

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูล composite haplotype บริเวณ D-loop และ ITS-1
ของประชากรปลาการ์ตูนน้ำจืดจาก 5 แหล่ง

ตารางที่ ผ-1 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปลาการ์ตูนจากแหล่งธรรมชาติ (NA)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern	ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
NA1	h1 AAAA	10011111111000001000011000001001100100	NA23	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA2	h2 AB BB	10011111111000100000011000100001101100	NA24	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA3	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA25	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA4	h6 ADCC	10011111111001000000011001000001101100	NA26	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA5	h6 ADCC	10011111111001000000011001000001101100	NA27	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA6	h7 ADEA	10011111111001000000011000000011100100	NA28	h10 AFED	10011111111000000000111000000011100110
NA7	h9 AEDD	1001111111100000000101000010001100110	NA29	h6 ADCC	1001111111100100000001100100000110100
NA8	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA30	h16 BDCC	0101111111100100000001100100000110100
NA9	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA31	h6 ADCC	1001111111100100000001100100000110100
NA10	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA32	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA11	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA33	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA12	h6 ADCC	1001111111100100000001100100000110100	NA34	h12 AGFE	10011111111000000010011000000101000101
NA13	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA35	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA14	h17 BEDA	0101111111100000000101000010001000100100	NA36	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100
NA15	h8 AEDA	1001111111100000000101000010001000100100	NA37	h22 CFED	00011111111000000000111000000011100110
NA16	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA38	h22 CFED	00011111111000000000111000000011100110
NA17	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA39	h21 CB BB	000111111110000100000011000100001101100
NA18	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA40	h19 CAAB	00011111111000001000011000001001101100
NA19	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA41	h20 CAAD	00011111111000001000011000001001100110
NA20	h8 AEDA	1001111111100000000101000010001000100100	NA44	h21 CB BB	00011111111000100000011000100001101100
NA21	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100	NA45	h16 BDCC	0101111111100100000001100100000110100
NA22	h4 ACBB	10011111111000010000011000100001101100			

ตารางที่ ๘-2 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปกาเกอะญอจำนวนมากจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ภูเก็ต (PU)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern	ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
RY1	h4 ACBB	100111111110000100000110001000001101100	PU10	h18 BIHC	0101111111110100000000011010000001110100
RY2	h4 ACBB	1001111111110000100000110001000001101100	PU11	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY3	h4 ACBB	1001111111110000100000110001000001101100	PU12	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY4	h13 AHGC	10011111111100000000011100000001110100	PU13	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY5	h4 ACBB	1001111111110000100000110001000001101100	PU14	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY6	h13 AHGC	10011111111100000000011100000001110100	PU15	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY7	h13 AHGC	10011111111100000000011100000001110100	PU17	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY8	h4 ACBB	1001111111110000100000110001000001101100	PU18	h3 ABHC	1001111111110001000000011010000001110100
RY9	h4 ACBB	1001111111110000100000110001000001101100	PU19	h23 CIHC	0001111111110100000000011010000001110100
RY10	h13 AHGC	10011111111100000000011100000001110100	PU20	h18 BIHC	0101111111110100000000011010000001110100
PU1	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU21	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100
PU2	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU23	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100
PU3	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU24	h5 ACHC	100111111111000010000011010000001110100
PU4	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU25	h5 ACHC	100111111111000010000011010000001110100
PU6	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU26	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100
PU7	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU27	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100
PU8	h14 AIHC	1001111111110100000000011010000001110100	PU28	h5 ACHC	100111111111000010000011010000001110100
PU9	h18 BIHC	0101111111110100000000011010000001110100	PU29	h5 ACHC	100111111111000010000011010000001110100

ตารางที่ ผ-3 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ D-loop ของประชากรปลากีร์ตูนมาจากแหล่งพะเยาเพียง จ. พังงา (PA)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern	ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
PA1	h3 ABHC	100111111100100000001010000001110100	PA28	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA2	h3 ABHC	100111111100010000001010000001110100	PA29	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA3	h3 ABHC	100111111100010000001010000001110100	PA30	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA4	h3 ABHC	100111111100010000001010000001110100	PA31	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA5	h3 ABHC	100111111100010000001010000001110100	PA32	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA6	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA33	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA7	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100	PA34	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA8	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100	PA35	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA9	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100	PA37	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA11	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100	PA38	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA12	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100	PA39	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA14	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100	PA40	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA15	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA42	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA17	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA43	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA18	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA44	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA19	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA45	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA20	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA46	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA22	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA47	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA23	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA48	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA24	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA49	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA25	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA50	h18 BIHC	010111111101000000001010000001110100
PA26	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA51	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100
PA27	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100	PA52	h14 AIHC	100111111101000000001010000001110100

ตารางที่ ผ-4 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype-บริเวณ D-loop ของประชากรปลากวี่ตุนานำจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ชลบุรี (CN)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
CN1	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN2	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN3	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN4	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN5	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN6	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN7	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN8	h11 AGFB	100111111100000010011000000101101100
CN9	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN10	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN11	h4 ACBB	10011111110000100000110001000001101100
CN12	h11 AGFB	1001111111000000010011000000101101100
CN13	h11 AGFB	1001111111000000010011000000101101100
CN14	h11 AGFB	1001111111000000010011000000101101100
CN15	h15 AJFB	1001111111000000100011000000101101100
CN16	h2 ABBB	100111111100001000000110001000001101100
CN17	h2 ABBB	100111111100001000000110001000001101100
CN18	h15 AJFB	1001111111000000100011000000101101100
CN20	h15 AJFB	1001111111000000100011000000101101100

ตารางที่ ผ-5 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาน้ำจืด (NA)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern	ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
NA1	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA23	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA2	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA25	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111
NA3	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA26	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA4	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA27	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA5	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA28	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA6	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA29	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA7	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA30	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA8	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA31	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA10	h2 BAAA	01010100101110100101111110011111	NA32	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA11	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA33	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111
NA12	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA34	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111
NA13	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA35	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111
NA14	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA36	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111
NA15	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA37	h4 CBAA	10110010101110100101111110011100
NA16	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA38	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111
NA17	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA39	h5 CCAA	10110010101110100101111110011101
NA18	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA40	h5 CCAA	10110010101110100101111110011101
NA19	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA41	h6 CCBB	10110010101110000101111010011101
NA20	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA42	h6 CCBB	10110010101110000101111010011101
NA21	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	NA44	h7 CBBB	10110010101110000101111010011100
NA22	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111	NA45	h7 CBBB	10110010101110000101111010011100

ตารางที่ ผ-6 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาที่รู้ต้นอานมาจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. ระยอง (RY) และ จ. ภูเก็ต (PU)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern	ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
RY1	h3 CAAA	10110010101110100101111110011111	PU10	h10 ^o DAAC	10110100101111010010111111101111
RY2	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	PU11	h12 CBCC	1011001010110001001111111011100
RY3	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	PU12	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY4	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	PU13	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY5	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	PU14	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY6	h1 AAAA	10110110101110100101111110011111	PU15	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY7	h4 CBAA	10110010101110100101111110011100	PU17	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY8	h8 AAAB	10110110101110100101111101001111	PU18	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY9	h8 AAAB	10110110101110100101111101001111	PU19	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
RY10	h8 AAAB	10110110101110100101111101001111	PU20	h13 CBCB	101100101011000100111111010011100
PU1	h9 AAAC	10110110101110100101111111011111	PU21	h1 AAAA	101101101011110100101111110011111
PU2	h9 AAAC	10110110101110100101111111011111	PU22	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU3	h9 AAAC	10110110101110100101111111011111	PU23	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU4	h10 DAAC	10110100101110100101111111011111	PU24	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU5	h10 DAAC	10110100101110100101111111011111	PU25	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU6	h10 DAAC	10110100101110100101111111011111	PU26	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU7	h10 DAAC	10110100101110100101111111011111	PU27	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU8	h9 AAAC	10110110101110100101111111011111	PU28	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111
PU9	h10 DAAC	10110100101110100101111111011111	PU29	h9 AAAC	10110110101111010010111111011111

ตารางที่ ผ-7 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลากัดสวนอานม้าจากแหล่งเพาะเลี้ยง จ. พังงา (PA)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern	ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
PA1	h14 AADD	10110110101110101101111111111111	PA28	h19 CBCE	10110010101100010011101010011100
PA2	h14 AADD	101101101011101011011111111111	PA29	h19 CBCE	10110010101100010011101010011100
PA3	h15 AAAD	10110110101110100101111101111111	PA31	h14 AADD	10110110101110101101111111111111
PA4	h15 AAAD	10110110101110100101111101111111	PA32	h20 ECDF	10110001011110101101111000111101
PA5	h14 AADD	10110110101110101101111111111111	PA33	h14 AADD	10110110101110101101111111011111
PA6	h15 AAAD	10110110101110100101111110111111	PA34	h14 AADD	10110110101110101101111111111111
PA7	h14 AADD	10110110101110101101111111111111	PA35	h21 AADF	10110110101110101101111000111111
PA8	h14 AADD	10110110101110101101111111111111	PA36	h14 AADD	10110110101110101101111111011111
PA9	h15 AAAD	10110110101110100101111111111111	PA37	h22 DADD	10110100101110101101111111101111
PA11	h15 AAAD	10110110101110100101111111111111	PA38	h22 DAAD	10110100101110100101111111111111
PA12	h16 CBAB	10110010101110100101111010011100	PA39	h21 AADF	10110110101110101101111000111111
PA14	h1 AAAAA	1011011010111010010111111110011111	PA40	h15 AAAD	10110110101110100101111110111111
PA15	h1 AAAAA	1011011010111010010111111110011111	PA41	h23 EAAD	10111100101110100101111110111111
PA16	h17 CBDA	1011001010111010110111111110011100	PA42	h24 EAAA	10111100101110100101111110011111
PA19	h18 AADA	1011011010111010110111111110011111	PA43	h24 EAAA	10111100101110100101111110011111
PA20	h18 AADA	1011011010111010110111111110011111	PA44	h24 EAAA	10111100101110100101111110011111
PA21	h30 CBEB	10110010101101000101111010011100	PA45	h24 EAAA	10111100101110100101111110011111
PA22	h30 CBEB	10110010101101000101111010011100	PA47	h24 EAAA	10111100101110100101111110011111
PA23	h31 CBEE	10110010101101000101101010011100	PA48	h1 AAAAA	10110110101110100101111110011111
PA24	h31 CBEE	10110010101101000101101010011100	PA49	h1 AAAAA	10110110101110100101111110011111
PA26	h31 CBEE	10110010101101000101101010011100	PA51	h1 AAAAA	10110110101110100101111110011111
PA27	h19 CBCE	101100101011000100111101010011100	PA52	h25 ABCB	10110110101100010011111010011100

ตารางที่ ผ-8 ข้อมูลรูปแบบ composite haplotype บริเวณ ITS-1 ของประชากรปลาน้ำจืดหางปลาเลีย จ. ชลบุรี (CN)

ตัวอย่าง	composite haplotype	Endonuclease pattern
CN1	h24 EAAA	1011110010111010010111110011111
CN2	h24 EAAA	1011110010111010010111110011111
CN3	h24 EAAA	1011110010111010010111110011111
CN4	h24 EAAA	1011110010111010010111110011111
CN5	h26 EAAB	1011110010111010010111101001111
CN6	h27 CBAB	101100101110100101111010011100
CN7	h28 CAAB	10110010111010010111101001111
CN8	h27 CBAB	101100101110100101111010011100
CN9	h28 CAAB	10110010111010010111101001111
CN11	h28 CAAB	10110010111010010111101001111
CN12	h28 CAAB	10110010111010010111101001111
CN13	h11 CADA	10110010111010110111110011111
CN14	h11 CADA	10110010111010110111110011111
CN15	h11 CADA	10110010111010110111110011111
CN16	h28 CAAB	10110010111010010111101001111
CN17	h27 CBAB	101100101110100101111010011100
CN18	h28 CAAB	10110010111010010111101001111
CN20	h29 ABAB	1011011011110100101111010011100

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. 2X master mix (Thermopol, USA)

10X buffer	2 ไมโครลิตร
10 mM dNTP mix	0.4 ไมโครลิตร
5X Q-solution	1 ไมโครลิตร
250 unit <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1 ไมโครลิตร
เติมน้ำปราศจาก nuclease	6.5 ไมโครลิตร

2. 2X master mix (Vivantis, Malaysia)

10X buffer	2 ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	0.6 ไมโครลิตร
10 mM dNTP mix	0.4 ไมโครลิตร
250 unit <i>Taq</i> DNA polymerase	0.2 ไมโครลิตร
เติมน้ำปราศจาก nuclease	16.8 ไมโครลิตร

3. 5X TBE

Tris base	54 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
Na ₂ EDTA	3.72 กรัม

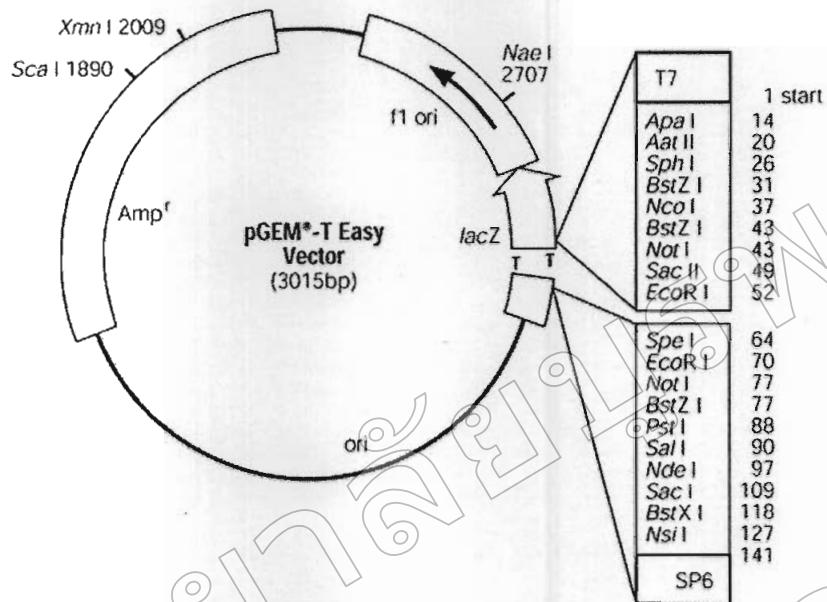
เติมน้ำกลั่นแล้วละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำการปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. Cell lysis buffer

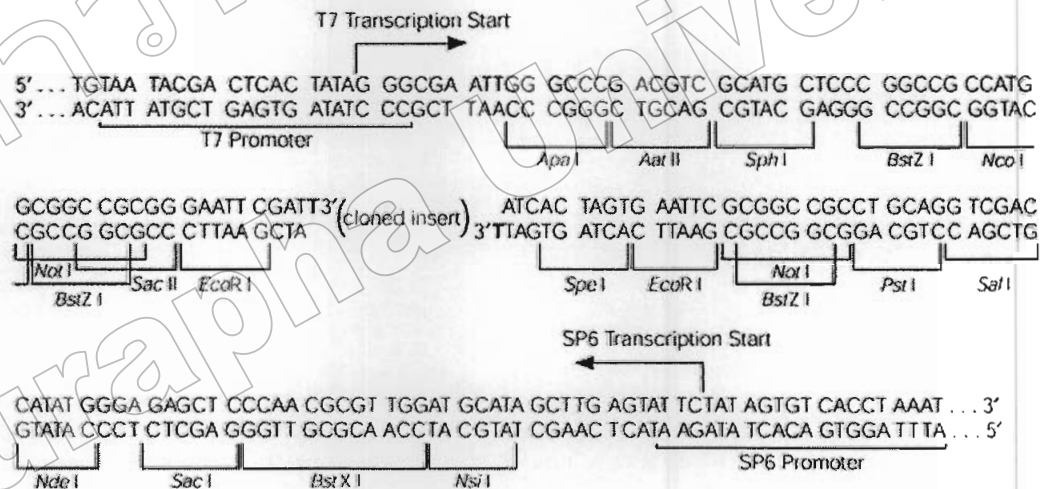
ตวงปริมาตรสารชนิดต่างๆ ดังนี้

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)	500 ไมโครลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	100 ไมโครลิตร
0.1% SDS	500 ไมโครลิตร

เติมน้ำปราศจาก nuclease แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปรับปริมาตรสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร



pGEM®-T Easy Vector



ภาพที่ ผ-1 แผนที่ลำดับเบสของดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T easy Vector

(Pusan National University, 2008)

ภาคผนวก ค

ผลงานเผยแพร่วิชาการจากงานวิจัย

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณยีน ND4-ND5 ของปลาการ์ตูน
(*Amphiprion* spp.) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP
ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN THE ND4-ND5 GENES REGION
OF CLOWNFISHES (*Amphiprion* spp.) USING PCR-RFLP

อรัทัย มังคลาด¹, ชุตตา บุญภักดี²

1. โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี 20131
2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี 20131

Oratai Mangkalad¹ and Chuta Boonphakdee²

1. Graduated School of Environmental Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand
2. Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

* Corresponding author Fax: +66-(0)38-393489, Email address: chuta@buu.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเทคนิคทางอนุชีววิทยาเริ่มมีบทบาทสำคัญและนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการแบ่งชนิดของสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวาง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าและระดับชนิดระหว่างปลาการ์ตูน 4 ชนิด (*Amphiprion polymnus*, *A. sandaracinos*, *A. ocellaris* และ *A. percula*) ในครั้งนี้ทำการวิเคราะห์บริเวณยีน ND4-ND5 ของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบขึ้นใหม่ (ND4-L2/ND5-R2) ปรากฏว่าได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดเท่ากันในปลาการ์ตูนทุกชนิด คือ 895 คู่เบส และเมื่อตัดผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเรสทริกชัน เอนไซม์ *BfuCI* และ *DdeI* ปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับชนิดของปลาการ์ตูน แต่ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอภายในประชากร (n=20) ของปลาการ์ตูนอานม้าเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *BfuCI*, *DdeI*, *BfuCI*+*HaeIII* และ *DdeI*+*HaeIII*

คำสำคัญ: saddleback clownfish/ *Amphiprion*, ND4/ND5/ mitochondrial DNA/ PCR-RFLP

บทนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกปลาทะเลประเภทสวยงามเป็นสินค้าจำหน่ายยังต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายล้านบาท ซึ่งปลาการ์ตูนเป็นปลาสวยงามชนิดหนึ่งที่มีสีสันสะดุดตา และได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ทำให้ปลาการ์ตูนจากธรรมชาติถูกลักลอบจับเป็นจำนวนมาก (สุขใจ รัตนขุวรร และคณะ, 2548) ส่งผลให้จำนวนประชากรของปลาการ์ตูนชนิดต่าง ๆ ลดลงมากจนเกือบเข้าภาวะวิกฤติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาการ์ตูนอานม้า (saddleback clownfish; *Amphiprion polymnus*) ซึ่งเป็น 1 ใน 2 ชนิดที่พบในทะเลฝั่งอ่าวไทย

ปลาการ์ตูนเป็นปลาที่ถูกจัดอยู่ในครอบครัวปลาคลิดฮิน (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2542) ปัจจุบันปลาการ์ตูนในแถบมหาสมุทรอินโด-แปซิฟิก มีทั้งหมด 27 ชนิด เป็นสกุล *Amphiprion* และสกุล *Premnas* อีก 1 ชนิด ซึ่งลักษณะที่ใช้จำแนกปลาสกุล *Premnas* ออกจากสกุล *Amphiprion* คือ การมีหนามขนาดใหญ่ที่บริเวณ

ได้คำ อย่างไรก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกในช่วงวัยอ่อนของปลาการ์ตูนยังไม่สามารถแยกชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน เช่น ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) และปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ที่มีรูปแบบและสีสันทึบใกล้เคียงกันมาก มีเพียงแถบสีดำที่เกิดขึ้นในช่วงโตเต็มวัยของปลาการ์ตูนเพอคูล่าเท่านั้นที่สามารถแบ่งแยกออกจากกันได้ (Allen, 1974) ดังนั้นวิธีที่จำแนกชนิดปลาการ์ตูนได้อย่างรวดเร็วโดยการศึกษาในระดับยีนรวมทั้งข้อมูลในระดับพันธุกรรมซึ่งมีการรายงานผลที่ถูกต้อง ชัดเจน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการจัดการทรัพยากรและการอนุรักษ์ปลาการ์ตูนของไทย

การศึกษาข้อมูลในระดับพันธุกรรมโดยเฉพาะในไมโทคอนเดรียคลิเอ็นเอมีรายงานไว้อย่างมากมาย (Cameron & Whiting, 2007; Jonniaux & Kumazawa, 2007 และ Ponce et al., 2007) และพบว่ามี ความแปรผันมากในระดับประชากร โดยเฉพาะในบริเวณยีน ND4 ถึง ND5 (Miya et al., 2005) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงานให้กับเซลล์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ไมโทคอนเดรียคลิเอ็นเอมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่านิวเคลียสคลิเอ็นเอและการถ่ายทอดพันธุกรรมเป็นการถ่ายทอดผ่านทางแม่ ไม่เกิดการผสมพันธุกรรมจากฝ่ายพ่อซึ่งต่างจากนิวเคลียสคลิเอ็นเอที่ได้มาจากเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ (สมพร ประเสริฐสงสกุล, 2547) ไมโทคอนเดรียคลิเอ็นเอของสัตว์มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดประมาณ 16-20 กิโลเบส สำหรับปลาการ์ตูนมีรายงานไว้เฉพาะปลาการ์ตูนส้มขาวมีจำนวน 16,649 คู่เบส (Genbank รหัสหมายเลข AP006017.1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างบริเวณ ND4 ถึง ND5 มีขนาดทั้งหมด 3,245 คู่เบส ซึ่งมียีน $rRNA^{His}$, $rRNA^{Ser(AGY)}$ และ $rRNA^{Lys(CUN)}$ คั่นอยู่ (Mabuchi et al., 2007) และด้วยเทคนิค PCR-RFLP (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) ที่ใช้เอนไซม์ EcoRI ซึ่งมีบริเวณจดจำบนลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะตัดคลิเอ็นเอ ผลจากการตัดทำให้ได้ความหลากหลายของชิ้นส่วนคลิเอ็นเอ ลักษณะหรือรูปแบบที่เกิดขึ้นภายหลังการแยกชิ้นส่วนคลิเอ็นเอด้วยเอนไซม์ EcoRI จะมีความจำเพาะกับชนิดหรือมีความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างที่ศึกษาเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน (Chirstian et al., 2000; Klossa et al., 2002; Moyses & de Almeda, 2002; Miya et al., 2005; Alam et al., 2006; Zang et al., 2006 และ Hsieh et al., 2007) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดของปลาการ์ตูน 4 ชนิด และภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า โดยสืบค้นในบริเวณระหว่างยีน ND4-ND5 ของไมโทคอนเดรียคลิเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างและการสกัดคลิเอ็นเอ

ตัวอย่างปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) และปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) เป็นปลาการ์ตูนนำเข้าและได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์ม ส่วนปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) เป็นตัวอย่างจากธรรมชาติในบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จ. ชลบุรี บางตัวอย่างได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์ม ชื่อจากชาวประมงและจากร้านขายปลาสวยงามซึ่งมีแหล่งที่มาจากอ่าวไทย ตัวอย่างปลาการ์ตูนใช้ชนิดละ 3-5 ตัวอย่าง แต่สำหรับปลาการ์ตูนอานม้าใช้ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง สกัดจีโนมคลิเอ็นเอจากเนื้อเยื่อบริเวณครีบหางที่ถูกเก็บรักษาไว้ในเอทานอล 100% หลังจากกระเทยเอทานอลแล้ว ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็ก เติม Extraction Buffer (0.5% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 80 mM EDTA pH 8) จากนั้นเติม Proteinase K (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 4.5 M NaCl แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นตกตะกอนคลิเอ็นเอด้วยเอทานอล (Miya et al., 2005)

2. การออกแบบไพรเมอร์และทำการเพิ่มขยายชิ้นคลิเอ็นเอ

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนระหว่างบริเวณ ND4-ND5 โดยสืบค้นข้อมูลของลำดับเบสบริเวณ ND4 และ ND5 จากปลาและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีการรายงานการศึกษาและบันทึกข้อมูลไว้ในธนาคารยีน (Genebank) โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000) คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ออกแบบคือ ND4-L2 และ ND5-R2 มีลำดับเบสดังนี้ 5'-GCACGAGGCCTACAAATAGC และ 5'-TATAGGGCAATTGGGGTGAA ตามลำดับ ไพรเมอร์นี้สังเคราะห์โดยบริษัทเอกชน (Invitrogen™ Life Technologies) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl; pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, เจลาติน 100 µg ml⁻¹, 0.2 mM dNTP, คู่ไพรเมอร์ ND4/ND5 อย่างละ 0.5 µM, ดีเอ็นเอปริมาณ 50-100 ng และ 0.5 ยูนิต Taq DNA Polymerase (QIAGEN Inc.)

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ เริ่มต้น Denaturation 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาอีก 39 รอบ โดยเริ่มจาก Denaturation 94°C เป็นเวลา 50 วินาที Annealing 55°C เป็นเวลา 40 วินาที และ Extension 72°C เป็นเวลา 70 วินาที Extension ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ตรวจสอบคุณภาพในอะกาโรสเจล โดยใช้ 1.0% SeaKem® LE Agarose (Cambrex Corp.) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นย้อมด้วย เอทีเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 4 µg ml⁻¹ แล้วนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แล้วบันทึกภาพไว้

3. การโคลนชิ้นดีเอ็นเอ การหาลำดับเบสและการคัดแยกยีน

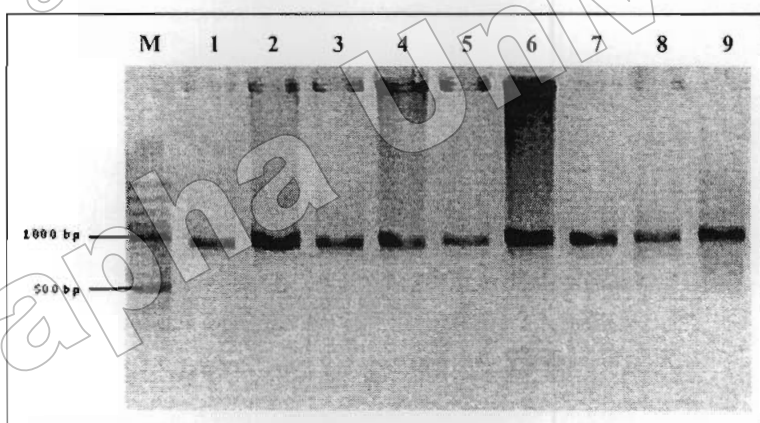
นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของบริเวณ ND4-ND5 ที่เพิ่มขยายได้จากตัวอย่างปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) มาโคลนและหาลำดับเบส โดยเริ่มจากนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป QIAquick PCR Purification (QIAGEN Inc.) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต แล้วเชื่อมต่อกับ พลาสมิด pCR®2.1 Plasmid (Invitrogen™ Life Technologies) จากนั้นทรานส์ฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* TOP 10 แล้วคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยใช้แอมพิซิลินและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN Inc.) วิเคราะห์ลำดับเบสของพลาสมิดที่ได้กับบริษัทเอกชน (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) ส่วนปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) อ่านลำดับเบสโดยตรงจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างที่อ่าน 2 ทิศทางมาเปรียบเทียบความเหมือนและตรวจสอบเพื่อยืนยันผลลำดับเบสของ ND4-ND5 ในปลาการ์ตูนโดยใช้โปรแกรม Bioedit version 7.0.0 (Hall, 1999) และ BLAST (Altschul et al., 1990) ตามลำดับ

4. วิเคราะห์ตำแหน่งตัดที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

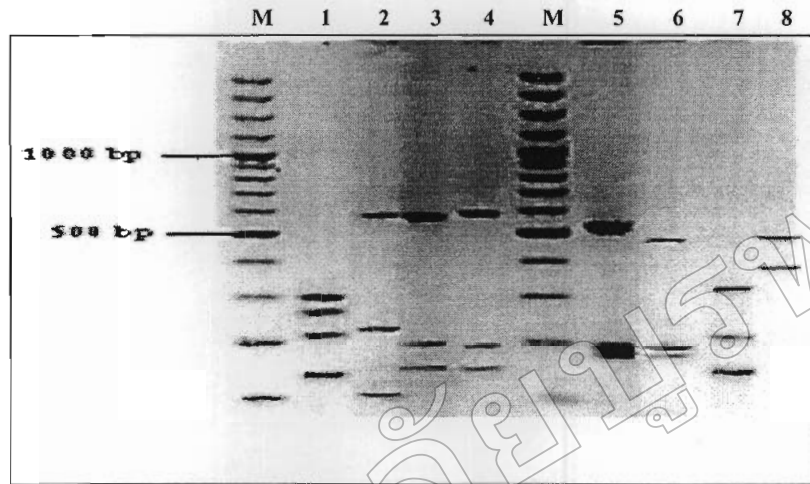
นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปลาการ์ตูน *A. sandaracinos* และ *A. polymnus* หาคำแหน่งตัดเพื่อคัดเลือกเอนไซม์ที่ตัดในบริเวณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของยีน ND4-ND5 โดยใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 (Heiman, 1997) คัดเลือกได้เอนไซม์ *Bfu*CI และ *Dde*I มาใช้ศึกษากับตัวอย่างปลาการ์ตูนทั้ง 4 ชนิด ส่วนการศึกษาความแปรผันระดับพันธุกรรมภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้าเน้นเพิ่มการตัดด้วย *Hae*III อีก 1 เอนไซม์ร่วมกับการใช้เอนไซม์ 2 ชนิดตัดร่วมกัน คือ *Bfu*CI, *Dde*I, *Bfu*CI+*Hae*III และ *Dde*I+*Hae*III โดยปฏิกิริยาการตัดของเอนไซม์ทั้งหมดนี้ทำในปริมาตรรวม 20 µl ซึ่งประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 1 µg เอนไซม์ 10 ยูนิต (New England Biolabs, UK) และ 2x Digestion Buffer 10 µl แล้วบ่มไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ถูกย่อยมาทำการแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 2.0% SeaKem® LE Agarose (Cambrex Corp.) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นย้อมด้วย เอทีเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 4 µg ml⁻¹ แล้วเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอของปลาการ์ตูนแต่ละชนิด

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

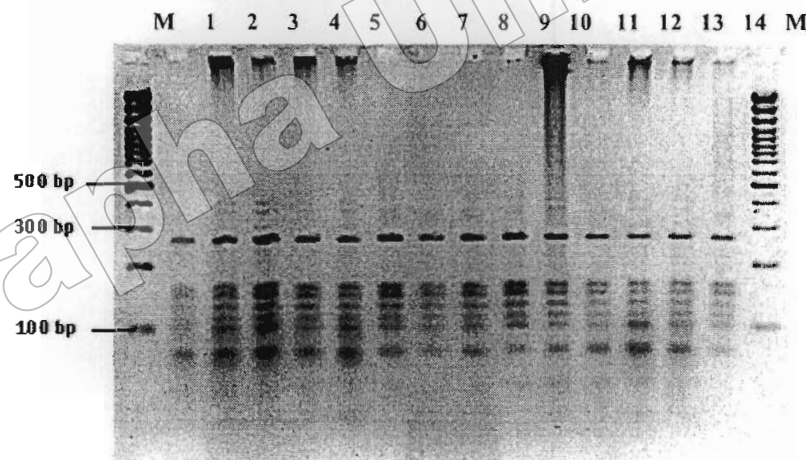
ปลาการ์ตูนทั้ง 4 ชนิด (*A. ocellaris*, *A. percula*, *A. polymnus* และ *A. sandaracinos*) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ND4-ND5 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ (ND4-L2 และ ND5-R2) ได้ขนาดเท่ากันคือ 895 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งยืนยันผลด้วยการโคลนและอ่านลำดับเบสในปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) และจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ที่เป็นการอ่านลำดับเบสจากผลผลิตพีซีอาร์โดยตรง ภายหลังจากคัดเลือกชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำบนลำดับนิวคลีโอไทด์ในปลาทั้งสองชนิดดังกล่าวแล้ว พบว่าเมื่อตัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ *BfuCI* และ *DdeI* พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างปลาการ์ตูนทั้ง 4 ชนิด นั่นคือเมื่อใช้ *BfuCI* รูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะหลังตัดในปลาการ์ตูนอานม้าปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอแถบเข้ม 4 แถบ (ขนาด 129, 207, 274 และ 305 คู่เบส) ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้มปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอเข้ม 3 แถบ (129, 205 และ 561 คู่เบส) ปลาการ์ตูนเพอคูล่าปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอเข้ม 3 แถบ (129, 178 และ 570 คู่เบส) ส่วนปลาการ์ตูนส้มขาวมี 3 แถบ (129, 178 และ 588 คู่เบส) ซึ่งในภาพดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 100 คู่เบสปรากฏไม่ชัดเจนอาจเนื่องมาจากปริมาณดีเอ็นเอน้อยเกินไป หรืออาจเป็นเพราะดีเอ็นเอชิ้นสั้น ๆ มีเบสที่ย้อมติดสีได้น้อยกว่าดีเอ็นเอชิ้นที่ยาวกว่า ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้เอนไซม์ *DdeI* ในปลาการ์ตูนอานม้าปรากฏชัดเจน 3 แถบ (176, 193 และ 526 คู่เบส) ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้มมีแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 3 แถบ (176, 193 และ 406 คู่เบส) ปลาการ์ตูนเพอคูล่าปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน 3 แถบ (158, 240 และ 335 คู่เบส) ส่วนปลาการ์ตูนส้มขาวมีแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 2 แถบ (369 และ 460 คู่เบส)



ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ในบริเวณ ND4-ND5 ขนาด 895 คู่เบสของปลาการ์ตูนบนทะเลอะโครอส 1% ช่อง 1-3 คือ ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ช่อง 4, 5 คือ ปลาการ์ตูนอินเดียแดงส้ม (*A. sandaracinos*) ช่อง 6, 7 คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) และช่อง 8, 9 คือ ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp ปฏิกิริยา PCR ควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอนั้นไม่เกิดผลผลิต (ไม่ได้แสดงผล)



ภาพที่ 2 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ภายหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Bfu*CI (ช่อง 1-4) และ *Dde*I (ช่อง 5-8) ของปลาการ์ตูน 4 ชนิด ช่อง 1, 5 คือ ปลาการ์ตูนอานม้า (*A. polymnus*) ช่อง 2, 6 คือ ปลาการ์ตูนอินเดียนแดงส้ม (*A. sandaracinos*) ช่อง 3, 7 คือ ปลาการ์ตูนเพอคูล่า (*A. percula*) และช่อง 4, 8 คือ ปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ส่วนช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp



(A)



ภาพที่ 3 รูปแบบ PCR-RFLP ในบริเวณ ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละตัวอย่างภายหลังตัดด้วย *BfuCI*+*HaeIII* (A) และ *DdeI*+*HaeIII* (B)

สำหรับการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในประชากรของปลาการ์ตูนอานม้า ($n=20$) นั้นเมื่อตัดดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนบริเวณ ND4-ND5 ในแต่ละตัวอย่างด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน คือ *BfuCI*+*HaeIII* และ *DdeI*+*HaeIII* พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏภายหลังตัดด้วย *BfuCI*+*HaeIII* ของปลาการ์ตูนอานม้าทุกตัวอย่างมีรูปแบบเหมือนกันปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 7 แถบ (ขนาดประมาณ 87, 96, 111, 130, 143, 180 และ 259 คู่เบส) ดังแสดงในภาพที่ 3(A) (แสดง 14 ตัวอย่าง) และเช่นเดียวกันกับการตัดด้วย *DdeI*+*HaeIII* รูปแบบดีเอ็นเอหลังตัดไม่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง คือปรากฏแถบดีเอ็นเอเพิ่มจำนวน 5 แถบ (ขนาดประมาณ 60, 165, 176, 240 และ 286 คู่เบส) แสดงในภาพที่ 3 (B) (แสดง 12 ตัวอย่าง)

กล่าวโดยสรุป ไพรมเมอร์ที่ออกแบบใหม่ในครั้งนี้สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของปลาการ์ตูนทั้ง 4 ชนิดที่ศึกษา (*A. ocellaris*, *A. percula*, *A. polymnus* และ *A. sandaracinos*) ได้ขนาดเท่ากันคือ 895 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอภายหลังตัดด้วยเอนไซม์ *BfuCI* และ *DdeI* พบความแตกต่างของปลาการ์ตูนแต่ละชนิดอย่างชัดเจน เนื่องจากรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเฉพาะสำหรับปลาการ์ตูนแต่ละชนิดเท่านั้น แต่ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอในตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าแต่อย่างใดเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน คือ *BfuCI*+*HaeIII* และ *DdeI*+*HaeIII* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบริเวณ ND4-ND5 มีความแปรผันไม่มากนักสามารถบ่งชี้ได้ในระดับชนิด แต่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างในระดับประชากรแต่ละตัวอย่างของปลาชนิดเดียวกัน หรืออาจพบได้ถ้ามีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 895 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ทั้งนี้ควรที่จะศึกษาในบริเวณอื่นในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่มีตัวอย่างการศึกษาในปลาบางชนิดแล้วร่วมด้วย เช่น 16S rRNA (Klossa et al., 2002), 12S rRNA (Zang et al., 2006), D-loop (Asntini & Polacco, 2006) และ cytochrome b (Christian et al., 2000) เป็นต้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบความผันแปรทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้า ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในระดับที่สูงขึ้นและทำให้เกิดประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้บางส่วนได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และคุณนฤมล พิสิฐเกษม ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาการ์ตูนเพื่อใช้ในการศึกษา คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- สมพร ประเสริฐสงสกุล. (2547). พันธุศาสตร์โมเลกุล (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไทร์เพช.
- สุภาพร สุกสีเหลือง. (2542). มินวิทยา. ชลบุรี: หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยง ฝ้ายวิจัย สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุขใจ รัตนขจร, กรรณิกา ชัชวาลวานิช, พิสุทธิ มังกรกาญจน์ และอมรา ทองปาน. (2548). การเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนในปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus* Linnaeus). รายงานการวิจัย สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Allen, G.R. (1974). *The anemonefish*. U.S.A.: T.F.H. Publication.
- Alam, M. T., Das, M. K., Dev, V., Ansari, M. A., & Sharma, Y. D. (2006). PCR-RFLP method for the identification of four member of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 239-244.
- Asntini, S., & Polacco, G. (2006). Finding Nemo: Molecular phylogeny and evolution of the unusual life style of anemonefish. *Gene*, 385, 19-27.
- Cameron, S. L., & Whiting, M. F. (2007). The complete mitochondrial genome of the tobacco homworm, *Manduca sexta*, (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. *Gene*, 408, 112-123.
- Chirstian, W., Martin, B., Philipp, H., & Luthy, J. (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*, 33, 144-150.
- Heiman, M. (1997). Webcutter 2.0. from: <http://www.ccsi.com/firstmarket/cutter/cut2.html>.
- Hsieh, H-S., Chai, T-J., & Hwng, D-F., (2007). Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed product of billfish meat. *Food Control*, 18, 369-374.
- Jonniaux, P., & Kumazawa, Y. (2007). Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Gene*, 407, 105-115.
- Klossa-K. E., Papatotriopolos, V., Kilias G., & Alahiotis, S. (2002). Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. *Food Control*, 13, 169-172.

การประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9 วันที่ 14-15 มีนาคม 2551 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

- Miya, M., Saitoh, K., Wood, R., Nishida, M., & Mayden, R.L. (2005). New primer for amplifying and sequencing the mitochondrial ND4/ND5 gene region of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi). *Ichthyological Research*, 53, 75-81.
- Moyses, C.B., & de Almeida-T.L.F. (2002). Restriction Fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astynax* (Pisces, Characidae). *Genetic and Molecular Biology*, 25, 401-407.
- Ponce, M., Infante, C., Jimenez-Cantizano, R.M., Perez, L., & Manchado, M. (2007). Complete mitochondrial genome of the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Perciformes: Sparidae), with high levels of length heteroplasmy in the WANCY region. *Gene*, 409, 44-52.
- Zang, J., Hung, H., Cai, Z., & Huang, L. (2006). Species identification in salt product of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12s rRNA gene sequence. *Food Control*, 17, 557-563.

DNA ISOLAION AND ANALYSIS OF THE ND4-ND5 SEQUENCES FROM SADDLEBLACK ANEMONEFISH (*Amphiprion polymnus*)

Oratai Mangkalad¹ and Chuta Boonphakdee²

¹Graduate School of Environmental Science program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

Corresponding author Fax: +66-(0)38-393489

Email address: chuta@buu.ac.th

In this study, we examined DNA isolation methods from 10 specimens of frozen and 100% ethanol- preserved fin clip of the saddleback anemonefish (*Amphiprion polymnus*). Four different methods; 1) GF-1 tissue DNA extraction kit, 2) PCR-ready genomic DNA, 3) Chloroform, and 4) Guanidine Thiocyanate were tested. The results allow us to propose for DNA isolation the PCR-ready genomic DNA. It is the simplest method; quick, using small size of fin-clip and requires no hazardous chemicals. The sample can be process directly for PCR and the ND4-ND5 mitochondrial region was successfully amplified from all samples tested. The PCR-ready genomic DNA method is suitable for simultaneous processing of a large number of samples. Analysis of the ND4-ND5 gene sequences of the saddleback anemonefish compared to that of other available database in GenBank revealed a 26 bp insertion, which is specific to the genus *Amphiprion*. Therefore, would be use analysis genetic diversity for identification of anemonefish from another fish and expect that the ND4-ND5 mitochondrial sequences can be used for the saddleback anemonefish genetic analysis at the population-level.

Keywords: DNA isolation, ND4-ND5 mtDNA gene, *Amphiprion polymnus*

การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน ND4-ND5
จากปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*)
DNA ISOLATION AND ANALYSIS OF THE ND4-ND5 SEQUENCES FROM
SADDLEBLACK ANEMONEFISH (*Amphiprion polymnus*)

อรทัย มังคลาด¹, ชุตตา บุญภักดี²

¹โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี 20131

*สามารถติดต่อได้ที่: +66-(0)38-393489, Email address: chuta@buu.ac.th

Oratai Mangkalad¹ and Chuta Boonphakdee²

¹Graduate School of Environmental Science program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

Corresponding author Fax: +66-(0)38-393489, Email address: chuta@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากซีลริบของปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*) จำนวน 10 ตัวอย่างที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งและในเอทานอล 100% โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 4 วิธี คือ 1) ชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 tissue DNA extraction kit, 2) PCR- ready genomic DNA, 3) Chloroform และ 4) Guanidine Thiocyanate ผลการศึกษาพบว่า PCR- ready genomic DNA เป็นวิธีที่เหมาะสมใช้เนื้อเยื่อปริมาณน้อย มีขั้นตอนการสกัดที่ใช้ระยะเวลาสั้น และไม่ต้องใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย ได้ดีเอ็นเอที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน ND4-ND5 ในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ จึงเหมาะสมสำหรับการศึกษาที่ต้องสกัดดีเอ็นเอจากจำนวนตัวอย่างมาก ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ND4-ND5 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาบางชนิดที่มีรายงานใน GenBank พบบริเวณจำเพาะขนาด 26 bp กับสกุล *Amphiprion* ที่ไม่ปรากฏในปลาชนิดอื่น ดังนั้นจะสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อนำมาใช้จำแนกกลุ่มปลาการ์ตูนออกจากกลุ่มปลาชนิดอื่น ๆ และคาดว่าบริเวณ ND4-ND5 จะสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าในระดับประชากรได้ต่อไป

คำสำคัญ: วิธีสกัดดีเอ็นเอ, ND4-ND5, *Amphiprion polymnus*

บทนำ

ปลาการ์ตูน (anemonefish, clownfish) เป็นปลาที่จัดอยู่ในครอบครัวปลาสลิคหิน (Pomacentridae) เป็นปลาทะเลสวยงามกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งมีส่วนแบ่งตลาดเกือบร้อยละ 50 ของปลาทะเลสวยงามทั่วโลก โดยมีมูลค่าตลาดภายในประเทศประมาณ 150 ล้านบาท และปัจจุบันไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศประมาณ 2-3 ล้านบาททุกปี (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2548) ทำให้มีการลักลอบจับปลาการ์ตูนจากธรรมชาติ ส่งผลให้ประชากรของปลาการ์ตูนในแหล่งธรรมชาติลดลงอย่างมากจนเกือบเข้าภาวะวิกฤติ (สุขใจ, กรรณิกา,

พิสุทธิ และอมรา, 2548) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*) ซึ่งเป็น 1 ใน 2 ชนิดที่มีรายงานการพบในทะเลฝั่งอ่าวไทยซึ่งมีการแพร่กระจายในบริเวณจำกัด เนื่องจากความจำเพาะของแหล่งอาศัยที่ต้องอาศัยร่วมกับดอกไม้ทะเล (Allen and Fautin, 1994) ดังนั้นจึงควรศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้จัดการทรัพยากรปลาการ์ตูนอานม้า เช่น การอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม พัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยง การตรวจสอบแหล่งที่มาของตัวอย่างในแหล่งเพาะเลี้ยง เป็นต้น ซึ่งนำไปสู่การวางแผนการอนุรักษ์และส่งเสริมการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ เป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญมากต่อการศึกษาข้อมูลพันธุกรรมด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เนื่องจากแต่ละวิธีมีขั้นตอน ข้อดีและข้อเสีย ความเหมาะสมที่แตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต เช่น การสกัดดีเอ็นเอจากเมือกปลาอะโรวาน่าด้วยวิธีฟีนอล/คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในอดีต เพราะได้ดีเอ็นเอที่ค่อนข้างมีคุณภาพและบริสุทธิ์ (นันทริกา ชันชื้อและคณะ, 2548) แต่วิธีการนี้มีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากและใช้เวลาในการเตรียมนาน อีกทั้งอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากฟีนอลเป็นสารอันตรายและมีกลิ่นฉุน หรือการใช้ Chloroform (Rainer *et al.*, 2007) และ Guanidine Thiocyanate (Carter and Milton, 1993; Hoss and Paabo, 1993) ในการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ใช้เวลาและขั้นตอนในการเตรียมค่อนข้างนาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อของปลาการ์ตูนอานม้า จำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษา มีขั้นตอนในการเตรียมดีเอ็นเอน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น มีความสะดวก ราคาถูกและได้สารพันธุกรรมตั้งต้นที่มีคุณภาพเพื่อนำไปใช้ศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไปได้

การศึกษาข้อมูลในระดับพันธุกรรมในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (Jonniaux and Kumazawa, 2007) เพื่อใช้บอกความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรหรือระหว่างกลุ่มประชากร โดยเฉพาะในบริเวณยีน ND4-ND5 มีความแปรผันมากในระดับประชากรของปลาที่อาศัยในน้ำจืด (Miya *et al.*, 2005) รวมทั้งพบว่าในบริเวณยีน ND4 มีอัตราการแทนที่เบส (transition) หรือการสลับตำแหน่งของเบส (transversion) ประมาณ 5% (Takacs *et al.*, 2005) ซึ่งส่งผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร โดยยีน ND4-ND5 เกี่ยวข้องกับการผลิตพลังงานให้กับเซลล์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอและถ่ายทอดพันธุกรรมจากฝ่ายแม่เท่านั้น (สมพร ประเสริฐสงสกุล, 2547) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่สามารถใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนได้ในบริเวณยีน ND4-ND5 และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเพื่อพิจารณานำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับประชากรของปลาการ์ตูนชนิดนี้ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าจากแหล่งธรรมชาติ บริเวณหน้าหาดพลา อ.บ้านฉาง จ.ระยอง 10 ตัวอย่าง จากนั้นทำการสลับด้วยการแช่ลงในสารละลาย MS222 ความเข้มข้น 90 mg/L แล้วตัดปลายครีบท่าง 1-4 ซม. ประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยเก็บรักษาไว้ในเอทานอล 100% หรือแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -30°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งใช้เนื้อเยื่อ 20 มิลลิกรัมในแต่ละวิธีที่ทำการศึกษา

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

วิธีที่ 1) การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (GF-1 Tissue DNA Extraction Kit, vivantis) ตามคำแนะนำของบริษัทโดยขั้นแรกทำการเติม TL buffer (280 µl) และ Proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 20 µl แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ

60°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน จากนั้นวางบนน้ำแข็ง 3 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ และเติม Ribonuclease A (20 mg/ml) ปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที แล้วนำออกมาเติม TB buffer ปริมาตร 600 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที และเติม Absolute ethanol แล้วทำการดูดสารละลายใส่ในคอลัมน์ ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย Wash buffer ปริมาตร 750 µl และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำคอลัมน์วางในหลอดใหม่แล้วทำการชะด้วยน้ำ 30 µl เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป

วิธีที่ 2) การสกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA

ทำการคัดแปลงขั้นตอนจากรายงานการวิจัยของ Meeker และคณะ (2007) โดยนำเนื้อเยื่อมาตัดเป็นชิ้นเล็ก (ประมาณ 20 mg) แล้วนำไปต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (50 mM ปริมาตร 100 µl) แล้วเติม 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1/10 เท่าของ NaOH แล้วดูดสารละลายส่วนใสไปศึกษาในขั้นต่อไป

วิธีที่ 3) การสกัดด้วย Chloroform (Rainer *et al.*, 2007)

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 chloroform ทำให้เกิดชั้นเอเทคตะกอน ด้วย Absolute ethanol แล้วล้างด้วย 70% Ethanol จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ สุดท้ายชะดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

วิธีที่ 4) การสกัดด้วย Guanidine Thiocyanate

ทำการเติม Cell Lysis Solution (100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl; pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) และ Proteinase K (20 mg/ml) แล้วนำไปบ่มที่ 55°C ข้ามคืน จากนั้นเติม RNase A (4 mg/ml) แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม Protein Precipitation Solution (4 M Guanidine Thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl; pH 7.5) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่และเติม 100% isopropanol ผสมให้เข้ากันโดยพลิกกลับไปมาเบาๆ แล้วนำไปแช่ใน -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกแล้วเติม 70% ethanol กลับหลอดไปมา ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสออก ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ 30 µl แล้วจึงเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ

โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นหาค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

4. ไพรมเมอร์และการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ

ทำการออกแบบไพรมเมอร์ที่มีความจำเพาะกับปลาการ์ตูนอนม้าโดยออกแบบในส่วนของยีน ND4-ND5 บนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยการสืบค้นข้อมูลของลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวจากปลาและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่มีรายงานการศึกษาและบันทึกไว้ในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) คู่ดีเอ็นเอไพรมเมอร์ที่ออกแบบได้คือ ND4-L2 (5'-GCACGAGGCCTACAAATAGC-3') และ ND5-R2

(5'-TATAGGGCAATTGGGGTGAA-3') ซึ่งจะทำได้ผลิตผลพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

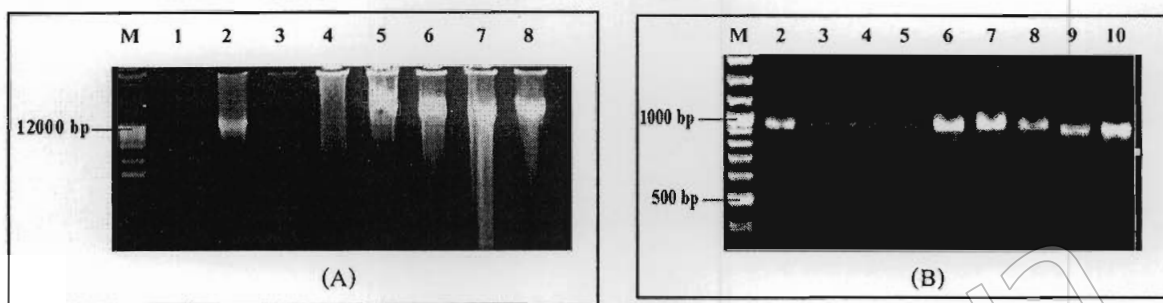
ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำในปริมาตรรวม 20 µl ที่ประกอบด้วย บัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา (PCR master mix; 10x Thermopol buffer, 5x Q-Solution, 10 mM dNTP mix, 5U/µl *Taq* DNA polymerase และ nuclease free water) จำนวน 10 µl ดีเอ็นเอเป้าหมายที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 2 µl (ประมาณ 50-100 ng) คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ ND4-L2 และ ND5-R2 ความเข้มข้น 10 µM ที่ออกแบบได้ชนิดละ 1.5 µl และ nuclease free water จำนวน 5 µl จากนั้นทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ เริ่มต้น pre-denaturation 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาอีก 39 รอบ โดยเริ่มจาก denaturation 94°C เป็นเวลา 50 วินาที annealing 55°C เป็นเวลา 40 วินาที และ extension 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 % ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ความเข้มข้น 4 µg/ml แล้วนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแล้วบันทึกภาพไว้

5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบลำดับเบส

นำผลิตผลพีซีอาร์บริเวณยีน ND4-ND5 ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสกับบริษัทเอกชน (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) โดยทำการอ่านลำดับเบสโดยตรงจากผลิตผลพีซีอาร์ จากนั้นนำข้อมูลจากการอ่าน 2 ทิศทางมาเปรียบเทียบความเหมือนและตรวจสอบเพื่อยืนยันผลว่าเป็นลำดับเบสของยีน ND4-ND5 ในปลาการ์ตูนแอนม้า โดยโปรแกรม Bioedit version 7.0.0 (Hall, 1999) และ BLAST (Altschul *et al.*, 1990) ตามลำดับ จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสของบริเวณยีน ND4-ND5 เปรียบเทียบกับข้อมูลบริเวณเดียวกันของปลาการ์ตูนและปลาบางชนิดที่มีในฐานข้อมูล GenBank ดังนี้ *Amphiprion ocellaris*, *Abudefduf vaigiensis*, *Coreoperca kawamebari*, *Monodactylus argenteus*, *Lutjanus kasmira*, *L. Rivulatus*, *Balistapus undulates*, *Percina macrolepidia*, *Pseudomonacanthus peroni* และ *Gallus gallus* ซึ่งมีหมายเลขรหัส คือ AP006017, AP006016, AP005990, AP009169, FJ416614, AP006000, AP009203, DQ536430, AP009225 และ AP003580 ตามลำดับ โดยหมายเลขรหัส AP003580 นำมาเปรียบเทียบเพื่อใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม(out group) เพื่อให้เห็นความแตกต่างของลำดับเบสในบริเวณ ND4-ND5 ที่ชัดเจนมากขึ้น ส่วนข้อมูลของ *Amphiprion ephippium* และ *A. sandaracinos* นำมาจาก อร์ทัยและซุตา (2551) จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson *et al.*, 1997)

ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

เมื่อสกัดดีเอ็นเอ 10 ตัวอย่าง จากตัวอย่างแช่แข็งและตัวอย่างที่เก็บรักษาในเอทานอล 100% ของปลาการ์ตูนแอนม้า ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี ได้แก่ 1) ชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit 2) PCR- ready genomic DNA 3) Chloroform และ 4) Guanidine Thiocyanate หลังจากละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วทำอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดมากกว่า 12 กิโลเบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb plus DNA Ladder แต่ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากวิธี PCR- ready genomic DNA ไม่ปรากฏแถบขึ้น (รูปที่ 1A) อาจเนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยไปหรือมีการละลายดีเอ็นเอที่เจือจางมากเกินไปจนไม่สามารถตรวจสอบได้ ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit, Chloroform และ Guanidine Thiocyanate ปรากฏแถบขึ้นขนาดมากกว่า 12 กิโลเบส แต่ดีเอ็นเอที่ได้มีการขาดของดีเอ็นเอเล็กน้อย ซึ่งจะปรากฏเป็นลักษณะแถบยาว (smear) ในรูปที่ 1A และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ND4-ND5 พบว่าผลิตผลพีซีอาร์ของปลาการ์ตูนแอนม้าโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจาก 4 วิธี มีขนาดประมาณ 900 คู่เบสทุกตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 1B (แสดงเพียง 1 วิธีและบางตัวอย่าง)



รูปที่ 1 เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้าที่สกัดได้จาก 4 วิธี (A) และแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณเบส ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอานม้าที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA (B)

ช่อง M คือ 1 kb Plus DNA Ladder (A), 100 bp DNA Ladder-Plus (B)

รูป A ช่อง 1-2 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit

ช่อง 3-4 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA

ช่อง 5-6 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วย Chloroform

ช่อง 7-8 คือ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วย Guanidine Thiocyanate

หมายเหตุ: ช่อง 1, 3, 5 และ 7 เป็นตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่เก็บด้วยวิธีแช่แข็ง

ช่อง 2, 4, 6 และ 8 เป็นตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าที่แช่ในเอทานอล 100%

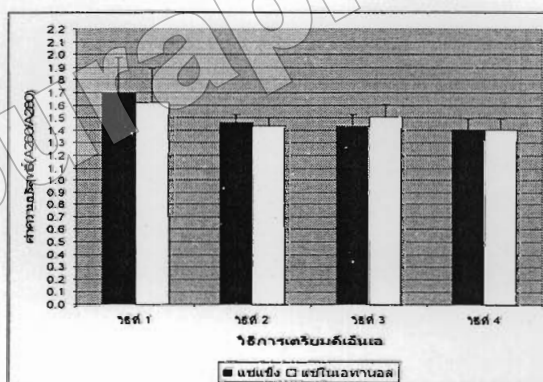
รูป B ช่อง 2-5 คือ ตัวอย่างแช่แข็ง

ช่อง 6-10 คือ ตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100%

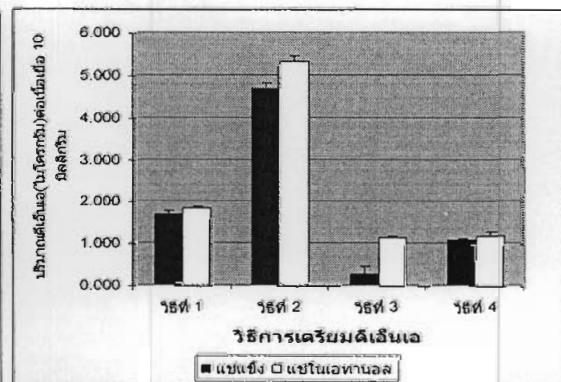
เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากการสกัดทั้ง 4 วิธี ไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอและทำการเปรียบเทียบทั้งคุณภาพ ปริมาณของตัวอย่างแช่แข็งกับตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100% รวมถึงระยะเวลาในการเตรียม สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 2 จากตารางพบว่า ดีเอ็นเอจากตัวอย่างแช่แข็งที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit มีความบริสุทธิ์มากที่สุดคือ 1.700 ± 0.274 และดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100% ที่สกัดด้วยวิธี Guanidine Thiocyanate มีความบริสุทธิ์น้อยที่สุดคือ 1.406 ± 0.108 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธี นอกจากนี้ตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100% ที่สกัดด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด คือ ประมาณ $5.309 \pm 0.135 \mu\text{g}/\text{เนื้อเยื่อ } 10 \text{ mg}$ และตัวอย่างแช่แข็งที่สกัดด้วย Chloroform ให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ ประมาณ $0.256 \pm 0.192 \mu\text{g}/\text{เนื้อเยื่อ } 10 \text{ mg}$

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 4 วิธี

วิธีสกัดดีเอ็นเอ	ความบริสุทธิ์ (A_{260}/A_{280})	ปริมาณดีเอ็นเอ ($\mu\text{g}/\text{เนื้อเยื่อ}$ 10 mg)	ระยะเวลา ในการสกัด	ผลของ ปฏิกิริยา PCR ใน บริเวณ ND4/ND5
1. ชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit			45 นาที	
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.700 ± 0.274	1.697 ± 0.067		+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.620 ± 0.125	1.809 ± 0.067		+
2. PCR- ready genomic DNA			25 นาที	
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.463 ± 0.063	4.697 ± 0.118		+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.439 ± 0.099	5.309 ± 0.135		+
3. Chloroform			8 ชั่วโมง	
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.428 ± 0.099	0.256 ± 0.192		+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.504 ± 0.135	1.135 ± 0.033		+
4. Guanidine Thiocyanate			7 ชั่วโมง	
- ตัวอย่างแช่แข็ง	1.406 ± 0.087	1.070 ± 0.033		+
- ตัวอย่างแช่ในเอทานอล	1.406 ± 0.108	1.159 ± 0.094		+



(A)



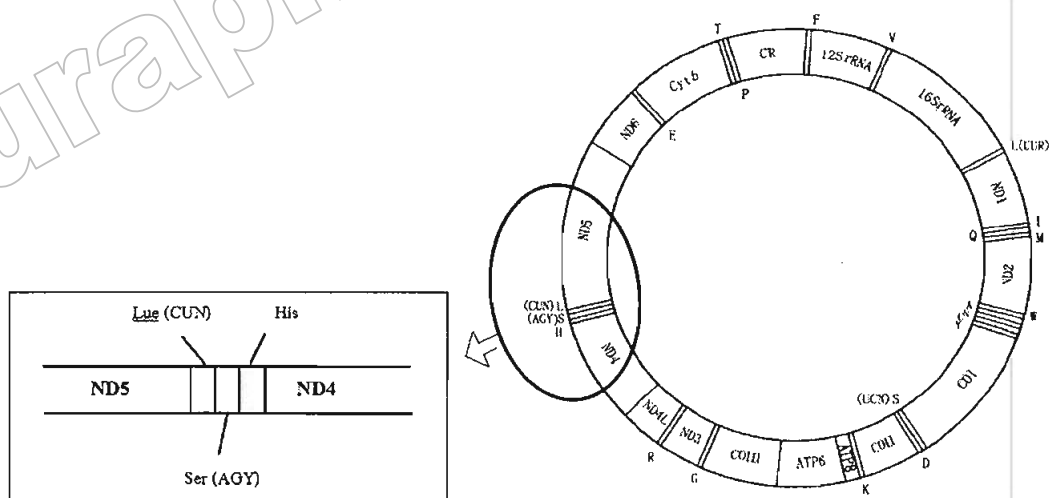
(B)

รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (A) และค่าเฉลี่ยปริมาณดีเอ็นเอ (B) จากตัวอย่างแช่แข็งและตัวอย่างที่แช่ในเอทานอล 100% จากวิธีสกัดทั้ง 4 วิธี

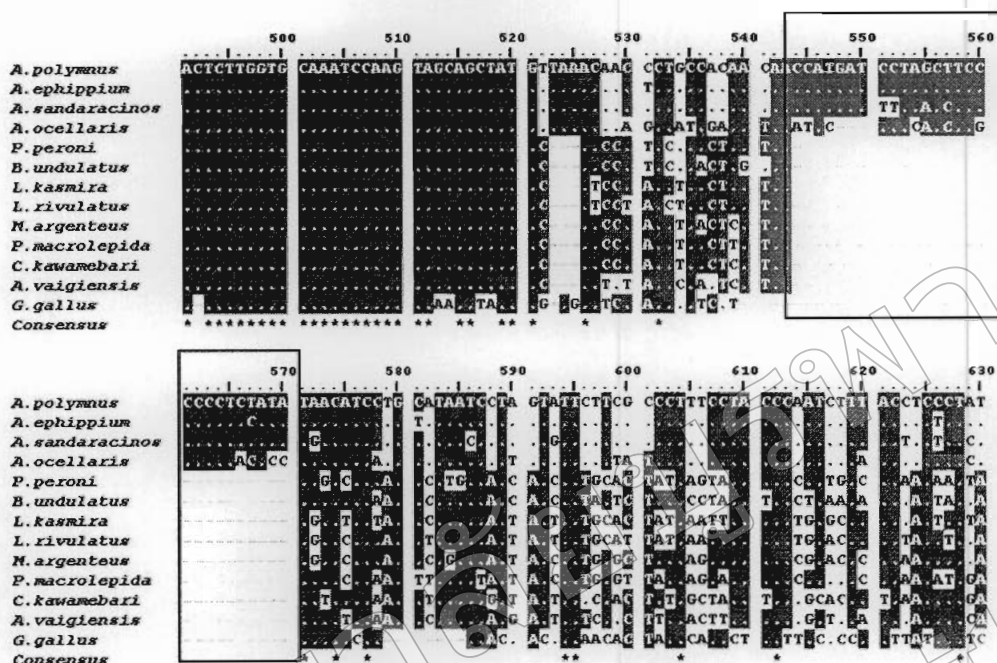
จะเห็นได้ว่าค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างแช่แข็งและเก็บรักษาในเอทานอล 100% ของชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction kit และ PCR- ready genomic DNA มีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 1.4-2.0 สำหรับค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างแช่แข็งและแช่ในเอทานอล 100% ของวิธี Chloroform และ Guanidine Thiocyanate มีค่าประมาณ 1.3-1.7 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสายคู่ตามทฤษฎี ควรมีค่าประมาณ 1.6-1.9 (สุรินทร์ ปิยโชคณากุล, 2548) จึงจัดได้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธี Chloroform และ Guanidine Thiocyanate มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยวิธีดังกล่าวมีการปนเปื้อนของโปรตีน อาร์เอ็นเอ หรือ Chloroform และทั้ง 2 วิธียังใช้เวลานานในการสกัดอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบแต่ละวิธีจะเห็นได้ว่า การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR- ready genomic DNA เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อปลาการ์ตูนอานม้ามากที่สุด คือ ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด และใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นเพียง 25 นาที (Meeker *et al.*, 2007) ถึงแม้ว่าจะมีค่าความบริสุทธิ์น้อยกว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดสกัด GF-1 tissue DNA extraction kit ก็ตาม แต่ก็สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ND4-ND5 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้เช่นกัน อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีอื่นๆ เนื่องจากใช้สารเคมีที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ

สำหรับบริเวณยีน ND4-ND5 มีขนาดประมาณ 3,245 คู่เบส ซึ่งคิดเป็น 19.49% ของยีนทั้งหมดในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ [ข้อมูลจากปลาการ์ตูนส้มขาว (*A. ocellaris*) ในฐานข้อมูล GenBank หมายเลขรหัส AP006017] ซึ่งโดยทั่วไปยีนในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของปลา มีขนาดประมาณ 15-18 Kb (Cui *et al.*, in Press) ทั้งนี้ได้แสดงองค์ประกอบของยีนที่ทำการศึกษานี้ไว้ในรูปที่ 3 และเมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือน (multi-alignment) ในบริเวณยีน ND4-ND5 กับปลาและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น พบว่าลำดับเบสของยีน ND4-ND5 มีความแปรปรวนสูงในกลุ่มปลา (Miya *et al.*, 2005) ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 520-630 ดังแสดงในรูปที่ 4 ทั้งนี้ในตำแหน่งที่ 544-570 ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีน tRNA-Lue ที่อยู่ระหว่างยีน ND4-ND5 ซึ่งพบเฉพาะในกลุ่มปลาการ์ตูนเท่านั้น ส่วนในปลาชนิดอื่นลำดับเบสในบริเวณนี้มีการขาดหายไป ดังนั้นน่าจะสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมเพื่อนำมาใช้จำแนกกลุ่มปลาการ์ตูนออกจากกลุ่มปลาชนิดอื่นๆ ได้เพราะลำดับเบสในบริเวณ ND4-ND5 มีความแปรปรวนสูงในปลาหลายชนิดที่ทำการเปรียบเทียบในครั้งนี้ และคาดว่าบริเวณ ND4-ND5 จะสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาการ์ตูนอานม้าในระดับประชากรได้ต่อไป



รูปที่ 3 โครงสร้างของยีน ND4-ND5 ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้และองค์ประกอบภายในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก Cui *et al.*, in Press)



รูปที่ 4 การจัดเรียงเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสในบริเวณยีน ND4-ND5 ของปลาการ์ตูนอันม้า (*A. polymnus*) เปรียบเทียบกับปลาและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (แสดงเพียงบางส่วน) สำหรับข้อมูลของ *A. ehippium*, *A. sandaracinos* นำมาจากรูทซ์และซูดา, 2551 และข้อมูลอื่นนำมาจากฐานข้อมูล GenBank รหัสหมายเลข AP006017, AP006016, AP005990, AP009169, FJ416614, AP006000, AP009203, DQ536430, AP009225 และ AP003580 โดยเรียงจากแถบบนลงล่าง ตามลำดับ

หมายเหตุ สัญลักษณ์เส้นประ (-) แสดงไม่มีลำดับเบสในตำแหน่งนั้น จุด (.) แสดงลำดับเบสที่เหมือนกันแต่ละไว้ในที่นี้ ส่วนตัวเลขด้านบนแสดงตำแหน่งลำดับเบสของตัวอย่างที่นำมาเปรียบเทียบกัน ในการศึกษครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบ ลำดับเบส 830 คู่เบส

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณฤศม พิสิษฐเกษม ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาการ์ตูนเพื่อใช้ในการศึกษา และโครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์บางส่วนในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- นันทริกา ชันซื่อ, กฤติกา อเนกชนกุล, สุเจตนา โสติพันธ์ และกฤษฎา ธิรบรรพทรัพย์. (2548). การสกัดดีเอ็นเอจากเมือกในปลาอะโรวาน่า (มังกร). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 36(4), 55-59.
- ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย.(2548). ปลาทะเลสวยงาม: การเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์. *มองเศรษฐกิจ*. ปีที่ 11 ฉบับที่ 1679.
- สุขใจ รัตนบุตร กรรณิกา ชัชวาลวนิช พิสุทธิ มังกรกาญจน์ และอมรา ทองปาน. (2548). การเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนลาวย่อนในปลาการ์ตูนอันม้า (*Amphiprion polymnus* Linnaeus). รายงานการวิจัยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. (2548). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- อรรถัย มังคลาด และชุตาน นุญรักษ์. (2551). การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณยีน ND4-ND5 ของปลาการ์ตูน (*Amphiprion spp.*) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP. ใน *เวทีนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 9* (หน้า 40). ชลบุรี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Allen, G.R. & Fautin, D.G. (1994). *Anemonefishes and their host sea anemone*. Trcta-Press. Germany.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403-410.
- Carter, M.J. & Milton, I.D. (1993). An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Research*. 21:1044.
- Cui, Z., Liu, Y., Li, C.P., You, F., & Chu, K.H. (in press). The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene*.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Hoss, M. & Paabo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*. 21, 3913-3914.
- Jonniaux, P., & Kumazawa, Y. (2007). Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Gene*. 407, 105-115.
- Meeker, N.D., Hutchinson, S.A., Ho, L., & Tredes, N.S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques*. 43, 610-614.
- Miya, M., Saitoh, K., Wood, R., Nishida, M., & Mayden, R. L. (2005). New primer for amplifying and sequencing the mitochondrial ND4/ND5 gene region of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi). *Ichthyological Research*. 53, 75-81.
- Sonnenberg, R., Nolte, W. A., & Tautz, D. (2007). An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*. 4, 1-12.
- Takacs, Z., Morales, J.C., Geissmann, T., Melnick, D.J. (2005). A complete species-level phylogeny of the Hylobatidae based on mitochondrial ND3-ND4 gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36, 456-467.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24, 4876-4882.

Species Identification of Anemonefishes using 28S Ribosomal RNA and mtDNA ND4-ND5 Genes

Chuta Boonphakdee^{1,2}, Oratai Mangkalad²

¹Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

²Graduate School of Environmental Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131

Email: chuta@buu.ac.th (Presenting author)

Abstract

Molecular methods are becoming increasingly important in taxonomic identification and classification of living things. To enable anemonefish species identification, the regions of 28s ribosomal RNA and mitochondrial ND4-ND5 genes from four species of anemonefish (*Amphiprion ocellaris*, *A. percula*, *A. polymnus* and *A. sandaracinos*) were PCR-amplified by specific primers developed in this study. Great variation in product fragment length of 28s ribosomal RNA gene was found between the different anemonefish species. While a unique fragment of approximately 895-bp of mitochondrial ND4-ND5 gene region was obtained from different fishes. Further analysis of ND4-ND5 mitochondrial DNA digested with *BfuCI* and *DdeI* endonucleases, provided specific restriction profiles that enabled direct visual identification of the anemonefishes analyzed. In this investigation, therefore, both nuclear 28s ribosomal RNA and mitochondrial ND4-ND5 genes provide a power tool as genetic markers for anemonefish species identification.

Keywords: anemonefish, clownfish, *Amphiprion*, 28s rRNA, ND4/ND5, mitochondrial DNA, mtDNA

PCR-RFLP Analysis of the mtDNA ND4-ND5 for Species Identification of Anemonefishes

Chuta Boonphakdee^{a,b*} and Oratai Mangkalad^b

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

^bGraduate School of Environmental Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131

* Corresponding author Fax: +66-(0)38-393489, Email address: chuta@buu.ac.th

ABSTRACT

To enable anemonefish species identification, the region of mitochondrial ND4-ND5 genes from four species of anemonefish (*Amphiprion ocellaris*, *A. percula*, *A. polymnus* and *A. sandaracinos*) was PCR-amplified by a pair of specific primers, ND4-L2 and ND5-R2, developed in this study. A unique fragment of approximately 895-bp was obtained from different fishes. Analysis of ND4-ND5 mitochondrial DNA digested with *BfuCI* and *DdeI* endonucleases, provided specific restriction profiles that enabled direct visual identification of the anemonefishes analyzed.

Key words: anemonefish, clownfish, *Amphiprion*, ND4/ND5, mitochondrial DNA, mtDNA, PCR-RFLP

INTRODUCTION

Anemonefishes are members of the Pomacentridae, one of the largest families in the order Perciformes. At present there are 27 species of the Indo-Pacific anemonefish genus *Amphiprion* and the monotypic anemonefish genus *Premnas* (Fautin and Allen, 1994). Morphological attributes are commonly used for anemonefish identification. However, these criteria lack reliability when apply to discriminate the juvenile stages, in particular between closely related species for example *A. ocellaris* and *A. percula*. These two fishes (being known as the fault and true percula clownfish, respectively) can only be morphologically distinguished by black stripes presented in adult stage of *A. percula* (Allen, 1974). In addition, hybrid crosses between many closely related anemonefish species have been produced in captive conditions. Therefore, a quick and reliable method for species-specific identification would be greatly useful.

In the field of teleost species identification, PCR-RFLP (RFLP: restriction fragment length polymorphism) mitochondrial DNA fragments has been widely used (see Chirstian et al., 2000; Klossa et al., 2002; Moyses and de Almeida, 2002; Miya et al., 2005; Alam et al.,

2006; Zang et al., 2006 and Hsieh et al., 2007). This methodology does not require sequencing of each unknown sample, which is costly and time-consuming. In addition with the available sequencing database and several computed programs allowed the appropriate restriction site of endonucleases can be easily obtained from the detailed sequences comparison. Selection of suitable restriction enzymes can be analyzed with the reference samples. This is to improve selection of suitable endonucleases that recognize sites for species identification (Christian et al., 2000). In this study, our goal was to assess whether the ND4-ND5 region of the mitochondrial genome contained sufficient genetic variation to be useful in species identification of anemonefish.

MATERIALS and METHODS

1. Samples and DNA extraction

All experimental anemonefishes were obtained from Percula Farm, Sameasan, Chonburi, Thailand. About 3-5 reproduced juvenile fishes of each species were collected for study. Genomic DNA was isolated from fin-clip ethanol-preserved tissues, digested in extraction buffer (0.5% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 80 mM EDTA pH 8) including proteinase K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), purified by 4.5 M NaCl and chloroform extraction and precipitated with ethanol (Miya et al., 2005).

2. ND4-ND5 primers design and DNA amplification

A pair of DNA primers, ND4-L2 (5'-GCACGAGGCCTACAAATAGC) and ND5-R2 (5'-TATAGGGCAATTGGGGTGAA), was designed following the alignment of various teleosts ND4-ND5 sequences available in GenBank, and synthesized commercially (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia). PCR reactions were performed in a 20 μl volume containing 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gelatin, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 0.5 μM of each primer, 50-100 ng of genomic DNA and 0.5 Units of *Taq* DNA polymerase (QIAGEN Inc.). The PCR thermal cycling profile was as follows: initial template denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 39 cycles of 94°C for 50 seconds, 55°C for 40 seconds, and 72°C for 70 seconds, and a final 10 minutes elongation cycle at 72°C . PCR amplified products were evaluated by agarose gel electrophoresis using 1.0% SeaKem® LE Agarose (Cambrex Corp.), run at 5 cm h^{-1} , and stained with 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ethidium bromide.

2.3. DNA cloning, sequencing and gene identification

In order to identify the amplified PCR products as the mitochondrial ND4-ND5 region, the produced PCR fragments only from *A. sandaracinos* were cloned and sequenced. The amplified products were initially purified using a QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc.), cloned into the pCR[®]2.1 plasmid (Invitrogen[™] Life Technologies) and then transformed into TOP10 competent cells provided with the kit. Positive recombinant clones were selected using ampicillin, and plasmid DNA was isolated with QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN Inc.). DNA sequencing was performed commercially (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) using M13 universal primers. The consensus nucleotide sequences were assembled with BioEdit version 7.0.0. (Hall, 1999) and analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990).

2.4 Restriction site analysis of the PCR products

The amplified DNA fragments were further used without purification. Restriction maps of the mitochondrial ND4/ND5 products from *A. sandaracinos* were obtained from Webcutter 2.0 (Heiman, 1997). From the detailed analysis, *Bfu*CI and *Dde*I (New England Biolabs) were selected as suitable candidates for discrimination of the five anemonefish species. Digestions with *Bfu*CI and *Dde*I endonucleases were individually performed in a total volume of 20 µl containing 100-200 ng amplified DNA, 10 units of enzyme, and 10 µl of 2x digestion buffer recommended by the manufacturer. The digestion reaction was incubated at 37°C for 3 hours. The digested fragments were then separated by electrophoresis in a 1.5% SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex Corp.), run at 5 cm h⁻¹ for 1 hour and stained with 4 µg ml⁻¹ ethidium bromide.

RESULTS and DISCUSSION

PCR amplification using a pair of designed primers developed in this study (ND4-L2 and ND5-R2) produced a unique fragment of approximately 890-bp from four anemonefish species analyzed (*A. ocellaris*, *A. percula*, *A. polymnus* and *A. sandaracinos*) as shown in Fig. 1. The ND4-ND5 gene fragment only from a representing species was then cloned and sequenced. The actual length of this fragment was 895 bp in *A. sandaracinos*. According to BLAST analysis, the sequences of *A. sandaracinos* mitochondrial ND4-ND5 genes region were highly similar to those of other fishes, in particular with *A. ocellaris* (GenBank accession number AP006017.1), exhibited 90% DNA identities (data not shown).

The resulting of similar lengths of the ND4-ND5 PCR products obtained from each species, this amplified fragment cannot be served as identical marker for anemonefish species discrimination. Therefore, further digestion of the amplified fragments (PCR-RFLP) was then performed. According to sequence analysis, there are 2 restriction sites for *Bfu*CI in the sequence of *A. sandaracinos* that cleave the PCR products from this species into 3 fragments (129, 205 and 559 bp) and the digested PCR products were correctly presented on electrophoresed agarose gel. On the other hand, there are 2 restriction sites for *Dde*I in *A. sandaracinos* PCR products. This should yield 3 fragments of 65, 194 and 636 bp. Digestion of this represented species of PCR products only with *Bfu*CI (Fig. 2 (A)) was in agreement with the expected sizes of the restriction fragments inferred from sequence analysis. However, digestion of *A. sandaracinos* PCR products with *Dde*I (Fig. 2 (B)) consistently yielded different sizes from individual samples analyzed.

The distinct restriction patterns from each individual anemonefish species were observed from digestion of ND4-ND5 gene fragments with *Bfu*CI and *Dde*I (Fig. 2 (A) and (B), respectively). Overlapping restriction patterns between different species were not observed in this study. The species-specific PCR-RFLP marker, a single enzyme digestion patterns could discriminate among species of anemonefish (Fig. 2).

In summary, we have found that the sequence of the ND4-ND5 region of the mtDNA that we examined contains information for discriminating between the anemonefish species analyzed (*A. ocellaris*, *A. percula*, *A. polymnus* and *A. sandaracinos*). This was achieved by polymerase chain reaction (PCR), followed by analysis of the polymorphism of the fragments generated by appropriate restriction endonucleases (PCR-RFLP). Either *Bfu*CI or *Dde*I can be used to produce RFLP specific patterns suitable for discrimination of these four anemonefish species studied. Interpretation of the restriction profiles was obvious and could be performed visually by comparison with reference samples, without knowing their sequences. This approach would be less costly than conventional sequencing of PCR products, especially when large numbers of samples are to be analyzed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Narudom Pisitkasem at Percula farm for his kindly provided anemonefish samples. This project was funded partially by grant from the National Research Council of Thailand (NRCT).

REFERENCES

- Allen, G.R., and Fautin, D.G. 1992. *Field guide to anemone – fishes and their host sea anemones*. Western Australian Museum. pp 160.
- Allen, G.R. 1974. *The anemonefish*. T.F.H. Publications U.S.A.
- Alam M. T., Das M. K., Dev V., Ansari M.A., and Sharma Y. D. 2006. PCR-RFLP method for the identification of four member of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 101, 239-244.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Christian W., Martin B., Philipp H., and Luthy J. 2000. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 33, 144-150.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Heiman M. 1997. Webcutter 2.0. (<http://www.ccsi.com/firstmarket/cutter/cut2.html>).
- Hsieh, H-S., Chai, T-J., and Hwng, D-F., 2007. Using the PCR-RFLP method to identify the species of different processed product of billfish meat. *Food Control*. 18, 369-374.
- Klossa-K. E., Papasotiropoulos V., Kiliass G., and Alahiotis S. 2002. Authentication of Messolongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. *Food Control*. 13, 169-172.
- Miya M., Saitoh K., Wood R., Nishida M., and Mayden R. L. 2005. New primer for amplifying and sequencing the mitochondrial ND4/ND5 gene region of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi). *Ichthyological Research*. 53, 75-81.
- Moyses C. B., and de almeida-T. L. F. 2002. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astynax* (Pisces, Characidae). *Genetic and Molecular Biology*. 25, 4, 401-407.
- Rozen, S. and Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers. In: Krawetz, S. and Misener, S. (ed) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, P 365-386.
- Zang J., Hung H., Cai Z., and Huang L. 2006. Species identification in salt product of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12s rRNA gene sequence. *Food Control*. 17, 557-563.

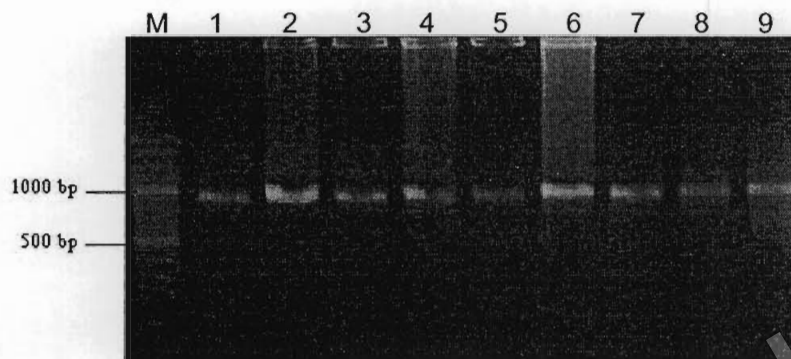


Fig. 1. PCR products of ND4-ND5 produced from four anemonefish species, *Amphiprion polymnus* (1, 2, 3), *A. sandaracinos* (4, 5), *A. ocellaris* (6, 7) and *A. percula* (8, 9). Lane M is a 100bp DNA ladder.

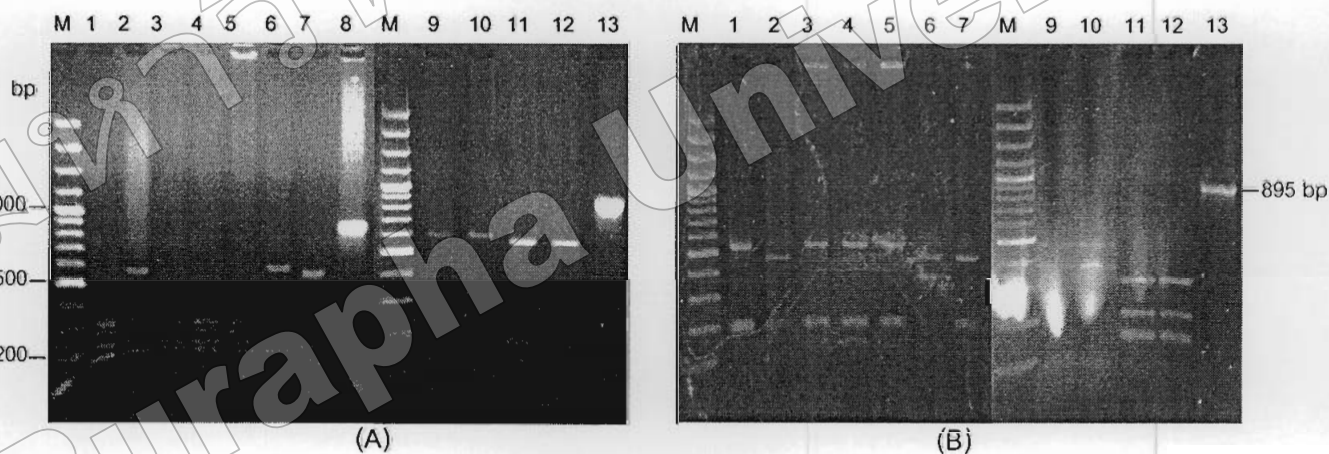


Fig. 2. PCR-RFLP patterns of ND4-ND5 digested with *BfuCI* (A) and *DdeI* (B) obtained from the anemonefish species, *Amphiprion polymnus* (1, 3 to 5), *A. sandaracinos* (2, 7), *A. ocellaris* (6, 9, 10) and *A. percula* (11, 12). Lanes 8 and 13 are undigested ND4-ND5 amplified product. Lane M is a 100bp DNA ladder.