รายงานการวิจัย

เรื่อง

การโคลนและหาลำดับเบสของตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล ชนิดไมโครแซทเทลไลทจากกุ้งแชบ๊วย

(*Penaeus merguiensis, Penaeus indicus*)

Cloning and Sequencing of Microsatellite Marker from Banana Prawn

(*Penaeus merguiensis, Penaeus indicus*)

โดย

รศ. ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์

ทุนงบประมาณโครงการวิจัย ประจำปี 2543 – 2544

ลักษณะของการวิจัย	การวิจัยเพื่อการพัฒนา
แผนงานวิจัย	เพื่อพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แผนงานย่อย	วิจัยเพื่อพัฒนาโครงสร้างพื้นฐานด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ประเภทของงานวิจัย	งานวิจัยพื้นฐานและประยุกต์
สาขาวิชาการที่ทำการวิจัย	ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล
คำสำคัญของเรื่องที่ทำการวิจัย (Keywords)	*Penaeus sp.*, Microsatellite, Molecular Marker

รายงาน ณ วันที่ 22 สิงหาคม พ.ศ. 2545

สมอ

เลขหมู่ QP624.5.S26 OAA 2545 ฉ. 1

Bib Key 227104

บทคัดย่อ

ได้เตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA library) โดยวิธี subtractive hybridization เพื่อเพิ่มจำนวนเฉพาะดีเอ็นเอที่มีส่วนของ repeated unit ของ CT(หรือ GA), GT (หรือ CA) และ TAA ทั้งนี้เพื่อง่ายต่อการค้นหา ย่นระยะเวลา และงบประมาณ ที่จะต้องหาการเรียงลำดับเบสของโคลนที่ไม่เกี่ยวข้อง ในที่สุดได้ห้องสมุด 3 ชนิด แล้วทำการค้นหาจนได้โคลนที่คาดว่าส่วนใหญ่น่าจะเป็น microsatellite DNA ทั้ง 3 ประเภท จำนวน 102 โคลน แต่ด้วยงบประมาณที่จำกัด และ จะต้องเรียนรู้ให้ได้เสียก่อนว่าห้องสมุดที่เตรียมไว้นั้นดีหรือไม่ จึงได้สุ่มตัวอย่างไปหาการเรียงลำดับเบสทั้งสิ้น 67 โคลน พบ microsatellite DNA 37 ชุด สามารถนำไปใช้ออกแบบ primer ได้ 7 ชุด และอีก 1 ชุด ออกแบบมาจากงาน RAPD เมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่จับได้จากแหล่งต่างๆของประเทศไทย พบว่า primer ACT1 และ S4 ใช้ได้ผลเพราะได้ polymorphic bands จะนำ primer ทั้งสองนี้ไปใช้ศึกษาโครงสร้างประชากรของกุ้งแชบ๊วยต่อไป

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ 2

บทคัดย่อ 3

สารบัญเรื่อง 4

สารบัญตารางและภาพ 6

คำอธิบายสัญลักษณ์หรือคำย่อที่ใช้ในการวิจัย 7

บทนำ 8

1. **ความสำคัญ ที่มา ของปัญหาที่ทำการวิจัย** 8

2. **วัตถุประสงค์ของโครงการ** 9

3. **ประโยชน์ที่ได้รับ** 9

4. **บททบทวนเอกสาร** 10

การจำแนกชนิดด้วยสัณฐานวิทยา 10

การแยก *P. merguiensis* และ *P. indicus* ด้วย morphometric และ Isozymes 13

เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จาก RAPD 15

ไมโครแซทเทลไลท (microsatellite) 15

วิธีดำเนินการวิจัย 16

1. **การเตรียมตัวอย่างกุ้ง** 16

2. **การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด** (Total DNA) **จากกุ้ง** 16

3. **การเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอ** 16

4. **การค้นหาไมโครแซทเทลไลทดีเอ็นเอจากห้องสมุดดีเอ็นเอ** 16

5. การทำ Subtractive hybridization 17

6. หาการเรียงลำดับเบสของแต่ละโคลน 17

7. การออกแบบและสังเคราะห์ primer 17

8. การวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis 17

ผลการทดลอง 18

วิจารณ์ 22

สรุปและเสนอแนะ 26

เอกสารอ้างอิง 24

ภาคผนวก 26

สารบัญภาพและตาราง

รูปที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของร่างกายและการเรียกชื่อ..... 10

รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบต่างๆของ Carapace..... 11

ตารางที่ 1 แสดงการแยกชนิดด้วยสัณฐานวิทยา..... 12

รูปที่ 3 แสดงความแตกต่างของ Third Maxilleped ที่ใช้แยกชนิดของกุ้ง 4 ชนิด ซึ่งมีรายละเอียดคือ..... 13

รูปที่ 4 แสดงระยะที่ใช้ในการคำนวณ morphometric เพื่อแยกชนิด *P. merguiensis* และ *P. indicus*..... 13

ตารางที่ 2 แสดงค่า MORPHOMETRIC ที่ใช้จำแนกกุ้ง 2 ชนิดตามข้อมูลของ PENDREY และ คณะ..... 14

รูปที่ 5 แสดงแบบแผน MDH ที่ใช้จำแนก *P. merguiensis* และ *P. indicus* รายงานโดย Pendrey และ คณะ 14

รูปที่ 6 แสดงผลการ HYBRIDIZATION ด้วย $(GT)_{15}$ PROBE..... 18

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทั่วไปของ MICROSATELLITE ที่พบ..... 19

ตารางที่ 4 แสดง PRIMER สำหรับ MICROSATELLTIE ที่พัฒนาได้..... 19

รูปที่ 7 แสดง polymorphism ของ ตัวอย่างจำนวน 29 ตัวอย่างที่ถูก amplify โดย primer ACT1..... 20

รูปที่ 8 แสดงผลการ amplify ตัวอย่างต่างๆด้วย primer S4..... 21

คำอธิบายสัญลักษณ์หรือคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

β	beta
°C	degree celcius
µg	microgram
µl	microlitre
µM	micromolar
M	Molar
mM	milimolar
pmole	picomole
g	gram
mg, ml	miligram, mililitre
ng	nanogram
bp	base pair
Kb	kilobase
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotidetriphosphates
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
SDS	sodium dodecyl sulphate
TAE	Tris-acetate-EDTA
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloric acid

บทนำ

1. ความสำคัญ ที่มา ของปัญหาที่ทำการวิจัย

ทะเลโดยรอบประเทศไทยประกอบด้วยกุ้งนานาชนิด สมนึก วงศ์ ชัยเทียมและคณะได้เคยสำรวจชนิดและแหล่งที่อยู่ของกุ้งเมื่อปี พ.ศ. 2535 ได้ระบุชนิดที่พบเป็นจำนวนมากได้แก่กุ้งกุลาดำ (Black tiger prawn) กุ้งกุลาลาย (Flower) กุ้งแชบ๊วย (White หรือ Banana) และกุ้งโอคัก (Pink) เป็นต้น เฉพาะกุ้งกุลาดำเท่านั้นที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ดีในระบบหนาแน่น แต่ก็ต้องอาศัยพ่อ แม่พันธุ์ จากทะเล การเพาะเลี้ยงที่มากขึ้นก่อให้เกิดผลเสียตามมาคือการระบาดของโรคและการขาดแคลนพ่อ แม่พันธุ์ ที่ดีในอนาคต แนวความคิดหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาปัญหาดังกล่าวคือนำกุ้งชนิดอื่นมาสลับเลี้ยงและพยายามเตรียมพ่อแม่พันธุ์ในบ่อทดลองแทนการจับจากธรรมชาติ ในส่วนของการเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดอื่น กุ้งแชบ๊วยนับเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย เป็นที่นิยมบริโภค และราคาในตลาดโลกมักสูงกว่ากุ้งกุลาดำ (ข้อมูลจาก Kiang Huat Sea-Gull Trading Frozen Food Co.,Ltd., Songkla) การเพาะพันธุ์สามารถทำได้ง่าย ปัจจุบันยังสามารถหาพ่อแม่พันธุ์ได้ง่ายจากธรรมชาติ ดังนั้นหากเราเริ่มทำการศึกษาและทดลองเสียตั้งแต่ตอนนี้ก่อนที่ปริมาณในธรรมชาติจะลดลงไปอันเนื่องจากการใช้ทรัพยากรอย่างฟุ่มเฟือย เราก็จะได้ข้อมูลสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงและการจัดการทรัพยากรในอนาคต

กุ้งแชบ๊วยเป็นชื่อรวมๆมาจากภาษาจีนแปลว่าหางเหลือง ในหนังสือคู่มืออนุกรมวิธานจัดไว้เป็นกุ้งขาว (white prawn) ประกอบด้วย 4 ชนิดคือ *Penaeus merguiensis* (Banana Prawn) *Penaeus indicus, Penaeus silasi* และ *Penaeus penicillatus* ตารางที่ 1 แสดงสรุปการแยกกุ้งทั้ง 4 ชนิดนี้ออกจากกันด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีความใกล้เคียงกันมาก โอกาสแยกชนิดผิดเกิดขึ้นได้สูงโดยเฉพาะในเพศเมีย ด้วยเหตุนี้ในปี 2539 ผู้วิจัยจึงได้เริ่มโครงการซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก สวทช. ประจำปีงบประมาณ 2539-254 1(1, 2)ได้นำเทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) มาใช้สำรวจหา polymorphic band โดยหวังว่าจะใช้จำแนกชนิดกุ้งได้ ซึ่งในครั้งนั้นได้ให้ความสนใจระหว่าง *P. merguiensis* และ *P. indicus* ในที่สุดก็ได้ DNA markers ออกมาจำนวนหนึ่ง และได้นำมาศึกษาเพิ่มเติมในโครงการวิจัยนี้ ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยดังกล่าวทำให้ทราบว่า *P. merguiensis* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการศึกษาในกุ้งกุลาดำ และยังพบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาจนเกิดความไม่มั่นใจว่ากุ้งที่เลือกมาและจำแนกว่าเป็นชนิดใดด้วยวิธี morphology (3, 4) จะน่าเชื่อถือและใช้ได้กับตัวอย่างที่จับมา จึงได้นำเทคนิคไอโซไซม์ (MDH) และ morphometric ซึ่งรายงานโดย Pendrey (5) และคณะมาช่วย (ดูหัวข้อบทตรวจเอกสาร) ในการทดลองกับตัวอย่างจำนวนมากปรากฏว่าพบตัวอย่างที่มีค่า morphometric ใกล้เคียงกับ *P. indicus* เพียงไม่กี่ตัวอย่าง ส่วนมากเป็น *P. merguiensis* และแบบแผน isozyme ของ MDH ก็ไม่เป็นไปตามที่ Pendrey ศึกษาไว้ เพราะแบบแผนที่ได้ส่วนใหญ่เป็น heterozygous ดังนั้นจึงมีคำถามว่า ตัวอย่าง *P. mergueinsis* ของ

เรานั้นเป็น *P. merguiensis* แท้ๆทั้งหมดหรือไม่ ถ้าไม่ส่วนที่ไม่แท้เกิดจากอะไร เป็นไปได้หรือไม่ที่เกิดจากการปะปนของ *P. silasi* (ในรายงานของสมนึก (3) บุว่าพบ *P. penicillatus* นอกทะเลไทย จึงตัดประเด็นการปนของ *P. penicillatus*) หรือว่าเกิดเป็น hybrid ตัวอย่างที่เคยแยกไว้ว่าเป็น *P. indicus* จะเชื่อว่าถูกต้องได้หรือไม่เนื่องจากผลของ morphometric และ isozyme pattern ไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย morphology ประกอบกับเมื่อตรวจสอบรายงานของสมนึกและคณะโดยละเอียดพบว่าไม่มีรายงานเรื่อง *P. indicus* ในขณะที่รายงานของ Grey และคณะแสดงการกระจายตัวของ *P. indicus* ว่ามีอยู่ในทะเลโดยรอบประเทศไทยด้วย การที่จะตอบคำถามเหล่านี้ได้จึงต้องอาศัย molecular markers มาช่วย

เราอาจแบ่ง molecular marker ได้เป็น marker จาก nuclear DNA และ จาก organelle หรือ mitochondrial DNA การศึกษา nuclear DNA จะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับศึกษา molecular systematics และ evolution ส่วนข้อมูลการเรียงลำดับเบสของ mitochondrial DNA ซึ่งมีอัตราการ diverse มากกว่า nuclear DNA 3 เท่า (6) มีความเหมาะสมในการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่เป็น closely related species ดังเช่นกลุ่มของกุ้งแชบ๊วย และยังเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษา population structure ด้วย (7) นอกจากนั้นทั้ง nuclear marker และ mitochondrial marker เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ allozyme marker ก็จะช่วยวิเคราะห์การเกิด hybrid ได้ ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยในประเทศไทยเป็นไปโดยสมบูรณ์ โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนา marker เพิ่มเติมต่อจากงาน RAPD ที่ผ่านมาแล้ว โดยในที่นี้ศึกษาจาก nuclear ชนิด microsatellite DNA เมื่อได้ marker ออกมาจำนวนหนึ่งก็จะนำไปใช้ร่วมกับ marker ที่พัฒนาจากโครงการวิจัยอีกโครงการซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก สวทช. แล้วใช้ marker ที่ได้ทั้งหมดร่วมกันในการศึกษาพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยและวิเคราะห์โครงสร้างประชากรในประเทศไทย (ผู้วิจัยต้องหางบประมาณจากแหล่งทุนอื่นมาเสริมเพราะโครงการวิจัยนี้ถูกตัดทอนงบประมาณไปมาก)

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 เพื่อโคลนและศึกษาลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์กุ้งแชบ๊วย

2.2 พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้และมีการนำไปพัฒนาต่อจนได้เป็นพันธุ์กุ้งแชบ๊วยที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์แล้ว สังคมจะได้รับผลประโยชน์ในด้านต่างๆดังนี้

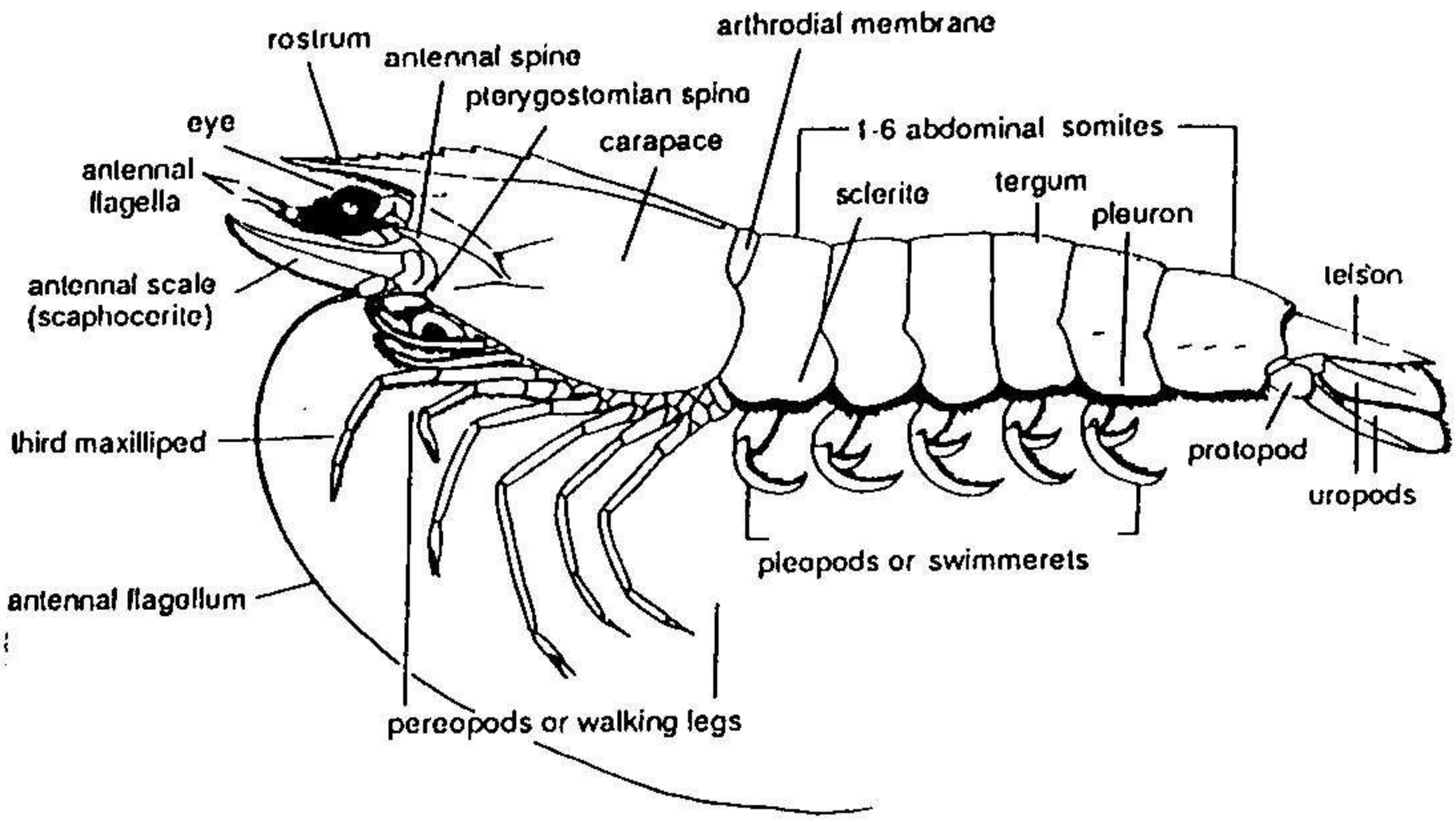
- เกษตรกรมีพันธุ์กุ้งที่มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงได้มากขึ้น เกษตรกรสามารถเลือกเลี้ยงกุ้งที่มีความเหมาะสมกับความชำนาญของตนเอง
- ลดการย้ายพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากขณะนี้มีแนวความคิดที่จะมีการหมุนเวียนประเภทของกุ้งที่เลี้ยงระหว่างกุ้งกุลาดำกับกุ้งประเภทอื่นๆ เพื่อลดความเสี่ยงเกี่ยวกับโรคกุ้ง

ซึ่งหากมีการยอมรับในด้านวิทยาศาสตร์ว่ากุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่มีศักยภาพแล้วจะช่วยให้ผู้เลี้ยงกุ้งไม่ต้องย้ายพื้นที่หรือขยายพื้นที่เลี้ยง

4. บททบทวนเอกสาร

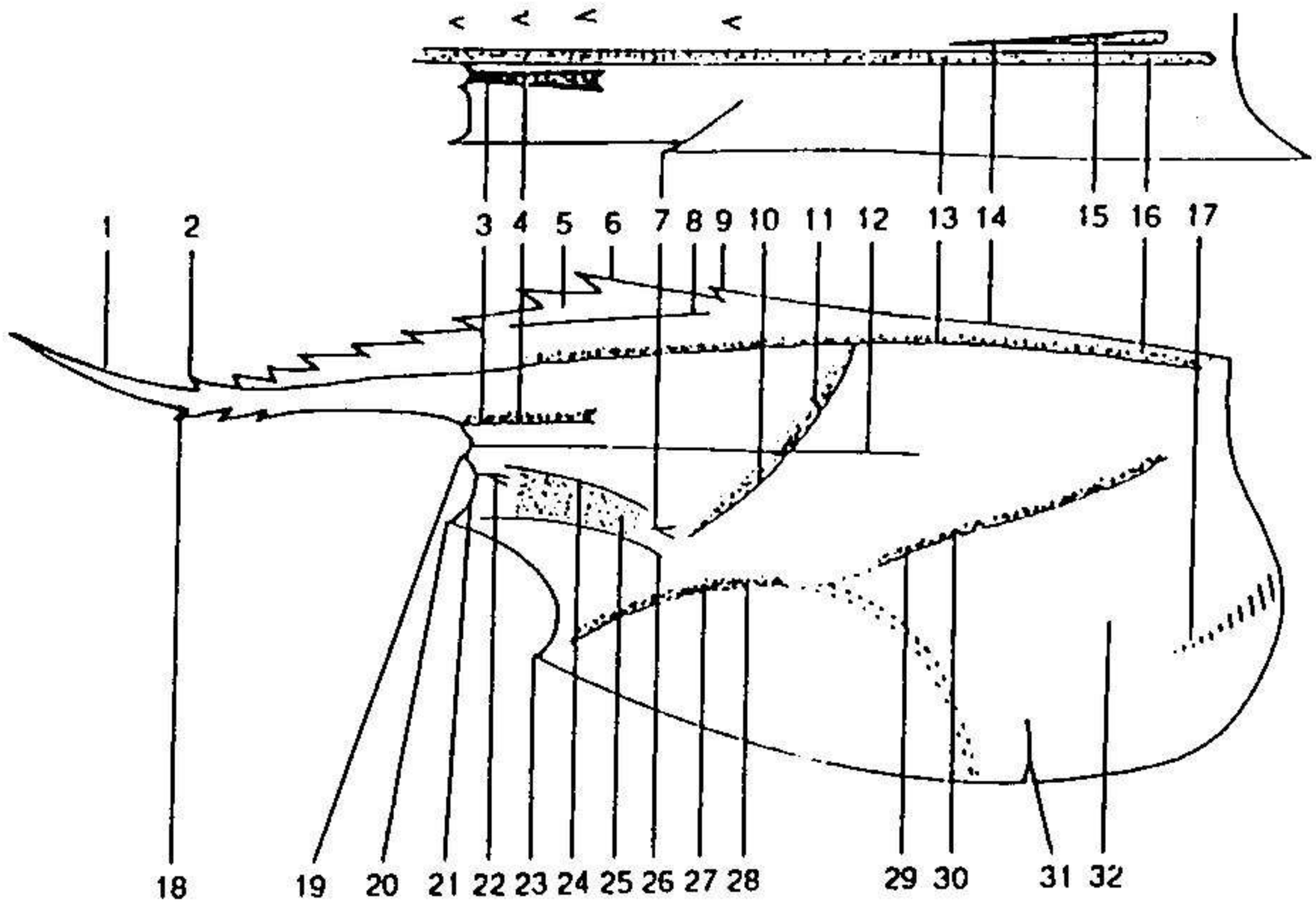
<u>การจำแนกชนิดด้วยสัณฐานวิทยา</u>

รูปที่ 1 และ 2 แสดงส่วนต่างๆและการเรียกชื่อของกุ้งโดยทั่วไป ดัชนีสำคัญที่ใช้ในการแยกชนิดคือการตรวจสอบลักษณะของ Rostral crest, hepatic spine, epigastric tooth, adrosal carina, gastroorbital carina, hepatic carina, third maxilliped



รูปที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของร่างกายและการเรียกชื่อ

(คัดลอกจาก Chaitiamvong and Supongpan, 1992)



1. unarmed portion of rostrum
2. dorsal rostral tooth
3. gastrofrontal carina
4. gastrofrontal sulcus
5. rostral blade
6. rostral crest
7. hepatic spine
8. accessory carina
9. epigastric tooth or spine
10. cervical carina
11. cervical sulcus or groove
12. longitudinal suture
13. adrostral carina
14. postrostral carina
15. postrostral sulcus
16. adrostral sulcus
17. stridulating ridges
18. ventral rostral tooth
19. orbital spine
20. antennal spine
21. postorbital margin
22. postorbital spine
23. pterygostomian spine
24. gastroorbital carina
25. orbito-antennal sulcus
26. antennal carina
27. hepatic carina
28. hepatic sulcus
29. branchiocardiac carina
30. branchiocardiac sulcus
31. transverse suture
32. branchiocardiac region

รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบต่างๆของ Carapace

(คัดลอกจาก Chaitiamvong and Supongpan, 1992)

กุ้งแชบ๊วยจัดอยู่ใน Order Decapoda, Suborder Dendrobranchiata, Superfamily Penaeoidea Rafinesque, Family Penaeidae Rafinesque, Genus *Penaeus* Fabricius แบ่งออกเป็น 4 species ดังต่อไปนี้

1. *Penaeus merguiensis* De Man พบในทะเลอันดามันและอ่าวไทย
2. *Penaeus monodon* Fabricius พบในทะเลอันดามันและอ่าวไทย
3. *Penaeus penicillatus* Alcock พบในทะเลอันดามัน นอกประเทศไทย
4. *Penaeus silasi* Muthu and Motoh พบในทะเลอันดามันและอ่าวไทย

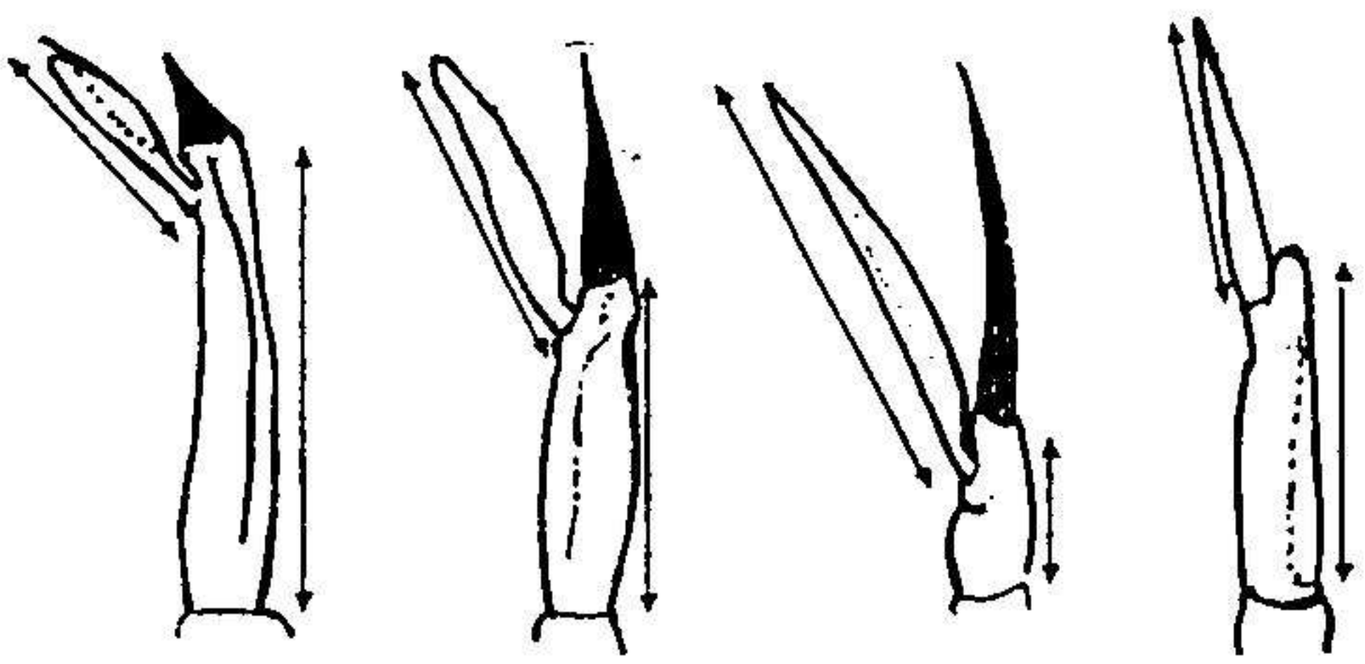
แต่ละ species มีรูปร่างแตกต่างกันตามที่ระบุใน Taxonomic key ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการแยกชนิดด้วยสัณฐานวิทยา

	P. merguiensis	*P. silasi*	*P. indicus*	*P. penicillatus*
1. Rostrum	Shorter; almost straight	Straight	Longer and forming a sigmoid curve	Straight
2. Rostral crest	Higher and more or less triangular	May be elevated, but not triangular	Shallower and not triangular	High and trianhular
3. Adrostral carina	Not reaching epigastric tooth	Reaching epigastric tooth	Reaching epigastric tooth	Reaching epigastric tooth
4. Gastro-orbital carina	Shorter, occupying the middle 1/3 distance between the hepatic spine and the orbital angle	Occupying 2/3 of the distance between the hepatic spine and the orbital angle	Occupying posterior 2/3 distance between hepatic spine and orbital angle	Occupying 1/3 of the distance between the hepatic spine and the orbital angle

(คัดลอกจาก A Guide to Penaeoid Shrimp Found in Thai Waters (3 และ A Guide to Australian Penaeid Prawns (4)

จากตารางเมื่อนำไปใช้สำรวจเพื่อแยก species จากตัวอย่างจริงพบว่าใช้ตรวจสอบได้ลำบาก จึงได้เพิ่มการตรวจสอบรายละเอียดที่สำคัญ คือ ลักษณะของ Third maxilliped ของเพศผู้ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3



a) *Penaeus merguiensis* b) *Penaeus indicus* c) *Penaeus penicillatus* d) *Penaeus silasi*

รูปที่ 3 แสดงความแตกต่างของ Third Maxilleped ที่ใช้แยกชนิดของกุ้ง 4 ชนิด ซึ่งมีรายละเอียดคือ

P. merguiensis De Man (FAO: Banana prawn): Second segment about half as long as distal segment and bearing a tuft of long hairs at tip.

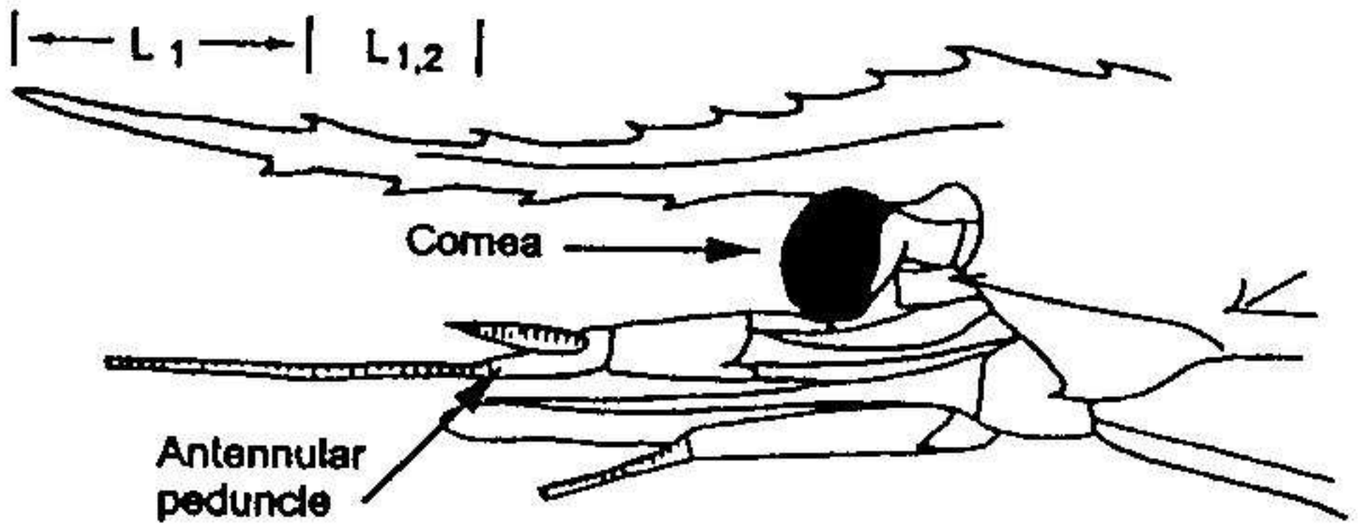
P. silasi Muthu and Motoh (FAO: False white prawn): Second segment as long as distal segment and only bears a rudimentary tuft of hairs at tip

P. indicus Milne Edwards (FAO: Indian white prawn): Second segment as long as distal segment and bearing a tuft of long hairs at tip.

P. penicillatus Alcock (FAO: Red tail prawn): Distal segment much longer than second segment which bears a tuft of dense long hairs (as long as distal segment) at tip.

<u>การแยก *P. merguiensis* และ *P. indicus* ด้วย morphometric และ Isozymes</u>

ในปี 1999 Pendrey และคณะได้ใช้วิธี morphometric และ isozymes จำแนก *P. merguiensis* และ *P. indicus* ที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถใช้ตรวจสอบได้ตั้งแต่ระยะ larvae โดยมีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5



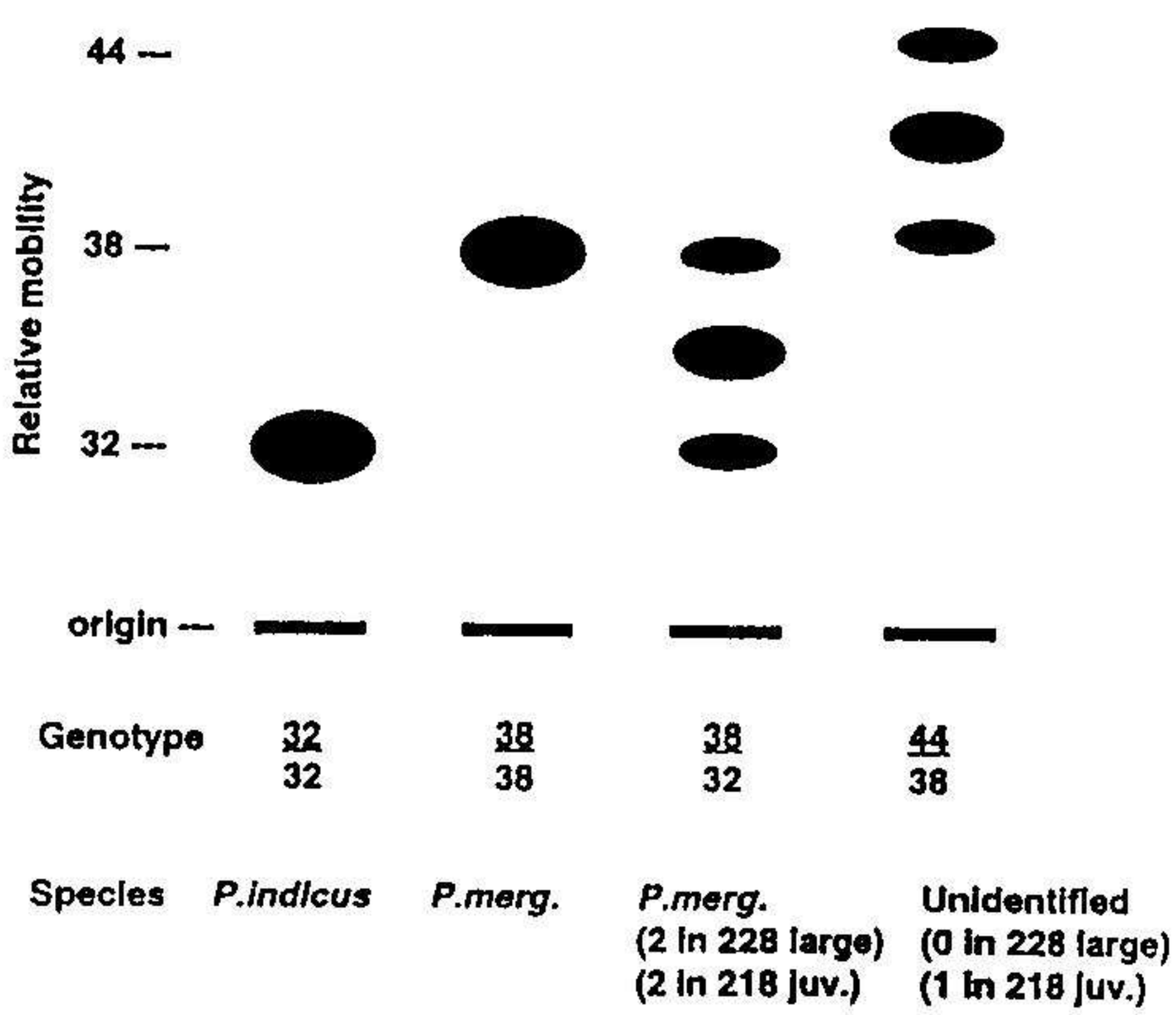
รูปที่ 4 แสดงระยะที่ใช้ในการคำนวณ morphometric เพื่อแยกชนิด *P. merguiensis* และ *P. indicus*

L_1 คือระยะจากปลายของ rostrum จนถึงฟันซี่ที่ 1 และ $L_{1,2}$ คือระยะระหว่างฟันซี่ที่ 1 และ 2

(คัดลอกจาก Pendrey และ คณะ)

ตารางที่ 2 แสดงค่า MORPHOMETRIC ที่ใช้จำแนกกุ้ง 2 ชนิดตามข้อมูลของ PENDREY และ คณะ

Character	*P. merguiensis*	*P. indicus*
$L_1 : L_{1,2}$	1.56 ±+ 0.84	3.16 ±+ 0.82
First tooth to ventral teeth	2-5	2-5
First tooth to ant. peduncle	posterior	Anterior
N. dorsal teeth behind eye	5: 93.9% 6: 6.1%	5: 4.5% 6: 95.5%
Mean carapace length (mm)	5.3. ±0.22	8.2±0.27
Carapace length (mm)	3.1-16.5	3.4-13.1



รูปที่ 5 แสดงแบบแผน MDH ที่ใช้จำแนก *P. merguiensis* และ *P. indicus* รายงานโดย Pendrey และ คณะ

<u>เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จาก RAPD</u>

ด้วยทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัส BT-38-06-API-18-45 ผู้วิจัยจึงได้เริ่มศึกษาพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยโดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (2) ในที่สุดแยกได้ marker สาม ชนิด คือ 06/1, 701/1,787/1 และ S4 อย่างไรก็ตาม DNA marker เหล่านี้ยังไม่เพียงพอ ไม่สามารถแยกกลุ่มกุ้งตามแหล่งต่างๆในประเทศไทยได้ จึงจำเป็นต้องหา marker เพิ่มขึ้นอีกจำนวนหนึ่ง เพื่อศึกษาโครงสร้างประชากรต่อไป ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นการช่วยเพิ่มเติมจำนวน marker ให้

<u>ไมโครแซทเทลไลท (microsatellite)</u>

ไมโครแซทเทลไลท (microsatellite) ดีเอ็นเอ คือเบสที่มีลักษณะเป็น tandem repeat ประกอบด้วยเบสจำนวน 2-6 เบสและมีจำนวนซ้ำได้ตั้งแต่ 10-10^2 ชุดพบกระจายอยู่ทั่วไปอย่าง random ในจีโนม และพบว่าการกระจายอยู่นี้ก่อให้เกิด polymorphism (8-9) ปัจจุบันมีการใช้ไมโครแซทเทลไลทในการศึกษา population genetics ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมของสัตว์บกเช่น วัว แกะ สัตว์น้ำเช่น ปลา sea bass หอยนางรม (10-13) ส่วนในกุ้งก็มีการนำมาศึกษาเช่นกันคือ *P. vannamei*, *P. setiferus* และ *P. japonicus* (14-16) สาเหตุที่เป็นที่นิยมเพราะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ให้ข้อมูลที่ละเอียดและติดตามผลได้แม่นยำ วิธีการก็ไม่ยุ่งยากจนเกินไปนักโดย ก่อนอื่นต้องทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นไมโครแซทเทลไลท นำดีเอ็นเอนั้นมาหาลำดับเบส ลำดับเบสที่อยู่ที่ปลาย 5' และ 3' ของไมโครแซทเทลไลท เป็นลำดับเบสที่ conserve สามารถนำมาใช้ออกแบบ primer ที่จำเพาะได้ แล้วจึงนำ primer ดังกล่าวไปใช้ในการทำ PCR เพื่อแยกความแตกต่างของแต่ละตัวอย่าง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างกุ้ง

เก็บตัวอย่างจากอ่าวไทยได้แก่จังหวัดตราด ระยอง สุราฎธานี นครศรีธรรมราช สงขลา จากทะเลอันดามันได้แก่ จังหวัดระนอง ภูเก็ต และสตูล กุ้งที่ได้ต้องเก็บรักษาโดยแช่เย็นที่ –70°C หรือแช่ใน 95% ethanol ก่อนที่จะนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (Total DNA) จากกุ้ง (ดัดแปลงจาก Ausubel et al,1987, 17)

นำเนื้อเยื่อที่แช่แข็งมาสับให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 % SDS และ 1 ug/ml Protinase K บ่มที่ 55 °C เป็นเวลา 2 ชม. นำไปทำ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 2ครั้งแล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้ 1 % agarose gel electrophoresis

3. การเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 2 มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I , *Hae* II และ *Rsa* I ตรวจสอบผลการย่อยดีเอ็นเอด้วย 1 % agarose gel จากนั้นจึงคัดเลือกโดยตัดดีเอ็นเอขนาด 200 –1000 bp ออกจาก agarose ทำให้บริสุทธิ์ นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมด้วย SNX linker (Halmiton et. al., 1998, 19) ดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อม linker แล้ว ถูกใช้เป็นแม่แบบ (tamplate) ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา 50 µl จะประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 10 µl, 0.8 µM SNX forward primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, เอนไซม์ Tag polymersae (QIAGEN) มีรอบของการเพิ่มจำนวนคือ 96° C 5 นาที 1 รอบ, 94° C 45 วินาที ตามด้วย 60° C 1 นาที และ 72° C 1 นาที จำนวน 40 รอบ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.8 % agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำไปใช้ในการทำ subtractive hybridization (รายละเอียดดูในหัวข้อถัดไป) กับ 5′ biotionylate oligonucleotide { $(TAA)_{10}$,$(CT)_{15}$ และ $(GT)_{15}$ } (11) นำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ subtractive hybridization แล้วมาทำPCR ต่อเพื่อเพิ่มจำนวนอีกครั้งก่อนที่จะนำไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM^{R}-TEasy (Promega) และ transfrom เข้าสู่ *E. coli* Top 10′ ในที่สุดในการทดลองนี้จะได้ 3 ห้องสมุด คือ ห้องสมุดที่มี TAA (TAA enriched library), ห้องสมุดที่มี CT และ ห้องสมุดที่มี GT

4. การค้นหาไมโครแซทเทลไลทดีเอ็นเอจากห้องสมุดดีเอ็นเอ

นำ transformant ทั้งหมดจากแต่ละห้องสมุดไปตรึงบน nylon membrane นำแผ่น membrane ไปอบที่อุณหภูมิ 80° C เป็นเวลา 2 ชม.แล้วจึงนำไปทำ hybridization กับ Probe ที่เป็น $(TAA)_{10}$, $(CT)_{15}$ และ $(GT)_{15}$ ซึ่งติดฉลากที่ปลาย 3′ ด้วย Dioxygenin (DIG) ตรวจสอบผลการ hybridize ด้วยสารละลาย antibody ต่อ DIG และปฏิกิริยาเคมีกับสับสเตรท Nitroblue tetrazolium และ BCIP หากเกิดการจับกันของ probe กับโคลนใดจะเห็นเป็นจุดสีม่วงและจัดเป็น positive clones

5. การทำ Subtractive hybridization (ดัดแปลงจาก Kijai et.al., 1994 และ Halmiton et.al.,1998, 18-19)

นำ streptavidin magnetic beads (Promega) ปริมาตร 50 µl มาล้างด้วย 0.5xSSC 3 ครั้ง และล้างด้วย 6xSSC อีก 1 ครั้ง ละลายเม็ด bead และ 5′ biotionylate oligonucleotide probe {$(TAA)_{10}$, $(CT)_{15}$ หรือ $(GT)_{15}$} ปริมาณ 1 µg ในสารละลาย 6xSSC ให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่านาน 15 นาที จากนั้นจึงล้างเม็ด bead ด้วย 6 xSSC 3 ครั้ง แล้วละลายเม็ด bead กลับด้วย 10xSSC ปริมาตร 35 µl เติมสารละลาย DNA ปริมาตร 65 µl (ปริมาณ DNA 3 µg) ที่ผ่านการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ลงไปได้ปริมาตรรวม 100 µl บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่าตลอดเวลานาน 20 นาที แล้วนำสารละลายที่มีเม็ด bead ไปล้างด้วย 2xSSC 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ ล้างด้วย 1xSSC อีก 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นจึงชะ DNA ออกโดยใช้สารละลาย TE ที่อุ่นที่ 95^0 C ปริมาตร 20 µl บ่มที่ 95^0 C นาน 20 นาที ดูดส่วนใสออกจากเม็ด bead ใส่ลงในหลอดใหม่ นำ DNA ที่ได้ไป purify ด้วย QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) เพื่อใช้เพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ต่อไป

6. หาการเรียงลำดับเบสของแต่ละโคลน

นำ Positive clone ในข้อ 4 ไปเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 ug/ml) เป็นเวลา 16-18 ชม. สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี Alkaline Lysis ดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAprep ^{R} Spin Miniprep Kit ก่อนส่งไปหาการเรียงตัวของลำดับเบสด้วย ABI PRISM^{TM}model 377 automated DNA sequencer (PE Applied Biosystems) วิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม DNASIS

7. การออกแบบและสังเคราะห์ primer

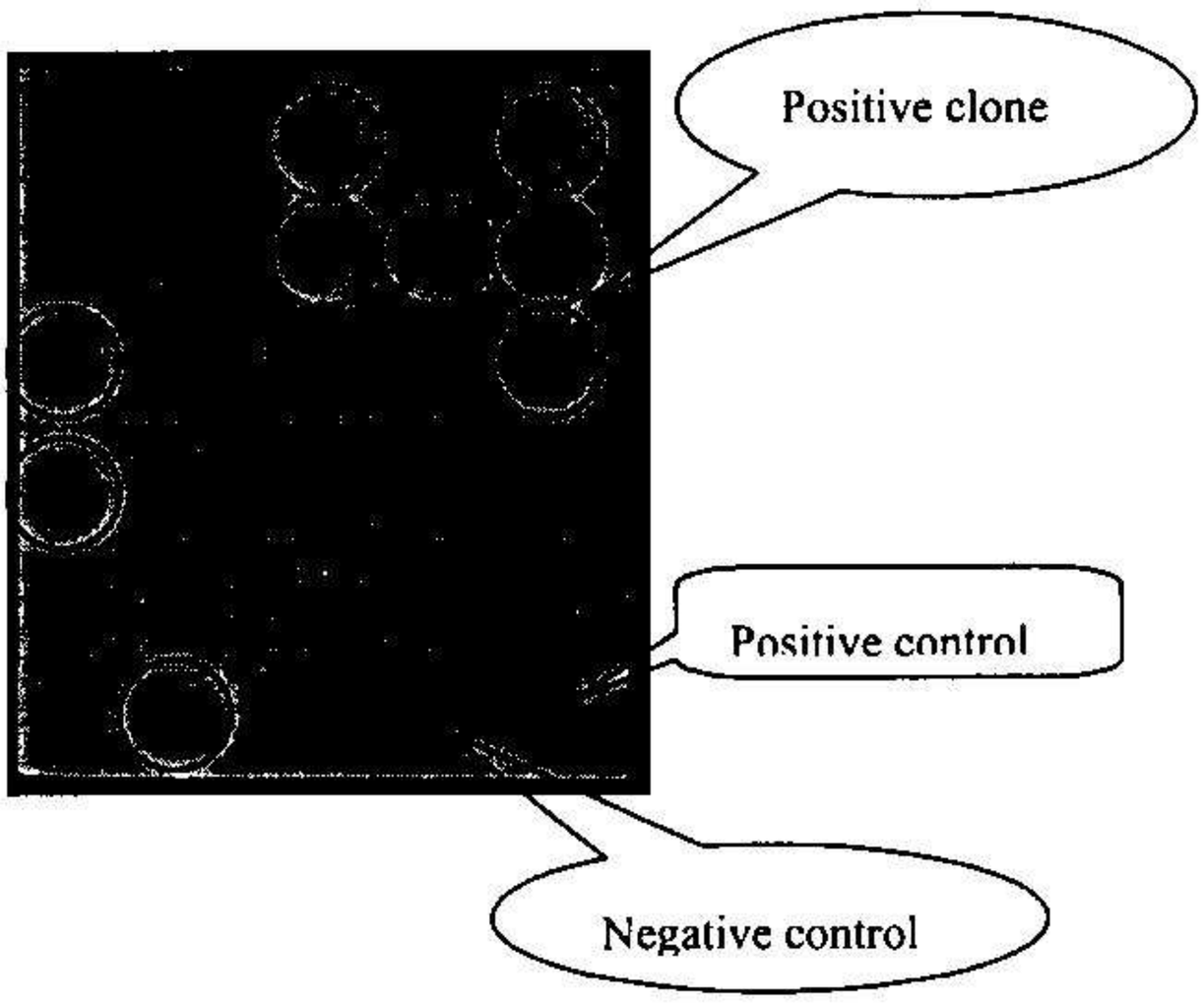
นำลำดับเบสของ microsatellte DNA มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Vector NTI 5 primer เพื่อออกแบบ primer ขนาด (18-22 bp) ซึ่งครอบคลุมปลาย 5' และ 3' ของ microsatellite DNA สังเคราะห์ primer ที่ออกแบบแล้วนำไปตรวจสอบการใช้งานโดยใช้ในปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้ ในปฏิกิริยา 10 µl ประกอบด้วย DNA 100 ng, 0.25mM dNTPmix, 0.8 uM froward และ reverse primer, 1 µM dCTP ที่ติดฉลากด้วย R6G และ 5U Tag polymerase ปรับสภาวะให้เหมาะสมโดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ตั้งแต่ 1.25 – 2.5 mM และมีรอบของ PCR ประกอบด้วย 95°C 10 นาที 1 รอบ, 94°C 1 นาที ตามด้วย anealing tempareture ที่เหมาะสม 1 นาที และ 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72°C เป็นเวลา 15 นาที

8. การวิเคราะห์ผลด้วย electrophoresis

นำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 100% formamide loding dyeปริมาตร 10 µl denature ที่ 95° C เป็นเวลา 5 นาทีก่อนนำไปแยกบน 6% denaturing acrylamide gel ที่ 50 W เป็นเวลา 2-3 ชม. ตรวจสอบผลด้วยโปรแกรม ABI PRISM GeneScan Analysis Version 2.0.2

ผลการทดลอง

จาก DNA library ได้ทำการคัดเลือกหา positive clones โดย hybridize กับ probe ที่เป็น tandem repeat ของ $(TAA)_{10}$, $(CT)_{15}$ และ $(GT)_{15}$ พบว่าได้ positive clones จำนวน 102 clones ดังแสดงบางตัวอย่างของ positive clone ไว้ในรูปที่ 6 จาก positive clones เหล่านี้ได้สุ่มเลือกเพียง 67 โคลนไปหาการเรียงลำดับเบส (สาเหตุที่ไม่ทำทั้งหมดเนื่องจากไม่มีงบประมาณเพียงพอ อย่างไรก็ตามโคลนเหล่านี้ถูกเก็บไว้อย่างดี พร้อมที่จะนำออกมาหาการเรียงลำดับเบสต่อไปเมื่องบประมาณอำนวย) ในจำนวนนี้พบ 37 โคลนที่มีลักษณะของ microsatellite โดย 17 โคลนมีลักษณะเป็น CT/GA repeat มีความยาวเบสซ้ำที่ยาวที่สุดของ CT/GA repeat คือ 21 ซ้ำ อีก 13 โคลน เป็น GT/CA repeats และ 7 โคลน เป็น TAA/ATT repeats ลักษณะของ microsatellite ที่พบทั้งหมดประกอบด้วยแบบ perfect, imperfect และ compound ดังแสดงสรุปในตารางที่ 3 และลำดับเบสของทั้ง 67 โคลนแสดงไว้ในภาคผนวก



รูปที่ 6 แสดงผลการ HYBRIDIZATION ด้วย $(GT)_{15}$ PROBE

ลักษณะของ microsatellite ส่วนใหญ่ที่ได้เป็นแบบ imperfect repeats การออกแบบ primer เพื่อ amplify ส่วนของ microsatellite จะออกแบบจาก บริเวณปลายทั้ง 2 ข้าง (5', 3') ของ microsatellite ซึ่งจากลำดับเบสทั้ง 37 ที่มีลักษณะของ microsatellite สามารถออกแบบเป็น primer ได้เพียง 7 คู่ (การเรียงลำดับเบสและลำดับเบสของแต่ละ primer ขอสงวนไว้รายงานใน manuscript) นำ primer ทั้ง 7 คู่ไปใช้ในการทำ PCR กับตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ผลการ amplify สรุปไว้ในตารางที่ 4 โดยพบว่ามีเพียง ACT 1 และ primer S4 ที่ได้จากการทดลองเก่าเท่านั้นที่ให้ polymorphic bands ดังแสดงในรูปที่ 7

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทั่วไปของ MICROSATELLITE ที่พบ

	Motif		
	TAA	CT	GT
number of positive clones	15	23	64
number of sequencing clones	15	23	29
number of microsatellite	7	17	13
perfect	no	5	7
imperfect	6	9	4
compound	1	3	2
most of common repeats	4	4 - 9	4 - 5
largest repeats	5	21	10

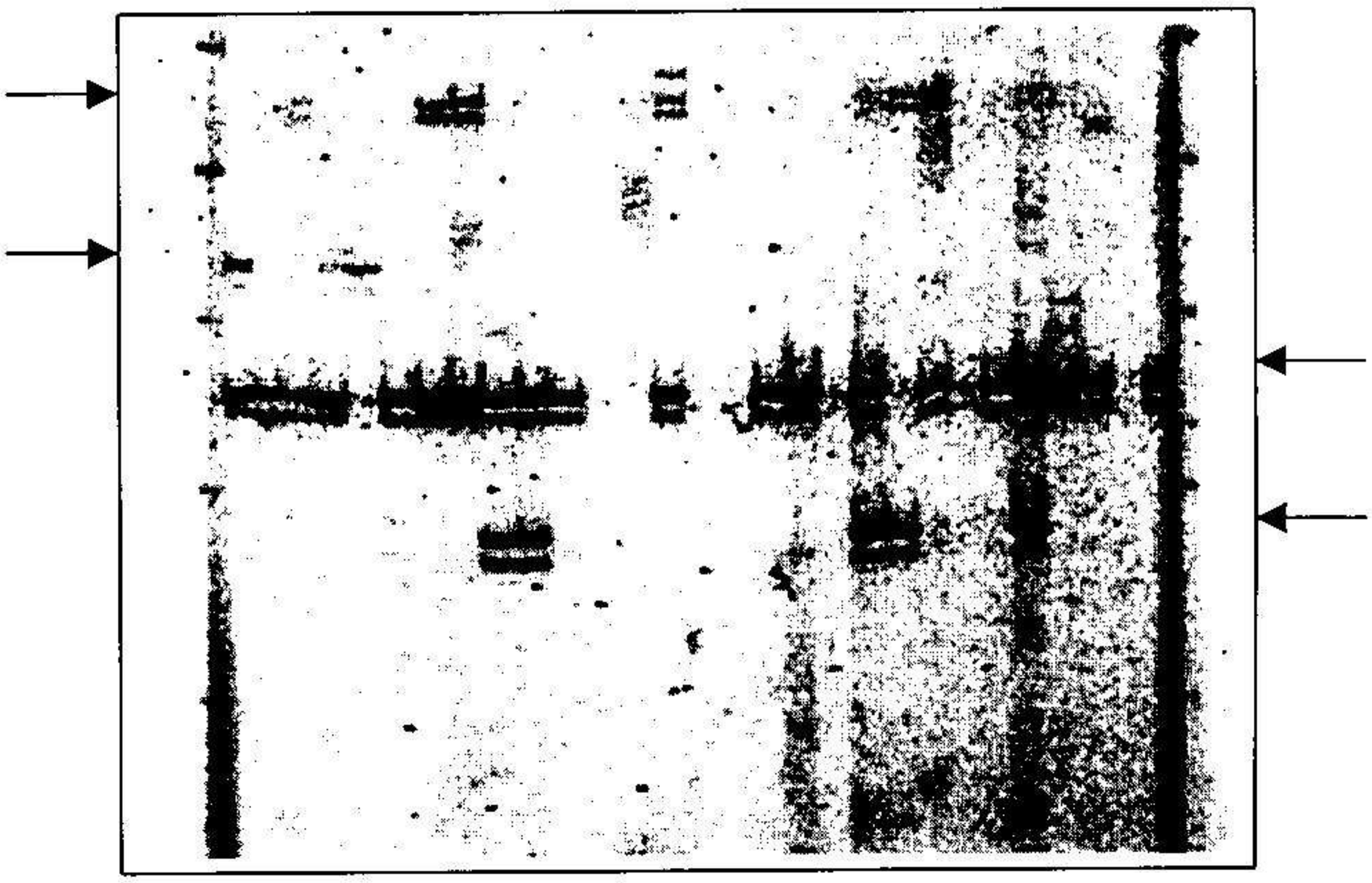
ตารางที่ 4 แสดง PRIMER สำหรับ MICROSATELLTIE ที่พัฒนาได้

Primer	sequence 5'-3'	Repeats	annealing	$MgCl_2$	No. alleles	Allele size(bp)
ACT 1	จะรายงานไว้ใน manuscript	$(CT)_{20}$	52^0C	1.5	4*	190-240
ACT 15	ACC ATC TCT CTC GCT CGT GC GGC GTA GAG TAG GGT AGA G	$(CCGT(CT)_4)_5CCGT(CTCCAT)_5$	50^0C	1.5	-	นับไม่ได้
ACT 26	AAT TAC TGC CCG GGA CGA CC GGT AGC TCT ATG TAT GGG GAG G	$(CT)_{21}$	50^0C	1.5	-	นับไม่ได้
ACT 31	CGC TGG CAC TAC GAA TAC GG CGT CTG TCT CTT AGT TTG TC	$(CT)_{11}$	45^0C	1.75	-	นับไม่ได้
ACT 38	CGG GGG CGT GTT CAT GTG TT CAT GCG GGT TTC TCT CTC TC	$(GA)_{16}(GAAAGA)_4(GA)_5$	45^0C	1.5	-	นับไม่ได้

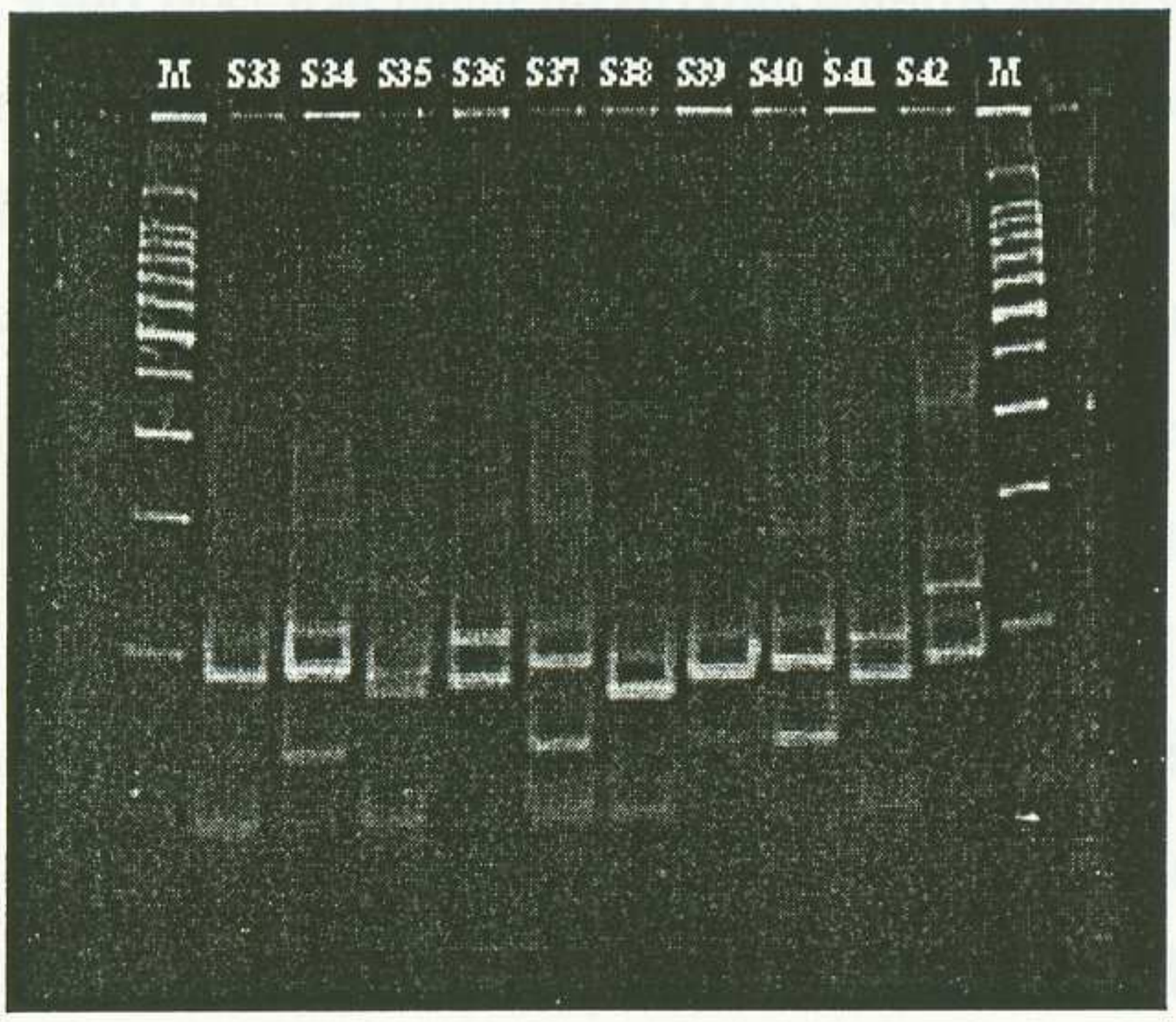
Central Library
Prince of Songkla University

Primer	sequence 5'-3'	Repeats	annealing	$MgCl_2$	No. alleles	Allele size(bp)
EAB 1	CGA ACC TCT TTT CGC TTG CC AAG ATT GCC TTT CCG GTA CC	$(GAA)_7(GA)_{13}TAAA(GA)_8$	45^0C	1.5	-	นับไม่ได้
MAW3	CCA CCT TCA CCA TCA CCA T GAG TTC CCT CAC TTG CTC G	$(CA)_{42}CG(CA)_8CGCAGA(CA)_{19}$	50^0C	2	Amplify ไม่ได้	นับไม่ได้
S4	จะรายงานไว้ใน manuscript	$(TAA)_n$				

รูปที่ 7 แสดง polymorphism ของ ตัวอย่างจำนวน 29 ตัวอย่างที่ถูก amplify โดย primer ACT1 (ลูกศรแสดง polymorphic band)



รูปที่ 8 แสดงผลการ amplify ตัวอย่างต่างๆด้วย primer S4



วิจารณ์

ได้ใช้เทคนิค subtractive hybridization คือนำ tandem repeat ที่สนใจเช่นในที่นี้คือ CT, GA และ TAA ซึ่งถูก label ด้วย biotin แล้วทำให้เกาะติดกับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magenetic beads สายดีเอ็นเอของ tandem repeat จะทำหน้าที่ดึงกลุ่มของ microsatellite DNA ที่มีเบสได้คู่สมกับตัว repeat ที่ใช้ เช่น CT ทำหน้าที่ ดึง GA ออกจาก total genomic DNA เอาไว้เป็นต้น ทำให้ดีเอ็นเอที่ติดอยู่บน magnetic beads มีแต่ (enrich) ด้วยดีเอ็นเอที่มี repeat ที่ต้องการ เมื่อชะออกมาแล้วนำไปเพิ่มจำนวนด้วย PCR แล้วนำ PCR product ไปเชื่อมกับเวคเตอร์และ transform เข้าสู่ host ก็จะได้เป็น microsatellite enrichment library ในที่นี้ได้ทำการทดลองเตรียมออกมาได้ 3 libraries ผลการสุ่มนำโคลนไปหาการเรียงลำดับเบสพบว่าประมาณ 50% เป็น microsatellite DNA จริง ส่วนที่เหลือเป็น sequence อื่นๆ แม้ในที่นี้ยังไม่มีความสำคัญ แต่ข้อมูลที่ได้ถูกเก็บเป็น data base อาจมีประโยชน์ในอนาคต

Microsatellite DNA ที่ได้เป็นทั้งแบบ perfect, imperfect และ compound ซึ่งความต้องการส่วนใหญ่ต้องการแบบ perfect ที่มีจำนวนของ repeat สูง แต่พบว่าในการทดลองครั้งนี้พบสูงสุดเพียง 21 repeats เข้าใจว่าเกิดจากประสิทธิภาพที่จะโคลนชิ้นขนาดใหญ่มีต่ำ ทำให้โคลนที่ได้มีขนาดเล็กประมาณ 300-500 bp ซึ่งไม่ครอบคุลมเพียงพอที่จะออกแบบ primer ได้ดี อย่างไรก็ตามสามารถออกแบบ specific primers 7 ชุด และชุดที่ 8 ได้จากข้อมูล sequence ของงาน RAPD เมื่อนำ primer ทั้งหมดไปใช้ทำ PCR กับตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่างๆของประเทศเพื่อตรวจสอบ polymorphism ก็ปรากฏว่าได้ primer ACT 1 และ S4 ที่ให้ผลการทดลองออกมาดี และสามารถนำไปใช้ศึกษา population genetics ต่อซึ่งเป็นขั้นตอนต่อไป โดยผู้วิจัยได้นำ primer ทั้ง 2 ชุดไปใช้ร่วมกับ primer ที่ได้รับการพัฒนาจากเทคนิคอื่น คือ DALP, EPIC (ทุนวิจัยโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกของ น.ส. วราพร วรรณนา), Mitochondrial DNA, ITS1 (ทุนวิจัย สวทช.) ซึ่งขณะนี้ได้ทำไปแล้ว และ อยู่ในขั้นตอนการประมวลผลรายงานใน manuscript เรื่อง Population studies of *Penaeus merguiensis* in Thai water.

สรุปและเสนอแนะ

จากการทดลองทั้งหมดจะเห็นว่าการพัฒนา primer แต่ละชุดจะต้องใช้เวลา และ งบประมาณ ทั้งนี้เนื่องจากจะต้องใช้หลายเทคนิคมาประกอบกัน และแต่ละเทคนิคจะต้องจบที่การหาการเรียงลำดับเบสซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้น ตัวอย่างในโครงการวิจัยนี้ได้ผลการเรียงลำดับเบสจาก 67 โคลน ราคาค่า sequence เพียงรอบเดียว (ทำปลายเดียว) เป็นเงิน 67 X 1200 = 80,400 บาท แต่ในความเป็นจริงต้องทำ 2 ครั้ง/1โคลน และยังไม่รวมที่ทำเสีย ซึ่งงบประมาณของโครงการวิจัยนี้ได้ถูกตัดทอนลงไปจากที่ขอไว้เดิมมาก จึงเหลือโคลนที่รอ sequence อยู่อีกประมาณสองร้อยกว่าโคลนที่อาจให้ marker ที่ดีต่อไปได้ อย่างไรก็ตามเพื่อให้งานวิจัยสามารถดำเนินต่อไปได้ ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะนำ primer เท่าที่มีอยู่ลองศึกษากับตัวอย่างก่อนแล้ววิเคราะห์ผลเพื่อให้ได้ข้อมูลประชากรเบื้องต้น โดยไม่จำเป็นต้องหา marker จากโคลนที่คงค้างในขณะนี้ (ผลวิเคราะห์กับตัวอย่างต้องรอสรุปรวมกับ marker อื่นซึ่งจะรายงานใน manuscript) ผลสรุปจากงานวิจัยในเบื้องต้นนี้จะเป็นแนวทางให้ผู้วิจัยสามารถวางแผนการทดลองในช่วงต่อไปโดยพัฒนา marker มาเพิ่มเติมอีกเพียงไม่มาก ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้งบประมาณมากอีก นอกจากนี้ก็ทำให้ห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยมี marker สะสมไว้สำหรับพัฒนาใช้กับสัตว์น้ำชนิดอื่นได้อย่างรวดเร็ว (สังเกตได้จากห้องปฏิบัติการของ Prof. F. Bohnomme ประเทศฝรั่งเศสซึ่งทำเรื่องสัตว์น้ำมานาน มี marker สะสมไว้จำนวนมากโดยมีจำนวน primer กว่า 500)

เอกสารอ้างอิง

1. อมรรัตน์ พงศ์คารา วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ อุดส่าห์ จันทน์อำไพ 2541 เรื่องการจำแนกชนิดกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค RAPD รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรมของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2. Phongdara, A., Chotigeat, W., Chandumpai, A., P. Duangtong and Tanthana, C. 1999. Identification of *Penaeus merguiensis* and *Penaeus indicus* by RAPD-PCR derived markers. Science Asia 25, 143-151
3. Chaitiamvong, S. and Supongpan, M. (1992) A Guide to Penaeoid Shrimps Found in Thai Waters. Asean-Australia Marine Science Project: Living Coastal Resources. Australian Institute of Marine Science Townsville, Australia.
4. Grey, D.L. and Dall, W. (1983) A Guide to the Australian Penaeid Prawns Northern Territory Government.
5. Pendrey, R.C. , Loneragan, N.R., Kenyon, R.A. and Vance, D.J. (1999) Simple morphometric characters, confirmed by gel electrophoresis, separate small juvenile banana prawns (*Penaeus indicus* and *Penaeus merguiensis*). *Mar. Freshwater Res*, 50, 677-80.
6. Palumbi, S.R. and Cipriano, F. 1998. Species identification using genetic tools: The value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. J. Hered. 89, 459-464.
7. Beaumont, A.R. 1994. In *Genetics and evolution of aquatic organisms* (eds A.R. Beaumont), Chapman & Hall, London, pp. 227-229.
8. Krawczak, M. and Schmidtke, J. 1994. In DNA Fingerprinting BIOS Scientific Publishers Ltd. United Kingdom
9. Beckmann, J.S. and Soller, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Bio/Technology 8:930-932
10. Crawford, A.M., Montgomery, G.W., Oierson, C.A., Brown, T., Dodds, K.G., Sunden, S.L.F., Henry, H.M., Ede, A.J., Swarbrick, P.A., Berryman, T., Penty, J.M. and Hill, D.F. 1994. Sheep linkage mapping: nineteen lingkage groups derived from the analysis of paternal half-sib families. Genetics, 137: 573-579
11. Garcia de Leon, F.J., Dallas, J.F., Chatain, B., Canonne, M., Versini, J.J. and Bonhomme, F. 1995 Development and use of microsatellite markers in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serrandidae). Mol Mar. Biol. Biotechnol. 4: 62-68.

12. Naciri, Y., Vigouroux, Y., Dallas, J., Desmarais, E., Delsert, C. and Bonhomme, F. 1995. Identification and inheritance of $(GA/TC)_n$ and $(AC/GT)_n$ repeats in the european flat oyster *Ostrea edulis* (L.) Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4:83-89.

13. Stettan, A., Olsaker, I. and Lie, O. 1993. Isolation and characterization of variable $(GT)_n$ repetitive sequences from Atlantic salmon (Salmo salar L.). Animal Genetic. 24 : 62-68.

14. Wolfus, G.M., Garcia, D.K., Alcivar-Warren, A. 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. Aquaculture. 152 : 35-47

15. Ball, A.O., Leonard, S. and Chapman, R.W. 1998. Characterization of $(GT)_n$ microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). Molecular Ecology. 7 : 1247-1263.

16. Moore, S.S., Whan, V., Davis, G.P., Byrne, K., Hetzel, D.J.S. and Preston, N. 1999. The development and application of genetic marker for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 173 : 19-32.

17. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston,R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987) Current protocals in molecular biology. Greene Publishing Associats and Wiley-Interscience.

18. Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S., Garbett, C.A. and Thomas, M.S. 1994. Enrichment of Microsatellites from the citus Genome Using Biotinylated Oligonucleotide Sequences Bound to streptavidin-Coated Megnetic Particles. Biotechniques.16 : 657-662.

19. Hamilton, M.B., Pincus, E.L., Fion, A.D. and Fleischer, R.C. 1999. Universal Linker and Ligation Procedures for construction of Genomic DNA libraries Enriched for Microsatellies. Biotechniques. 27 : 500-507.

ภาคผนวก

ข้อมูลรายละเอียด DNA sequences ของทุกโคลนที่ได้จากงานนี้มิได้เผยแพร่ในที่นี้ ผู้สนใจติดต่อขอรายละเอียดได้ที่ผู้วิจัย รศ. ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์