บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างครีบหางขนาด 0.5 เซนติเมตรของปลากะพงขาว ตัวเต็มวัยจากประชากรโรงเพาะฟักและประชากรธรรมชาติ (ตารางที่ 3-1, ภาพที่ 3-1 และภาพที่ 3-2) ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 โดยเลือกตัวแทนของประชากรโรงเพาะฟักจาก 4 แหล่ง คือฟาร์มทะเลทอง อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดระยอง ซึ่งประกอบไปด้วย ประชากรตั้งต้นของศูนย์ฯ (รุ่นพ่อแม่) และปลาที่พัฒนามาจากประชากรตั้งต้น (รุ่นลูก; F1) และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนตัวแทนของประชากรในธรรมชาติมาจากจังหวัดจันทบุรี จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดตราด (ภาพที่ 3-2) เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อครีบหางปลากะพงขาวในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 %

ปลาที่รวบรวมได้มีขนาดมากกว่า 4 กิโลกรัมและ 45 เซนติเมตรขึ้นไป (ตารางภาคผนวกที่ ก-1) ซึ่งการศึกษานี้มีข้อมูลเฉพาะขนาดปลาที่เก็บรวบรวมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดระยอง อย่างไรก็ตามปลาที่รวบรวมจากแหล่งอื่น ๆ ก็มีขนาดใกล้เคียงหรือใหญ่กว่าปลาของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดระยอง การเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ของศูนย์ฯ ต่าง ๆ มีการวางยาสลบปลาก่อนที่จะตัดครีบหางมาเล็กน้อย ส่วนการเก็บตัวอย่างของฟาร์มทะเลทอง ทำในขณะที่ปลาได้รับการฉีดฮอร์โมนก่อนการผสมพันธุ์ ส่วนในตัวอย่างประชากรธรรมชาติที่เก็บโดยชาวประมงจะใช้เครื่องมือประมง ได้แก่ เบ็ด เฝือก อวนติดตา และอวนลอยปลากะพงขาว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

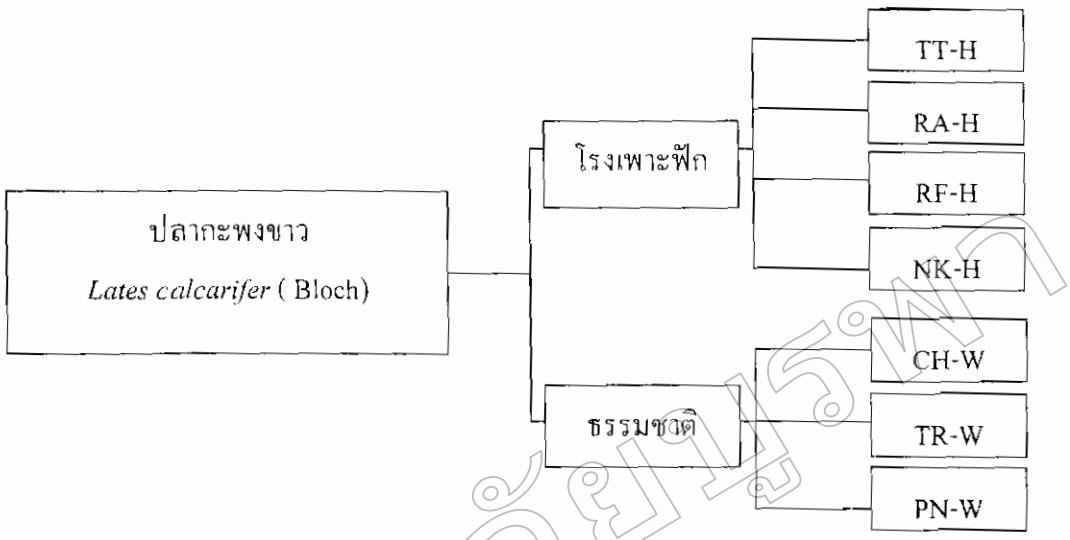
ตารางที่ 3-1 จำนวนและแหล่งตัวอย่างของประชากรปลากะพงขาว ที่ใช้ในการศึกษานี้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	สัญลักษณ์	จำนวน	ช่วงเวลาที่เก็บ (พ.ศ.)
จังหวัดจันทบุรี	CH-W	65	2550-2551
จังหวัดนครศรีธรรมราช	PN-W	66	2551
จังหวัดตราด	TR-W	53	2552
ฟาร์มทะเลทอง อ.เมือง จังหวัดชลบุรี	TT-H	56	2551
ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดนครศรีธรรมราช	NK-H	39	2551
ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (รุ่นพ่อแม่)	RA-H	31	2551
ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จ.ระยอง (รุ่นลูก)[1]	RF-H	36	2551
รวม		346	

หมายเหตุ W = ประชากรธรรมชาติ, H = ประชากรโรงเพาะฟัก

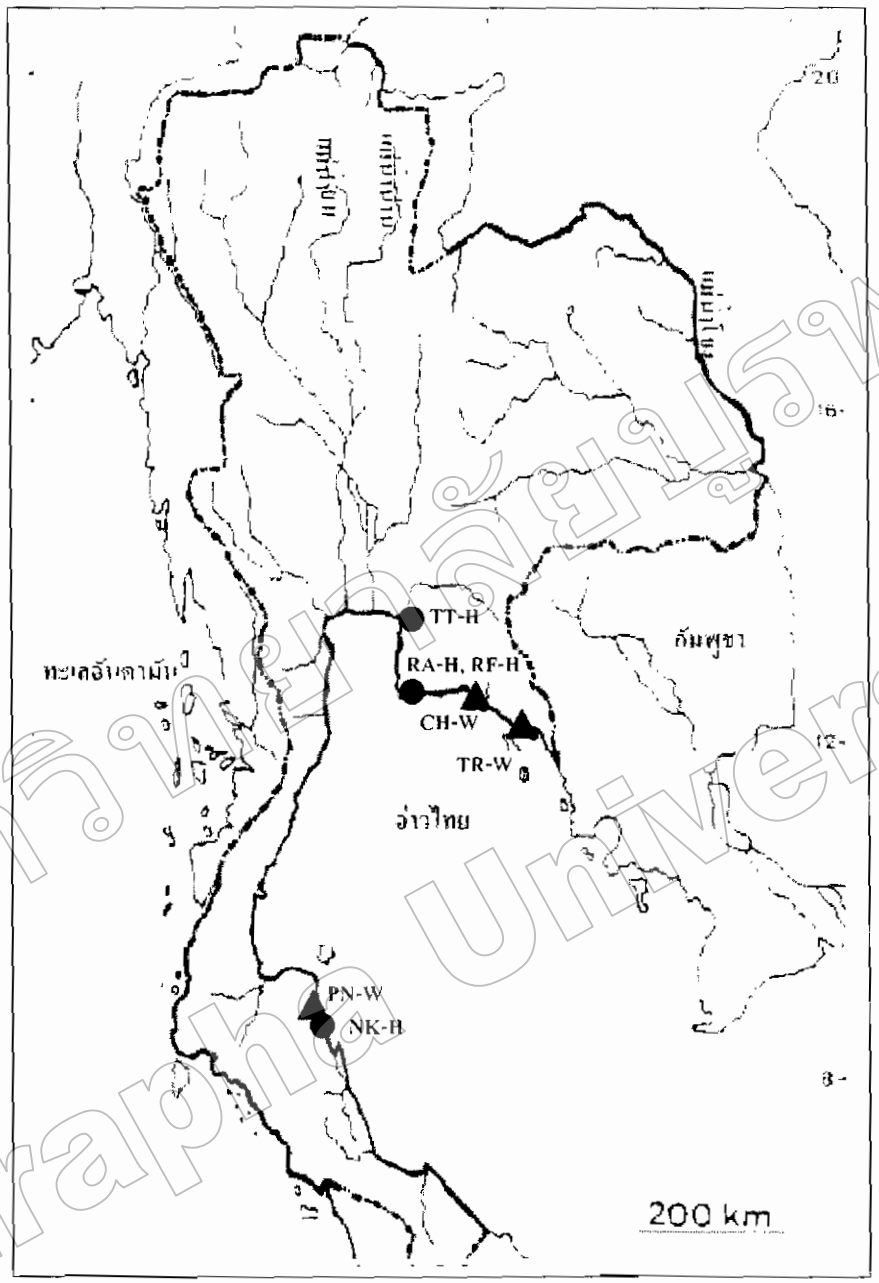
[1]เป็นปลารุ่นลูกของ RA-H ที่ผ่านการคัดเลือกปลาที่โตเร็วมาใช้เป็นประชากร RF-H

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-1 แผนผังการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาว ในบริเวณอ่าวไทย ที่ใช้ในการศึกษานี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



หมายเหตุ ▲ ประชากรปลากะพงขาวจากธรรมชาติ

● ประชากรปลากะพงขาวจากโรงเพาะฟัก

ภาพที่ 3-2 จุดรวบรวมตัวอย่างปลากะพงขาวบริเวณอ่าวไทยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1. สกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี Salt extraction ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Aljanabi and Martinez (1997) อธิบายโดยสังเขปดังนี้ ตัดตัวอย่างครีบหางของปลากะพงขาวออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดทดลอง Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี Lysis buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 0.2 M NaCl) และ Proteinase K (20 mg/ml) เพื่อทำการย่อยโปรตีนออกจากเนื้อเยื่อและบ่มสารละลายที่ได้ ด้วยเครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (Water Bath) (Poly Science 9005 A5, USA) ที่ 55 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ 6 M NaCl และตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ Isopropanol 100% ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ใน TE buffer (1 M Tris Base pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0)

2. วัดปริมาณดีเอ็นเอ

วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (ผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก) บนอะกาโรสเจล 1% ที่กระแสไฟฟ้า 67 โวลท์ ประมาณ 45 นาที ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส แบบนอน (Bio-Rad Subcell GT, Italy) หลังจากนั้นจึงย้อมแผ่นเจลด้วยเอธีเดียมโบรไมด์ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วจึงเทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder M23; ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม (ตารางที่ 3-2) โดยดูความเข้มของสารเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธีเดียมโบรไมด์ ภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง UV Transilluminator (Vilber Lourmat Etx-40M, French)

ตารางที่ 3-2 ปริมาณดีเอ็น ของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่รวมอยู่ใน DNA Ladder M23 ปริมาณ 0.4 ไมโครกรัม

ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (base pairs)	ปริมาณดีเอ็นเอ	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (base pairs)	ปริมาณดีเอ็นเอ
1500	60 ng	500	60 ng
1000	80 ng	400	20 ng
900	48 ng	300	12 ng
800	44 ng	200	8 ng
700	28 ng	100	8 ng
600	32 ng		

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่

3.1 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycler (T gradient 96 Biometra, England) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณไมโครแซลเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง ซึ่งได้แก่ *LcaM08F*, *LcaM21F*, *LcaM32* (Yue, Li, Chao & Orban, 2002) *Lca60*, *Lca64*, *Lca74* (Zhu et al., 2006) และ *Lc-m05* (Sim & Othman, 2005) (ตารางที่ 3-3)

ตารางที่ 3-3 ลำดับเบสของไพรเมอร์และ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับพีซีอาร์ของไมโครแซลเทลไลท์ 7 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง	Repeat motif	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'→3')	Annealing temp (°C)
LcaM32	$(GATA)_{15}$	F:TGATCTCATAAGAGGTTTGACATT	50
		R:CCTCTTCTTGATTTGTTGCTT TGT	
Lca74	$(CA)_{13}$	F:CATCATTTACACTCTGTTTGCCTCAT	57
		R:GACAGACAGGTGTTTTAGCCTATTTG	
LcaM21F	$(CA)_{13}$	F:GTGCCACCTGCCTGACC	55
		R:GCCATGACTGATTGCGTGAGA	
Lca60	$(GACA)_{12}$	F:GCA GGTGGGATCATCAGGTGA	57
		R:GGCGAGCTGGCCGTCAG	
Lca64	$(AC)_{21}$	F:AGGCATATGCACCTCACAAGAGTG	55
		R:CCCACGGTTTATTTATCTGTCATTATC	
LcaM08F	$(GA)_{21}$	F:GGACGGTTGGATTTAAGGATTTT	50
		R:GCTTTTCATTAGTGTTTCCCACAC	
Lc-m05	$(GT)_4(GA)_{19}$	F:GCTGTCTTCACCCAACCACTG	50
	$G(GT)_4$	R:CAGCCCCTCATCACAAACAAT	

3.2 สารละลายในการทำพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), 1X บัฟเฟอร์, นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) 200 µM, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 1.5 mM, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.2 µM และ *Taq* Polymerase (Bioscience, 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.6 ยูนิต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 วัฏจักรของการเพิ่มลดอุณหภูมิ ประกอบด้วย 3 วัฏจักร คือ 1) อุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 1 รอบ 2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิที่ทำให้ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอตั้งต้น (Annealing Temperature,ตารางที่ 3-3) นาน 30 วินาที และอุณหภูมิที่ *Taq* Polymerase สามารถซ่อมสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension Temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 33 รอบ และ3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

4. แยกอัลลิลของไมโครแซลเทลไลท์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.1 นำผลผลิตจากกระบวนการพีซีอาร์มาเติม Loading Dye (97% Formamide, 0.4% NaOH, 0.1% Bromophenol Blue, 0.1% Xylene Cyano FF) แล้วนำมาแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ผ่านโพลีอะคริลาไมด์เจล 6% ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส แนวตั้ง (Scie-Plas SEQ3341, United Kingdom) ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ผ่านกระแสไฟฟ้า 1200 โวลท์ เป็นเวลา 3.50 ชั่วโมง

4.2 ย้อมอัลลิลที่แยกด้วยเทคนิค Silver staining ซึ่งมีหลักการโดยสังเขป คือ รีดิวซ์ Silver Ion ที่จับกับพันธะของกรดอะมิโนโดยสารโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และฟอร์มาดีไฮด์ (Formaldehyde) วิธีนี้มีความไวสูง ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง เมื่อย้อมแล้วจะเห็นดีเอ็นเอจับกับซิลเวอร์ไนเตรต (Silver Nitrate) เป็นแถบสีน้ำตาลเข้มที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

5. บันทึกจีโนไทป์ที่ได้จากการย้อม

บันทึกจีโนไทป์แต่ละตำแหน่ง ที่ได้จากการย้อม โดยบันทึกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (base pair) หรือ อัลลิล (allele) บนแผ่นเจล เทียบการเคลื่อนที่ของลำดับเบส (pGEM-32f (+) sequencing marker) วิธีการอ่านเจลที่ทำให้เรียกชื่ออัลลิลได้สม่ำเสมอคือ เลือกตัวอย่างที่เป็น Positive มาใช้เปรียบเทียบทุกครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร โดยใช้การทดสอบต่อไปนี้

1.1 ความถี่ของอัลลิล (Allele frequency) ในแต่ละตำแหน่งของประชากร ซึ่งคำนวณโดยใช้โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall & Smouse, 2006)

1.2 จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง (number of alleles per locus, A) โดยใช้โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall & Smouse, 2006)

1.3 Allelic Richness (A_r) คือ จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งที่คำนวณโดยปรับตามจำนวนตัวอย่างที่เท่ากันในทุกประชากร ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่านี้ในการเปรียบเทียบความหลากหลายของอัลลิล ในประชากรที่มีจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน (Foulley & Ollivier, 2006) คำนวณค่า A_r โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001)

1.4 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) โดยใช้โปรแกรม GenAlEx version 6.1 (Peakall & Smouse, 2006)

1.5 การทดสอบการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี – ไวน์เบิร์ก ของความถี่จีโนไทป์ที่แต่ละตำแหน่งภายในประชากร โดยการประเมินค่า exact p-value ด้วยวิธี markov chain ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2007) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple tests) ด้วยวิธี Bonferroni correction (Rice, 1989)

1.6 Null allele คือ อัลลิลที่ไม่ปรากฏบนแผ่นเจล ซึ่งอาจเกิดจากการกลายบริเวณลำดับเบสที่ไพรเมอร์จับ ซึ่งการเกิด null allele มักทำให้อ่านผลผิดพลาดจากเฮตเทอโรไซโกต เป็นโฮโมไซโกต โดยใช้โปรแกรม MicroChecker version 2.2.3 (Oosterhout, Hutchinson, Will, & Shipley, 2004)

1.7 Effective Population Size (Ne) คือ ค่าทางทฤษฎีซึ่งแสดงถึงจำนวนสมาชิกของประชากรอุดมคติที่มีอัตราการเกิดการขาดช่วงทางพันธุกรรม เท่ากับประชากรจริงที่สนใจ ใช้ข้อมูล Linkage Disequilibrium ในการวิเคราะห์ โดยใช้โปรแกรม NeEstimator Version 1.3 (Peel, Ovenden, & Peel, 2004)

2. ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร โดยใช้การทดสอบต่อไปนี้

2.1 Analysis of Molecular variance (AMOVA) คือการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างประชากร เมื่อเทียบกับความแปรปรวนภายใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประชากร โดยใช้ค่าสถิติ Φ_{ST} ทดสอบความมีนัยสำคัญระหว่างคู่ตัวอย่าง ประเมิน AMOVA โดยใช้โปรแกรม ARLEQUIN version 3.11 (Excoffier, Laval, & Schneider, 2006)

2.2 Genic differentiation ทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลิลของแต่ละประชากร โดย Exact tests ตามวิธีของ Guo and Thompson (1992) (Dememorization = 1000, Batches = 1000, Iterations per batch = 1000) ในโปรแกรม GENEPOP version 4 (Rousset, 2007) และปรับระดับความน่าจะเป็น (p-value) สำหรับการใช้ข้อมูลวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple test) ด้วย Bonferroni correction (Rice, 1989)

2.3 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F- Coefficients) โดยใช้โปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001)

2.4 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (1967) โดยทำการสุ่มป้อนข้อมูลซ้ำ (bootstraping) 1000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MSA version 4.05 (Dieringer & Schlotterer, 2003)

2.5 แผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ที่สร้างจากค่า F_{ST} และค่า Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (1967) ที่เกิดจากการสุ่มข้อมูล 1,000 ครั้ง ด้วยวิธี UPGMA จะนำเสนอแผนผัง ในรูปของ consensus dendrogram ที่มีข้อมูลจากการสุ่มซ้ำแต่ละประชากร สร้างแผนผังด้วย NEIGHBOR และ CONSENSE โดยใช้โปรแกรม PHYLIP version 3.67 (Felsenstein, 2007)

2.6 การวิเคราะห์แบ่งส่วนหลายมิติ (Multi Dimensional Scaling: MDS) นำค่าที่สร้างจาก F_{ST} และค่า Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (1967) มากำหนดจุดบน Ordination ด้วยการสุ่มหลาย ๆ ครั้ง จนได้ภาพตรงกับ Distance Matrix ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มดูจากค่า Stress Value วิเคราะห์ MDS โดยใช้โปรแกรม SPSS version 14

4. สถานที่ทำการทดลอง

ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University