เครื่องหมายระดับโมเลกุลในการจำแนกกุ้งสกุล *Penaeus*

Molecular Markers for Identification of *Penaeus* Species

จรรยา รังษีธรรม

Junya Rungsithum

Order Key 27569
BIB Key 174500

เลขหมู่ QH432 .R44 2542 ค.2
เลขทะเบียน
1 - 7 มิ.ย. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ เครื่องหมายระดับโมเลกุลในการจำแนกกุ้งสกุล *Penaeus*
ผู้เขียน นางสาวจรรยา รังษีธรรม
สาขาวิชา ชีวเคมี

คณะกรรมการที่ปรึกษา

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

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

คณะกรรมการสอบ

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

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

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวรพร เรืองเลิศปัญญากุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ เครื่องหมายระดับโมเลกุลในการจำแนกกุ้งสกุล *Penaeus*
ผู้เขียน นางสาวจรรยา รังษีธรรม
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาเครื่องหมายระดับโมเลกุลสองประเภทใหญ่ ๆ คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากนิวเคลียส และ เครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากนิวเคลียส ได้แก่ specific primer S4 ซึ่งเป็น primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นไมโครแซทเทิลไลท์ มีความจำเพาะกับกุ้งแชบ๊วยและใช้ระบุเอกลักษณ์เฉพาะของกุ้งแต่ละตัว ได้ศึกษายีนของไมโตคอนเดรียคือ 12S rRNA และ 16S rRNA โดยใช้ universal primers ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ใช้ถอดรหัสเป็น third domain ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) เมื่อย่อยผลผลิต PCR ของ 12S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I, *Bgl*II และ *Sau*3AI สามารถใช้แบบแผนดีเอ็นเอเพื่อแยกกุ้ง *Metapenaeus* sp., *P. monodon* และกุ้งแชบ๊วยออกจากกันได้ การแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ต้องใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 12S rDNA ที่แตกต่างกัน 6.9% ส่วนการย่อยผลผลิต PCR ของ 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I สามารถใช้แบบแผนดีเอ็นเอแยกชนิดของกุ้ง *Metapenaeus* sp., *P. monodon* และกุ้งแชบ๊วยได้ การแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ต้องใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ที่แตกต่างกัน 2.7%

Thesis Title	Molecular Markers for Identification of *Penaeus* Species
Author	Miss Junya Rungsithum
Major Program	Biochemistry
Academic Year	1999

Abstract

Genetic markers including nuclear DNA and mitochondrial DNA were studied. The nuclear DNA marker such as specific primer S4 was used to amplify microsatellite DNA. The primer was specific to DNA of Banana prawn and the loci were polymorphic among individual. Two mitochondrial genes, 12S rRNA and 16S rRNA were obtained by using two pairs of universal primers to amplify the third domain of ribosomal RNA. DNA patterns obtained from the restricted digestion of PCR products from 12S rDNA with *Alu*I, *Bgl*II and *Sau*3AI have shown evidence that the marker could identify the species of *Metapenaeus* sp., *P. monodon* and Banana prawn from one another. In order to differentiate *P. indicus* and *P. merguiensis* the sequences of 12S rDNA were compared, and 6.9% different. The restricted digestion patterns of PCR products from 16S rDNA with *Alu*I could also be used to identify *Metapenaeus* sp., *P. monodon* and Banana prawn. The sequence of 16S rDNA of *P. indicus* was 2.7% different from *P. merguiensis*.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จโดยสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีวเคมี และ ผศ.ดร.สุวรพร เรืองเลิศปัญญากุล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ชนะ คุณาธรรม ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ตรัง หัวหน้าฝ่ายวิเคราะห์อาหาร และน้อง ๆ อาหารเคมี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของศูนย์ฯ ทุกท่านที่กรุณาให้โอกาสและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและอบรมสั่งสอน ผู้เขียนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ให้กำลังใจและ มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จรรยา รังษีธรรม

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	21
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	22
วัสดุ	22
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
3 ผลการทดลอง	44
4 วิจารณ์ผลการทดลอง	70
5 สรุปผลการทดลอง	74
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียน	84

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primer S4	29
2.2	สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primer sS4	29
2.3	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primer 06/1	30
2.4	สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primer 06/1	31
2.5	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer mtD-35 และ mtD-36	39
2.6	สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer mtD-35 และ mtD-36	34
2.7	ปฏิกิริยาการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ	37
2.8	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ด้วย primer mtD-32 และ mtD-34	40
2.9	สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer mtD-32 และ mtD-34	41
2.10	ปฏิกิริยาการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD 32 และ mtD-34 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*	43
3.1	ตัวอย่างกุ้งที่นำมาศึกษา โดยแยกชนิดตามสัณฐานวิทยาและแบบแผนไอโซไซม์	49

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	*P. indicus* Milne Edwards	4
1.2	บริเวณที่พบกุ้ง *P. indicus* Milne Edwards	5
1.3	*P. merguiensis* de Man	6
1.4	บริเวณที่พบกุ้ง *P. merguiensis* de Man	6
1.5	*P. monodon* Fabricius	7
1.6	บริเวณที่พบกุ้ง *P. monodon* Fabricius	8
1.7	*Metapenaeus ensis* de Hann	9
1.8	บริเวณที่พบกุ้ง *Metapenaeus ensis* de Hann	9
1.9	ข้อมูลลำดับเบสของโคลน 787 จากการศึกษาของปิยนันท์ ดวงทอง (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) และจันทน์ผา ตันธนา ซึ่งได้ทำการศึกษาพันธุกรรมของกุ้งสองชนิดคือ *P. indicus* และ *P. merguiensis* ด้วยเทคนิค RAPD	14
1.10	แผนที่และทิศทางการถอดรหัสของยีนในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial gene) ของสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง	16
1.11	แผนที่และทิศทางการถอดรหัสของยีนในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial gene) ของแมลงหวี่, Drosophila จาก Simon และคณะ (1994)	17
3.1	แสดงแบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งด้วย specific primer S4 วิเคราะห์บน 8% polyacrylamide gel electrophoresis.	45
3.2	แสดงผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่าง โดยเทียบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย specific primer S4 ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst® software ของ Bio-Rad Laboratories	46

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.3	แบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยกลุ่ม A ที่เป็น *P. indicus* และ กลุ่ม E ที่เป็น *P. merguiensis* จากการใช้ specific primer 06/1 วิเคราะห์บน 8% polyacrylamide gel electrophoresis.	48
3.4	แสดงผลการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ของกุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* (A5) *P. merguiensis* (E1) และกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* (D2) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I, *Bgl*II, *Sau*3AI วิเคราะห์บน 8% polyacrylamide gel electrophoresis.	52
3.5	แสดงผลการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ของกุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* (A5) *P. merguiensis* (E1) และกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* (D2) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I, *Dra*I และ *Xho*I วิเคราะห์บน 8% polyacrylamide gel electrophoresis	53
3.6	แสดงผลการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II ย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ของ *Metapenaeus* sp. (A1 และ A2) *P. indicus* (A5 และ A6) *P. merguiensis* (E1 และ E2) และ *P. monodon* (D1 และ D2) วิเคราะห์บน 10% polyacrylamide gel electrophoresis	54
3.7	แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* , A5	55
3.8	แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* , A6	56
3.9	แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย, *P. merguiensis*, E1	56
3.10	แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย, *P. merguiensis*, E2	57
3.11	แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งกุลาดำ, *P. monodon*, D2	57

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.12	เปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* กุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* และ *P. merguiensis* จากการใช้ primer mtD–35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 12S rDNA	58
3.13	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกุ้ง *P. merguiensis* (E1 และ E2) *P. indicus* , (A5 และ A6) *P. monodon* (D2) โดยการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของ 12S rDNA ตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 410 (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)	59
3.14	เปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* กุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* และ *P. merguiensis* จากการใช้primer mtD-35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 12S rDNA กับ *P. vannamei* จากธนาคารยีน	60
3.15	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกุ้ง *P. merguiensis* (E1 และ E2) *P. indicus* , (A5 และ A6) *P. monodon* (D2) และ *P. vannamei* ด้วย 12S rDNA ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ homology กับ *P. vannamei* ตั้งแต่เบสที่ 76 ถึงเบสที่ 288 (โดยใช้โปรแกรม DNASIS)	61
3.16	แสดงผลการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I ย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 ของ *Metapenaeus* sp. (A1 และ A2) *P. indicus* (A5 และ A6), *P. merguiensis* (E1 และ E2) และ *P. monodon* (D1 และ D2) วิเคราะห์บน 10% polyacrylamide gel electrophoresis	62
3.17	แสดงลำดับเบสของยีน16S rDNA ของกุ้งแชบ๊วย, *P. indicus*, A6	63
3.18	แสดงลำดับเบสของยีน16S rDNA ของกุ้งกุลาดำ, *P. monodon*, D1	64
3.19	แสดงลำดับเบสของยีน16S rDNA ของกุ้งแชบ๊วย, *P. merguiensis*, E2	65

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.20	เปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งกุลาดำ,*P. monodon* (D1) กุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* (A6) และ *P. merguiensis* (E2) จากการใช้ primer mtD–32 และ mtD-34 ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 16S rDNA	66
3.21	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของกุ้ง *P. indicus* (A6), *P. merguiensis* (E2) และ *P. monodon* (D1) ด้วยการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของ 16S rDNA ตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 561 (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)	67
3.22	เปรียบเทียบลำดับเบสของของกุ้ง *P. monodon* (D1), *P. indicus* (A6) และ *P. merguiensis* (E2) จากการใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 16S rDNA กับ *P. monodon* (16S rDNA) จากธนาคารยีน	68
3.23	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของกุ้ง *P. indicus* , *P. merguiensis* และ *P. monodon* ด้วย 16S rDNA ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ homology กับ *P. notialis* ตั้งแต่เบสที่ 110 ถึงเบสที่ 510 (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)	71

ตัวย่อและสัญลักษณ์

µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
A	=	Adenosine
AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATP	=	Adenosine triphosphate
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate
bp	=	basepair
BSA	=	Bovine serum albumine
C	=	Cytosine
DIG	=	Digoxigenin
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleoside triphosphate
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylenediaminetetracetic acid
FAO	=	Food and Agriculture Organization
G	=	Guanine
kb	=	kilobase
NBT	=	Nitroblue tetrazolium
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pmole	=	picomole
RAPD	=	Random Amplify Polymorphic DNA

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

RNA	=	Ribonucleic acid
RNase A	=	Ribonuclease A
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
T	=	Thymidine
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

กุ้งเป็นสินค้าเกษตรที่สำคัญของประเทศเนื่องจากเป็นอาหารส่งออกที่ทำรายได้ให้ปีละมาก ๆ เช่น ในปี 2541 มีการส่งออกกุ้งแช่เย็น แช่แข็ง ตั้งแต่เดือนมกราคม-ตุลาคม เป็นมูลค่า 47,540.2 ล้านบาท กุ้งแปรรูปอื่น ๆ 412 ล้านบาท โดยกุ้งที่มีขนาดโตมีราคาสูงกว่ากุ้งที่มีขนาดเล็ก จากข้อมูลสถิติในวารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ฉบับเดือนมกราคม 2542 กุ้งขนาด 30 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาประมาณ 370 - 405 บาทต่อกิโลกรัม ส่วนกุ้งที่มีขนาด 40 ตัวต่อกิโลกรัม ราคาประมาณ 260 - 295 บาทต่อกิโลกรัม ด้วยผลตอบแทนที่มากมายเช่นนี้จึงทำให้มีการจับกุ้งจากธรรมชาติและทำการเพาะเลี้ยงมากขึ้น ในส่วนที่จับจากธรรมชาติก็จะทำให้เกิดการขาดแคลนทรัพยากรประเภทนี้ในอนาคต ซึ่งรวมไปถึงพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกนำมาใช้ผลิตลูกกุ้ง ในส่วนของการเพาะเลี้ยงก็พบการแพร่ระบาดของโรคและปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา ปัจจุบันนักวิชาการและเกษตรกรต่างช่วยกันระดมความคิดเพื่อหาแนวทางป้องกันและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น ซึ่งได้แก่การเร่งพัฒนาการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ขึ้นมาเองในบ่อเลี้ยงแทนการจับจากธรรมชาติ ตลอดจนหาแนวทางให้การเลี้ยงกุ้งแบบระบบหนาแน่นของกุ้งหลาย ๆ ชนิด จะได้เกิดการเพาะเลี้ยงแบบสลับกันไป เพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่ระบาดของโรค

Molecular marker หรือเครื่องหมายระดับโมเลกุล ได้แก่ส่วนของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ถูกนำมาใช้แสดงข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ได้หลายระดับ เช่น ใช้ในการจำแนก สายพันธุ์ สกุล ชนิด (molecular systematic) หรือระบุความเป็นปัจเจก (individual) หรือใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (phylogenetic analysis) ได้มีการใช้ molecular marker เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ พืชและสัตว์ เนื่องจากเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมที่ละเอียดชัดเจนและอธิบายข้อสงสัยต่าง ๆ ได้ดี แม้จะต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงแต่เป็นข้อมูลที่คุ้มค่า นอกเหนือไปจากใช้ในการศึกษา molecular systematic และ phylogenetic analysis ดังกล่าวข้างต้นแล้ว

molecular marker ยังมีประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การหายีนที่สัมพันธ์กับลักษณะเด่นบางอย่าง ซึ่งก็จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดี

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่ใช้ในการหา molecular marker สามารถทำได้หลายวิธี มีวิวัฒนาการเรื่อยมาตั้งแต่วิธีดั้งเดิมคือ RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมาก ปัจจุบันวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction) ได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ มากขึ้น อาทิ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA) และ PCR-RFLP เป็นต้น วิธีต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้การหา molecular marker ทำได้เร็วขึ้นโดยใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ๆ ซึ่งเหมาะสมกับงานที่ต้องทำการทดลองกับตัวอย่างครั้งละมาก ๆ

ด้วยประโยชน์ของการใช้ molecular marker ดังกล่าวข้างต้นประกอบกับการเล็งเห็นปัญหาที่ควรจะพัฒนาการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ของกุ้งชนิดอื่น ๆ นอกเหนือกุ้งกุลาดำ เพื่อให้เกิดการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ยั่งยืนในอนาคต งานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ศึกษาและพัฒนา molecular marker ของกุ้งแชบ๊วยขึ้นมา กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งธรรมชาติ แม้จะไม่มีการเพาะเลี้ยงด้วยระบบหนาแน่นอย่างแพร่หลาย แต่ด้วยราคาในตลาดโลกที่สูง (ราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำ) ทำให้มีการจับจากทะเลเป็นปริมาณมาก ก่อให้เกิดความกังวลว่าในอนาคตอันใกล้นี้จะไม่มีกุ้งชนิดนี้เหลืออีก โดยในที่นี้ได้ตรวจสอบการใช้งานของ specific marker S4, 06/1 และ 787/1 ศึกษาการเรียงลำดับเบสของ 12S rDNA และ 16S rDNA และวิเคราะห์ข้อมูลกับธนาคารยีน (Gene bank)

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 ชีววิทยาของกุ้ง

กุ้ง ตามพจนานุกรมราชบัณฑิตยสถาน หมายถึง สัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง ลำตัวยาว มีเปลือกหุ้มตัว และแบ่งเป็นปล้อง ๆ ก้านและตีนอยู่ที่ส่วนหัว ในทางอนุกรมวิธานกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) กุ้งแชบ๊วย 2 สายพันธุ์ *P. indicus* Milne Edward และ *P. merguiensis* de Man จัดอยู่ใน :-

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Natantia

Section Penaeidea

Family Penaeidea

sub-family Penaeidea

กุ้งทะเลที่พบในอ่าวไทยและบริเวณใกล้เคียงมีมากมายหลายชนิด แต่กุ้งที่มีขนาดโตและราคาดีมีไม่กี่ชนิด เช่น กุ้งกุลาดำ (*P. monodon* Fabricius) กุ้งแชบ๊วย 2 สายพันธุ์ คือ *P. indicus* Milne Edward และ *P. merguiensis* de Man จัดเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่และพบทั่วไปตามชายฝั่งทะเลของประเทศไทย ฟิลิปปินส์ อินเดีย สิงค์โปร์ ไต้หวัน อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น ส่วนในประเทศไทยจังหวัดที่พบกุ้งนี้มากเช่น จันทบุรี ตราด สุราษฎร์ธานี ระยอง ปัตตานี สงขลา และทางชายฝั่งทะเลอันดามัน เช่น สตูล ภูเก็ต ระนอง เป็นต้น (ประจวบ หลำอุบล, 2531)

1.2.1.1 **ชนิดของกุ้ง**

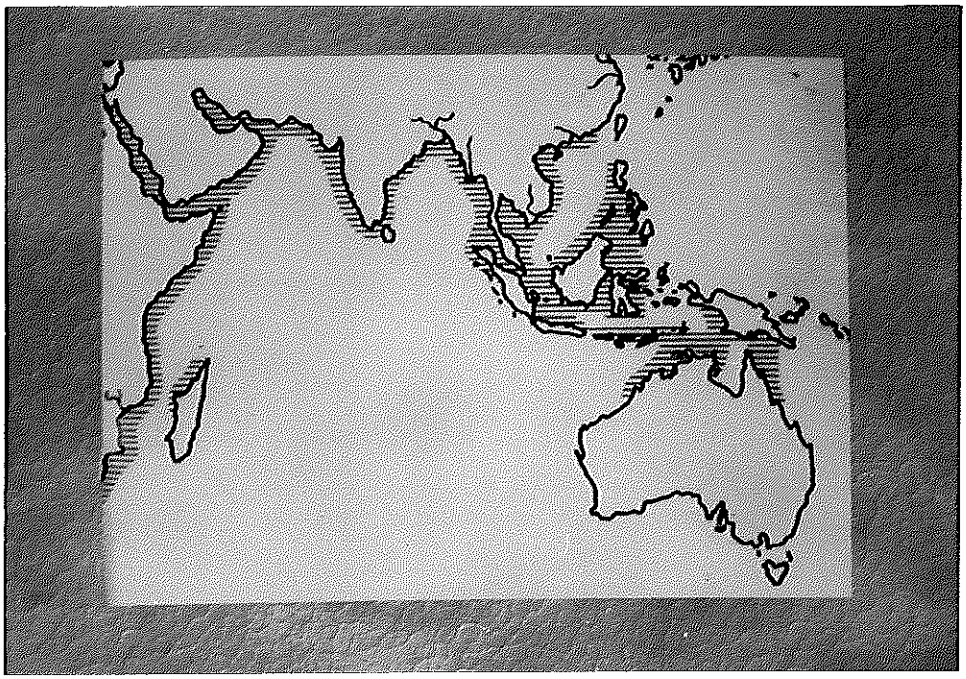
1.2.1.1.1 **กุ้งแชบ๊วย** (Banana prawn)

กุ้งแชบ๊วย ที่พบในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.2.1.1.1.1 *Penaeus indicus* Milne Edwards

เรียกกันทั่ว ๆ ไปว่า กุ้งแชบ๊วย กุ้งขาว กุ้งหางแดง มีชื่อสามัญ (Australia) ว่าBanana prawn มีชื่อทาง FAO ว่า Indian white prawn ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *P. indicus* Milne Edwards ลักษณะเปลือกบางมีสีนวล มีสันกรีต่ำ (low rostral crest) ไม่มีสันตับ (hepatic ridge) มีสัน gastro-orbital ชัดเจน ในเพศผู้ระยะตัวเต็มวัยปล้องสุดท้าย (dactylus) ของขาที่ใช้ในการเขี่ยอาหารคู่ที่ 3 (third maxilliped) จะมีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของปล้องถัดลงมา (propodus) อวัยวะเพศผู้แผ่นตรงกลางจะชี้ไปทางด้านหน้า แผ่นด้านข้างจะม้วนเข้าหากัน อวัยวะเพศเมียแผ่นบนเป็นแอ่งกว้าง แผ่นล่างมีรูปร่างกลม

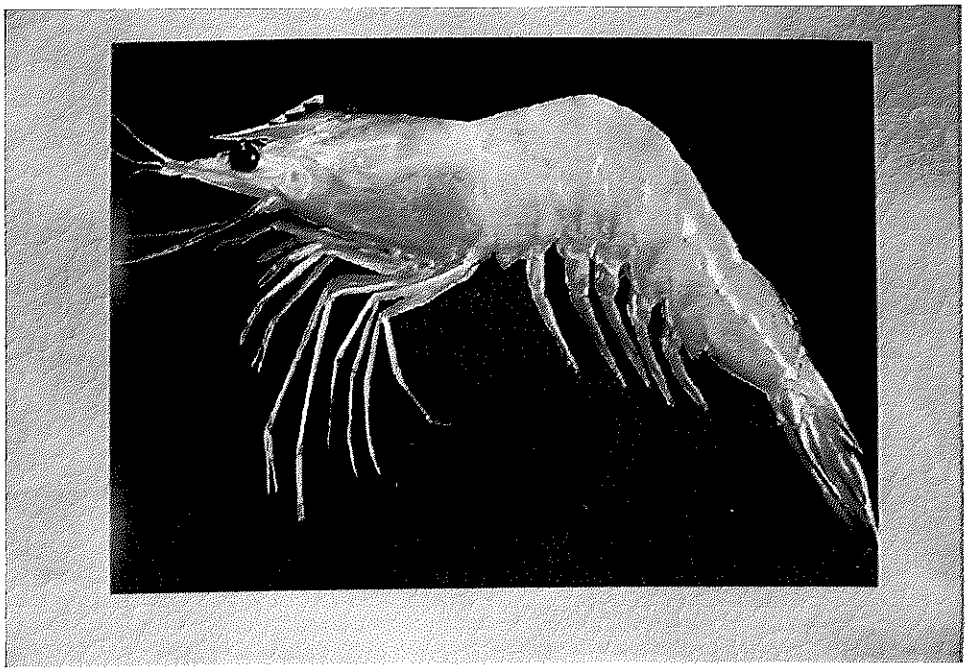
รูปที่ 1.1 กุ้งแชบ๊วย *Penaeus indicus* Milne Edwards
ที่มา : Grey และ คณะ (1983)



รูปที่ 1.2 บริเวณที่พบกุ้ง *Penaeus indicus* Milne Edwards.
ที่มา : Grey และ คณะ (1983)

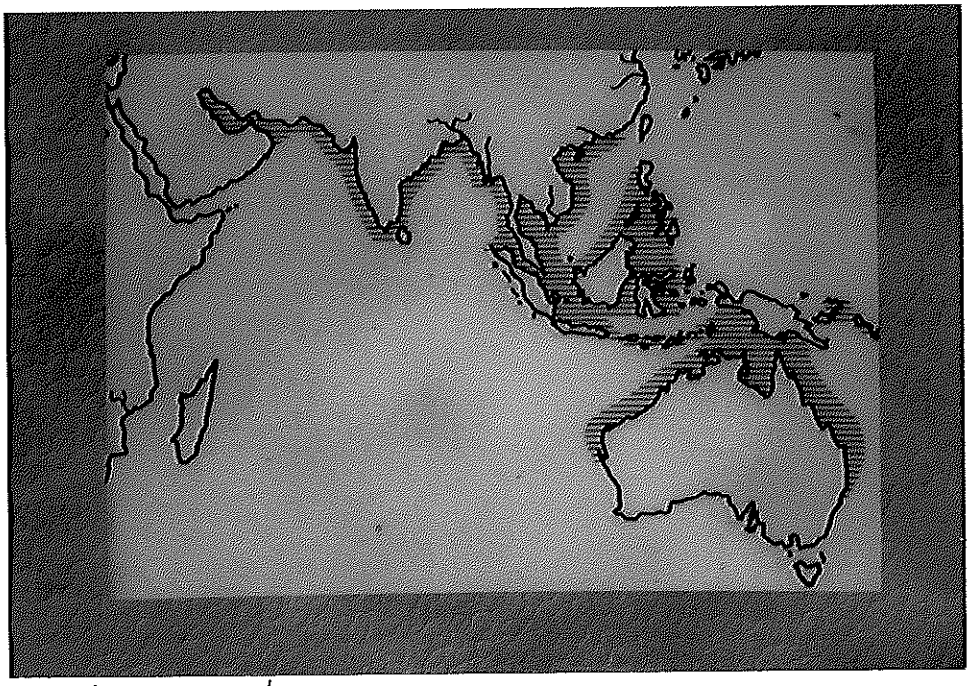
1.2.1.1.1.2 *Penaeus merguiensis* de Man

มีชื่อสามัญ (Australia และ FAO) ว่า Banana prawn ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *P. indicus* Milne Edwards เป็นกุ้งแชบ๊วยชนิดหนึ่งที่มีรูปร่างคล้ายกับชนิดแรกมาก ต่างกันตรงที่กุ้งชนิดนี้กรีมีลักษณะเป็นสันคมและสูง มีฟันกรีทั้งบนและล่าง ไม่มีสันตับ (hepatic ridge) ไม่มีสัน gastro-orbital หรือบางมาก อวัยวะเพศผู้ของกุ้งชนิดนี้คล้ายกับ *P. indicus* มากต่างกันตรงที่อวัยวะเพศเมียจะมีเนื้อนูนยื่นลงมาอยู่ใน seminal receptacle มากกว่า



รูปที่ 1.3 *Penaeus merguiensis* de Man

ที่มา : Grey และ คณะ (1983)

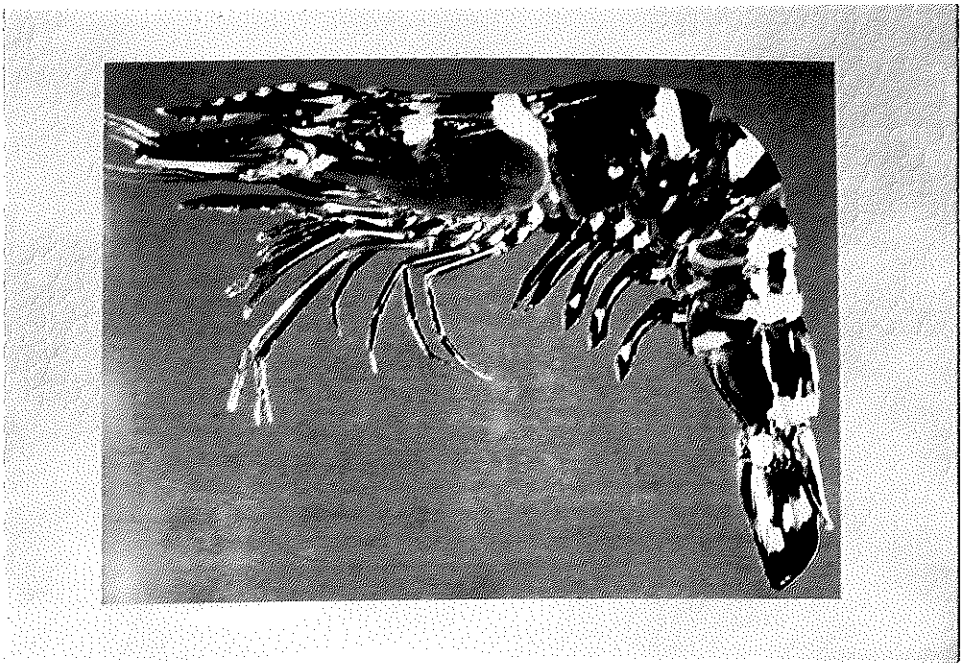


รูปที่ 1.4 บริเวณที่พบกุ้ง *Penaeus merguiensis* de Man

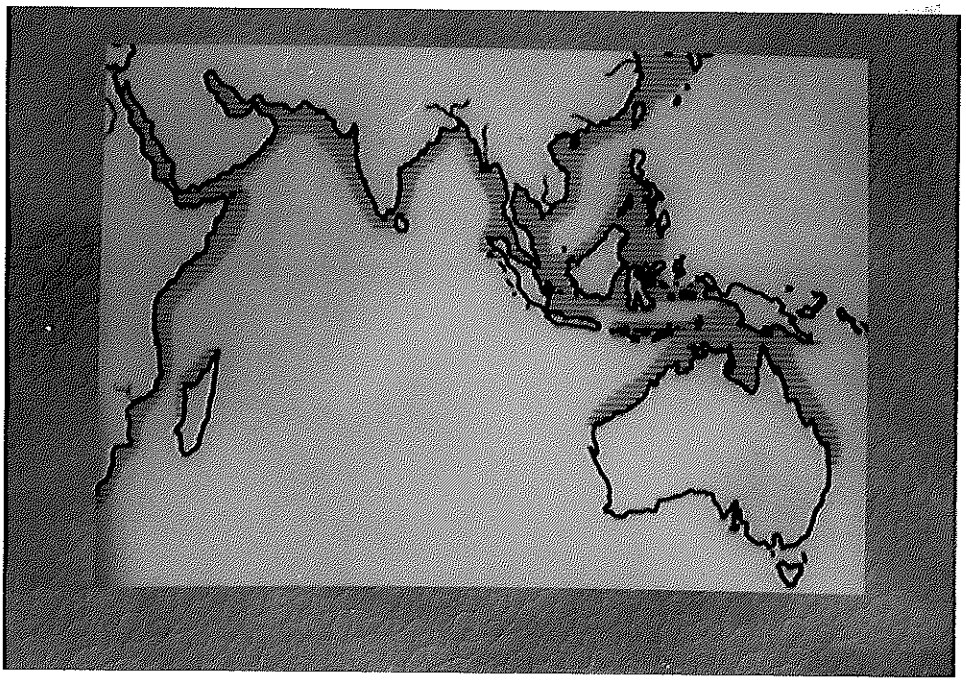
ที่มา : Grey และ คณะ (1983)

1.2.1.1.2 **กุ้งกุลาดำ** (*Penaeus monodon* Fabricius)

มีชื่อสามัญ (FAO) ว่า Giant tiger prawn ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *P. monodon* Fabricius เป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ ลักษณะเปลือกเกลี้ยงไม่มีขน มีกรียาว มีสันตับ (hepatic ridge) ยาว ลำตัวสีน้ำเงินแกมม่วง มีแถบดำพาดขวางลำตัวตามปล้องและปลายหาง โคนขาว่ายน้ำมีสีเหลืองพาดขวางเห็นได้ชัด อวัยวะเพศผู้แผ่นตรงกลางจะชี้ไปทางด้านหน้า แผ่นด้านข้างม้วนเข้าหากัน อวัยวะเพศเมียแผ่นบนจะมีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง แผ่นล่างเกือบเป็นวงกลม



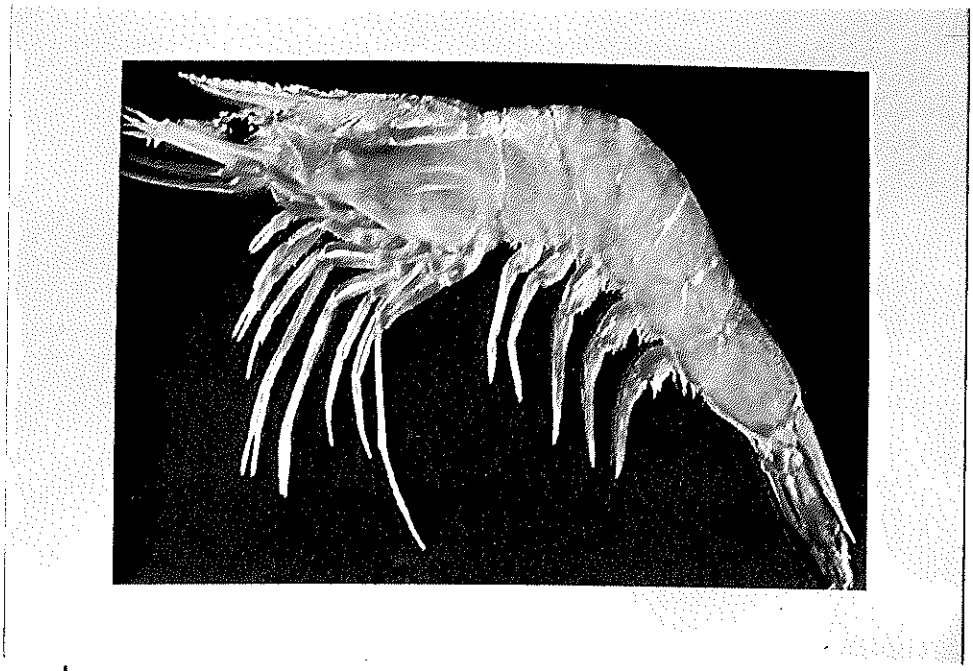
รูปที่ 1.5 *Penaeus monodon* Fabricius
ที่มา : Grey และ คณะ (1983)



รูปที่ 1.6 บริเวณที่พบกุ้ง *Penaeus monodon* Fabricius
ที่มา : Grey และ คณะ (1983)

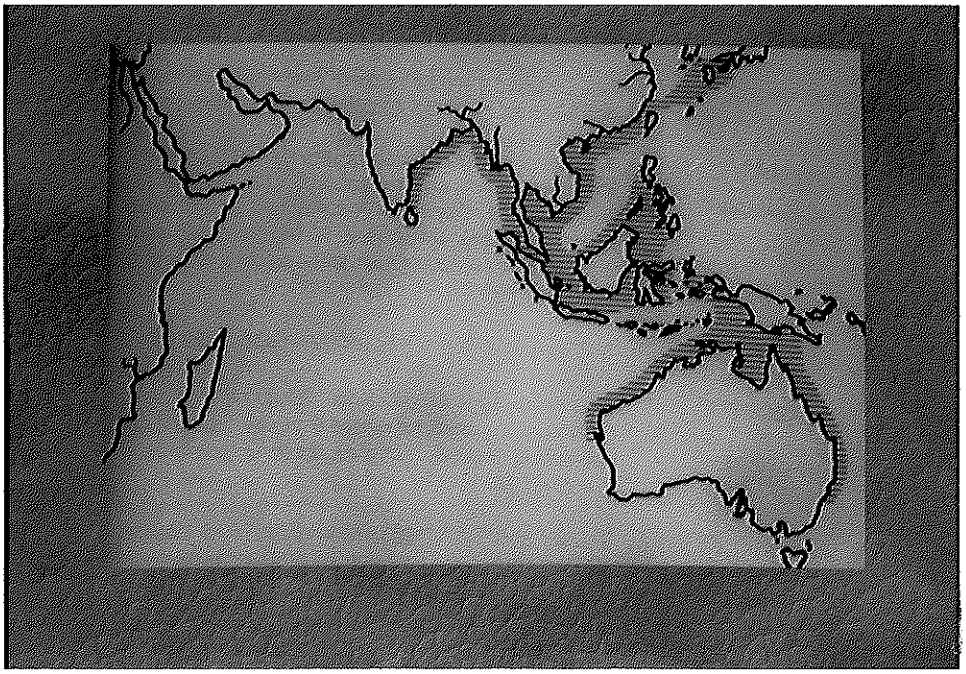
1.2.1.1.3 **กุ้งตะกาด** (*Metapenaeus ensis* de Hann)

มีชื่อสามัญ (FAO) ว่า Greasyback shrimp ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Metapenaeus ensis* de Hann ลักษณะฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างไม่มีสันกรียาวจรดขอบหลักของเปลือกหัว โคนขาคู่ที่ 1-3 มีหนามแหลม ลำตัวสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน มีจุดเล็ก ๆ สีน้ำเงินประตลอดตัว เปลือกแข็งกว่ากุ้งอื่น ๆ



รูปที่ 1.7 *Metapenaeus ensis* de Hann

ที่มา : Grey และ คณะ (1983)



รูปที่ 1.8 บริเวณที่พบกุ้ง *Metapenaeus ensis* de Hann

ที่มา : Grey และ คณะ (1983)

จะเห็นว่าการแบ่งชนิดกุ้งดังกล่าวข้างต้นมักใช้สัณฐานวิทยาเป็นหลัก แต่ในบางครั้งการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ เช่น ในการจำแนกชนิดของกุ้งแชบ๊วย คือ *P. indicus* และ *P. merguiensis* ทำได้ลำบาก เพราะกุ้งทั้งสองมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกุ้งอาจมีการผสมข้ามสายพันธุ์กัน หรือมีการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งแวดล้อมดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะหาวิธีอื่นเข้ามาเสริมเพื่อให้การแยกชนิดของสิ่งมีชีวิตเป็นไปโดยถูกต้อง ดังนั้นจึงมีความสนใจที่ใช้ตัวชี้วัดระดับโมเลกุล (natural marker) เพื่อที่จะจำแนกชนิดกุ้ง อีกทั้งในการใช้รูปร่างทางสัณฐานวิทยานั้นต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ ขณะเดียวกันกุ้งขณะวัยอ่อนนี้ยังไม่สามารถใช้การจำแนกโดยอาศัยรูปร่างทางสัณฐานวิทยา

ความหลากหลายทางชีวภาพหรือทางพันธุกรรม คือ พันธุ์ สายพันธุ์ หรือกลุ่มประชากรที่แตกต่างกันตามภูมิภาคพื้นที่ ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจเกิดจากปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวกับวิวัฒนาการ เช่น การอพยพย้ายถิ่น การถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติ ซึ่งส่งผลให้เกิดความหลากหลายของยีนในกลุ่มประชากรที่ต่างพื้นที่กัน (Cavalli-Sforza, 1998) ในการวิเคราะห์ตรวจสอบเพื่อแยกสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งให้ถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้นนั้นจำเป็นต้องมีเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) มาใช้ ซึ่งเครื่องหมายดังกล่าวมีหลายระดับ แบบดั้งเดิมและมีความสำคัญมาช้านาน คือตัววัดในระดับผลผลิตของยีน (เอนไซม์หรือโปรตีน) เช่น ใช้เทคนิค Protein electrophoresis โดยในปี 1960 นักพันธุศาสตร์ด้านนิเวศน์วิทยาชาวอังกฤษ นำเทคนิคโปรตีนอิเลกโตโฟลิซิสมาใช้ศึกษาความหลากหลายในกลุ่มประชากรของหอย ผีเสื้อ หรือพืช (Skibinski, 1994) ในปี 1974 ได้มีการนำเทคนิคนี้มาศึกษาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ในกลุ่มประชากรของหอย ผีเสื้อ หรือพืช อันอาจเนื่องมาจากการอพยพย้ายถิ่น (Skibinski, 1994 อ้างถึง Lewontin, 1994) ต่อมาในปี 1990 ได้ใช้ protein coding loci ศึกษาความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว (Skibinski, 1994 อ้างถึง Powers, 1994)

แต่ในขณะเดียวกันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยมีการศึกษาในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ในปี 1970 นักพันธุศาสตร์ได้พัฒนาเทคนิคดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) เพื่อต้องการทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเชื่อมต่อ

ระหว่างดีเอ็นเอที่สนใจเข้ากับดีเอ็นเอที่เป็นพาหะของแบคทีเรียหรือฟาจ แล้วนำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ จากนั้นจึงใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดเพื่อดูความหลากหลายของลำดับเบสในกลุ่มประชากรหอย 2 ฝา

ตั้งแต่ปี 1970 ที่นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นต้นมา ทำให้การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมเริ่มให้ความสำคัญกับการใช้ดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่น ในปี 1989 Sambrook และคณะ (อ้างโดย Skibinski, 1994) ได้ใช้เทคนิค RFLP ในการวิเคราะห์โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาแยกด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรลิซิสจากนั้นนำไปทำ hybridization แล้วตรวจสอบแถบที่เกิดขึ้น ในปี 1986 มีการศึกษาประชากรแมงดาทะเล (horseshoe crab) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อดูความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (Skibinski, 1994 อ้างถึง Saunder *et al.*, 1986) ต่อมาในปี 1990 Reeb และ Avise (อ้างโดย Skibinski, 1994) ได้ใช้ข้อมูลของแอลโลไซม์ร่วมกับดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมาวิเคราะห์หลากหลายของประชากรแมงดาทะเล ศึกษาดีเอ็นเอจากจีโนมของไมโตคอนเดรียโดยการโคลน ทำแผนที่การตัด (restriction mapping) และหาลำดับเบส

1.2.2 เครื่องหมายระดับยีนหรือดีเอ็นเอ

เป็นลำดับเบสหรือดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตซึ่งสิ่งมีชีวิตมีลำดับเบสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว เฉพาะสายพันธุ์ ชนิด สกุล และในระดับความสัมพันธ์ที่สูงขึ้นไป ดังนั้นในการตรวจสอบดีเอ็นเอเพื่อหาเอกลักษณ์ จึงมีหลายระดับขึ้นอยู่กับความต้องการที่จะศึกษานั้น ๆ เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีหลายแบบและวิธีการที่ใช้หาก็แตกต่างกันไป แต่ในที่นี้กล่าวเพียง 2 ประเภท คือ เครื่องหมายแบบไมโครแซทเทิลไลท์ (Microsatellite) และเครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) เป็นต้น

1.2.2.1 เครื่องหมายแบบไมโครแซทเทิลไลท์

ไมโครแซทเทิลไลท์ หรือ short tandem repeats คือดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบสสั้น ๆ 2-5 bp เรียงซ้ำกันหลายชุด โดยมีจำนวนชุดแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วย ลำดับเบสของ repeated units ก็มีลักษณะเฉพาะตัว เช่น Bagshaw และ Buckholt (1997) ได้ศึกษาในกุ้ง *P. vannamei* พบว่ามีลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ กัน หรือไมโครแซทเทิลไลท์ CCTAA จำนวน 12 ชุด ซึ่งกระจายอยู่ในจีโนมและเมื่อนำโคลนของ *P. vannamei* ที่ได้ไป hybridize กับกุ้ง *Penaeus* ชนิดอื่นพบว่าโคลนนี้ไม่สามารถ hybridize กับกุ้ง *Penaeus* ชนิดอื่นได้

ปัจจุบันนิยมศึกษาไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือระบุความเป็นปัจเจก (individuals) (Hearne *et al.*, 1992)

การศึกษาไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอก่อนอื่นต้องโคลนดีเอ็นเอที่เป็น repeated sequences ให้ได้ แล้วนำไปหาการเรียงลำดับเบส ลำดับเบสที่อยู่ที่ 5' และ 3' ของ repeated units เป็นเบสที่มีความจำเพาะ หากทราบก็จะทำให้สามารถนำมาออกแบบ primer สำหรับทำ PCR ได้ การโคลนไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอค่อนข้างจะทำได้ยาก เนื่องจากเรามักไม่ทราบว่าสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษาอยู่มี repeated units มีลำดับเบสและการกระจายตัวอยู่ในจีโนมเช่นไร จึงได้มีการพัฒนาวิธีการเรื่อยมาดังตัวอย่างต่อไปนี้

Ostrander และคณะ (1992) นำ Genomic DNA ตัดด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น *Sau*3AI, *Rsa*I, *Hae*III, *Eco*RV และ *Ssp*I จากนั้นทำสายดีเอ็นเอให้เป็นปลายทู่ (blunt end) ด้วยเอนไซม์ Klenow DNA polymerase I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK (+) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Sma*I นำดีเอ็นเอลูกผสมไป transform เข้า *E. coli* CJ236 เพื่อให้ผลิตเป็นดีเอ็นเอลูกผสม นำดีเอ็นเอไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (CA)n หรือ (TG)n เป็น primer จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะที่เหมาะสมและ transform เข้าเซลล์ *E. coli* XL1-Blue หรือ BSJ72 นำดีเอ็นเอลูกผสมไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็นไมโครแซทเทิลไลท์อีกครั้งโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ชุดเดิมเป็น primer สำหรับทำ PCR

ในปี 1996 Edward และคณะ ได้โคลนไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุลสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืช โดยการนำ Genomic DNA มาย่อยด้วยเอนไซม์ *Rsa*I แล้วนำไปเชื่อมด้วย *Mlu*I adaptor แล้วนำไป hybridize กับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ $(GA)_{15}$,$(GT)_{15}$,$(AT)_{15}$,$(GC)_{15}$,$(CAA)_{10}$,$(CATA)_{10}$, $(ATT)_{10}$, $(GATA)_{10}$,$(GCC)_{10}$ และ $(ATAG)_{10}$ ที่ตรึงอยู่บนเมมเบรน แล้วชะดีเอ็นเอที่ถูกจับออก จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบจาก *Mlu*I adaptor นำ PCR product ที่ได้ไปเชื่อมกับ pUC19 ที่ตัดด้วย *Bss*HI ก่อน transform เข้า *E. coli* DH10B™

Fischer และ Bachmann (1998) ประสบความสำเร็จในการโคลนไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอของพืชตระกูลหัวหอม (onion) หรือ shallot *Allium cepa L.* โดยใช้วิธีเดียวกับ Edward และคณะ

May และคณะ (1997) ได้ใช้จำนวนชุดของไมโครแซทเทิลไลท์ เช่น $(TTG)_9$, $(AAAT)_8$ ที่บริเวณ locus ต่าง ๆ มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในปลา sturgeon ที่อยู่ในทะเลสาบทางตอนเหนือของประเทศอเมริกา ได้แก่ สายพันธุ์ *Acipenser* และ *Scaphirhynchus* เนื่องมาจากปลาทั้งสองสายพันธุ์ถูกคุกคามและใกล้จะสูญพันธุ์

Fontaine และคณะ (1997) ได้ใช้เครื่องหมายแบบไมโครแซท-เทิลไลท์ในการศึกษาประชากรของปลา Salmon , *Salmo salar* ที่อยู่ในบริเวณต่าง ๆ ของมหาสมุทรแอตแลนติก 3 บริเวณ ได้แก่ North shore, Gaspe Peninsula และ Ungava ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบจากบริเวณที่มีลำดับเบสแบบแซทเทิลไลท์ เช่น บริเวณ locus MST 792 มี repeated unit $(GT)_{12}$ พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย และยังพบลักษณะที่มีการผสมกันในสายพันธุ์

นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ไมโครแซทเทิลไลท์ในการศึกษาแผนที่ยีนในมนุษย์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เรื่องโรคทางพันธุกรรม เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน โดยดูจากตำแหน่งที่ผิดปกติบนยีน (Hearne *et al.*, 1992)

จากการศึกษาของปิยนันท์ ดวงทอง (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) และจันทน์ผา ตันธนา ซึ่งได้ทำการศึกษาพันธุกรรมของกุ้งสองชนิด คือ *P. indicus* และ *P. merguiensis* ด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และได้โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่น่าสนใจ ทั้งสิ้นจำนวน 7 ชิ้น มีขนาดและลำดับเบสแตกต่างกัน ในจำนวนนี้

พบว่า S4 และ 787/1 มีลักษณะลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ กัน โดย S4 มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทิลไลท์ประกอบด้วยเบสจำนวน 3 เบส ที่ซ้ำกันเป็นจำนวนอย่างน้อย 15 ชุด ส่วนโคลน 787 พบว่าประกอบไปด้วยลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ กันที่มีขนาดความยาว (long repeat) 73 bp จำนวน 2 ชุด และภายในหน่วยซ้ำ (repeat) นี้ยังมีลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ อีก (direct repeat) ATGAAGCA ขนาด 8 bp อยู่ จำนวน 12 ชุด และยังพบเบสแบบไมโครแซทเทิลไลท์ $(CA)_3$ อยู่ 5 ชุด (ดังรูปที่ 1.9)

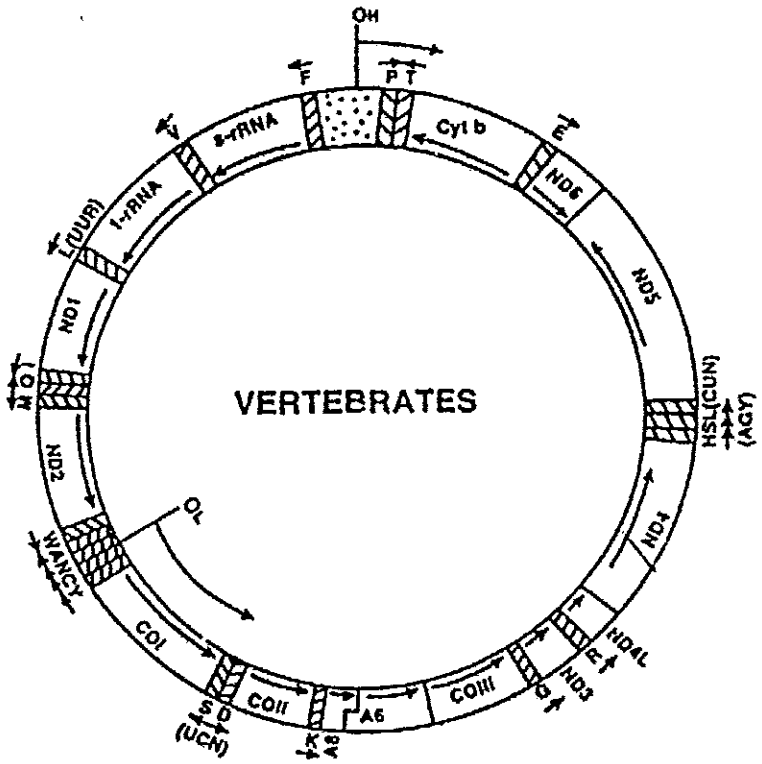
```
        10         20         30         40         50         60
CCCTTCTTCC AGAAAACACA TCAAATGCAT CAGTTCCTAA TAAGCAATAA TCATTCACAC
                  80         90        100        110
ACGAAGTAAT GAAGCATATC TATGAAGCAG CGATCATTCA CACACGTAGT AATGAAGCAT
       140        150        160        170        180
ATATATGAAG CAATGATTAT ACACACACAA AGTAATGAAG CATATATATG AAGCAATGAC
       190        200        210        220        230        240
TATACACACA CAAAGTAATG AAGCACATCT ATGAAGCAGC GATCATTCAC ACACGTAGTA
                  270        280        290        300
ATGAAGCATA TATATGAAGC AATGATTATA CCGCACACCG AAGTAATGAA GCATATCTAT
       310        320        330        340        350        360
GAAGCACAAA GACAAGGAAC ACTATCCACG ACCATTAAAA TTAACTAAGA AGAGAAATAA
       370        380        390        400        410        420
ACAGAAAGCA GTATAAACAC AACTTAGGTA TGAATCCTAC TACAACTGTA TTAAAGATGA
       430        440        450        460        470        480
GATGGTGGAC ATAAATATCC ATGACTGAAC CAGTTGTGGG TGGGATTATG AATGAAAAAT
       490        500        510        520        530        540
AAATGGACAA CGTACAATAC TGAAAACGTT TTAAGGGACG AGACAGAATA ACACGAAACA
       550        560        570        580        590        600
CATTCATCAT CAGAATTGTA AAATGAAAAA AAAGAAAAAA AAAAATACTG AGGAAAGAAG

G
```

รูปที่ 1.9 ข้อมูลลำดับเบสของโคลน 787 จากการศึกษาของปิยนันท์ ดวงทอง (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) และจันทน์ผา ตันธนา ซึ่งได้ทำการศึกษาพันธุกรรมของกุ้งสองชนิดคือ *P. indicus* และ *P. merguiensis* ด้วยเทคนิค RAPD

1.2.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย

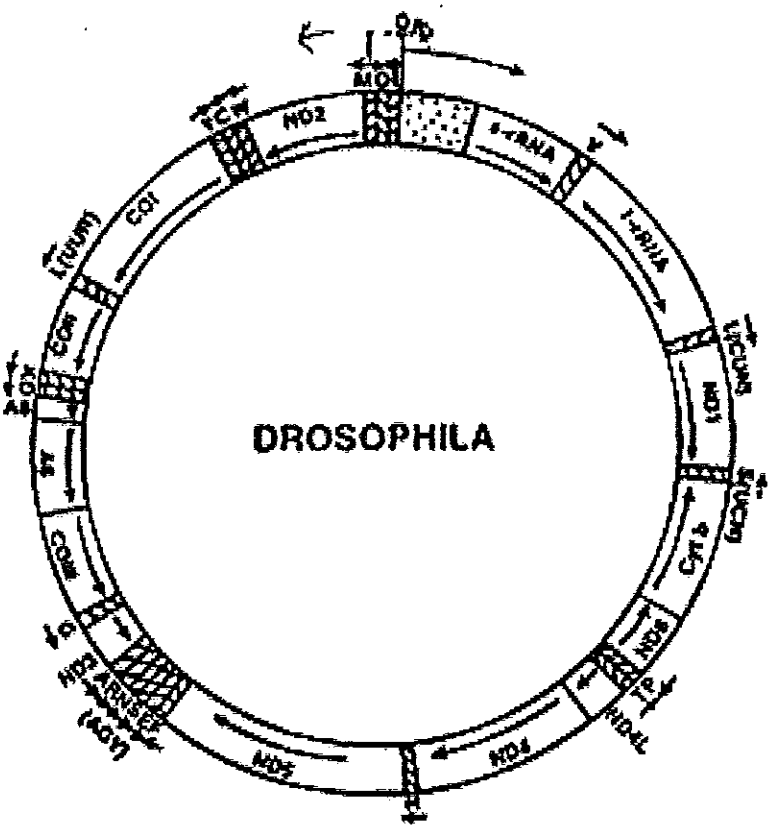
ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสทางพันธุกรรมโดยมีการเรียงตัวของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ นอกจากนั้น ยังพบในออแกแนล (organelle) อื่น เช่น ในไมโตคอนเดรียของสัตว์ ส่วนในพืชยังพบในไมโตคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ ส่วนใหญ่ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียและดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ มีรูปแบบของดีเอ็นเอเป็น single circular molecule และมีลำดับเบสที่มีเอกลักษณ์จำเพาะ มีบางกรณีที่ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย จะเป็น linear molecule ซึ่งมักพบในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ (lower eukaryote) ข้อได้เปรียบของการศึกษาดีเอ็นเอในออแกแนลเหนือการศึกษาดีเอ็นเอในนิวเคลียสคือปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยกว่าและจำนวน (copy number) ของไมโตคอนเดรียหรือคลอโรพลาสต์ ซึ่งมีมากในหนึ่งเซลล์ทำให้สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาการเรียงลำดับเบสดีเอ็นเอทั้งหมดได้ไม่ยาก จึงมีข้อมูลของยีนและการเรียงตัวของยีนอย่างครบถ้วน ปัจจุบันมีข้อมูลของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียและดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เป็นจำนวนมากบรรจุอยู่ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน

จีโนมของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial genome) ในสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) ประกอบด้วยยีนที่มีรหัสแปลเป็นโปรตีน (coding protein) 13 ยีน ยีนสำหรับรหัสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (coding for ribosomal RNA) 2 ยีน ได้แก่ small subunit ของ 12S และ large subunit ของ 16S ยีนสำหรับ transfer RNAs (tRNA) 22 ยีน และยีนสำหรับส่วนที่ไม่มีรหัสซึ่งเป็นตำแหน่งควบคุม (control region) 1 ยีน ยีนที่มีรหัสแปลเป็นโปรตีน ได้แก่ NADH dehydrogenase 7 subunit (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, และ 6) cytochrome b, cytochrome c oxidase 3 subunit (CO I, II, III) และ ATP synthetase 2 subunit (ATPase 6 และ 8) (Meyer, 1994) ดังรูปที่ 1.10 ส่วนในสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) มีส่วนประกอบของยีนต่าง ๆ คล้ายกันดังรูปที่ 1.11 ประกอบด้วยยีนที่มีรหัสแปลเป็นโปรตีน (coding protein) 13 ยีน ยีนสำหรับรหัสไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (coding for ribosomal RNA) 2 ยีน ได้แก่ small subunit ของ 12S และ large subunit ของ 16S ยีนสำหรับ transfer RNAs (tRNA) 22 ยีน (Simon *et al.*, 1994 อ้างถึง Clary และ Wolstenholmer, 1985)



รูปที่ 1.10 แผนที่และทิศทางการถอดรหัสของยีนในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial gene) ของสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง

ที่มา : Simon และคณะ (1994) (อ้างถึง Clary และ Wolstenholme, 1985)



รูปที่ 1.11 แผนที่และทิศทางการถอดรหัสของยีนในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial gene) ของแมลงหวี่, Drosophila

ที่มา : Simon และคณะ (1994) (อ้างถึง Clary และ Wolstenholme, 1985)

ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียเป็นดีเอ็นเอที่เบสมีอัตราการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วถูกถ่ายทอดจากแม่ไปยังลูก (maternally inheritance) และไม่มี recombination เกิดขึ้น หมายความว่าสามารถย้อนหาต้นกำเนิดทางสายแม่ได้ (Bouchon, 1994) ดังนั้นจึงพบว่าเหมาะที่จะนำดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมาใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่งมีวิวัฒนาการแยกออกจากกันเมื่อไม่นานมานี้ (Sankoff, 1992) และใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation rate) สูงกว่าเมื่อเทียบกับยีนในนิวเคลียส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในนิวเคลียสมีกลไกการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ (Krawczak and Schmidtke, 1994)

แต่เดิมการศึกษาดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย ค่อนข้างยุ่งยากโดยต้องเตรียมดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียให้บริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากนิวเคลียสและนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกครั้ง โดยเทคนิค RFLP (Tegelstrom, 1992) แต่ปัจจุบันมีข้อมูลการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดอยู่ในฐานข้อมูลค่อนข้างสมบูรณ์ ทำให้สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบแล้วเลือกลำดับเบสที่มีเอกลักษณ์จำเพาะ (conserved) มาใช้ออกแบบเป็น universal primers สำหรับทำ PCR ซึ่งวิธี PCR นั้นไม่จำเป็นต้องเตรียมดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียให้บริสุทธิ์ (Cheng, 1994) นอกจากนั้นปัจจุบันยังนิยมนำ 2 เทคนิคมาใช้ร่วมกันคือเทคนิค PCR และ RFLP โดยใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่สนใจเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สนใจปริมาณมาก จากนั้นจึงใช้เทคนิค RFLP คือตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปแยกขนาด โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (Hansen *et al.*, 1997) วิธีการดังกล่าวนี้ Kocher และคณะ (1989) (อ้างโดย Simon *et al.*, 1994) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสัตว์หลายชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกน้ำนม (mammals) สัตว์ปีก (birds) สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibians) ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการได้

ในการศึกษาจีโนมของไมโตคอนเดรียพบว่ายีนที่ที่มีการศึกษาแพร่หลาย ได้แก่ ยีนของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA gene) ทั้งนี้เนื่องจากยีนนี้มีบทบาทในการสังเคราะห์โปรตีน (Simon *et al.*,1994 อ้างถึง Brinacombe *et al.*, 1990, Noller *et al.*, 1990) จึงทำให้มีลำดับเบสและโครงสร้างที่ conserve อย่างไรก็ตามบางส่วน

ของยีนมีลำดับเบสที่หลากหลายและเหมาะที่จะนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ (Simon *et al.*, 1994 อ้างถึง Mindell และ Honeycutt, 1990, Hillis และ Dixon, 1991, Hambby และ Zimmer, 1992) ยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA gene) สร้างอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว จากนั้นจะม้วนพับและจับคู่กับตัวของมันเองเพื่อที่จะเปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้น ในไมโตคอนเดรียของสัตว์โครงสร้างทุติยภูมิของ rRNA นี้ ขดตัวกับโปรตีนเป็นรูป 3 มิติ พบว่าบริเวณนี้มีความเป็นเอกลักษณ์ (conserved) สูง (Simon *et al.*, 1994 อ้างถึง De Rijk *et al.*, 1993, Van de Peer *et al.*, 1993) สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เช่น *E. coli* (Simon *et al.*, 1994 อ้างถึง Brinacombe *et al.*, 1990, Noller *et al.*, 1990)

อัตราการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ มีค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ยีน 12S ทาง 5′ มีลำดับเบสที่เป็นเอกลักษณ์ (nucleotide conserve) น้อยกว่าทางด้าน 3′ (Simon *et al.*, 1994 อ้างถึง Clary และ Wolstenholme, 1985, De Rijk *et al.*, 1993, Van de Peer *et al.*, 1993) เช่นเดียวกันยีน 16S ทางด้าน 5′ มีลำดับเบสที่เป็นเอกลักษณ์ (nucleotide conserve) น้อยกว่าทางด้าน 3′ (Simon *et al.*,1994 อ้างถึง Uhlenbush *et al.*, 1987, Gutell *et al.*, 1992) ดังนั้นจึงพบว่ามักมีใช้การเรียงลำดับเบสที่ปลาย 3′ ของยีนไรโบโซมอลในการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต

ตัวอย่างการนำจีโนมของไมโตคอนเดรียมาใช้ศึกษาในสัตว์น้ำ ได้แก่ Machado และคณะ (1992) ได้ศึกษายีน 16S rRNA จากไมโตคอนเดรียของกุ้ง *P. notialis* และ *P. schmitti* ด้วยเทคนิค PCR โดยเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA และศึกษาลำดับเบสของยีนนี้ พบว่ากุ้งทั้งสองชนิดมีลำดับเบสแตกต่างกัน (divergence) 11 %

Bouchon, D และคณะ (1994) ได้ศึกษาดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียของกุ้ง *P. monodon* จาก 3 แหล่ง ได้แก่ มาเลเซีย ออสเตรเลีย และ ฟิจิ และยังศึกษาในกุ้ง *P. japonicus* ผลการศึกษาสรุปว่าดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียของกุ้ง penaied ทั้งสองมีขนาด 16,000 bp และสามารถแยกชนิดของกุ้ง *P. monodon* และ *P. japonicus* ได้โดยทำ PCR-RFLP ของ 12S rDNA และ 16S rDNA พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน 12S rRNA 8.7$\pm$3.7% ส่วนยีน 16S rRNA มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF [illegible] UNIVERSITY

13.9±3.4% และยังพบว่า *P. monodon* จากแหล่งฟิจิและออสเตรเลียมีความคล้ายคลึงกัน แต่ต่างจากมาเลเซีย

นอกจากนี้ Brzuzan และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาลักษณะของยีนในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial genotype) ของปลาน้ำจืด *Esox lucius* L. โดยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งใช้ primer ที่ออกแบบจากบริเวณที่ไม่มีรหัสของยีน (noncoding region) ของปลา *Salmo trutta* L. เพื่อทำการเพิ่มจำนวนส่วนที่ไม่มีรหัสยีนของไมโตคอนเดรียของปลา *E. lucius* L. จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิด ซึ่งพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ *Nco*I และ *Pst*I ได้รูปแบบที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์

1. ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งด้วย specific primer S4 และ 06/1
2. แยกชนิดกุ้งโดยใช้ยีน 12S rRNA และ 16S rRNA จากไมโตคอนเดรีย
3. ศึกษาการเรียงลำดับเบสของ 12S rDNA และ 16S rDNA

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid	Merck
Acrylamide	BDH
Ammonium acetate	Merck
Calcium chloride	Merck
Chloroform	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid	Merck
Glycerol	Sigma
Isoamyl alcohol	LABSCAN
Magnesium chloride	Merck
N,N′-methylene-bis-Acrylamide	Sigma
Phenol	Merck
Potassium acetate	Merck
Sodium chloride	Univar
Sodium citrate	CARLO ERBA
Sodium dodecyl sulfate	Riedel-deHaën
Sodium hydroxide	CARLO ERBA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma

2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
α-Dithiothreitol (α-DTT)	Sigma
Agarose	Merck
Ampicllin	Sigma
*Alu*I	Promega
Anti-DIG-AP	Boeheringer Mannhem
*Bgl*II	Bio Labs
Blocking reagent	Boeheringer Mannhem
Chelex® 100 Resin	BIO-RAD
*Cla*I	Bio Labs
*Dra*I	Bio Labs
*Eag*I	Bio Labs
Ethidium bromide	Sigma
Formamide	Amresco
*Hin*fI	Promega
Isopropanol	Sigma
N-Lauroylsarcosine	Sigma
Maleic acid	Sigma
NBT/BCIP	Boeheringer Mannhem
*Nco*I	Bio Labs
Proteinase K	Merck
*Pst*I	Bio Labs
Ribonuclease A	Merck
*Rsa*I	Promega

2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade) (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
*Sau*3AI	Bio Labs
T4 DNA ligase	Promega
Tetracycline	Sigma
*Xba*I	Bio Labs
*Xho*I	Bio Labs
100bp. ladder	Promega

2.1.2 ตัวอย่างกุ้ง

กุ้ง เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่ม A จากชายฝั่งทะเลตะวันตก จังหวัดสตูล

กลุ่ม D จากชายฝั่งทะเลตะวันตก จังหวัดภูเก็ต

กลุ่ม E จากชายฝั่งทะเลตะวันออก จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ล้างทำความสะอาด เก็บรักษาไว้ที่ –70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ (Total DNA)

2.1.3 แบคทีเรีย

E. coli (Top10F′) มีลักษณะ Genotype : F' [*pro*AB, *lac* I^q, *lacZ*ΔM15, Tn10(Tet^R) *mcr*A, Δ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80*lacZ*ΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rec*A1, *ara*Δ139, , Δ(*ara-leu*)7697,*gal*U, *gal*K, *rps*L(Str^R), *end* A1, *nup*Gλ^- ซื้อจากบริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

2.1.4 **ดีเอ็นเอพาหะ**

pGEM®-T (Promega)

2.1.5 **ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้น ๆ** (Oligonucleotide primer)

2.1.5.1 specific primer

ได้จากการทดลองของปิยนันท์ ดวงทอง และจันทน์ผา ตันธนา ได้แก่ specific primer S4 (S4F2 และ S4R1) และ specific primer 06/1 (06/1F และ 06/1R) สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Gibthai

2.1.5.2 mitochondrial primer

ซึ่งออกแบบจากลำดับเบสและโครงสร้างที่แน่นอน (conserved sequence) ของ 12S rDNA และ 16S rDNA สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Gibthai

- primer สำหรับศึกษา 12S rDNA ประกอบด้วย

mtD-35 5′-AAG AGC GAC GGG CGA TGT GT-3′

mtD-36 5′-AAA CTA GGA TTA GAT ACC CTA TTA T-3′

- primer สำหรับศึกษา 16S rDNA ประกอบด้วย

mtD-32 5′-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3′

mtD-34 5′-CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT-3′

2.2 อุปกรณ์

กล้องถ่ายรูป Polaroid (Fotoday)

เครื่อง UV light transilluminator (UVP)

เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Bio-RAD)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น Junior 2000 C (Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius)

เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (Advance)

เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis (ATTO)

เครื่องบันทึกแผนภาพดีเอ็นเอ รุ่น Gel Doc 1000 (BIO-RAD)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น Ultraspec III (Pharmacia)

เครื่องวัดพีเอช รุ่น 109 (Action)

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (Hybrid)

เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น Z 382K (TLG)

ตู้ Hybridization (Robbins Scientific Corperation)

ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus)

ตู้เย็นแช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (REVCO)

หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA-300 M II (Founday)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอ ด้วย specific primers S4 และ 06/1

2.3.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอของกุ้ง

2.3.1.1.1 การสกัดดีเอ็นเอของกุ้ง (Total DNA) (ดัดแปลงจากวิธี Bielawski *et al.*, 1995, Harvey และ Botha, 1996 และ Estoup *et al.*, 1996)

เนื้อเยื่อกุ้งซึ่งเก็บไว้ที่ –70 องศาเซลเซียส ปริมาณ 0.1 กรัม มาหั่นและสับด้วยมีดจนละเอียด แล้วใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีสารละลาย extraction buffer 600 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 50 mM Tris pH 8.0, 0.7 M NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS และ 5%chelex®100 , 1 mM DTT 15 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Proteinase K 15 ไมโครลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าไปมาเบา ๆ ทุก ๆ 15 นาที นำไปบ่มต่อที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ถึง 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเนื้อเยื่อละลายหมด นำไปปั่นที่ 10,000xg 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย isopropanol ที่แช่เย็นปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลายส่วนใส เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 10,000xg 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส 100-200 ไมโครลิตร เติม 1 ไมโครลิตรของสารละลาย RNaseA ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis วัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิคที่ได้โดยวิธี Spectrophotometer (Sambrook *et al.*, 1989) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.1.1.2 **การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิค** (Sambrook *et.al.*,1989)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสม (1:100) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ตามลำดับ คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยนำค่าการดูดกลืนแสง (OD_{260}) ที่ 260 nm ไปคูณกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า OD_{260}=1 หมายความว่ามีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และคุณภาพของกรดนิวคลีอิคคำนวณโดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm หารด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้งที่ทราบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3.1.2 **การตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย** specific primers S4 (Innis *et al.*, 1990 และตามวิธีของบริษัท Perkin Elmer)

สารละลายดีเอ็นเอของกุ้งกลุ่ม A กลุ่ม D และกลุ่ม E ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1.1 เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอสจนมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primer S4 (S4F2 และ S4R1) มีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.1 และสภาวะการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.2

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้างต้น นำมาวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอโดยใช้ 8%polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ Bio-Rad Laboratories

ตารางที่ 2.1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primers S4

สภาวะการทำปฏิกิริยา	ปริมาตร(µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	7.9	-
10x Buffer Ampli Taq Gold	2.0	1X
25 mM $MgCl_2$	2.4	3 mM
10 mM dNTP (2.5 mM each)	1.6	200 µM
Primer S4F2 (2 pmol/µl)	2.0	0.2 µM
Primer S4R1 (2 pmol/µl)	2.0	0.2 µM
เอนไซม์ Taq Polymerase, 5U/µl	0.1	0.025 U/µl
ดีเอ็นเอ (50 ng/µl)	2.0	5 ng/µl
ปริมาตรรวม	20.0	

ตารางที่ 2.2 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primers S4

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	95 °C	12 นาที	1 รอบ
2. Denature	94 °C	30 วินาที	
3. Annealing	55 °C	20 วินาที	35 รอบ
4. Extension	72 °C	1 นาที	
5. Final extension	72 °C	10 นาที	1 รอบ

2.3.1.3 การตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย specific primers 06/1 (Innis *et al.*, 1990 และตามวิธีของบริษัท Perkin Elmer)

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้งกลุ่ม A และกลุ่ม E ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอสจนมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากข้อ 2.3.1.2 ไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primers 06/1 มีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.3 และสภาวะการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.4

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้างต้น นำมาวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอโดยใช้ 8%polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Molecular Analyst® Software ของ Bio-Rad Laboratories

ตารางที่ 2.3 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primers 06/1

สภาวะการทำปฏิกิริยา	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	6.9	-
10x Buffer Ampli Taq Gold	2.0	1X
25 mM $MgCl_2$	2.4	3 mM
10 mM dNTP (2.5 mM each)	1.6	200 µM
Primer 06/1F (2 pmol/µl)	2.0	0.2 µM
Primer 06/1R (2 pmol/µl)	2.0	0.2 µM
เอนไซม์ Taq Polymerase ,5U/µl	0.1	0.025 U/µl
ดีเอ็นเอ (50 ng/µl)	3.0	7.5 ng/µl
ปริมาตรรวม	20.0	

ตารางที่ 2.4 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ specific primers 06/1

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	95 °C	12 นาที	1 รอบ
2. Denature	94 °C	5 วินาที	35 รอบ
3. Annealing	60 °C	20 วินาที	
4. Extension	72 °C	1 นาที	
5. Final extension	72 °C	5 นาที	1 รอบ

2.3.2 การตรวจสอบ genomic DNA ของกุ้งด้วยโคลน 787

2.3.2.1 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอตรวจจับโคลน 787

2.3.2.1.1 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Birnboim และ Doly , 1979) เขี่ยเชื้อพลาสมิดโคลน 787 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB (Luria Bertaini) 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 3,000xg นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ เติม 100 ไมโครลิตรของสารละลาย I (ประกอบด้วย 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0,10 mM EDTA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลาย II (ประกอบด้วย 0.2 N NaOH, 1%SDS) ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติม 150 ไมโครลิตรของสารละลาย III (ประกอบด้วย 5 M potassium acetate 60 มิลลิลิตร,glacial acetic acid 11.8 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 28.5 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน วางหลอดไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg นาน 15 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนใสที่ได้ซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอด microcentrifuge ใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70%ethanol ทำให้ตะกอนที่

ได้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ประกอบด้วย 10 mM Tris. และ 1 mM EDTA,pH 8.0) 100 ไมโครลิตร เติม 1 ไมโครลิตรของสารละลาย RNaseA ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis วัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิคที่ได้โดยใช้วิธี Spectrophotometer (Sambrook *et al.*, 1989) เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.2.1.2 **การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์** (Sambrook *et al.*, 1989)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้ (จากข้อ 2.3.2.1.1) ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยเติมสารละลาย phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอ แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 10,000xg นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใส เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด microcentrifuge ใหม่ เติมสารละลาย 3M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายส่วนใส ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70%ethanol ทำให้ตะกอนที่ได้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ประกอบด้วย 10 mM Tris และ 1 mM EDTA, pH 8.0) แล้วนำไปวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิคที่ได้โดยวิธี Spectrophotometer (Sambrook *et al.*, 1989) เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.2.1.3 **การติดฉลากดีเอ็นเอตรวจจับด้วย** DIG (digoxigenin) (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

ดูดสารละลายดีเอ็นเอของโคลน 787 (จากข้อ 2.3.2.1.2) ปริมาณ 3 ไมโครกรัม ใส่ลงในหลอด microcentrifuge นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นรีบวางลงบนน้ำแข็งทันที เติมสารละลาย hexanucleotide 2 ไมโครลิตร, dNTP labelling mixture (ประกอบด้วย 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP และ 0.35 mM DIG-dUTP,pH 7.5) 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Klenow polymerase (2unit/µl) 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส จนครบ 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงเบา ๆ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำมาหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M EDTA, pH 8.0 จำนวน 2 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 4 M $LiCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 75 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 14,000 rpm 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70%ethanol 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 14,000 rpm 5 นาที ทำตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ประกอบด้วย 10 mM Tris และ 1 mM EDTA,pH 8.0) 50 ไมโครลิตร

2.3.2.2 **การเตรียม** Genomic DNA (Bagshaw *et al.*, 1997)

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้ง เตรียมตามวิธีในข้อ 2.3.1.1 ปริมาณ 2 ไมโครกรัม ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Rsa*I, *Sau*3AI และ *Hin*fI โดยมีส่วนประกอบปฏิกิริยาดังตารางที่ 2.5 แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลาย 3M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายส่วนใสตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000xg นาน 10 นาที

ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70% ethanol ทำให้ตะกอนที่ได้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบปฏิกิริยาการย่อย Genomic DNA ของกุ้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I , *Sau*3AI และ *Hin*fI

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ชนิดเอนไซม์ตัดจำเพาะ		
	*Hin*fI	*Rsa*I	*Sau*3AI
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส (µl)	119.0	119.0	119.0
10Xbuffer(แต่ละเอนไซม์)(µl)	20.0	20.0	20.0
10XBSA (µl)	20.0	20.0	20.0
เอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 unit/µl (µl)	1.0	1.0	1.0
Genomic DNA 50 ng/µl (µl)	40.0	40.0	40.0
ปริมาตรรวม (µl)	200.0	200.0	200.0

2.3.2.3 การย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยเทคนิค Southern blots (Sambrook *et al.*, 1989)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.2 มาทำการวิเคราะห์บน 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น บันทึกแผนภาพดีเอ็นเอไว้ จากนั้นทำการย้ายดีเอ็นเอลงแผ่นไนลอนเมมเบรน โดยนำเจลมาแช่ในสารละลาย 0.2 N HCl 10 นาที ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย denaturation (ประกอบด้วย 1.5 M NaCl, 0.5M NaOH) นาน 15 นาที และแช่เจลในสารละลาย neutralization (ประกอบด้วย 3 M NaCl ,0.5 M Tris, pH 8.0) นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอย้ายลงบนแผ่นเมมเบรนตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (1989) โดยวางแผ่นเจลลงบนกระดาษ Whatman 3M ที่ชุ่มด้วยสารละลาย 20XSSC (ประกอบด้วย 6M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) เป็นสะพานเชื่อมไอออน จากนั้นวาง

แผ่นเมมเบรนลงแผ่นเจล แล้ววางแผ่นกระดาษ Whatman 3 M ซึ่งชุ่มด้วยสารละลาย 20XSSC วางกระดาษทิชชูลงบนกระดาษ Whatman 3M สูงประมาณ 3 เซนติเมตร ตามลำดับ วางของหนักทับบนกระดาษทิชชูอีกครั้ง ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนมาล้างเบา ๆ ด้วยสารละลาย 2XSSC นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.3.2.4 การทำ Hybridization (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

นำแผ่นไนลอนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่จากขั้นตอนที่ 2.3.2.3 ไปบ่มในสารละลาย prehybridization [ประกอบด้วย 5XSSC,1%(w/v) blocking reagent, 0.1%(w/v) N-lauroyl sarcosine และ 0.2%(w/v) SDS] ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบ่มในสารละลาย hybridization (มีส่วนผสมเช่นเดียวกับสารละลาย prehybridization และมีดีเอ็นเอตรวจจับโคลน 787 จากข้อ 2.3.2.1.3) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย Washing I [ประกอบด้วย 2XSSC, 0.1%(w/v) SDS] ที่อุณหภูมิห้อง 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ล้างด้วยสารละลาย washing II [ประกอบด้วย 0.1XSSC, 0.1%(w/v)SDS] ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที จากนั้นปล่อยให้แผ่นเมมเบรนแห้งที่อุณหภูมิห้องและนำไปตรวจสอบผลการ hybridize ในขั้นตอนต่อไป

2.3.2.5 การตรวจสอบผลของการ hybridize ด้วย antibody ต่อ DIG (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim)

นำแผ่นไนลอนเมมเบรนจากขั้นตอนที่ 2.3.2.4 มาล้างในสารละลาย washing buffer [ประกอบด้วย 0.1 M maleic acid buffer, 3%(v/v)Tween® 20] นาน 1-5 นาที บ่มในสารละลาย blocking [ประกอบด้วย 1%(w/v) blocking reagent ใน 0.1 M Maleic acid buffer] 30 มิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นนำเมมเบรนมาบ่มในสารละลายแอนติบอดี้ (anti-DIG-AP conjugate 1:1000 ใน

สารละลาย blocking) 10 มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างในสารละลาย washing buffer [ประกอบด้วย 0.1 M maleic acid buffer, 3%(v/v) Tween®20] 100 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย detection buffer (ประกอบด้วย 0.1 M Tris,pH 9.5 , 0.1 M NaCl และ 50 mM $MgCl_2$) 20 มิลลิลิตร 2 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลาย color substrate (เตรียมใหม่ ๆ โดยผสมสารละลาย 10XNBT/BCIP 200 ไมโครลิตร ในสารละลาย detection buffer 10 มิลลิลิตร) วางไว้ในที่มืด เมื่อปรากฏแถบสีม่วงของดีเอ็นเอนำไปหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ประกอบด้วย 10 mM Tris และ 1 mM EDTA, pH 8.0)

2.3.3 การใช้จีโนมของไมโตคอนเดรียเพื่อศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง

2.3.3.1 ยีนของ 12S rRNA

2.3.3.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 12S rDNA ด้วยวิธี PCR (Innis *et al.*, 1990)

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้ง A5, A6, D2, E1 และ E2 (เตรียมตามวิธีข้อ 2.3.1.1.1) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากนิวคลีเอสจนมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 มีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.6 และสภาวะการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.7

นำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์บน 1%agarose gel electrophoresis จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ microcentrifuge filter (sigma) เพื่อที่นำไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T เพื่อที่ศึกษาลำดับเบสที่อยู่ภายในยีนต่อไป

ตารางที่ 2.6 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer mtD-35 และ mtD-36

สภาวะการทำปฏิกิริยา	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	14.6	-
10x Buffer QIAGEN	2.5	1X
25 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP (2.5 mM each)	2.0	200 µM
Primer mtD 35 (5 pmol/µl)	1.0	0.2 µM
Primer mtD 36 (5 pmol/µl)	1.0	0.2 µM
เอนไซม์ Taq Polymerase ,5U/µl	0.4	0.08 U/µl
ดีเอ็นเอ (50 ng/µl)	2.0	4 ng/µl
ปริมาตรรวม	25.0	

ตารางที่ 2.7 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer mtD-35 และ mtD-36

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	95 °C	4 นาที	1 รอบ
2. Denature	94 °C	30 วินาที	
3. Annealing	50 °C	30 วินาที	→ 35 รอบ
4. Extension	72 °C	1 นาที	
5. Final extension	72 °C	10 นาที	1 รอบ

2.3.3.1.2 การเชื่อมชิ้นยีนจากผลผลิต PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T (ตามวิธีของบริษัท Promega)

นำผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ จากขั้นตอน 2.3.3.1.1 7 ไมโครลิตร ไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T 1 ไมโครลิตร แล้วเติม 1 ไมโครลิตรของสารละลาย 10xbuffer เติม 1 ไมโครลิตรของเอนไซม์ T4 DNA ligase และน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส จนครบ 10 มิลลิลิตร (ซึ่งทุกขั้นตอนทำที่ 4 องศาเซลเซียส) จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

2.3.3.1.3 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (competent cell) จาก *E. coli* Top 10 F′ (ดัดแปลงจากวิธี Hanahax, 1983)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* Top10 F′ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) ที่มี tetracyclin 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลว 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งความขุ่นที่วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ค่า 0.5-0.6 ถ่ายเชื้อลงหลอดปั่นแล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนมาละลายด้วย 10 มิลลิลิตรของ 0.1 M $CaCl_2$ (ที่เย็นจัด) ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ใน 15%glycerol (ที่เย็นจัด) 4 มิลลิลิตร แบ่งลงในหลอด microcentrifuge หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บเซลล์เจ้าบ้านไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3.3.1.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ และตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม (Sambrook *et al.*,1989)

นำเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ที่เตรียมไว้ (จากข้อ 2.3.3.1.3) ซึ่งเก็บไว้ที่ –70 องศาเซลเซียส วางบนน้ำแข็ง และนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.3.3.1.2 มา 5 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอด microcentrifuge ที่มีเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบา ๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที รีบนำหลอดมาแช่น้ำแข็ง 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB จำนวน 800 ไมโครลิตร ลงในหลอดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าไปมาเบา ๆ ให้เข้ากัน ดูดเชื้อแบคทีเรียมา 200 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง เมื่อได้แบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 - 18 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัด พลาสมิดลูกผสม โดยวิธีของ Birnboim และ Doly (1979) (ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.3.2.1.1) นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* และ *NcoI* เพื่อตรวจสอบหาชิ้นยีนโดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสภายในยีน

2.3.3.1.5 การศึกษา 12S rDNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Hansen, 1997)

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้ง A1, A2, A5, A6, D1, D2, E1 และ E2 ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากนิวคลีเอสจนมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ตามวิธีการข้อ 2.3.3.1.1

จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ โดยมีส่วนประกอบปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.8 แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอบน 8%polyacrylamide gel electrophoresis.

ตารางที่ 2.8 ปฏิกิริยาการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ชนิดของเอนไซม์					
	*Alu*I	*Bgl*II	*Cla*I	*Dra*I	*Sau*3AI	*Xho*I
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส (µl)	6.0	7.5	6.0	7.5	6.0	6.0
10Xbuffer(แต่ละเอนไซม์)(µl)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
10XBSA (µl)	1.5	-	1.5	-	1.5	1.5
เอนไซม์ตัดจำเพาะ 10 U/µl (µl)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ผลผลิตที่ได้จาก PCR (µl)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ปริมาตรรวม (µl)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0

2.3.3.2 **ยีน 16S rRNA**

2.3.3.2.1 **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ** 16S rDNA (Innis *et al.*, 1990)

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้ง A6, D1 และ E1 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer mtD-32 และ mtD–34 มีปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.9 และสภาวะการทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดังตารางที่ 2.10

นำผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์บน 1%agarose gel electrophoresis จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ microcentrifuge

filter (sigma) เพื่อที่นำไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T เพื่อที่ศึกษาลำดับเบสที่อยู่ภายในยีนต่อไป

ตารางที่ 2.9 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ด้วย primer mtD-32 และ mtD-34

สภาวะการทำปฏิกิริยา	ปริมาตร(µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	12.6	-
10x Buffer QIAGEN	2.5	1X
25 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP (2.5 mM each)	2.0	200 µM
Primer mtD-32 (2.5 pmole/µl)	2.0	0.2 µM
Primer mtD-34 (2.5 pmole/µl)	2.0	0.2 µM
เอนไซม์ Taq Polymerase ,5U/µl	0.4	0.08 U/µl
ดีเอ็นเอ (50 ng/µl)	2.0	4 ng/µl
ปริมาตรรวม	25.0	

ตารางที่ 2.10 สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer mtD-32 และ mtD-34

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
1. Hot start	95 °C	4 นาที	1 รอบ
2. Denature	94 °C	30 วินาที	
3. Annealing	50 °C	30 วินาที	35 รอบ
4. Extension	72 °C	1 นาที	
5. Final extension	72 °C	10 นาที	1 รอบ

2.3.3.2.2 การเชื่อมชิ้นยีนจากผลผลิต PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T (ตามวิธีของบริษัท Promega)

นำผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ จากขั้นตอน 2.3.3.2.1 7 ไมโครลิตร ไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T 1 ไมโครลิตร แล้วเติม 1 ไมโครลิตรของสารละลาย 10xbuffer เติม 1 ไมโครลิตรของเอนไซม์ T4 DNA ligase และน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส จนครบ 10 มิลลิลิตร (ซึ่งทุกขั้นตอนทำที่ 4 องศาเซลเซียส) จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

2.3.3.2.3 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ และตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม (Sambrook *et al.*, 1989)

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ (จากขั้นตอนที่ 2.3.3.2.2) 5 ไมโครลิตร เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ (ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.3.3.1.4) เมื่อได้แบคทีเรียที่เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง แล้วสกัดพลาสมิดลูกผสม โดยวิธีของ Birnboim และ Doly (1979) (ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้อ 2.3.2.1.1) นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* และ *NcoI* เพื่อตรวจสอบหาชิ้นยีนโดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสภายในยีน

2.3.3.2.4 การศึกษา 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (Hansen, 1997)

นำสารละลายดีเอ็นเอของกุ้ง A1, A2, A5, A6, D1, D2, E1 และ E2 ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากนิวคลีเอสจนมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ตามวิธีการข้อ 2.3.3.2.1

จากนั้นนำผลผลิต PCR ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* โดยมีส่วนประกอบปฏิกิริยาตามตารางที่ 2.11 แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอด้วย 10%polyacrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 2.11 ปฏิกิริยาการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I

ส่วนประกอบในปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	6.0
10Xbuffer *Alu*I	1.5
10XBSA	1.5
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I (10 unit/µl)	1.0
ผลผลิต PCR	5.0
ปริมาตรรวม	15.0

บทที่ 3

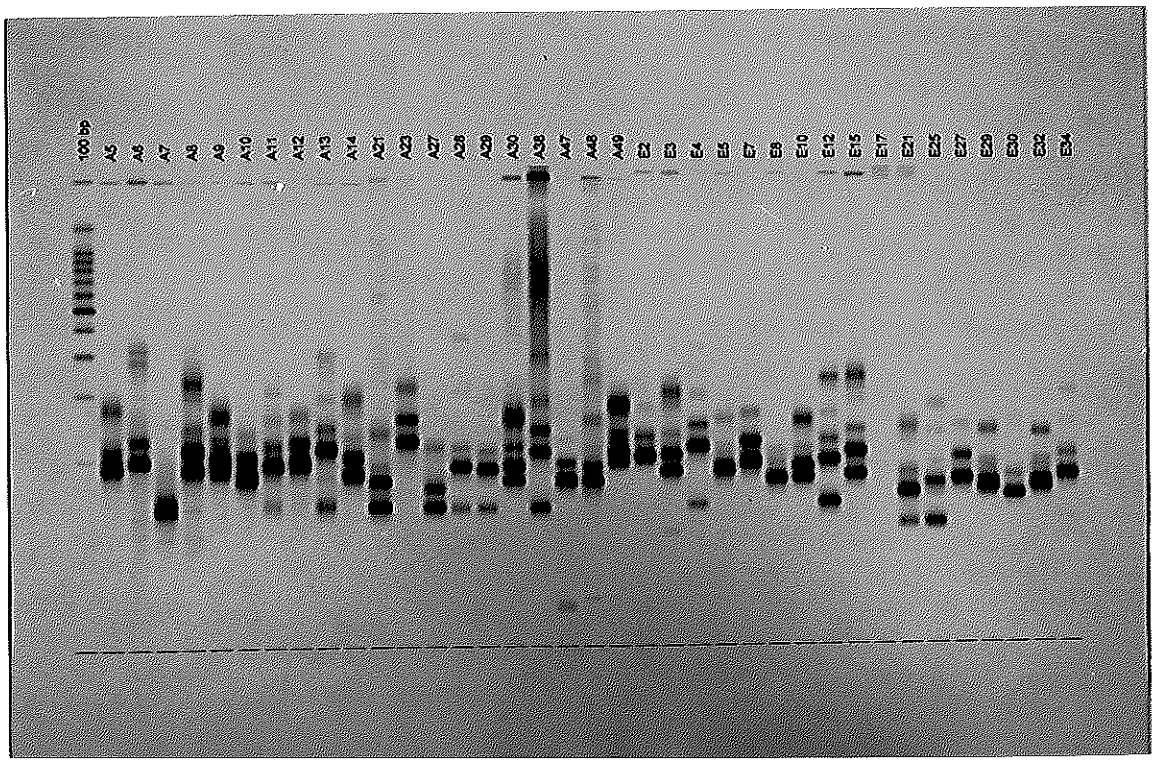
ผลการทดลอง

3.1 การตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งด้วย specific primers

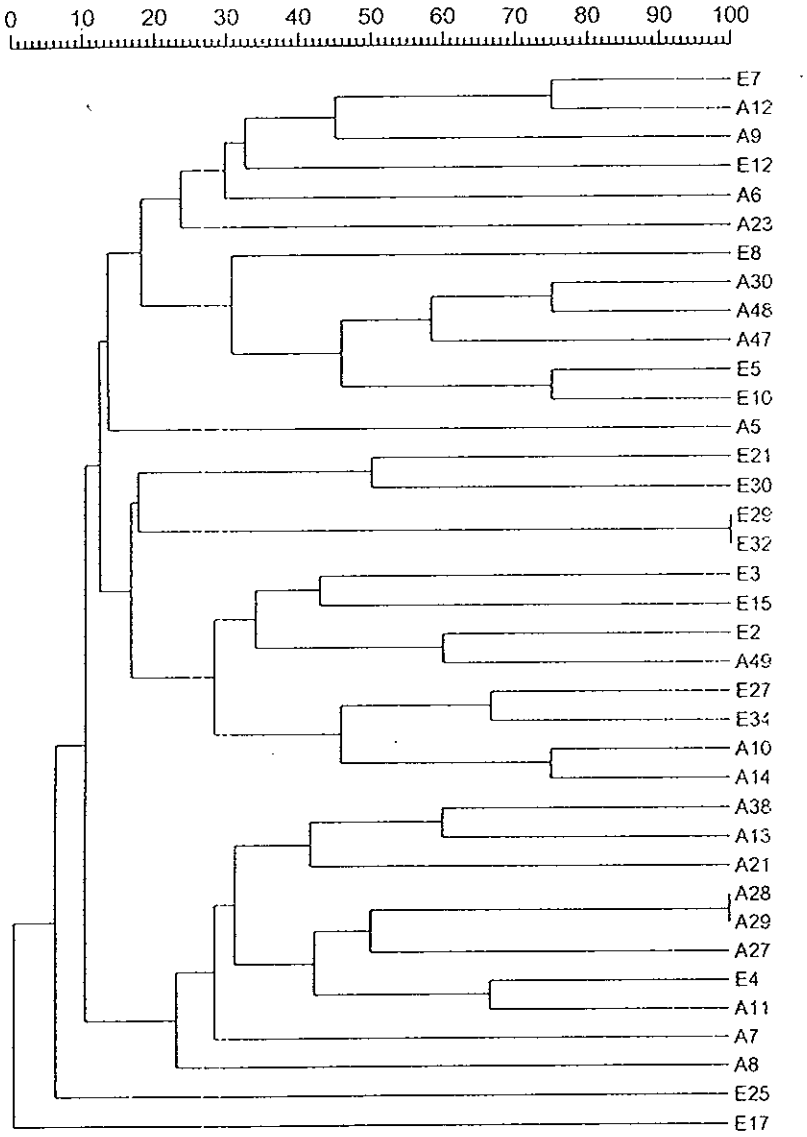
3.1.1 การตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งด้วย specific primers S4

จากการตรวจเอกสารงานวิจัยที่ทำกันอยู่ในปัจจุบัน พบว่า ไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Hearne *et al.*, 1992) และยังสามารถใช้ในการระบุความเป็นปัจเจกในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว (individual) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงสายพันธุ์ในอนาคต ดังนั้นในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเริ่มต้นโดยใช้ specific primer S4 ที่ได้จากการทดลองของปิยนันท์ ดวงทอง (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) และจันทน์ผา ตันธนา ซึ่งได้ศึกษาพันธุกรรมของกุ้งสองชนิดคือ *P. indicus* และ *P. merguiensis* ด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และจันทน์ผา ตันธนา ได้โคลนดีเอ็นเอที่น่าสนใจทั้งสิ้น 7 ชิ้น มีขนาดและลำดับเบสแตกต่างกัน ในจำนวนนี้ยังมีโคลนที่สำคัญคือ S4 ที่ไม่ได้ศึกษาในรายละเอียด ที่กล่าวว่าสำคัญก็เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของโคลน S4 พบว่าประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำ ๆ กันแบบไมโครแซทเทิลไลท์อยู่อย่างน้อย 15 ชุด จึงได้ออกแบบ specific primer หนึ่งคู่ซึ่งเป็นลำดับเบสที่อยู่ด้าน 5′ และ 3′ ของลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทิลไลท์ และให้ชื่อว่า specific primer S4 เช่นเดียวกับชื่อของโคลน ในการทดลองได้นำตัวอย่างกุ้งในกลุ่ม A กลุ่ม D และกลุ่ม E ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification) ด้วย specific primer S4 ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 8%polyacrylamide gel electrophoresis ผลการทดลองแสดงในรูป 3.1 จะเห็นว่ากุ้งแทบทุกตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จนอาจแยกได้ว่าแบบแผนใดเป็นของตัวใด และพบว่า primer นี้มีความจำเพาะกับกุ้งแชบ๊วยเท่านั้น เพราะไม่สามารถที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *P. monodon* และ *Metapenaeus* sp. ความแตกต่างของแบบแผนดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างจะเห็นได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst® software ของ Bio-Rad Laboratories ร่วมด้วยดังแสดงในรูปที่ 3.2 จะเห็นว่ากุ้งแต่ละตัวมี

แบบแผนเฉพาะของตัวเอง ยกเว้นตัวอย่าง E29 มีแบบแผนที่เหมือนกับ E32 ส่วน A28 มีแบบแผนที่เหมือนกับ A29



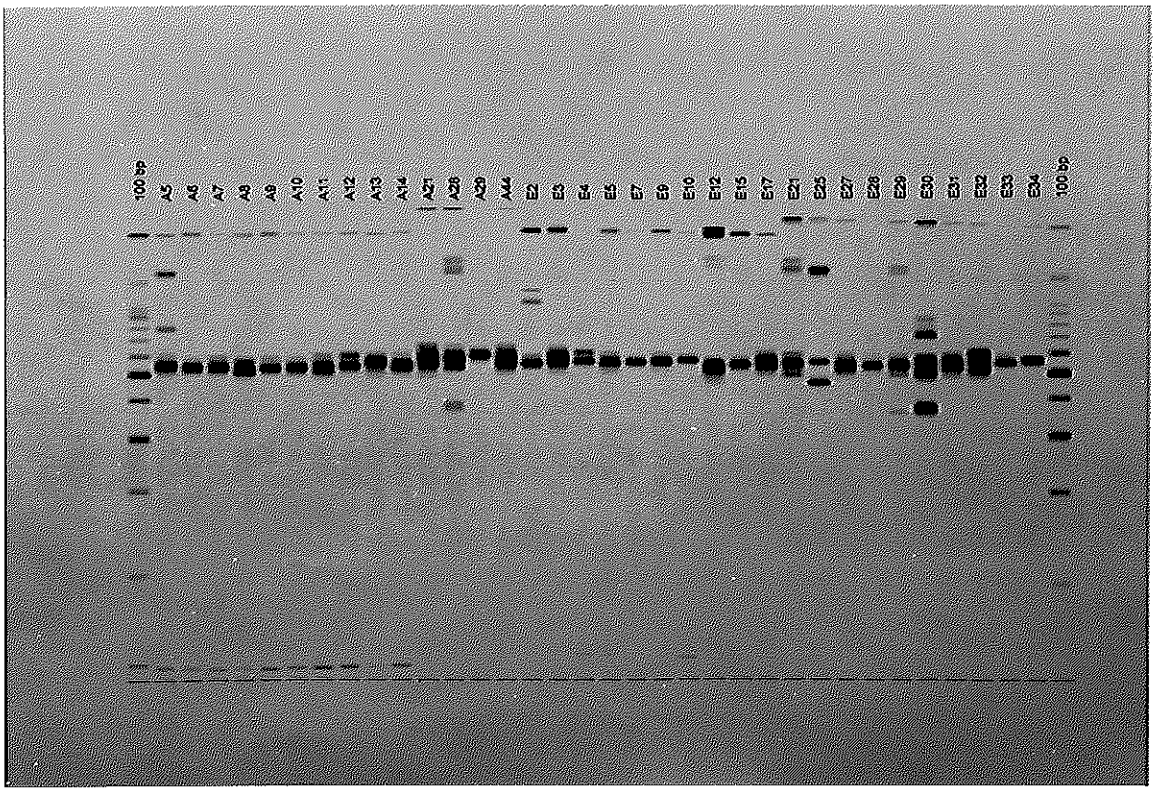
รูปที่ 3.1 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยกลุ่ม A ที่เป็น *P. indicus* และกลุ่ม E ที่เป็น *P. merguiensis* ด้วย specific primers S4 วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis. (จากการนำเจล 4 เจล เรียงกันโดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® software ของ Bio-Rad Laboratories และ run maker 100 bp ladder ทั้ง lane แรก และ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)



รูปที่ 3.2 แสดงผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่าง โดยเทียบแบบแผนดีเอ็นเอด้วย specific primer S4 ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst® software ของ Bio-Rad Laboratories

3.1.2 **การตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งด้วย** specific primers 06/1

จันทน์ผา ตันธนา ได้ทำการทดลองและสรุปว่า specific primers 06/1 เป็น species specific primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อกุ้งแชบ๊วย เมื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่าง จะสามารถแยกชนิดกุ้งที่เป็น *P. indicus* และ *P. merguiensis* แท้ ๆ ออกจากกันได้ แต่ไม่สามารถใช้แยกกุ้งที่เป็น hybrid หรือพิสูจน์การเกิด hybrid ได้ เนื่องจากการที่จะแยกกุ้งที่เป็น hybrid นั้น ต้องมี marker มากกว่า 1 ชุด และสำรวจจากตัวอย่างจำนวนมากแล้วนำแบบแผนที่ได้มาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ เนื่องจากในการทดลองของจันทน์ผา ตันธนา ได้สำรวจตัวอย่างไว้เพียง 25 ตัวอย่าง ในการทดลองนี้จึงได้สำรวจตัวอย่างเพิ่มเติม ผลผลิตที่ได้จาก PCR ไปแยกด้วย 8%polyacrylamide gel electrophoresis (รูปที่ 3.3) โดยใช้ตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้กับ specific primer S4 ทั้งนี้เพื่อเป็นฐานข้อมูลสำหรับใช้ร่วมกับ marker อื่นที่กำลังพัฒนาขึ้นมาใหม่ สำหรับการเปรียบเทียบ fingerprint ของแต่ละตัวอย่างต่อไป เมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางที่ 3.1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ผ่านมาของปิยนันท์ ดวงทอง (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) พบว่าตัวอย่างกุ้ง A5 จากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา มีลักษณะผสมระหว่าง *P. indicus* และ *P. merguiensis* จากการตรวจสอบโดยใช้ไอโซไซม์เป็น *P. indicus* เมื่อใช้ specific primer 06/1 วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis ได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ ส่วน A6 จากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์เป็น *P. indicus* เมื่อใช้ specific primer 06/1 วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis ได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ส่วน E2 และ E3 จากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์เป็น *P. merguiensis* เมื่อใช้ specific primer 06/1 วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ



รูปที่ 3.3 แบบแผนดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยกลุ่ม A ที่เป็น *P. indicus* และ กลุ่ม E ที่เป็น *P. merguiensis* จากการใช้ specific primer 06/1 วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis. (จากการนำเจล 4 เจล เรียงกันโดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst® software ของ Bio-Rad Laboratories และ run maker 100 bp ladder ทั้ง lane แรก และ lane สุดท้ายของเจลแต่ละเจล)

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาโดยแยกชนิดตามสัณฐานวิทยาและแบบแผนไอโซไซม์

หมายเลขตัวอย่าง	เพศ	รายละเอียดของรูปร่าง			การแยกชนิดโดยสัณฐานวิทยา	การแยกชนิดด้วยไอโซไซม์
		P	R	GO		
A5	female	M	I	I	Mix	*P. indicus*
A6	male	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A7	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A8	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A9	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
A10	male	M	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*
E1	female	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E2	male	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E3	female	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*
E4	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. merguiensis*
E5	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. merguiensis*

P=Petesma, R=Rostrum, Go=Gastro-orbital, I=ลักษณะที่ตรงกับ key ว่าเป็น *P. indicus*

M=ลักษณะที่ตรงกับ key ว่าเป็น *P. mergueinsis*

ที่มา : ปิยนันท์ ดวงทอง (2542)

3.2 การตรวจสอบ genomic DNA ของกุ้งแชบ๊วยด้วยโคลน 787

โคลน 787 เป็นดีเอ็นเอที่โคลนจากแถบดีเอ็นเอ ขนาด 601 bp. ที่เกิดจากการทำ RAPD ของดีเอ็นเอกุ้งแชบ๊วยด้วย primer UBC-787 (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) โคลนนี้ (ดังรูปที่ 1.9) ประกอบด้วยลำดับเบสที่เป็น long repeated sequences ขนาดความยาว 73 bp จำนวน 1 คู่ ภายในหรือบริเวณที่ใกล้เคียงของ 73 bp นี้มี tandem repeats ขนาด 8 bp จำนวน 12 ชุด ลักษณะลำดับเบสเช่นนี้ทำให้คิดว่าดีเอ็นเอของโคลน 787 น่าจะมาจากส่วนของจีโนมที่เป็น mini- หรือ microsatellite จึงสนใจที่จะสำรวจต่อว่า repeated sequences ที่มีลำดับเบสทำนองเดียวกันหรือใกล้เคียงกันเช่นนี้ยังพบที่ส่วนอื่นของจีโนมหรือไม่ จึงทำการทดลองโดยนำ genomic DNA ของตัวอย่างต่าง ๆ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นิยมใช้ในการศึกษาพวก repeated sequences (Bagshaw *et al.*, 1997) ได้แก่ *Rsa*I, *Hin*fI และ *Sau*3AI โดยในที่นี้ได้เลือกใช้เอนไซม์ *Hin*fI เนื่องจากพบว่าตัดดีเอ็นเอได้ขนาดที่กระจายสม่ำเสมอ ทำการตรึงดีเอ็นเอที่ถูกตัดบนเมมเบรนแล้วนำไป hybridize กับดีเอ็นเอของโคลน 787 ที่ติดฉลากด้วย DIG (ได้ใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดรวมทั้งส่วนของดีเอ็นเอพาหะในการเตรียมเป็น probe เนื่องจากได้ทดสอบแล้วว่าดีเอ็นเอของดีเอ็นเอพาหะไม่ hybridize กับดีเอ็นเอของกุ้ง) ตรวจสอบผลการ hybridize ด้วยชุดตรวจสอบของ Boehringer Mannheim ผลการทดลองไม่พบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน แต่เห็นปรากฏเพียงลาง ๆ จนไม่แน่ใจว่าเป็นสิ่งแปลกปลอมหรือไม่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากใช้ genomic DNA ในปริมาณน้อยเกินไปหรือการเลือกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI อาจไม่เหมาะสม

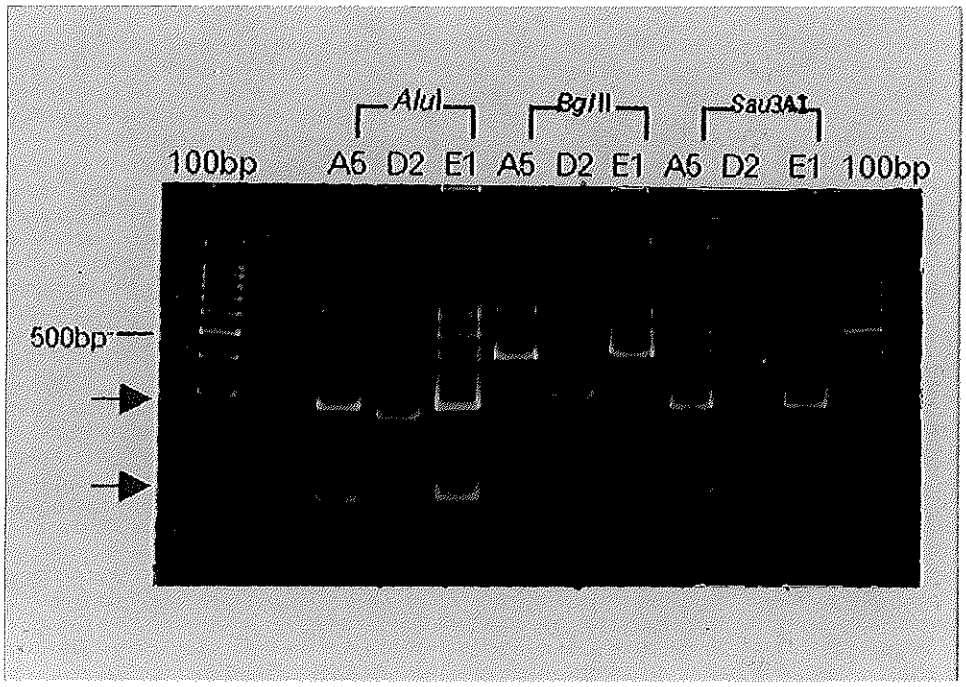
3.3 การใช้จีโนมของไมโตคอนเดรียเพื่อศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง

ในการทดลองที่ผ่านมาเป็นการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากแบบแผนของ RAPD ซึ่งแม้จะมีหลาย marker แต่ก็มีเพียง specific primer 06/1 เท่านั้นที่สามารถนำมาใช้แยกชนิดของกุ้งแชบ๊วยได้ การมี primer เพียงชุดเดียวไม่สามารถตอบคำถามที่สำคัญได้ คือกุ้งสองชนิดนี้ hybridize กันหรือไม่ การศึกษาจีโนมของไมโตคอนเดรีย (mitochondrial genome) จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งจะทำให้ได้ marker เพิ่มขึ้น คุณสมบัติที่สำคัญของดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียคือดีเอ็นเอถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานทางแม่ ไม่มี recombination เกิดขึ้น (Bouchon, 1994) นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในยีนยังเกิดขึ้นรวดเร็วเร็วกว่ายีนในนิวเคลียส ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมีบทบาทในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในหลายระดับ (Kocher *et al.*, 1994) เพียงแต่ต้องเลือกใช้ยีนและตำแหน่งของยีนให้ถูกต้อง ในที่นี้จึงเลือกที่จะศึกษายีนจากไมโตคอนเดรียสองชนิดคือ 12S rRNA และ 16S rRNA

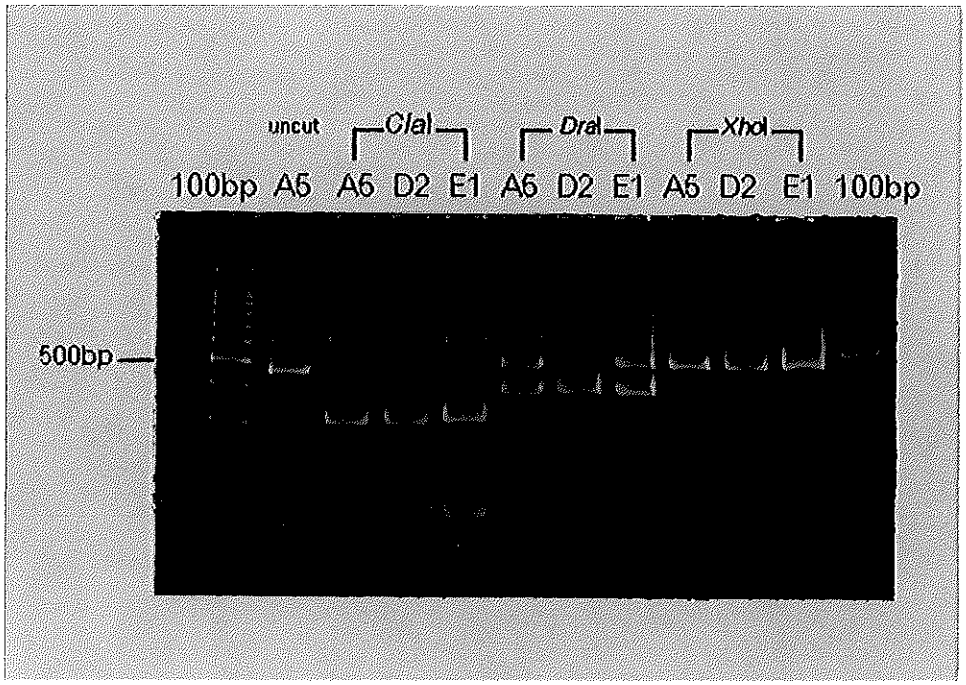
3.3.1 การศึกษา third domain ของ 12 S rDNA

เลือกใช้ตัวอย่าง 3 ชนิด คือ *Metapenaeus* sp. (A1 และ A2) *P. monodon* (D1 และ D2) และกุ้งแชบ๊วยในการทดลอง (ใช้กุ้ง *Metapenaeus* sp. และ *P. monodon* เป็นตัวควบคุม) โดยตัวอย่างที่เป็นกุ้งแชบ๊วยประกอบด้วยกุ้งที่ถูกระบุชนิดโดยการตรวจสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ให้ผลสอดคล้องกันว่าเป็น *P. indicus* 2 ตัวอย่าง (A5 และ A6) และ *P. merguiensis* อีก 2 ตัวอย่าง (E1 และ E2) นำตัวอย่างของดีเอ็นเอเหล่านี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย primer mtD-35 และ mtD-36 ซึ่งเป็น conserve sequence อยู่ที่บริเวณ third domain ของ 12S rRNA พบว่าผลผลิต PCR ของแต่ละตัวอย่างมีขนาดใกล้เคียงกัน คือประมาณ 410 bp เมื่อนำผลผลิต PCR มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ คือ *Alu*I, *Bgl*II, *Xho*I , *Cla*I, *Dra*I และ *Sau*3AI พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ *Alu*I, *Bgl*II และ *Sau*3AI จะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจนสามารถแยก *Metapenaeus* sp., *P. monodon* และกุ้งแชบ๊วยออกจากกันได้ (รูปที่ 3.4 รูปที่ 3.5 และรูปที่ 3.6 โดยในรูปที่ 3.4 และ 3.5 ได้เลือกผลผลิต PCR ของกุ้งชนิดละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ A5, D2 และ E1 เป็นตัวแทนในการย่อยด้วยเอนไซมตัดจำเพาะ) แต่การตัดด้วยเอนไซม์

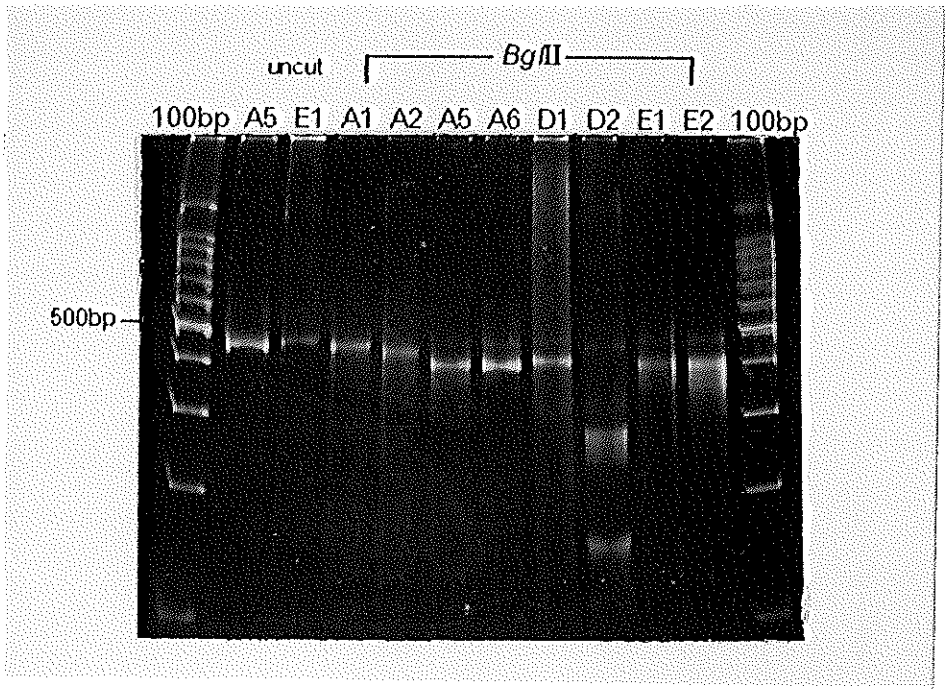
3 ชนิดนี้ไม่สามารถที่จะแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ออกจากกันได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีการเรียงลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก จึงได้ทำการทดลองต่อโดยนำผลผลิตจาก PCR จากตัวอย่างทั้ง A5, A6, D2, E1 และ E2 ไปหาการเรียงลำดับเบสและได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.7 - 3.11



รูปที่ 3.4 แสดงผลการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 12S rDNA ของกุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* (A5), *P. merguiensis* (E1) และกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* (D2) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I, *Bgl*II และ *Sau*3AI วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis.
(หมายเหตุ แถบดีเอ็นเอที่มากกว่า 410 bp เป็นแถบที่เกิดจากผลผลิต PCR ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงทำให้มีแถบที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น)



รูปที่ 3.5 แสดงผลการย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 12S rDNA ของกุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* (A5), *P. merguiensis* (E1) และกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* (D2) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I, *Dra*I และ *Xho*I วิเคราะห์บน 8%polyacrylamide gel electrophoresis.
(หมายเหตุ แถบดีเอ็นเอที่มากกว่า 410 bp เป็นแถบที่เกิดจากผลผลิต PCR ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงทำให้มีแถบที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น)



รูปที่ 3.6 แสดงผลการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II ย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 12S rDNA ของ *Metapenaeus* sp. (A1 และ A2), *P. indicus* (A5 และ A6), *P. monodon* (D1 และ D2) และ *P. merguiensis* (E1 และ E2) วิเคราะห์บน 10%polyacrylamide gel electrophoresis

```
        10          20          30    AluI  40          Sau3AI      60
AAGAGCGACG GGCGATGTGT ACATAACCTA GAGCTAAAAT CAAAAGATCT TATTAAAATT
                                                  BglII
          DraI      80          90          100         110         120
TTCTTACTTT TAAATCCACC TTTATAACAA ATATTCATTT ATTGTTCCGT TTATTTTATC

       130         140         150   AluI  160   Sau3AI              180
TATATTGTAA CCCATCTCTT CCTCTATTAT AAGCTGCACC TTGATCTAAT ATATTAGCAA

       190         200         210         220         230         240
AACTATTCTA GTAACTTTAT CTTTTATAAA AGTTACCTAA TAATGACGGT ATACAAACTG

       250         260         270         ClaI        290         300
TATTTCTACA AAATAGAGTA AGATTCTTCG TGGACTATCG ATTACAGGAC AGGTTCCTCT

       310         320         330         340         350         360
AAATAGACTA AGTTACCGCC AAATCCTTTG AGTTTCAAGA TAATAACTGT TTAGTACCCG

       370         380         390         400         410
CGGTCATAAC AATTCAAATA AAGTATAATA GGGTATCTAA TCCTAGTTT
```

รูปที่ 3.7 แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย *P. indicus* , A5

[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

```
        10          20          30    AluI  40          Sau3AI      60
AAGAGCGACG GGCGATGTGT ACATAACCTA GAGCTAAAAT CAAAAGATCT TATTAAAATC
                                                  BglII
          DraI      80          90          100         110         120
TTCTTACTTT TAAATCCACC TTTATAATAA ATATTCATTT ATTGTTCCGT TTATTTTAGT

       130         140         150   AluI  160         170         180
ATATTGTAAC CCATCTCTTC CTGTATTATA AGCTGCACCT CGATCTAATA TATTAGCAAA

       190         200         210         220         230         240
ACTATTCTAG TAACTTTATC TTTTATAAAA GTTACCTAAT AATGACGGTA TACAAACTGT

       250         260         270         ClaI        290         300
ATTTCTACAA AATAGAGTAA GATTCTTCGT GGACTATCGA TTACAGGACA GGTTCCTCTA

       310         320         330         340         350         360
AATAGACTAA GTTACCGCCA AATCCTTTGA GTTTCAAGAT AATAACTGTT TAGTACCCAG

       370         380         390         400         410
GTAATAACAA TTCAAATAAA GTATAATAGG GTATCTAATC CTAGTTT
```

รูปที่ 3.8 แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย *P. indicus* , A6

[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

```
        10          20          30          40          50          60
AAGAGCGACG GGCGATGTGT ACATAACCTA GAGCTAAAAT CAAAAGATCT TATTAAAATC
                                    AluI        Sau3AI      BglII
        70          80          90          100         110         120
TTCTTACTTT TAAATCCACC TTTATAACGA ATATTCATCT GTTATTCCGT TTATTTTACT
       130         140         150         160         170         180
ATATTGTAAC CCATCTCTTC CTCTACTATA AGCTGCACCT TGATCTAATA TATTAGCAAA
       190         200         210         220         230         240
ACTATTTTAG TAACTTTATC TTTTATAAAA GTTACCTAAT AATGACGGTA TACAAACTGT
       250         260         270         280         290         300
ATTTCTACAA AATAGAGTAA GATTCTTCGT GGACTATCGA TTACAGGACA GGTTCCTCTA
                                    ClaI
       310         320         330         340         350         360
AATAGACTAA GTTACCGCCA AATCCTTTGA GTTTCAAGAT AATAACTGTT TAGTACCCAG
       370         380         390         400         410
GTAATAACAA TTCAAATAAA GTATAATAGG GTATCTAATC CTAGTTT
```

รูปที่ 3.9 แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis*, E1

[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

```
        10          20          30          40          50          60
AAGAGCGACG GGCGATGTGT ACATAACCTA GAGCTAAAGT CAAAAGATCT TATTAAAATC
                                    AluI        Sau3AI      BglII
        70          80          90          100         110         120
TTCGTAGTTT TAAATCCACC TTAATAACGA ATATTCATCT GTTATTCCGT TTATTTTACT
       130         140         150         160         170         180
ATTTGGTAAC CCATCTCTTC CTGTACTATA AGCTGCTCCT TGATCTAATA TATTAGCAAA
       190         200         210         220         230         240
ACTATTTTAG TAACTTTATC TTTTATAAAA GTTACCTAAT AATGACGGTA TACAAACTGT
       250         260         270         280         290         300
ATTTGTACAA AATAGAGTAA GATTCTTCGT GGACTATCGA TTACAGGACA GGTTCCTCTA
                                    ClaI
       310         320         330         340         350         360
AATAGACTAA GTTACCGCCA AATCCTTTGA GTTTCAAGAT AATAACTGTT TAGTACCCAG
       370         380         390         400         410
GTAATAACAA TTCAAATAAA GTATAATAGG GTATCTAATC CTAGTTT
```

รูปที่ 3.10 แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis*, E2

[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

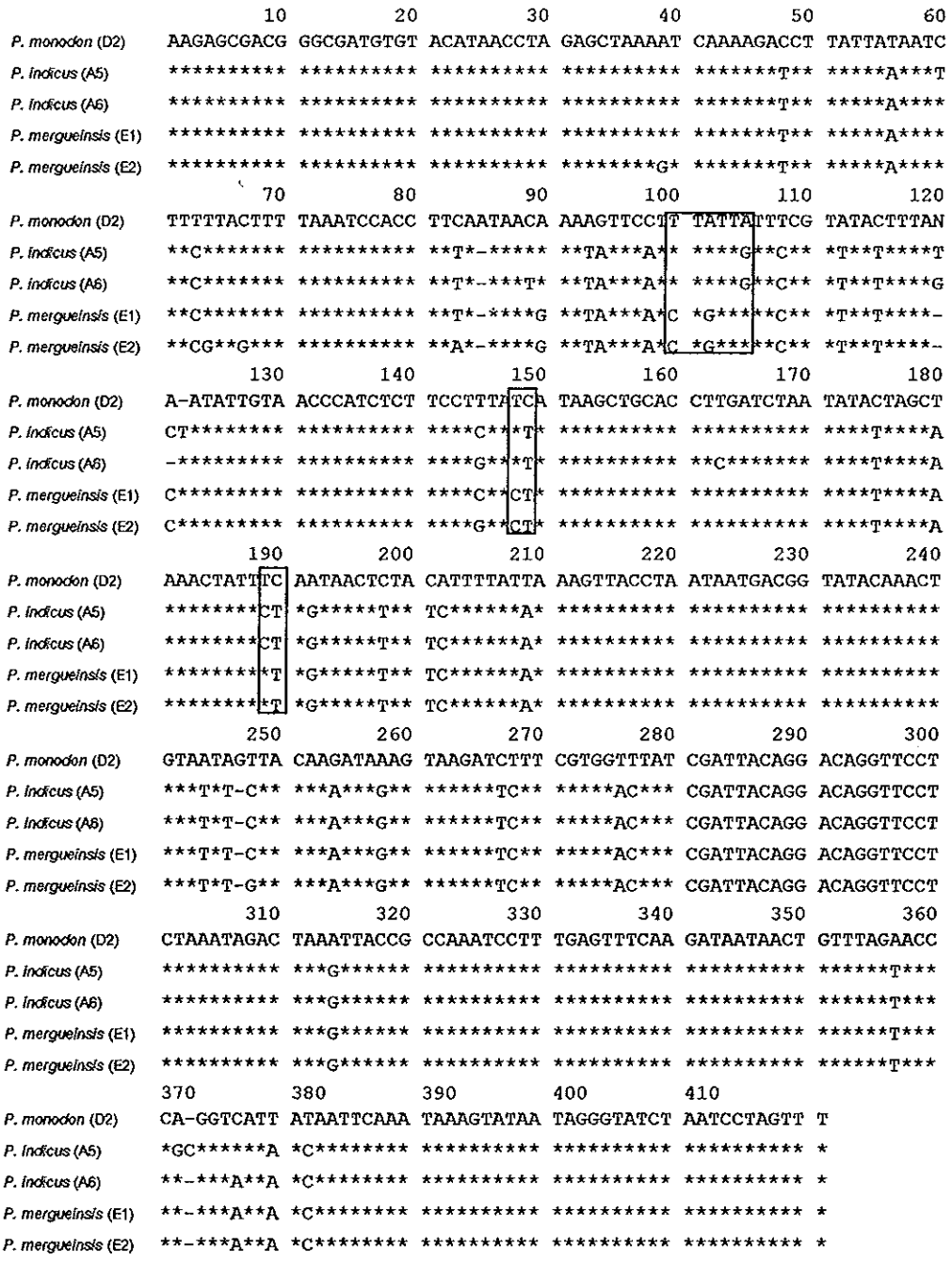
```
        10          20          30   AluI   40          50          60
AAGAGCGACG GGCGATGTGT ACATAACCTA GAGCTAAAAT CAAAAGACCT TATTATAATC

          DraI      80          90          100         110         120
TTTTTACTTT TAAATCCACC TTCAATAACA AAAGTTCCTT TATTATTTCG TATACTTTAN

       130         140         150   AluI  160   Sau3AI 170         AluI
AATATTGTAA CCCATCTCTT CCTTTATCAT AAGCTGCACC TTGATCTAAT ATACTAGCTA

       190         200         210         220         230         240
AACTATTTCA ATAACTCTAC ATTTTATTAA AGTTACCTAA TAATGACGGT ATACAAACTG

       250         260    Sau3AI 270          ClaI       290         300
TAATAGTTAC AAGATAAAGT AAGATCTTTC GTGGTTTATC GATTACAGGA CAGGTTCCTC
                       BglII
       310         320         330         340         350         360
TAAATAGACT AAATTACCGC CAAATCCTTT GAGTTTCAAG ATAATAACTG TTTAGAACCC

       370         380         390         400         410
AGGTCATTAT AATTCAAATA AAGTATAATA GGGTATCTAA TCCTAGTTT
```

รูปที่ 3.11 แสดงลำดับเบสของยีน 12S rDNA กุ้งกุลาดำ *P. monodon*, D2

[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

นำลำดับเบสของยีน 12S rDNA ของกุ้งทั้งสามชนิดมาเปรียบเทียบกันดังรูปที่ 3.12 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งและเบสที่แตกต่างกัน จุดที่สำคัญคือตำแหน่ง 100-105, 148-149 และ 189-190 แตกต่างกันระหว่าง *P. monodon*, *P. indicus* และ *P. merguiensis* อย่างชัดเจน และเมื่อใช้โปรแกรม DNASIS วิเคราะห์การเรียงลำดับเบสเพื่อหาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างจะได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูป 3.13

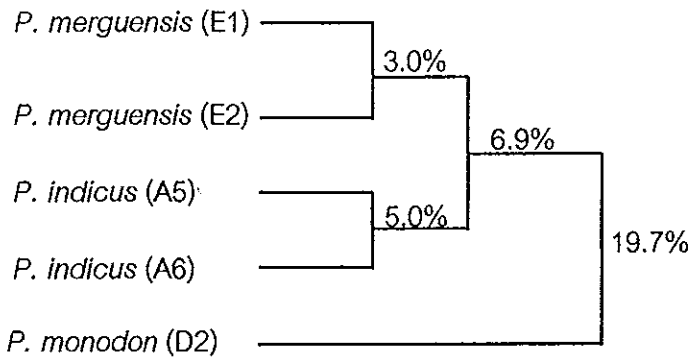


รูปที่ 3.12 เปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* กุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* และ *P. merguiensis* จากการใช้ primer mtD –35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 12S rDNA

[สัญลักษณ์ (-) แทนตำแหน่งที่ไม่มีลำดับเบส

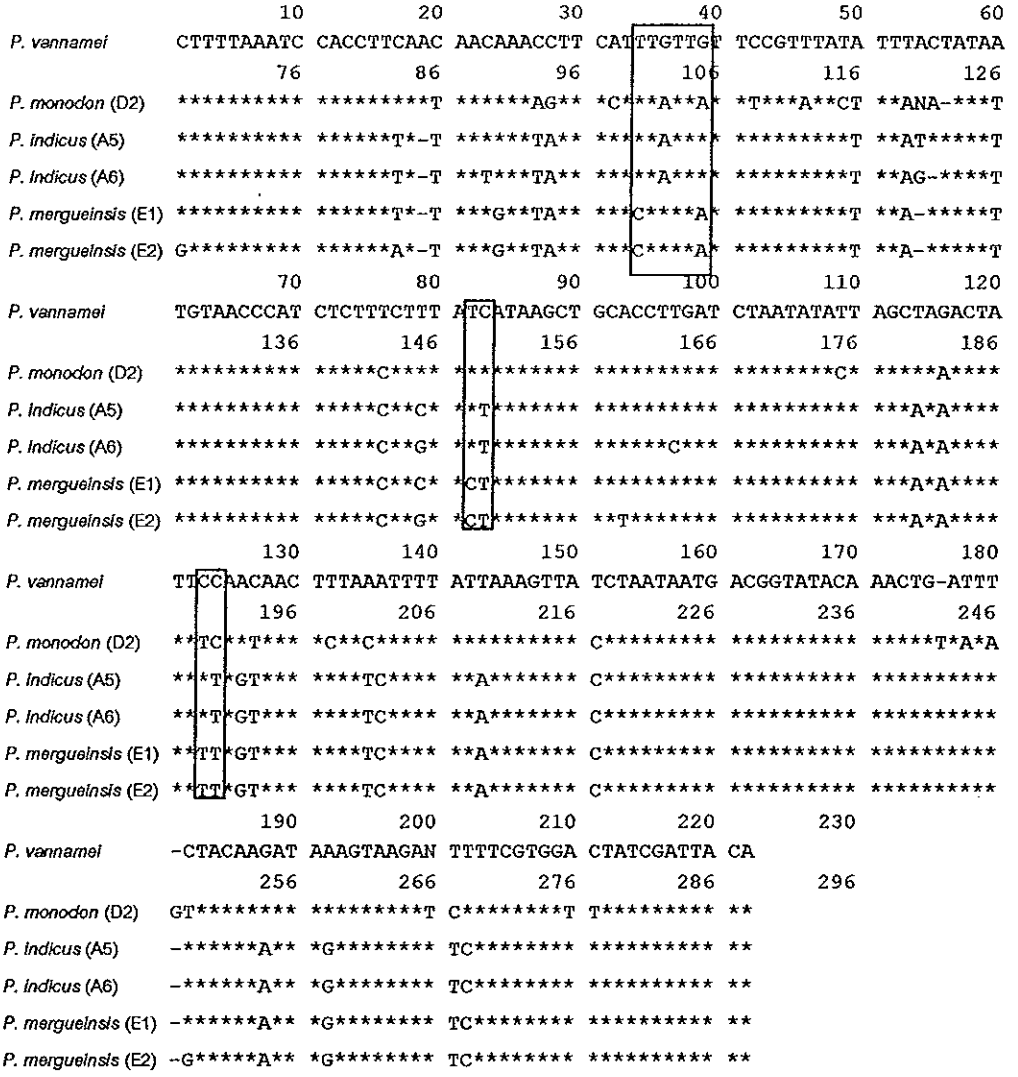
(*) แทนตำแหน่งที่มีลำดับเบสตรงกัน

(□) แสดงบริเวณลำดับเบสที่ต่างกันของกุ้งทั้งสามชนิด]



รูปที่ 3.13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกุ้ง *P. merguiensis* (E1 และ E2) *P. indicus* , (A5 และ A6) *P. monodon* (D2) โดยการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของ 12S rDNA ตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 410 จำนวน 410 bp (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)

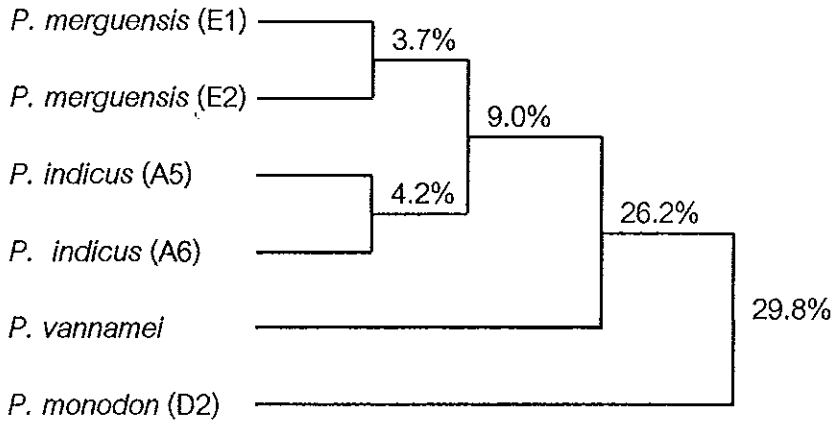
เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 เป็นส่วนของ 12S rDNA จริง จึงได้นำลำดับเบสไปเทียบเคียง (alignment) กับลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequence) จากกุ้งหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลธนาคารยีน ได้ผลสรุปว่าเป็นดีเอ็นเอของ 12S rDNA และมีความใกล้เคียงกับลำดับเบสของ *P. vannamei* ดังรูปที่ 3.14 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS ได้ผลสรุปดังรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.14 เปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งกุลาดำ, *P. monodon* กุ้งแชบ๊วย *P. indicus* และ *P. merguiensis* จากการใช้ primer mtD-35 และ mtD-36 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 12S rDNA กับ *P. vannamei* (12S rDNA) จากธนาคารยีน [สัญลักษณ์ (-) แทนตำแหน่งที่ไม่มีลำดับเบส

(*) แทนตำแหน่งที่มีลำดับเบสตรงกัน

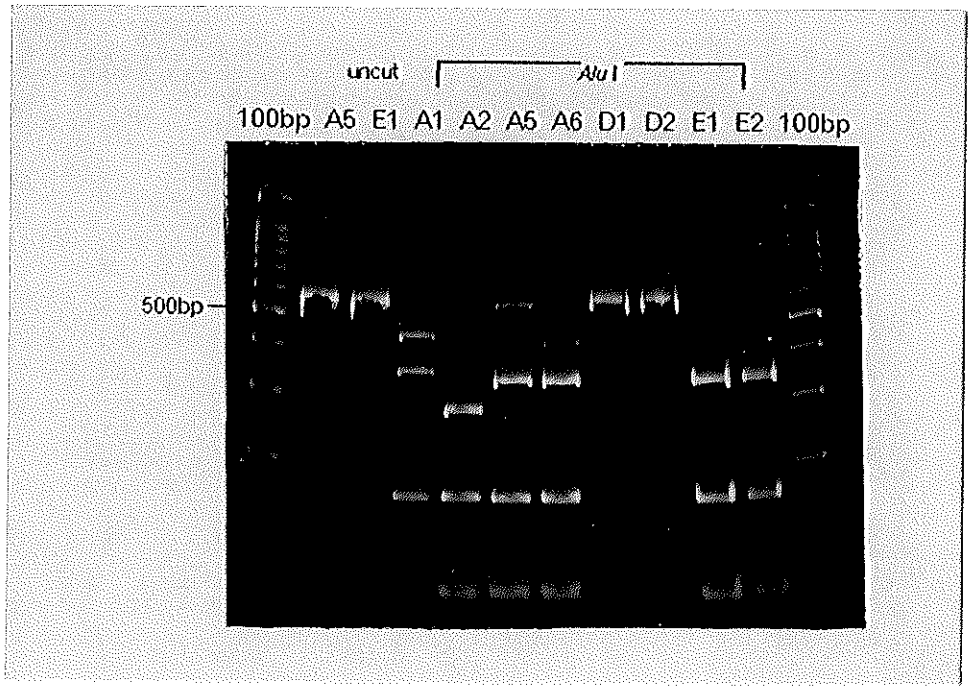
(□) แสดงบริเวณลำดับเบสที่ต่างกัน]



รูปที่ 3.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกุ้ง *P. merguiensis* (E1 และ E2) *P. indicus* , (A5 และ A6) *P. monodon* (D2) และ *P. vannamei* ด้วย 12S rDNA ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ homology กับ *P. vannamei* ตั้งแต่เบสที่ 76 ถึงเบสที่ 288 (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)

3.3.2 การศึกษา third domain ของ 16 S rDNA

ทำการศึกษาคล้ายกับการศึกษา 12S rDNA ในหัวข้อ 3.3.1 โดยใช้ตัวอย่างชุดเดียวกัน แต่ใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 ซึ่งเป็น conserve sequence อยู่ที่บริเวณ third domain ของ 16S rRNA พบว่าผลผลิต PCR ของแต่ละตัวอย่าง มีขนาดใกล้เคียงกัน คือประมาณ 560 bp เมื่อนำผลผลิต PCR มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* จะได้แถบดีเอ็นเอของแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังรูปที่ 3.16 ความแตกต่างที่เกิดขึ้นจะสามารถแยก *Metapenaeus* sp. (A1 และ A2) *P. monodon* (D1 และ D2) ออกจากกุ้งแชบ๊วยทั้งสองชนิด (A5, A6, E1 และ E2) ได้ แต่ไม่สามารถที่จะแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ออกจากกันได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีการเรียงลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก จึงได้ทำการทดลองต่อโดยนำผลผลิต PCR จากตัวอย่างทั้ง D1, A6 และ E1 ไปหาการเรียงลำดับเบสได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.17-3.19



รูปที่ 3.16 แสดงผลการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ย่อยผลผลิต PCR จากการใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 12S rDNA ของ *Metapenaeus* sp. (A1 และ A2), *P. indicus* (A5 และ A6), *P. monodon* (D1 และ D2) และ *P. merguiensis* (E1 และ E2) วิเคราะห์บน 10%polyacrylamide gel electrophoresis

```
        10          20          30          40          50          60
CCGGTCTGAA CTCAGATCAC GTAAGGATTT AAAGGTCGAA CAGACCTTCC TTTATAACTG

        70          80          90         100         110         120
CTGCATCATA AGGATACCTT AATTCAACAT CGAGGTCGCA AACCTTCTTG TCGATATGGA

       130         140         150         160         170         180
CTCTCAAAGA AGATTACGCT GTTATCCCTA AAGTAACTTA ATCTTTTAAT CGCTAATAGA

       190         200         210         220         230         240
GGATCACACT AATTTTCAAT TATATCTGTT ATTAAATATT TAAGAACAGT TACCTATTAT

       250         260         270         280         290         300
ATTCTCGTCG CCCCAACGCA ACAAATTTTA ATTAAAACCA AGTTACACTA ACAATTGATA

       310         320  AluI   330         340         350         360
GTATAATTAA ATTATTGTCA AGCTTTATAG GGTCTTATCG TCCCCTTAAT TTATTTAAGC

       370         380         390         400  AluI   410         420
CTTTTCACTT AAAAGTTAAG TTCAATTATT ATAATTGAGA CAGCTTACTT TTTGTCCAAC

       430         440         450         460         470         480
CATTCATACA AGCCTTCAAT TAAAAGACTA ATGATTATGC TACCTTCGCA CGGTCAATAT

       490         500         510         520         530         540
ACCGCGGCCC TTTAAACTAA ATCAGTGGNC AGGCTAGACT TTATATAACA ATAAAATAGA

       550         560         570
CATGTTTTTG TTAAACAGGC G
```

รูปที่ 3.17 แสดงลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของกุ้งแชบ๊วย *P. indicus*, A6

[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

```
        10          20          30          40          50          60
CCGGTCTGAA CTCAGATCAC GTTTTGATTT AAAGGTCGAA CAGACCTTGC TTTATAACTG

        70          80          90         100         110         120
CTGCATTATA AGGATACCTT AATTCAACAT CGAGGTCGCA AACCTTCTTG TCGATAAGGA

       130         140         150         160         170         180
CTCTCAAAGA AGATTACGCT GTTATCCCTA AAGTAACTTA ATCTTTTAAT CTTTAATAAA

       190         200         210         220         230         240
GGATCAATTA TTCTTCAATT ATACTTGTTA ATAAAATATT TAAGAACAGT TACTAATTAT

       250         260         270         280         290         300
ATTCCCGTCG CCCCAACGCA ACAAACATTA ATTAAAATCA AGTTATACTA ACAATTTATA

       310         320         330         340         350         360
ATTTAATCAA ATTATTGTTA AGTTTTATAG GGTCTTATNG TCCCCTTAAA GTATTTAAGC

       370         380         390         400         410         420
CTTTTCACTT AAAAGTTAAG TTCAACTATT ATAACTGAGA CAGATTACTT TTTGTCCAAC

       430         440         450         460         470         480
CATTCATACA AGCCTTCAAT TAAAAGACTA ATGATTATGC TACCTTCGCA CGGNCAGTAT

       490         500         510         520         530         540
ACCCGCGGCC CTTTAAAAAT AATTCAGTGG GCAGGCTAGA CTTTATATAA CAATCATATA

       550         560         570
GACATGTTTT TGTTAAACAG GCG
```

รูปที่ 3.18 แสดงลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของกุ้งกุลาดำ *P. monodon*, D1

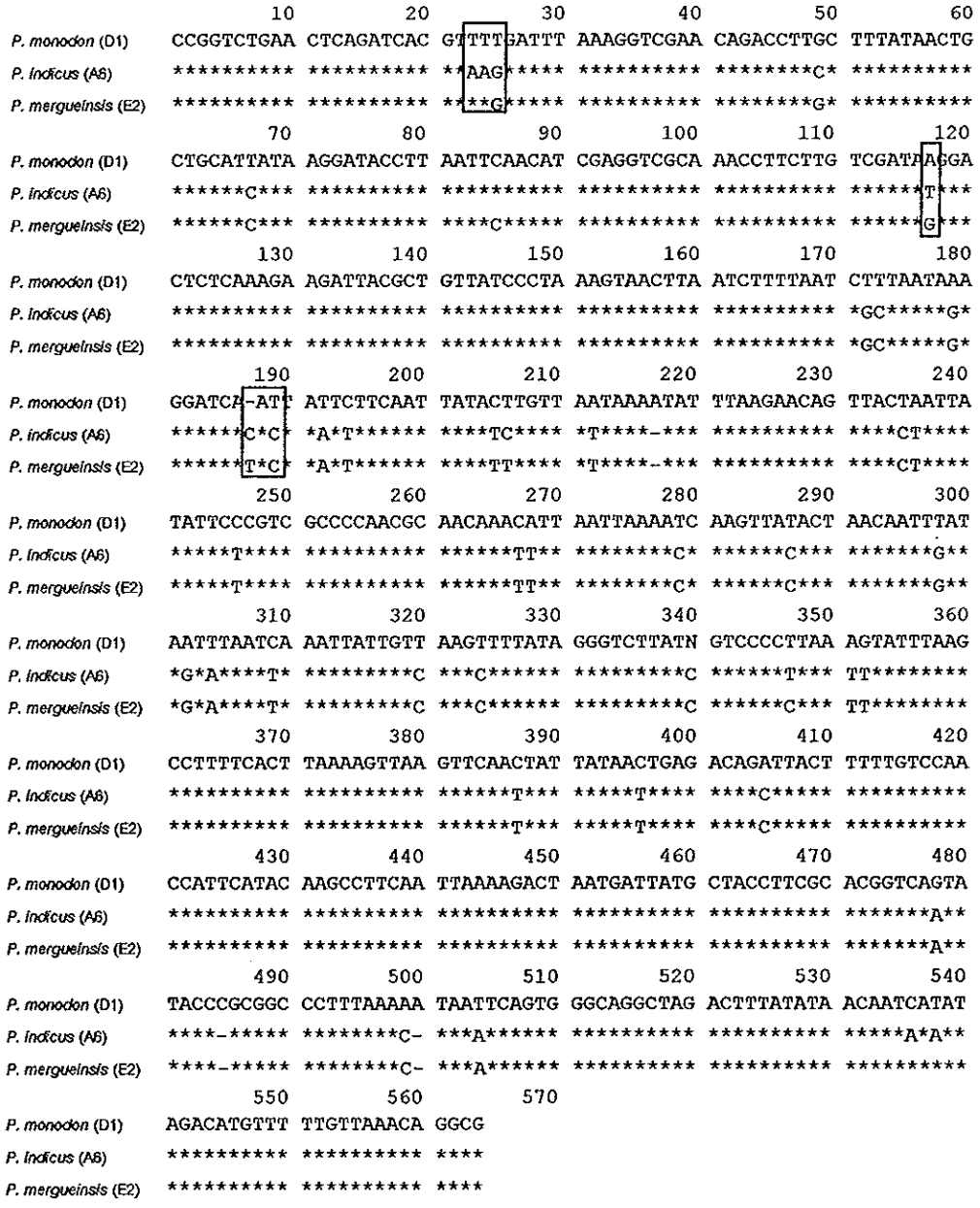
[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer

หมายเหตุ ลำดับเบสของยีนนี้ไม่มีตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I]

```
        10          20          30          40          50          60
CCGGTCTGAA CTCANTTCAC GTTTGGATTT AAAGGTCGAA CAGACCTTGC TTTATAACTG

        70          80          90         100         110         120
CTGCATCATA AGGATACCTT AATTCAACAT CGAGGTCGCA AACCTTCTTG TCGATAGGGA

       130         140         150         160         170         180
CTCTCAAAGA AGATTACGCT GTTATCCCTA AAGTAACTTA ATCTTTTAAT CGCTAATAGA

       190         200         210         220         230         240
GGATCATACT AATTTTCAAT TATATTTGTT ATTAAATATT TAAGAACAGT TACCTATTAT

       250         260         270         280         290         300
ATTCTCGTCG CCCCAACGCA ACAAATTTTA ATTAAAACCA AGCTACACTA ACAATTGATA

       310         320  AluI   330         340         350         360
GTATAATTAA ATTATTGTCA AGCTTTATAG GGTCTTATCG TCCCCCTAAT TTATTTAAGC

       370         380         390         400  AluI   410         420
CTTTTCACTT AAAAGTTAAG TTCAATTATT ATAATTGAGA CAGCTTACTT TTTGTCCAAC

       430         440         450         460         470         480
CATTCATACA AGCCTTCAAT TAAAAGACTA ATGATTATGC TACCTTCGCA CGGTCAATAT

       490         500         510         520         530         540
ACCGCGGCCC TTTAAACTAA ATCAGTGGGC AGGCTAGACT TTATATAACA ATCATATAGA

       550         560         570
CATGTTTTTG GTAAACAGGC G
```

รูปที่ 3.19 แสดงลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis*, E2
[สัญลักษณ์ (_) แสดงบริเวณ primer
(—) แสดงบริเวณเอนไซม์ตัดจำเพาะ]

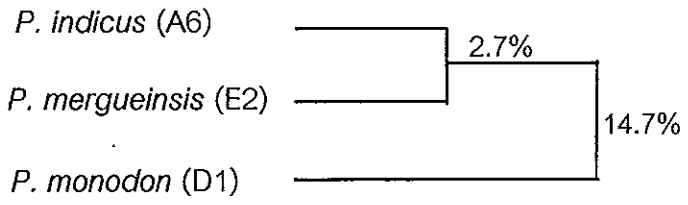
นำลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของกุ้งทั้งสามชนิดมาเปรียบเทียบกัน ดังรูปที่ 3.20 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งและเบสที่แตกต่างกัน จุดที่สำคัญคือตำแหน่ง 23-25, 117 และ 186-189 แตกต่างกันระหว่าง *P. monodon*, *P. indicus* และ *P. merguiensis* อย่างชัดเจน เมื่อใช้โปรแกรม DNASIS วิเคราะห์การเรียงลำดับเบส เพื่อหาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างจะได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 3.21



รูปที่ 3.20 เปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งกุลาดำ,*P. monodon* (D1) กุ้งแชบ๊วย *P. indicus* (A6) และ *P. merguiensis* (E2) จากการใช้ primer mtD–32 และ mtD-34 ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 16S rDNA [สัญลักษณ์ (-) แทนตำแหน่งที่ไม่มีลำดับเบส

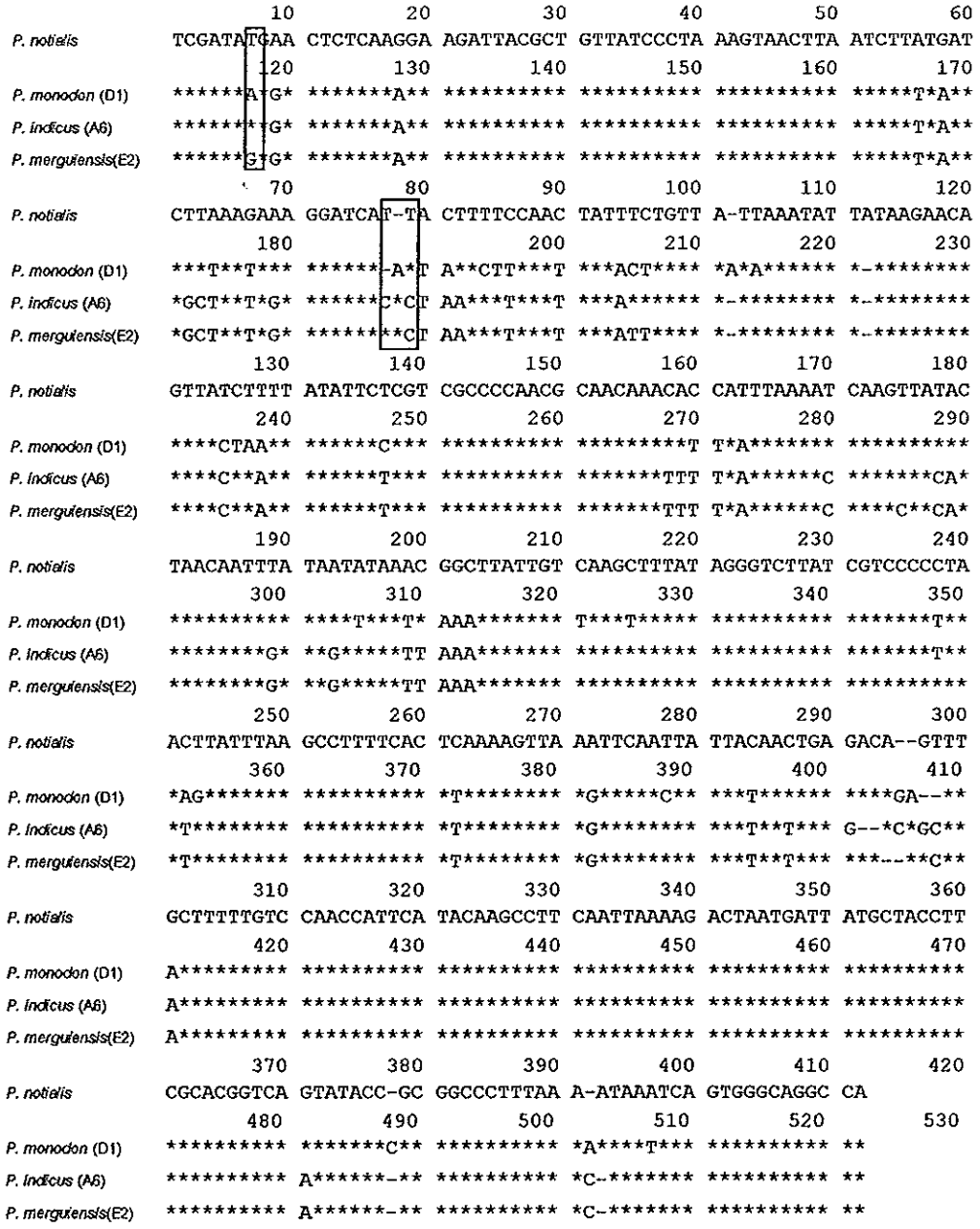
(*) แทนตำแหน่งที่มีลำดับเบสตรงกัน

(□) บริเวณที่มีลำดับเบสต่างกัน]



รูปที่ 3.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของกุ้ง *P. indicus* (A6) *P. merguiensis* (E2) และ *P. monodon* (D1) โดยการเปรียบเทียบดีเอ็นเอของ 16S rDNA ตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 561 จำนวน 561 bp (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 เป็นส่วนของ 16S rDNA จริง จึงได้นำลำดับเบสไปเทียบเคียงกับลำดับเบสดีเอ็นเอจากกุ้งหรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูลธนาคารยีน ได้ผลสรุปว่าเป็นดีเอ็นเอของ 16S rDNA จริง และมีความใกล้เคียงกับลำดับเบสของ *P. notialis* จากธนาคารยีน ดังรูปที่ 3.22 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS ได้ผลสรุปดังรูปที่ 3.23

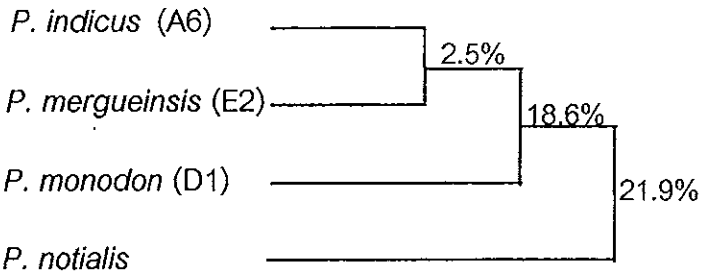


รูปที่ 3.22 เปรียบเทียบลำดับเบสของของกุ้ง *P. monodon* (D1) *P. indicus* (A6) และ *P. merguiensis* (E2) จากการใช้ primer mtD-32 และ mtD-34 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียบริเวณ 16S rDNA กับ *P. notialis* (16S rDNA) จากธนาคารยีน

[สัญลักษณ์ (-) แทนตำแหน่งที่ไม่มีลำดับเบส

(*) แทนตำแหน่งที่มีลำดับเบสตรงกัน

(□) บริเวณที่มีลำดับเบสต่างกัน]



รูปที่ 3.23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกุ้ง *P. indicus* ,*P. merguiensis* *P. monodon* และ *P. notialis* ด้วย 16S rDNA ด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ homology กับ *P. notialis* ตั้งแต่เบสที่ 110 ถึงเบสที่ 512 (วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNASIS)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งธรรมชาติที่ยังคงมีอยู่เป็นจำนวนมากในทะเลรอบประเทศไทย แม้จะยังไม่มีการเลี้ยงด้วยระบบหนาแน่นอย่างเช่นกุ้งกุลาดำ แต่ก็เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ต้องการการพัฒนาอย่างต่อเนื่องสำหรับการเพาะเลี้ยงที่ยั่งยืน ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงคือการคัดเลือกพันธุ์ที่ดี โดยในการคัดเลือกจะต้องนำเครื่องหมายระดับโมเลกุลจำนวนมากมาใช้สำรวจพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติและในบ่อเลี้ยง

เครื่องหมายระดับโมเลกุลมีอยู่หลายประเภท การพัฒนาและนำไปใช้งานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักสองประการคือ วัตถุประสงค์ของงานและงบประมาณที่มีอยู่ เนื่องจากการศึกษาเรื่องเครื่องหมายระดับโมเลกุลของกุ้งแชบ๊วยเป็นเรื่องที่ยังไม่มีผู้ใดศึกษามากนัก ปัญหาหลักที่พบคือการจำแนกชนิดที่ถูกต้องระหว่างกุ้งแชบ๊วย, *P. indicus* และกุ้งแชบ๊วย, *P. merguiensis* ตลอดจนการพิสูจน์สมมติฐานของการเกิด hybrid ดังนั้นในที่นี้เพื่อให้การทำงานบรรลุเป้าหมายและใช้งบประมาณเหมาะสมประกอบกับงบประมาณที่จำกัด ในที่นี้ผู้วิจัยจึงดำเนินการศึกษาแยกออกเป็นสองหัวข้อหลักคือ

1. การศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากนิวเคลียสจากงานวิทยานิพนธ์ของปิยนันท์ ดวงทอง (ปิยนันท์ ดวงทอง, 2542) และจันทน์ผา ตันธนา
2. ศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย

ในปี 2542 จันทน์ผา ตันธนา ได้โคลนดีเอ็นเอจากแบบแผน RAPD หลายโคลนและศึกษาไปเพียง 5 โคลน ส่วนที่เหลืออีก 2 โคลน ได้แก่ S3 และ S4 ยังไม่ได้ศึกษาต่อ จากการวิเคราะห์การเรียงลำดับเบสของโคลน S4 พบว่าที่ประกอบด้วยเบสซ้ำ ๆ เป็นชุดแบบไมโครแซทเทิลไลท์อยู่จำนวน 15 ชุด โคลนที่ได้นี้มีความสมบูรณ์คือได้ลำดับเบสของ 5′ และ 3′ ของ repeated sequence ซึ่งเป็น conserve sequence ไว้ด้วย ทำให้ใช้ในการออกแบบ specific primer อนึ่งในที่นี้ยังไม่ได้แสดงรายละเอียดของลำดับเบสต้องรอจนกว่าข้อมูลจะได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร ในที่สุดได้ออกแบบ specific primer 1 คู่ และตั้งชื่อว่า specific primer S4 ซึ่งเมื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งจำนวน 36 ตัว ได้ผล

การทดลองที่สรุปได้ว่า specific primer S4 มีความจำเพาะกับกุ้งแชบ๊วยทั้งสองชนิด โดยแต่ละตัวอย่างมีแบบแผนของผลผลิต PCR เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว เกิดจากจำนวนชุดของ repeated units ไม่เท่ากัน แบบแผนที่เกิดขึ้นนี้ใช้แยกแต่ละตัวได้ เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกในอนาคต marker ชนิดที่ 2 ที่ได้ศึกษาในที่นี้คือ ดีเอ็นเอของโคลน 787 ซึ่งจันทน์ผา ตันธนา ได้โคลนไว้ 2 ชิ้นคือ 787/1 และ 787/2 ผลการเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งสองพบว่าเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกัน โดย 787/2 มีขนาดเล็กกว่า 787/1 ส่วนที่หายไปของ 787/2 เป็นส่วนสำคัญที่พบใน 787/1 คือโคลนของ 787/1 ประกอบด้วยลำดับเบสขนาด 73 bp ที่มีความเหมือนกันอยู่ 1 คู่ (เป็น long repeated sequences) ลำดับเบสที่อยู่ภายในและบริเวณใกล้เคียงกับ 73 bp repeated sequences นี้ยังประกอบด้วย tandem repeat ขนาด 8 bp อยู่ 12 ชุด ดังนั้นเมื่อมี deletion ใน 787/2 จำนวน 8 bp repeated units เหล่านี้ก็เปลี่ยนแปลงไปการพบเช่นนี้ทำให้ตั้งสมมติฐานขึ้นว่าตัวอย่างกุ้งแต่ละตัวอาจมีจำนวนหรือลักษณะของ 8 bp repeated units ที่แตกต่างกัน แต่จากการทำ PCR โดยใช้ specific primer 787/1 ที่ออกแบบมาเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างอื่น ๆ พบว่าได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดของดีเอ็นเอไม่ต่างจากโคลน 787/1 มากนัก และความแตกต่างมีไม่หลากหลายเท่าที่ควรแสดงว่าตำแหน่งดีเอ็นเอ (locus) ที่ specific primer 787/1 ไปจับนั้นมีเพียงไม่กี่ alleles หรืออาจกล่าวได้ว่าไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ อย่างไรก็ตามยังมีความสนใจต่อว่า long repeated sequences และ tandem repeats เช่นนี้จะมีอยู่ที่ส่วนอื่นของจีโนมหรือไม่ จึงได้ลองนำโคลน 787/1 มาใช้เป็น probe ติดฉลากด้วย DIG แล้วนำไปใช้ hybridize กับโครโมโซมดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และตรึงบนไนลอนเมมเบรน ผลการทดลองพบแถบเพียงลาง ๆ จนไม่แน่ใจว่าจะเป็น false positive หรือไม่ ได้ทำการทดลองซ้ำหลายครั้งแต่ได้ผลเช่นเดิม เข้าใจว่าใช้โครโมโซมดีเอ็นเอในปริมาณน้อยเกินไป เพราะหาก locus นี้เป็น single copy locus ก็ทำให้ตรวจสอบด้วยวิธี hybridization ได้ยากต้องใช้โครโมโซมดีเอ็นเอปริมาณมากขึ้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เราศึกษาข้างต้น ต่างเป็นดีเอ็นเอที่มาจากนิวเคลียสและเป็นส่วนของ noncoding region เป็นที่ทราบกันดีว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่บริเวณเหล่านี้ยกเว้นส่วนที่เป็นไมโครแซทเทิลไลท์ จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ เมื่อเทียบกับ

ส่วนของดีเอ็นเอที่มาจากออแกแนล (Krawczak และ Scmidtke, 1994) ซึ่งในที่นี้ได้แก่ ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย จากการศึกษาดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียของทั้งพืชและสัตว์ (Simon *et al.*, 1994) พบว่าการเรียงตัวของยีนที่อยู่ภายในค่อนข้างจะไม่เปลี่ยนแปลง การเรียงลำดับเบสของบางส่วนของยีนไม่เปลี่ยนแปลง (conserve region) ในขณะเดียวกันมีส่วนของลำดับเบสที่มีการเปลี่ยนแปลง (variable region) การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่เกิดขึ้น หากเลือกบริเวณที่เหมาะสมมาศึกษาจะพบว่าสามารถนำข้อมูลมาใช้หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ดี ไม่ว่าจะเป็น systematic analysis หรือ phylogenetic analysis หรือการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ส่วนที่เป็น conserve sequences ของ third domain ของยีน 12S rRNA และ 16S rRNA มาเป็น primer สำหรับเพิ่มปริมาณของ 12S rDNA และ 16S rDNA ของตัวอย่าง *P. monodon*, *Metapenaeus* sp., *P. indicus* และ *P. merguiensis* นำผลผลิต PCR ไปหาการเรียงลำดับเบสแล้วเปรียบเทียบการเรียงลำดับเบสที่ได้ ผลการทดลองพบความแตกต่างของลำดับเบส ความแตกต่างที่เกิดขึ้นสามารถแยกชนิดของ *Metapenaeus* sp., *P. monodon* และกุ้งแชบ๊วยออกจากกันได้ โดยการตัดผลผลิต PCR ของ 12S rDNA ด้วยเอนไซม์ *Alu*I, *Bgl*II และ *Sau*3AI แต่การที่จะแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ออกจากกันต้องวิเคราะห์จากการเรียงลำดับเบสและสามารถสรุปเบสที่แตกต่างกันได้ 3 แห่ง คือเบสที่ 100-105 ของ *P. monodon* มีเบสเป็น TTATTA ในขณะที่ *P. indicus* เป็น TTATTG และ *P. merguiensis* เป็น CTGTTA เบสที่ 148-149 ของ *P. monodon* มีเบสเป็น TC ในขณะที่ *P. indicus* เป็น TT และ *P. merguiensis* เป็น CT และเบสที่ 189-190 ของ *P. monodon* มีเบสเป็น TC ในขณะที่ *P. indicus* เป็น CT และ *P. merguiensis* เป็น TT เมื่อนำความแตกต่างของเบสไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 410 ได้ข้อสรุปว่าลำดับเบสของ *P. indicus* และ *P. merguiensis* แตกต่างกัน 6.9% และทั้งสองต่างจาก *P. monodon* 19.7% เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ *P. vannamei* พบความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่ง 100-105, 148-149 และ 189-190 ในกุ้งทั้ง 4 ชนิด ส่วนผลการศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA ได้ข้อสรุปว่าการตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ *Alu*I สามารถใช้แยกชนิดของ *P. monodon*, *Metapenaeus* sp. และกุ้งแชบ๊วยออกจากกันได้ แต่การแยก *P. indicus*

และ *P. merguiensis* ต้องสำรวจจากลำดับเบสโดยเบสที่ 23-25 ของ *P. indicus* เป็น AAG ในขณะที่ *P. merguiensis* เป็น TTG เบสที่ 117 ของ *P. indicus* เป็น T ในขณะที่ *P. merguiensis* เป็น G และเบสที่ 187-189 ของ *P. indicus* เป็น CAC ในขณะที่ *P. merguiensis* เป็น TAC ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสตั้งแต่เบสที่ 1 ถึงเบสที่ 561 ให้ข้อสรุปว่าลำดับเบสของ *P. indicus* มีความแตกต่างกับ *P. merguiensis* 2.7% และทั้งสองต่างจาก *P. monodon* 14.7% นอกจากนั้นเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ *P. notialis* พบความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่ง 187-189 ในกุ้งทั้งสี่ชนิด

ผลการศึกษาด้วย 12S rDNA และ 16S rDNA ข้างต้น ได้ข้อสรุปในเรื่องการนำมาใช้จำแนกชนิดเช่นเดียวกับที่ศึกษาในกุ้งชนิดอื่น คือ *P. notialis*, *P. schmiti* (Machado, 1992) และ *P. japonicus* (Bouchon, 1994) ด้วยเครื่องหมายระดับโมเลกุลนี้เมื่อนำไปร่วมกับเครื่องหมายบน loci อื่นบนจีโนมของนิวเคลียส (nuclear genome) จะช่วยให้สรุปในอนาคตว่ามีการผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่าง *P. indicus* และ *P. merguiensis* หรือไม่

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเครื่องหมายระดับโมเลกุล ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากนิวเคลียส และเครื่องหมายดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรีย ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

1. สามารถใช้ specific primer S4 ซึ่งเป็น primer ที่มีความจำเพาะกับกุ้งแชบ๊วยในการแยกแต่ละตัว
2. ได้ใช้ specific primer 06/1 ในการสำรวจแบบแผนดีเอ็นเอจากตัวอย่างเพิ่มเติม และเก็บข้อมูลนี้ไว้เพื่อการวิเคราะห์ร่วมกับ maker อื่นต่อไปในอนาคต
3. ได้โคลน third domain ของยีน 2 ชนิด คือ 12S rDNA และ 16S rDNA ด้วยวิธี PCR ศึกษาการเรียงลำดับเบสที่สอดคล้องและมี homology กับยีนเดียวกัน แต่จากกุ้งต่างชนิดกัน

4 ผลการย่อยผลผลิต PCR ของ 12S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเอนไซม์ *Alu*I, *Bgl*II และ *Sau3*AI สามารถที่แยกชนิดของ *Metapenaeues* sp., *P. monodon* และกุ้งแชบ๊วยได้ แต่ในการแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ต้องใช้ความแตกต่างของลำดับเบสซึ่งแตกต่างกัน 6.9%

5 ผลการย่อยผลผลิต PCR ของ 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเอนไซม์ *Alu*I สามารถที่แยกชนิดของ *Metapenaeues* sp., *P. monodon* และกุ้งแชบ๊วยได้ แต่ในการแยก *P. indicus* และ *P. merguiensis* ต้องใช้ความแตกต่างของลำดับเบสซึ่งแตกต่างกัน 2.7%

6. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของกุ้งชนิดอื่น ๆ พบว่ากุ้งแชบ๊วยมีลำดับเบสของ 12S rDNA ต่างจาก *P. monodon* 29.8% และต่างจาก *P. vannamei* 26.2% และมีลำดับเบสของ 16S rDNA ต่างจาก *P. monodon* 18.6% และต่างจาก *P. notialis* 21.9%

เอกสารอ้างอิง

เครือเจริญโภคภัณฑ์. 2542. ตลาดกุ้ง. ข่าวกุ้ง. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์. 10(126) : 1-4

ประจวบ หลำอุบล. 2531. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. ในกุ้ง. หน้า 51-70 ฝ่ายการศึกษาสำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปิยนันท์ ดวงทอง. 2542. ศักยภาพของการใช้แบบแผน RAPD สำหรับการศึกษาพันธุกรรมของกุ้ง วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Bagshaw,J. C. and Buckholt, M.A. 1997. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei.* Gene. 184:211-214

Bielawski, J. P., Noak, K. and Pumo, D.E. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. J. BioTechniques. 18:856-860

Bimboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7:1513-1523

Boehringer Mannheim Biochemeca. 1997. Protocol of DIG DNA Labeling and Detection Kit. United States of America.

Bouchon,D., Souty-Grosset,C and Raimond, R. 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identify in two penaeid shrimp species:*Penaeus monodon* Frabricius and *P. japonicus* Bate. Aquaculture. 127:131-144

Brzuzan, P., Luczynski, M. and Kuznair, P.A. 1998. Mitochondrial DNA variation in two samples of northern pike, *Esox lucius* L. Aquacultue research. 29:521-526

Cavalli-Sforza, L.L. 1998. The DNA revolution in population genetics. TIG. 14(2):60-65

Cheng, S. and Stoneking, M. 1994. Complete mitochondrial genome amplification. Nature. 7:351-352

Edward, K.J., Barker, J.H.A., .Dally, A., Jones, C. and Karp, A. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequence in plants. BioTechniques. 20:758-760

Estoup, A., Largiadë, C.R., Perrot, E.. and Chourrout, D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. Mol. Mar. Biol. and Biotechnology. 5(4):295-296

Fischer, D. and Bachmann, K. 1998. Microsatellite Enrichment in Organisms with Large Genomes (*Allium cepa* L.) BioTechniques 24:796-802

Fontaine, P-M., Dodson, J.J. and Bernatchez, L. 1997. A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) microsatellite. J. Fish. Aquat. Sci. 54:2434-2442.

Hanahax, D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids Mol. Biol. 166:557-580

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

Grey, D., Dall, W. and Baker, A. 1983. A Guide to the Australian Penaeid Prawns. pp:58-90 Northern Territory Government Printing office, Australia.

Hansen , M.M., Mensberg, K-L., Rasmusen, G.,and Simonsen, V. 1997. Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. Aquaculture. 153:15-29

Hearne, C. M. and Ghosh, S. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. TIG. 8(8): 288-294

Hoelzel, A.R. and Green, A. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. *In* Molecular Genetic Analysis of populations: a practical Approach. (ed. by A. R.. Hoelzel), pp.159 – 168. Oxford University Press, New York.

Innis, M.M. and Gelfand,D.H. 1990. Optimization of PCRs. *In* PCR Protocol : A Guide to Methods and Application. (ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J. Sninsky), pp. 3-12 Acadamic Press, Inc, San Diego, Califoria.

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

Krawczak, M. and Schmidtke, J. 1994. The genetic background. *In* DNA Fingerprint. pp.1-15. Information Press, UK.

Lewin, Benjamin. 1994. Organelle genomes are circular DNA molecules that for organelle protein. *In* Gene V. pp. 735. Oxford University Press, New York.

Machado, E.G., Dennebouy, N., Suarez, M.O., Mounolou, J-C., and Monnerot, M. 1993. Mitochondrial 16S-rRNA gene two species of shrimps : sequence variability and secondary structure. Crustaceana. 65(3):279-286

May, B., Krueger, C.C., and Kincaid, H.L. 1997. Genetic variation at micosatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54:1542-1547

Meyer,A. 1994. DNA technology and ohylogeny of fish. *In* Genetic and Evolution of Aquatic Organisms. (ed. by A.R. Beaumont) pp. 225-226. Chapman & Hall. UK.

Ostrander, E.A., Jong, P.M., Rine, J. and Duyk, G. 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:3419-3423

Promega Corporation. 1997. Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Instructions for use of products. United States of America.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Clonning A Laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York.

Sankoff, D., Leduc, A., Antoine, N., Paquin, B. and Lang, B.F. 1992. Gene order comparisons for phylogenetic inference: evolution of the mitochondrial genome. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:6575-6579

Skibinski, D.O.F. 1994. DNA Technology and genetics of aquatic Invertebrates. *In* the Genetic and Evolution of Aquatic Organisms. (ed. by A.R. Beaumont) pp. 177-199. Chapman & Hall UK.

Tegelstrom, H. 1992. Detection of mitochondrial DNA Fragments. *In* Molecular Genetic Analysis of Populations: a practical Approach. pp.89 (ed. by A. R. Hoelzel. Oxford University Press, New York.

Wieener, R.J., Swift, H. and Zak, R. 1991. Purification of mitochondrial DNA from total cellular DNA of small tissue samples. Gene. 98:277-281

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 1 ลิตร

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม

2. บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ

10x*Alu*I Buffer = 50 mM NaCl
6 mM Tris-HCl, pH 7.5
6 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Bgl*II Buffer = 100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7.9
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Cla*I Buffer = 50 mM potassium acetate
20 mM Tris-acetate , pH 7.9
10 mM Magnesium acetate
1 mM DTT

10x*Dra*I Buffer = 50 mM potassium acetate
20 mM Tris-acetate , pH 7.9
10 mM Magnesium acetate
1 mM DTT

10x*Eag*I Buffer = 100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7.9
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10xHinfI Buffer = 50 mM NaCl
90 mM Tris-HCl, pH 7.5
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Nco*I Buffer = 50 mM Potassium acetate
20 mM Tris acetate, pH 7.9
10 mM Magnesium acetate
1 mM DTT

10x*Pst*I Buffer = 100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7.9
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Rsa*I Buffer = 50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7.9
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Sua*3AI Buffer = 50 mM NaCl
10 mM Bis Tris propane-HCl, pH 7.0
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Xba*I Buffer = 50 mM NaCl
50 mM Tris-HCl, pH 7.9
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10x*Xho*I Buffer = 50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7.9
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

10xT4 ligase buffer = 300 mM Tris-HCl, pH 7.8
100 mM $MgCl_2$
100 mM DTT
10 mM ATP

3. การเตรียม RNase A 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง RNase A 100 มิลลิกรัม มาละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris HCl, pH 7.5 และ 15 mM Sodium Chloride ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

4.1 Amplicilin

ชั่ง Ampicilin sodium salt 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2 Tetracyclin

ชั่ง Tetracyclin 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอสต่อเอทธานอล (1:1) 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ในที่มืด

5. การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับอิเล็กโตโฟลิซิส

5.1 Tris-Borate (10xTBE)

ชั่ง Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA, pH 8.0 40 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5.2 Tris-Acetate (50xTAE)

ชั่ง Tris base 242 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA, pH 8.0 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

6. การเตรียม polyacrylamide gel electrophoresis ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

	เปอร์เซนต์ความเข้มข้นของเจลระดับต่าง ๆ	
สารละลาย	8%	10%
30% Acrylamide (ml)	2.66	3.33
10xTBE (ml)	1.00	1.00
น้ำกลั่น (ml)	6.34	5.67
10%APS (µl)	150	150
TEMED (µl)	10	10

7. 1 unit ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ หมายความว่า ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยดีเอ็นเอ ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 60 นาที ภายใต้สภาวะของแต่ละเอนไซม์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวจรรยา รังษีธรรม

วัน เดือน ปีเกิด 19 เมษายน 2508

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2529