ตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง

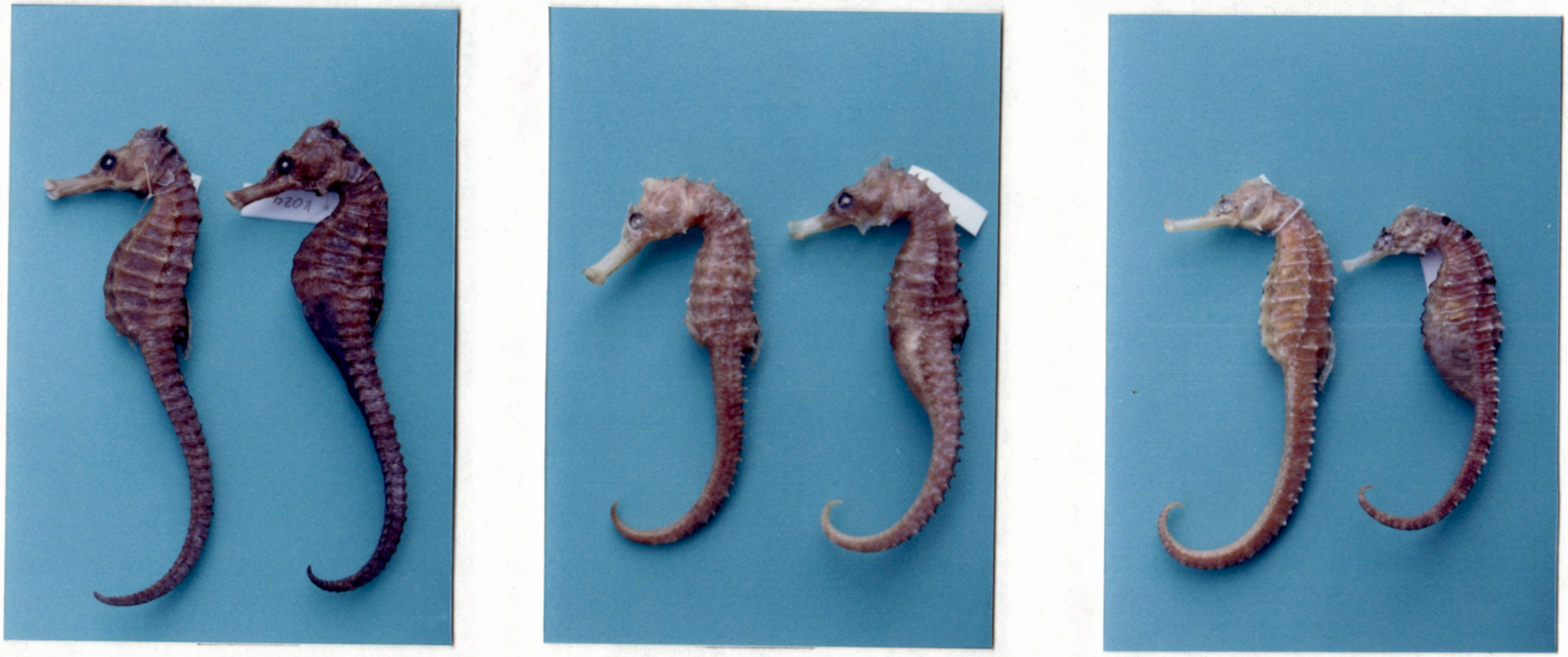
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

1. การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสลบตัวอย่างม้าน้ำด้วย Tricaine methane salfonate (ภาคผนวก) ความเข้มข้น 200 ppt เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเจาะเก็บเลือดที่บริเวณโคนหางแต่ละตัวอย่างประมาณ 20-50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ TNES-Urea (ภาคผนวก) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอในลำดับต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำสารละลายตัวอย่างเลือด จำนวน 50 ไมโครลิตรผสมในบัฟเฟอร์ TNES-Urea จำนวน 450 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Protinase K (ภาคผนวก) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล (Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol; 25 : 24 : 1) จำนวนเท่ากับปริมาตรเดิมแล้วเขย่าโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นแยกชั้นสารละลายที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติมสารละลายฟีนอลจำนวนเท่ากับปริมาตรเดิม เขย่าเบาๆ ทำซ้ำเช่นเดิมจนกระทั่งไม่มีคราบโปรตีนปรากฏในระหว่างชั้นของสารละลาย นำสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol จำนวน 2-2.5 เท่าของปริมาตรเดิมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°ซ อย่างน้อย 3 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย เอทธานอล 70% ปั่นที่ 13,500 rpm อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวน 20-50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ



(A) (B) (C)

ภาพที่ 3.1 ม้าน้ำตัวเต็มวัย เพศเมีย (ซ้าย) และเพศผู้ (ขวา); *H. kuda* (A), *H. spinosissimus* (B) และ *H. trimaculatus* (C)

3. การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโตรโฟริซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจำนวน 125 นาโนกรัม โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟ 80 โวลต์ เคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวกในบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก 6) ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ใช้สีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก3) เป็นตัวติดตาม หรือสังเกตจากตำแหน่งสีของ Bromophenol blue ให้มีตำแหน่งห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้อมเจลที่ได้ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 20 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 23.1, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32 และ 0.57 กิโลเบส ซึ่งจะมีดีเอ็นเอประมาณ 59.7, 24.3, 16.9, 11.2, 5.9, 5.2 และ 1.4 นาโนกรัม ตามลำดับ

สำหรับการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอตัวอย่าง ทำโดยนำค่าระยะทางที่ดีเอ็นเอตัวอย่างเคลื่อนที่ในเจลเปรียบเทียบค่าจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐานกับระยะทางที่ดีเอ็นเอมาตรฐานเคลื่อนที่

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และการตรวจสอบผลิตผล PCR

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3 แต่ละตัวอย่างประมาณ 60 นาโนกรัม แล้วเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 ลงในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันในที่เย็น แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermalcycler ตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR ในเครื่อง thermalcycler ดังนี้

1. ตำแหน่งยีน18S rRNA

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S rRNA โดยใช้ ไพรเมอร์ 18S-1 (GGGCAAGTCTGGTGCC) และ18S-2 (GGTCTGTGATGCCCTT) ใช้อุณหภูมิ 95^{o}ซ เวลา 30 วินาที 55^{o}ซ เวลา 30 วินาที และ 72^{o}ซ เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 ^{o}ซ เวลา 2 นาที และ 72^{o}ซ เวลา 5 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ

2. ตำแหน่งตั้งแต่ยีน cytochome b จนถึงยีน 12S rRNA ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ใช้อุณหภูมิ 94^{o}ซ เวลา 1 นาที 45^{o}ซ เวลา 1 นาที และ 72^{o}ซ เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบที่อุณหภูมิ 94^{o}ซ เวลา 3 นาที และ 72^{o}ซ เวลา 5 นาที ตามลำดับ

3. ตำแหน่งยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ใช้อุณหภูมิ 95^{o}ซ เวลา 1 นาที 40^{o}ซ เวลา 1 นาที และ 72^{o}ซ เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบที่อุณหภูมิ 95^{o}ซ เวลา 3 นาที และ 72^{o}ซ เวลา 5 นาที ตามลำดับ เมื่อครบเวลานำผลิตผล PCR มาตรวจสอบ โดยใช้ผลิตผล PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับสีติดตามในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 นำ มาทำอิเล็กโตรโฟริซีสความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเจลที่ได้ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 20 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และ λ/*Hind* III

5. **การทำผลิตผล PCR ให้บริสุทธิ์** (ตามคำแนะนำของบริษัท Life Technologies)

นำผลิตผล PCR ในข้อ 5 จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย binding solution (H_1)จำนวน 400 ไมโครลิตร (สำหรับผลิตผล PCR จำนวนเท่ากับ 100 ไมโครลิตรหรือน้อยกว่า) จากนั้นนำสารละลายผสมใส่ลงในหลอด spin cartridge แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม Wash Buffer (H_2) จำนวน 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง และนำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด spin cartridge ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ TE ที่ทำให้อุ่นก่อนที่อุณหภูมิ 65-70 °ซ จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อรอการวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สาร	ปริมาตรที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย
ดีเอ็นเอแม่พิมพ์	1 ไมโครลิตร	60 นาโนกรัม
น้ำกลั่น	77.8 ไมโครลิตร	-
บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 10 เท่า	10 ไมโครลิตร	-
ไพรเมอร์ตัวที่ 1	1 ไมโครลิตร	0.2 ไมโครโมลาร์
ไพรเมอร์ตัวที่ 2	1 ไมโครลิตร	
แมกนีเซียม	6 ไมโครลิตร	1.5 ไมโครโมลาร์
Taq DNA Polymerase	0.4 ไมโครลิตร	2 ยูนิต
dNTPs	0.8 ไมโครลิตร	0.2 มิลลิโมลาร์
ปริมาตรรวม	**100 ไมโครลิตร**	-

6. **การย่อยผลิตผล PCR ด้วยเรสทริชันเอนไซม์**

นำผลิตผล PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิด ผสมกับบัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอประมาณ 10 นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ยกเว้นเอนไซม์ *Taq*I บ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาด้วยสีติดตามในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 จากนั้นนำปริมาตรทั้งหมดมาทำเจลอิเล็กโตรโฟริซีส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 2

เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลที่ได้ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 20 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และ λ/*Hind* II

ชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์และบัฟเฟอร์

เรสทริกชันเอนไซม์ที่เลือกใช้ในการทดลองได้แก่

1. บริเวณจดจำประกอบด้วยการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่

1.1 *Eco*RI

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...G↓AATTC...3'

3'...CTTAA↑G...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ ประกอบด้วย 50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.025% Triton X-100, pH 7.5

1.2 *Hind*III

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...AA↓GCTT...3'

3'...TTCG↑AA...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA และ 50% Glycerrol

1.3 *Kpn*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...GGTAC↓C...3'

3'...C↑CATGG...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.0 และ 100 µl/ml BSA

2 บริเวณจดจำประกอบด้วยการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ 4 นิวคลีโอไทด์

2.1 *Hae*III

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...GG↓CC...3'

3'...CC↑GG...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM $MgCl_2$ และ1 mM DTT

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

2.2 *Hha*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...GC↓GC...3'

3'...CG↑CG...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 50 mM potassium, 20 mM Tris acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT , pH 7.0 และ 100 µl/ml BSA

2.3 *Msp*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...C↓CGG...3'

3'...GGC↑C...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.9 และ 1 mM DTT

2.4 *Taq*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...T↓CGA...3'

3'...AGC↑T...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 100 mM NaCl , 10 mM Tri-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 8.4 และ 100 µl/ml BSA

7. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำด้วยเทคนิค RFLP

ทำการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำแต่ละตัวอย่างในแต่ละแหล่งหลังย่อยผลิตผล PCR ของแต่ละตัวอย่างด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันในทุกเอนไซม์ที่เลือกใช้ โดยที่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำชนิด *H. kuda* จะวิเคราะห์ที่ตำแหน่งยีน ATPase ส่วนม้าน้ำ *H. spinosissimus* วิเคราะห์ตำแหน่งตั้งแต่ยีน cytochrome b จนถึงยีน 12S rRNA ส่วนม้าน้ำ *H. trimaculatus* มีจำนวนตัวอย่างน้อยมากจึงไม่ได้ทำการศึกษา

QL7. 6798
8658 ป
Q.6
249239

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของม้าน้ำ

ผลการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของม้าน้ำทั้งสามชนิดคือ *H. kuda*, *H. spinosissimus*, และ *H. trimaculatus* ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี phenol/chloroform เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /*Hind* III หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส พบว่าดีเอ็นเอที่ได้ของตัวอย่างทั้งหมดมีลักษณะความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์คือเป็นแถบดีเอ็นเอแถบเดียว มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส และเตรียมได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.1

การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ

เมื่อนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำที่เตรียมได้ข้างต้นในม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด ตัวอย่างละ 60 นาโนกรัม โดยประมาณ มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S rRNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าได้ผลิตผล PCR ที่เป็นรูปแบบเฉพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำ คือ *H. spinosissimus* มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาด 900 คู่เบส โดยประมาณ, และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส เป็นแถบเข้ม 1 แถบ และขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบสอีก 3 แถบ เป็นแถบจาง ดังแสดงในภาพที่ 4.2

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ

1. ม้าน้ำ *H. spinosissimus*

เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* โดยการนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำจำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง คือจาก ต.บางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี จำนวน 18 ตัวอย่าง บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง จำนวน 5 ตัวอย่าง และ ต. ท่าพริก อ.เมือง จ. ตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จำนวน 60 นาโนกรัม โดยประมาณ มาทำการเพิ่มปริมาณที่บริเวณยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ CB3R-L (CATATTAAACCCGAATGATATTT) และ ไพรเมอร์ 12SAR-H (ATAGTGGGGGTATCTAATCCCAGTT) จำนวน 0.2 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing 45 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ก่อนและหลังเข้ารอบอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที ตามลำดับ ภายหลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder และ λ /*Hind* III พบว่าผลิตผล PCR ทุกตัวอย่าง มีขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 4.3

และในขั้นต่อมาได้ทำการทดสอบการย่อยผลิตผล PCR ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ปรากฏรูปแบบของดีเอ็นเอ (DNA pattern) ชัดเจนเท่านั้น โดยใช้เอนไซม์ 7 ชนิด คือ *EcoR*I, *Hind* III, *Kpn*I, *Hae*III, *Msp*I และ *Taq*I พบว่ามีเพียง *EcoR*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I เท่านั้นที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ได้และเกิดรูปแบบที่จำเพาะ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นจึงเลือกทำการย่อยผลิตผล PCR ของทุกตัวอย่างด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิดนี้ ผลการทดลองพบว่าภายหลังย่อยจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยที่เมื่อย่อยด้วย *EcoR*I, *Hae*III, *Hha* I, และ *Msp*I ได้รูปแบบที่จำเพาะของแถบดีเอ็นเอจำนวน 3, 6, 2, และ 3 แถบ ตามลำดับ โดยที่ม้าน้ำทุกตัวอย่างจากทั้งสามแหล่งมีรูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะเพียงแบบเดียวในแต่ละเรสทริกชันเอนไซม์ที่ทดสอบ ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 4.5 -4.8) ยกเว้นเรสทริกชันเอนไซม์ *Taq*I ที่ผลิตผล PCR เมื่อถูกย่อยแล้วปรากฏรูปแบบจำเพาะ 2 แบบ คือแบบที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ และแบบที่ 2 มี 5 แถบ โดยม้าน้ำทุกตัวอย่างมีรูปแบบจำเพาะที่เหมือนกันทั้งหมดในแบบที่ 1 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ (ภาพที่ 4.9 ช่อง 1, 2 และ 4) แต่มีเพียง 1 ตัวอย่างจากหมู่เกาะมัน อ. แกลง จ. ระยอง ที่มีรูปแบบจำเพาะที่ต่างออกไปเป็นแบบที่ 2 ที่มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ (ภาพที่ 4.9 ช่อง 3)

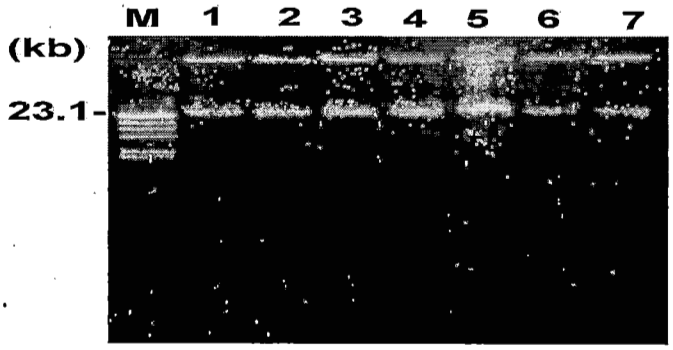
ตารางที่ 4.1 ขนาดของผลิตผล PCR ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เรสทริกชันเอนไซม์	ขนาดดีเอ็นเอ (คู่เบส)
EcoR I	960, 750, 290
Hae III	670, 380, 350, 270, 180, 150
Hha I	1,600, 400
Msp I	1,370, 400, 230
Taq I แบบที่ 1	1,050, 490, 290, 170
แบบที่ 2	680, 490, 370, 290, 170

2. ม้าน้ำ *H. kuda*

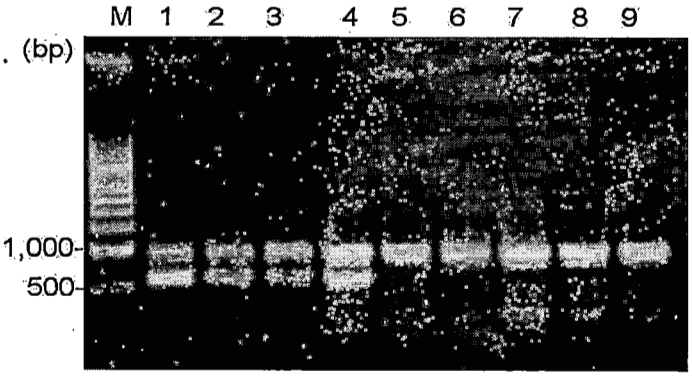
เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda* จำนวน 30 ตัวอย่างคือ จากต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี 26 ตัวอย่าง และจากต. ท่าพริก อ.เมือง จ.ตราด 4 ตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวนที่บริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ L8562 5-CTT CGA CCA ATT TAT GAG CCC-3 และ H943 5-GCC ATA TCG TAG CCC TTT TTG-3 และใช้อุณหภูมิการ denature เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที อุณหภูมิ annealing เท่ากับ40 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที อุณหภูมิ extension เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ก่อนและหลังเข้ารอบใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามลำดับ ได้ผลิตผล PCR ที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส เป็นแถบเข้ม และ 300 คู่เบส เป็นแถบจาง ดังแสดงในภาพที่ 4.10

และเมื่อทดลองนำผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPaseในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 300 คู่เบส จำนวน 1 ตัวอย่าง มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 6 ตำแหน่ง จำนวน 3 ชนิดคือ *Eco*RI, *Hind*III และ*Kpn*I และเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 4 ตำแหน่ง จำนวน 4 ชนิดคือ *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Tag*I เพื่อทดสอบหารูปแบบจำเพาะที่เหมาะสม ปรากฏผลดังภาพที่ 4.11 โดยพบว่ามีเพียงเรสทริกชันเอนไซม์ *Hae*III เท่านั้นที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ที่มีขนาด 900 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบเข้มได้ (ภาพที่ 4.11 ช่อง 2) โดยได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และ 300 คู่เบส ส่วนผลิตผล PCR ที่มีขนาด 300 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบจางนั้นไม่ถูกย่อยด้วย *Hae*III แต่ถูกย่อยได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดอื่นคือ *Hha*I, *Msp*I และ *Tag*I ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 คู่เบส และ 100 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบที่จางมากทั้งสองแถบ และผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H.kuda* บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้ ไม่สามารถย่อยได้ด้วย *Eco*RI, *Hind*III และ*Kpn*I ดังแสดงในภาพที่ 4.11 ดังนั้นจึงเลือกใช้เฉพาะ *Hae*III เท่านั้นย่อยผลิตผล PCR ของทุกตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าปรากฏรูปแบบจำเพาะเพียงรูปแบบเดียวเท่านั้นในม้าน้ำจากทั้ง 3 แหล่ง (ภาพที่ 4.12)



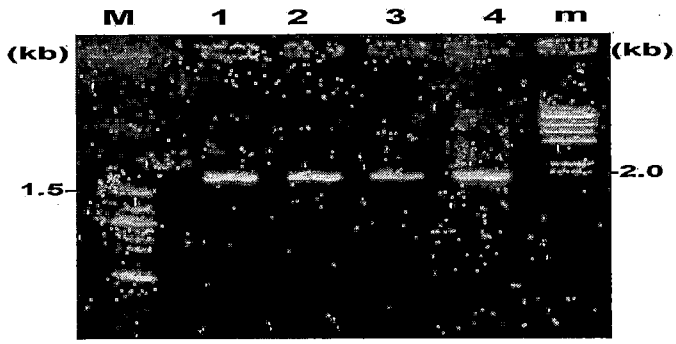
ภาพที่ 4.1 รูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของม้าน้ำ

ดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของม้าน้ำ *H. kuda* (ช่อง1-2), *H. spinosissimus* (ช่อง3-5), และ *H. trimaculatus* (ช่อง6-7) ที่เตรียมจากเลือดในบัฟเฟอร์ TNES-Urea หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hind*III จำนวน 125 นาโนกรัม (ช่อง M)



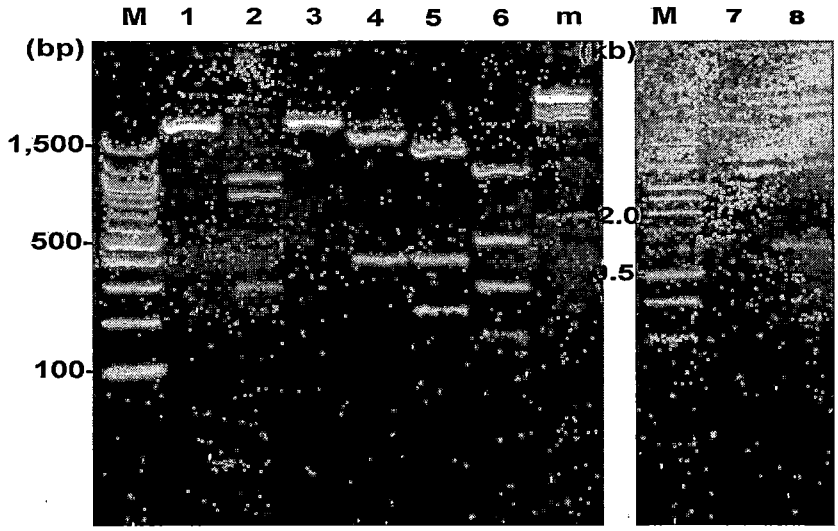
ภาพที่ 4.2 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน 18S rRNA ของม้าน้ำ

ผลิตผล PCR บริเวณยีน 18S rRNA ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* (ช่อง 1-4), *H. kuda* (ช่อง 5-6) และ *H. trimaculatus* (ช่อง7-9) แต่ละตัวอย่าง หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 500 bp DNA Ladder (ช่อง M)



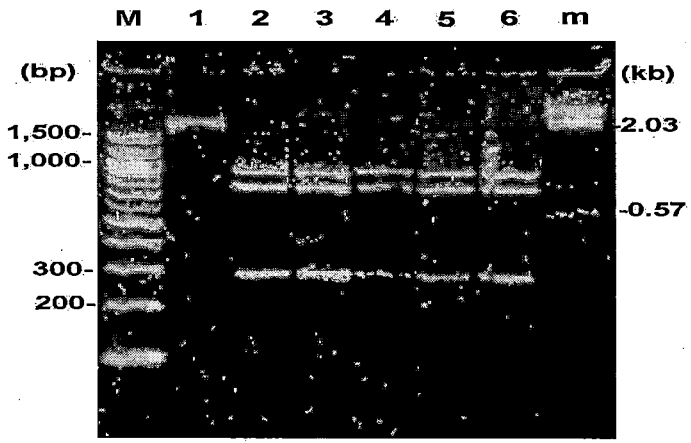
ภาพที่ 4.3 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของม้าน้ำ *H. spinosissimus*

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างหลังทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ /*Hind* III (ช่อง m)

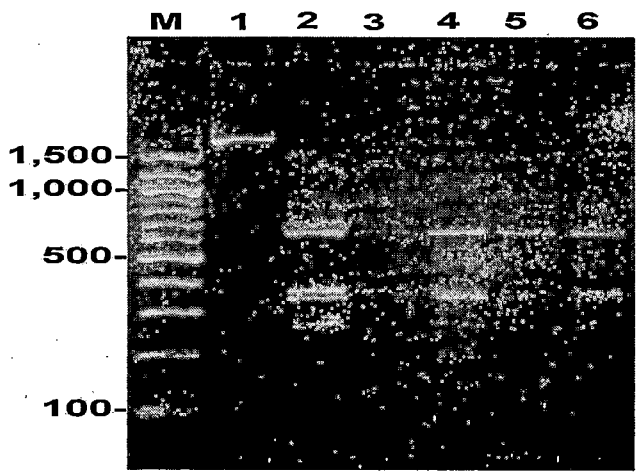


ภาพที่ 4.4 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

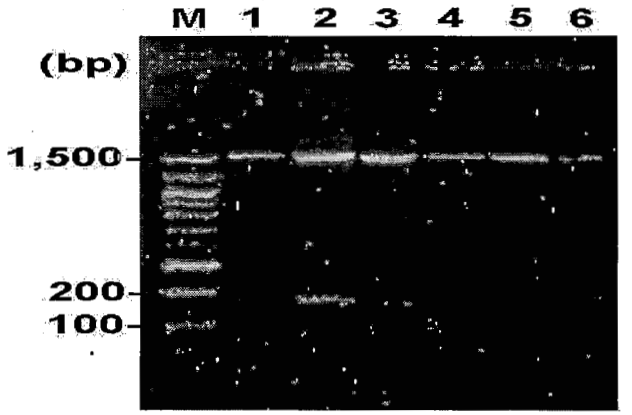
ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Kpn*I, *Hha*I, *Msp*I, *Taq*I, *Hind*III และ *Hae*III (ช่อง 2-8 ตามลำดับ) หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder และ λ /*Hind* III (ช่อง M และ m ตามลำดับ)



ภาพที่ 4.5 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *EcoR* I ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 2-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoR* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ */Hind* III (ช่อง m)

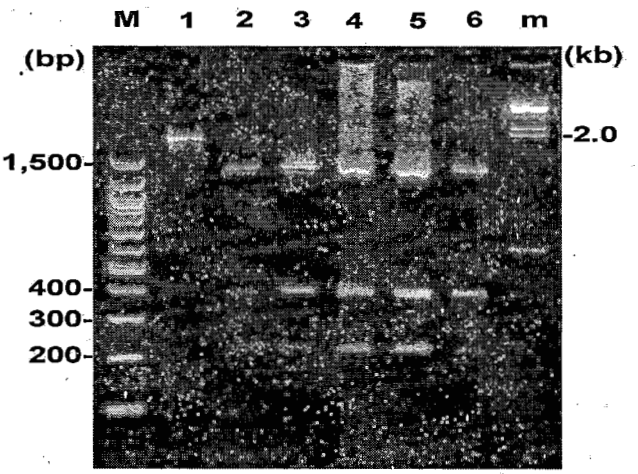


ภาพที่ 4.6 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hae* III ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 2-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hae* III หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ */Hind* III (ช่อง m)



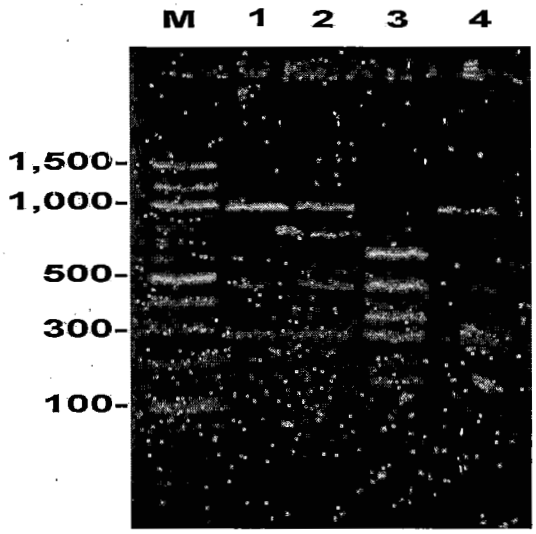
ภาพที่ 4.7 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hha* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 1-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hha* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



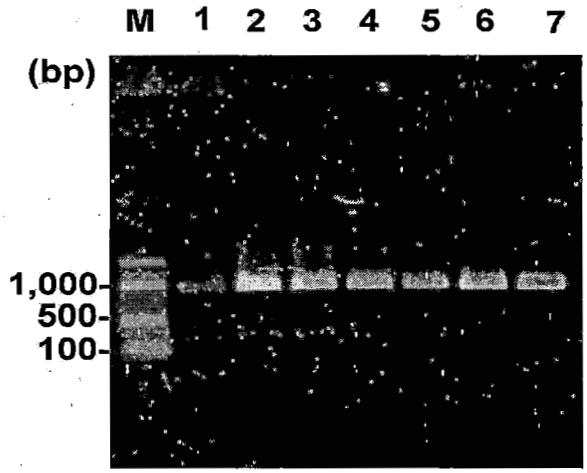
ภาพที่ 4.8 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Msp* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 2-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Msp* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ /*Hind* III (ช่อง m)



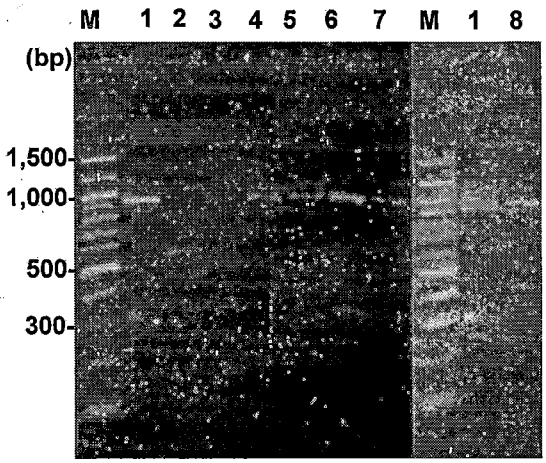
ภาพที่ 4.9 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Taq* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* จาก จ. ชลบุรี (ช่อง 1-2) จ. ระยอง (ช่อง 3) และ จ. ตราด (ช่อง 4) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Taq* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



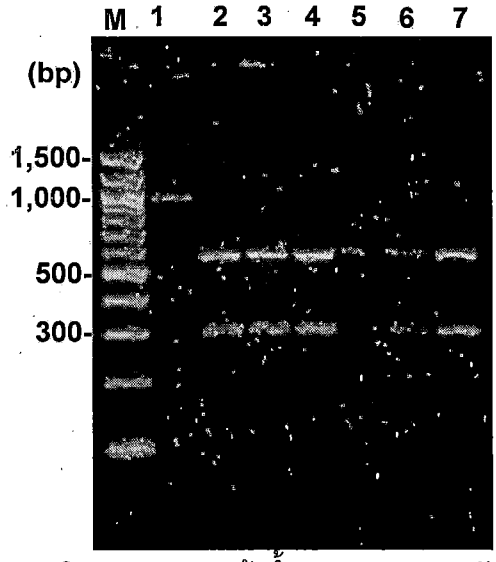
ภาพที่ 4.10 ผลิตผล PCR ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณยีน ATPase ของม้าน้ำ *H. kuda*

ผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* จากจ. ชลบุรี (ช่อง 1-4) และจากจ. ตราด (ช่อง 5-7) หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ในอะกาโรสความเข้มข้น 1.8% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



ภาพที่ 4.11 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* หลังย่อยด้วย *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I, *Taq*I, *Eco*RI, *Hind*III และ *Kpn*I (ช่อง 2-8 ตามลำดับ) แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8% เปรียบเทียบกับผลิตผล PCR ก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



ภาพที่ 4.12 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วย *Hae*III

ผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* จากจ. ชลบุรี (ช่อง 2-5) และจากจ. ตราด (ช่อง 6-7) หลังย่อยด้วย *Hae*III แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8% เปรียบเทียบกับผลิตผล PCR ก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)

บทที่ 5

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอ

การเตรียมดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุลของม้าน้ำนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษา ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องทดลองเตรียมดีเอ็นเอจากส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆ ทั้งจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อตับ และเนื้อเยื่อไต แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมได้ยังไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป (ไม่ได้รายงานในผลการทดลอง) และเนื่องจากม้าน้ำเป็นปลาที่มีโครงร่างแข็งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของร่างกาย การเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อดังกล่าวจึงทำได้ไม่สะดวกนัก ในที่สุดจึงพบว่าเมื่อใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของม้าน้ำที่มีชีวิต จะเตรียมดีเอ็นเอได้ดีที่สุด โดยดัดแปลงวิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของคน (Gelhaus *et.al.*, 1995) และจากเนื้อเยื่อของปลาชนิดอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (Asahida *et.al.*, 1996) โดยทำการเจาะเลือดที่บริเวณโคนหางของม้าน้ำตัวอย่างละ 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาเตรียมดีเอ็นเอจะเตรียมได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อของปลาชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ (0.5-2.6ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อ 1 มิลลิกรัม) (Asahida *et.al.*, 1996) ในด้านคุณภาพของดีเอ็นเอพบว่ามีลักษณะความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hind*III จะมีขนาดมากกว่า 23.1 kbp สามารถนำไปเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลขั้นต่อไปได้ เช่นเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของปลาชนิดอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 6 หรือ 8 โมลาร์ เพื่องานศึกษาด้านพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิค PCR (Gelhaus *et.al.*, 1995), เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Bardakci and Skibinski, 1994; Asahida *et.al.*, 1996), เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)(Chow *et.al.*, 1993) หรือนำไปใช้หาลำดับเบส (DNA sequencing) (Bartlett and Davidson, 1991) เป็นต้น แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของยูเรียในบัฟเฟอร์ และระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดของม้าน้ำจะมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วย โดยพบว่าถ้าเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 4 โมลาร์ หรือใช้ความเข้มข้นของยูเรียมากกว่านี้และเก็บเลือดไว้เป็นระยะเวลานานมากกว่า 12 เดือน ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จะมียูเรียตกค้างและไม่สามารถที่จะทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไปได้ (ไม่ได้รายงานในผลการทดลอง) ซึ่งจะแตกต่างจากรายงานของ Asahida *et.al.* (1996) ที่สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้จากเนื้อเยื่อของปลาที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 3 ปี ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 6 หรือ 8 โมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเจาะและเก็บเลือดของม้าน้ำเพียงเล็กน้อยไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 4 โมลาร์ เพื่อใช้สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอภายในระยะเวลา 1 ปี ก็เป็นวิธีที่สะดวกทั้งในการปฏิบัติภาคสนาม และในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนการขน

ย้าย และการเก็บรักษา และดีเอ็นเอที่ได้มีความสมบูรณ์และปริมาณมากพอที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป อีกทั้งตัวอย่างม้าน้ำที่มีชีวิตที่ใช้ในการทดลองนี้ยังสามารถปล่อยกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติเดิมได้

การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำโดยใช้เทคนิค PCR ในบริเวณยีน 18S rRNA โดยเมื่อนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำที่เตรียมได้ข้างต้นในม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด คือ *H. spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* ตัวอย่างละ 60 นาโนกรัมโดยประมาณ มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ ไพรเมอร์ 18S-1 (GGGCAAGTCTGGTGCC) และ18S-2 (GGTCTGTGATGCCCTT) ใช้อุณหภูมิ denature ที่ 95°ซ เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55°ซ เวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72°ซ เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 2 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ พบว่าได้ผลิตผล PCR ที่เป็นรูปแบบเฉพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำ คือ *H. spinosissimus* มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาด 900 คู่เบส โดยประมาณ, และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส เป็นแถบเข้ม 1 แถบ และขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบสอีก 3 แถบ เป็นแถบจาง ทั้งนี้เมื่อทดลองเปลี่ยนค่าอุณหภูมิของการ annealing ให้มีค่าต่ำลง จะพบรูปแบบเฉพาะตัวเช่นกันแต่จำนวนแถบของดีเอ็นเอจะมากขึ้นและมีแถบจางมากกว่าแถบเข้มซึ่งยากต่อการวิเคราะห์ขนาดที่แน่นอนของแต่ละแถบ และเมื่อใช้อุณหภูมิของการ annealing ให้สูงขึ้นความเข้มของแถบจางก็จะลดลงบ้างแต่ยังคงปรากฏรูปแบบจำเพาะตัวเช่นเดียวกับที่รายงานในครั้งแรก ดังนั้นตำแหน่งยีน 18S rRNA ของม้าน้ำจะให้รูปแบบที่มีความจำเพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำได้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ

การศึกษาความหลากหลายภายในประชากรของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันนิยมศึกษาในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอส่วนหนึ่งของจีโนมและมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอ โดยเฉพาะตำแหน่ง control region หรือ D-loop region และยีน ATPase (Thomus and Wayne, 1996) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิค RFLP มาใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสของบริเวณดังกล่าวของม้าน้ำที่พบแพร่กระจายทั่วไปในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทยเพียงสองชนิดคือ *H. spinosissimus* และ *H. kuda* การที่ไม่ได้ทำการศึกษาในม้าน้ำ *H. trimaculatus* เนื่องจากทำการเก็บตัวอย่างได้น้อยมากไม่เพียงพอที่จะวิเคราะห์ความแปรผันภายในประชากรได้ และด้วยเหตุที่จำกัดด้วยงบประมาณและปริมาณตัวอย่างม้าน้ำที่เก็บได้จึงทำให้ต้องแยกศึกษายีนแต่ละชนิดในม้าน้ำแต่ละชนิด โดยศึกษา ตำแหน่ง control region หรือ D-loop region ในม้าน้ำ *H. spinosissimus* และยีน ATPase ใน *H. kuda* โดยทำการเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในบริเวณยีนดังกล่าวของม้าน้ำก่อนด้วยเทคนิค PCR แล้วจึงย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะตัวของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างในทุกแหล่ง

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. spinosissimus

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. spinosissimus* จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง (ต.บางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี จำนวน 18 ตัวอย่าง บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง จำนวน 5 ตัวอย่าง และ ต. ท่าพริก อ.เมือง จ. ตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง) โดยการเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากเลือดที่เก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TNES-Urea แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เตรียมด้วยเทคนิค PCR แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมระดับโมเลกุลของม้าน้ำมาก่อน จึงดัดแปลงวิธีการวิจัยจากรายงานของ Okazaki *et.al.* (1996) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมในปลา pilchards บริเวณเขต anti-tropical โดยวิเคราะห์บริเวณยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งครอบคลุมบริเวณ D-loop โดยใช้ไพรเมอร์ CB3R-L และไพรเมอร์ 12SAR-H ซึ่งมีลำดับเบส CATATTAAACCCGAATGAATATTT และ ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT ผลิตผล PCR มีขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส แล้วย่อยด้วย *Aci* I, *Afa* I, *Alu* I, *Bfa* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I และ *Taq* I เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะตัวของดีเอ็นเอ นอกจากนี้มีรายงานของ Tabata *et.al.* (1997) ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลา Bream 5 สายพันธุ์จากทะเลแดง โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ย่อยผลิตผล PCR ซึ่งอยู่ในช่วงบริเวณยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้เช่นกัน รวมถึงแนวทางในการทดสอบความแปรผันในบริเวณไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอของปลาชนิดอื่นๆ (Bartlett and Davidson, 1991; Carr and Marshall, 1991; Lockwood *et.al.*, 1993) ดังนั้นในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* นี้จึงทดลองใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเดียวกับที่ Okazaki *et.al.* (1996) ศึกษา แต่พบว่าไม่สามารถเพิ่มผลิตผล PCR ได้ที่อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา PCR ตามที่ Okazaki *et.al.* (1996) รายงาน ต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและเวลาใหม่เป็นอุณหภูมิ denature 94°ซ เวลา 1 นาที annealing 45°ซ เวลา 1 นาที และ extension 72°ซ เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบที่อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 3 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ตามลำดับ จึงได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส ในทุกตัวอย่าง จากนั้นเมื่อนำผลิตผล PCR ที่ได้มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 6 ตำแหน่ง คือ *EcoR*I, *Hind*III และ *Kpn*I และเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 4 ตำแหน่ง คือ *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่าทุกเอนไซม์ย่อยได้ยกเว้น เฉพาะ *Hind*III และ *Kpn*I ที่ไม่สามารถย่อยได้ จากการทดลองนี้แสดงว่าในช่วงของยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* นี้ไม่มีบริเวณจดจำลำดับเบสของ *Hind*III และ *Kpn*I แต่มีบริเวณจดจำลำดับเบสของ *EcoR*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I ซึ่งการทราบชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยได้นี้จะเป็นประโยชน์ในการทำโคลนเพื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ต่อไป ซึ่งจะสามารถเลือกชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งสามารถทำแผนที่ยีน (restriction map) (Beckenbach, 1991) จากผลการทดลองนี้แม้จะพบว่าเมื่อย่อยผลิตผล PCR ทุกตัวอย่างแล้วปรากฏรูปแบบจำเพาะเพียงแบบเดียวเหมือนกันหมดในแต่ละเอนไซม์ ยกเว้นมีเพียง *Taq*I เท่านั้นที่พบรูปแบบจำเพาะ 2 แบบ แสดงว่ามีความแปรผันใน

ประชากรของม้าน้ำชนิดนี้และพบภายในแหล่งเดียวกัน คือที่ บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง ซึ่งมีรูปแบบจำเพาะที่ต่างออกไป

อย่างไรก็ตามอาจพบรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ *H. spinosissimus* หลากหลายมากขึ้นถ้าเพิ่มชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์โดยเฉพาะชนิดที่มีบริเวณจดจำ 4 ลำดับเบส และเพิ่มจำนวนตัวอย่างม้าน้ำให้มากกว่านี้และจากหลายแหล่ง ซึ่งจะทำให้ข้อมูลความแปรผันภายในประชากรของม้าน้ำมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และหากนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตำแหน่งยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของม้าน้ำนี้ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ (DNA sequencing) และเปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างจะทำให้ทราบถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่แน่ชัดขึ้น รวมถึงเป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของม้าน้ำ และที่สำคัญเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในด้านอื่นๆ อีกมาก (Bartlett and Davidson, 1991; Carr Marshall, 1991; Lockwood *et.al*., 1993; Iguchi *et.al*, 1997)

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. kuda

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *H. kuda* นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาด้านพันธุกรรมมาก่อน ในครั้งนี้จึงทดลองศึกษาในบริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพราะเป็นบริเวณที่มีอัตราการแทนที่และความหลากหลายสูงอีกตำแหน่งหนึ่ง โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาตามที่รายงานโดย Chow and Ushiama (1995) ที่ศึกษาโครงสร้างประชากรของปลา albocore (*Thunnus alalunga*) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองกับม้าน้ำ *H. kuda* จาก 2 แหล่ง คือ จังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราด จำนวน 30 ตัวอย่าง คือจาก ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง และจาก ต.ท่าพริก อ.เมือง จ.ตราด จำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในตำแหน่งยีน ATPase ใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 40°ซ ได้ผลิตผล PCR 2 แถบ มีขนาด 900 และ 300 คู่เบสโดยประมาณ แต่แถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสจะเป็นตำแหน่งที่ไม่มีความจำเพาะ เพราะเมื่อทดลองเพิ่มอุณหภูมิในช่วง annealing ให้สูงขึ้นแถบนี้ก็จะหายไปหรือจางกว่าเดิม แต่ที่อุณหภูมิของการ annealing ที่ 40°ซ นี้จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสเสมอในทุกตัวอย่าง และเมื่อทดสอบการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 7 ชนิด คือ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Tag*I พบว่ามีเพียง *Hae*III เท่านั้นที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ขนาด 900 คู่เบสได้ และไม่ย่อยแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ด้วย แสดงว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสนี้ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์รูปแบบที่จำเพาะตัวหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ดังนั้นเลือกใช้เฉพาะ *Hae*III เท่านั้นย่อยผลิตผล PCR ทุกตัวอย่าง พบว่าได้รูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะตัวเพียงแบบเดียว จึงเป็นไปได้ว่ายังไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมภายในประชากรม้าน้ำทั้งสองแหล่ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการกระจายตัวของประชากรม้าน้ำชนิดนี้ในบริเวณกว้าง หรืออาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในแต่ละแหล่งมีน้อยเกินไป ทำให้ยังไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมก็เป็นได้ แต่ทั้งนี้ในการเก็บตัวอย่างม้าน้ำแต่ละครั้งมีข้อจำกัดหลายประการที่ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้มาก เช่น ฤดูกาล และต้องอาศัยชาวประมงในการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ในปัจจุบันจำนวนประชากร

ของม้าน้ำลดลงอย่างมาก อีกทั้งขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับแหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งแพร่กระจาย ลักษณะการดำรงชีวิต รวมทั้งแหล่งการทำประมงที่แน่ชัดนอกจากเหตุผลดังที่กล่าวมาแล้ว ในด้านเทคนิคการศึกษาด้วย RFLP ก็ควรที่จะเพิ่มชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ให้มากขึ้น เพราะเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกัน ทำให้มีโอกาสพบรูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะและมีความหลากหลายเกิดขึ้นได้

นอกจากนี้การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมยังสามารถตรวจสอบได้โดยศึกษาจากแบบแผนของโปรตีนโดยใช้วิธี starch-gel electrophoresis (นงลักษณ์ สกุลญานนท์วิทยา และคณะ, 2537; Nugroho *et.al*, 1997) หรือศึกษาดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เช่นกันแต่จะไม่ทราบบริเวณที่แน่นอนและใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวที่ขนาดสั้นกว่าปกติ (8-10 นิวคลีโอไทด์) มีเบส GC ประมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถ้าการสุ่มมีความจำเพาะในส่วนของดีเอ็นเอที่แปรผันมากก็จะได้แบบแผนที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้ ดังเช่นที่ Bardakci and Skibinsi (1993) บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์และสับสปีชีส์ของปลาหมอเทศได้ หรือในทำนองเดียวกับการศึกษาในปลา zebra fish เป็นต้น (Johnson *et.al*, 1994) หรือใช้เทคนิค PCR-SSCP วิเคราะห์ตำแหน่งยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ได้จะมีความจำเพาะต่อชนิดเช่นเดียวกัน (Hartmut *et.al*,1997)

สรุปผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอ

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์ด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุลของม้าน้ำ ทำโดยการเจาะเลือดที่บริเวณโคนหางของม้าน้ำตัวอย่างละ 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 ปี สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอมีลักษณะความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hind*III จะมีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส และสามารถนำไปเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลขั้นต่อไปได้

การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำ 3 ชนิด คือ *H. spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณยีน 18S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมจากตัวอย่างเลือดในบัฟเฟอร์ TNES-Urea โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส GGGCAAGTCTGGTGCC และ GGTCTGTGATGCCCTT ที่อุณหภูมิ denature เท่ากับ 95^{o}ซ เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55^{o}ซ เวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72^{o}ซ เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 ^{o}ซ เวลา 2 นาที และ 72^{o}ซ เวลา 5 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ ผลิตผล PCR ที่ได้เป็นรูปแบบจำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำ โดยที่ *H. spinosissimus* มี

แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาด 900 คู่เบส โดยประมาณ, และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส เป็นแถบเข้ม 1 แถบ และขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบสอีก 3 แถบ เป็นแถบจาง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. spinosissimus

ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. spinosissimus* จากตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่าง คือ ต. บางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี จำนวน 18 ตัวอย่าง บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง จำนวน 5 ตัวอย่าง และ ต. ท่าพริก อ.เมือง จ. ตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตั้งแต่บริเวณยีน cytochrome b จนถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส จากนั้นย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่าทุกเอนไซม์ย่อยได้ยกเว้น *Hind*III และ *Kpn*I ที่ไม่สามารถย่อยได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ทั้งสี่ชนิดย่อยผลิตผล PCR ของตัวอย่างม้าน้ำ *H. kuda* ทุกตัวอย่าง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะตัวของดีเอ็นเอ จากผลการทดสอบพบเพียงรูปแบบเดียวทุกเอนไซม์ ยกเว้น *Taq*I ที่มี 2 รูปแบบ แสดงว่ามีความแปรผันในประชากรของม้าน้ำชนิดนี้และพบภายในแหล่งเดียวกัน คือที่หมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง ซึ่งมีรูปแบบจำเพาะที่ต่างจากแหล่งอื่น

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. kuda

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. kuda* จากตัวอย่างที่ จังหวัดชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง และจังหวัดตราด จำนวน 4 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในบริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* แต่ละตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 300 คู่เบส จากนั้นย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่ามีเพียง *Hae*III ชนิดเดียวที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ขนาด 900 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ชนิดนี้ย่อยผลิตผล PCR ของตัวอย่างม้าน้ำ *H. kuda* ทุกตัวอย่าง จากผลการทดสอบพบเพียงรูปแบบเดียว ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 และ 300 คู่เบส ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงยังไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda*

เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา เจริญวิจิตรศิลป์. 2536. ม้าน้ำหนึ่งในความงามของท้องทะเล. *ผาสุก* 16(94): 34-38.

คณะประมง. 2523. คู่มือวิเคราะห์พันธุ์ปลา. กรุงเทพ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทวี หอมชง, วนัดดา คมเวช และสาธิต โกวิทวที. 2529. การเลี้ยงปลาม้าน้ำ *Hippocampus kuda* (Bleeker) ในห้องปฏิบัติการ. เอกสารงานวิจัยเลขที่ 19/2529. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล,มหาวิทยาลัยบูรพา.

ทวี หอมชง. 2534. การเลี้ยงปลาม้าน้ำ *Hippocampus kuda* (Bleeker) ในห้องปฏิบัติการและในธรรมชาติ การเจริญเติบโต อายุไข (Life span) และอัตราการรอดชีวิต. เอกสารงานวิจัย เลขที่ 44/2534, สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.

มนตรี อัตถทิพพหลคุณ และวัชรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.กรงเทพฯ: โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

วสันต์ จันทราทิตย์ ปราณี ลี้ชัยชนะ และวาสนา ศิริรังสี. 2539. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโคโมโซมและยีน. เชียงใหม่: โรงพิมพ์พงษ์สวัสดิ์.

วิชัย บุญแสง อัญชลี ทัศนาจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2541. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. กรุงเทพฯ: สำนักงานวิทยาศาสตร์และพัฒนาเทคโนโลยีแห่งชาติ.

วิโรจน์ โชติพิพัฒน์วรกุล. 2540. สารชีวโมเลกุล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

นิภาพร ก้านทอง. 2539. สภาวะหลากรูปแบบของไมโตรคอนเดรีย-ดีเอ็นเอในปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus Gunther*). วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สกุลญานนทวิทยา, อนันต์ พู่พิทยาสถาพร, สุมณฑา พรหมบุญ, พันธุ์สิน เกตุทัต และไพรบูลย์ นัยเนตร. 2537. พันธุศาสตร์ยุคใหม่. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ภิญโญ พานิชพันธ์, ประหยัด โกรมาทัต, พิณทิพ รื่นวงษา, ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, บุรชัย สนธยานนท์, สุมาลี ตั้งประดับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศรันย์ ขยันการนาวี. 2540. การศึกษาชนิดและปริมาณของม้าน้ำที่ได้จากการประมงอวนลาก ณ. ท่าเทียบเรือ ตำบลบางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรม:ปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

สุรพล ฉลาดคิด และ ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน. 2536. การเปรียบเทียบชนิดของอาหารและความเค็มที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของม้าน้ำวัย อ่อน *(Hippocampus kuda)* ในห้องปฏิบัติการ. เอกสารงานวิจัยเลขที่ 55/2536, สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2540. เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับสัตว์ทะเล. ชลบุรี: แพรวิทยา.

Asahida, T., K. Takanori, S. Kenji, and N. Ichiro. 1996. Tissue preservation and Total DNA Extraction Fish Store at Ambient Temperature Using Buffers Containing High Concentration Urea. *Fisheries Science* 62(5): 727-730.

Bardakci, F. and D.O.F Skibinski. 1994. Application of the RAPD Technique in Tilapia Fish: Species and Subspecies Identification. *Heredity*. 73 (2): 117-123.

Bartlett, E. S. and S. W. Davidson. 1991. Identification of Thunnus Tuna Species by the Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis of their Mitochondrial Cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(1): 309-317.

Beckenbach, A. T. 1991. Rapid mtDNA Sequence Analysis of Fish Populations Using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(1): 95-98.

Billington, N. and P. D. N. Hebert. 1991. Mitochondrial DNA Diversity in Fishes and its Implications for Introductions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(1): 80-94.

Bremer, A., B. Stequert, N. W. Robertson, and B. Ely. 1996. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) population. *Marine Biology*. 132(4); 547-557.

Carr, S.M. and H.D. Marshall. 1991. Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (Gadus morhua) by the polymerase chain reaction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(1): 48-52.

Chow, S., Clarke, M. E. and Walsh, P. J. 1993. PCR-RFLP Analysis on Thirteen Western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): A Simple Method for Species and Stock Identification. *Fish. Bull.* 91 (4): 619-627.

Chow, S., H. Okamot, Y. Uozumi, Y. Takeuchi and H. Takeyama. 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region. *Marine Biology* (127): 359-367.

Chow, S. and H. Ushiama. 1995. Global population structure of albacore (Thunus alalunga) in fered by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. *Marine Biology* 123: 39-45.

Gelhaus, B. U. and C. Pirmez. 1995. DNA Extraction from urea-preserved blood clots for use PCR. *Biotechniques* 11(2): 41.

Grzimek, B. 1973. Grzime's animal life Encyclopedia. New York: Van Nosttrand Reinhold Company.

Hartmut R., K. Gabriele, and T. Schmidt. 1997. Application of PCR-SSCP to Species Identification of Fishery Products. *Journal of the Science of Food and Agricuture* 74: 35-41.

Iguchi, K., Y. Tanimura, and M. Nishida. 1997. Sequence Divergence in the MtDNA Control Region of Amphidromous and Landlocked Forms of Ayu. *Fisheries Science* 63(6): 901-905.

Johnson, S. L., C. N. Midson, E. W. Callinger, and J. H. Postlethwait. 1994. Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish. *Genomic* 19(1): 152-156.

Lockwood, S. F., R. E. Dillinger Jr., T. P. Birt, J. M. Green, and T. P. Snyder. 1993. Phylogenetic Relationships among Members of the Coregoninae Inferred from Direct Sequencing of PCR-Amplified Mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2112-2118.

Lourie, S. A., A. C. J. Vincent, and H. J. Hall. 1999. Seahorse : An identification guide to the world's species and their conservation. Dorling print Limited, Surrey, 211 pp.

Moran, P., A. M. Pendas, and E. Gareia-vazqeq. 1996. Mitochondrial DNA variation in wild and hatchery broun trout (*Salmo trout*) population from spain. Aquaculture 141: 59-65.

Nugroho, E, M.,Takagi, and N. Taniguchi 1997. Practical Manual on Detection of DNA Polymorphism in Fish Population Study. *Bull. Mar. Sci, Kochi Univ.* 17: 109-129.

Okazaki,T., T. Kobayachi, and Y. Uozumi. 1996. Genetic relationships of pilchards (genus: *Sardinops*) with anti-tropical distributions. *Marine Biology* 126: 585-590.

Patarnello T., L. Bargelloni, V. Varotto, and B. Pattaglia. 1996. Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Marine Science* 126: 603-608.

Quicke, D. L. J. 1993. Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy. London: Blackie Academic & Professional.

Rosel, P. E. and B. A. Block. 1996. Mitochondiral control region Variabillity and global population structure in the swordfish (*Xiphias gladius*). *Marine Biology* 125: 11-22.

Shedlock, A. M., M. G. Haygood, T. W. Pietsch, and P. Bentzen. 1997. Enhanced DNA Extraction and PCR Amplification of Mitochondrial Genes from Formalin Fixed Museum Specimens. *Biotechniques* 22: 394-400.

Tabata, K., H. Kishioka, M. Takagi, A. Mizuta, and N. Taniguchi. 1997. Genetic Diversity of five Strains of Red Sea Bream (*Pagrus major*) by RFLP Analysis of mtDNA D-loop Region. *Fisheries Science* 63(3): 344-348.

Takashi A., K..Takanori, S. Kenji, and N. Ichiro. 1996. Tissue Preservation and Total DNA Extraction from Fish Stored at Ambient Temperature Using Buffers Containing High Concentration of Urea. *Fisheries Science* 62 (5): 727-730.

Thomas, B. and R. K. Wayne. 1996. Molecular Genetic Approaches in Conservation. New York, Oxford University Press.

Walsh, P.S., D.A. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*. 10 (4): 506-513.

ภาคผนวก

สารเคมี

1. Tricaine methane salfonate

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 200 ppm ด้วยน้ำทะเลที่มีความเค็มเท่ากับ 30 ppm

2. RNAse

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนใช้ต้องต้มในน้ำเดือดก่อน 10 นาทีและทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วด้วยการแช่ลงในน้ำแข็ง เก็บไว้ที่ -20 °ซ

3. Proteinase K

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °ซ นาน 30 นาที เก็บไว้ที่ –20 °ซ

4. Phenol

หลอมเกล็ด Phenol ในขวดสีชาที่อุณหภูมิประมาณ 50 °ซ เติมบัฟเฟอร์ TE ในปริมาตรเท่ากับ Phenol เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ TE ทำเช่นเดิมประมาณ 3-4 ครั้ง จึงเก็บสารละลาย Phenol ในที่มืดหรือตู้เย็น 4 °ซ ก่อนใช้นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิปกติ

5. Tracking dye

Bromphenol blue	1 เปอร์เซ็นต์
Xyline cyanol FF	1 เปอร์เซ็นต์
Glycerine	30 เปอร์เซ็นต์

6. λ/*Hind*III standard DNA

เตรียมความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

Stock (λ/*Hind* III) 500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร
Tracking dye	200 ไมโครลิตร
TE buffer	975 ไมโครลิตร

7. 100 bp ladder standard DNA

เตรียมความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

Stock (100bp ladder) 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร	25 ไมโครลิตร
Tracking dye	200 ไมโครลิตร
TE buffer	975 ไมโครลิตร

บัฟเฟอร์

1. TNES-Urea buffer

Trizma hydrochloride	0.1 โมลาร์; pH 9
Ethyline diamine tetra acetate	0.05 โมลาร์; pH 8
Sodium chloride	0.1 โมลาร์
Sodium dodecyl sulfate	0.2 โมลาร์

3. TE buffer

Trizma hydrochloride	0.01 โมลาร์; pH 8
Ethyline diamine tetraacetate	0.01 โมลาร์; pH 7.5

นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4.TBE Tris-borate, EDTA buffer

5x stock solution		กรัม/ลิตร สำหรับ 5x stock solution
Tris base	445 มิลลิโมลาร์	54.0 กรัม
Boric acid	445 มิลลิโมลาร์	27.5 กรัม
$Na_2EDTA*2H_2O$	10 มิลลิโมลาร์	3.72 กรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น