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

รายงานการวิจัย

การจำแนกชนิดของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ

DNA Profiles for Species Identification of Seahorse in the Genus *Hippocampus*

คณะผู้วิจัย
นายพิทักษ์ สูตรอนันต์[1]
นางสาวเสาวภา สวัสดิ์พีระ[2]

เริ่มบริการ
27 ส.ค. 2552
249285

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ.เมืองชลบุรี จ.ชลบุรี 20131

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2546

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546 ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างม้าน้ำสำหรับการวิจัย และขอขอบคุณ คุณกรรณิการ์ ชวนประสิทธิ์กุล คุณวนิดา อาสน์สถิต และคุณประกาศิต รัตนตันหยง ที่ช่วยทำให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

แบบแผนอาร์เอพีดี (RAPD patterns) ที่ได้จากการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี และอาศัยการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันของตัวอย่างภายในสปีชีส์เดียวกัน และปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากการตรวจสอบสอบไพรเมอร์จำนวน 53 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แบบแผนอาร์เอพีดีที่จำเพาะกับสปีชีส์ และสามารถนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำ 3 สปีชีส์ ในสกุล *Hippocampus* คือ ม้าน้ำดำ (*H. kuda*) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) และ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ได้ มีเพียงบางไพรเมอร์ที่ให้ผลไม่เด่นชัด และจากข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ของแต่ละไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ ก็สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อสปีชีส์โดยอาศัยการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ รวมถึงการนำข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรม และการเพาะเลี้ยงของม้าน้ำต่อไปได้ และสำหรับการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอฟแอลพี การศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ของดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อในส่วนกล้ามเนื้อม้าน้ำดำ (*H. kuda*) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ คือ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA และคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 16S rRNA ก่อนนำผลผลิตพีซีอาร์ส่งไปตรวจสอบลำดับเบส แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูล GeneBank บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เพื่อนำข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างม้าน้ำในสกุลเดียวกันที่มีความเหมือน มา alignment ก่อนวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะกับผลผลิตพีซีอาร์ เพื่อให้ได้แบบแผนอาร์เอฟแอลพีซึ่งให้ผลการตัดที่สามารถจำแนก สปีชีส์ได้ เมื่อยืนยันผลการวิเคราะห์โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ด้วยเอนไซม์บางชนิดได้แก่ *Spe*I, *Nde*I, *Nla*III และ *Dra*I กับผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์ทั้งสามข้างต้น สามารถแสดงให้เห็นถึงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามออกจากกันได้

Abstract

The common bands of each sample within species and density of each common band of RAPD amplification were examined for the RAPD patterns. The result show that most of primer of 53 RAPD primers have species-specific patterns that can be used to identify three species of seahorse (Genus *Hippocampus*) such as spotted seahorse (*Hippocampus kuda*), hedgehog seahorse (*H. spinosissimus*) and three-spot seahorse (*H. trimaculatus*), only a few primers was not clear. The species-specific bands of each primer can be applied to develop PCR technique for species-specific marker. Furthermore, this data can use as database for research of genetic structure, molecular level of seahorse, seahorse fisheries management and also seahorse aquaculture. For RFLP patterns, the amplification of the mitochondrial 12S and 16S rRNA with a template of total DNA from muscle tissues of spotted seahorse (*Hippocampus kuda*) and hedgehog seahorse (*H. spinosissimus*) was studied. Three pairs of primers, L1091, H1478 and L1091, H2001 that specific with 12S rRNA and couple of L2510 and H3058 that specific with 16S rRNA were used in PCR reaction. The base sequencing of PCR production was sequenced by BSU (Bioservice Unit). Then nucleotide sequences encoding a partial region of the 12S and 16S rRNA gene of two species were compared with other species in GeneBank database net work. The sequenced fragments were also used to select restriction enzymes, yielding species-specific restriction fragment length polymorphisms (RFLP). After calculation of corresponding RFLP-patterns of two species and the other species investigated with suitable restriction enzymes, the selected restriction enzymes: *Spe*I, *Nde*I, *Nla*III และ *Dra*I; were found to be sufficient for identification of two species of seahorse.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
บทนำ	9
วิธีดำเนินการวิจัย	14
ผลและอภิปรายการวิจัย	18
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	36
บรรณานุกรม	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์อาร์เอพีดี และข้อมูลของแถบดีเอ็นเอของม้าน้ำทั้งสามสปีชีส์.....	25

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 สปีชีส์ โดยไพรเมอร์ OPA-17	22
2	แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 สปีชีส์ โดยไพรเมอร์ OPB-06	23
3	แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 สปีชีส์ โดยไพรเมอร์ OPC-04	24
4	แถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (*H. kuda*) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478, L1091 กับ H2001 และ L2510 กับ H3058	28
5	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L1091 กับ H1478	29
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L1091 กับ H2001	30
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 16S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L2510 กับ H3058	31
8	แผนผังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001	34
9	แผนผังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 16S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058	34
10	แบบแผนอาร์เอฟแอลพีของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (*H. kuda*) และม้าน้ำหนาม (H. spinosissimus) โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478, L1091 กับ H2001 และ L2510 กับ H3058	35

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

พีซีอาร์ (PCR)	ย่อมาจาก Polymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มโพลีเมอเรส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และการควบคุมอุณหภูมิ
อาร์เอพีดี (RAPD)	ย่อมาจาก Randomly Amplified Polymorphic DNA เป็นเทคนิคทางพีซีอาร์ประเภทหนึ่งที่อาศัยไพรเมอร์แบบสุ่มในการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ
พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP)	ย่อมาจาก Restriction Fragment Length Polymorphism เป็นเทคนิคที่อาศัยการเพิ่มผลผลิตของชิ้นดีเอ็นเอของวิธีทางพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน ก่อนนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้เกิดแบบแผนอาร์เอฟแอลพี

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ม้าน้ำเป็นปลาที่จัดอยู่ในคลาส (Class) Osteichthyes ซึ่งปลาในกลุ่มนี้มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันมาก ม้าน้ำอยู่ในครอบครัว (Family) Syngnathidae ซึ่งมีสมาชิกอยู่หลายตัวด้วยกัน เช่น ปลาจิ้มฟันจระเข้ (pipe fish) ม้าน้ำปากยาว (pipe horse) เป็นต้น ม้าน้ำอยู่ในสกุล (Genus) *Hippocampus* จัดเป็นปลาที่มีกระดูกแข็ง และมีรูปร่างลักษณะแปลกไปจากปลาทั่วๆไป ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบม้าน้ำทั่วโลกทั้งหมด 35 ชนิด (Lourie, 1999) ส่วนม้าน้ำในประเทศไทยมีรายงานว่าพบทั้งหมด 6 ชนิดคือ ม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) และม้าน้ำแคระ (*H. mohnokei*) (เสาวภา และ วรเทพ, 2543) และจากการสำรวจชนิดของปลาสวยงามในโครงการธุรกิจปลาสวยงามน้ำเค็มในแผนงานวิจัยการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำเค็มกลุ่มปลาการ์ตูน ได้รายงานว่าพบม้าน้ำเพิ่มอีก 2 ชนิด คือ ม้าน้ำหนามขอ (*H. histrix*) และม้าน้ำยักษ์ (*H. kelloggi*)

การจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้อนุกรมวิธานทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) มีข้อจำกัดเนื่องจากต้องการตัวอย่างที่มีความสมบูรณ์ และต้องเป็นตัวอย่างที่โตเต็มวัยแล้วเท่านั้นจึงสามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน หากตัวอย่างที่ต้องการพิสูจน์สปีชีส์เป็นเพียงเศษชิ้นเนื้อ หรือเป็นตัวอย่างที่ยังอยู่ในวัยอ่อน ก็จะไม่สามารถจำแนกสปีชีส์ได้ ซึ่งการจำแนกสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตสามารถเพิ่มความถูกต้องแม่นยำได้ด้วยการอาศัยเทคนิคที่เกี่ยวกับการตรวจสอบโปรตีน และดีเอ็นเอ (อ้างถึงโดย Partis และ Wells, 1996) ซึ่งวิธีการตรวจสอบที่เกี่ยวกับโปรตีนนั้นประกอบด้วยเทคนิค sodium lauryl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), isoelectric focusing (IEF), isozyme staining และ immunoreactivity แต่ข้อมูลที่ได้จากเทคนิคที่เกี่ยวกับการตรวจสอบโปรตีนเหล่านี้ก็ต้องขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้สามารถสูญเสียสภาพธรรมชาติได้โดยง่าย และในแต่ละอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ก็มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันได้ ถึงแม้จะได้มาจากตัวอย่างเดียวกัน

สำหรับเทคนิคที่อาศัยการตรวจสอบดีเอ็นเอ จะไม่ขึ้นกับคุณภาพของตัวอย่างในระดับเดียวกันกับการตรวจสอบโปรตีน (อ้างถึงโดย Martinez และ Yman, 1998) ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอนั้นประกอบไปด้วย การใช้โพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสปีชีส์ การวิเคราะห์โดยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP: restriction fragment length polymorphism) ที่รวมถึงการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยเทคนิคพีซีอาร์ของชิ้นดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอหรือไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ การตรวจสอบความหลากหลายเชิงโครงรูปของชิ้นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกเพิ่มขยาย (SSCP: single strand conformation polymorphisms) และ การวิเคราะห์โดยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: random amplification of polymorphic DNA)

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: Random amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่อาศัยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอภายใต้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ในบริเวณต่างๆ บนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ถูกเข้าจับได้ด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็ก (ขนาดสิบเบส) และมีลำดับแบบสุ่ม (arbitrary sequence) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และที่สำคัญคือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา (Williams และ คณะ, 1990) ซึ่งเทคนิคอาร์เอพีดีนี้ได้มีการนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตหลายประเภทเพื่อการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรม รวมถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกปลา เช่น การจำแนกสปีชีส์ของปลาจำนวน 8 สปีชีส์ โดยการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Partis และ Wells, 1996) การตรวจสอบเครื่องหมายอาร์เอพีดีของปลาลูกผสมที่เกิดขึ้นจากบราวน์เทราท์กับแอตแลนติคแซลมอล (Elo และคณะ, 1997) และ การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาคาร์พอินเดีย จำนวน 4 สปีชีส์ (Barman และคณะ, 2003) เป็นต้น

แม้ว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะถูกสลายจนมีขนาดเล็ก แต่ก็สามารถนำมาตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ที่ทำให้เกิดแบบแผนของแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จากการรายงานโดย Dias Neto และคณะ (1994, อ้างถึงโดย Martinez และ Yman, 1998) เทคนิคอาร์เอพีดีได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับสปีชีส์ (species-specific genetic markers) และความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์เลี้ยง (Appa Rao และคณะ, 1996) การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพื่อการบ่งชี้สปีชีส์ของสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Martinez และ Yman, 1998 และ Saez และคณะ, 2004) และได้แสดงให้เห็นถึงการนำแบบแผนอาร์เอพีดีมาใช้เพื่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของหนู (González Ittig และคณะ 2002) รวมทั้งได้มีการนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของปลาได้ (Partis และ Wells, 1996)

ปัจจุบันเทคนิคระดับโมเลกุลของการตรวจสอบลำดับเบส (nucleotide sequencing) มีการพัฒนาไปมากกว่าอดีต ซึ่งรวมถึงราคาการตรวจสอบต่อหน่วยที่ลดต่ำลงด้วย จึงทำให้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคของการตรวจสอบลำดับเบสที่เคยยุ่งยากซับซ้อนในอดีตมาเป็นเทคนิคพื้นฐาน เพื่อทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสบางส่วนบนตำแหน่งของยีนจำเพาะทั้งที่อยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งข้อมูลของลำดับเบสที่ได้นั้นสามารถนำมาเปรียบเทียบความเหมือน และการซ้ำกันกับข้อมูลที่ปรากฏอยู่บนฐานข้อมูลที่มีในเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ไม่ว่าจะเป็นฐานข้อมูล GeneBank ที่ NCBI (National Center for Biotechnology Information) DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ที่ญี่ปุ่น หรือ EBI (European Bioinformatics Institute) ที่ประเทศอังกฤษ โดยการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวทำให้รู้ว่าข้อมูลที่ได้เหมือนกับของผู้อื่นหรือไม่ หรือถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตในสกุลเดียวกัน แต่ต่างสปีชีส์กัน หรือในกรณีเป็นสิ่งมีชีวิตคนละประเภท ก็สามารถนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าว มาวิเคราะห์และประยุกต์ได้หลากหลายแบบ เช่น การวิเคราะห์วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตต่างชนิด หรือสิ่งมีชีวิตในสกุลเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ หรือต่างสายพันธุ์ ซึ่งในที่นี้จะเป็นการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส เพื่อนำมาใช้ในการตัดสินใจเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้สำหรับการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอใน

ตำแหน่งยีนที่จำเพาะ หรือที่เรียกว่าเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) ที่ในอดีตเมื่อทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายกับตำแหน่งยีนที่จำเพาะได้แล้ว ก็จำเป็นจะต้องทำการสุ่มเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดเพื่อให้เกิดแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่แสดงความแตกต่าง ซึ่งต้องใช้เอนไซม์เป็นจำนวนมากในการสุ่มเลือก ดังนั้นหากรู้ว่าเอนไซม์ชนิดใดให้ผลที่ต้องการ ก็ไม่จำเป็นต้องสุ่มเลือกเอนไซม์ ทำให้ลดรายจ่ายที่เกิดขึ้นได้มาก

เหตุผลที่เลือกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) เป็นแหล่งดีเอ็นเอเป้าหมายในการศึกษานี้เนื่องจากจากเหตุผลหลักสามประการคือ (1) อัตราการเกิดวิวัฒนาการของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีค่าที่สูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) มาก รวมทั้งยังเต็มไปด้วยลำดับเบสที่มีความหลากหลายที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ได้ (Carrera และคณะ, 1999, Barriga-Sosa และคณะ, 2005, Girish และคณะ, 2005, Ishizaki และคณะ, 2005, Karaiskou และคณะ, 2005 และ Zhang และคณะ, 2006) (2) จำนวนสำเนาของโมเลกุลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีมากในเซลล์เซลล์หนึ่ง (มีประมาณ 600 – 6000 ชุดของโมเลกุลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอต่อเซลล์สัตว์หนึ่งเซลล์) ทำให้มีปริมาณที่เพียงพอถึงแม้เซลล์ที่ต้องการทดสอบจะผ่านกระบวนการแปรสภาพมาบ้าง (อ้างถึงโดย Zhang และคณะ, 2006) และ (3) ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลักษณะการถ่ายทอดที่ส่งผ่านข้อมูลพันธุกรรมมาจากทางฝ่ายแม่เท่านั้นและไม่เกิดการผสมผสานข้อมูลพันธุกรรมจากฝ่ายพ่อ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงเป็นข้อมูลในแง่ของวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นโดยตรงต่อไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Karaiskou และคณะ, 2005) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA: rRNA) สามารถพบได้ในจีโนมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์ ทั้งขนาดเล็กที่ตำแหน่งยีน 12S rRNA(ขนาดประมาณ 819 – 975 คู่เบส ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง) และขนาดใหญ่ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA (ขนาดประมาณ 1571 – 1649 คู่เบส ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง) (Carrera และคณะ, 1999)

มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิต ที่อาศัยคู่ไพรเมอร์มาตรฐานที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน cytochrome b และ 12S rRNA ในบริเวณอนุรักษ์ (Kocher และคณะ, 1989) ซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาตำแหน่งยีนในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีการใช้ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตมากกว่า 100 สปีชีส์ ที่มีทั้ง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางประเภท สำหรับการตรวจสอบแบบแผนพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการจำแนกสปีชีส์ โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสก่อนนั้น ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายทั้งในตำแหน่งยีน 12S rRNA ได้แก่ การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Girish และคณะ, 2005) และการจำแนกสปีชีส์ของปลาในผลิตภัณฑ์ดองเค็ม (Zhang และคณะ, 2006) สำหรับตำแหน่งยีน 16S rRNA ได้แก่ การจำแนกปลาแซลมอนกับปลาเทราท์ (Carrera และคณะ, 1999) การจำแนกปลา Macrorhamphosus scolopax ที่มีลักษณะสัณฐานในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกับปลาในสกุล Trachurus ซึ่งมีถิ่นอาศัยในแถบเดียวกัน ซึ่งได้มีการศึกษาใน 5S rRNA ที่อยู่บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอด้วย (Karaiskou และคณะ, 2005) การจำแนกสปีชีส์ของปลา 4 สปีชีส์ในกลุ่ม silversides “peces blancos” (Chirostoma sp.) และอีกสองสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน (Barriga-Sosa และคณะ, 2005) และการจำแนกสปีชีส์ของกลุ่มปลาปักเป้าที่มีพิษกับที่ไม่มีพิษ (Ishizaki และคณะ, 2005)

สำหรับการศึกษาในม้าน้ำที่มีการรายงาน จะเกี่ยวข้องกับการตรวจสอบลำดับเบสของม้าน้ำสปีชีส์ต่างๆ ที่กระจายอยู่ทั่วโลก เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นถึงจุดเริ่มต้น และสายวิวัฒนาการของม้าน้ำสปีชีส์ต่างๆ (Casey และคณะ, 2003, Teske และคณะ, 2003) และการตรวจสอบวิวัฒนาการในแง่ของการตั้งครรภ์และเลี้ยงดูลูกอ่อนของม้าน้ำกับปลาจิ้มฟันจระเข้ที่ได้จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของกระเป๋าหน้าท้องกับข้อมูลระดับโมเลกุล (Wilson และคณะ, 2001) ซึ่งตำแหน่งยีนที่มีการนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสคือตำแหน่งยีน 12S rRNA (Wilson และคณะ, 2001), 16S rRNA (Wilson และคณะ, 2001 และ Teske และคณะ, 2003), cytochrome b (Wilson และคณะ, 2001 และ Casey และคณะ, 2003), RP1 และ Aldolase (Teske และคณะ, 2003)

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

การทดลองนี้มีเป้าหมายในการแสดงแบบแผนอาร์เอพีดี และข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม เพื่อการบ่งบอกและจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำ สกุล *Hippocampus* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ ม้าน้ำดำ (*H. kuda*) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) และ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา และการตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม แล้วนำลำดับเบสที่ตรวจสอบได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีความเหมือนหรือซ้ำกันของม้าน้ำสปีชีส์อื่นที่มีอยู่บนฐานข้อมูล GeneBank บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เพื่อนำข้อมูลที่ได้มา alignment และเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีผลต่อการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำในสกุล *Hippocampus* และสามารถจำแนกม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามออกจากกันได้ แล้วนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้มายืนยันด้วยการทดลองโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี

การวิจัยนี้จะอาศัยเทคนิคการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอพีดี ซึ่งอาศัยการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม สำหรับตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมของจีโนมิกดีเอ็นเอของม้าน้ำ เพื่อนำข้อมูลของแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้มาใช้เพื่อการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำ นอกจากนั้นได้ทำการตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 3 คู่ แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มา alignment กับข้อมูลลำดับเบสในตำแหน่งเดียวกันของม้าน้ำในสกุลเดียวกันที่มีอยู่บนฐานข้อมูล GeneBank บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ก่อนนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์เพื่อหาเอนไซม์ที่มีตำแหน่งตัดบนลำดับเบสข้างต้น ซึ่งทำให้ได้แบบแผนอาร์เอฟแอลพี ที่สามารถนำมาจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำได้ ก่อนที่จะยืนยันผลการตรวจสอบข้างต้น ด้วยการเลือกเอนไซม์บางชนิดมาทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถนำมาช่วยในการจำแนกชนิดของม้าน้ำได้ในระยะตัวอ่อนโดยไม่ต้องรอให้เป็นตัวเต็มวัย หรือสามารถจำแนกชนิดม้าน้ำที่ไม่มีความสมบูรณ์ หรือถูกเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก
2. สามารถนำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างม้าน้ำชนิดต่างๆ ในสกุล *Hippocampus* ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การตรวจสอบแบบแผนอาร์เอพีดี

1.1 ตัวอย่างม้าน้ำ

ตัวอย่างของม้าน้ำทั้ง 3 สปีชีส์ ได้แก่ ม้าน้ำดำ (Hippocampus kuda) (ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4) ม้าน้ำหนาม (H. spinosisimus) (ตัวอย่างหมายเลข 5 ถึง 8) และ ม้าน้ำสามจุด (H. trimaculatus) (ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและยืนยันสปีชีส์โดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยม้าน้ำดำมีถิ่นกำเนิดบริเวณชายหาดบางแสน ส่วนม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุดมีถิ่นกำเนิดบริเวณหมู่เกาะแสมสาร ทั้งสองบริเวณอยู่ในจังหวัดชลบุรี ม้าน้ำแต่ละสปีชีส์ที่ใช้ในการทดลองจะประกอบไปด้วยม้าน้ำเพศผู้ (ตัวอย่างหมายเลข 1, 2, 5, 6 และ 9) และเพศเมีย (ตัวอย่างหมายเลข 3, 4, 7, 8, 10 และ 11)

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างม้าน้ำ จะอาศัยเนื้อส่วนโคนหางของม้าน้ำที่ตัดออกมาจากตัวอย่างของม้าน้ำซึ่งถูกแช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ในที่เย็น โดยนำเนื้อที่ได้ประมาณ 50 มิลลิกรัม มาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยกรรไกรและโกร่งบด แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Hoelzel (1998) โดยนำตัวอย่างที่ละเอียดเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM Tris; pH 7.5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% (w/v) SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเอนไซม์โปรตีเนส-เค (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปบ่มที่ 55 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 7000 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนที่เป็นชั้นน้ำนำไปสกัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) แล้วตามด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24 : 1) ในปริมาตรเดียวกันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายชั้นบนมาเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 0.1 เท่า ก่อนที่จะเติมเอธานอลบริสุทธิ์ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ รอจนตะกอนแห้งจึงละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณโดยการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเจลอะกาโรสที่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/HindIII Digest (BioLabs)

1.3 ไพรเมอร์อาร์เอพีดี

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี เป็นไพรเมอร์ขนาด 10 เบส (Ten base long oligonucleotide primers) ที่ออกแบบและผลิตโดย Operon Technologies (Alameda, CA, USA) จำนวน 53 ไพรเมอร์ ซึ่งอยู่ในชุดไพรเมอร์ OPA, OPB และ OPC จำนวน 19, 20 และ 14 ไพรเมอร์ ตามลำดับ โดยไพรเมอร์เหล่านี้เป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม (random or arbitrary primers) ที่มีค่า GC content ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1

1.4 การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี อาศัยการดัดแปลงข้อมูลจาก RAPD 10mer Kit Technical Information (QIAGEN Operon Product Guide 2002) และทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycler ของ Thermo Hybaid รุ่น Px2 โดยการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอในปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี 1 ไมโครลิตร (5 pmol), สารละลายบัฟเฟอร์ (Taq DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium Free: 100 mM Tris-Cl, pH 8.3; 500 mM KCl; 1% Triton®X-100) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิโมลาร์, dNTP แต่ละชนิด อย่างละ 10 ไมโครโมลาร์, สารละลายดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (in Storage Buffer B, Promega) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ภายใต้โปรแกรมจำนวน 45 รอบ ที่ประกอบด้วย 94 องศาเซนเซียส 1 นาที, 36 องศาเซนเซียส 1 นาที, และ 72 องศาเซนเซียส 2 นาที

1.5 อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส

นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ มาแยกขนาดโดยเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (100bp DNA Ladder, Promega) ภายใต้อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส (15 X 10) ที่ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยใช้เวลาในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสภายใต้บัฟเฟอร์ 1X TBE ประมาณ 1.5 ชั่วโมง ที่ 100 โวลต์/เซนติเมตร แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำผลที่ได้มาตรวจสอบและถ่ายภาพโดยเครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Gel document, SYNGENE)

1.6 การแสดงแบบแผนอาร์เอพีดี และการตรวจสอบข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ

จากผลภาพของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของม้าน้ำแต่ละสปีชีส์ นำมาสร้างแบบแผนอาร์เอพีดี โดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันในทุกตัวอย่างภายในสปีชีส์เดียวกัน ที่มีความชัดเจน และทำซ้ำได้ มาแสดงเป็นแถบบาร์โค้ดที่มีความหนาบางของแถบแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอ พร้อมบอกขนาดของแถบดีเอ็นเอเป็นคู่เบส โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส จากแบบแผนอาร์เอพีดีของแต่ละไพรเมอร์ นำมาตรวจสอบการปรากฏร่วมกันของแถบดีเอ็นเอกับม้าน้ำต่างสปีชีส์ โดยใช้สัญลักษณ์เป็น A, B, C, D และ X โดย A แทนการปรากฏร่วมกันของทั้งสามสปีชีส์ B แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนาม C แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำดำกับม้าน้ำสามจุด และ D แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำหนามกับม้าน้ำสามจุด สำหรับ X จะแทนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในบางตัวอย่างของสปีชีส์อื่น แล้วนำข้อมูลที่ได้ของแต่ละไพรเมอร์มาแสดงลงในตารางเพื่อแสดงข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสปีชีส์ จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมดของแต่ละสปีชีส์ และ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน

2. การตรวจสอบแบบแผนอาร์เอฟแอลพี

2.1 ตัวอย่างม้าน้ำ

ตัวอย่างของม้าน้ำทั้ง 2 สปีชีส์ ได้แก่ ม้าน้ำดำ (Hippocampus kuda) (ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 6) และม้าน้ำหนาม (H. spinosissimus) (ตัวอย่างหมายเลข 7 ถึง 12) ได้รับความอนุเคราะห์และยืนยันสปีชีส์โดย

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เสียชีวิตแล้วซึ่งถูกแช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์และเก็บไว้ในที่เย็น โดยม้าน้ำดำมีถิ่นกำเนิดบริเวณชายหาดบางแสน ส่วนม้าน้ำหนามมีถิ่นกำเนิดบริเวณหมู่เกาะแสมสาร ทั้งสองบริเวณอยู่ในจังหวัดชลบุรี

2.2 การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำเนื้อส่วนโคนหางของม้าน้ำประมาณ 50 มิลลิกรัม มาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยกรรไกรและโกร่งบด แล้วนำมาผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเนสเค และ SDS ที่ 55 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อด้วยวิธี ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (Sambrook และคณะ, 1989 และ Hoelzel, 1998) นำสารละลายดีเอ็นเอของม้าน้ำที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือไพรเมอร์ L1091 (5′-AAACTGGGATTAGATACCCCACTA-3′) H1478 (5′-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3′) และ H2001 (5′-AACCAGCTATCACCAGGC TCG-3′) (อ้างถึงใน Wilson และคณะ, 2001) โดยจับคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001 ซึ่งจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 430 และ 990 คู่เบส ตามลำดับ และคู่ของไพรเมอร์ L2510 (5′-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3′) กับ H3058 (5′-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3′) ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 620 คู่เบส

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร dNTP แต่ละชนิด อย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์, สารละลายบัฟเฟอร์ (Taq DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium Free: 100 mM Tris-Cl, pH 8.3; 500 mM KCl; 1% Triton®X-100) $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์แต่ละชนิด อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (in Storage Buffer B, Promega) แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermal cycler ของ Thermo Hybaid รุ่น Px2 ภายใต้โปรแกรมที่เริ่มต้นด้วยขั้นตอนการทำให้เสียสภาพเริ่มต้น (initial denaturation step) (94 องศาเซนเซียส 5 นาที) แล้วตามด้วยวัฏจักรของอุณหภูมิจำนวน 35 รอบ ที่ประกอบด้วยการทำให้เสียสภาพ (denaturation) (94 องศาเซนเซียส 30 วินาที) การเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) (50 องศาเซนเซียส 1 นาที) และการต่อสายดีเอ็นเอ (extension) (72 องศาเซนเซียส 1 นาที) แล้วตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายของการต่อสายดีเอ็นเอ (final extension) (72 องศาเซนเซียส 10 นาที) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำบริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen) ก่อนส่งผลผลิตพีซีอาร์ภายหลังการทำบริสุทธิ์แล้วในรูปของตะกอน พร้อมกับคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ คือ L1091, H1478 และ H2001 และคู่ไพรเมอร์ L2510 และ H3058 ไปยังหน่วยบริการชีวภาพ (BSU: Bioservice Unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อการวิเคราะห์หาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์

2.3 การตรวจสอบ และการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส และการวิเคราะห์ตำแหน่งตัด

นำลำดับเบสทั้งหมด มาปรับให้แต่ละลำดับเริ่มต้นจากปลายของไพรเมอร์ L1091 แล้วทำการเปรียบเทียบความเหมือนด้วยการ alignment โดยใช้ ClustalW Multiple alignment (Thompson และคณะ 1994) ซึ่งเป็นโปรแกรมประยุกต์เพิ่มเติมที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version

7.0.1 (Hall, 1999) เมื่อได้การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างในแต่ละสปีชีส์แล้ว ทำการปรับแต่งโดยอาศัยการเปรียบเทียบด้วยตาและตัดลำดับในส่วนที่ไม่ชัดเจนออกไป แล้วนำตัวแทนของข้อมูลของลำดับเบสที่ได้ ไปตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยการใช้โปรแกรม BLAST (BLAST 2.2.13 released. BLASTN 2.2.13 [Nov-27-2005] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Sited in March 11, 2006. RID: 1142074297-4754-136905989758.BLASTQ4 (L1091_ H1478) and RID: 1142074846-32738-165965787313.BLASTQ1 (L2510_H3058) แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของม้าน้ำสปีชีส์อื่นที่ได้มาทำการ alignment กับข้อมูลของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนามที่ทำการทดลอง แล้วตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบส พร้อมนำตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันนั้นมาวิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอาศัยโปรแกรมประยุกต์ Restriction Mapping Utility ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.1 (Hall, 1999) เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างของสปีชีส์ของม้าน้ำเมื่อต้องมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ต่อไป

ลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ที่ได้จากตัวอย่างหมายเลขที่ 1 ของแต่ละสปีชีส์ จะถูกนำไปเก็บไว้กับฐานข้อมูล GeneBank โดยมีเลขรหัส (accession number) ดังนี้คือ ลำดับเบสจากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม มีเลขรหัสเป็น DQ452299 และ DQ452300 ตามลำดับ ลำดับเบสจากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม มีเลขรหัสเป็น DQ452303 และ DQ452304 ตามลำดับ และ ลำดับเบสจากคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม มีเลขรหัสเป็น DQ452301 และ DQ452302 ตามลำดับ

2.4 การตรวจสอบการจำแนกสปีชีส์ม้าน้ำดำและม้าน้ำหนามด้วยพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ทั้งสามคู่ข้างต้น ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนามซึ่งเป็นตัวอย่างคนละชุดกับที่ทำการตรวจสอบลำดับเบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (New England Biolabs Inc.) ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดเพื่อการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม โดยผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 มาตัดด้วยเอนไซม์ SpeI (A'CTAG_T) ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 มาตัดด้วยเอนไซม์ NdeI (CA'TA_TG) และ NlaIII (_CATG') และผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 มาตัดด้วยเอนไซม์ DraI (TTT'AAA) และ NlaIII (_CATG') โดยในปฏิกิริยาการตัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ 0.5 ไมโครกรัม 10X ของเอนไซม์บัฟเฟอร์ที่จำเพาะ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำผลการตัดที่ได้ไปทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้บัฟเฟอร์ TBE (45 mM Tris-borate, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (100bp DNA Ladder, Promega)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การตรวจสอบแบบแผนอาร์เอพีดี

จากการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอพีดีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดีของไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 53 ไพรเมอร์ ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* จำนวน 3 สปีชีส์ คือ ม้าน้ำดำ (*H. kuda*) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) และ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ซึ่งแบบแผนอาร์เอพีดีทั้งหมดที่ตรวจสอบสามารถทำซ้ำได้ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่าลักษณะของแบบแผนอาร์เอพีดีมีลักษณะจำเพาะในแต่ละสปีชีส์ โดยพิจารณาได้จาก แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันของทุกตัวอย่างในสปีชีส์เดียวกัน และปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอเหล่านั้น โดยแสดงตัวอย่างของแบบแผนอาร์เอพีดีได้ดังภาพที่ 1, 2 และ 3 ที่เป็นผลจากไพรเมอร์ OPA-17, OPB-06 และ OPC-04 ตามลำดับ โดยแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้แต่ละสปีชีส์จะแสดงเป็นแถบบาร์โค้ดที่มีความหนาบางของแถบแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอ พร้อมบอกขนาดของแถบดีเอ็นเอเป็นคู่เบส โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ซึ่งกำหนดชื่อแบบแผนอาร์เอพีดีตามสปีชีส์ของม้าน้ำและไพรเมอร์ที่ใช้ เช่น ม้าน้ำดำกับไพรเมอร์ OPA-17 ก็จะมีชื่อว่า KA-17 เป็นต้น (ภาพที่ 1) และในแต่ละภาพจะแสดงการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบว่าได้ปรากฏร่วมกันกันม้าน้ำสปีชีส์อื่นหรือไม่ โดยใช้สัญลักษณ์เป็น A, B, C, D และ X แทนการปรากฏร่วมกันของแถบดีเอ็นเอนั้นระหว่างสปีชีส์ โดย A แทนการปรากฏร่วมกันของทั้งสามสปีชีส์, B แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนาม, C แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำดำกับม้าน้ำสามจุด และ D แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำหนามกับม้าน้ำสามจุด สำหรับ X จะแทนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในบางตัวอย่างของสปีชีส์อื่น ข้อมูลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้ง 53 ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1

จากผลของแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากไพรเมอร์โดยส่วนใหญ่พบว่า สามารถนำมาใช้สำหรับการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำทั้งสามสปีชีส์ออกจากกันได้ เนื่องจากแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้มีความจำเพาะกับสปีชีส์ดังตัวอย่างในภาพที่ 1 ถึง 3 และจากข้อมูลงานวิจัยของ Martinez และ Yman (1998) ที่แสดงให้เห็นว่าแบบแผนอาร์เอพีดีนั้นมักจะจำเพาะกับสปีชีส์ (species-specific) โดยมีบางไพรเมอร์ที่ให้แบบแผนที่มีความหลากหลายสูงหรือโพลีมอร์ฟิคภายในสปีชีส์ (polymorphic patterns within a species) ในขณะที่บางไพรเมอร์ให้ความหลากหลายที่ต่ำหรือโมโนมอร์ฟิคภายในสปีชีส์ (monomorphic patterns within species) และมีเพียงไม่กี่ไพรเมอร์เท่านั้นที่ไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์หรือรูปแบบที่ทำซ้ำไม่ได้ ซึ่งในกรณีของการเลือกใช้ไพรเมอร์เพื่อจำแนกสปีชีส์นั้น จะเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความหลากหลายที่ต่ำหรือโมโนมอร์ฟิคภายในสปีชีส์

จากการตรวจสอบข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแบบแผนอาร์เอพีดีของทุกไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) คือ ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสปีชีส์ จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมดของแต่ละสปีชีส์ และ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน จะเห็นว่าช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบนั้นอยู่ในช่วง 230 ถึง 1760 คู่เบส จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมดที่ตรวจสอบมีตั้งแต่ 0 ถึง 17 แถบ ซึ่งพบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุด เป็นจำนวนมาก

สุดเท่ากับ 5, 5 และ 6 แถบ ตามลำดับ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันของทั้งสามสปีชีส์ (A) พบมากสุด เท่ากับ 3 แถบ และระหว่างคู่ของสปีชีส์ ได้แก่ ม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนาม (B) ม้าน้ำดำกับม้าน้ำสามจุด (C) และ ม้าน้ำหนามกับม้าน้ำสามจุด (D) พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันมากสุดเท่ากับ 4, 8 และ 8 แถบ ตามลำดับ จากข้อมูลในตารางที่ 1 สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำทั้งสามสปีชีส์ได้ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เด่นชัดซึ่งจำเพาะต่อสปีชีส์ เช่นเดียวกับการจำแนกสปีชีส์ของหนู ทั้งสามสปีชีส์ในสกุล *Calomys* ที่อาศัยการปรากฏของแถบดีเอ็นเอร่วมกัน (common band) ของตัวอย่างในสปีชีส์เดียวกัน (González Ittig และคณะ, 2002) และจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD-marker) ที่แสดงความจำเพาะต่อสปีชีส์ของม้าน้ำมากขึ้น ซึ่งอาศัยวิธีการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสปีชีส์ และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาสร้างเครื่องหมายที่จำเพาะกับสปีชีส์นั้นๆ ต่อไปได้ (Dalla Valle และคณะ, 2002)

2. การตรวจสอบแบบแผนอาร์เอฟแอลพี

จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม สปีชีส์ละ 6 ตัวอย่าง ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA และคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 16S rRNA ซึ่งตำแหน่งยีนทั้งสองอยู่บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 430, 990 และ 620 ตามลำดับคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ ซึ่งม้าน้ำทั้งสองสปีชีส์ให้ผลผลิตขนาดเดียวกัน (ภาพที่ 4) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งสามคู่นี้ อ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Wilson และคณะ (2001) ที่รายงานเพียงจำนวนของลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ของ 12S rRNA และ 16S rRNA ที่มีจำนวน 339 และ 497 คู่เบส ตามลำดับ โดยไม่ได้รายงานขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสามคู่

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทั้งหมดส่งไปยังหน่วยบริการชีวภาพ (BSU: Bioservice Unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อหาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบความเหมือน แล้วทำการปรับแต่งจนได้เป็นลำดับเบสที่สมบูรณ์ ยกเว้นลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ซึ่งมีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดใหญ่ ทำให้บริเวณปลายของลำดับเบสในส่วนตำแหน่งจับโดยไพรเมอร์ H2001 ไม่ชัดเจน จึงสามารถรายงานลำดับเบสได้เพียง 954 และ 953 คู่เบส ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม ตามลำดับ (ภาพที่ 6) สำหรับคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 สามารถตรวจสอบลำดับเบสได้เท่ากันทั้งในม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม คือ 431 คู่เบส (ภาพที่ 5) เมื่อพิจารณาความแตกต่างที่เกิดขึ้นของลำดับเบสจากทั้งหกตัวอย่างของแต่ละสปีชีส์ พบว่าในม้าน้ำดำ ตัวอย่างหมายเลขที่ 6 แตกต่างจากอีกห้าตัวอย่างในเบสลำดับที่ 270 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในแบบ transition จาก T มาเป็น C (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทำให้ลำดับเบสที่แสดงในภาพที่สองตรงลำดับนี้จะแสดงเบสเป็น Y เนื่องจากลำดับดังกล่าวไม่พบตำแหน่งตัดที่สำคัญสำหรับม้าน้ำหนามทั้งหกตัวอย่างให้ผลของลำดับเบสที่เหมือนกัน และเมื่อพิจารณาผลของลำดับเบสที่ได้จากคู่

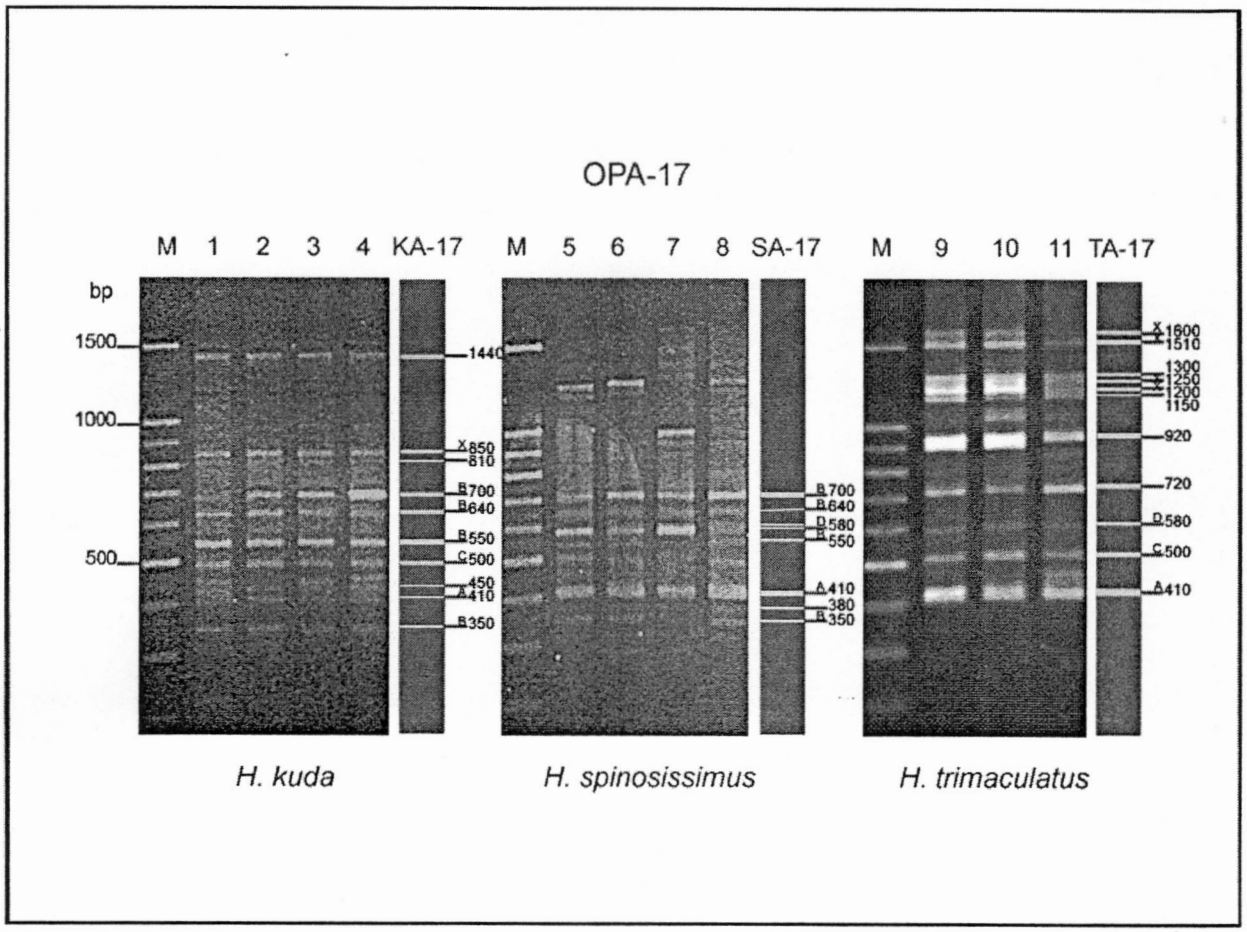
ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ทำให้พบว่า ลำดับเบสของตำแหน่งจับโดยไพรเมอร์ H1478 (5′-GAGGGTG ACGGGCGGTGTGT-3′) มีการเปลี่ยนแปลง 1 ตำแหน่ง เป็น GAGAGTGACGGGCGGTGTGT แต่ตำแหน่งดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์เนื่องจากมีเพียงตำแหน่งเดียว และไม่ได้อยู่ในตำแหน่งปลาย 3′ ที่จะส่งผลต่อการต่อสาย ส่วนผลลำดับเบสที่ได้ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 แสดงในภาพที่ 5 และ 6 โดยลำดับเบสที่ได้ของม้าน้ำดำให้ผลแบบเดียวกับไพรเมอร์คู่แรก คือตัวอย่างหมายเลขที่ 6 แตกต่างจากห้าตัวอย่างที่เหลือ แต่สำหรับม้าน้ำหนามนั้นทั้งหกตัวอย่างมีความแตกต่างกันทุกตัวอย่าง ซึ่งตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับเบสนั้นจะแสดงเป็น R หรือ Y เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสระหว่าง A กับ G และ C กับ T ตามลำดับ ซึ่งลำดับเบสของทุกตัวอย่างในแต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างในตำแหน่งของเบสเท่ากับ 3 และ 9 ตำแหน่ง ในม้าน้ำดำ และ ม้าน้ำหนาม ตามลำดับ

สำหรับผลผลิตพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม สามารถตรวจสอบลำดับเบส ได้เท่ากับ 617 และ 620 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) เมื่อพิจารณาลำดับเบสระหว่างตัวอย่างภายในสปีชีส์เดียวกันพบว่าสามารถจัดแบ่งความเหมือนออกได้เป็นกลุ่ม โดยในม้าน้ำดำ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหมายเลข 1 และ 4 กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างหมายเลข 2, 5 และ 6 และกลุ่มที่ 3 คือตัวอย่างหมายเลข 3 สำหรับม้าน้ำหนามก็สามารถแบ่งได้เป็นสามกลุ่มเช่นกันคือ กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างหมายเลข 1 และ 5 กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างหมายเลข 2, 4 และ 6 และ กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างหมายเลข 3 แต่ความแตกต่างดังกล่าวนี้มีเพียงตัวอย่างที่ 3 ของม้าน้ำหนามเท่านั้นที่แตกต่างจากตัวอย่างอื่น เนื่องจากความแตกต่างของลำดับเบสส่งผลต่อการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตรวจสอบได้ คือ *Bfa*I (ภาพที่ 7) ซึ่งลำดับเบสของทุกตัวอย่างในแต่ละสปีชีส์จะมีความแตกต่างในตำแหน่งของเบสเพียง 3 และ 2 ตำแหน่ง เท่านั้น ในม้าน้ำดำ และ ม้าน้ำหนาม ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลของลำดับเบสที่ได้ของม้าน้ำดำจากตำแหน่งยีนทั้ง 12S rRNA ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ 16S rRNA ของคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ไปตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยการใช้โปรแกรม BLAST พบว่าได้ข้อมูลของม้าน้ำอีกหลายสปีชีส์ ซึ่งได้ค่า E-value ที่ต่ำกว่า 1e-132 และ 1e-92 ตามลำดับ และพบข้อมูลของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม ในตำแหน่งยีน 16S rRNA ส่วนตำแหน่งยีน 12S rRNA พบเพียงม้าน้ำดำ เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมา alignment และทำการตรวจสอบตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอาศัยโปรแกรมประยุกต์ Restriction Mapping Utility ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.1 (Hall, 1999) สามารถวิเคราะห์ และแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ดังภาพที่ 2, 3 และ 4 โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่วิเคราะห์นี้เป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 ตำแหน่ง และมีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะซึ่งไม่มีเบสอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องอยู่ภายใน จากภาพที่ 2 ซึ่งเป็นตำแหน่งยีน 12S rRNA ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสิ้น 3 ชนิด คือ *Bfa*I, *Spe*I และ *Tsp509*I และเมื่อเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีลำดับเบสครบถ้วนเช่นเดียวกับม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนามที่ทำการทดลอง พบว่าสามารถแสดงแผนผังการจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Bfa*I และ *Spe*I เนื่องจาก

*Tsp509*I มีตำแหน่งตัดที่อยู่ในบริเวณที่ไม่มีลำดับเบสของหลายตัวอย่าง ดังนั้นการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล Hippocampus ตามแผนผังที่แสดงในภาพที่ 8 หากต้องการแยกม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามที่ทำการทดลองออกจากกัน ก็สามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์ *Spe*I ตัดผลผลิตพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 (ภาพที่ 10) แต่จากแผนผังในภาพที่ 8 จะพบว่ามีตัวอย่างของม้าน้ำดำที่ได้จากฐานข้อมูลให้ผลเช่นเดียวกับม้าน้ำหนาม แสดงว่าผลการจำแนกม้าน้ำสองสปีชีส์นี้ออกจากกันอาจให้ผลที่ผิดพลาดได้ สำหรับผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 จะแสดงให้เห็นการจำแนกม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามโดยการใช้เอนไซม์ *Afl*III, *Nde*I, *Fat*I และ *Nla*III (*Fat*I กับ *Nla*III มีลำดับเบสที่ตำแหน่งจดจำแบบเดียวกัน) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ ไม่แสดงตำแหน่งตัดบนผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 (ภาพที่ 5 และ 6) แต่เนื่องจากไม่มีตัวอย่างลำดับเบสของม้าน้ำสปีชีส์อื่นที่มีลำดับเบสเท่ากับของไพรเมอร์คู่นี้ ทำให้การเปรียบเทียบจากแผนผังในภาพที่ 8 จะทำเพียงม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามที่ทำการทดลองเท่านั้น ซึ่งผลจากแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์บางชนิด ได้แก่ *Nde*I และ *Nla*III ก็ให้ผลที่สามารถจำแนกม้าน้ำสองสปีชีส์นี้ออกจากกันได้ (ภาพที่ 10)

ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ของตำแหน่งยีน 16S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 จากการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 7) พบว่าเอนไซม์ *Bfa*I สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างภายในสปีชีส์ของม้าน้ำหนามได้ ดังนั้นจึงไม่นำมาพิจารณา จึงพบว่าการจำแนกม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ *Dra*I, *Fat*I และ *Nla*III (ภาพที่ 9) และเมื่อทำการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Dra*I และ *Nla*III ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้แล้ว พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันคือสามารถจำแนกม้าน้ำดำและม้าน้ำหนามออกจากกันได้ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 1 แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 สปีชีส์ โดยไพรเมอร์ OPA-17 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

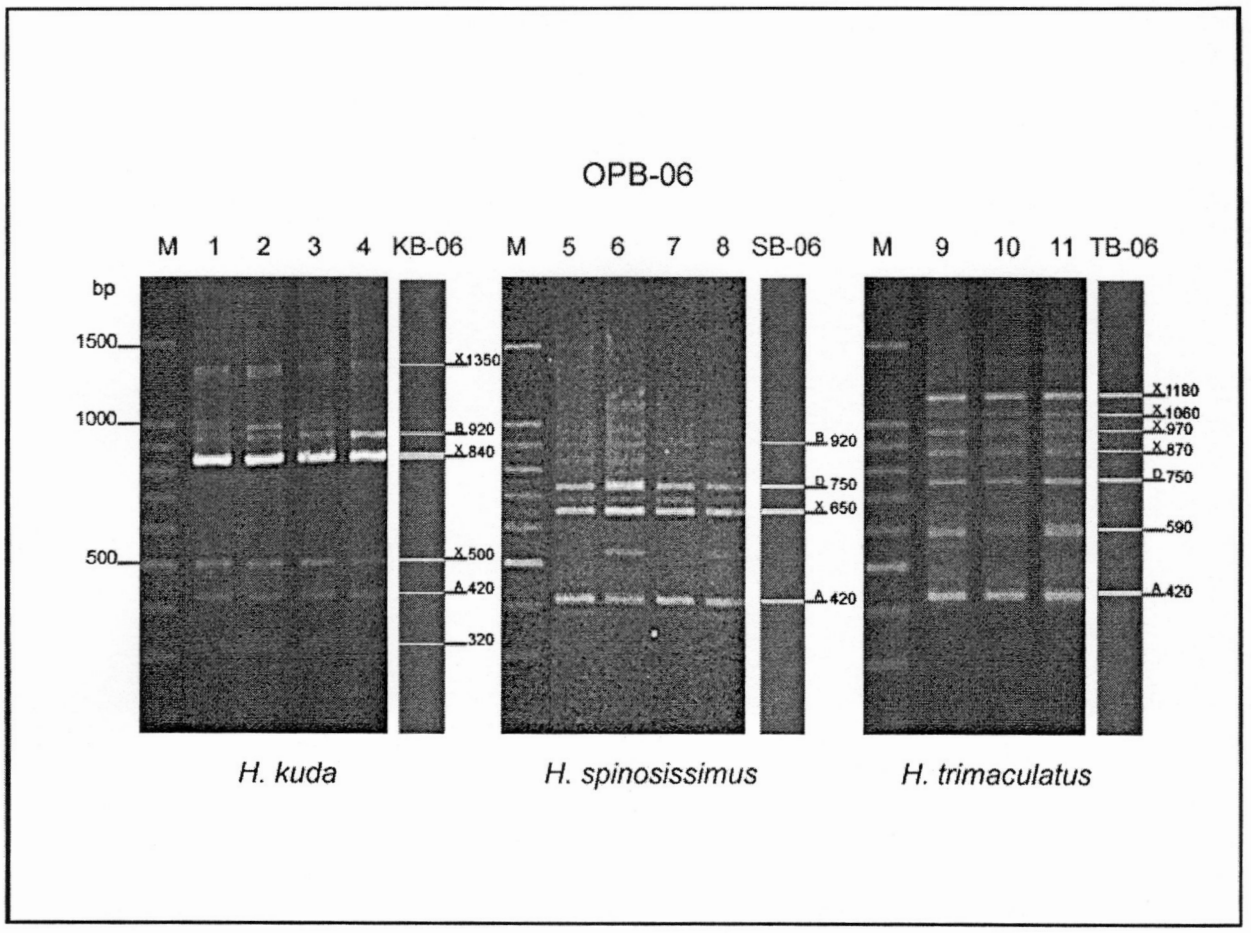
ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*)

ตัวอย่างหมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*)

ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*)

KA-17, SA-17 และ TA-17 คือแบบแผนอาร์เอพีดีในรูปแบบบาร์โค้ดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และ ม้าน้ำสามจุด ตามลำดับ ที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-17

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



ภาพที่ 2 แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 สปีชีส์ โดยไพรเมอร์ OPB-06 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

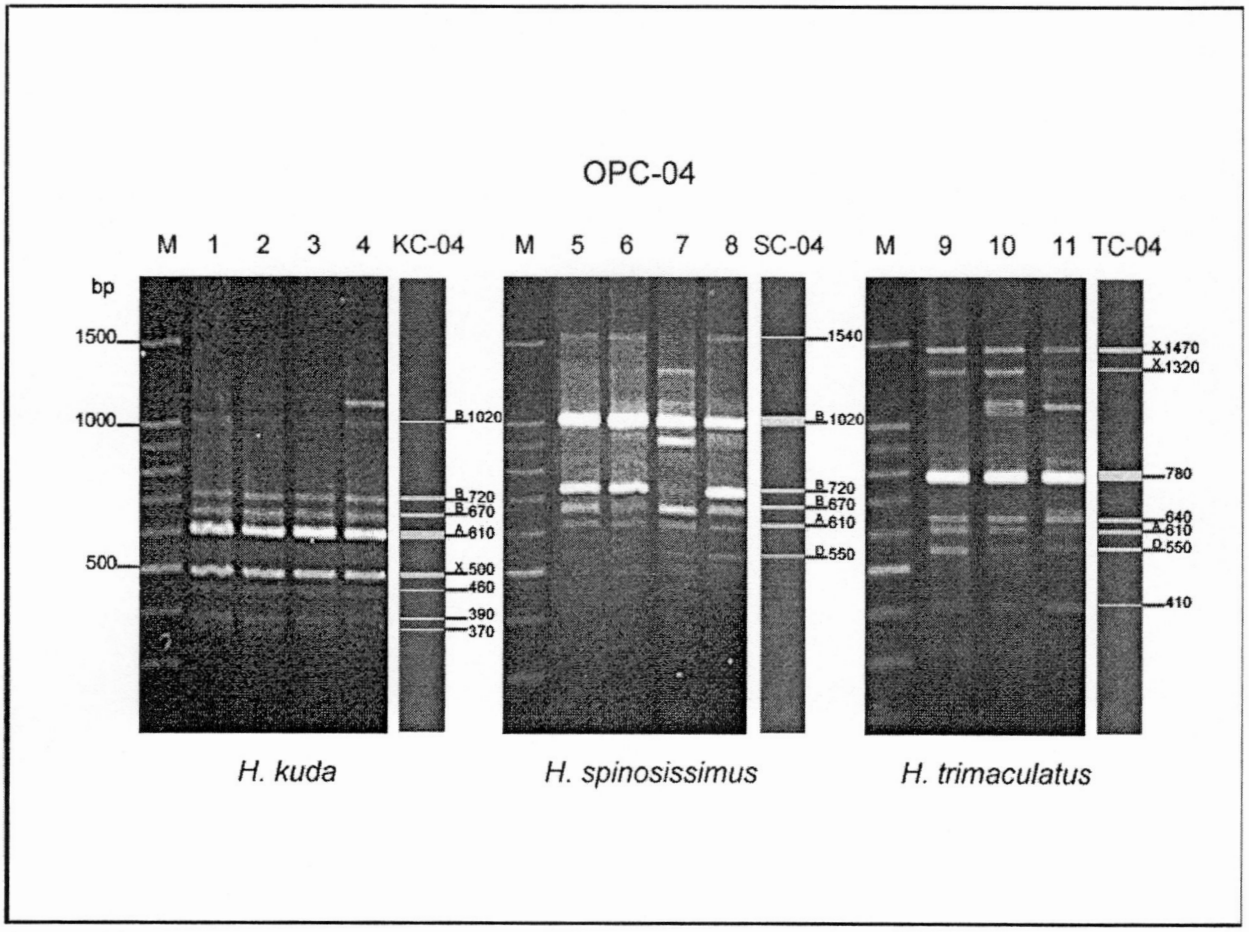
ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*)

ตัวอย่างหมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*)

ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*)

KB-06, SB-06 และ TB-06 คือแบบแผนอาร์เอพีดีในรูปแบบบาร์โค้ดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และ ม้าน้ำสามจุด ตามลำดับ ที่เกิดจากไพรเมอร์ OPB-06

249285
ว๗. ๒๗๘
พ ๒๗๓ ก
ฉ.3



ภาพที่ 3 แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 สปีชีส์ โดยไพรเมอร์ OPC-04 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*)

ตัวอย่างหมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*)

ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*)

KC-04, SC-04 และ TC-04 คือแบบแผนอาร์เอพีดีในรูปแบบบาร์โค้ดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และ ม้าน้ำสามจุด ตามลำดับ ที่เกิดจากไพรเมอร์ OPC-04

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์อาร์เอพีดี และข้อมูลของแถบดีเอ็นเอของม้าน้ำทั้งสามสปีชีส์

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (คู่เบส)			จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสปีชีส์* (จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด**)			จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน***
			ม้าน้ำดำ	ม้าน้ำหนาม	ม้าน้ำสามจุด	ม้าน้ำดำ^{ABC}	ม้าน้ำหนาม^{ABD}	ม้าน้ำสามจุด^{ACD}	
1	OPA-01	CAG GCC CTT C	400 - 1200	380 - 920	640 - 1320	2 (7)	1 (4)	0 (6)	2^{C}, 3^{D}
2	OPA-02	TGCCGA GCT G	500 - 750	340 - 500	370 - 1580	0 (3)	1 (2)	5 (14)	1^{A}, 2^{C}
3	OPA-03	AGT CAG CCA C	530 - 1400	295 - 640	470 - 1400	0 (5)	2 (4)	2 (12)	1^{A}, 3^{C}, 1^{D}
4	OPA-04	AAT CGG GCT G	350 - 1300	350 - 1300	600 - 1110	2 (10)	0 (6)	0 (5)	2^{A}, 3^{B}, 1^{C}, 1^{D}
5	OPA-01	AGG GGT CTT G	420 - 1500	750 - 1640	750 - 1640	0 (3)	0 (3)	1 (10)	2^{C}, 3^{D}
6	OPA-06	GGT CCC TGA C	350 - 1530	700 - 1500	700 - 1660	1 (7)	1 (5)	3 (9)	2^{A}, 3^{B}, 1^{C}, 1^{D}
7	OPA-07	GAA ACG GGT G	620	620	510 - 1680	0 (1)	0 (1)	6 (12)	1^{A}
8	OPA-08	GTG ACG TAG G	510 -650	730 - 1760	280 - 1450	1 (2)	2 (8)	5 (8)	2^{D}
9	OPA-09	GGG TAA CGC C	370 - 1630	680 - 980	260 - 1200	2 (8)	0 (3)	1 (7)	1^{A}, 4^{C}, 1^{D}
10	OPA-10	GTG ATC GCA G	480 - 1300	520 - 610	480 - 1380	0 (7)	1 (4)	0 (9)	1^{A}, 4^{C}, 1^{D}
11	OPA-11	CAA TGC CCG T	370 - 1560	470 - 1560	370 - 1620	0 (7)	0 (3)	2 (8)	2^{A}, 1^{B}, 2^{C}, 1^{D}
12	OPA-12	TCG GCG ATA G	610 - 790	700 - 930	1110 - 1540	0 (7)	0 (7)	4 (6)	0
13	OPA-13	CAG CAC CCA C	510 - 1160	410 - 1250	380 - 1700	0 (8)	0 (11)	6 (17)	1^{A}, 2^{B}, 1^{C}, 8^{D}
14	OPA-14	TCT GTG CTG G	520 - 1300	280 - 1500	490 - 1750	0 (10)	2 (9)	2 (8)	3^{A}, 3^{B}, 2^{C}
15	OPA-15	TTC CGA ACC C	400 - 700	300 - 1580	400 - 1650	0 (4)	5 (13)	1 (9)	1^{A}, 1^{B}, 1^{C}, 4^{D}
16	OPA-12	GAC CGC TTG T	350 - 1440	350 - 700	410 - 1600	2 (10)	1 (7)	4 (11)	1^{A}, 4^{B}, 1^{C}, 1^{D}
17	OPA-18	AGG TGA CCG T	340 - 1120	290 - 1390	340 - 1750	0 (12)	1 (5)	2 (14)	1^{A}, 1^{B}, 6^{C}
18	OPA-19	CAA ACG TCG G	-	330 - 980	330 - 1480	0 (6)	1 (4)	3 (10)	4^{D}
19	OPA-20	GTT GCG ATC C	680 - 1280	350 - 1330	750 - 1230	0 (9)	1 (7)	1 (5)	3^{A}, 3^{B}, 2^{C}
20	OPB-01	GTT TCG CTC C	390 - 1750	500 - 900	390 - 1750	0 (12)	1 (6)	1 (12)	3^{A}, 1^{B}, 5^{C}
21	OPB-02	TGA TCC CTG G	310 - 1480	750 - 820	510 - 1680	0 (4)	1 (2)	5 (11)	1^{A}, 1^{C}

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (คู่เบส)			จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสปีชีส์* (จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด**)			จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน***
			ม้าน้ำดำ	ม้าน้ำหนาม	ม้าน้ำสามจุด	ม้าน้ำดำ^{ABC}	ม้าน้ำหนาม^{ABD}	ม้าน้ำสามจุด^{ACD}	
22	OPB-03	CAT CCC CCT G	470 - 900	340 - 1140	310 - 1400	0 (5)	1 (3)	1 (9)	$2^{C}, 2^{D}$
23	OPB-04	GGA CTG GAG T	380 - 1300	730	310 - 1420	5 (14)	0 (1)	4 (12)	$1^{A}, 6^{C}$
24	OPB-05	TGC GCC CTT C	700 - 1450	700 - 1450	440 - 1580	0 (4)	0 (4)	4 (11)	$2^{A}, 1^{D}$
25	OPB-06	TGCTCT GCC C	320 - 1350	420 - 920	420 - 1180	1 (6)	0 (4)	1 (7)	$1^{A}, 1^{B}, 1^{D}$
26	OPB-03	GGT GAC GCA G	380 - 1700	570 - 1220	380 - 1350	0 (14)	0 (2)	1 (12)	$1^{A}, 7^{C}, 1^{D}$
27	OPB-08	GTC CAC ACG G	650 - 1000	680 - 1070	410 - 1300	0 (6)	0 (3)	2 (9)	$1^{A}, 3^{C}, 2^{D}$
28	OPB-09	TGG GGG ACT C	410 - 890	470 - 1080	550 - 1360	1 (4)	3 (4)	2 (4)	1^{B}
29	OPB-10	CTG CTG GGA C	390 - 1300	650 - 800	420 - 1040	1 (7)	0 (3)	4 (11)	$1^{B}, 1^{C}, 2^{D}$
30	OPB-11	GTA GAC CCG T	320 - 1180	250 - 960	200 - 1480	1 (8)	1 (6)	4 (11)	$2^{B}, 2^{C}, 1^{C}$
31	OPB-12	CCT TGA CGC A	390 - 1300	350 - 1680	290 - 1420	0 (5)	1 (6)	0 (11)	2^{C}
32	OPB-13	TTC CCC CGC T	960	-	710 - 770	0 (1)	0 (0)	1 (2)	0
33	OPB-14	TCC GCT CTG G	590 - 1200	390 - 1200	320 - 1700	0 (5)	0 (3)	3 (8)	$3^{A}, 2^{B}$
34	OPB-11	GGA GGG TGT T	400 - 1380	400 - 1400	310 - 1400	2 (14)	0 (7)	0 (11)	$2^{A}, 2^{B}, 5^{C}, 3^{D}$
35	OPB-16	TTT GCC CGG A	330 - 1108	550 - 1620	510 -1620	1 (9)	0 (6)	0 (8)	$1^{A}, 2^{B}, 3^{C}, 1^{D}$
36	OPB-17	CCA CAG CAG T	230 - 1500	330 - 770	440 - 1440	0 (14)	1 (7)	0 (11)	$2^{A}, 3^{B}, 4^{C}$
37	OPB-18	CCA CAG CAG T	240 - 1160	300 - 1220	300 - 1680	2 (12)	0 (9)	3 (13)	$3^{A}, 3^{B}, 3^{C}, 3^{D}$
38	OPB-19	ACC CCC GAA G	560 - 1100	350 - 1100	480 - 1480	0 (2)	1 (6)	1 (6)	1^{A}
39	OPB-20	GGA CCC TTA C	550 - 1520	590 - 1210	400 - 1460	1 (7)	1 (4)	1 (10)	$1^{A}, 1^{C}, 1^{D}$
40	OPC-01	TTC GAG CCA G	290 - 1500	1010 - 1500	240 - 1560	1 (12)	0 (3)	2 (14)	$1^{A}, 8^{C}, 1^{D}$
41	OPC-02	GTG AGG CGT C	630 - 960	630 - 1650	310 - 1400	0 (2)	2 (5)	2 (15)	$2^{A}, 1^{D}$
42	OPC-03	GGG GGT CTT T	250 - 1150	420 - 1250	440 - 1410	2 (5)	0 (5)	1 (4)	$1^{C}, 1^{D}$
43	OPC-04	CCG CAT CTA C	370 - 1020	550 - 1540	410 - 1470	3 (8)	1 (6)	3 (7)	$1^{A}, 3^{B}, 1^{D}$

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (คู่เบส)			จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสปีชีส์* (จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด**)			จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน***
			ม้าน้ำดำ	ม้าน้ำหนาม	ม้าน้ำสามจุด	ม้าน้ำดำ^{ABC}	ม้าน้ำหนาม^{ABD}	ม้าน้ำสามจุด^{ACD}	
44	OPC-05	GAT GAC CGC C	300 - 1480	620 - 1020	340 - 1300	2 (11)	0 (4)	0 (8)	$1^{A}, 2^{C}, 1^{D}$
45	OPC-06	GAA CGG ACT C	470 - 1500	1070 - 1440	340 - 1580	1 (7)	0 (4)	2 (12)	$2^{A}, 2^{B}$
46	OPC-07	GTC CCG ACG A	610 - 1720	1080	310 - 1520	3 (8)	0 (1)	1 (7)	$1^{A}, 1^{C}$
47	OPC-08	TGG ACC GGT G	390 - 980	480 - 1500	300 - 1630	0 (10)	0 (8)	2 (11)	$1^{A}, 1^{B}, 4^{C}, 2^{D}$
48	OPC-09	CTC ACC GTC C	400 - 1280	400 - 900	370 - 1500	0 (8)	0 (6)	1 (6)	$3^{B}, 2^{C}$
49	OPC-10	TGT CTG GGT G	360 - 1050	320 - 1050	290 - 1050	0 (7)	0 (1)	2 (10)	$1^{A}, 2^{B}, 4^{C}$
50	OPC-11	AAA GCT GCG G	360 - 1470	360 - 1450	420 - 1250	1 (15)	0 (12)	0 (7)	$1^{A}, 4^{B}, 1^{C}, 2^{D}$
51	OPC-12	TGT CAT CCC C	280 - 1150	380 - 1360	280 - 1360	1 (8)	0 (10)	1 (6)	$3^{B}, 1^{C}, 1^{D}$
52	OPC-13	AAG CCT CGT C	400 - 1250	400 - 1460	460 - 1650	1 (10)	0 (5)	2 (7)	$4^{B}, 2^{C}$
53	OPC-14	TGC GTG CTT G	440 - 1280	440 - 1150	440 - 1380	1 (6)	1 (7)	1 (8)	$2^{A}, 2^{C}, 1^{D}$

*จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อสปีชีส์ คือ จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในสปีชีส์อื่นเลย

**จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด คือ จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทุกตัวอย่างจากสปีชีส์เดียวกัน

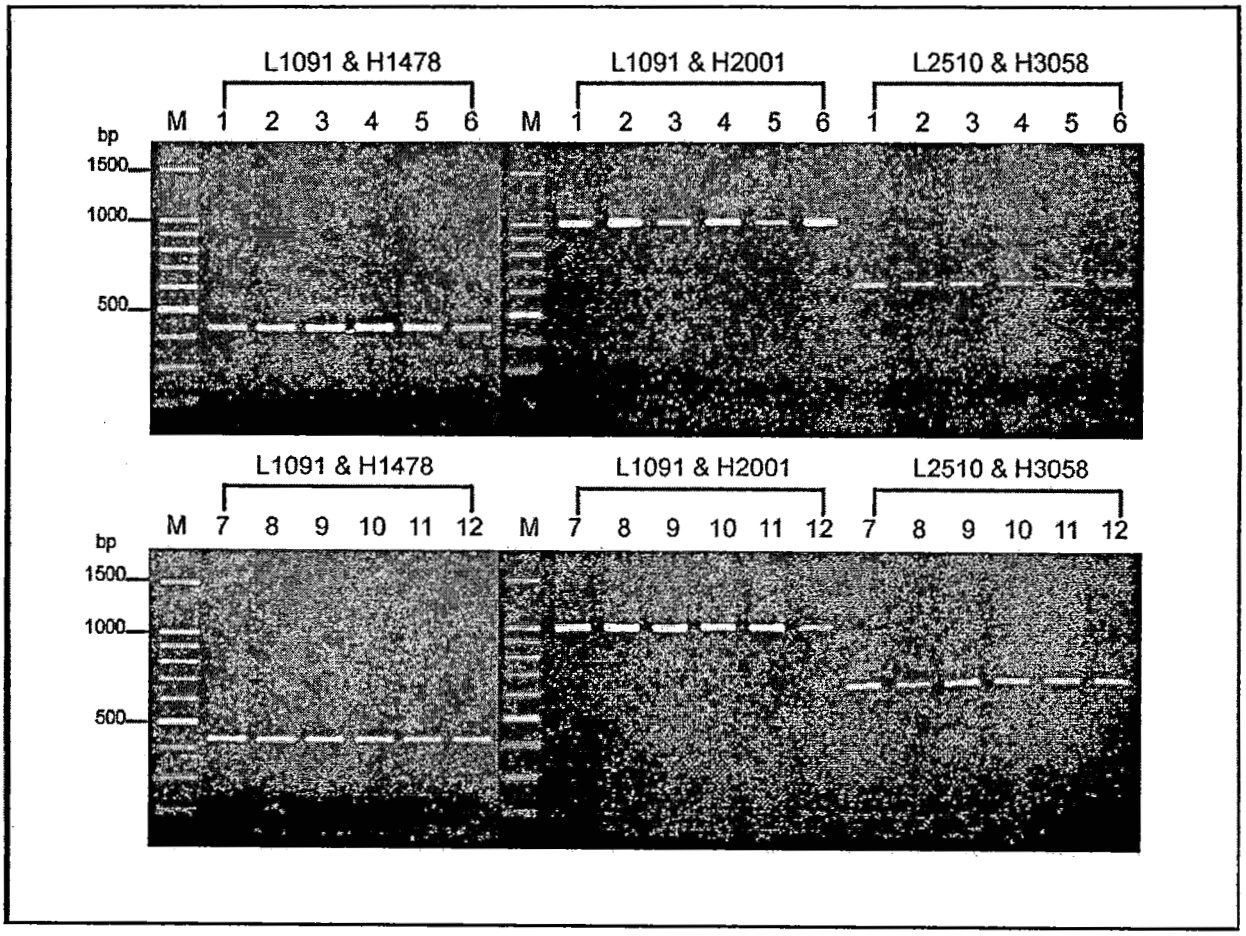
***จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบร่วมกัน คือ จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ตัวอย่างต่างสปีชีส์กันก็สามารถพบแถบดีเอ็นเอนั้นเป็นแถบดีเอ็นเอจำเพาะได้

ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{A} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ทั้ง 3 สปีชีส์

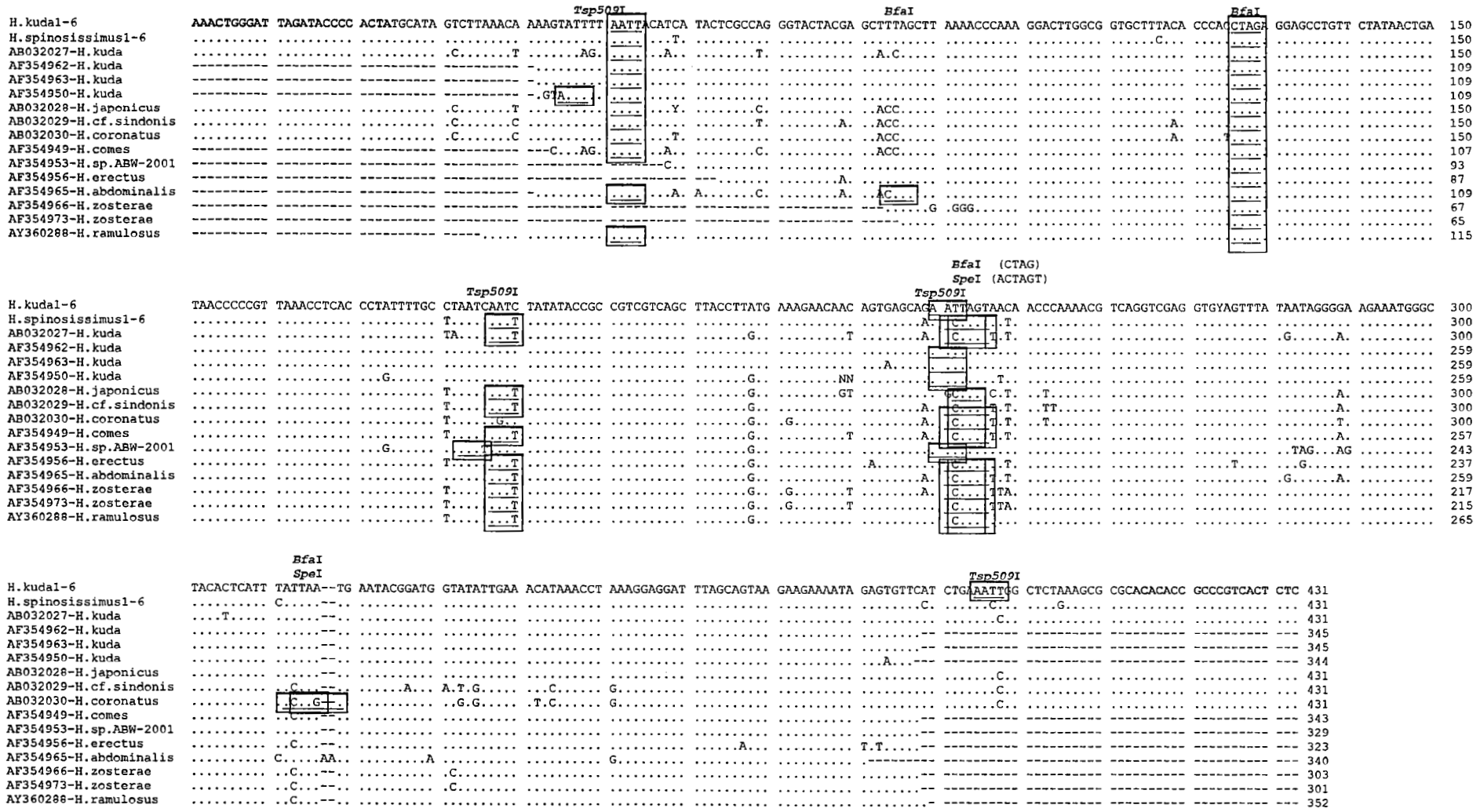
ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{B} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ระหว่างม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนาม

ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{C} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ระหว่างม้าน้ำดำ กับม้าน้ำสามจุด

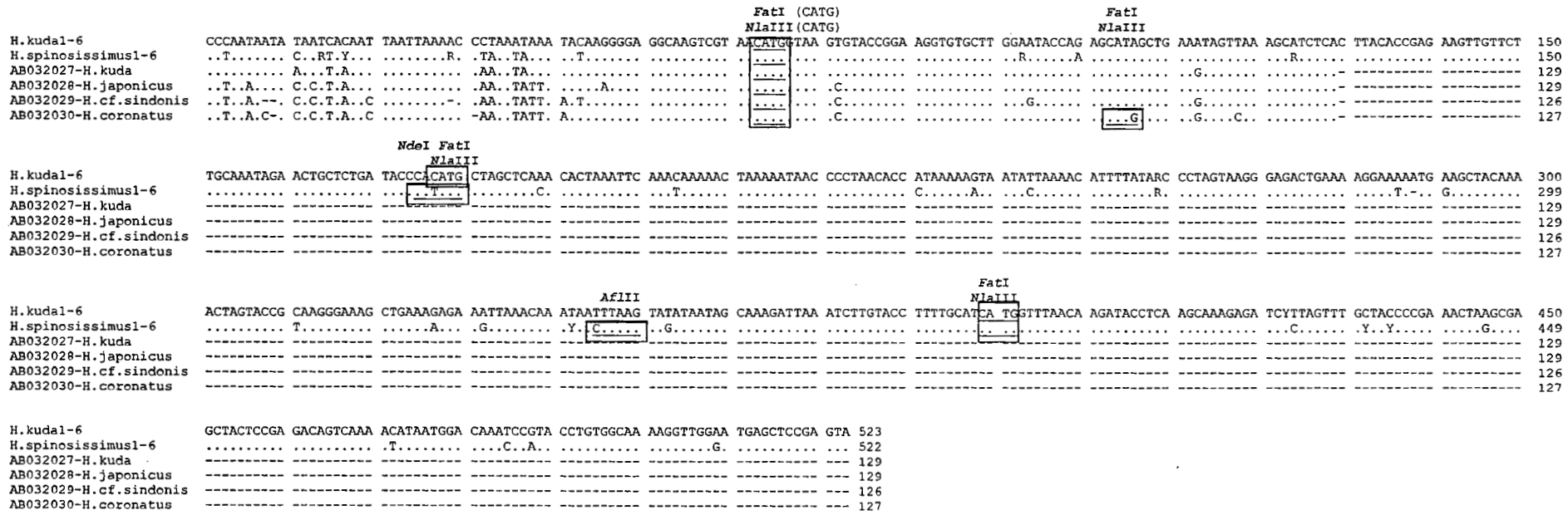
ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{D} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ระหว่างม้าน้ำหนาม กับม้าน้ำสามจุด



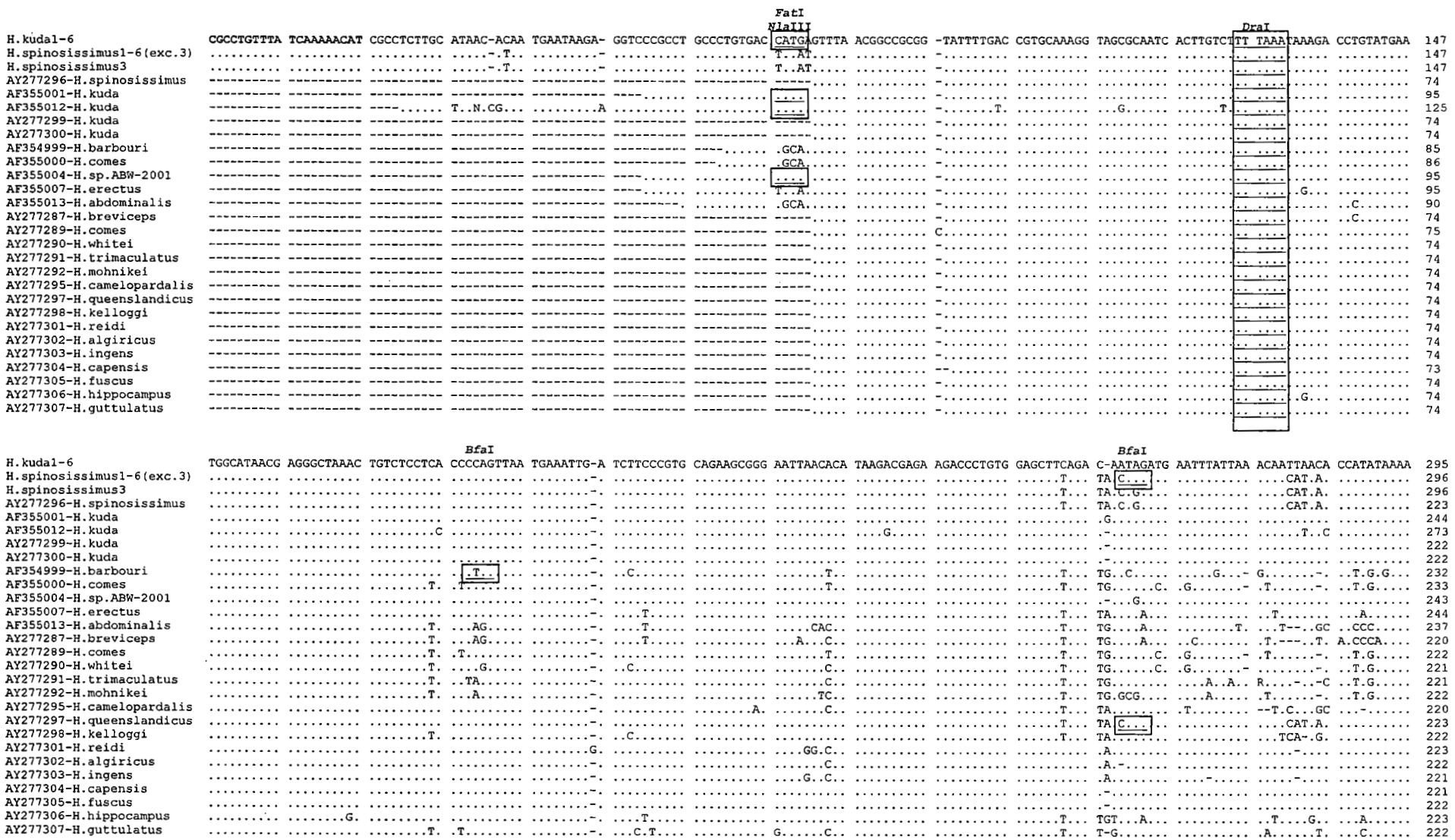
ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (Hippocampus kuda) และม้าน้ำหนาม (H. spinosissimus) โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478, L1091 กับ H2001 และ L2510 กับ H3058 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 6 คือ ม้าน้ำดำ และตัวอย่างหมายเลข 7 ถึง 12 คือ ม้าน้ำหนาม



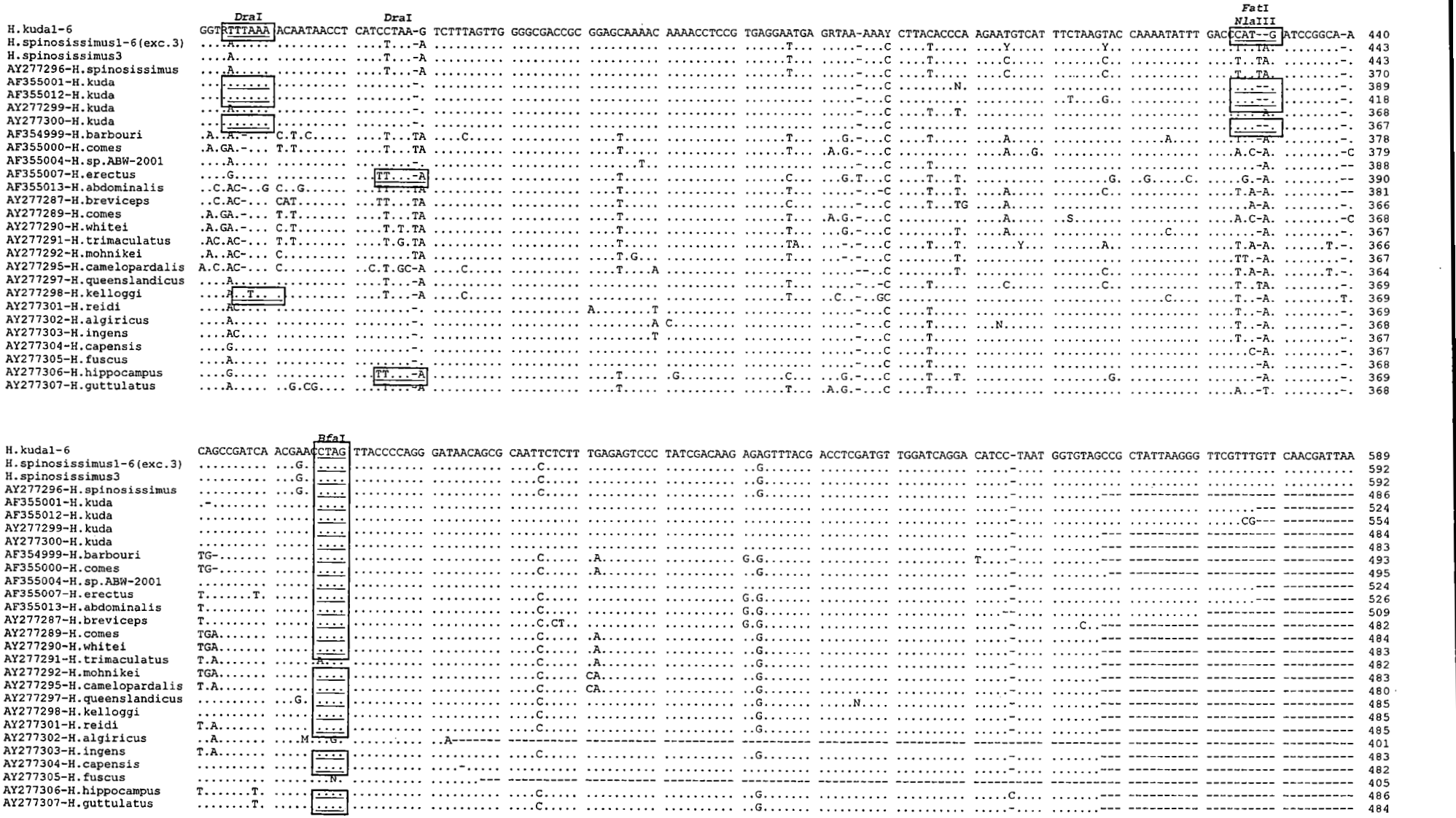
ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 ซึ่งตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงเป็นตัวทึบ จุด (.) แสดงเบสที่เหมือนกับดีเอ็นเอสายแรก การแทนที่เบส (substitution: transitions and transverstions) แสดงด้วยเบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอสายแรก สำหรับบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดแสดงด้วยการขีดเส้นใต้



ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ในที่นี้แสดงลำดับเบสต่อจากภาพที่ 1 จุด (.) แสดงเบสที่เหมือนกับดีเอ็นเอสายแรก การแทนที่เบส (substitution: transitions and transverstions) แสดงด้วยเบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอสายแรก สำหรับบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดแสดงด้วยการขีดเส้นใต้ ไม่ได้แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ H2001 เนื่องจากลำดับเบสตั้งแต่ 524 และ 523 เป็นต้นไป ได้ผลที่ไม่ชัดเจน



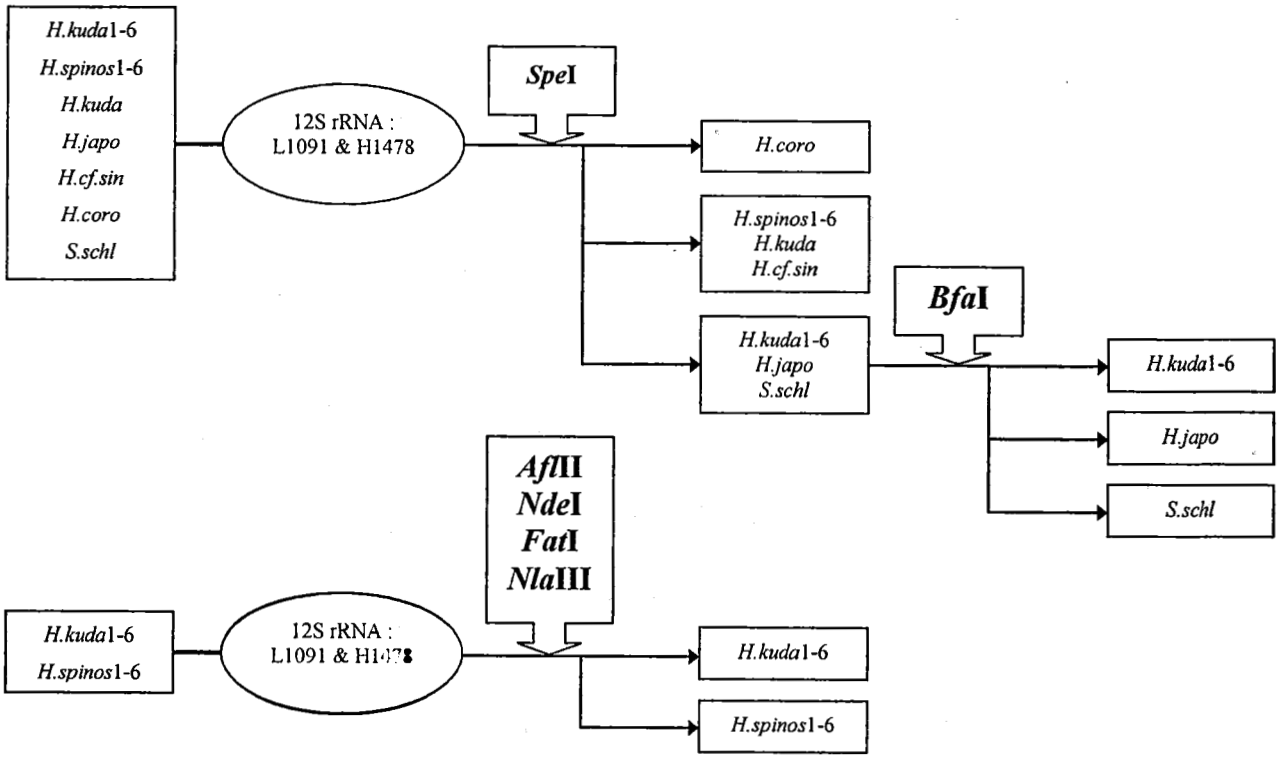
ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 16S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ซึ่งตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงเป็นตัวทึบ จุด (.) แสดงเบสที่เหมือนกับดีเอ็นเอสายแรก การแทนที่เบส (substitution: transitions and transverstions) แสดงด้วยเบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอสายแรก สำหรับบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดแสดงด้วยการขีดเส้นใต้


DraI
DraI
FatI
NlaIII
BfaI
H.kuda1-6
H.spinosissimus1-6(exc.3)
H.spinosissimus3
AY277296-H.spinosissimus
AF355001-H.kuda
AF355012-H.kuda
AY277299-H.kuda
AY277300-H.kuda
AF354999-H.barbouri
AF355000-H.comes
AF355004-H.sp.ABW-2001
AF355007-H.erectus
AF355013-H.abdominalis
AY277287-H.breviceps
AY277289-H.comes
AY277290-H.whitei
AY277291-H.trimaculatus
AY277292-H.mohnikei
AY277295-H.camelopardalis
AY277297-H.queenslandicus
AY277298-H.kelloggi
AY277301-H.reidi
AY277302-H.algiricus
AY277303-H.ingens
AY277304-H.capensis
AY277305-H.fuscus
AY277306-H.hippocampus
AY277307-H.guttulatus

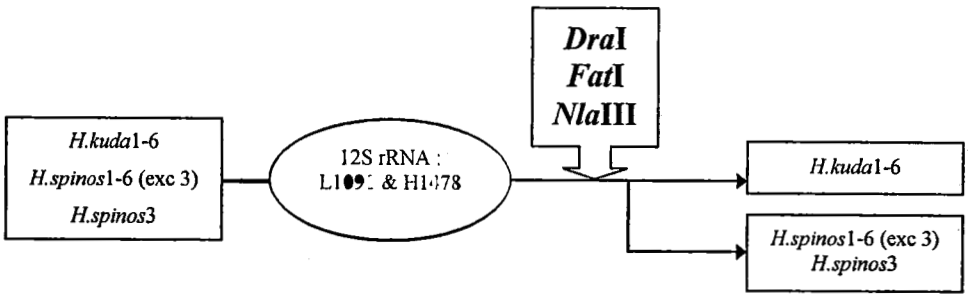
ภาพที่ 7 (ต่อ)

```
H.kuda1-6                  AGTCCTACGT GATCTGAGTT CAGACCGG 617
H.spinosissimus1-6(exc.3)  .......... .......... ........ 620
H.spinosissimus3           .......... .......... ........ 620
AY277296-H.spinosissimus   ---------- ---------- -------- 486
AF355001-H.kuda            ---------- ---------- -------- 524
AF355012-H.kuda            ---------- ---------- -------- 554
AY277299-H.kuda            ---------- ---------- -------- 484
AY277300-H.kuda            ---------- ---------- -------- 483
AF354999-H.barbouri        ---------- ---------- -------- 493
AF355000-H.comes           ---------- ---------- -------- 495
AF355004-H.sp.ABW-2001     ---------- ---------- -------- 524
AF355007-H.erectus         ---------- ---------- -------- 526
AF355013-H.abdominalis     ---------- ---------- -------- 509
AY277287-H.breviceps       ---------- ---------- -------- 482
AY277289-H.comes           ---------- ---------- -------- 484
AY277290-H.whitei          ---------- ---------- -------- 483
AY277291-H.trimaculatus    ---------- ---------- -------- 482
AY277292-H.mohnikei        ---------- ---------- -------- 483
AY277295-H.camelopardalis  ---------- ---------- -------- 480
AY277297-H.queenslandicus  ---------- ---------- -------- 485
AY277298-H.kelloggi        ---------- ---------- -------- 485
AY277301-H.reidi           ---------- ---------- -------- 485
AY277302-H.algiricus       ---------- ---------- -------- 401
AY277303-H.ingens          ---------- ---------- -------- 483
AY277304-H.capensis        ---------- ---------- -------- 482
AY277305-H.fuscus          ---------- ---------- -------- 405
AY277306-H.hippocampus     ---------- ---------- -------- 486
AY277307-H.guttulatus      ---------- ---------- -------- 484
```

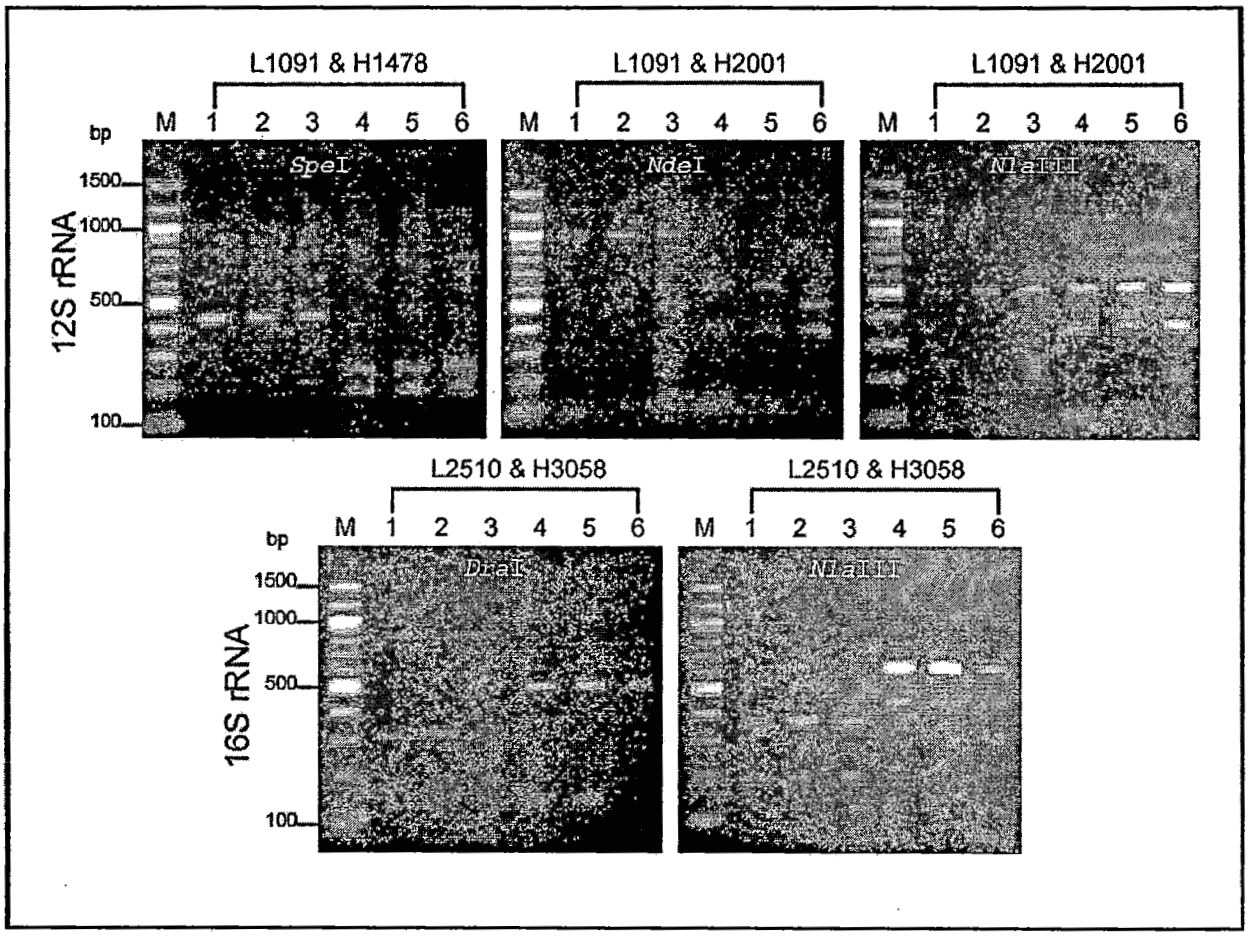
ภาพที่ 7 (ต่อ)



ภาพที่ 8 แผนผังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล Hippocampus โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001



ภาพที่ 9 แผนผังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล Hippocampus โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 16S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058



ภาพที่ 10 แบบแผนอาร์เอฟแอลพีของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (Hippocampus kuda) และม้าน้ำหนาม (H. spinosissimus) โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478, L1091 กับ H2001 และ L2510 กับ H3058 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 3 คือ ม้าน้ำดำ และตัวอย่างหมายเลข 4 ถึง 6 คือ ม้าน้ำหนาม

สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากผลการทดลองเป็นการยืนยันให้เห็นว่าเทคนิคอาร์เอฟพีดีสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการจำแนกสปีชีส์ของตัวอย่างม้าน้ำทั้งสามสปีชีส์ได้ โดยอาศัยแบบแผนอาร์เอฟพีดีที่ได้จากไพรเมอร์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดลองซึ่งแสดงถึงความจำเพาะกับแต่ละสปีชีส์ ถึงแม้จะมีไพรเมอร์บางส่วนที่ให้ผลไม่เด่นชัด ซึ่งการศึกษานี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นเพื่อการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมของม้าน้ำ ที่สามารถนำไปประยุกต์ในขั้นตอนต่อไปคือ การสร้างเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการจำแนกสปีชีส์ การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร การตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สำคัญ และการจัดการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงม้าน้ำ เป็นต้น สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบนตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA โดยอาศัยการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดบนลำดับเบสที่ได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลของลำดับเบสของม้าน้ำสกุลเดียวกันหรือสปีชีส์เดียวกันที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบสำหรับการตัดสินใจเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อนำมาแสดงแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำได้

การวิจัยในขั้นตอนต่อไปที่ควรจะทำก็คือ การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแบบแผนอาร์เอพีดีที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของม้าน้ำแต่ละสปีชีส์ว่ามีลำดับเบสเป็นอย่างไร เพื่อนำลำดับเบสที่ได้มาสร้างไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสปีชีส์นั้นๆขึ้น เพื่อนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำโดยเทคนิคพีซีอาร์ หรือเนสเต็ดพีซีอาร์ (nested PCR) ที่สามารถตรวจสอบได้ง่าย แน่นอน และรวดเร็วกว่าการสร้างแบบแผนอาร์เอพีดี สำหรับการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอฟแอลพี ก็ควรเพิ่มตำแหน่งยีนที่ศึกษาให้เพิ่มมากขึ้น เช่นตำแหน่งยีน cytochrome b, RP1 และ Aldolase เป็นต้น เพื่อเพิ่มฐานข้อมูลที่ใช้สำหรับการสร้างแผนผังเพื่อการจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ต่อไป

บรรณานุกรม

Appa Rao K. B. C., Bhat K. V. and Totey S. M. 1996. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 13: 135 – 138.

Barriga-Sosa, I.A., Pérez-Ramírez, M.Y., Soto-Aguirre, F., Castillo-Rivera, M. and Arredondo-Figueroa, J.L. 2005. Inter-specific variation of the mitochondrial r16S gene among silversides, "Peces Blancos", (Atherinopsidae: Menidiinae) and its utilization for species identification. Aquaculture 250: 637 – 651.

Carrera, E., Garcia, T. Céspedes, A. González, I., Fernández, A., Hernández, P.E. and Martin, R. 1999. Salmon and Trout Analysis by PCR-RFLP for Identity Authentication. Journal of Food Science, Vol. 64, No. 3: 410 – 413.

Casey, S. P., Hall, H. J., Stanley, H. F. and Vincent, A. C. J. 2003. The origin and evolution of seahorses (genus Hippocampus): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 261 – 272.

Dalla Valle L., Zanella L., Belvedere P. and Colombo L. 2002. Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damselae* subsp. *Piscicida* (Vibrionaceae). *Aquaculture* 207: 187 – 202.

Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Yiswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M. and Sharma, B. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. Meat Science 70: 107 – 112.

González Ittig R.E., Chiappero M.B., Blanco A., Provensal C. and Gardenal C.N. 2002. Accurate identification of three cryptic species of rodents of the genus *Calomys* using RAPD-PCR and mitDNA RFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 425 – 432.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser 41: 95-98

Hoelzel, A. R. 1998. Molecular Genetic Analysis of Populations, 2nd., Oxford University Press, New York.

Ishizaki, S., Yokoyama, Y., Oshiro, N., Teruya, N., Nagashima, Y., Shiomi, K. and Watabe, S. 2005. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D. Article in press.

Karaiskou, N., Triantafyllidis, A., Margaroni, M., Karatzas, D. And Triantaphyllidis, C. A double DNA approach for identifying Macrorhamphosus scolopax (Pisces, Centriscidae). ICES Journal of Marine Science 62: 1683 – 1690.

Kocher, T.D., Thomas,W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 86: 6196 – 6200.

Martinez I. and Yman I. M. 1998. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International*, Vol. 31, No. 6 – 7: 459 – 466.

Partis L. and Wells R. J. 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* 10: 435 – 441.

Saez R., Sanz Y. and Toldrá F. 2004. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science* 66: 659 – 665.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Teske, P. R., Cherry, M. I. and Matthee, C. A. 2003. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: Hippocampus): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 273 – 286.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, submitted, June 1994.

Wilson, A. B., Vincent, A., Ahnesjö, I., and Meyer, A. 2001. Male Pregnancy in Seahorses and Pipefishes (Family Syngnathidae): Rapid Diversification of Paternal Brood Pouch Morphology Inferred From a Molecular Phylogeny. J Hered 92: 159-166.

Zhang, J., Huang, H., Cai, Z. and Huang, L. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. Food Control 17: 557 – 563.