บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การรวบรวมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแม่และลูกเต่าตนุ จากบริเวณหาดขาม ที่ตั้งอยู่บนเกาะครามฯ จ. ชลบุรี (ภาพที่ 3-1) ซึ่งตั้งอยู่พิกัด 12 40.83 N และ 100 47.55 E อยู่ทางทิศตะวันตกของอำเภอสัตหีบ ห่างฝั่งประมาณ 5 กิโลเมตร มีขนาดประมาณ 12 ตารางกิโลเมตร เกาะครามเป็นพื้นที่ของฐานทัพทหารเรือสัตหีบและเป็นบริเวณที่มีเต่าวางไข่มากที่สุดแห่งหนึ่งในอ่าวไทย (หรรษา จรรย์แสง, อุกกฤต สตภูมินทร์ และสมบัติ ภู่วชิรานนท์, 2542) มีจำนวนรังที่แม่เต่าขึ้นวางไข่ตั้งแต่ พ.ศ. 2535-2548 จำนวน 295-75 รัง ซึ่งมีจำนวนลดลงประมาณร้อยละ 75

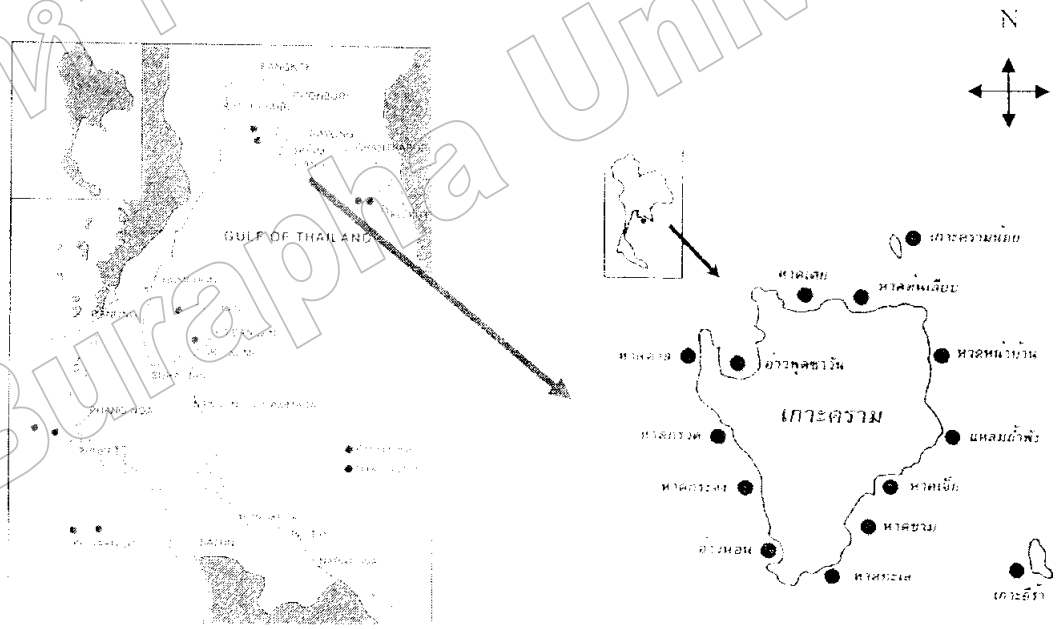
ตัวอย่างเต่าตนุที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำการรวบรวมตัวอย่างโดยเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก โดยเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1. เนื้อเยื่อแม่เต่าจำนวน 30 ตัวอย่าง ที่รวบรวมระหว่างปี พ.ศ. 2547-2549 เพื่อใช้สำหรับประเมินความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรม ความสามารถในการคัดแยกความสัมพันธ์ทางสายเลือด และคำนวณความถี่ในการประเมินโอกาสที่เต่า 1 ตัว มีจีโนไทป์ซ้ำกันที่หลายตำแหน่ง และ 2. เนื้อเยื่อแม่เต่า 6 ตัว และลูกเต่า 363 ตัว (23-30 ตัวต่อรัง ตารางที่ 3-1) สำหรับการวิเคราะห์การที่ลูกเต่า 1 รังเกิดจากพ่อพันธุ์หลายตัว (Multiple Paternity) และติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนพ่อพันธุ์ที่ให้ลูกใน 1 รัง ตลอดฤดูกาลวางไข่

สำหรับการวิเคราะห์ Multiple Paternity เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อแม่และลูกเต่าที่ฟักเป็นตัว (เก็บเนื้อเยื่อจากบริเวณขาว่ายน้ำ ขนาดประมาณ 0.5-1 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2547 โดยคัดเลือกรังที่เป็นตัวแทนของการวางไข่ตลอดฤดูกาลวางไข่ ซึ่งได้วิเคราะห์ลูกเต่าจำนวน 1-3 รังต่อแม่เต่าแต่ละตัว (ตารางที่ 3-1) จำนวนแม่เต่าที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คิดเป็นร้อยละ 13.95 ของจำนวนแม่เต่าขึ้นวางไข่ในปี 2547 (จำนวนแม่เต่าทั้งหมดคิดจากจำนวนไข่ที่สำรวจได้ทั้งหมด 128 รัง หารด้วยค่าเฉลี่ยของจำนวนครั้งของการวางไข่ของแม่เต่า 1 ตัว ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเป็น 3 ครั้งต่อตัว) และจำนวนรังของลูกเต่า 13 รัง คิดเป็นร้อยละ 10.15 ของจำนวนรังทั้งหมด เก็บรักษาชิ้นเนื้อในแอลกอฮอล์ 95% แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตาราง 3-1 จำนวนและช่วงเวลาที่รวบรวมตัวอย่างแม่และลูกเต่าตนุจาก เกาะคราม จ. ชลบุรี ระหว่างเดือนเมษายน-กันยายน พ.ศ. 2547

แม่เต่าตัวที่	จำนวนรังที่วางไข่ทั้งหมด	จำนวนไข่ทั้งหมด	จำนวนรังที่ศึกษา	วันที่เดือน ที่วางไข่ (จำนวนไข่ที่ศึกษาในแต่ละรัง)			จำนวนไข่ที่ศึกษารวมทั้งหมด
1	1	136	1	2/04 (30)			30
2	5	361	3	7/04 (29)	18/05 (27)	5/06 (27)	83
3	2	184	2	12/04 (28)	3/05 (30)		58
4	4	276	3	19/04 (30)	25/05 (26)	3/06 (28)	84
5	2	166	2	22/04 (27)	25/05 (30)		57
6	3	197	2	1/06 (23)	1/07 (29)		52



ภาพที่ 3-1 แสดงที่ชายหาดของเกาะคราม จ. ชลบุรี แปะเฉพาะที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ หาดขาม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

...ยสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
...แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

วิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ และวิเคราะห์โดยเทคนิค Silver Staining

การสกัดดีเอ็นเอและการวัดปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อลูกและแม่เต่าด้วย Chelating Resin Techniques (Milligan, 1998) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

1. คัดเนื้อเยื่อเต่าขนาด 2-3 มิลลิเมตร ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Chelating Resin (Chelex 100; BIO-RAD, 5 % น้ำหนัก/ปริมาตร) 200 ไมโครลิตรและ Proteinase K 30 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร) คัดเนื้อเยื่อให้ละเอียด บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

2. บ่มสารละลายดีเอ็นเอในขั้นที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 8-10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงตกตะกอน Chelating Resin โดยการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลว (สารละลายดีเอ็นเอ) ประมาณ 150 ไมโครลิตร ใส่หลอด Microcentrifuge หลอดใหม่

3. วัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (เป็นการแยกสารโดยใช้ไฟฟ้าจากขั้วลบไปขั้วบวก) บนอะกาโรสเจล 1% ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบนอน (BIO-RAD Subcell GT, Italy) และผ่านกระแสไฟฟ้า 70 โวลท์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที หลังจากนั้นบ่มแผ่นเจลมาสัมผัสด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร) แล้วจึงเทียบปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน โดยดูความเข้มของการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ภายใต้แสงยูวี โดยใช้เครื่อง UV Transilluminator (VILBER LOURMAT ETX-40M, France)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

1. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยมาร์กไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง ซึ่งได้แก่ Cm 72, Cm 58, Ce 117 (Fitzsimmons, Moritz, & Moore, 1995) และ Ce 7 (Fitzsimmons, 1998) ซึ่งมีรายละเอียดลำดับเบส (ตารางที่ 3-2) และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับพีซีอาร์ (ตารางที่ 3-3)

ตารางที่ 3-2 ลำดับเบสของไพร์เมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่ง

ไมโครแซทเทลไลท์	ลำดับเบส (5' ——► 3')		อ้างอิง
Cm 58	F GCCTGCAGTACACTCGGTATTTAT		(Fitzsimmons et al., 1995)
	R TCAATGAAAGTGACAGGATGTACC3		
Cm 72	F CTATAAGGAGAAAGCGTTAAGACA		
	R CCAAATTAGGATTACACAGCCAAC		
Ce 117	F TCTTTAACGTATCTCCTGTAGCTC		
	R CAGTAGTGTCAGTTCATTGRTTCA		
Ce 7	F TGCATTGCTTGACCAATTAGTGAG		(Fitzsimmons et al., 1998)
	R ACATGTATAGTTGAGGAGCAAGTG		

ตารางที่ 3-3 วัฏจักรของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ด้วยเครื่อง Thermocycle (Gradient 96, Biometra, England)

ขั้นที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา	จำนวนรอบ
1	95	3 นาที	
2	95	45 วินาที	
3	62	1 นาที	Touch Down (0.5 °C)
4	72	1 นาที	กลับไปที่ขั้น 2 จำนวน 9 รอบ
5	90	45 วินาที	
6	59	1 นาที	
7	72	1 นาที	กลับไปที่ขั้น 5 จำนวน 29 รอบ
8	72	5 นาที	

2. สารละลายในการทำปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอสแม่พิมพ์ 4 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร), 1X บัฟเฟอร์, ดีเอ็นทีพี ไตรฟอสเฟส (dNTPs) 0.2 มิลลิโมล, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 มิลลิโมล, ไพรเมอร์

Forward และ Reverse อย่างละ 0.8 ไมโครโมล และ *Taq* Polymerase 0.4 ไมโครลิตร (Invitrogen, USA; 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

3. วัฏจักรของการเพิ่มจดคุณหภูมิประกอบไปด้วย 4 วัฏจักร (ตารางที่ 3-3) คือ 1. คุณหภูมิที่ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (Denaturation) 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ 2. คุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที คุณหภูมิที่ไพรเมอร์มาเกาะกับสายดีเอ็นเอดั้งเดิม (Annealing Temperature; Ta) 62 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และคุณหภูมิที่ *Taq* Polymerase สามารถต่อนสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension Temperature) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 9 รอบ 3. คุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที คุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และคุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 29 รอบ และ 4. คุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

การแยกผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส

1. นำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ผสม Loading Dye (97% Formamide, 0.4% NaOH, 0.1% Bromophenol Blue, 0.1% Xylene Cyano FF) แล้วนำมาแยกผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน ด้วยแผ่นกลางเล็กโตรโฟรีซีสแผ่นหนา 6% Denaturing Polyacrylamide Gel ด้วยเครื่อง อิเล็กโตรโฟรีซีสแนวตั้ง (SCIE-PLAS SEQ3341, United Kingdom) ในบัฟเฟอร์ 1XTBE ผ่านกระแสไฟฟ้า 1200 โวลต์ เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง

2. ย้อมดีเอ็นเอที่แยกขนาดแล้วด้วยแผ่นเงิน Silver Staining (Promega, USA) หลักการของเทคนิคนี้คือ ซิลเวอร์ Silver Ion มีปฏิกิริยาแบบธรรมชาติกับโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde) วิธีนี้มีความไวสูง ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง เมื่อย้อมได้แล้วจะเห็นดีเอ็นเอจับกับซิลเวอร์ไนเตรต (Silver Nitrate) เป็นแถบสีน้ำตาลเข้มที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า

3. วัดขนาดของดีเอ็นเอ (Base Pair; bp) แบบแผ่นเจล ที่แต่ละด้านหน่วงโดยเทียบกับตำแหน่งที่แน่นอนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM-3Z/FC-1 Vector (Promega, USA) กับแถบดีเอ็นเอในไกโนไทป์ของแม่และลูกแต่ละคน

การวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทางสายเลือด

1. นำจำนวนจีโนไทป์ที่หลายตำแหน่ง (Multilocus Genotypes) และจำนวนพ่อที่เป็นไปได้ของพ่อที่ให้ลูก 1 ตัวโดยวิธี Parental Reconstruction (Jones, 2005) โดยโปรแกรม GERUD 2.0 ซึ่งมีหลักการเปรียบเทียบสร้างจีโนไทป์ที่น่าจะเป็นไปได้ของพ่อจากข้อมูลจีโนไทป์ของลูกในครอกเดียวกัน โดยที่ทราบข้อมูลแม่ เนื่องจากจีโนไทป์ที่ได้มาในลูกจะประกอบด้วยอัลลีลที่ได้มาจากพ่อ

และแม่อย่างละอัลลีล ดังนั้นขนาดอัลลีลของพ่อจะเป็นอัลลีลที่แตกต่างไปจากอัลลีลของแม่ ในกรณีที่ลูกมีจีโนไทป์เป็นแฮทเทอโรไซโกตและเป็นอัลลีลเดียวกับของแม่ ในกรณีที่ลูกมีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซโกต จากนั้นประเมินรูปแบบจีโนไทป์หลายตำแหน่งของพ่อจากสัดส่วนลูกที่เกิดจากพ่อตัวนั้น ๆ ตามหลักการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดล (Jones & Ardren, 2003) จำนวนรูปแบบจีโนไทป์หลายตำแหน่งที่เป็นไปได้ใน 1 รัง ขึ้นแสดงถึงจำนวนพ่อขั้นต่ำที่ให้กำเนิดลูกแต่ละรัง

2. ในกรณีที่เกิด Multiple Paternity เปรียบเทียบสัดส่วนลูกที่เกิดจากพ่อแต่ละตัวในแต่ละรังกับสัดส่วนที่คาดหวังตามกฎการถ่ายทอดยีนของเมนเดล

3. เปรียบเทียบจีโนไทป์หลายตำแหน่งของพ่อที่ผสมในลูกที่เกิดจากแม่ตัวเดียวกันตลอดฤดูกาลวางไข่

การประเมินความหลากหลายทางเครื่องหมายพันธุกรรม และความสามารถในการคัดแยกความสัมพันธ์

นำข้อมูลจีโนไทป์ของแม่เต่าตนุทั้งหมดในประชากรมาคำนวณค่าดัชนีต่าง ๆ โดยโปรแกรม GenAlEx V.6 ดังต่อไปนี้

1. ความถี่ของอัลลีล (Allele Frequency) คำนวณได้จากการนับจำนวนรูปแบบของจีโนไทป์ต่อตำแหน่งที่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ จำนวนโฮโมไซโกต (Homozygote) และจำนวนแฮทเทอโรไซโกต (Heterozygote) ตามแต่ละอัลลีลตามที่ ๆ ของแต่ละตำแหน่ง คำนวณตามสูตร ดังนี้

$$p_i = (2H_o + H_e) / 2N$$

เมื่อ p_i คือ ความถี่ของอัลลีลที่ i

H_o คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส

H_e คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบแฮทเทอโรไซกัส

N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

2. จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (Number of Allele Per Locus, NA) (Hedrick, 1985)

3. ค่าแฮทเทอโรไซโกซิตี้ (Heterozygosity, H) คือ สัดส่วนของจีโนไทป์ที่เป็นแฮทเทอโรไซกัสต่อจีโนไทป์ทั้งหมดของแต่ละตำแหน่ง ซึ่งสามารถประเมินได้ 2 แบบ คือ คำนวณโดยตรงจากตัวอย่างซึ่งเรียกว่าค่าสังเกตของแฮทเทอโรไซโกซิตี้ (Observed Heterozygosity, Ho) และ

คำนวณจากความถี่อัลลีลตามความสัมพันธ์กายใต้สภาวะของประชากรตามทฤษฎีซึ่งเรียกว่า ค่าคาดหมายของเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (Expected Heterozygosity, He)

3.1 ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (Observed Heterozygosity, Ho)

$$He = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮตเทอโรไซกัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

3.2 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้จากค่าคาดหมาย (Expected Heterozygosity, He) ในแต่ละตำแหน่ง (Nei, 1978) คำนวณได้จาก

$$He = 2N(1 - \sum p^2) / (2N - 1)$$

เมื่อ p_i = ความถี่ของอัลลีลที่ i

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (Nei, 1978)

4. ทดสอบการเป็นไปตามสมดุล Hardy-Weinberg ซึ่งเป็นการทดสอบดุลยภาพระหว่างความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ในประชากรตามทฤษฎีว่าด้วยการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการคัดเลือก ไม่มีการอพยพเข้าและไม่มีการอพยพออกของประชากร) โดยทดสอบได้จากความแตกต่างระหว่างค่าสังเกตและค่าคาดหมายของความถี่จีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่ง (Falconer & Mackay, 1996) โดยการประมาณค่า Exact p-Value ด้วยวิธี Markov Chain Method ตามวิธีการของ Guo & Thompson (1992) ด้วยโปรแกรม Genpop V.3.4

5. Probability of Identity (PI) เป็นค่าความน่าจะเป็นที่ตัวอย่าง 2 ตัวอย่างจะมีจีโนไทป์ที่หลายตำแหน่งเหมือนกัน โดยคำนวณได้จากความถี่อัลลีลของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (ในที่นี้ใช้ตัวอย่างแม่เต่าที่สุ่มจากประชากร) ได้จากสูตรดังนี้

$$PI = \sum_i p_i^4 + \sum_{i<j} (2 p_i p_j)^2$$

เมื่อ p_i คือ ความถี่ของอัลลีล i

p_j คือ ความถี่ของอัลลีล j

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

n คือ จำนวนตำแหน่งที่ศึกษา (Waits, Luikar, & Taberle, 2001; Ayres & Overall, 2004)

6. Paternity Exclusion Probability (PE) เป็นการคำนวณเพื่อตรวจสอบความสามารถของเครื่องหมายพันธุกรรมในการแยกพ่อที่แท้จริง ออกจากตัวผู้สืบ ๆ ที่อยู่ในประชากร โดยพิจารณาจากโอกาสและความแตกต่างของจีโนไทป์ในตำแหน่ง ในการที่จะเป็นพ่อลูกกันของตัวอย่าง จากรูปแบบจีโนไทป์ และความถี่อัลลีลที่เครื่องหมายตำแหน่งนั้น ๆ ค่าที่ได้เป็นความสามารถโดยเฉลี่ยของเครื่องหมายในการที่จะช่วยยืนยันความสัมพันธ์พ่อ ลูก สามารถคำนวณได้จาก

$$PE = \sum_{i=1}^{n} p_i^2 (1 - p_i)^2 + \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} p_i p_j (1 - p_i - p_j)^2$$

เมื่อ p_i คือ ความถี่ของอัลลีล i

p_j คือ ความถี่ของอัลลีล j

n คือ จำนวนตำแหน่งที่ศึกษา (Jamieson & Taylor, 1997)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University