การใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguiensis* และ *Penaeus indicus*

Specific DNA Primers for the Species Identity of *Penaeus merguiensis* and *Penaeus indicus*

จันทน์ผา ตันธนา

Chanpa Tanthana

เลขหมู่ QL444.M33 ต63 2544 ต.2

Bib Key 210586

4 ธ.ค. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2544

ชื่อวิทยานิพนธ์	การใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguiensis* และ *Penaeus indicus*
ผู้เขียน	นางสาวจันทน์ผา ตันธนา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณโชติเกียรติ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หอสมุด คุณหญิงหลง ธรรกระวีสุนทร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับหาย
บัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 4 เดือน 4 ส.ค. 2546

ชื่อวิทยานิพนธ์	การใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguiensis* และ *Penaeus indicus*
ผู้เขียน	นางสาวจันทน์ผา ตันธนา
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

ศึกษาการเปรียบเทียบนิวเคลียร์ดีเอ็นเอระหว่างกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguiensis* และ *Penaeus indicus* โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการทำ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ด้วยไพรเมอร์ 5 ชุด ได้แก่ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 ปรากฏว่ามีไพรเมอร์ 3 ชุดเท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอมีลักษณะแตกต่างกันระหว่างกุ้ง 2 ชนิด คือ OPC 06, UBC 701 และ UBC 787 จากนั้นทำการโคลนดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอดังกล่าว และหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเหล่านี้ แล้วนำไพรเมอร์แบบจำเพาะซึ่งออกแบบจากข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปทำ PCR กับกลุ่มดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการ พบว่าสามารถแบ่งแบบแผนดีเอ็นเอได้ 7 แบบ โดยแบบที่ 1-2 พบใน *P. indicus*, แบบที่ 3-5 พบใน *P. merguiensis* ส่วนแบบที่ 6-7 คาดว่าอาจเป็นแบบแผนดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งที่เป็น hybrid และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมต่อไปได้

Thesis Title	Specific DNA Primers for the Species Identity of *Penaeus merguiensis* and *Penaeus indicus*
Author	Miss Chanpa Tanthana
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	2000

Abstract

Nuclear DNA of *Penaeus merguiensis* and *Penaeus indicus* were compared by using polymerase chain reaction (PCR) technique. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) reaction carried out on the samples using five primers, OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 and UBC 787. Three difference bands were observed in the reaction from OCP 06, UBC 701 and UBC 787. The DNA banding were isolated and sequenced. Three pairs of specific primers were designed from the sequencing data and used to amplified a set of samples. At least 7 haplotypes of DNA pattern were obtained with type 1-2 found in *P. indicus*, whereas type 3-5 found in *P. merguiensis* and type 6-7 occurred in samples with confused morphology, possibly hybrids and used as genetic markers.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ผู้ซึ่งเสียสละทั้งแรงกายและแรงใจให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสศึกษาเล่าเรียนในหลักสูตรนี้

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา อาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งคอยดูแล แนะนำ ให้คำปรึกษาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ ตลอดจนรองศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาเสนอแนะแก้ไขเพิ่มเติมจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุตส่าห์ จันทร์อำไพ ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยที่ใช้ในการทำการทดลองครั้งนี้ ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณธัญญา ศรีโพธิ์ และคุณจรรยา รังษีธรรม ที่ให้คำแนะนำ ความรู้ในการทดลอง การใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์และเป็นกำลังใจให้เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณพี่สาวที่รักยิ่งซึ่งคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

จันทน์ผา ตันธนา

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจสอบเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	21
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	22
วัสดุ	22
สารเคมี	23
อุปกรณ์	28
วิธีการทดลอง	29
3. ผลการทดลอง	38
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	67
5. สรุปผลการทดลอง	72
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียน	86

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สัดส่วนการผลิตกุ้งทะเลและกุ้งกุลาดำของไทย	2
2	ปริมาณการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของไทยในจังหวัดต่าง ๆ	3
3	ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	25
4	ลักษณะเปรียบเทียบของกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis* และ *P. indicus* ที่ใช้ในการแยกชนิด	40
5	ชนิดของกุ้งสกุล *Penaeus* เมื่อตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยแบบแผน isozyme	41
6	สรุปข้อมูลเกี่ยวกับโคลนของดีเอ็นเอที่สนใจและลำดับเบสของไพรเมอร์แบบจำเพาะ	57

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของกุ้ง	6
2	ลักษณะภายนอกและแหล่งที่พบกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis* ก. ลักษณะภายนอก ข. แหล่งที่พบ	8
3	ลักษณะภายนอกและแหล่งที่พบกุ้งแชบ๊วย *P. indicus* ก. ลักษณะภายนอก ข. แหล่งที่พบ	9
4	ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction	13
5	ขั้นตอนการทำ Restriction Fragment Length Polymorphic	16
6	ขั้นตอนการทำ Amplified Fragment Length Polymorphic	17
7	ลักษณะภายนอกที่ใช้แยกชนิดกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis* และ *P. indicus*	39
8.	แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 701, UBC 814, UBC 815 และ UBC 703	44
9	แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPC 06 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15	45
10	แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 114 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15	46
11	แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 150 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15	47
12	แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 701 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15	49
13	แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 787 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15	50

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	แถบดีเอ็นเอของโคลน S4, S3, 06/1 และ 06/2	52
15	ลำดับเบสของโคลน 06/1	53
16	ลำดับเบสของโคลน 06/2	54
17	ลำดับเบสของโคลน 114	55
18	ลำดับเบสของโคลน 701	56
19	ลำดับเบสที่เหมือนกัน (93% homology) ของโคลน 06/1 และ 06/2	58
20	ลำดับของกรดอะมิโนของโคลน 06/2	59
21	แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06	62
22	แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06	63
23	แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06	64
24	แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701	65
25	แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 787	66
26	แบบแผนการเกิดแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ชนิด	71

ตัวย่อและสัญลักษณ์

%	=	persentage
β	=	beta
°C	=	degree celcius
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
A	=	absorbance
AFLP	=	Amplification Fragment Length Polymorphic
bp	=	base pair
Bkm	=	Banded krait minor satellite
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleotidetriphosphates
dsDNA	=	double strand DNA
DTT	=	dithiotreitol
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
g	=	gram
kb	=	kilobase
LB	=	luria bertaini
M	=	molar
Mr	=	apparent molecular weight
mg	=	milligram
ml	=	millilit
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
oligoNT	=	oligo nucleotide
P.	=	*Penaeus*

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pH	=	hydrogen ion concentration
pmole	=	picomole
Rep	=	repetitive DNA
RAPD	=	Random Amplification Polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphic
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
ssDNA	=	single strand DNA
TAE	=	Tris–acetate
TBE	=	Tris-borate
TEMED	=	N,N,N',N' tetramethylethylene diamine
Tris-HCl	=	Tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride acid

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงเพราะเป็นที่นิยมบริโภคอีกทั้งเป็นที่ต้องการในตลาดโลกสูง ทำให้มีปริมาณการจับจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น ปริมาณกุ้งทะเลของไทยช่วงระหว่างปี 2526-2530 ที่ได้จากการจับจากธรรมชาติมีมากกว่าร้อยละ 80-90 ของปริมาณผลผลิตกุ้งทะเลทั้งหมด เช่น กุ้งแชบ๊วย, กุ้งกุลาลาย, กุ้งโอคัก และกุ้งเหลือง ส่วนที่เหลือจะเป็นกุ้งทะเลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและกุ้งในสกุล *Penaeus* เป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูงสุด จากสถิติประมงปี 2526-2528 ปริมาณการจับกุ้งในสกุลนี้อยู่ในช่วง 22,000-23,000 ตัน หรือคิดเป็น 16-20% ของปริมาณการจับกุ้งทั้งหมด แต่มีมูลค่าถึง 2,500-2,900 พันล้านบาท หรือ 61-62 % ของมูลค่าสัตว์น้ำพวกกุ้ง โดยมีปริมาณกุ้งแชบ๊วยมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กุ้งกุลาลาย, กุ้งเหลือง (บุญศรี จารุธรรมโสภณ และ ธวัชชัย จันทะวงษ์, 2533) เนื่องจากประสบปัญหาความเสื่อมโทรมของแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลของไทย เกิดกรณีพิพาทที่มีบ่อยครั้งและรุนแรงขึ้นจากปัญหาการบุกรุกน่านน้ำทะเลของประเทศเพื่อนบ้าน มีผลทำให้การจับกุ้งทะเลจากธรรมชาติมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง (ตารางที่ 1) จึงหันมาทำการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ เพราะเป็นอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกที่สำคัญและเป็นที่ต้องการในตลาดโลกสูง (สุมล สุวรรณนภาศรี, 2539) ในประเทศไทยเริ่มมีการเลี้ยงกุ้งนานกว่า 30 ปี เริ่มจากการเลี้ยงแบบอาศัยธรรมชาติโดยทำบ่อเลี้ยงกุ้งจากธรรมชาติ ในบริเวณพื้นที่ป่าชายเลน และพัฒนาการเลี้ยงมาโดยลำดับ มีการนำเทคโนโลยีใหม่ๆ เข้ามาช่วยเพิ่มผลผลิตและควบคุมคุณภาพของกุ้ง การให้อาหารเสริม การใช้ยาและสารเคมีเพื่อควบคุมโรคและคุณภาพน้ำ ทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของไทยเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยมีแหล่งเลี้ยงกุ้งทะเลและกุ้งกุลาดำที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกและภาคใต้ ซึ่งได้แก่ จังหวัดจันทบุรี, ระยอง, นครศรีธรรมราช, สุราษฎร์ธานี และสงขลา เป็นต้น (ตารางที่ 2) ประเทศไทยจึงเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกกุ้งรายใหญ่ที่สุดในโลก ในปี 2539 ประเทศไทยมีผลผลิตกุ้งรวม 205,000 เมตริกตัน (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2541) และในช่วงเดือนมกราคม-พฤษภาคม ปี 2542 มีการส่งออกกุ้งมูลค่าทั้งสิ้น 15,323.6 ล้านบาท (นิรนาม, 2542)

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนการผลิตกุ้งทะเลและกุ้งกุลาดำของไทย

ปริมาณ:ตัน

ปี	กุ้งทะเล					กุ้งกุลาดำ				
	จับจากธรรมชาติ	สัดส่วน (%)	เพาะเลี้ยง	สัดส่วน (%)	รวม	จับจากธรรมชาติ	สัดส่วน (%)	เพาะเลี้ยง	สัดส่วน (%)	รวม
2526	122,584	91.70	11,550	8.30	139,134	596	80.22	147	19.78	743
2527	104,394	88.92	13,007	11.80	117,401	522	75.43	170	24.57	692
2528	91,631	85.26	15,341	14.74	107,472	463	81.37	106	18.63	569
2529	102,527	85.15	17,886	14.85	120,413	282	23.92	897	76.08	1,179
2530	106,211	81.34	23,566	18.16	129,777	295	2.726	10,544	97.28	10,839
2531	85,870	60.68	55,633	39.32	141,503	426	1.03	40,774	98.97	41,200
2532	85,204	47.68	93,495	52.32	178,699	408	0.50	81,492	99.50	81,900
2533	84,012	41.25	118,227	58.75	201,239	331	0.30	107,969	99.70	108,300
2534	106,495	39.65	162,070	60.35	268,565	331	0.21	155,069	99.79	155,400
2535	91,616	31.43	184,884	68.57	269,627	262	0.15	179,358	99.85	179,620
2536	93,086	29.22	225,514	70.78	318,600	300	0.14	219,900	99.86	220,200
2537	94,000	27.33	250,000	72.67	344,000	250	0.11	242,000	99.89	242,250
2538	93,000	26.85	253,400	73.15	346,400	230	0.09	245,000	99.91	245,230

ที่มา: สถิติการเลี้ยงกุ้งทะเล กรมประมง

หมายเหตุ: ปี 2537 ข้อมูลเบื้องต้น

ปี 2538 คาดคะเน

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของไทยในจังหวัดต่าง ๆ

หน่วย:พันตัน

จังหวัด	ปี 2533	ปี 2534	ปี 2535	ปี 2536	ปี 2537	ปี 2538
จันทบุรี	16.2	41.5	52.1	56.56	67.63	70.45
นครศรีธรรมราช	21.8	29.8	23.3	29.83	30.89	32.18
สุราษฎร์ธานี	14.4	18.7	20.0	25.36	25.96	27.04
สงขลา	4.1	9.7	14.1	17.34	18.31	19.07
ระยอง	5.4	8.9	9.6	12.19	12.46	12.98
ตราด	4.8	8.3	9.4	10.65	12.20	12.71
ชุมพร	5.3	5.5	5.3	4.97	6.87	7.16
ฉะเชิงเทรา	7.9	4.9	9.8	14.57	12.72	13.25
ประจวบคีรีขันธ์	2.0	4.1	3.7	2.72	4.80	5.00
ปัตตานี	2.8	4.0	4.1	7.85	5.32	5.54
เพชรบุรี	4.3	3.4	2.9	2.00	3.76	3.92
สตูล	1.0	3.2	5.3	7.36	6.88	7.17
สมุทรสาคร	9.9	3.0	2.2	1.68	2.86	2.98
สมุทรปราการ	4.2	3.0	1.2	0.75	1.56	1.62
สมุทรสงคราม	7.9	2.3	1.0	0.50	1.30	1.35
ตรัง	1.0	3.0	5.0	7.34	6.49	6.76
พังงา	1.0	1.9	3.2	8.06	4.16	4.33
ภูเก็ต	1.4	1.7	1.7	3.32	2.20	2.29
อื่นๆ	2.8	52.2	10.5	12.38	23.63	17.60
รวมทั้งประเทศ	118.2	162.1	184.4	226.50	250.00	258.40

ที่มา: สถิติการเลี้ยงกุ้งทะเล กรมประมง

หมายเหตุ: ปี 2537 ข้อมูลเบื้องต้น

ปี 2538 คาดคะเน

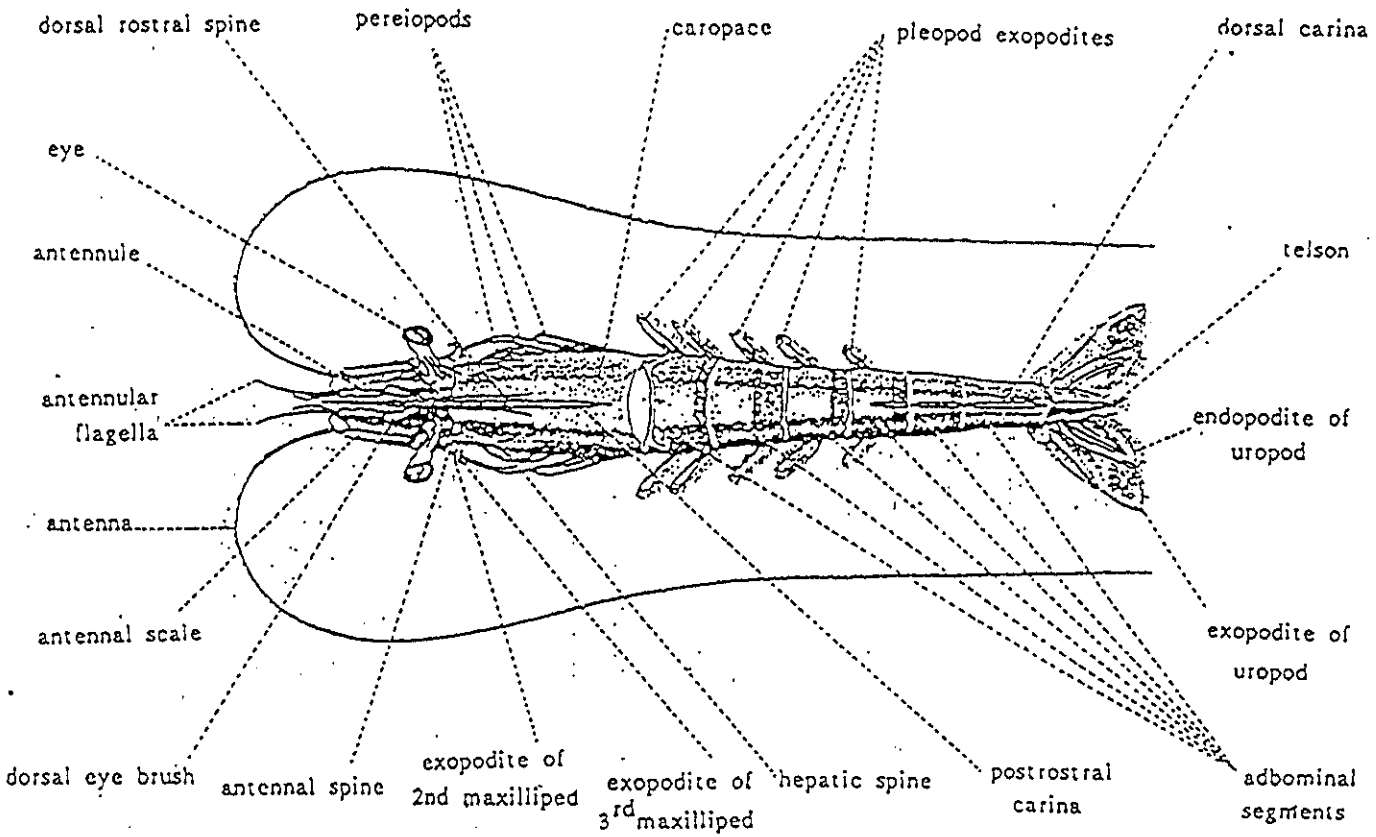
ประโยชน์ในการใช้แยกชนิดสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเป็น จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ ซึ่งได้ผลดี (Bassam *et al.*,1991; Williams *et al.*,1990) จากวิทยานิพนธ์ของปิยนันท์ ดวงทอง (2542) ได้ทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ 120 ชุดและได้คัดเลือกไพรเมอร์ได้ 5 ชุด คือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 ที่อาจใช้แยกชนิดกุ้งแชบ๊วยทั้งสองชนิดได้ว่าเป็น *P. merguiensis* และ *P. indicus* โดยพบแถบที่น่าสนใจจากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 5 ชุด ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการโคลนแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ จากนั้นนำไปหาลำดับเบสเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับทำ PCR เพื่อแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วยต่อไป และเป็นแนวทางในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆได้

การตรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย

กุ้งจัดเป็นสัตว์น้ำจำพวกครัสเตเซียน (crustaceans) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะเป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายและเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศปีละหลายพันล้านบาท ปัจจุบันได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั่วไปตามพื้นที่ติดชายทะเลหลายจังหวัด ได้แก่ จันทบุรี, ชลบุรี, ระยอง, สมุทรสาคร, สมุทรสงคราม, นครศรีธรรมราช, สงขลา และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น

อวัยวะของกุ้งแบ่งเป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ ส่วนหัวที่เชื่อมรวมกับอก (cephalothorax) ส่วนท้อง (abdomen) และหาง (telson) อวัยวะภายในได้แก่ กระเพาะอาหาร, หัวใจ, เหงือก, อวัยวะเพศจะอยู่บริเวณส่วนหัวและอก สำหรับส่วนท้องนั้นมีกล้ามเนื้อเป็นส่วนใหญ่ จากลำตัวมีระยางค์ยื่นออกมาเป็นคู่ ๆ ได้แก่ หนวด, ระยางค์ปาก, ขาเดิน, ขาว่ายน้ำ เป็นต้น (รูปที่ 1) กุ้งเป็นสัตว์หน้าดิน ชอบอาศัยตามพื้นทะเลที่เป็นดินโคลนหรือโคลนปนทราย ยกเว้นกุ้งมังกรชอบอยู่ตามซอกหินบริเวณแนวปะการัง (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2535) และโดยทั่วไปรายละเอียดเกี่ยวกับอัตราส่วนของเพศจะมีประโยชน์ในการคาดคะเนความสามารถในการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ พบว่าอัตราส่วนเพศเมีย/เพศผู้ จะต่ำในช่วงฤดูวางไข่เนื่องจากเพศเมียจะอยู่ในรูเพื่อเลี้ยงดูกลุ่มไข่จนกว่าจะฟัก ดังนั้นเพศเมียจึงจับได้น้อย (บุญศรี จารุธรรมโสภณ, 2537)



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของกุ้ง

ที่มา: ประจวบ หลำอุบล, 2531

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยอยู่ใน Family Penaeidae และ Subfamily Penaeidae สกุล *Penaeus* มีจุดเด่นคือ กรีมีฟันทั้งบนและล่าง หนวดคู่แรกสั้นกว่าเปลือกหุ้มหัว (carapace) ผิวลำตัวมัน ในระยะวัยอ่อนหรือระยะนอเพลียสจะไม่มีเหงือกที่ยึดเกาะติดกับผนังข้างตัวระหว่างระยางค์ (pseudobranchiae) ในประเทศไทยพบ 8 ชนิด ซึ่งรวมถึงกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguiensis* de Man, 1988 และอีกชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกัน คือ *Penaeus indicus* Milne Edwards, 1983 (ประจวบ หลำอุบล, 2531) กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่เป็น dominant species พบว่าในอ่าวพังงา มีฤดูวางไข่ 2 ช่วง คือเดือนกุมภาพันธ์ และระหว่างเดือนกรกฎาคม-เดือนสิงหาคม ในธรรมชาติทุกเดือนมีกุ้งเพศเมียมากกว่ากุ้งเพศผู้ ซึ่งมีความแตกต่างกันโดยสถิติ (บุญศรี จารุธรรมโสภณ, 2537) กุ้งแชบ๊วยในอ่าวไทยที่พบมีอยู่ 2 ชนิดคือ *P. merguiensis* และ *P. indicus* มีสันฐานวิทยาดังต่อไปนี้

1. *Penaeus merguiensis* de Man,1988 มีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า กุ้งขาว, กุ้งแชบ๊วย, กุ้งหางแดง หรือกุ้งหางดอก (รูปที่ 2, ก.) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Banana prawn ชื่อทางการค้าเรียกว่า White prawn มีลักษณะเด่นชัดที่สังเกตได้คือ มีกรีด้านบนมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่าง 4-5 ซี่ กุ้งชนิดนี้เมื่อโตเต็มที่ โคนกรีจะยกขึ้นเป็นรูปสามเหลี่ยมยอดสูง ส่วนมากปลายกรีจะยาวไม่ถึงปลายของโคนหนวดคู่สั้น สันข้างกรี (adrostral carina) จะยาวไม่ถึงฟันกรีซี่สุดท้าย สันหลังร่องตา (gastro-orbital carina) ยาวประมาณ 1/3 ของระยะทางระหว่างร่องหลังตา (orbital margin) กับหนามข้างแก้ม (hepatic spine) ส่วนมากสันนี้จะอยู่ห่างจากหนามข้างแก้มปลายขาเดินคู่ที่ 3 ปกติจะยาวไม่ถึงแพนหนวด ในเพศผู้ระยางค์ส่วนอก (maxilliped) คู่ที่ 3 ของเพศผู้ปล้องสุดท้าย (dactylus) จะยาวประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องถัดลงมา (propodus) และมีกลุ่มขนยื่นออกมายาวเท่าๆกับ dactylus อวัยวะเพศของกุ้งชนิดนี้คล้ายกับ *P. indicus* มาก ต่างกันตรงที่อวัยวะเพศเมียจะมีเนื้อนูนยื่นลงมาอยู่ในถุงเก็บน้ำเชื้อตัวผู้ (seminal receptacle) มากกว่ามีแผ่นบนของอวัยวะเพศเมีย (anterior plate of thelycum) เป็นรูปครึ่งวงกลมมีติ่งเนื้อ (fleshy) เห็นชัดเจน ขอบด้านข้างของแผ่นล่าง (margin of lateral plates or seminal receptacle) โค้ง และแหล่งที่พบกระจายอยู่ทั่วไปทางตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิกในบริเวณคาบสมุทรอินโดจีน จนถึงประเทศไทย, ฮ่องกง, ฟิลิปปินส์, ประเทศอินโดนีเซียจนถึงนิวกินี, นิวแคลิโดเนีย และทางด้านเหนือของประเทศออสเตรเลีย (รูปที่ 2, ข.)
(Grey *et al.*, 1983)

ก.

ข.

รูปที่ 2 ลักษณะภายนอกและแหล่งที่พบของกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis*

ก. ลักษณะภายนอก (ตัวเมีย)

ข. แหล่งที่พบ (≡)

ที่มา: Grey *et al.*, 1983

ก.

ข.

รูปที่ 3 ลักษณะภายนอกและแหล่งที่พบของกุ้งแชบ๊วย *P. indicus*

ก. ลักษณะภายนอก (ตัวเมีย)

ข. แหล่งที่พบ (▤)

ที่มา: Grey *et al.*, 1983

2. *Penaeus indicus* Milne Edwards, 1983 มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Indian prawn เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ (รูปที่ 4, ก.) เปลือกบาง มีสีนวล บางครั้งอาจมีสีชมพูอ่อน โคนกรีมองดูหางด้านข้างยกขึ้นเป็นรูปสามเหลี่ยมยอดเตี้ย ส่วนมากในระยะตัวเต็มวัยปลายกรีจะยาวเลยปลายของโคนหนวดคู่สั้น (antennular peduncle) กรีด้านบนมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 4-5 ซี่ ทั่วๆไปพบด้านบน 7 ซี่ ด้านล่าง 4 ซี่ สันด้านหลังร่องตา (adrostral carina) ยาวเลยฟันกรีซี่สุดท้าย (epigastric tooth) สันด้านหลังร่องตา (gastro-orbital carina) ยาวประมาณ 2/3 ของระยะทางระหว่างร่องหลังคา (post orbital margin) กับหนามข้างแก้ม กุ้งชนิดนี้ไม่มีสันข้างแก้ม ปลายขาเดินคู่ที่ 3 ส่วนมากจะยาวเลยแทนหนวด (scaphocerite) ในเพศผู้ระยะตัวเต็มวัยปล้องสุดท้าย (dactylus) ของขาที่ใช้ในการเขี่ยอาหารคู่ที่ 3 (third maxilliped) จะมีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของปล้องถัดลงมา (propodus) อวัยวะเพศผู้แผ่นตรงกลางจะชี้ไปทางด้านหน้า แผ่นล่างมีรูปร่างกลมและแหล่งที่พบ *P. indicus* กระจายอยู่ทั่วไปทางตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิกในบริเวณคาบสมุทรอินโดจีน บริเวณทางด้านตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้ของแอฟริกาจนถึงตอนใต้ของประเทศจีน ตลอดจนมาเลเซียและประเทศอินโดนีเซียถึงนิวกินี และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย (รูปที่ 3, ข.) (Grey *et al.*, 1983)

3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพมาก เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน มีความต้องการใช้ PCRในงานต่างๆมากยิ่งขึ้นและยังสามารถพัฒนานำไปใช้กับงานใดงานหนึ่งโดยเฉพาะ (Jean-Paul Charlieu, 1994) เช่น ใช้ในงานวินิจฉัยโรคต่างๆ ตลอดจนงานวิจัยพื้นฐาน (Brand *et al.*, 1991) ข้อดีของเทคนิค PCR คือมีความไวสูงมากแต่ก็ทำให้เกิดข้อด้อยที่สำคัญมาก เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) เพียงไม่กี่โมเลกุลให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นหลายล้านโมเลกุล ฉะนั้นหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในงาน PCR เพียงเล็กน้อย ก็ทำให้ได้ผลแปลกปลอมได้ (false positive) การปนเปื้อนดังกล่าวอาจเกิดขึ้นในช่วงการเก็บ การเตรียมหรือการแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากตัวอย่างที่ต้องการทำ นอกจากนี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนของ genomic DNA หรือ plasmid DNA ที่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, 2539)

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA), deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, oligonucleotide primer 1 คู่, บัฟเฟอร์ (10X) ที่เหมาะสม, ความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) ที่เหมาะสมและ thermostable DNA polymerase ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR เป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำๆกันหลายรอบ ปฏิกิริยาในแต่ละรอบของ PCR มี 3 ขั้นตอน ได้แก่ (รูปที่ 4)

1. ขั้นตอน Denaturation

ดีเอ็นเอแม่พิมพ์จะถูก denature โดยการให้ความร้อน เป็นการแยกสาย dsDNA แม่พิมพ์ให้เป็น ssDNA โดยใช้อุณหภูมิในการ denature ประมาณ 90-96°C

2. ขั้นตอน primer annealing

เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-58°C เพื่อให้ primer สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม (complementary sequences)

3. ขั้นตอน primer extension

เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก primer ในทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA Polymerase เช่น Taq DNA polymerase อุณหภูมิในขั้นตอนนี้อยู่ในช่วงประมาณ 70-75°C

การสังเคราะห์จะดำเนินการตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ เรียกว่า PCR หรือ amplified product เป็นจำนวนมากแบบ expotential โดยหลังการทำ PCR จำนวน n รอบ PCR product ที่ได้ตามทฤษฎีเท่ากับ 2^n ถ้าการทำ PCR มีประสิทธิภาพการผลิต 100%

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำ PCR

1. ดีเอ็นเอไพรเมอร์

สิ่งที่สำคัญของไพรเมอร์ คือการคัดเลือกหรือการออกแบบ ให้เหมาะสมกับงาน PCR แต่ละงาน เช่น ควรมีความยาวประมาณ 20-30 nucleotides และประกอบด้วย G+C ประมาณ 50% และควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurines และ polypyrimidines (Saiki, 1990) ความเข้มข้นของไพรเมอร์เป็นสิ่งสำคัญ หากมีปริมาณ primers มากเกินไป จะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้น ทำให้ได้ PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นมากมาย และโอกาสเกิด primer-dimer สูงขึ้น เป็นผลให้ PCR product ที่ต้องการลดลง นอกจากนั้น Tm (melting point temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ต้องใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 55-80 °C (Innis and Gelfand, 1990)

2. ความเข้มข้นของ Magnesium ion (Mg^{2+})

Mg^{2+} เป็นอิออนที่มีความสำคัญมากในปฏิกิริยา PCR เพราะมีผลต่อ primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ ถ้ามีความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไป ทำให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไปจะทำให้ได้ PCR product น้อยลง และความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมจะถูกจำเพาะกับไพรเมอร์หนึ่งๆ (Park *et al.*, 1994)

3. deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ในงาน PCR ควรจะมี pH = 7 (Graham, 1991) มีความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 μM อย่างละเท่าๆกัน (Saiki, 1990) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมให้ได้ PCR product ในปริมาณสูง หากมีปริมาณ dNTPs มากเกินไป จะทำให้เกิด mispriming ของ primers และ misincoporation ของ dNTPs

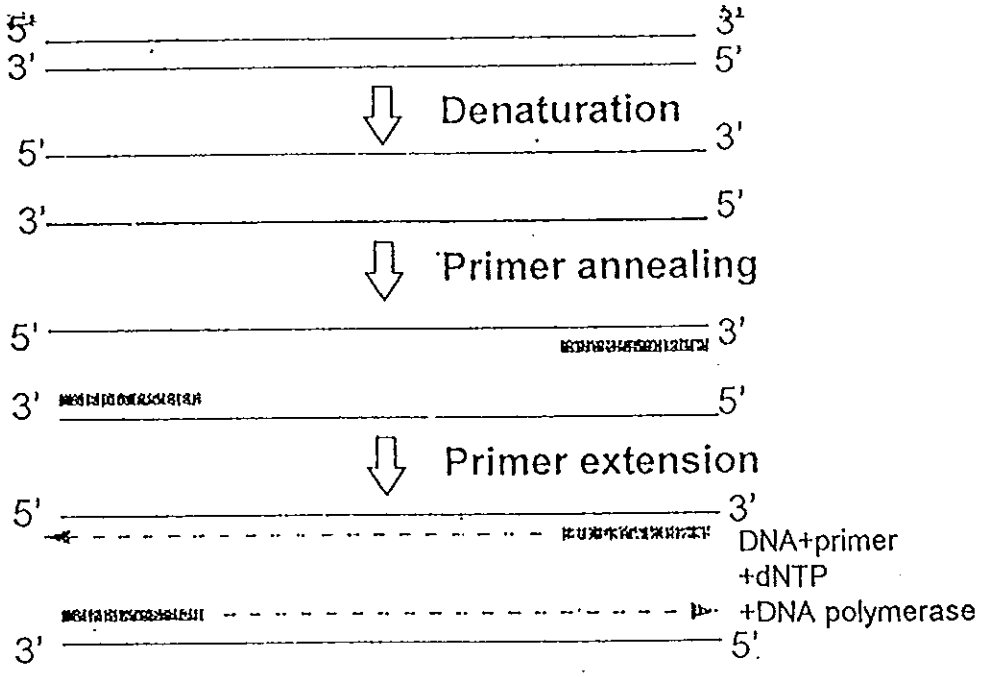
4. ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase

Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่แยกมาจากแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้ เช่น *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่มีอุณหภูมิสูงๆ กล่าวคือที่อุณหภูมิ 94°C เอนไซม์จะไม่ถูกทำลาย แต่หากในขั้นตอน denature ใช้เวลานานจนเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพไปได้ (Bielawski *et al.*, 1995)

5. ดีเอ็นเอเป้าหมาย

ดีเอ็นเอเป้าหมายจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆตามต้องการ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากสัตว์และพืชไม่จำเป็นต้องใช้ในปริมาณมากจนเกินไป หากแต่ขึ้นกับ complexity ของดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่า (Caetano-Anolles G. *et al.*, 1992)

6. การเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของการทำ PCR ตลอดจนเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนและจำนวนรอบที่เหมาะสมขึ้นกับดีเอ็นเอเป้าหมายและดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่เลือกใช้ (Graham *et al.*, 1991) เช่น ในขั้นตอน annealing หากใช้อุณหภูมิต่ำเกินไป จะทำให้เกิดปัญหา mispriming และ misextension, การเพิ่มเวลาในขั้นตอน denature ให้มากขึ้นจาก 5 วินาที เป็น 30 วินาที จะทำให้ได้แบบแผน RAPD ที่ดีกว่า (Bielawski *et al.*, 1995) นอกจากนั้นจำนวนรอบในการทำ PCR ขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้หากใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปจะทำให้ได้ PCR product น้อย และหากใช้จำนวนรอบมากเกินไปจะเป็นการเพิ่ม nonspecific background product (Innis and Gelfand, 1990)



รูปที่ 4 ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction

5. ประโยชน์ของการใช้ตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล (molecular marker)

ในปัจจุบันจำนวนประชากรโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะมีวิธีการอย่างไรในการเพิ่มผลผลิตต่างๆ ให้มากขึ้น ในอนาคตเพื่อให้ทันกับการเพิ่มของประชากรโลกแล้ว ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ความหลากหลายทางชีวภาพในสัตว์ สายพันธุ์ทางการค้าได้ถูกจำกัดโดยการคัดเลือกพันธุ์ที่เน้นในเรื่องของผลผลิต ไม่ว่าจะเป็นเนื้อ นม หรือไข่ ซึ่งการคัดเลือกดังกล่าวอาจทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพในด้านอื่นๆลดลงได้ หรือพันธุกรรมของบางลักษณะถูกคัดทิ้งไป ซึ่งลักษณะที่ถูกคัดทิ้งไปอาจเป็นประโยชน์ได้ต่อไปในอนาคต เช่น ความต้านทานโรคหรือความอยู่รอดและความทนทานในสภาพแวดล้อมต่างๆ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องรักษาความหลากหลายทางชีวภาพเหล่านี้ไว้ ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นผลจากการเกิด mutation (Franklin, 1981; Hill and Keightley, 1988 อ้างอิงโดย ศิริลักษณ์ พรสุขศิริ, 2537) ซึ่งสะสมและผ่านกระบวนการการวิวัฒนาการอื่นที่ยาวนาน จนสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่ม พวก พันธุ์ ชนิด และสายพันธุ์ เพราะฉะนั้นการสูญเสียความหลากหลายเหล่านี้ไป ย่อมหมายถึงการสูญพันธุ์ของสัตว์เหล่านั้นและไม่สามารถที่จะทำให้เกิดขึ้นใหม่ได้อีก

ตัวบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยา

การจัดการ การศึกษาโครงสร้างทางประชากรของสัตว์น้ำ โดยใช้ตัวบ่งชี้ที่ไม่ใช่ตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม ซึ่งมีอยู่หลายแบบด้วยกัน เช่น การวิเคราะห์ออกมาเป็นค่าต่างๆ, การศึกษาทางสัณฐานวิทยา, การศึกษาสมบัติทาง meristic อย่างไรก็ตามพฤติกรรมและสิ่งแวดล้อมของสิ่งมีชีวิตก็ยังมีผลกระทบต่อตัวบ่งชี้เหล่านี้ (Garcia *et al.*, 1997) ส่วน Winter and Kahl (1995) กล่าวไว้ว่าแผนที่ทางพันธุกรรมในเริ่มแรกมีพื้นฐานมาจากตัวบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยาและ growth' habits

ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี

เนื่องจากจำนวน polymorphic ของตัวบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดในการศึกษาโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการผสมผสานกันแบบจำเพาะ (intra-specific) และมีการแสดงออกที่เป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาตัวบ่งชี้ชนิดอื่นๆขึ้น เช่นการศึกษาความแตกต่างของ allele (allelic variants) ของเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งก็คือการศึกษา isozyme หรือศึกษาสมบัติอื่นทางชีวเคมี เช่น ไขมันหรือน้ำตาล (Winter and Kahl, 1995) ตัวอย่างเช่น การศึกษาความแปรปรวนของ isozyme ระหว่าง specific pathogen free (SPF) *Penaeus vannamei* ซึ่งพบว่าเปอร์เซนต์ของ polymorphic loci ของประชากรกลุ่มที่ 2 (16.67) มีค่ามากกว่าประชากรกลุ่มที่ 1 (6.67) (Garcia *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับกุ้งสกุล *Penaeid* ว่ามีค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำและมีค่าความแตกต่างทางภมิศาสตร์ (geographic) เล็กน้อย คือ *P. vannamei* มีค่า 16% polymorphism, *P. stylirostris* มีค่า 26% polymorphism ซึ่งมีค่าต่ำกว่า

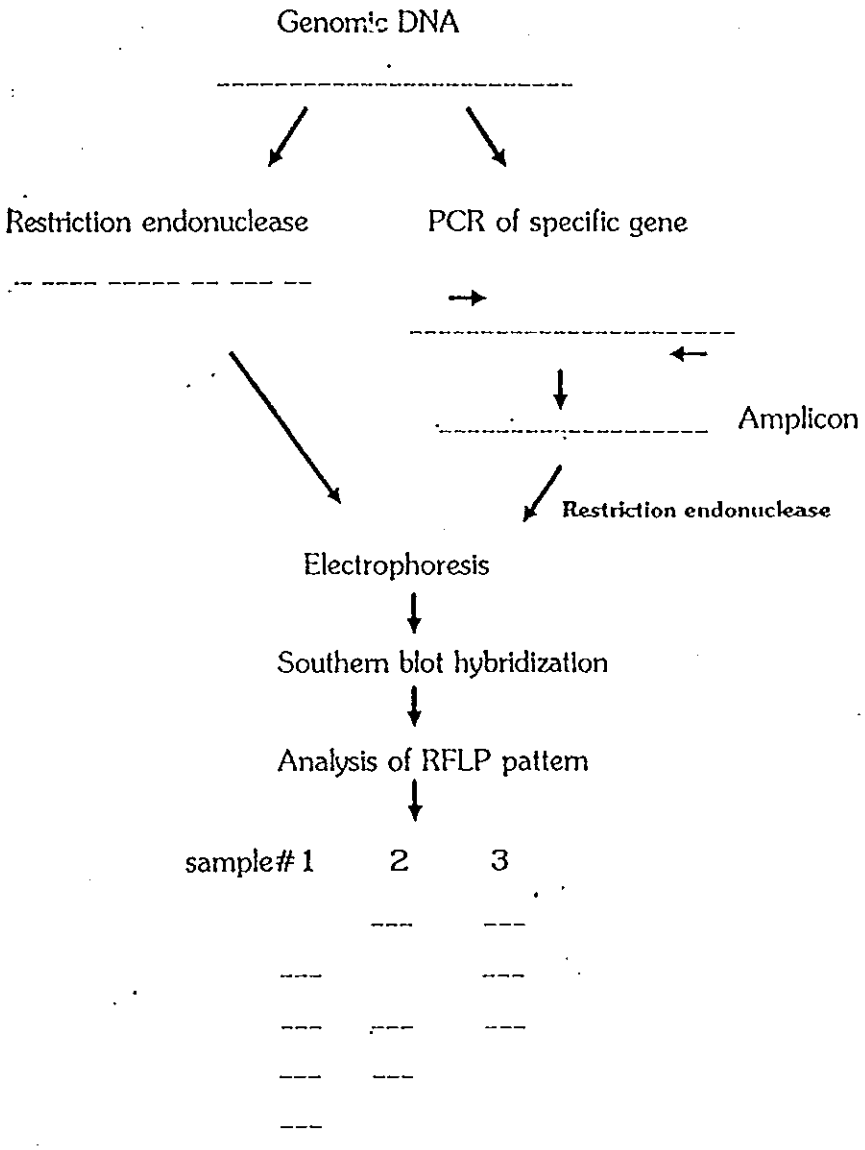
P. aztecus ที่มีค่า 33% polymorphism และ *P. setiferus* มีค่า 29% polymorphism (Lester, 1983 อ้างอิงโดย Alcivar-Warren, 1994)

ตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล

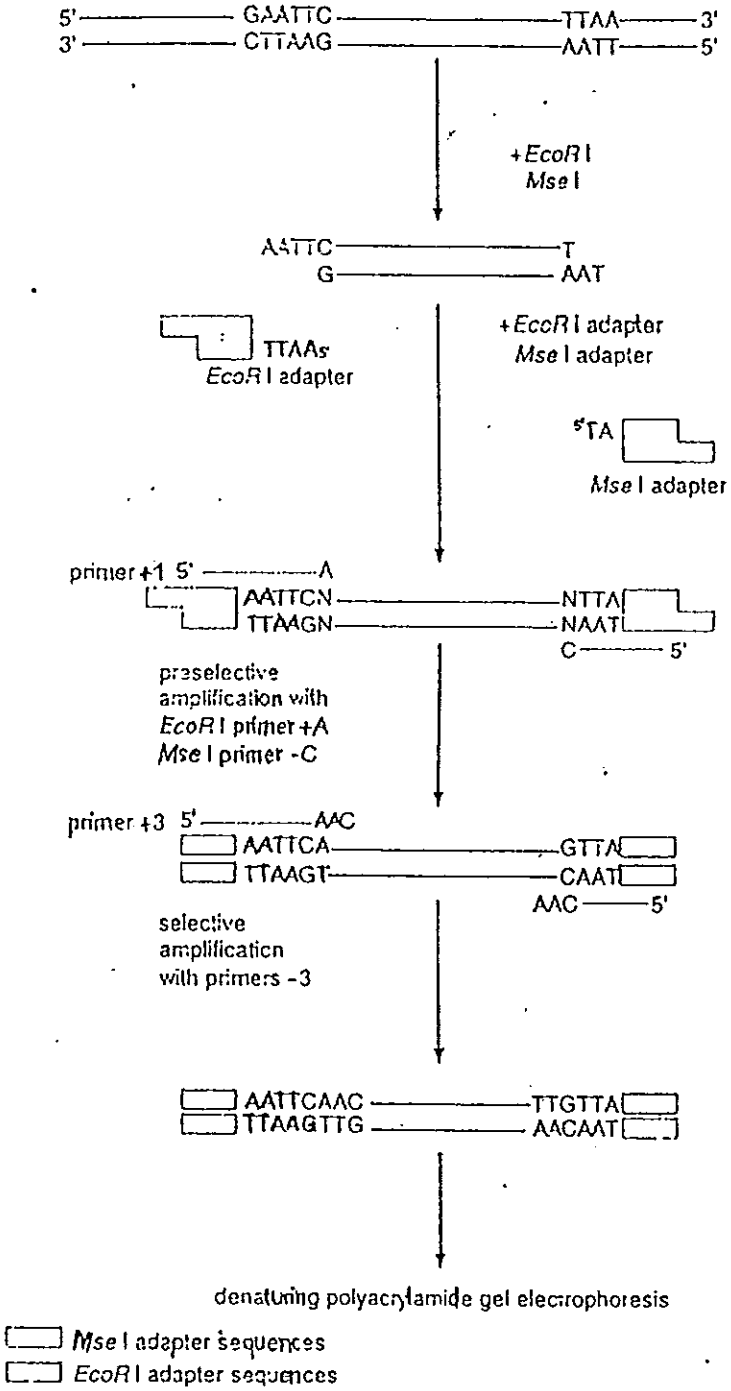
การศึกษาตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งมีอยู่หลายวิธี เช่น การใช้เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphic) เป็นเทคนิคการตัดดีเอ็นเอที่ต้องการเปรียบเทียบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ, AFLP (Amplified Restriction Fragment Polymorphic) เป็นเทคนิคที่ใช้ผสมผสานระหว่าง RFLP และ Polymerase Chain Reaction (PCR), การใช้หลักการของ Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการทำ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ซึ่งจะกล่าวดังต่อไปนี้

Restriction Fragment Length Polymorphic (RFLP)

RFLP เป็นเทคนิคการตัดดีเอ็นเอที่ต้องการเปรียบเทียบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะตัดเฉพาะจุด ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกันไปหลักการในการทำ RFLP มีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นย่อยดีเอ็นเอเป็นชิ้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วเข้าสู่ขั้นตอนการแยกและการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ (รูปที่ 5) ปัจจุบันมีการนำ RFLP มาใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ดีเอ็นเอในหลายรูปแบบ เช่นการจำแนกชนิดของจุลชีพ ตลอดจนนำมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียบางชนิด และยังใช้ในการตรวจหา point mutation ของยีนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับการเกิดโรคมะเร็ง หรือความผิดปกติทางพันธุกรรม (ปราณี ลิ้ชนะชัย, 2539) Alcivar-Warren (1994) ได้ใช้ RFLP ในการศึกษาความปรวนแปรของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ โดยการ polymorphisms ของ ribosomal RNA ของ *P. vannamei* พบว่าไม่พบจุดตัดที่แตกต่างกันหรือไม่มีความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ 28s ribosomal ของ *P. vannamei* ซึ่งถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ



รูปที่ 5 ขั้นตอนการทำ Restriction Fragment Length Polymorphic
ที่มา: ปราณี ลี้ชนะชัย, 2539



รูปที่ 6 ขั้นตอนการทำ Amplified Fragment Length Polymorphic โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่

ที่มา: LIFE TECHNOLOGIES, GIBCOBRL.

Amplification Fragment Length Polymorphic (AFLP)

AFLP เป็นเทคนิคที่คัดเลือก PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอทั้งหมด ซึ่งผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (รูปที่ 6) โดยเทคนิคนี้สามารถแบ่งได้ 3 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็นการย่อยดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วเชื่อมเข้ากับ oligonucleotide adaptor ขั้นตอนที่สองทำการคัดเลือกการ amplify ของชุดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สุดท้ายนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเจล เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยที่ไม่ทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้นมาก่อนและได้ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรีย (Lin *et al.*, 1996) ได้มีการทดลองใช้ *Eco*RI และ *Mse*I โดย *Eco*RI จะตัดชิ้นดีเอ็นเอให้เป็นชิ้นที่มีขนาดต่างๆกัน ค่อนไปทางขนาดใหญ่ และเมื่อใช้ *Mse*I จะตัดชิ้นดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงไป จากนั้นนำไปเชื่อมกับ *Eco*RI และ *Mse*I adaptors ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR จะออกแบบให้จับกับส่วนของ adaptors ได้ เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอที่ตัดไว้เหล่านั้นทั้งหมด การออกแบบไพรเมอร์แต่ละข้างมี selective nucleotide เพิ่มตั้งแต่ 1-3 เบส จะช่วยลดจำนวนแถบของดีเอ็นเอลงเหลือประมาณ 50-100 แถบ ซึ่งมีความหลากหลาย (polymorphism) และศึกษาแถบดีเอ็นเอที่ได้บน denature gel (sequencing gel) (Vos *et al.*, 1995)

Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย หากแต่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ใช้เป็นแบบไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) แล้วตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย gel electrophoresis ผลจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 3-4 kb (Klinbuga *et al.*, 1996) ส่วนประโยชน์ของ RAPD ก็มีให้เห็นอยู่มากมาย William *et al.* (1990) ได้กล่าวไว้ RAPD marker เป็นเทคนิคที่เหมาะในการทำ genetic mapping, ใช้ประโยชน์ในโปรแกรมการ breeding ในสัตว์, พืช และยังใช้ในการศึกษา population genetics จากนั้น Bielawski และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ RAPD จากดีเอ็นเอปลากะพง (*Morone saxatilis)* เมื่อเปรียบเทียบ protocol ที่ใช้กับ Williams *et al.*, 1990 ปรากฏว่าสภาวะที่ใช้นั้นแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคนี้ในการหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกุ้ง *P. monodon* และ *P. stylirostris* (Alcivar-Warren *et al.*, 1994) Garcia และคณะ, 1994 ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *P. vamamei* โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของตัวพ่อ-แม่ และตัวอ่อน จากตัวอย่าง 6 ครอบครัว กับไพรเมอร์ชนิดต่างๆ จำนวน 14 ชุด ผลปรากฏว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มี polymorphic 3 แถบ โดยใช้การปรากฏแถบและไม่มีแถบเป็นตัวกำหนด เป็นตัวบ่งชี้ family-specific และยังคงใช้ RAPD markers ในการศึกษาโปรแกรมการ breeding ใน *P. monodon* (Garcia *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังมีการใช้ RAPD marker มาศึกษาพันธุกรรมของผึ้งหวาน (hony bee) เพราะว่าผึ้งหวานเป็น

haploidiploid โดยตัวเมียจะเป็น diploid ส่วนตัวผู้เป็น haploid (Grey *et al.*, 1992) และยังศึกษาใน brown trout กับ Atlantic salmon (Elo K. *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังได้นำเทคนิคนี้มาศึกษาสายพันธุ์และการแยกชนิด genotype ของ *Candida* (Lehmann *et al.*, 1992) มีการทำโปรแกรม breeding ในพืชโดยใช้เทคนิค RAPD ในการปรับปรุงพันธุ์ มีการใช้เทคนิค RAPD กันอย่างแพร่หลาย (Winter and Kahl, 1995) เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ในพืชชนิดต่างๆ เช่น ถั่วลิสง, ถั่วเหลือง และข้าวโพด Halward และคณะ (1992) ได้ใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆที่มีลำดับเบสไม่จำเพาะเจาะจงในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของถั่วลิสง และตรวจสอบ polymorphic ในถั่วลิสงชนิดต่างๆและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิด ส่วน Havey และ Botha (1996) ได้นำเทคนิค RAPD ในการหาความหลากหลายระหว่าง Saccharum ต่างๆ รวมทั้ง ถั่ว, ข้าว, กาแฟ,หัวมัน และมันสำปะหลัง

6. การโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR product

การโคลน (cloning) ดีเอ็นเอหรือยีน (gene) เกิดขึ้นได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกระดับ ตั้งแต่แบคทีเรีย ยีสต์ ไปจนถึงพืชและสัตว์ แต่ไม่ว่าจะเป็นการโคลนยีนในเซลล์ชนิดใด ขั้นตอนหนึ่งที่มักเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยเสมอคือ การโคลนยีนนั้นๆ ในแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli*

PCR Cloning เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่สนใจศึกษาให้ได้จำนวนมากพอ จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) มาเชื่อมต่อเข้ากับสารพันธุกรรมพาหะ (vector) เรียกว่า ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เรียกว่า transformation เทคนิคที่มีการตัดต่อสารพันธุกรรม แล้วนำสารพันธุกรรมที่ได้ transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านนั้นเรียกเทคนิคนี้ว่า DNA cloning ดังนั้นการรวมเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้กับ DNA cloning เรียกว่า PCR cloning ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดีกว่าการโคลนยีนแบบดั้งเดิม (conventional genomic cloning) คือทำให้โอกาสที่จะแยกชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ต้องการหรือยีนที่สนใจศึกษาเป็นไปได้ง่ายขึ้นและใช้เวลาน้อยลง อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR cloning ก็มีข้อจำกัดคือ จำเป็นต้องทราบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence) ของยีนที่สนใจบางส่วนเพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ (Primer design) ที่จะใช้เป็นตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) (ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี, 2540)

วัลยา อุทัยสาง และคณะ (1997) ศึกษาสายพันธุ์ของผึ้งโพรงไทย โดยจะเตรียมดีเอ็นเอติดตามสำหรับใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ ได้เลือกใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอติดตามจากส่วนของ repetitive sequence ของผึ้งโพรงด้วยวิธีการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผึ้งโพรงเข้ากับดีเอ็นเอพาหนะได้เป็นดีเอ็นเอลูกผสมแล้วจึงเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย จากนั้นจึงติดตามหาดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequence โดยการทำ Dot-blot hybridization กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากดีเอ็นเอของผึ้งโพรง ดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequence นำมาเตรียมดีเอ็นเอติดตาม

Central Library
Prince of Songkla University

ในการทำ RFLP analysis ดูว่าดีเอ็นเอดิดตามใดจะให้ RFLP haplotype ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรงไทย

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำ specific primer มาใช้ในการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วยทั้งสองชนิดคือ *P. merguiensis* และ *P. indicus*

วัตถุประสงค์

1. เพื่อนำแบบแผน RAPD มาวิเคราะห์หาชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้ในการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากแบบแผน RAPD
3. หาลำดับเบสจากโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้และออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ
4. เพื่อแยกชนิดกุ้งแชบ๊วยด้วยดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

ตัวอย่างกุ้งซึ่งได้จากฝั่งทะเลอันดามันและอ่าวไทย โดยเป็นกุ้งสดมีชีวิตหรือเมื่อเป็นซาก จึงเก็บในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ –70°C และแบ่งตัวอย่างตามช่วงเวลาและสถานที่ที่ได้รับตัวอย่างกุ้งมาคือ

กลุ่ม A ได้แก่ตัวอย่างกุ้งจากทะเลอันดามัน จังหวัดสตูล เมื่อวันที่ 26 เดือนมิถุนายน 2539 เป็นจำนวน 49 ตัวอย่าง

กลุ่ม B ได้แก่ตัวอย่างกุ้งจากอ่าวไทย เกาะยอ จังหวัดสงขลา เมื่อวันที่ 7 เดือนพฤศจิกายน 2539 เป็นจำนวน 39 ตัวอย่าง

กลุ่ม C ได้แก่ตัวอย่างกุ้งจากตลาดสด เกาะยอ จังหวัดสงขลา เมื่อวันที่ 10 เดือนมกราคม 2540 เป็นจำนวน 7 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่มีไว้เพื่อทดสอบว่าตัวอย่างที่ไม่สด จะสามารถนำมาใช้ในการศึกษา RAPD หรือไม่

กลุ่ม D ได้แก่ตัวอย่างที่เป็น *Penaeus monodon* เป็นตัวอย่างที่ใช้สำหรับเป็น control เพื่อหา specific primer ของกุ้งแชบ๊วย ได้จากจังหวัดภูเก็ต จำนวน 6 ตัวอย่าง เมื่อวันที่ 18 เดือนเมษายน 2540

กลุ่ม E ได้แก่ตัวอย่างจากอ่าวไทย จังหวัดสุราษฎร์ธานี เมื่อวันที่ 14 พฤษภาคม 2540 จำนวน 36 ตัวอย่าง

กุ้งตัวอย่างเหล่านี้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วนโดยส่วนลำตัวสำหรับสกัดโครโมโซมอล ดีเอ็นเอและส่วนหัวสำหรับตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาตามอนุกรมวิธานอย่างคร่าว ๆด้วยตาเปล่าว่าเป็นกุ้งชนิดใด (ตารางที่ 4) แต่ยกเว้นตัวอย่างกุ้ง A21–A49, กลุ่ม B และกลุ่ม C เนื่องจากส่วนหัวไม่อยู่ในสภาพที่ตรวจสอบได้

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมี	บริษัทผลิต
Acrylamide	Merck
Ammonium persulphate	Sigma
Bis-acrylamide (N, N'-methylene bisacrylamide)	Sigma
Boric acid	Merck
Chloroform	Merck
Diethyl ether	Riedel-de Haen
β-Mercaptoethanol	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Glycerol	BDH Chemical Ltds.
Isoamyl alcohol	Uni Lab
Isopropanol	Merck
Phenol	CARLO ERBA
Sodium acetate	CARLO ERBA
Sodium chloride	CARLO ERBA
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma
Sodium hydroxide	CARLO ERBA
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Fluka
Urea	Sigma

2.2.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology)

สารเคมี	บริษัทผลิต
100 bp DNA ladder	Promega
Agarose	Sigma
Agarose gel DNA extraction kit	Boehringer Mannheim

สารเคมี	บริษัทผลิต
Ampli Taq Gold	Perkin Elmer
Ampicillin	Sigma
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Promega
DNA sequencing kit	Perkin Elmer
Ethidium bromide	Sigma
GeneAmp detection gel	Perkin Elmer
Lysozyme	Sigma
Proteinase K	Sigma
Restriction endonuclease	Promega
Ribonuclease (RNase A)	Sigma
Taq DNA polymerase	Perkin Elmer
T4 DNA ligase	Promega

2.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผลิต
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Tryptone	Difco
Yeast extraction	Difco

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง *E. coli* สายพันธุ์ Top10F'

E. coli สายพันธุ์ Top10F' มี Genotype คือ F' *pro*AB, *lac*Iq, *lacZ*ΔM15, Tn10(TetR) *mer*A, Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80 *lacZ* ΔM15, Δ *lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *ara*Δ*139*, Δ (*ara-leu)7697*, *gal*U, *gal*K, *rps*L(StrR), *end*A1, *nup*Gλ ซื้อจากบริษัท Invitrogen, ประเทศเนเธอร์แลนด์

2.4 Oligonucleotide primer ในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ

Oligonucleotide primer ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ในการทำ RAPD ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์จาก 5' ไป 3'	%GC
OPC-01	TTCGAGCCAG	60
OPC-02	GTGAGGCGTC	70
OPC-03	GGGGGTCTTT	60
OPC-04	CCGCATCTAC	60
OPC-05	GATGACCGCC	70
OPC-06	GAACGGACTC	60
OPC-07	GTCCCGACGA	70
OPC-08	TGGACCGGTG	70
OPC-09	CTCACCGTCC	70
OPC-10	TGTCTGGGTG	60
OPC-11	AAAGCTGCGG	60
OPC-12	TGTCATCCCC	60
OPC-13	AAGCCTCGTC	60
OPC-14	TGCGTGCTTG	60
OPC-15	GACGGATCAG	60
OPC-16	CACACTCCAG	60
OPC-17	TTCCCCCCAG	70
OPC-18	TGAGTGGGTG	60
OPC-19	GTTGCCAGCC	70
OPC-20	ACTTCGCCAC	60
UBC-101	GCGGCTGGAG	80
UBC-102	GGTGGGGACT	70
UBC-103	GTGACGCCGC	80
UBC-104	GGGCAATGAT	50
UBC-105	CTCGGGTGGG	90
UBC-106	CGTCTGCCCG	80
UBC-107	CTGTCCCTTT	50
UBC-108	GTATTGCCCT	50
UBC-109	TGTACTGAC	50
UBC-110	TAGCCCGCTT	60
UBC-111	AGTAGACGGG	60
UBC-112	GCTTGTGAAC	50
UBC-113	ATCCCAAGAG	50

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์จาก 5 ' ไป 3'	%GC
UBC-114	TGACCGAGAC	60
UBC-115	TTCCGCGGGC	80
UBC-116	TACGATGACG	50
UBC-117	TTAGCGGTCT	50
UBC-118	CCCGTTTTGT	50
UBC-119	ATTGGGCGAT	50
UBC-120	GAATTTCCCC	50
UBC-121	ATACAGGGAG	50
UBC-122	GTAGACGAGC	60
UBC-123	GTCTTTCAGG	50
UBC-124	ACTCGAAGTC	50
UBC-125	GCGGTTGAGG	70
UBC-126	CTTTCGTGCT	50
UBC-127	ATCTGGCAGC	60
UBC-128	GCATATTCCG	50
UBC-129	GCGGTATAGT	50
UBC-130	GGTTATCCTC	50
UBC-131	GAAACAGCGT	50
UBC-132	AGGGATCTCT	60
UBC-133	GCAAACCTCT	50
UBC-134	AACACACGAG	50
UBC-135	AAGCTGCGAG	60
UBC-136	TACGTCTTGC	50
UBC-137	GGTCTCTCCC	70
UBC-138	GCTTCCCCTT	60
UBC-139	CCCAATCTTC	50
UBC-140	GTCGCATTTC	50
UBC-141	ATCCTGTTCG	50
UBC-142	ATCTGTTCGG	50
UBC-143	TCGCAGAACG	60
UBC-144	AGAGGGTTCT	50
UBC-145	TGTCGGTTGC	60
UBC-146	ATGTGTTGCG	50
UBC-147	GTGCGTCCTC	70
UBC-148	TGTCCACCAG	60
UBC-149	AGCAGCGTGG	70
UBC-150	GAAGGCTCTG	60
UBC-701	CCCACAACCC	70

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์จาก 5' ไป 3'	%GC
UBC-703	CCAACCACCC	70
UBC-705	GGAGGAAGGG	70
UBC-707	CCCAACACCC	70
UBC-709	CCTCCTCCCT	70
UBC-711	CCCTCTCCCT	70
UBC-713	CCCTCCCTCT	70
UBC-715	CCACCACCCA	70
UBC-717	CCCACACCCA	70
UBC-719	CCCACCCACA	70
UBC-721	CCCTTCCCTC	70
UBC-723	CCCTCTCCTC	70
UBC-725	GGGTTGGGTG	70
UBC-727	GGGTGTGGTG	70
UBC-729	CCCAACCCAC	70
UBC-731	CCCACACCAC	70
UBC-733	GGGAAGGGAG	70
UBC-735	GGGAGAGGAG	70
UBC-737	GGTGGGTGTG	70
UBC-739	GGAGGGAGAG	70
UBC-741	CCTCCCTCTC	70
UBC-743	CCACCCACAC	70
UBC-745	GGGAAGAGGG	70
UBC-747	CCACCAACCC	70
UBC-749	GGGAGGAGAG	70
UBC-751	CCCACCACAC	70
UBC-753	GGGAGGAGGA	70
UBC-755	CCCACCACCA	70
UBC-757	GGAAGGGAGG	70
UBC-759	CCAACCCACC	70
UBC-761	GAGAGGAGGG	70
UBC-763	CACACCACCC	70
UBC-765	AGGGAGGAGG	70
UBC-767	ACCCACCACC	70
UBC-769	GGGTGGTGGG	80
UBC-771	CCCTCCTCCC	80
UBC-773	GGGTTGTTGG	60
UBC-775	GGTTTTGTGG	60
UBC-777	GGAGAGGAGA	60
UBC-779	CCTTTCTCCC	60

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์จาก 5' ไป 3'	%GC
UBC-781	GGGAAGAAGG	60
UBC-783	GGTGGGTTGT	60
UBC-785	CACCCAACCA	60
UBC-787	CCCTTCTTCC	60
UBC-789	GGAAGGGAGA	60
UBC-791	GTGGGTTGTG	60
UBC-793	CTCCTCTCTC	60
UBC-795	TGGTGTGGGT	60
UBC-797	CCACCAACAC	60
UBC-799	TGTGGTGGTG	60

2.5 ดีเอ็นเอพาหะ (vector)

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองเป็นพลาสมิดเวคเตอร์ คือ pGEM®-T Vector และ pGEM®-T Easy Vector ซื้อจากบริษัท Promega, สหรัฐอเมริกา (ภาคผนวก ข.)

2.6 อุปกรณ์

ชื่อ	บริษัทผลิต
Micropipette	Gilson, Eppendorf
Spectophotometer รุ่น Ultrospec III	Pharmacia
Electrophoresis apparatus รุ่น Mupid	Advance co.,ltd
Electrophoresis apparatus รุ่น Horizon 11.14	Life Technologies, inc.
กล้องถ่ายรูป Polaroid	Fotodyne Incorporated
เครื่อง Temperature Cycling system รุ่น GENEMASTER	Hybaid Limited
เครื่อง Temperature Cycling system รุ่น Touch Down	Hybaid Limited

ชื่อ	บริษัทผลิต
เครื่อง UV light transilluminator	UVP
เครื่อง Vaccum system รุ่น B-169	Biichi
เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ	Lab Line
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น junior 2000C	Precisa
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Analytic AC210S	Sartorius
เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Z 230A	Hermle
เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Centrifuge 5415C	Eppendorf
เครื่องวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ รุ่น 373A DNA Sequencer	Applied Biosystem
เครื่อง Gel Documentation รุ่น Gel Doc 1000	Bio-Rad
ตู้อบ รุ่น B 53	Binder
โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ DNASIS	BIO-RAD
อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Personal – 11	Taitec

2.7 วิธีการทดลอง

2.7.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้ง

(ดัดแปลงจาก Bielawski *et al.*, 1995 และ Harvey and Botha, 1996)

1. ตัดเนื้อเยื่อกุ้งประมาณ 15-30 mg นำมาสับให้ละเอียดด้วยมีดคมใส่ลงในหลอดที่บรรจุสารละลาย extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.7 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS) ปริมาตร 600 µl ซึ่งเติม 1 M DTT 15 µl และ 10 mg/ml Proteinase K 6 µl ผสมให้เนื้อเยื่อกุ้งกระจายทั่ว buffer

2. นำไปอุ่นที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง โดยเขย่าเบาๆตลอดเวลา จากนั้นอุ่นต่อที่ 65°C นาน 2-3 ชั่วโมง หรือจนเนื้อกุ้งละลายหมด

3. นำสารละลายที่ได้ไปสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:24:1) ปริมาตรเท่าตัว เขย่าให้เข้ากันเบาๆปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลาย 2 ชั้น ดูดสารละลายชั้นบนด้วย tip ปลายตัดลงในหลอดใหม่

4. นำมาสกัดด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย chloroform:isoamyl alcohol (อัตราส่วน 25:1) ในปริมาตรเท่าตัว ผสมให้เข้ากันเบาๆปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลาย 2 ชั้น ดูดสารละลายชั้นบนด้วย tip ปลายตัดลงในหลอดใหม่

5. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 2/3 เท่า เขย่าให้เข้ากันเบาๆ เก็บในที่ –20°C เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที

6. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งด้วยเครื่องดูดสูญญากาศ

7. ละลายตะกอนด้วย deionized water ปริมาตร 100 µl

8. ทำการกำจัด RNA ด้วยการเติม 10 mg/ml RNase A ปริมาตร 2 µl แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

9. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณสารละลายดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ –20°C

2.7.2 การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิก (Sambrook *et al.*, 1989)

เจือจางตะกอนดีเอ็นเอด้วย deionized water ในอัตราส่วน 1:100 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ตามลำดับ

การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับดีเอ็นเอความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 mg/ml จะให้ค่า A 260=1 และการตรวจสอบสภาพของกรดนิวคลีอิก สามารถทำได้โดยการหาอัตราส่วนของค่า A260/A280 ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่บริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอนั้นมีโปรตีนหรือฟีนอล (ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด) ปะปนอยู่

2.7.3 การจำแนกชนิดกุ้งแชบ๊วย (Banana Prawn) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Specific primers

การจำแนกชนิดกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค PCR ทำโดยการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจให้ได้ปริมาณตามต้องการ แล้วศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่ได้ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจากเจลแล้วนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอให้สะอาดก่อนนำไปโคลนชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นหาลำดับเบสของโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ Automated DNA Sequencer แล้ววิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม DNASIS เพื่อออกแบบไพรเมอร์ขึ้นมาใหม่เป็น specific primers และนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำ PCR และตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

2.7.3.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นด้วยการทำ PCR

1. เตรียม reaction mixture 25 µl ใน 0.2 ml microcentrifuge tube

deionized water	6.3	µl
10X buffer	2.5	µl
dNTPs (อย่างละ 200 µM)	4.0	µl
primer (3 mM)	2.0	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	3.0	µl
Taq DNA polymerase (1U)	0.2	µl
(AmpliTaq®DNA Polymerase, Stoffel Fragment)		
สารละลายดีเอ็นเอ (5 ng/µl)	5.0	µl

2. โปรแกรมการทำ PCR

preheat	94 °C	4	นาที
denature	94°C	5	วินาที
annealing	40°C	20	วินาที
extension	72°C	1	นาที

เป็นจำนวน 35 รอบ

3. ศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

2.7.3.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากเจล

การทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอเพื่อกำจัด primer และ dNTPs ออกจากสารละลายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้ Agarose gel DNA extraction kit

การเตรียมดีเอ็นเอจากเจล Agarose gel DNA extraction kit

(Boehringer Mannheim)

1. แยกดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธี 1.8% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide แล้วส่องดูด้วย UV light transilluminator

2. ตัดเจลส่วนที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

3. เติม agarose solubilization buffer ปริมาตร 300 µl (ต่อเจลขนาด 100 mg) และสารละลาย silica matrix 10 µl นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56-60°C เป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนเจลละลายหมด (ขณะอุ่น 2-3 นาที นำไปผสมให้เข้ากันแล้วนำกลับมาอุ่นต่อ) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง

4. เติมสารละลาย nucleic acid binding buffer 500 µl แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้ง

5. elute ดีเอ็นเอด้วย deionized water ปริมาตร 30 µl แล้วผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เก็บส่วนใสในหลอดใหม่

6. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

2.7.3.3 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอจาก PCR product

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอให้สะอาด จากนั้นนำไปเชื่อมกับ pGEM®-T Easy Vector แล้วนำ ligation mixture ที่ได้ไป transform เข้าสู่ host cell

1. ขั้นตอนการ Ligation (pGEM®-T Vector System และ pGEM®-T Easy Vector System, Promega)

1.1 เตรียม reaction mixture 10 µl ใน 0.5 ml microcentrifuge tube

T4 DNA ligase 10x buffer	1	µl
pGEM®-T easy vector	1	µl
PCR product	7	µl
T4 DNA ligase	1	µl

1.2 นำหลอดที่บรรจุ reaction mixture แล้วเก็บในอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการ transformation

2. การเตรียม competent cell (Top10F')

(ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.*, 1989)

2.1 เลี้ยง E. *coli* Top10F' บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเหลว LB 5 ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.3 เทเชื้อทั้ง 5 ml ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 100 ml เลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง หรือจนได้ OD_{600} ประมาณ 0.4-0.5 แล้วเก็บในน้ำแข็งทันที

2.4 แบ่งใส่หลอด centrifuge 4 หลอดๆละ 25 ml วางบนน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.5 เติม 0.1 M $MgCl_2$ หลอดละ 5 ml ผสมให้เข้ากัน เทรวม 2 หลอดเป็นหลอดเดียว ได้ทั้งหมด 2 หลอด วางบนน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.6 เติม 0.1 M $CaCl_2$ หลอดละ 10 ml ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 นาที เทส่วนใสทิ้ง

2.7 เติม 0.1 M $CaCl_2$ หลอดละ 2 ml ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง เทรวม 2 หลอดเป็นหลอดเดียว ปริมาตรทั้งหมด 4 ml

2.8 เติม 100% glycerol ในอัตราส่วน เชื้อ 150 µl ต่อ 100% glycerol 850 µl ผสมให้เข้ากันดีแบ่งใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ซึ่งวางบนกะบะน้ำแข็ง หลอดละ 200 µl

2.9 เก็บ Competent cell ที่ –70°C ทันที จนกระทั่งนำไปใช้

3. ขั้นตอนการ Transformation

(ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.*, 1989)

3.1 ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านขั้นตอนการ ligation ปริมาตร 5 µl ลงcompetent cell (Top10F') ปริมาตร 200 µl ซึ่งเก็บในตู้ –70°C แล้วเอาออกมาวางให้ละลายในน้ำแข็งทันทีก่อนที่เติมดีเอ็นเอดังกล่าว

3.2 หลังจากเติมดีเอ็นเอแล้วตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที

3.3 เติมอาหารเหลว LB 800 µl นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีดูดส่วนใสทิ้ง 800 µl ที่เหลือผสมให้เข้ากัน

3.4 ดูดเชื้อมา 100 µl ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin จากนั้น spread ให้ทั่ว plate นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.5 แยกโคโลนีที่ต้องการ และเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ปริมาตร 5 ml นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปสกัดพลาสมิดและย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ

2.7.3.4 การสกัดพลาสมิด (Plasmid) (ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.*,1989)

1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ซึ่งมีความเข้มข้นของ ampicillin 8 µg/ml ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
2. แบ่งดูดมาปริมาตร 1.5 ml ลงในหลอด 1.5 ml microcentrifuge ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส
3. ทำให้เซลล์แตกโดยการเติมสารละลาย lysis buffer ดีดหลอด microcentrifuge ให้ตะกอนเซลล์กระจายทั่วสารละลาย ตั้งทิ้งในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลายประกอบผสมระหว่าง 0.2 M NaOH กับ 1% SDS ปริมาตร 300 µl ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
5. เติมสารละลาย 3 M potassium acetate, pH 4.8 ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเก็บในหลอดใหม่
6. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 0.6 volume ของ isopropanol ผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
7. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย deionized water 200 µl
8. กำจัด RNA ด้วย RNase 10 mg/ml ปริมาตร 2 µl นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

2.7.3.5 การตรวจสอบโคลนที่ได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบโคลนของชิ้น PCR product โดยนำโคลนที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วศึกษาผลที่ได้โดย 1.8% agarose gel electrophoresis

1. เตรียม reaction mixture (20 µl) ใน 1.5 ml microcentrifuge tube

สารละลายดีเอ็นเอ (0.2 µg/µl)	1.5-2.5	µl
10X buffer	2.0	µl
เอนไซม์ตัดจำเพาะ (4U)	1.0	µl
deionized water	x	µl

2. นำ reaction mixture ที่ได้ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
3. วิเคราะห์ผลการย่อยโดย 1.8% agarose gel electrophoresis

2.7.3.6 การหาลำดับเบส (sequence) ของโคลน ของชิ้นดีเอ็นเอ PCR product โดยใช้ Automate DNA Sequencer (Taq Dye Deoxy Cycle Terminator kit, Applied Biosystems)

1. ขั้นตอนการทำ PCR

1.1 เตรียม reaction mixture (20 µl) ใน 0.2 ml microcentrifuge tube

สารละลายดีเอ็นเอ (0.2 µg/µl)	1.5-2.5	µl
Terminator premix	8.0	µl
ชุด primer T7/SP6 (3.2 pmole)	2.0	µl
deionized water	9.0	µl

ปรับสภาวะของ PCR ดังนี้คือ

denature 96°C	30	วินาที
annealing 50°C	5	วินาที
extension 60°C	4	นาที

จำนวน 25 รอบ

1.2 PCR product ที่ได้ เติมสารละลาย 3 M sodium acetate, pH 4.8 ปริมาตร 2 µl

1.3 ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol 50 µl ตั้งที่ –20°C เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

1.4 ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้ง

1.5 ละลายตะกอนใน loading buffer 4 µl จากนั้นให้ความร้อน 90°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วย้ายไปเก็บในน้ำแข็งทันที

2. การเตรียม 6% polyacrylamide sequencing gel มีส่วนผสมดังนี้

40% acrylamide (stock solution)	10.5	ml
urea	3.5	g
10x TBE	7.0	ml
deionized water	49.0	ml
10% APS	150.0	µl
TEMED	39.9	µl

ผสมให้เข้ากัน

3. เตรียม 6% polyacrylamide gel ลงในชุดแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ตั้งให้เจลแข็งตัว อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4. load ตัวอย่าง PCR product (1.5 µl) ลงในเจลที่เตรียมไว้ ประกอบชุดเจลเข้ากับ ABI 373 automated DNA sequencer ใช้ศักย์ไฟฟ้า 1,000 โวลต์ เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง

2.7.3.7 การทำ PCR ด้วย specific primers

1. เตรียม reaction mixtures 25 µl ใน 0.2 ml microcentrifuge tube

deionized water	8.3	µl
10x buffer	2.5	µl
25 µM dNTPs	4.0	µl
25 mM $MgCl_2$	3.0	µl
primer 1	0.3	ng
primer 2	0.3	ng
Taq Gold DNA polymerase (1U) (AmpliTaq®Gold DNA polymerase)	0.2	µl
DNA (5ng/µl)	5.0	µl

2. โปรแกรมการทำ PCR

preheat	94°C	10	นาที
denature	94°C	5	นาที
annealing	60°C	20	วินาที
extension	72°C	20	วินาที

เป็นจำนวน 35 รอบ

3. ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis หรือ 5% polyacrylamide gel electrophoresis

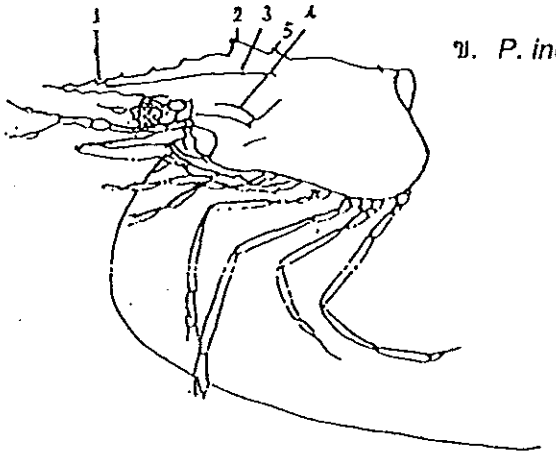
บทที่ 3

ผลการทดลอง

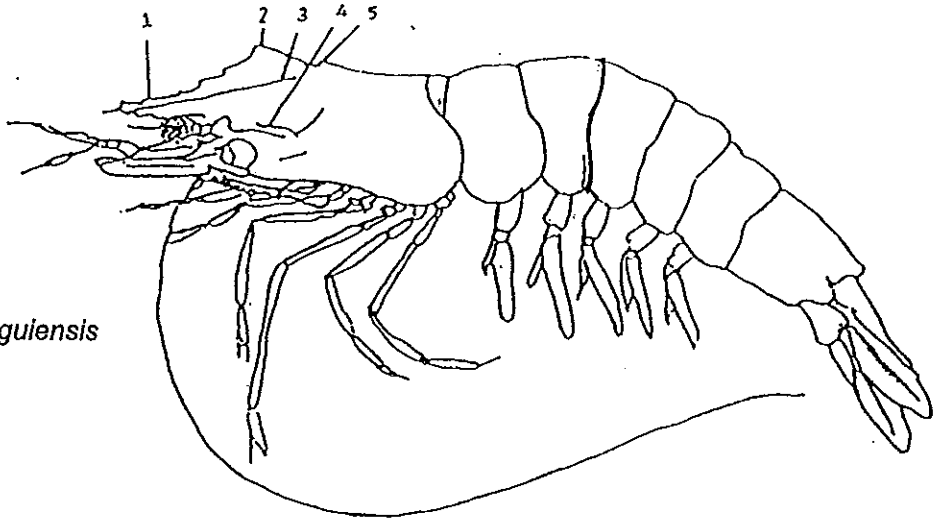
1. การตรวจสอบชนิดกุ้งแชบ๊วยด้วยสัณฐาณวิทยาและไอโซไซม์

นำตัวอย่างกุ้งทั้งหมดของกลุ่มต่างๆมาตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา เพื่อแยกชนิดของแต่ละตัวซึ่งพบว่ามีทั้ง *Metapenaeus sp.,* กุ้งกุลาดำ และกุ้งแชบ๊วย ได้นำเฉพาะกุ้งแชบ๊วยมาตรวจสอบรายละเอียดต่อไปโดยดูส่วนของสันกรี (rostrum) หลังจากนั้นนำตัวอย่างกุ้งมาแยกเอา carapase ออก ล้างให้สะอาด นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ดูรายละเอียดของ carapase เพื่อวัดความยาวของ adrostral carina และ gastro-orbital carina (รูปที่ 7) ว่าให้ผลตามตารางการเปรียบลักษณะของกุ้ง *P. merguiensis* หรือ *P. indicus* หรือไม่ (ตารางที่ 4) แล้วรายงานผลการตรวจสอบลักษณะโดยระบุเป็น M (*P. merguiensis*) เมื่อมีลักษณะของ *P. merguiensis* หรือ I (*P. indicus*) เมื่อมีลักษณะของ *P. indicus* แสดงผลตามตารางที่ 5 ซึ่งพบมีตัวอย่างกุ้งหลายตัวที่มีลักษณะปะปนกันและจากการสำรวจด้วยรูปสัณฐานพบว่าตัวอย่างที่มีลักษณะตามอนุกรมวิธานว่าเป็น *P. indicus* 10 ตัวอย่าง และเป็น *P. merguiensis* 6 ตัวอย่างเท่านั้น ตัวอย่างที่เหลือไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นกุ้งชนิดใดและด้วยสาเหตุของความสับสนของการแยกด้วยสัณฐานวิทยา (ขึ้นอยู่กับความเห็นของแต่ละบุคคลที่แยกชนิดด้วย) ทำให้ต้องหาวิธีอื่นเข้ามาช่วย คือ การใช้แบบแผนไอโซไซม์ (เกษรา แซ่ตัน, 2540 และ ปรางพิไล ลิ้มเจริญ, 2540) แล้วได้สรุปผลการทดลองไว้ดังตารางที่ 5

1. Rostrum
2. Rostral crest
3. Adrostral carina
4. Gastro-orbital carina
5. Epigastric tooth



ข. *P. indicus*



ก. *P. merguiensis*

รูปที่ 7 ลักษณะภายนอกที่ใช้แยกชนิดกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis* และ *P. indicus*

ก. *P. merguiensis*

ข. *P. indicus*

ตารางที่ 4 ลักษณะเปรียบเทียบของ *P. merguiensis* และ *P. indicus* ที่ใช้ในการแยกชนิด (ดัดลอกจาก Chaitiamvong, 1992 และ Grey *et al.*, 1983)

	P. merguiensis	*P. indicus*
1. rostrum	shorter; almost straight	longer and forming a sigmoidal curve
2. rostral crest	higher and more or less triangular	shallower and not triangular
3. adrostral carina	not reaching epigastric tooth	reaching epigastric tooth
4. gastro-orbital carina	shorter, occupying the middle 1/3 distance between the hepatic spine and the orbital angle	occupying posterior 2/3 distance between hepatic spine and orbital angle

ตารางที่ 5 ชนิดของกุ้งสกุล *Penaeus* เมื่อตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบด้วยแบบแผน isozyme (เกษรา แซ่ตัน, 2540 และ ปรางพิไล ลิ้มเจริญ, 2540)

ตัวอย่างที่	เพศ	ดรรชนี			การระบุชนิดของกุ้ง	
		P/T	R	GO	สัณฐานวิทยา	isozyme
A1	เมีย	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND
A2	ผู้	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND
A3	ผู้	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND
A4	ผู้	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND
A5	เมีย	M	I	I	mix	*P. indicus*
A6	ผู้	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A7	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A8	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A9	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A10	ผู้	M	I	I	mix	*P. indicus*
A11	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A12	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A13	เมีย	?	I	I	confuse	*P. indicus*
A14	เมีย	I	I	?	confuse	*P. indicus*
A15-A19					*Metapenaeus sp.*	ND
B1	-	-	I	I	confuse	ND
B9	-	-	I	I	confuse	ND
B10	-	I	I	I	*P. indicus*	ND
B16	ผู้	-	I	I	confuse	ND
B18	ผู้	-	?	?	confuse	ND
B19	ผู้	?	I	I	confuse	ND
B20	-	?	I	?	confuse	*P. indicus*
D1-D6					*P. monodon*	ND
E1	เมีย	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E2	ผู้	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E3	เมีย	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E4	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. merguiensis*
E5	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. merguiensis*
E6	เมีย	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E7	เมีย	M	M	I	mix	*P. merguiensis*

ตารางที่ 5 (ต่อ)

E8	เมีย	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E9	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*P. merguiensis*
E10	ผู้	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E11	ผู้	?	I	I	confuse	*P. indicus*
E12	ผู้	?	M	I	mix	*P. merguiensis*
E13	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	*
E14	เมีย	M	I	M	mix	*P. merguiensis*
E15	ผู้	?	I	I	confuse	*P. merguiensis*
E16	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	ND
E17	ผู้	?	M	M	confuse	ND
E18	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	ND
E19	ผู้	?	I	I	confuse	ND
E20	ผู้	?	I	I	confuse	ND
E21	-	?	M	I	confuse	ND
E22	-	?	M	I	confuse	ND
E23	ผู้	?	M	I	confuse	ND
E24	-	?	M	I	confuse	ND
E25	เมีย	-	M	I	mix	ND
E26	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	ND
E27	เมีย	M	I	?	confuse	ND
E28	เมีย	I	I	I	*P. indicus*	ND
E29	เมีย	M?	I	I	mix	ND
E30	เมีย	I	I	?	confuse	ND
E31	เมีย	-	-	-	-	ND
E32	ผู้	?	M	?	confuse	ND
E33	เมีย	I	M	I	mix	ND
E34	เมีย	I	I	?	confuse	ND
E35	เมีย	M	I	I	mix	ND
E36	เมีย	I	I	?	confuse	ND

หมายเหตุ P/T: petasma หรือ thelycum, R: rostrum, GO: gastro-orbital ridge, ND: ไม่มีการตรวจสอบ, I: มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น *P. indicus*, M มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น *P. merguiensis* และ ?: ไม่แน่นอนว่าเป็น I หรือ M

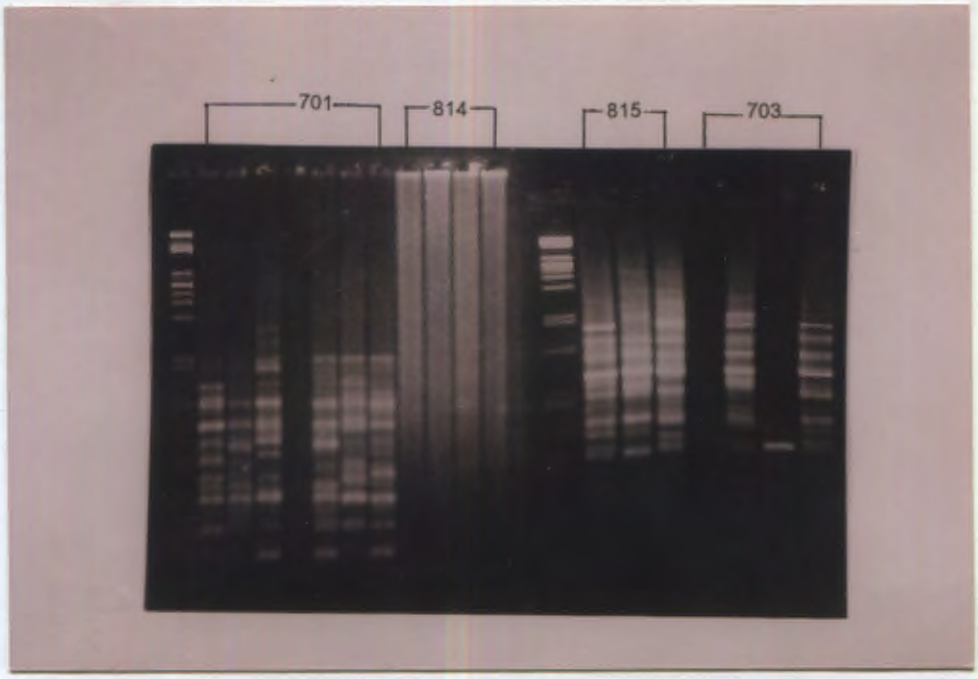
ที่มา: ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542

2. การวิเคราะห์แบบแผน RAPD ที่ได้จากไพรเมอร์ห้าชนิด

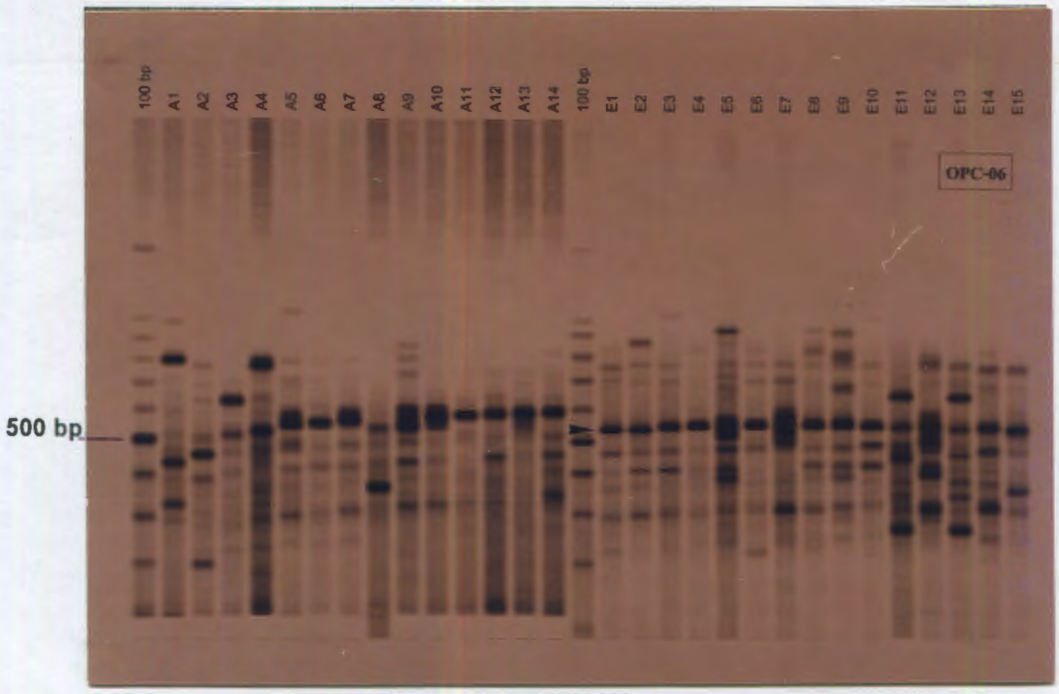
ได้ทำการทดลองร่วมกับปิยนันท์ ดวงทอง โดยผู้วิจัยทำหน้าที่สุ่มหาไพรเมอร์ทั้งหมด 120 ชุด แต่ละชุดมีลำดับเบสและ %GC ดังแสดงในตารางที่ 3 เพื่อเลือกตัวอย่างไพรเมอร์ที่ให้แบบแผนดีเอ็นเอที่ชัดเจน มีจำนวนแถบดีเอ็นเอไม่มากหรือน้อยจนเกินไปและแสดง polymorphism เช่น ในรูปที่ 8 เป็นการทำ PCR ของตัวอย่างกุ้ง 3-5 ตัวอย่างกับไพรเมอร์ 4 ชุด พบว่า ไพรเมอร์ UBC 701 จะให้แบบแผนดีเอ็นเอที่ดี ในขณะที่ไพรเมอร์ UBC 814 ให้แบบแผนดีเอ็นเอที่ใช้ไม่ได้คือไม่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ เป็นต้น ผลการทดลองสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ดีไว้จำนวน 5 ชุด คือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 จากนั้น ปิยนันท์ ดวงทอง ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ เช่น หาปริมาณดีเอ็นเอและปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมรวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ในที่สุดสรุปว่าควรใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 25 ng, สารละลาย $MgCl_2$ 3.0 mM และมีโปรแกรมการทำ PCR คือ ขั้นตอน denature ที่อุณหภูมิ 72°C, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 44°C สำหรับไพรเมอร์ OPC 06, UBC 114, UBC 150 และ UBC 701 ส่วน UBC 787 นั้นใช้อุณหภูมิ 42°C และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C ทั้งสามขั้นตอนเป็นจำนวน 35 รอบ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นแล้ว ได้นำไพรเมอร์ทั้ง 5 ชุดไปตรวจสอบกับตัวอย่างกุ้ง 29 ตัวอย่าง คือตัวอย่างกุ้งกลุ่ม A (A1-A14) และกลุ่ม E (E1-E15) แล้วได้ผลการทดลองแสดงแถบดีเอ็นเอที่น่าสนใจดังต่อไปนี้

OPC 06: แบบแผนดีเอ็นเอประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอประมาณ 10-14 แถบ มีขนาดระหว่าง 200-1,500 bp ในจำนวนแถบเหล่านี้ พบว่าแต่ละตัวอย่างของกุ้งแชบ๊วยที่นำมาทดลองพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอยู่ระหว่าง 450-600 bp โดยแถบบริเวณดังกล่าวสามารถแบ่งออกเป็น 1-4 แถบ (รูปที่ 9) ส่วนตัวอย่างกุ้งชนิดอื่น เช่น *Metapenaeus sp.* และ *P. monodon* ไม่พบแถบที่ปรากฏชัดเจนบริเวณนี้ จึงตั้งข้อสันนิษฐานว่าแถบดีเอ็นเอบริเวณนี้ซึ่งได้จาก การทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ OPC 06 อาจมีความสำคัญต่อการนำมาใช้แยกชนิดของกุ้งแชบ๊วยได้

UBC 114: ให้แบบแผนดีเอ็นเอ ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอประมาณ 10-14 แถบ มีขนาดระหว่าง 200-1,000 bp ไม่พบแถบที่แสดงความแตกต่างแยกเด่นชัดระหว่างกุ้งกลุ่ม A และกลุ่ม E แต่พบว่าแต่ละตัวอย่างกุ้งที่นำมาทำการทดลองให้ความแตกต่างระหว่างการมีแถบที่ขนาด 900 bp และไม่มีแถบที่มีขนาด 900 bp (รูปที่ 10)

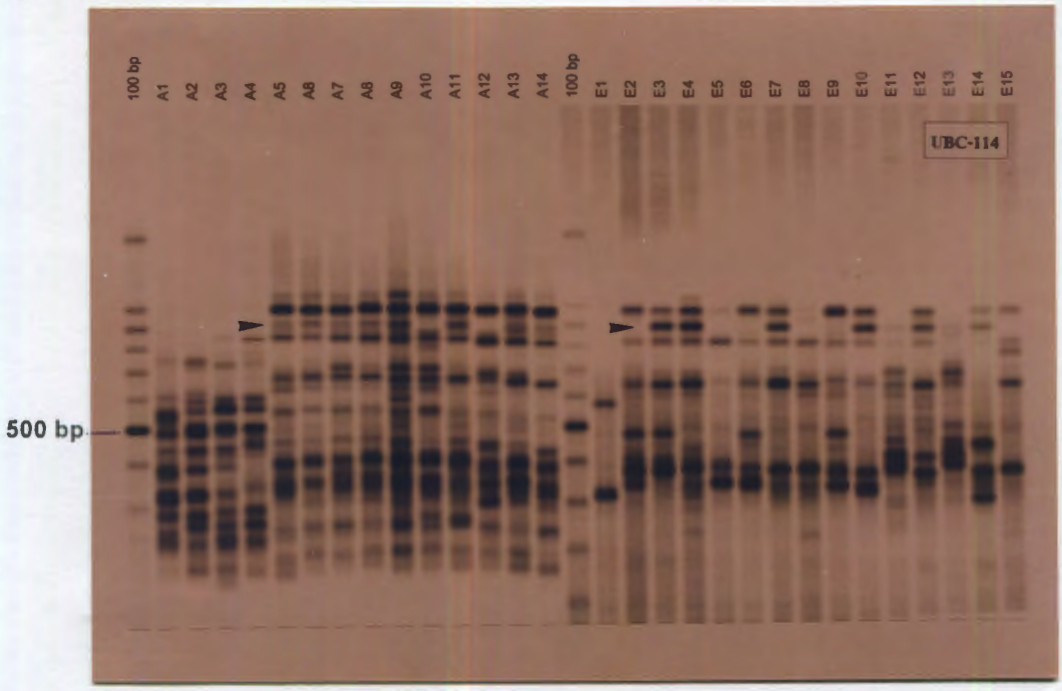


รูปที่ 8 แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 701, UBC 814, UBC 815 และ UBC 703 (กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งปริมาณ 25 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 40°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)



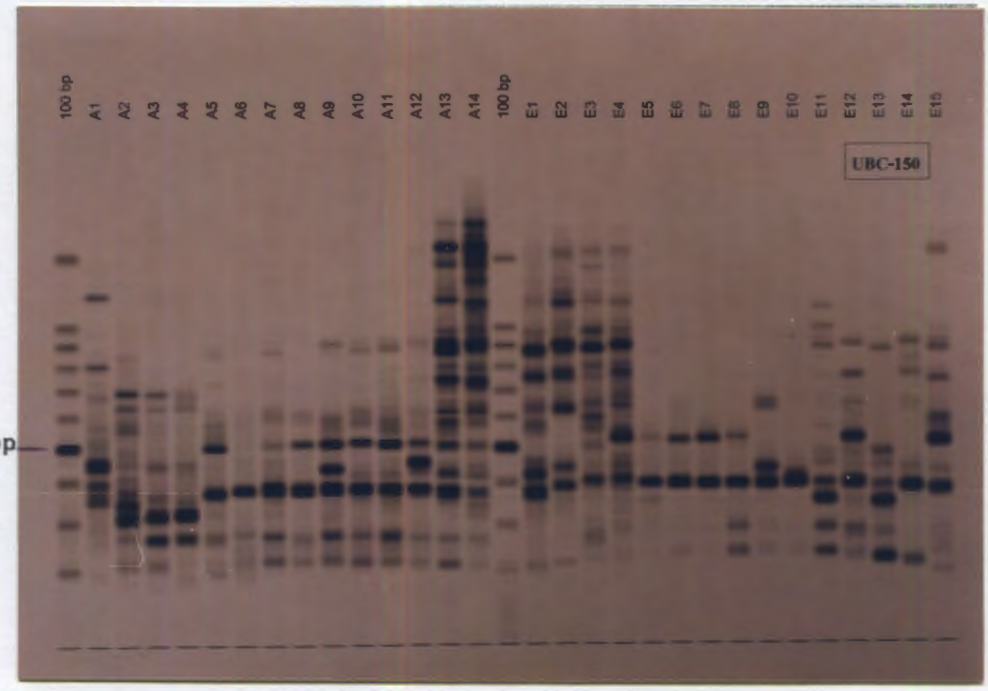
รูปที่ 9 แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPC 06 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15 (ปริมาณดีเอ็นเอ 25 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 44°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

ลูกศรชี้: บริเวณแถบดีเอ็นเอที่จะนำไปโคลน ขนาดประมาณ 450-600 bp (จากการนำเจล 2 เจลเรียงกัน โดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ BIO-RAD Laboratories และ run marker 100 bp ladder ทั้ง lane แรกและ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)



รูปที่ 10 แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 114 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15 (ปริมาณดีเอ็นเอ 25 ng, ขั้นตอน annealingที่อุณหภูมิ 44°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

ลูกศรชี้: บริเวณแถบดีเอ็นเอที่จะนำไปโคลน ขนาดประมาณ 900 bp (จากการนำเจล 2 เจลเรียงกัน โดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ BIO-RAD Laboratories และ run marker 100 bp ladder ทั้ง lane แรกและ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)



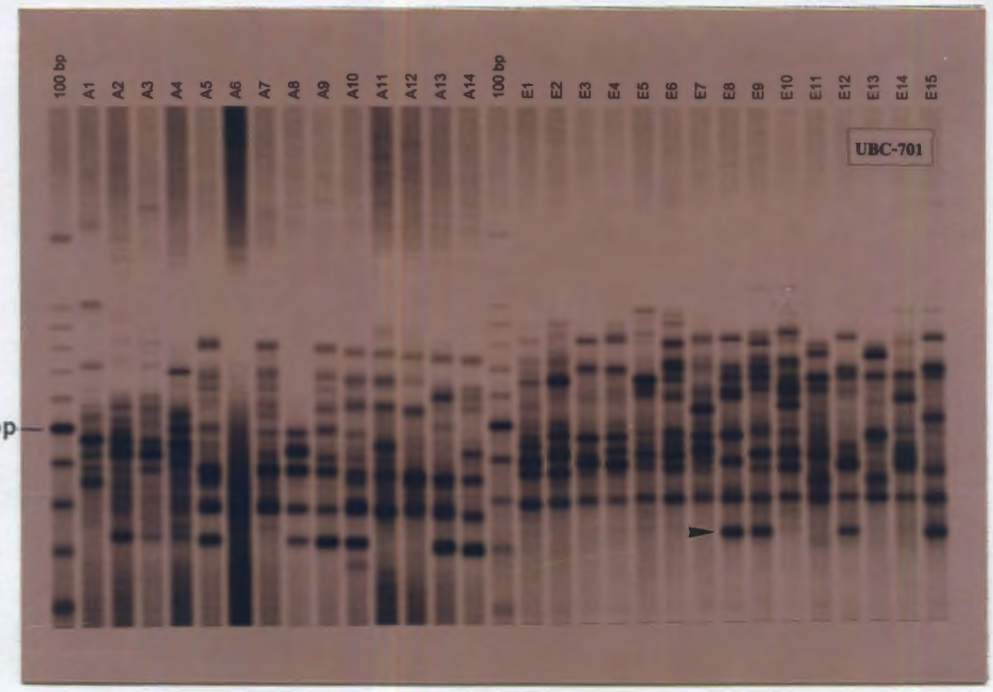
รูปที่ 11 แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 150 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15 (ปริมาณดีเอ็นเอ 25 ng,ขั้นตอน annealingที่อุณหภูมิ 44°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)
(จากการนำเจล 2 เจลเรียงกัน โดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ BIO-RAD Laboratories และ run marker 100 bp ladder ทั้ง lane แรกและ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)

UBC 150: ให้แบบแผนดีเอ็นเอประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอประมาณ 10-16 แถบ มีขนาดระหว่าง 200-1,500 bp (รูปที่ 11) ไม่พบแถบซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างกุ้งสองกลุ่ม จึงไม่อาจนำไปใช้หาไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer) ได้ แต่แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ชัดเจนพอสำหรับการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างกุ้ง สำหรับบางตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอไม่สมบูรณ์ดี ซึ่งอาจเกิดจากความแปรปรวนในการทำ RAPD ซึ่งได้ทำการทดลองซ้ำซ่อมตัวอย่างกุ้งที่ amplify แล้วมีปัญหา และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง สามารถนำแถบที่ได้จากการทดลองซ้ำไปแทนที่แถบเดิมซึ่งไม่ชัดเจนได้และได้ใช้วิธีนี้กับทุกกรณีที่มีปัญหาได้

UBC 701: ให้แบบแผนดีเอ็นเอประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอกระจายสม่ำเสมอ มีขนาดอยู่ระหว่าง 200-1,500 bp เช่นเดียวกับไพรเมอร์ OPC 06 และ UBC 150 อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ UBC 701 เป็นไพรเมอร์ที่ให้แบบแผนดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างกุ้งหลากหลายแบบมาก (มี polymorphism) นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าแถบที่ 200 bp เห็นแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจน และมักปรากฏแถบดังกล่าวและไม่ปรากฏในกุ้งบางตัวอย่าง (รูปที่ 12)

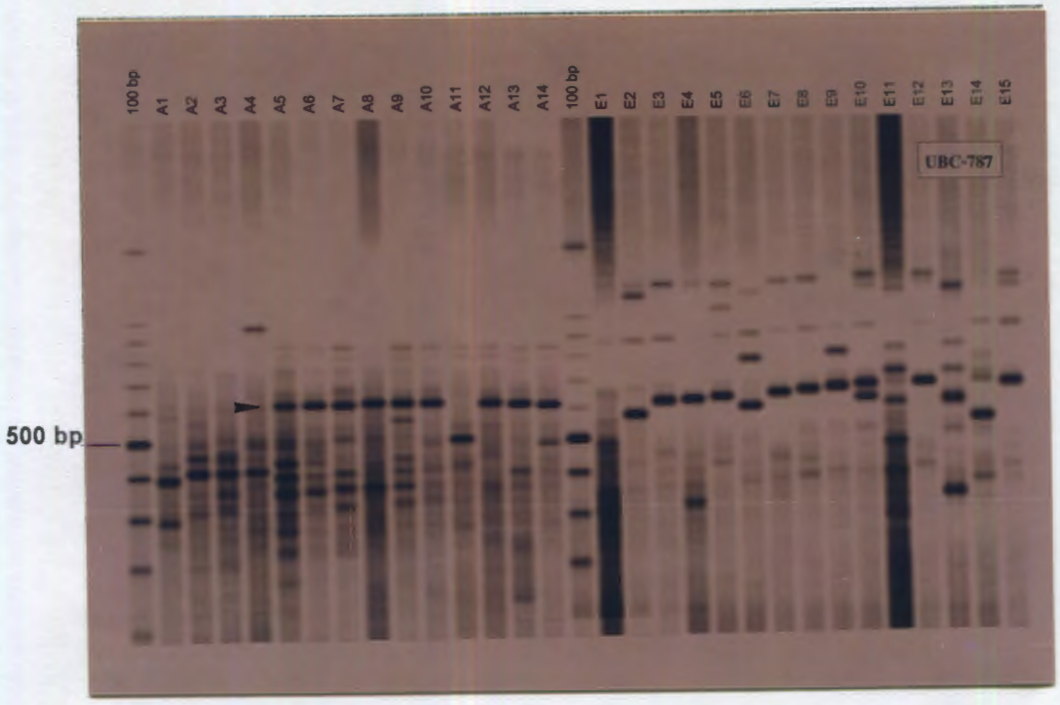
UBC 787: ให้แบบแผนดีเอ็นเอประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มสม่ำเสมอตลอดช่วงขนาด 200-1,300 bp แต่มีอยู่แถบหนึ่งที่ 600 bp ซึ่งปรากฏเป็นแถบเข้มกว่าแถบอื่น ในบางตัวอย่างแถบนี้หายไป (เช่น E1) หรือเปลี่ยนตำแหน่งไปปรากฏที่ขนาด 500 bp เช่น A11 หรือ ที่ขนาด 550 bp ในตัวอย่าง E2 และ E6 (รูปที่ 13) จึงเลือกที่จะโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 600 bp จากตัวอย่าง E4 และโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 500 bp จากตัวอย่าง B30 นำไปหาลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer) แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้มาทำ PCR กับตัวอย่างกุ้งต่อไป

ปิยนันท์ ดวงทอง ได้นำแบบแผน RAPD ของตัวอย่างต่างๆไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst ของ BIO-RAD ได้ dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งแต่ละตัวพบว่ากุ้งกลุ่ม A น่าจะเป็น *P. indicus* และกลุ่ม E น่าจะเป็น *P. merguiensis* อย่างไรก็ตามในการระบุชนิดกุ้งด้วยการใช้ dendrogram นั้นอาจไม่สะดวก เนื่องจากเป็นที่ทราบดีว่าเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยการทำ PCR ในแต่ละครั้งค่อนข้างมาก รวมทั้งยังขึ้นอยู่กับฝีมือคนทำ ไม่ว่าจะเป็นการทำ PCR หรือการทำ gel electrophoresis จึงควรจะคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่อาจใช้แยกความแตกต่างของกุ้งสองชนิดไปหาการเรียงลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ จึงได้ทำการทดลองต่อคือ โคลนแถบดีเอ็นเอต่างๆที่ระบุและแสดงโดยลูกศรชี้ในรูปที่ 9 ถึง 13



รูปที่ 12 แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 701 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15 (ปริมาณดีเอ็นเอ 25 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 44°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

ลูกศรชี้: บริเวณแถบดีเอ็นเอที่จะนำไปโคลน ขนาดประมาณ 200 bp (จากการนำเจล 2 เจลเรียงกัน โดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ BIO-RAD Laboratories และ run marker 100 bp ladder ทั้ง lane แรกและ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)



รูปที่ 13 แถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 787 กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง A1-A14 และ E1-E15 (ปริมาณดีเอ็นเอ 25 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 42°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

ลูกศรชี้: บริเวณแถบดีเอ็นเอที่จะนำไปโคลน ขนาดประมาณ 500-600 bp (จากการนำเจล 2 เจลเรียงกัน โดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ BIO-RAD Laboratories และ run marker 100 bp ladder ทั้ง lane แรกและ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)

3. การโคลนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะใช้แยกชนิดกุ้ง

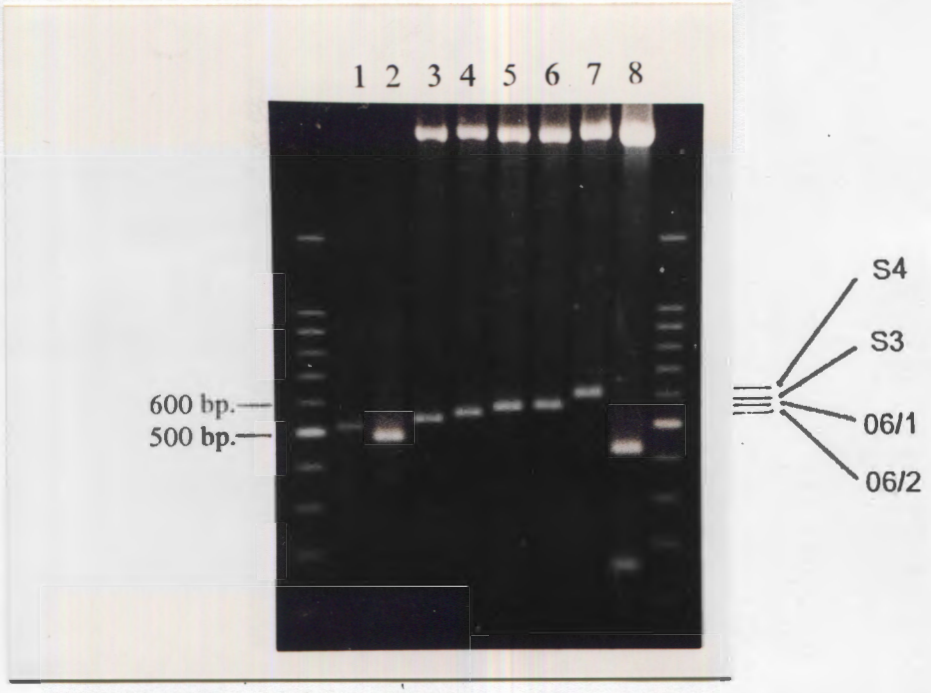
จากแถบดีเอ็นเอในข้อ 2 ได้เลือกโคลนดีเอ็นเอขนาด 450-600 bp ของไพรเมอร์ OPC 06 (จากตัวอย่าง E3 และ E7), แถบขนาด 900 bp ของไพรเมอร์ UBC 114 (จากตัวอย่าง B1และ B30), แถบขนาด 200 bp ของไพรเมอร์ UBC 701 จากตัวอย่าง A5 และ A9 และ แถบขนาด 500 และ 600 bp ของไพรเมอร์ UBC 787 จากตัวอย่าง B30 และ E4 ตามลำดับ เพราะทุกแถบจะเข้มและเห็นได้ชัดเจน จากนั้นตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นที่ต้องการ แล้วทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Agarose gel DNA extraction kit (Boehringer Mannheim) แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมกับ pGEM®-T Vector และ pGEM®-T Easy Vector (ภาคผนวก ข) นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ไป transform เข้าสู่ *E. coli* (Top10F') จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง LB ซึ่งมียาปฏิชีวนะ ampicillin 80 μg/ml เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Eco*RI เมื่อใช้ pGEM®-T Easy Vector หรือ *Pst*I กับ *Nco*I เมื่อใช้ pGEM®-T Vector) เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมกับ vector ให้ผลดังนี้

แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-OPC 06

โคลนแถบดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ระหว่าง 450-600 bp ที่ได้จาก PCR product ของไพรเมอร์ OPC 06 จากตัวอย่างกุ้ง E3 และ E7 ปรากฏว่าได้โคลนที่ดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน 4 โคลน ดังแสดงในรูปที่ 14 กำหนดชื่อให้เรียงตามลำดับจากขนาดใหญ่ไปเล็กคือ S4, S3, 06/1 และ 06/2 (S4 และ S3 ไม่ได้นำมาศึกษาในที่นี้) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปหาลำดับเบส และแสดงผลการหาลำดับเบสของ 06/1 และ 06/2 มีขนาดที่แน่นอน 521 และ 493 bp ดังรูปที่ 15 และ 16 ตามลำดับ

แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-UBC 114

โคลนแถบดีเอ็นเอขนาด 900 bp ที่ได้จาก PCR product ของไพรเมอร์ UBC 114 จากตัวอย่าง B1 และ B30 จากการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ปรากฏว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 900 bp เมื่อตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสได้ดังรูปที่ 17 แต่เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่มาก จึงได้ผลของลำดับเบสไม่สมบูรณ์ คือหาไพรเมอร์ช่วงท้ายของลำดับเบสไม่พบ ต้องมีการทำ subcloning และหาลำดับเบสใหม่



รูปที่ 14 แถบดีเอ็นเอจากโคลน S4, S3, 06/1 และ 06/2 บน 1.8% agarose gel electrophoresis ด้วย 1XTAE buffer

แถบที่ 3 โคลน 06/2 ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I กับ *Nco*I

แถบที่ 4 โคลน 06/1 ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I กับ *Nco*I

แถบที่ 5-6 โคลน S3 ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

แถบที่ 7 โคลน S4 ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

(run marker 100 bp DNA ladder lane แรก และ lane สุดท้าย)

หมายเหตุ 1. ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I กับ *Nco*I เมื่อใช้ pGEM®-T Vector

2. ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เมื่อใช้ pGEM®-T Easy Vector

3. โคลน S4 และ S3 ไม่นำมาศึกษาในที่นี้

```
        10         20         30         40         50         60
GAACGGACTC TCTCCTTCGA CTCTGGAATG TCCTTGACCA TCAATTTAGC TCGGGATAAG
        70         80         90        100        110        120
TTTATTTATC TGTTTATCTG TTTGTTTATT TATTTATGTA TCTATCTGTC TGTGAACCTA
       130        140        150        160        170        180
TCTATATCTG TTTATCTATC TGTCTATCTG TTAATCTATC AATTATATAT TGTTTATGTA
       190        200        210        220        230        240
TCTATTTATC TATTTGATTT TATTGTAGTA AAGTTAGGAA TTTCAAGATC TCATTTATTA
       250        260        270        280        290        300
AGTTCAAATT TCAACAATAG TATACATTTT ATAATCTTTT GTTAGTAATA TTGGAAGACA
       310        320        330        340        350        360
AGTTCTCAAT AATTGCATAG TTATTAGACG ATAAGTTTGA AATTTGAATA TAAATATATA
       370        380        390        400        410        420
TATATCTGTT TATGACTAAT TATGGTTTGA GACTATTTCA CTGTGTATTA GTGGTGTATT
       430        440        450        460        470        480
AATGACTTTT TGGTGTTATC AAGGCGACTG TTAAACCATC ACGAGTAATC CGCTAGGTTT
       490        500        510        520
GCCTCTCGTA TCCTGATGAT TATTTACGCA TGAGTCCGTT C
```

รูปที่ 15 ลำดับเบสของโคลน 06/1

————แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ OPC 06 ที่ใช้ในการ amplify

```
        10         20         30         40         50         60
GAACGGACTC TCTCCTTCGA CTCTGGGAAT GTCCTTAACC ATCAATTTAG CTCGGGATAA
        70         80         90        100        110        120
GTTTATTTAT CTGTTTATCT GTTTGTTTAT TTATTTATGT ATCTATCTGT CTGTGAACCT
       130        140        150        160        170        180
ATCTATATCT GTTTATCTAT CTGTCTATCT GTTAATCTAT CAATTATATA TTGTTTATGT
       190        200        210        220        230        240
ATCTATTTAT CTATTTGATT TTATTGTAGT AAAGTTAGGA ATTTCAAGAT CTCATTTATT
       250        260        270        280        290        300
AAGTTCAAAT TTCAACAATA GTATACAAGA CAAGTTCTCA ATAATTGCAT AGTTTTTAGA
       310        320        330        340        350        360
CGATAAGTTT GAAATTTTAA TATAAATATA TATATATCTG TTTATGACTA ATTATGGTTT
       370        380        390        400        410        420
GAGACTATTT CACTGTGTAT TAGTGGTGTA TTAATGACTT TTTGGTGTTA TCAAGGCGAC
       430        440        450        460        470        480
TGTTAAACCA TCACGAGTAA TCCGCTAGGT TTGCCTCTCG TATCCTGATA ATTATTTACG
       490
CATGAGTCCG TTC
```

รูปที่ 16 ลำดับเบสของโคลน 06/2

——— แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ OPC 06 ที่ใช้ในการ amplify

```
        10          20          30          40          50          60
TGACCGAGAC TGAACTCTCC AGGAGCTATC TGTACGTCTA TTCTGTATGG GTCTATCTTT
        70          80          90         100         110         120
TCCCTCTTGC CTACATCATC TACAGCTGCG CTTTCATCGT CAAGGCTGTT GCTGCTCACG
       130         140         150         160         170         180
AGAAGGGACT GCGAGAACAG GCCAAGAAGA TGGGAGTTAA ATCTCTGATA AGCGAGGAAG
       190         200         210         220         230         240
CCCAGAATAC CTCGGCTGAC TGCCGTCTAT GCAAGGTTGC TCTCTTGACC GTGACCCTGT
       250         260         270         280         290         300
GGTTCGTGGC ATGGACCCCC TACTTTGTCA TCAACTGGGG AGGAATGTTC ATATTTCCTA
       310         320         330         340         350         360
TTGTCACTCC TCTTTTCTCC ATCTGGGGCT CCGTCTTCGC CAAGGCCAAC GCCGTTTACA
       370         380         390         400         410         420
ACCCCATCGT GTACGCCATC AGCCACCCCA AGTACCGAAC TGCCCTTGAG AACAAGCTGC
       430         440         450         460         470         480
CTTGTCTTGC CTGTGCTACA GATGGCCGAG ATGGAGGTTC TGACGCCGGA TCCACTGCTA
       490         500         510         520         530         540
CTTCTGAGAC CCTGACAAGA CCGAGTCTGC CTAAGGCACA TGTTATTTTC TAAACTCAAG
       550         560         570         580         590         600
ATCCTGTTTA CTGTCCCTTC ATCCTGAATT TACAATTTAA CTCCCCCCAT CTGAACCCTC
       610         620         630         640         650         660
CACTTTTCAC TGTTTATCCT GTTTTTCTTA ACATATGTTT TAACCTCATT TATTTACCCC
       670         680         690         700         710         720
CTATGAAAAA TCCCCCTTGG TTTCCAAGTA ACCTATTCCC CAAAAATAAC CCCTACCCCC
       730         740         750         760         770         780
AATTTTTGCC GGATTTTTTA AAAACAGGCA CATCTAATTC CCCCTCAATC TTTTTTAATC
       790         800         810         820         830         840
TCTTGTTACC CCTCTCCTAG CTTTATTATC TAAGGGAATT CGGGAAACAT GCCCCTTTTT
       850         860         870         880         890         900
TACTTTTCTC GCTCGAATA. ..........  ..........  ..........  ..........
```

รูปที่ 17 ลำดับเบสของโคลน 114

———แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ UBC 114 ที่ใช้ในการ amplify (หมายเหตุ: โคลน 114 มีขนาดใหญ่ประมาณ 860 bp จำเป็นต้อง subcloning และหาลำดับเบสของโคลนใหม่)

แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-UBC 701

โคลนแถบดีเอ็นเอขนาด 200 bp จาก PCR product ของไพรเมอร์ UBC 701 จากการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ปรากฏว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 bp เมื่อตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปหาลำดับเบสได้ดังรูปที่ 18 มีขนาดที่แน่นอน 212 bp

```
        10         20         30         40         50         60
CCCACAACCC TCAGAGATAT TTTGAATTGG GAGTTACGAA CCTCTTGCAA TAAGGTAGCG
        70         80         90        100        110        120
AATATGGTAT ATATGTATAT ACATTATATA TTTTTTTCTT CTTTTTTTAC TTTTCTTCAT
       130        140        160        160        170        180
TAATGCTGTT ACAGTATATA TGTATAGATG TAACACGATA TAACTGATTT GTATAACCAG
       190        200        210
TAAATAACCT AATTCTATTG CTGGGTTGTG GG
```

รูปที่ 18 แสดงลำดับเบสของโคลน 701

_____: แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ UBC 701 ที่ใช้ในการ amplify

แถบดีเอ็นเอจาก RAPD-UBC 787

โคลนแถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 600 bp จาก PCR product ของไพรเมอร์ UBC 787 จากตัวอย่าง B30 และ E4 ตามลำดับ โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากแถบที่ 500 bp ตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Pst*I กับ *Nco*I เมื่อใช้ pGEM®-T Vector โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากแถบที่ 600 bp ตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Eco*RI เมื่อใช้ pGEM®-T Easy Vector โคลนชิ้นดีเอ็นเอจากแถบที่ 600 bp และโคลนชิ้นดีเอ็นเอจากแถบที่ 500 bp กำหนดชื่อเป็น 787/1 และ 787/2 มีขนาดที่แน่นอน 602 และ 473 bp ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequences) ของโคลนต่าง ๆด้วยโปรแกรม DNASIS และการเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank

นำข้อมูลของการเรียงลำดับเบส (DNA sequences) ของโคลน 06/1, 06/2, 701 และ 787/1 ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ 06/1 และ 06/2 และพบว่าทั้ง 2 โคลนต่างมีลำดับเบสที่เหมือนกัน (มี homology 93%) ดังแสดงในรูปที่ 19 โดยโคลน

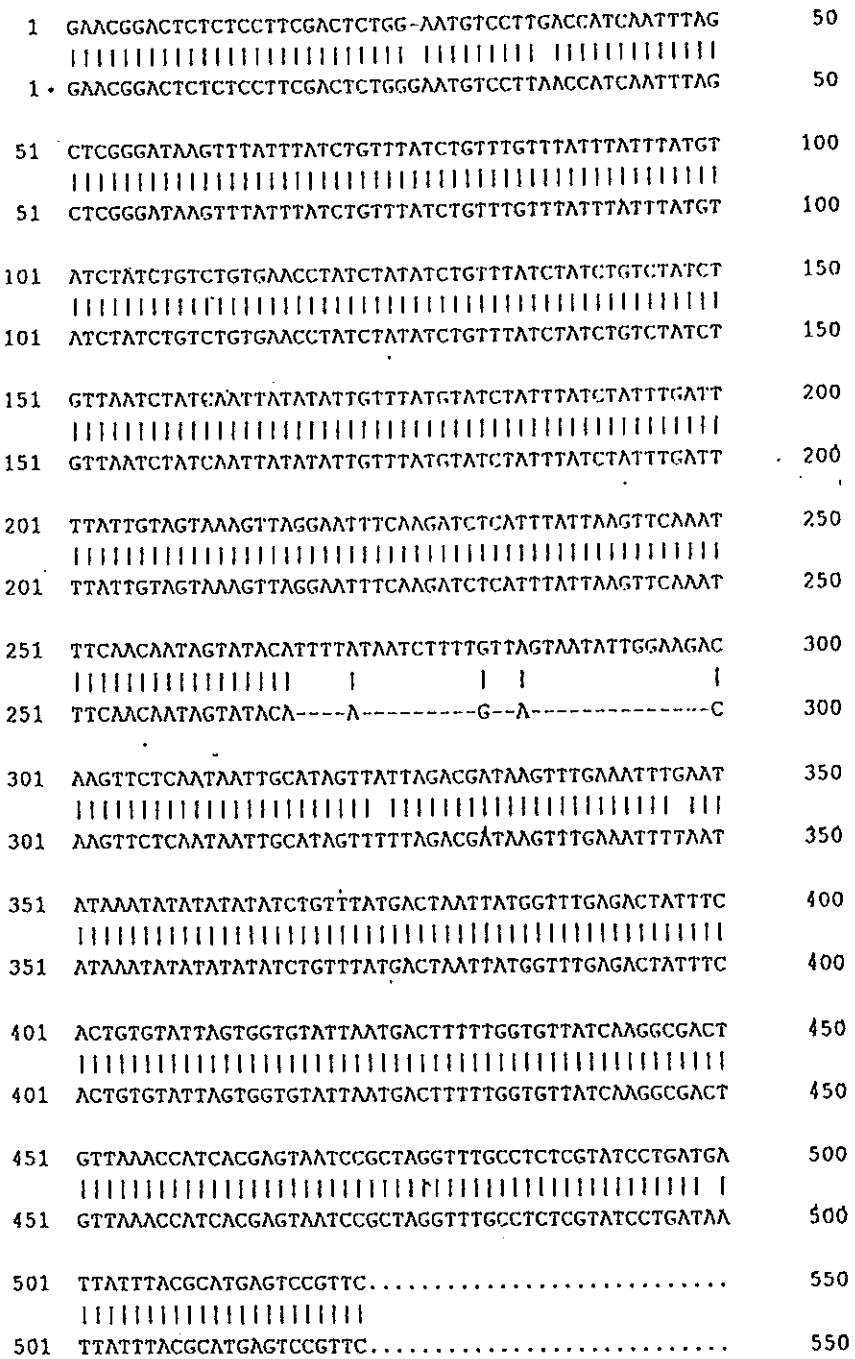
06/2 มีลำดับเบสน้อยกว่า โคลน 06/1 อยู่ 29 เบส ช่วงที่เบสหายไปอยู่ระหว่างเบสที่ 268 ถึง เบสที่ 271, 273-281, 283-284 และ 286-299 ของ 06/1 นอกจากนั้นยังได้ใช้โปรแกรมเพื่อคาดคะเนการใช้ลำดับเบสเป็นรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีน แล้วนำลำดับของกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank ให้ผลการวิเคราะห์ว่ามีเพียง โคลน 06/2 ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำนวน 173 ตัว (รูปที่ 20) โดยลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเหมือนกับ Bkm-like protein ของ *Drosophila melanogaster* (55%), (Bkm: Banded krait minor satellite)

5. แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer)

ได้ออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะของดีเอ็นเอแต่ละชนิด จากข้อมูลลำดับเบสของโคลนต่างๆ

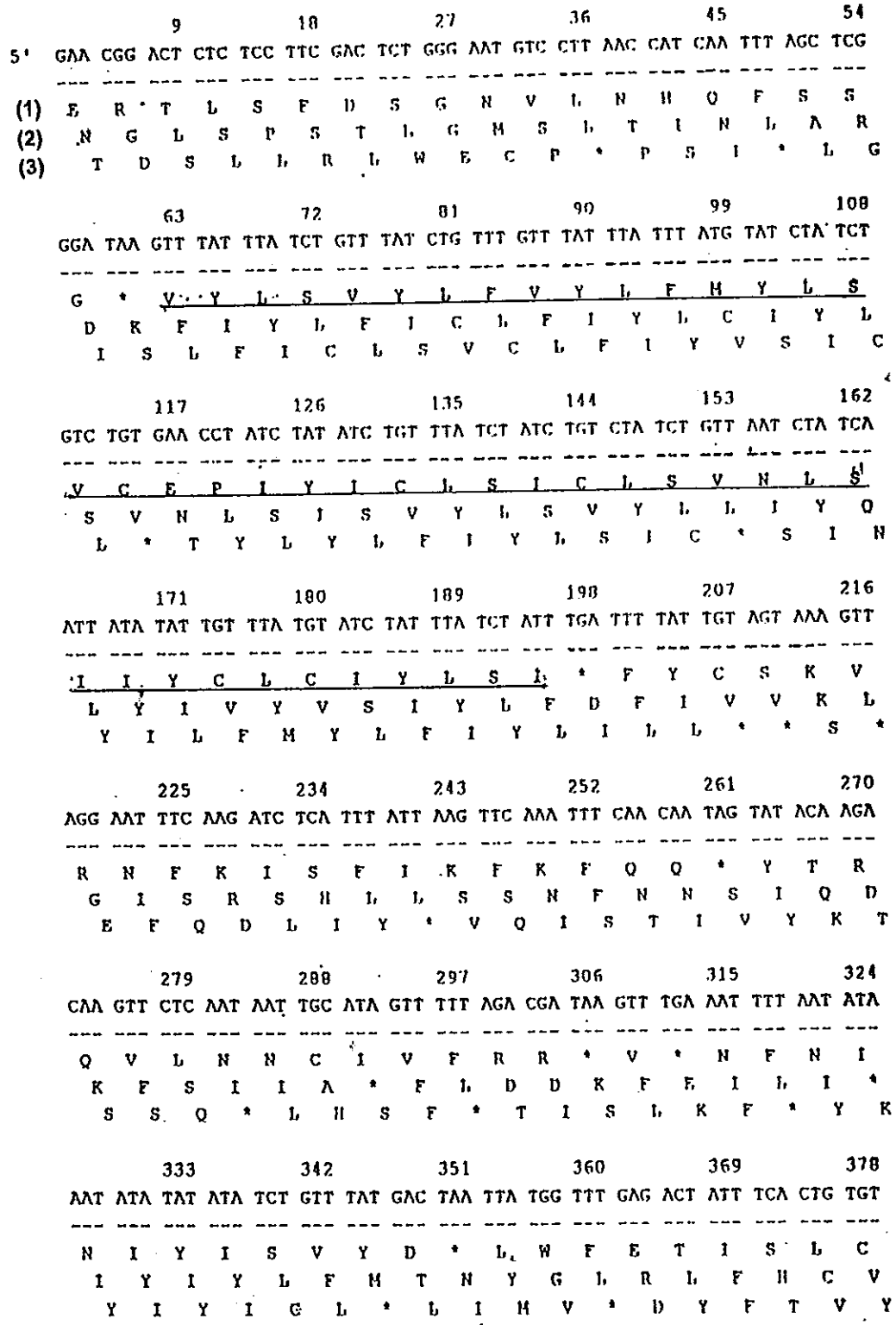
ตารางที่ 6 สรุปข้อมูลเกี่ยวกับโคลนของดีเอ็นเอที่สนใจและลำดับเบสของไพรเมอร์แบบจำเพาะ

ชื่อโคลน	ชื่อไพรเมอร์ (RAPD)	ขนาดที่แน่นอนของดีเอ็นเอลูกผสม(bp)	ลำดับเบสของไพรเมอร์แบบจำเพาะ
06/1	OPC 06	521	F: TGC GTA AAT AAT CAT CAG R: ACT CTC TCC TTC GAC TCT
701	UBC 701	212	F: ACC CTC AGA GAT ATT TTG R: CCC AGC AAT AGA ATT AGG
หมายเหตุ	F = Forward R = Rewerse		



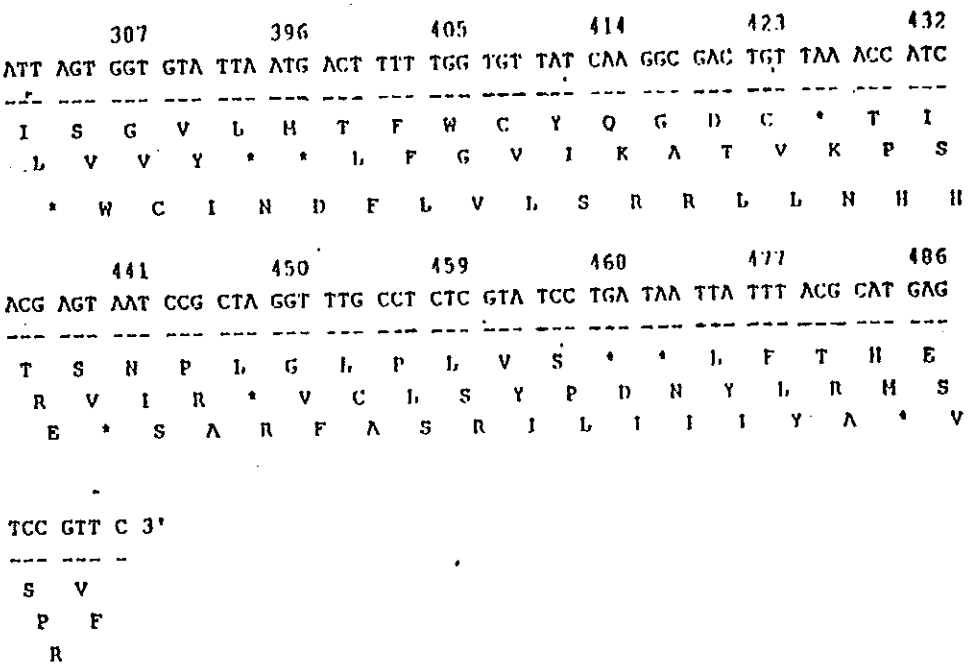
รูปที่ 19 ลำดับเบสที่เหมือนกัน (93% homology) ของโคลน 06/1 (เส้นบน) กับ 06/2 (เส้นล่าง)

..... บริเวนเบสที่หายไปของโคลน 06/2



รูปที่ 20 ลำดับของกรดอะมิโนของโคลน 06/2 (ได้จากการคาดคะเนจากลำดับเบสทั้ง 3 frame โดย frame 1: (1), frame 2: (2) และ frame 3: (3))

_____ แสดงบริเวณที่นำไปเปรียบเทียบกับ GenBank



รูปที่ 20 ลำดับของกรดอะมิโนของโคลน 06/2 (ได้จากการคาดคะเนจากลำดับเบสทั้ง 3 frame) (ต่อ)

_____ แสดงบริเวณที่นำไปเปรียบเทียบกับ GenBank

เมื่อนำ specific primers ไปใช้ในการ amplify ดีเอ็นเอจากตัวอย่างต่างๆ ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis และ 5% polyacrylamide gel electrophoresis ได้ผลการทดลองดังนี้

ไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06

เมื่อตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 bp มีขนาดใกล้เคียงกันทุกตัวอย่าง สอดคล้องกับแถบดีเอ็นเอที่พบในการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ OPC 06 เช่น จะไม่ปรากฏแถบดังกล่าวในตัวอย่างกุ้งที่เป็น *P. monodon*, A1 และปรากฏใน A6, A9, E1 และ E9 ดังรูปที่ 21 และเมื่อตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย 5% polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าสามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏได้ละเอียดและชัดเจนยิ่งขึ้น (รูปที่ 22 และ 23) โดยจะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอบริเวณนี้มีความแตกต่างกันหลายแบบ เมื่อเปรียบเทียบกันแต่ละตัวอย่าง กล่าวคือ

1. เป็นแถบไม่ชัดเจน บางๆ
2. ปรากฏเป็นแถบ 1 แถบ แต่มีขนาดไม่เท่ากัน ในบางตัวอย่าง
3. ปรากฏเป็นแถบ 2 แถบ คู่ที่มีขนาด 521 และ 493 bp หรือมีมากกว่า 2 แถบ
4. ไม่ปรากฏแถบเลย

ไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701

จากผลการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 แล้วตรวจสอบด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ได้ว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ประมาณ 200 bp ซึ่งแถบที่ปรากฏนี้ในบางตัวอย่างจะไม่มี และการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบของตัวอย่างที่ทดสอบด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะก็สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ UBC 701 เช่น ในตัวอย่างกุ้ง D1 (*P. monodon)*, A1 (*Metapenaeus sp.*) และ E1 จะไม่ปรากฏแถบนี้ A6, A9 และ E9 จะปรากฏแถบที่ประมาณ 200 bp ดังรูปที่ 24

ไพรเมอร์แบบจำเพาะ 787

การทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 787 แล้วตรวจสอบแถบที่เกิดขึ้นด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 25) ปรากฏว่าให้ผลคล้ายคลึงกับการทำ RAPD ด้วยไพร-เมอร์ UBC 701 เช่นจะไม่เกิดการ amplify กับตัวอย่าง E1 และตัวอย่างกุ้งที่เป็น *P. monodon* กับ A6, A9 และ E9 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ 600 bp

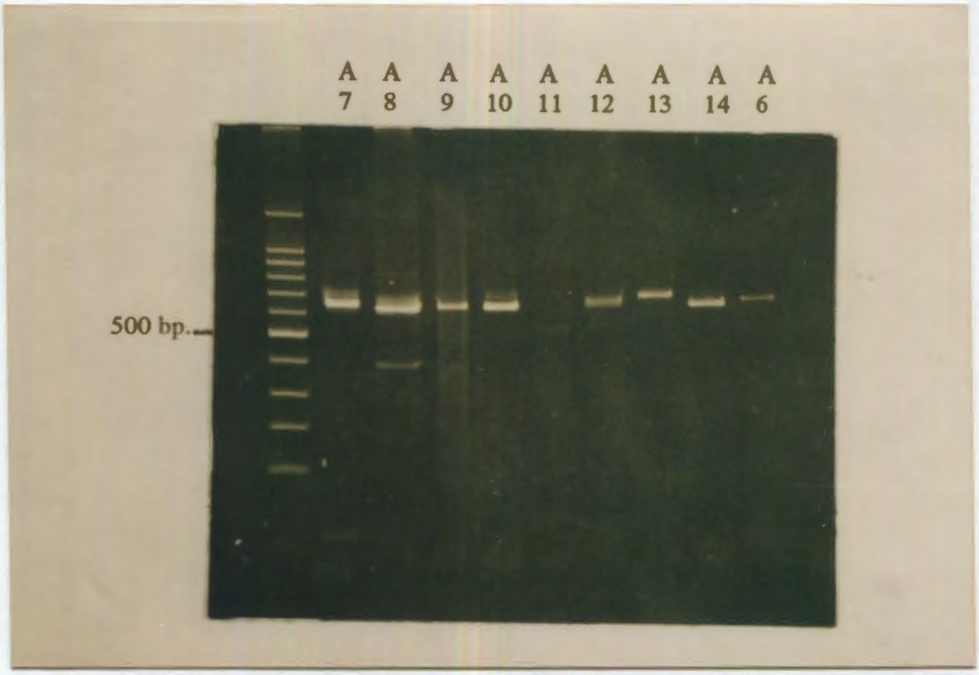
รูปที่ 21 แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06 (ปริมาณดีเอ็นเอ 50 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

แถบที่ 1 100 bp DNA ladder

แถบที่ 2 ตัวอย่างกุ้ง D1 (*P. monodon)*

แถบที่ 3-5 ตัวอย่างกุ้ง A1, A6 และ A9 ตามลำดับ

แถบที่ 6-7 ตัวอย่างกุ้ง E1 และ E9 ตามลำดับ

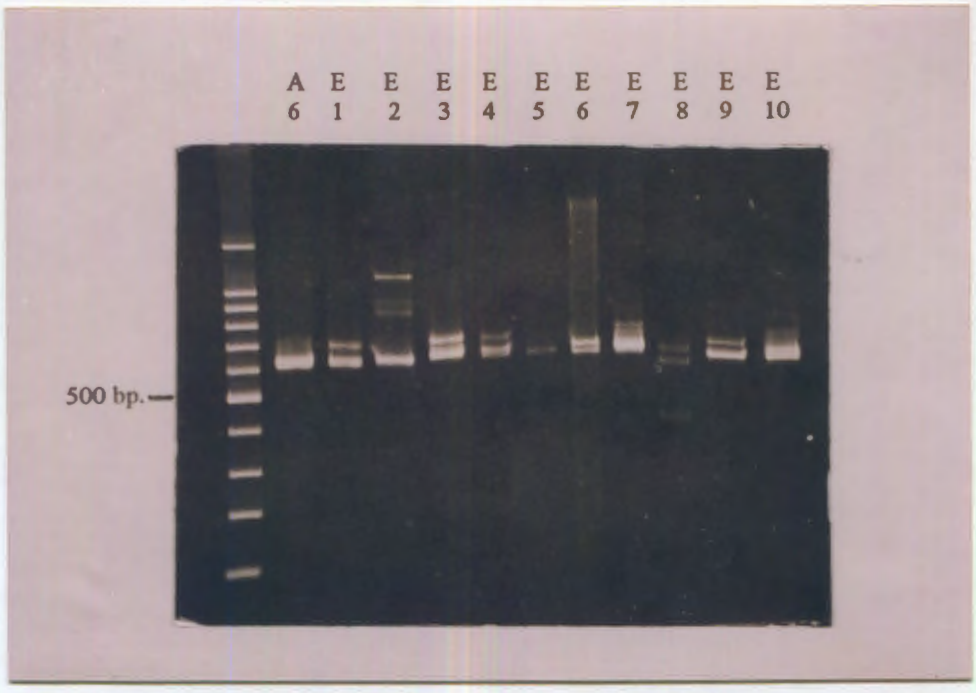


รูปที่ 22 แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06 (ปริมาณดีเอ็นเอ 50 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60°C และตรวจสอบบน 5% polyacrylamide gel electrophoresis)

แถบที่ 1 100 bp DNA ladder

แถบที่ 2-9 ตัวอย่างกุ้ง A7-A14 ตามลำดับ

แถบที่ 10 ตัวอย่างกุ้ง A6

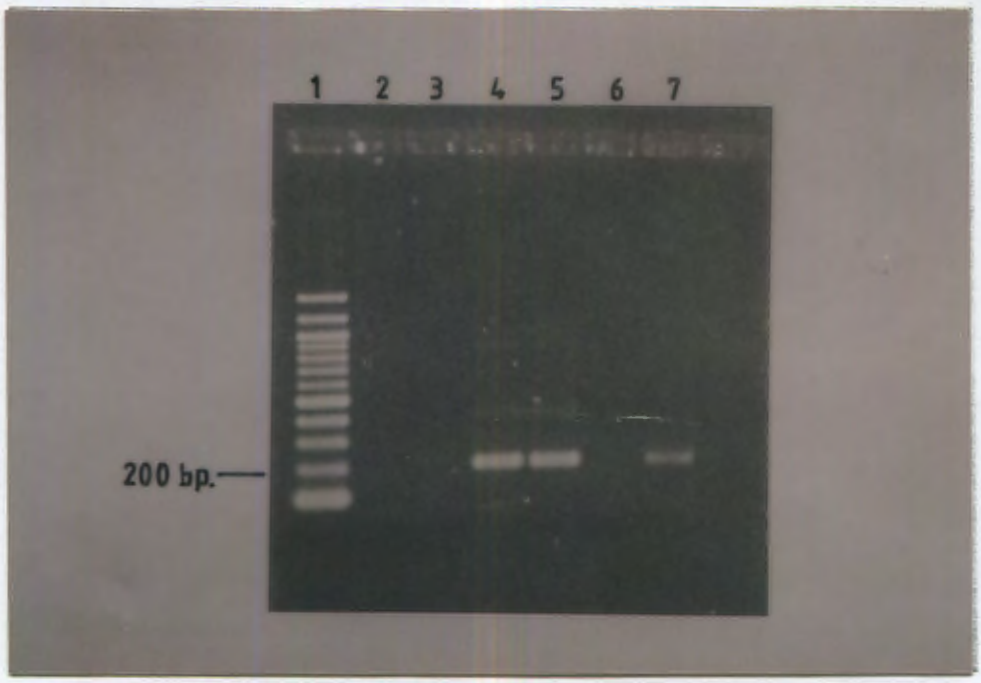


รูปที่ 23 แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06 (ปริมาณดีเอ็นเอ 50 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60°C และตรวจสอบบน 5% polyacrylamide gel electrophoresis)

แถบที่ 1 100 bp DNA ladder

แถบที่ 2 ตัวอย่างกุ้ง A6

แถบที่ 3-12 ตัวอย่างกุ้ง E1-E10 ตามลำดับ



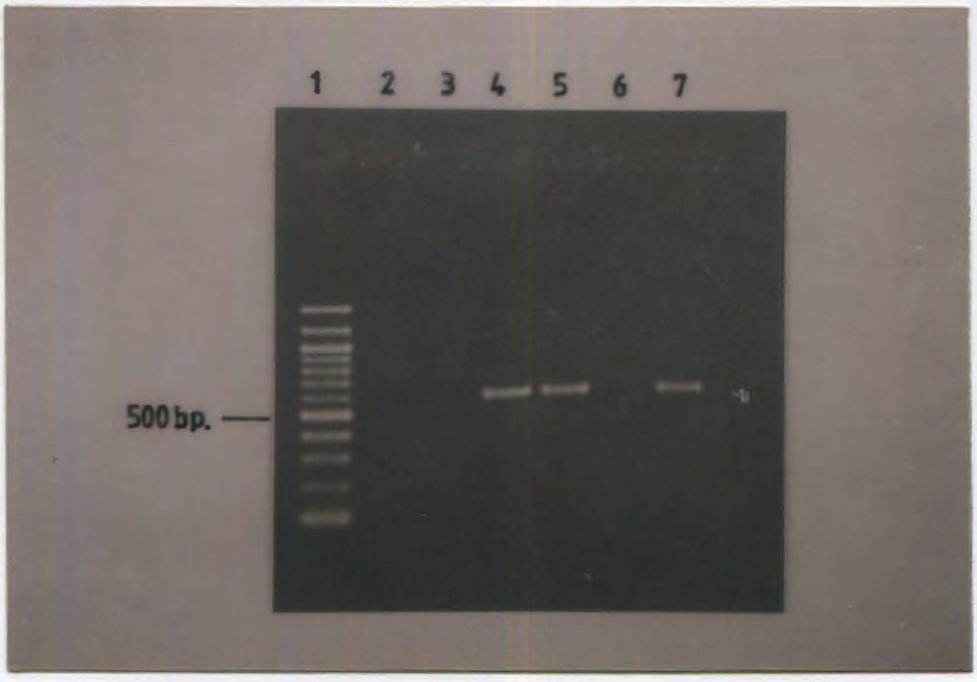
รูปที่ 24 แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 (ปริมาณดีเอ็นเอ 50 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60°C และตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

แถบที่ 1 100 bp DNA ladder

แถบที่ 2 ตัวอย่างกุ้ง D1 (*P. monodon)*

แถบที่ 3-5 ตัวอย่างกุ้ง A1, A6 และ A9 ตามลำดับ

แถบที่ 6-7 ตัวอย่างกุ้ง E1 และ E9 ตามลำดับ



รูปที่ 25 แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 787 (ปริมาณดีเอ็นเอ 50 ng, ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60°C และ ตรวจสอบบน 1.8% agarose gel electrophoresis)

แถบที่ 1 100 bp DNA ladder

แถบที่ 2 ตัวอย่างกุ้ง D1 (*P. monodon)*

แถบที่ 3-5 ตัวอย่างกุ้ง A1, A6 และ A9 ตามลำดับ

แถบที่ 6-7 ตัวอย่างกุ้ง E1 และ E9 ตามลำดับ

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ได้นำตัวอย่างกุ้งจากทะเลฝั่งอ่าวไทย คือ จังหวัดสงขลา, สุราษฎร์ธานี และฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่จังหวัดสตูล และภูเก็ต แบ่งตัวอย่างเป็นกลุ่ม ตามระยะเวลาที่เก็บ คือ กลุ่ม A–E นำตัวอย่างกุ้งทุกตัวมาตรวจสอบรูปสัณฐานเบื้องต้นเพื่อแยกชนิดว่าเป็น กุ้งหัวแข็ง (*Metapenaeus sp.*) หรือกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) หรือกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis , P. indicus*) พบว่าตัวอย่างกุ้ง A1-A4 เป็นกุ้งหัวแข็ง, A5-A14 เป็นกุ้งแชบ๊วย, กลุ่ม B เป็นกุ้งแชบ๊วย, กลุ่ม C เป็นกุ้งแชบ๊วย, กลุ่ม D เป็นกุ้งกุลาดำ และ E1-E15 เป็นกุ้งแชบ๊วย ในที่นี้ให้ความสนใจเฉพาะกุ้งแชบ๊วยจึงได้สำรวจกุ้งแชบ๊วยทางสัณฐานวิทยา ตามลักษณะดังตารางที่ 4 แยกได้ว่า A5–A14 มีลักษณะตรงตามอนุกรมวิธานว่าเป็น *P. indicus* ส่วนตัวอย่างกุ้งในกลุ่ม E ในครั้งแรกผู้วิจัยคาดว่า ตัวอย่างทั้ง 30 ตัวอย่างเป็น *P. merguiensis* แต่เมื่อตรวจสอบอย่างละเอียดกลับพบว่า มีอยู่เพียง 6 ตัวอย่าง คือ E1–E3, E6, E8 และ E10 ที่เป็น *P. merguiensis* ส่วน E4, E5 และ E9 เป็น *P. indicus* และตัวอย่างที่เหลือ คือ E7, E11, E12, E14 และ E15 เป็นตัวอย่างที่ระบุชนิดได้ยาก เนื่องจากมีลักษณะไม่ตรงตามอนุกรมวิธาน เพราะมีลักษณะของ *P. merguiensis* และ *P. indicus* ปนกันอยู่โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกิดความสับสนในการตรวจสอบลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ถึงแม้ว่าได้ทำการสำรวจเพิ่มเติมจากตัวอย่างกุ้งกลุ่มอื่นๆอีกดังกล่าวข้างต้นก็ไม่สามารถระบุชนิดกุ้งได้ชัดเจน เกิดความสับสนในการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามในที่สุดได้เลือกกุ้ง A5-A14 และ E1-E15 สำหรับทำการทดลองเพื่อการหา marker ทั้งนี้เนื่องจากได้มีการทดลองของ เกษรา แซ่ตัน (2540) และปรางพิไล ลิ้มเจริญ (2540) ซึ่งทำการศึกษาโดยการตรวจสอบแบบแผนไอโซไซม์มาช่วยยืนยันการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วย ผลการทดลองสรุปได้ดังตารางที่ 5 คือ จากแบบแผนไอโซไซม์ทำให้แยกชนิดตัวอย่างกุ้งได้ 2 กลุ่ม คือ A5–A14 เป็น *P. indicus* และ E1-E15 เป็น *P. merguiensis* แม้ผลการตรวจสอบไอโซไซม์จะพบความขัดแย้งในการแยกชนิดกับการดูจากรูปสัณฐาน เช่น E4, E5 และ E9 มีรูปสัณฐานของ *P. indicus* แต่กลับมีแบบแผนไอโซไซม์ของ *P. merguiensis* ก็ตาม กลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มก็จัดเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ดีที่ใช้ในการศึกษาหา DNA marker ที่เหมาะสมได้ด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplificaction Polymorphic DNA) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์สายสั้นๆ ขนาด 10 เบส ถูกออกแบบมาอย่างไม่จำเพาะ สามารถนำไปใช้ทำ PCR กับตัวอย่างดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆได้อย่างไม่จำกัด แต่ทั้งนี้ต้องเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมและต้องปรับปรุงสภาวะการทำ PCR ให้เหมาะสมด้วยจึงจะทำให้ได้แบบ

แผนดีเอ็นเอที่ดี เพื่อการแปลผลได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำหน้าที่สำรวจไพรเมอร์ชนิดต่างๆ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 120 ชุดร่วมกับปิยนันท์ ดวงทอง และปิยนันท์ ดวงทอง (2542) เป็นผู้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ในที่สุดสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 5 ชุดได้แก่ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 ไพรเมอร์เหล่านี้ถูกนำไปใช้กับดีเอ็นเอตัวอย่างกุ้ง 2 กลุ่มดังกล่าวข้างต้นแล้วนำแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม molecular analyst ของ BIO-RAD แสดงผลเป็น dendrograms จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้แบบแผน RAPD เพื่อแยกกลุ่มของตัวอย่างกุ้งได้และมีความเชื่อมั่นว่าตัวอย่างกุ้งกลุ่ม A คือ *P. indicus* และ กลุ่ม E คือ *P. merguiensis* แต่เนื่องจากเทคนิค RAPD มีข้อจำกัดค่อนข้างมาก เป็นเทคนิคที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยการทำ PCR ในแต่ละครั้ง รวมทั้งยังขึ้นอยู่กับฝีมือคนทำการทดลอง ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าจำเพาะกับชนิดของกุ้ง (species specific DNA) แล้วโคลนและหาการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้นๆเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับการทำ PCR ต่อไป

โดยคัดเลือกแถบดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอในการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ 4 ชุดคือ OPC 06, UBC 114, UBC 701 และ UBC 787 กับตัวอย่างกุ้งทั้ง 2 กลุ่ม คือ A5-A14 และ E1-E15 แล้วนำไปหาลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ เพื่อเป็นไพรเมอร์ในการทำ PCR เพื่อแยกชนิดของตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากการทดลองพบว่า

1. ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ OPC 06 ที่อยู่ระหว่าง 450-600 bp แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่าง กล่าวคือบางตัวอย่างจะปรากฏเพียงแถบเดียว บางตัวอย่างมีมากกว่า 2 แถบในบริเวณนี้ และบางตัวอย่างมีถึง 4 แถบ แถบที่เห็นว่าอยู่ตรงกันของแต่ละตัวอย่างนั้นไม่ได้หมายความว่าแถบดีเอ็นเอนั้นจะต้องมีลำดับเบสที่เหมือนกัน (homology กัน) (รูปที่ 21) หรือเกิดการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจาก locus เดียวกันและในทางตรงข้ามก็อาจเป็นไปได้ว่าแถบที่ไม่ได้อยู่ตรงตำแหน่งเดียวกันอาจจะมีลำดับเบสบางส่วนที่เหมือนกันได้ และนอกจากนี้ในการตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis แล้วปรากฏแถบเดียวหนาทึบนั้น เมื่อตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย 5% polyacrylamide gel electrophoresis จะปรากฏแถบดีเอ็นเอนั้นหลายขนาดที่ใกล้เคียงกันด้วยเหตุดังกล่าวจึงได้โคลนแถบดีเอ็นเอขนาด 450-600 bp ได้ทั้งหมด 4 โคลนที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ S4, S3, 06/1 และ 06/2 เมื่อนำดีเอ็นเอเหล่านี้ไปหาลำดับเบสจะได้ขนาดที่แน่นอนคือ 555, 535, 521 และ 493 bp ตามลำดับ (S4 และ S3 ไม่ได้นำมาศึกษาในที่นี้) จากนั้นได้นำลำดับเบสของโคลน 06/1 และ 06/2 มาเปรียบเทียบกันพบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกันถึง 93% โดย 06/2 มีขนาดสั้นกว่าและส่วนที่หายไปคือที่ปลาย 3' เมื่อนำลำดับเบสไปแปรรหัสเป็นกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank พบว่าโคลน 06/2 มีลำดับกรดอะมิโนใน frame แรกคล้ายคลึงกับ Bkm-like protein ของ *Drosophila melanogaster* (55% homology) (Bkm: Banded krait

minor satellite) จากการสำรวจบริเวณเบสที่หายไปในโคลน 06/2 เมื่อเทียบกับโคลน 06/1 ซึ่งพบลำดับเบสที่เป็น stop codon อยู่ ในขณะที่โคลน 06/2 ไม่มี stop codon จึงได้ coding region ที่ยาว ซึ่งในความเป็นจริงจะมีโปรตีนที่สังเคราะห์จาก 06/2 นี้จริงหรือไม่จะต้องทำการทดลองเพื่อสำรวจต่อไป นำลำดับเบสที่ได้ไปใช้ออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ คือ Forward primer TGC GTA AAT AAT CAT CAG และ Reverse primer ACT CTC TCC GAC TCT และเรียกชื่อว่า specific primer 06 (sp 06) หลังจากนั้นนำไพรเมอร์คู่นี้ไปทำ PCR กับตัวอย่างกุ้งกลุ่ม A และ E และตัวอย่างกุ้งกลุ่มอื่นๆ พบว่า ไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06 ให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างตัวอย่างกุ้งที่เป็น *P. merguiensis* และ *P. indicus* โดย *P. indicus* จะเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นเพียงแถบเดียวแต่แถบที่ได้ในแต่ละตัวอย่างกุ้งมีขนาดไม่เท่ากัน ตามลักษณะแถบชนิดที่ 1 และ 2 (รูปที่ 26) เช่น แถบเดี่ยวของตัวอย่าง A12 จะมีขนาดเล็กกว่า A13 ส่วนตัวอย่างกุ้งที่เป็น *P. merguiensis* ซึ่งมีรูปสัณฐานชัดเจน จะเกิดแถบดีเอ็นเอสองแถบขึ้นไป ตามลักษณะแถบชนิดที่ 3, 4 และ 5 (รูปที่ 26) โดยแถบที่เกิดขึ้นนี้จะอยู่ชิดกันมาก เช่นแถบคู่ที่เกิดกับตัวอย่างกุ้ง E5 และ E10 หรือแถบที่ได้อยู่ห่างกัน เช่น ตัวอย่างกุ้ง E2 และอาจเป็นไปได้ว่าแถบคู่ของบางตัวอย่างกุ้งที่เกิดขึ้น เช่น ในตัวอย่างกุ้ง E1, E3, E4, E6 และ E9 มีขนาดตรงกับแถบเดี่ยว ทั้งสองขนาดของ *P. indicus* ส่วนตัวอย่างกุ้งที่มีรูปสัณฐานไม่ชัดเจน มีลักษณะผสมกัน หรือแยกไม่ออกระหว่างกุ้งทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีการ amplify ของดีเอ็นเอแตกต่างกันไป เช่น เกิดแถบดีเอ็นเอบางๆเป็นแถบเดี่ยวบ้าง หรือบางตัวอย่างเกิดแถบบางๆเป็นแถบคู่ หรือบางตัวอย่างไม่เกิดการ amplify ตามลักษณะแถบชนิดที่ 6 และ 7 (รูปที่ 26) เช่น E13 (ไม่ได้แสดงผลในที่นี้) ซึ่งได้ทำการทดลองซ้ำหลายครั้งจนมั่นใจว่าไม่มีการ amplify เกิดขึ้นอย่างแน่นอน จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้ไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06 ในการระบุชนิดของกุ้งแชบ๊วยกล่าวคือ หากเป็น *P. indicus* จะเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นเพียงแถบเดียว และถ้าเป็น *P. merguiensis* จะเกิดแถบดีเอ็นเอสองแถบขึ้นไป โดยผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธีการอื่น

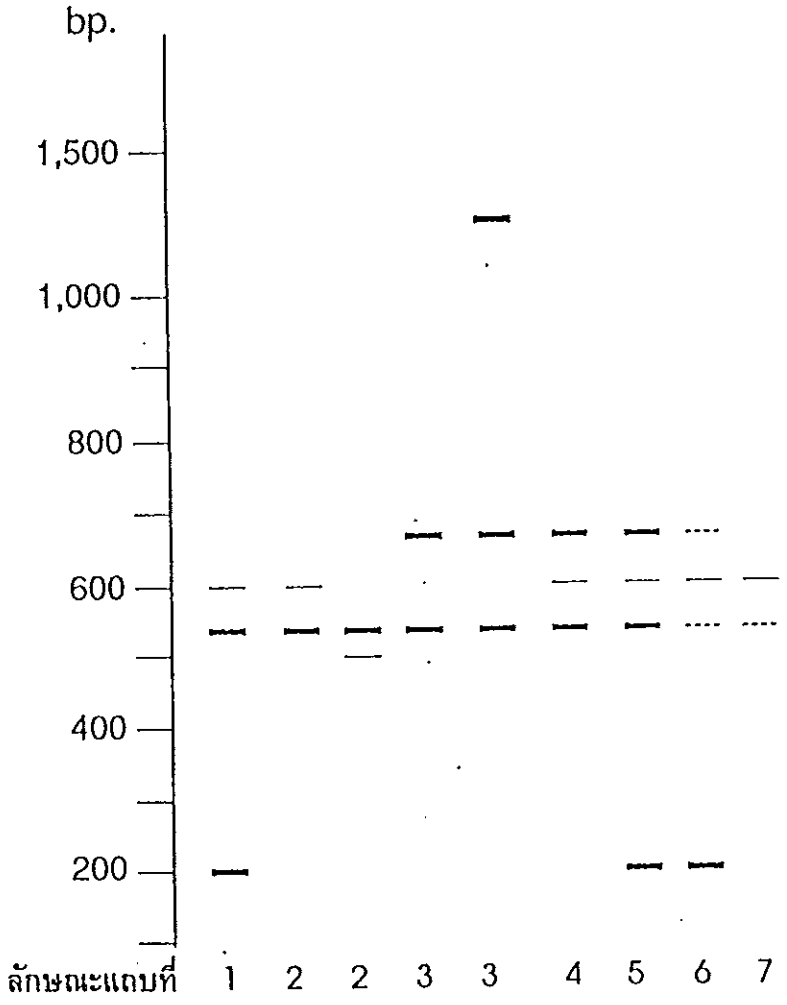
2. จากการสำรวจแบบแผนที่เกิดจากไพรเมอร์ UBC 114 ได้พบแถบที่ 900 bp ที่น่าสนใจจึงโคลนดีเอ็นเอขนาด 900 bp ปรากฏว่าเมื่อนำไปหาลำดับเบสที่แน่นอนพบว่าโคลนมีขนาดใหญ่มาก ทำให้ได้ลำดับเบสที่ไม่สมบูรณ์ คาดว่าต้องมีการทำ subcloning และหาลำดับเบสใหม่ จึงไม่ได้นำไปวิเคราะห์หาไพรเมอร์แบบจำเพาะในที่นี้

3. จากแบบแผนดีเอ็นเอของไพรเมอร์ UBC 701 ได้เลือกโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp และหาลำดับเบสที่แน่นอนได้ขนาด 212 bp นำไปวิเคราะห์และออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ จากนั้นนำไพรเมอร์แบบจำเพาะไปทำ PCR กับดีเอ็นเอตัวอย่างกุ้งต่างๆจะให้แถบดีเอ็นเอที่ 212 bp ในบางตัวอย่างและไม่ปรากฏแถบที่ 212 bp ในบางตัวอย่าง โดยพบว่าตัวอย่างที่คาดว่าเป็น *P. indicus* จำนวน 33 ตัวอย่าง พบว่าเกิดแถบที่ 212 bp จำนวน 28 ตัวอย่าง เช่น A6, A9, E6 และ E9 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ 212 bp ส่วน E1 และ E7

ไม่เกิดแถบที่ 212 bp แต่เนื่องจากการเกิดแถบและไม่เกิดแถบ 212 bp นี้ยังไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ในที่นี้ทำให้ยังไม่อาจสรุปว่าจะใช้การเกิดแถบที่ 212 bp เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการระบุชนิดของ *P. indicus* ด้วยได้หรือไม่ เพียงแต่ตั้งข้อสังเกตว่าตัวอย่างที่มีรูปสัณฐานชัดเจนว่าเป็น *P. indicus* เมื่อนำดีเอ็นเอมาทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 มักจะเกิดแถบดีเอ็นเอที่ 212 bp แต่ถ้าเป็น *P. merguiensis* จะไม่พบแถบนี้ อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีอื่น อาจเป็นตัวอย่างที่เป็น hybrid

4. จากแบบแผนดีเอ็นเอของไพรเมอร์ UBC 787 ได้เลือกโคลนดีเอ็นเอขนาด 600 และ 500 bp ได้เป็นโคลน 787/1 และ 787/2 ตามลำดับ มีขนาดที่แน่นอน 602 และ 473 bp ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์และออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ จากนั้นนำไปทำ PCR กับดีเอ็นเอตัวอย่างกุ้งต่างๆ ได้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 กล่าวคือตัวอย่างกุ้งที่คาดว่าเป็น *P. indicus* มักจะมีแถบที่ประมาณ 600 bp แต่ผลของการสำรวจทุกตัวอย่างยังได้ข้อสรุปที่ไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ซึ่งอาจอธิบายว่าเป็นตัวอย่างที่เป็น hybrid เช่นกัน

ถึงแม้ไม่สามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 และ 787 เป็นไพรเมอร์ที่สามารถระบุชนิดกุ้งแชบ๊วยได้ก็ตาม แต่สามารถนำมาใช้ในการศึกษารายละเอียดทางพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยทั้งสองชนิด โดยเห็นว่าสามารถแบ่งกุ้งออกเป็นสามพวกตาม genetic markers ทั้งสามแบบดังรูปที่ 26 สรุปแบบแผนการเกิดแถบซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ชนิด เป็นแถบที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะดังกล่าวคือลักษณะแถบ 1 และ 2 พบในตัวอย่างกุ้งที่เป็นกุ้งแชบ๊วย *P. indicus* และแบบที่ 3-5 พบในกุ้ง *P. merguiensis* ซึ่งพบว่าตัวอย่างกุ้งที่เป็นตามแบบที่ 1 และ 2 คือตัวอย่างกุ้ง A5-A14 (ยกเว้น A11) มีความเชื่อมั่นว่าเป็น *P. indicus* จะปรากฏดีเอ็นเอแถบเดี่ยว และตัวอย่างกุ้งกลุ่ม E เป็นตามแบบที่ 3-5 จะปรากฏดีเอ็นเอแถบคู่หรือมากกว่า มีความเชื่อมั่นว่าเป็น *P. merguiensis* โดยตัวอย่างกุ้งทั้งสองกลุ่มนี้ได้มาจากสถานที่ที่ต่างกันไป คือตัวอย่างกุ้งกลุ่ม A ได้มาจากฝั่งทะเลอันดามันและตัวอย่างกุ้งกลุ่ม E ได้มาจากฝั่งทะเลท่าวไทย ส่วนกุ้งที่ตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่ามีลักษณะผสมกันหรือแยกไม่ออกเป็นกุ้งชนิดใดจะมีลักษณะแถบแบบที่ 6 และ 7 ซึ่งอาจเกิดจากการผสมข้าม (hybrid) ของกุ้งทั้ง 2 ชนิด อย่างไรก็ตามผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าจะต้องมีการสำรวจตัวอย่างกุ้งจำนวนมากกว่านี้จากสถานที่ต่างๆและเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาก่อนที่จะสรุปการกระจายตัวของกุ้งทั้งสองชนิดในทะเลโดยรอบประเทศไทยได้ แต่เนื่องจากจำนวน marker ที่มีในงานนี้ไม่มากพอที่จะระบุว่ามีการผสมข้ามพันธุ์กันจริงหรือไม่ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้นอกจากการแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วยแล้วยังมีประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการหา DNA marker เพิ่มเติมหรือนำ DNA marker ที่มีอยู่แล้วไปใช้ในการสำรวจประชากรและการจัดการการผสมพันธุ์และเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดนี้



รูปที่ 26 แบบแผนการเกิดแถบซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วยทั้ง 2 ชนิด (เป็นแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ sp 06, 701 และ 787)

— แถบที่เกิดจากไพรเมอร์แบบจำเพาะ sp 06

— แถบที่เกิดจากไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 (ที่ 200 bp)

— แถบที่เกิดจากไพรเมอร์แบบจำเพาะ 787

---- แถบที่เกิดจากไพรเมอร์แบบจำเพาะ sp 06 (แถบบาง ๆ)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับแยกชนิดของกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis* และ *P. indicus* สามารถสรุปได้ว่า

1. จากการทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 120 ชุด สามารถเลือกไพรเมอร์ได้ 5 ชุด เพื่อนำมาวิเคราะห์หาชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปศึกษาการแยกชนิดกุ้งแชบ๊วย คือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 มีขนาดระหว่าง 450-500, 900, 400, 200 และ 500 กับ 600 bp ตามลำดับ

2. เมื่อโคลนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD นำไปหาลำดับเบสที่แน่นอนได้ดังนี้ ไพรเมอร์ OPC 06 ได้โคลนซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ทั้งหมด 4 ชนิดคือ S4, S3, 06/1 และ 06/2 (S4 และ S3 ไม่ได้นำมาศึกษาในที่นี้) โดย 06/1 และ 06/2 มีขนาด 521 และ 493 bp ตามลำดับ, ไพรเมอร์ UBC 701 ได้โคลนซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคือ 701 มีขนาด 212 bp และ UBC 787 ได้โคลนซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ 2 ชนิด คือ 787/1 และ 787/2 มีขนาด 602 และ 473 bp ตามลำดับ

3. คาดคะเนได้ว่าเมื่อนำลำดับของกรดอะมิโน ของโคลน 06/2 ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก GenBank ปรากฏว่าพบบริเวณที่เหมือนกับ Bkm-like protein ของ *Drosophila melanogaster*

4. ไพรเมอร์แบบจำเพาะ 06 (sp 06) ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างกุ้งที่ให้ผลตามแบบที่ 1 และ 2 เป็นกุ้ง *P. indicus* ส่วนตัวอย่างกุ้งที่ให้ผลตามแบบที่ 3-5 เป็นกุ้ง *P. merguiensis* ส่วนตัวอย่างกุ้งที่มีรูปสัณฐานไม่ชัดเจน มีลักษณะผสมกันหรือแยกไม่ออกระหว่างกุ้งทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะแถบแบบที่ 6 และ 7 ส่วนไพรเมอร์แบบจำเพาะ 701 และไพรเมอร์แบบจำเพาะ 787 ไม่สามารถชี้ได้ชัดเจนว่าตัวอย่างกุ้งเป็นกุ้งชนิดใด แต่ให้ข้อสังเกตว่าตัวอย่างที่ตรวจทางสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจนแล้วว่าเป็น *P. indicus* จะเกิดแถบดีเอ็นเอที่ 212

และ 600 bp ตามลำดับ และกุ้งที่ให้แถบแบบที่ 6 และ 7 คาดว่าเป็นกุ้งที่เกิดจากการผสมข้าม (hybrid)

จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าจะพบกุ้ง *P. indicus* ส่วนใหญ่ทางฝั่งทะเลอันดามัน และพบกุ้ง *P. merguiensis* ส่วนใหญ่ทางฝั่งทะเลอ่าวไทยหากสำรวจตัวอย่างกุ้งและเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ศึกษาจำนวนมากกว่านี้ และสามารถนำแนวทางการใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับแยกชนิดสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆได้

เอกสารอ้างอิง

เกษรา แซ่ตัน. 2540. *การเปรียบเทียบการแยกสายพันธุ์กุ้งแชบ๊วยโดยใช้ไอโซไซม์อิเล็กโทโฟ-รีซิสและโดยสัณฐานวิทยา*. โครงงานวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิรนาม. 2542. ภาวะการค้ากุ้งของไทย: กุ้งกุลาดำ. ว. *การประมง* 52 (5): 491-492.

บุญศรี จารุธรรมโสภณ. 2537. ชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis)* ในบริเวณอ่าวพังงา. ใน *รายงานการสัมมนาวิชาการ* ณ กรมประมง วัน เดือน ปี หน้า 586-592.

บุญศรี จารุธรรมโสภณ และ ธวัชชัย จันทะวงษ์. 2533. ชนิดของกุ้งสกุล *Penaeus* ที่สำรวจพบในอ่าวพังงา-อ่าวกระบี่ และฝั่งตะวันตกของภูเก็ต. ว. *การประมง* 43 (4): 281-286.

ประจวบ หลำอุบล. 2531. *กุ้ง*, 237 หน้า. กรุงเทพ: ฝ่ายการศึกษาสำนักส่งเสริมและฝึกอบรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรางพิไล ลิ้มเจริญ. 2540. *การแยกสายพันธุ์กุ้งแชบ๊วยโดยใช้ไอโซไซม์*. โครงงานวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปราณี ลี้ชนะชัย. 2539. Restriction Fragment Length Polymorphism. ใน วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย และ วาสนา ศิริรังษี (บรรณาธิการ), *วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน*, หน้า 17-1 – 17-15. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปิยนันท์ ดวงทอง. 2542. *ศักยภาพของการใช้แบบแผน RAPD สำหรับการศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วนัดดา คมเวช. 2532. สรุปงานวิจัยโรคกุ้ง. ใน *สรุปทบทวนผลงานวิชาการเรื่องกุ้ง* ณ สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งแห่งชาติ จังหวัดสงขลา.

วัลยา อุทัยสาง. 2537. *การเตรียมดีเอ็นเอติดตามเพื่อวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรง*. บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์.2539. การจัดห้องปฏิบัติการและวิธีลดปัญหาในงาน PCR: การใช้เทคนิค PCR และ in situ hybridization เพื่อการวินิจฉัยและงานวิจัย. *งานประชุมเชิงปฏิบัติการ* ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 25-26 เมษายน 2539.

ศิริเพ็ญ ศิริมนตรี. 2540. PCR Cloning. ใน *PCR Technology and Application*, หน้า 8-1 – 8-7. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศิริลักษณ์ พรสุขศิริ. 2537. แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์พื้นเมือง. *ว. เกษตร* 10 (2): 158-168.

สุมล สุวรรณนภาศรี และ รวิวรรณ ชยันต์ตระกูล. 2539. กุ้งไทยส่งออก...ฤาจะถึงจุดพลิกผัน. *เศรษฐทัศน์* 14 (3): 17-30.

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. 2540. RAPD Amplified Polymorphisms of DNA. ใน *PCR Technology and Application*, 6-1 – 6-3. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุรินทร์ มัจฉาชีพ. 2535. *สัตว์น้ำจากท้องทะเลไทย*, 152 หน้า. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แพร่วิทยา.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2541. บทบาทของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติในการพัฒนาและแก้ไขปัญหาอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. *ว. เทคโนโลยีชีวภาพ* 3 (12): 3-5

อุดส่าห์ จันทร์อำไพ และคณะ. 2532. *การศึกษาพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้งแชบ๊วย (Peneanus indicus)*. รายงานผลการวิจัยเสนอต่อ สวทช..

Alávar-Warren, A., Garcia, D.K., Faggart, M.A. and Rich, C. 1994. Evaluation of genetic diversity of *Penaeus vannamei* shrimp using molecular genetic technique. USMSFP 10th anniversary review, GCRL special publication (No.1).

Bielawski, J.P., Noack, k. and Pumo, D.E. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *J. Bio. Techniques.* 18: 856-860.

Brand, N.J., Vallins, W.J., Yacoub, M. and Barton, P.J.R. 1991. The polymerase chain reaction and its application to basic research in molecular biology. In J.m. Grange, A. Fox and N.J. Morgan (eds.). *Genetic manipulation: Techniques and applications*, pp. 279-293. England: Blackwell scientific publications.

Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1992. Primer template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotide. *J. Mol. Gen. Genet.* 235:157-165.

Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1992. DNA amplification fingerprinting with very short primers. *Proceeding of the symposium. Application of RAPD technology to plant breeding*, Minneapolis Minnesota, 1 November 1992, pp.18-25.

Chaitiamvong, S. and Supongpan, M. 1992. A Guide to penaeoid shrimp found in Thai waters. Asean-Australia marine science project: living coastal resources. Australian institute of marine science Townsville, Australia.

Elo, K., Ivanoff, S., Vuorinen, J.A. and Piironen, J. 1997. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* 152: 55-65.

Estoup, A., Largiader C.R., Perrot, E. and Chourrout D. 1996. Rapid one tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *J. Mol. Marine Bio. and Biotech.* 5 (4): 295-298.

Garcia, D.k. and Benzie, J.A.H. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture* 130: 137-144.

Garcia, D.k., Faggart M.A., Rhodes, L. and Warren, A.A. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molercular genetic techniques. *J. Mol. Marine Bio. and Biotech.* 3 (5): 270-280.

Garcia DeLeon, F.J., Chikhi, L. and Bonhomme, F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in nature population of European sea bass *Dicentrarchus labrax.* (Linnaeus, 1758). *J. Mol. Ecol.* 6: 51-62.

Graham, R.T. 1991. Polymerase chain reaction: Basic principles and automation. In M.J. McPheson, P. Quirke and G.R. Taylor (eds.), *PCR: A practical approach*, pp. 1-13. New York.: Oxford University Press.

Grey, D.L., Dall, W. and Baker, A. 1983. *A Guide to the Australian penaeid prawns.* Northen Territory Government Printing Office, Australia.

Halward, L., Stalker, T., LaRue, E. and Kochert, G. 1992. Use of single primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea L.*). *J. Mol. Bio.* 18: 315-325.

Havey, M. and Botha, F.C. 1996. Use of PCR-based methode methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties. *J. Euphytica* 89: 257-265.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.), *PCR protocols: A Guide to Methodes and Application*, pp. 3-12. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo and Toronto: Academic press inc.

Invitrogen. 1997. *A manual of methods for expression of recombination proteins in Pichia pastoris* (Version F). The Netherland.

Klinbunga, S., Prathumchai, B., Penman, D.J., McAndrew, B.J. and Menasveta, P. 1996. Development of a DNA probe based on PCR primed with M13 core sequences and its application for multilocus DNA fingerprinting in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *J. Aqua. Sci.* 3 (1): 21-35.

Lehmann, P.F., Lin, D. and Lasker, B.A.1992. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. of Clin. Microbiol* 30 (12): 3249-3254.

Lin, J.J., Kuo, J. and Ma, J. 1996. A PCR-base DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucl. acids res.* 24(18): 3649-3650.

Park, Y.K. and Kohel, R.J. 1994. Effect of concentration of $MgCl_2$ on random amplified DNA polymorphism. *J. Bio. Techniques* 16: 652-655.

Saiki, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. In M.A. Innis, D.H. Gelfand and J.J. Sninsky (eds.), *PCR protocols: A guide to methodes and application*, pp. 13-20. San Diego, California: Academic Press inc.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual* (2^{nd} ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D.L., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. acids res.* 23 (21): 4407-4414.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. acid res.* 18: 6531-6535.

Winter, P. and Kahl, G. 1995. Molecular markers technologies for plant improvement. *World J. of Micro. and Biotech.* 11: 438-448.

ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

2. การเตรียมบัฟเฟอร์ และสารอื่น ๆ

50X TAE buffer 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA, pH 8	100	มิลลิลิตร

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

50X TBE buffer ประกอบด้วย

Tris base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
0.5 M EDTA, pH 8	40	มิลลิลิตร

แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

1XTE buffer ประกอบด้วย

Tris–HCl, pH 8	0.010	โมลาร์
EDTA, pH 8	0.001	โมลาร์

Extraction buffer ประกอบด้วย

Tris–HCl, pH 8	0.05	โมลาร์
Sodium chloride	0.70	โมลาร์
EDTA, pH 8	0.02	โมลาร์
DTT	0.02	โมลาร์
SDS	0.50	เปอร์เซ็นต์

Loading dye ปริมาตร 10 ml ประกอบด้วย

Bromophenol blue	0.25	กรัม
Xylene cyanol	0.25	กรัม
Sucrose	50.00	กรัม
Tris–HCl, pH 8	1.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมยาปฏิชีวนะ Ampicillin (100 mg/ml)

ชั่ง Ampicillin 1 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml แบ่งเป็น aliquots (100-500 ml) เก็บที่อุณหภูมิ –20°C

3. การเตรียมเอนไซม์ต่าง ๆ

RNase A (10 mg/ml)

ชั่ง RNase A 100 mg ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งเป็น aliquots (100-500 ml) เก็บที่อุณหภูมิ –20 °C

Proteinase K (10 mg/ml)

ชั่ง Proteinase K 100 mg ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ml แบ่งเป็น aliquots (100-500 ml) เก็บที่อุณหภูมิ –20°C

4. Agarose Gel Electrophoresis

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ชุดเตรียม gel electrophoresis ได้แก่ chamber, ถาดเตรียมเจลพร้อมแผ่นหวี และ power supply
2. agarose gel
3. บัฟเฟอร์ 1X TAE buffer หรือ 1X TBE buffer
4. 10X loading buffer
5. DNA molecular weight markers
6. ethidium bromide

วิธีการทดลอง

1. ชั่งและละลาย agarose ใน 1XTAE buffer ตามต้องการ (%) ปล่อยให้เย็นประมาณ 50°C

2. เท agarose ที่ละลายไว้ลงใน ถาดเตรียมเจลและใส่แผ่นหวีลงไปเพื่อกำหนดช่องสำหรับ load ตัวอย่างที่ต้องการ ทิ้งให้เจลแข็งดี ประมาณ 30-45 นาที

3. นำแผ่นเจลที่ได้วางลงใน chamber ที่มีบัฟเฟอร์อยู่ท่วมเจล

4. load ตัวอย่างซึ่งผสมกับ 10Xloading buffer ดีแล้ว ลงในช่องที่กำหนดไว้ตามต้องการ

5. ต่อชุด gel electrophoresis เข้ากับ power supply ทำการ run gel ด้วยไฟฟ้า 80-100 โวลต์

6. นำเจลที่ได้ ย้อมในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml และล้างออกด้วยน้ำกลั่น

7. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอหรือแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้ UV illumination

5. ตารางแสดงความเข้มข้นของ Agarose gel (%w/v) กับ ความสามารถในการแยกดีเอ็นเอ (kb)

ความเข้มข้นของ Agarose gel (%w/v)	ความสามารถในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอ (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.8	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

6. การเตรียม 5% polyacrylamide gel electrophoresis

การเตรียม 5% polyacrylamide gel ปริมาตร 10 ml

30% Acrylamide	1.66	ml
10XTBE	1.00	ml
น้ำกลั่น	7.34	ml
10% APS	150	µl
TEMED	10	µl

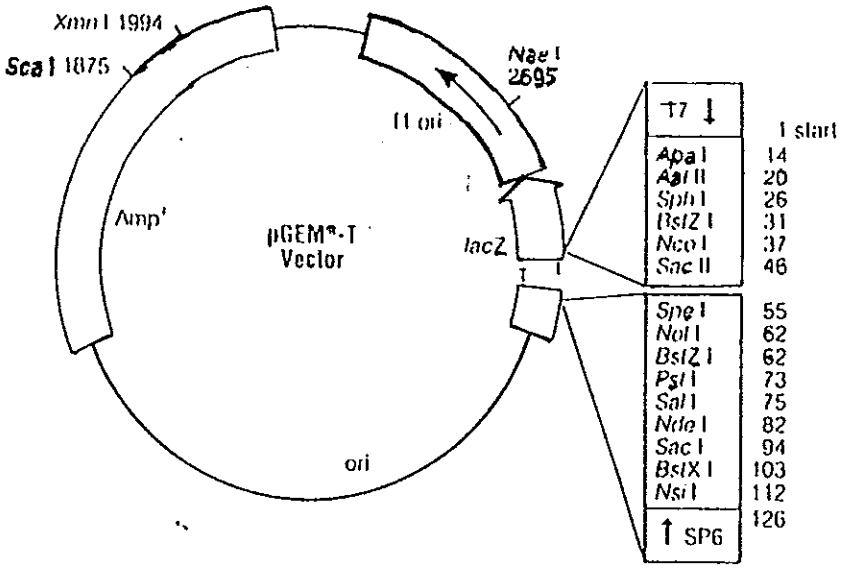
ภาคผนวก ข.

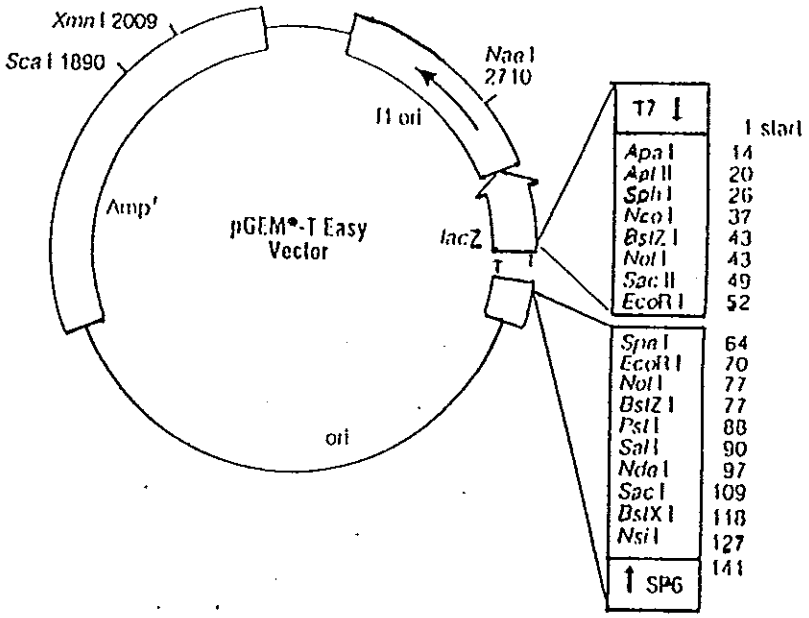
1. ดีเอ็นเอพาหะ (Vector) ที่ใช้ในการทดลอง pGEM®-T Vector และ pGEM®-T Easy Vector

pGEM®-T Easy Vector และ pGEM®-T Easy Vector เป็นดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการโคลน PCR product เวคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดได้มาจากการย่อย Promega's pGEM®-T Easy Vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RV และมีการเติม thymidine ที่ปลาย 3' ทั้งสองข้าง โดยการเติม thymidine ที่ปลาย 3' นั้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเชื่อมกันของ PCR product กับดีเอ็นเอพาหะ (พลาสมิด) นั่นก็คือจะป้องกันการเกิดการเชื่อมกลับของดีเอ็นเอพาหะ (recircularization) ส่วนเอนไซม์ thermostable polymerase จะเติม deoxyadenosine ที่ปลาย 3' ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวน

pGEM®-T Vector และ pGEM®-T Easy Vector มีลักษณะเป็น high copy number และมี โปรโมเตอร์ของ T7 และ SP6 RNA Polymerase ขนาบข้าง multiple cloning site (MCS) ภายใน α-peptide coding region ของเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่ง α-peptide coding region นี้ใช้ในการหา recombinant clones โดยวิธี color screening บน indicator plates และ multiple cloning site ของเวคเตอร์ ประกอบด้วยบริเวณจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จัดเตรียมไว้สำหรับ Promega's Erase-a-Base System โดย pGEM®-T Easy Vector มีบริเวณจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ multiple cloning site จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงตำแหน่งเดียว (single restriction enzyme) เพื่อจะนำเอาชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาและจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านั้นคือ *Eco*RI, *Bst*ZI และ *Not*I ส่วน pGEM®-T Vector มีบริเวณจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ cloning site ซึ่งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*ZI

2. รูปแสดงแผนที่ของ pGEM®-T Vector และ pGEM®-T Easy Vector





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวจันทน์ผา ตันธนา
วัน เดือน ปีเกิด	4 ธันวาคม 2513

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้	2536