บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Gallenkamp, England)
2. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Carbolite, USA)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Denville scientific, USA)
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน
5. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
6. ชุดแยกขยายชิ้นดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า (Biomax, USA)
7. เครื่องเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ รุ่น T-Gradient thermoblock (Biometra, Germany)
8. อุปกรณ์ถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (Syngene, USA)
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
10. อุปกรณ์ผ่าตัด ปากคีบ
11. ไมโครทิวบ์ผนังบาง
12. pGEM T-Easy vector system (Promega, U.S.A.)
13. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit) (Vivantis, Malaysia)
14. ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตผลพีซีอาร์จากเจล QIA quick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Germany)
15. ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตผลพีซีอาร์ QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Germany)
16. ชุดสกัดพลาสมิด QIA Prep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Germany)

สารเคมี

1. SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Fluka, USA)
2. Ethanol (VWR international, France)
3. Tris Base (Promega,USA)
4. Boric acid (Univar, USA)
5. EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid) (Amresco, USA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. Guanidine Thiocynate (Fluka, USA)
7. Isopropanol (Fluka, USA)
8. Ethidium bromide (Invitrogen, USA)
9. Seakem LE Agarose gel (Comprex, USA)
10. LB Broth (Hardy Diagnostics, USA)
11. Bactoagar (Hardy Diagnostics, U.S.A.)
12. X-gal (Amresco, USA)
13. Amplicillin (T.P. Drug Laboratories, USA)
14. Nuclease free water (Promega, Singapore)
15. MS-222 (ethyl 3-aminobenzoate) (Sigma Aldrich CHEMIE, Germany)

เอนไซม์

1. *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) (New England Biolabs, USA และ Vivantis, Malaysia)
2. 10 mM dNTP Mix (Fermentas, USA)
3. Protinase K (Fermentas, USA)
4. 6x loading dye (Fermentas, USA)
5. Ribonuclease A (Sigma-Aldrich, USA)
6. เรสทริกชันเอนไซม์ (New England Biolabs, USA)

ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker)

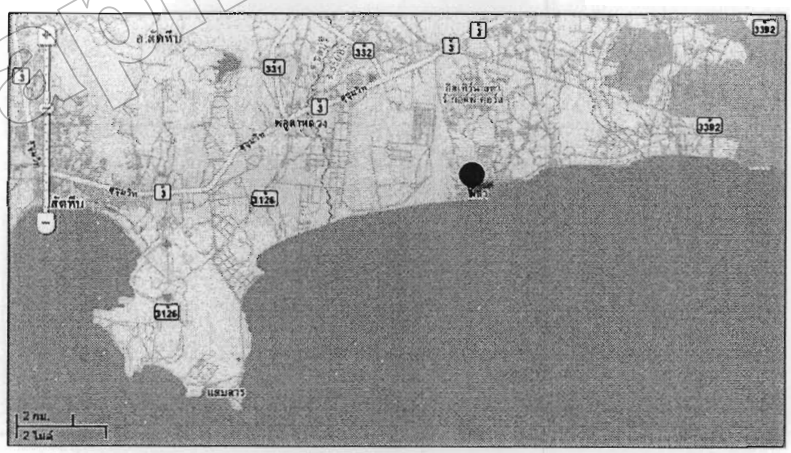
1. 1 kb Plus DNA Ladder (1.0 µg/µl) (Invitrogen, USA)
2. 100 bp DNA Ladder Plus (0.5 µg/µl) (Fermentas, USA)
3. 50 bp DNA Ladder (0.5 µg/µl) (Fermentas, USA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่ใช้ในการทดลอง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าไม่จำกัดเพศ วัย และขนาด จากธรรมชาติ (NA) ซึ่งพบว่ามีการแพร่กระจายในปัจจุบันจากบริเวณหน้าหาดพลา อ.บ้านฉาง จ.ระยอง 45 ตัวอย่าง จุดเก็บตัวอย่างจากธรรมชาติแสดงไว้ดังภาพที่ 3-1 และจากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดระยอง (RY) ภูเก็ต (PU) พังงา (PA) และชลบุรี (CN) ฟาร์มละ 10, 29, 52 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 3-1) ส่วนปลาการ์ตูนอีก 6 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) ปลาการ์ตูนแดงดำ (*A. ephippium*) ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) และปลาการ์ตูนแดง (*Premnas biaculeatus*) ที่ใช้สำหรับทดสอบและคัดเลือกยีนที่เหมาะสม ได้รับความอนุเคราะห์จากเพอคูล่าฟาร์ม ต.แสมสาร อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี

โดยนำตัวอย่างปลาการ์ตูนที่ยังมีชีวิตมาทำการสลบด้วยการแช่ในสารละลาย MS222 ความเข้มข้น 90 mg/L แล้วตัดปลายครีบหาง 1-4 ซี่ ยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วเก็บรักษาโดยแช่ครีบปลาที่ตัดได้ไว้ในเอทานอล 100% หรือแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -30°C เพื่อนำไปเตรียมดีเอ็นเอ หลังจากตัดซี่ครีบแล้วปล่อยคืนปลาสู่แหล่งอาศัยเดิม อนึ่งการทดสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจะใช้ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่ได้รับความอนุเคราะห์จากเพอคูล่าฟาร์ม จำนวน 10 ตัวอย่าง ขนาดลำตัวยาวมากกว่า 3 เซนติเมตร โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณปลายครีบหางที่เก็บรักษาไว้ในเอทานอล 100% และแช่แข็งที่ -30°C



ภาพที่ 3-1 แผนผังแสดงตำแหน่งเก็บตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) จากบริเวณหน้าหาดพลา อ.บ้านฉาง จ.ระยอง (ทัวร์ดอย, 2008)

หมายเหตุ ● คือ ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 แหล่งตัวอย่าง จำนวนและสัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิจัย

แหล่งตัวอย่าง/ประชากร	จำนวนตัวอย่าง	สัญลักษณ์
ธรรมชาติ จ. ระยอง	45	NA
ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ระยอง	10	RY
ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ภูเก็ต	29	PU
ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. พังงา	52	PA
ฟาร์มเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี	20	CN

ตอนที่ 1: ศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากเนื้อเยื่อตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้า

ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่นิยมใช้กับปลาหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จำนวน 4 วิธี คือ 1) ชุดสกัดสำเร็จรูป (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit) 2) PCR- ready genomic DNA 3) Chloroform และ 4) Guanidine Thiocyanate

ขั้นแรกเตรียมตัวอย่างปลาการ์ตูนโดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณ โคนหางของปลาการ์ตูนที่เก็บรักษาในเอทานอล 100% หรือแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -30°C แต่ละตัวอย่าง โดยใช้ใบมีดตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม และชั่งน้ำหนักชิ้นละ 10 mg จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยใช้กรรไกรตัดและใบมีดสับ แล้วใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ก่อนที่จะนำมาทำการเตรียมดีเอ็นเอในแต่ละวิธีต่อไป ซึ่งแบ่งการสกัดดีเอ็นเอ 4 วิธี ดังนี้

1) การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit, vivantis)

โดยขั้นแรกทำการเติม TL buffer ปริมาตร 280 µl ลงในหลอดทดลองที่มีเนื้อเยื่อตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร เติม Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไป-มา จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือข้ามคืนจนกว่าเนื้อเยื่อละลายหมด นำออกมาวางบนน้ำแข็ง 3 นาที ทำการปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 g/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ และเติม Ribonuclease A (20 mg/ml) ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที แล้วนำออกมาเติม TB buffer ปริมาตร 600 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 6°C เป็นเวลา 10 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 µl ผสมอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำการดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ เติม Absolute ethanol ซ้ำอีกรอบแล้วปั่นตกตะกอน ทำการล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปริมาตร 750 µl และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ และทำการล้างคอลัมน์ซ้ำอีกรอบ จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 g/นาที เป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายนำคอลัมน์วางในหลอดใหม่แล้วทำการชะด้วยน้ำ (Dnase-Rnase Free water) ปริมาตร 30 µl เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป

2) การสกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA

ทำการดัดแปลงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากรายงานการวิจัยของ Meeker et al. (2007) โดยนำเนื้อเยื่อชั่งน้ำหนักประมาณ 10 mg มาตัดเป็นชิ้นเล็ก แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, 50mM) 100 µl จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C ประมาณ 30 นาที แล้วแช่น้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม 1M Tris-HCl (pH 8.0) 1/10 เท่าของ NaOH เพื่อปรับสภาพให้เป็นกลาง แล้วดูดสารละลายส่วนใสนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3) การสกัดด้วย Chloroform

โดยทำการดัดแปลงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากรายงานการวิจัยของ Sonnenberg et al. (2007) คือ เติมสารละลาย HOM buffer (0.5% SDS, 100 mM Tris-HCl, 80 mM EDTA; pH 8.0) ลงในเนื้อเยื่อที่ตัดเป็นชิ้นเล็กและ Proteinase K (20 mg/ml) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55°C ข้ามคืน จากนั้นเติม NaCl (4.5 M) กับ chroloform ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ด้วย Absolute ethanol แล้วล้างด้วย 70% Ethanol จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ สุดท้ายชะดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป

4) การสกัดด้วย Guanidine Thiocyanate

โดยทำการดัดแปลงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากรายงานการวิจัยของ Hoss และ Paabo (1993) โดยทำการเติม Cell Lysis Solution (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl; pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) ปริมาตร 300 µl และ Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 2 µl ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปบ่มที่ 55°C ข้ามคืน จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันแล้วเติม RNase A (4 mg/ml) ปริมาตร 2 µl แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จากนั้นเติม Protein Precipitation Solution (4 M Guanidine Thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl; pH 7.5) ปริมาตร 100 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่และเติม 100% isopropanol ปริมาตร 300 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมาเบาๆ ประมาณ 50 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกแล้วเติม 70% ethanol ปริมาตร 300 µl กลับหลอดไปมา ทำการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสออก ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ (Dnase-Rnase free water) ปริมาตร 30 µl แล้วจึงเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อไว้ใช้ศึกษาด้วยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นหาค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากค่า A_{260} แล้วทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในตัวกลางเจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.0% (w/v) เทียบกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus DNA ladder ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ตอนที่ 2: การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลาการ์ตูนอานม้า

ศึกษาในบริเวณยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และบริเวณ D-loop ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

1. การออกแบบไพรเมอร์

การศึกษาในบริเวณยีน 16S rRNA ใช้คู่ไพรเมอร์ 16Sar_L /16Sbr_H (Palumbi, Martin, Romano, MacMillan, Stice, & Grabowski, 1991) ส่วนบริเวณยีน ND4-ND5 และบริเวณ D-loop ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับปลาการ์ตูนอานม้า โดยสืบค้นข้อมูลของลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวจากปลาและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีรายงานการศึกษาและบันทึกข้อมูลไว้ในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000) คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้สำหรับบริเวณ ND4-ND5 คือ ND4-L2/ND5-R2 และในบริเวณ D-loop คือ Dloop_L/R แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 3-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-2 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และ D-loop

ยีน/บริเวณที่ศึกษา	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	แหล่งอ้างอิง
ยีน 16S rRNA			
	16Sar_L	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi et al. (1991)
	16Sbr_H	CCGGTCTGAACTCTCAGATCACGT	Palumbi et al. (1991)
ยีน ND4-ND5			
	ND4-L2	GCACGAGGCCTACAAATAGC	ศึกษาในครั้งนี้
	ND5-R2	TATAGGGCAATTGGGGTGAA	ศึกษาในครั้งนี้
บริเวณ D-loop			
	Dloop_L	ACTCCCAAAGCTAGGATTCATAA	ศึกษาในครั้งนี้
	Dloop_R	CCTTAACATCTTCAGAGTTATCGTC	ศึกษาในครั้งนี้

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สำหรับการศึกษาในบริเวณยีน 16S rRNA ได้เริ่มต้นศึกษาจากปลาการ์ตูนอานม้าเปรียบเทียบกับปลาการ์ตูนชนิดอื่นอีก 5 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง (*A. sebae*) ปลาการ์ตูนแดงดำ (*A. ephippium*) และปลาการ์ตูนแดง (*Premnas biaculeatus*) และการศึกษาในบริเวณ ND4-ND5 ศึกษาเปรียบเทียบกับปลาการ์ตูนชนิดอื่น 3 ชนิด คือ ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) และ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน 16S rRNA และ ND4-ND5 ซึ่งทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 µl โดยมีส่วนผสมดังตารางที่ 3-3 ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ D-loop ทำในปริมาตรรวมทั้งหมด 25 µl โดยมีส่วนผสมแสดงดังตารางที่ 3-4 และขั้นตอนในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน 16S rRNA, ND4-ND5 และ บริเวณ D-loop แสดงในตารางที่ 3-5, 3-6 และ 3-7 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-3 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 16S rRNA และ ND4-ND5

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA (50-100 ng)	2
10 mM 16Sar_L หรือ 10 mM ND4-L2	1.5
10 mM 16Sbr_H หรือ 10 mM ND5-L2	1.5
2x master mix (N)*	10
น้ำปราศจาก nuclease	5
ปริมาตรรวม	20

หมายเหตุ (N)* = ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 3-4 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ D-loop

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ที่เจือจางด้วยน้ำ 1:10 (50-100 ng)	10
10 mM Dloop_ L	2
10 mM Dloop_ R	2
2x master mix (V)*	10
น้ำปราศจาก nuclease	1
ปริมาตรรวม	25

หมายเหตุ (V)* = ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-5 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน 16S rRNA

ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	94	180	1
Denaturation	94	50	35
Annealing	55	60	
Extension	72	50	
Final extension	72	300	1

ตารางที่ 3-6 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณยีน ND4-ND5

ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	94	180	1
Denaturation	94	50	40
Annealing	55	40	
Extension	72	60	
Final extension	72	300	1

ตารางที่ 3-7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ D-loop

ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	94	180	1
Denaturation	94	30	14 รอบ โดย
Annealing	59	30	ลดอุณหภูมิ annealing
Extension	72	60	รอบละ 0.07°C
Denaturation	94	30	19
Annealing	57	30	
Extension	72	60	
Final extension	72	300	1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การตรวจสอบผลิตผลพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส

นำผลิตผลพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 % จากนั้นเติมเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้นปริมาณ 0.5 µg/µl และนำผลิตผลพีซีอาร์ปริมาตร 3 µl ผสมกับ 2x loading dye ปริมาตร 2 µl หยอดลงในหลุมเจลทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วบันทึกภาพ

ศึกษาในบริเวณยีน ITS-1 ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

1. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบคู่ไพรเมอร์ในบริเวณ ITS-1 โดยสืบค้นข้อมูลของลำดับเบสในบริเวณยีน 18S rRNA และ 5.8S rRNA จากปลาและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีรายงานการศึกษาและบันทึกข้อมูลไว้ใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS-1 ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 µl โดยมีโดยมีส่วนผสมแสดงดังตารางที่ 3-8 จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งแสดงขั้นตอนในแต่ละรอบของปฏิกิริยาไว้ดังตารางที่ 3-9

ตารางที่ 3-8 ส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของบริเวณ ITS-1

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ที่เจือจางด้วยน้ำ 1:10 (50-100 ng)	10
10 mM Xle_ITS1 L	2
10 mM Xle_ITS2 R	2
2x master mix (V)*	10
น้ำปราศจาก nuclease	1
ปริมาตรรวม	25

หมายเหตุ (V)* = ส่วนผสมแสดงในภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-9 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์บริเวณ ITS-1

ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	94	180	1
Denaturation	94	30	35
Annealing	57	40	
Extension	72	40	
Final extension	72	300	1

นำผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % ความยาวเจล 10 เซนติเมตร ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ระยะเวลา 30 นาที

การทำผลิตผลพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

ในกรณีที่ผลิตผลพีซีอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการผ่านคอลัมน์โดยใช้ QIA quick PCR Purification Kit โดยนำผลิตผลพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้มาเติมบัฟเฟอร์ PB จำนวน 5 เท่าของปริมาตรผลิตผล ผสมให้เข้ากันใส่ในคอลัมน์ QIAquick แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดใหม่ แล้วทำการชะดีเอ็นเอในคอลัมน์ด้วยน้ำปราศจาก nuclease ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายดีเอ็นเอใส่หลอดใหม่เก็บไว้ที่ -20°C

ในกรณีที่ผลิตผลพีซีอาร์มีหลายแถบ การทำแถบดีเอ็นเอในแต่ละแถบให้บริสุทธิ์ทำโดยตัดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจลก่อนนำมาผ่านคอลัมน์โดยใช้ QIA quick Gel Extraction Kti โดยนำผลิตผลพีซีอาร์ของตัวอย่างทั้งหมดที่เพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยการทำซ้ำ 3 ซ้ำ นำมารวมกันแล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเจลใส่ในหลอดทดลอง ชั่งน้ำหนักแล้วเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (300 µl/น้ำหนักเจล 100 mg) แล้วนำมาบ่มที่ 50°C หรือจนกว่าเจลละลายหมดแล้วสังเกตสีของสารละลาย (หากเป็นสีส้มหรือสีม่วงให้เติม 3 M sodium acetate, pH 5.0 ปริมาตร 2 µl) จากนั้นเติม isopropanol เท่ากับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปริมาตรของสารละลายเจล แล้วเปลี่ยนใส่คอลัมน์ QIAquick spin ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 µl แล้วปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างดีเอ็นเอที่เกาะอยู่ที่แผ่นเมมเบรนโดยการเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 µl ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทิ้งและปั่นเหวี่ยงอีก 1 นาที จากนั้นเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่แล้วทำการชะดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจาก nuclease ที่อุณหภูมิ 50°C ปริมาตร 30 µl ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดส่วนที่ผ่านคอลัมน์ใส่หลอดใหม่เก็บไว้ที่ -20°C

การโคลนชิ้นผลิตผลพีซีอาร์เข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์

1. การเชื่อมต่อผลิตผลพีซีอาร์กับเวคเตอร์ (DNA Ligation)

นำผลิตผลพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T easy Vector ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาประกอบด้วยผลิตผลพีซีอาร์ จำนวน 3 µl บัฟเฟอร์ 2x Rapid Ligation จำนวน 5 µl เอนไซม์ T4 DNA Ligase จำนวน 1 µl และพลาสมิด pGEM®-T easy (50 ng) (ภาคผนวก ข) จำนวน 0.5 µl น้ำปราศจาก nuclease จำนวน 0.5 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน (16-20 ชั่วโมง)

2. การนำดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Transformation)

นำดีเอ็นเอลูกผสม (รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ) ในข้อ 1 ที่อยู่ในหลอดทดลองวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นปิเปตจำนวน 2 µl เติมลงในหลอดทดลองที่มี completent cells (*E. coli* TOP10F; Invitrogen™ Life Technologies) จำนวน 25 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวางต่อในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำ heat shock โดยบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายหลอดทดลองวางบนน้ำแข็งอย่างรวดเร็วและทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำออกมาเติม SOC medium (2 % Tryptone, 0.5 % Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucose) ที่อุณหภูมิห้องปริมาตร 180 µl คนเบา ๆ ด้วยปิเปตทิปแล้วนำเข้าตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเซลล์ (ทรานสฟอร์เมนท์) ปริมาตร 120 µl กระจายบนผิวหน้าอาหารแข็ง (LB-agar) ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 µg/ml X-gal 40 µg/ml และ IPTG 10 µg/ml แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การตรวจสอบแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยวิธีพีซีอาร์

ทำการ replica โคโลนีเดี่ยวสีขาวลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่พร้อมกับการทำพีซีอาร์ โดยใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวดังกล่าวจุ่มในสารผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ประกอบด้วย RedTaq™ ReadyMix™ จำนวน 3 µl ไพรเมอร์ M13 Forward จำนวน 0.25 µl M13 Reverse จำนวน 0.25 µl และน้ำปราศจาก Nuclease จำนวน 2.5 µl แล้วนำไม้จิ้มฟันดังกล่าวไป streak ลงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 µg/ml X-gal 40 µg/ml และ IPTG 10 µg/ml แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ส่วนหลอดทดลองที่มีสารผสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนดังตารางที่ 3-10 จากนั้นนำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 % ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE

ตารางที่ 3-10 ขั้นตอนทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม

ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)	จำนวน (รอบ)
Pre-denaturation	94	180	1
Denaturation	94	30	30
Annealing	53	30	
Extension	72	30	
Final extension	72	300	1

การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (โดยใช้ QIA prep Spin Miniprep Kit)

นำ replica โคโลนีของแบคทีเรียสีขาวที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่ถูกตรวจสอบแล้วให้ผลบวกโดยวิธีพีซีอาร์ มาทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว (LB broth) ที่มีแอมพิซิลิน 50 µg/ml ปริมาตร 2 ml นำเข้าตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในหลอดทดลองมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 40 วินาที เทส่วนใสทิ้งเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P1 (Resuspension Buffer) จำนวน 250 µl แล้วผสมให้เข้ากันเพื่อกระจายเซลล์ จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 (Lysis buffer) จำนวน 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับไปมา 4-6 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หลังจากนั้นทำการเติมบัฟเฟอร์ N3 ทันทีปริมาตร 350 µl แล้วกลับหลอดไปมา 4-6 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ในคอลัมน์ QIAprep และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมบัฟเฟอร์ PB จำนวน 500 µl แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนที่ผ่านคอลัมน์ แล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิมเป็นเวลา 1 นาที ทำการทิ้งส่วนใสและปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้เอทานอลออกให้หมดแล้วย้ายคอลัมน์ QIAprep ใส่ในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 ml เติมน้ำปราศจาก nuclease 30 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บสารละลายพลาสมิดที่ผ่านคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับเบสโดยส่งวิเคราะห์กับบริษัทเอกชน (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) จากนั้นนำข้อมูลของลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างที่อ่าน 2 ทิศทางมาเปรียบเทียบและตรวจสอบความถูกต้องเพื่อยืนยันผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณที่ศึกษาโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.0 (Hall, 1999) และเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990)

การคัดเลือกเรสทริกชันเอนไซม์เพื่อตัดผลิตผลพีซีอาร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่ได้ทำการอ่านลำดับเบสและยืนยันผลในส่วนของยีนบริเวณที่ศึกษาเรียบร้อยแล้ว มาหาตำแหน่งตัดเพื่อทราบชนิดและคัดเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม คือ มีการตัดชิ้นดีเอ็นเอแบบสุ่มและกระจายทั่วทั้งบริเวณที่ศึกษา และแต่ละเอนไซม์ที่เลือกต้องไม่มีตำแหน่งตัดที่ซ้ำกัน ซึ่งใช้เอนไซม์ประมาณ 3-5 ชนิด จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 (Heiman, 1997) และได้แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่ใช้ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ดังตารางที่ 3-11 โดยใช้ดีเอ็นเอประมาณ 2 µg ต่อเรสทริกชันเอนไซม์ 2-5 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ผลโดยนำปริมาตรทั้งหมดมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 3.0% ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2.40 ชั่วโมง ที่มีเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 µg/µl

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-11 ตำแหน่งตัดของเรสทริกชันเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

บริเวณที่ศึกษา	ชนิดของเอนไซม์	ตำแหน่งตัด
16S rRNA	*Mse*I	T/TAA
ND4-ND5	*Bfu*CI	GATC
	*Dde*I	C/TNAG
	*Hae*III	GG/CC
D-loop	*Mse*I	T/TAA
	*Ssp*I	AAT/ATT
	*Hpy*CH4V	TG/CA
	*Ase*I	AT/TAAT
	*Hpa*II	C/CGG
ITS-1	*Hae*III	GG/CC
	*Hinf*I	G/ANTC
	*Hha*I	GCG/C
	*Hpa*II	C/CGG
	*Mnl*I	CCTC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจากรูปแบบดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยแทนค่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่างด้วย (1) และไม่ปรากฏแถบด้วย (0) โดยคิดคำนวณจากสูตร และรูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกกำหนดชื่อด้วยภาษาอังกฤษ (A-Z) แล้วนำผลการตัดด้วยเอนไซม์ทั้งหมดมาเขียนรวมกันเป็น composite haplotype ของปลาการ์ตูนอานม้าแต่ละตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Gene Tools และ Gene Directoty (Syngene, USA) โดยใช้ค่า Similarity distance ซึ่งเปรียบเทียบจากรูปแบบ composite haplotype ของแต่ละตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ทั้งบริเวณ D-loop และ ITS-1 แล้วนำมาสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram) ด้วยวิธี UPGMA โดยกำหนดค่า bootstrap 1,000 ครั้ง และกำหนด % tolerance เท่ากับ 1%

สำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากบริเวณ D-loop และบริเวณ ITS-1 ภายในประชากร โดยคำนวณ haplotype diversity (h) และ nucleotide diversity (π) จากโปรแกรม DA ซึ่งอยู่ใน Restriction Enzyme Analysis Package (REAP) (McElroy, 1992) จากนั้นทดสอบความเหมือนทางพันธุกรรมโดยใช้ Monte Carlo simulation ซึ่งอยู่ใน REAP โดยค่าที่ได้จะบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างประชากรปลาการ์ตูนอานม้าที่มาจากแต่ละแหล่งที่ทำการศึกษาทั้งหมด 5 แหล่ง

การคำนวณความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งต่างๆ ทำการวิเคราะห์จาก (1) Analysis of Molecular Variance (AMOVA; Excoffier, Laval & Schneider, 1992) และ (2) genetic distance และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากร (cluster analysis) การทดสอบ AMOVA โดยวิเคราะห์จาก F-Statistics (F_{ST}) ด้วยโปรแกรม ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, inpress) จากนั้นทำการสร้าง genetic distance matrix (bootstrap = 100 ครั้ง) โดยใช้โปรแกรม Mitochondrial DNA Distance Analysis Program (MTDIS) (Danzmann, 1998) แล้วทำการสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม Phylip 3.6 (Felsenstein, 2004) สำหรับ consensus tree ที่สร้างได้สามารถดูได้จากโปรแกรม Treeview (Page, 1996) โดยกำหนดค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University