รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรมฉบับสมบูรณ์

เสนอ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

โครงการวิจัย พัฒนา และวิศวกรรม **รหัส BT-38-06-API-18-45**

ชื่อโครงการ (ไทย) **การจำแนกชนิดกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค RAPD**

(อังกฤษ) **Genotypic identification of banana prawn by using RAPD**

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ไทย) **นางอมรรัตน์ พงศ์ดารา**

(อังกฤษ) **Mrs. Amornrat Phongdara**

ตำแหน่ง **รองศาสตราจารย์**

ที่ทำงาน **ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์**
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

โทรศัพท์ **(074)-211030~49 ต่อ 2618**

โทรสาร **(074)-212801 หรือ (074)-446656**

E-mail **pamornra@ratree.psu.ac.th**

ผู้ร่วมโครงการ **1. นายอุดส่าห์ จันทร์อำไพ**

ที่ทำงาน **ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์**
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

โทรศัพท์ **(074)-211030~49 ต่อ 2631**

โทรสาร **(074)-212801**

E-mail **causa@ratree.psu.ac.th**

2. นางสาววิไลวรรณ โชติเกียรติ

ตำแหน่ง **ผู้ช่วยศาสตราจารย์**

ที่ทำงาน **ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์**
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

โทรศัพท์ **(074)-211030~49 ต่อ 2618**

โทรสาร **(074)-212801 และ (074)-446656**

E-mail **cwilaiwa@ratree.psu.ac.th**

สงขลา

เลขหมู่ QL444.M33 อ44 ว545

Bib Key 237702

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมและปัจจัยหลายประการที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบหนาแน่น แต่ในทางปฏิบัติปรากฏว่าไม่สามารถเลี้ยงกุ้งให้มีขนาดโตตามความต้องการของตลาดและติดโรคง่าย ซึ่งสาเหตุประการหนึ่งอาจมาจากการใช้พ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้งที่ไม่เหมาะสม จากการตรวจสอบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาพบว่ากุ้งแชบ๊วยในประเทศไทยมีอยู่สองชนิด คือ *Penaeus merguiensis* และ *Penaeus indicus* ซึ่งมีรูปร่างใกล้เคียงกันมากและบางครั้งพบกุ้งที่มีรูปร่างไม่แน่นอนจนเกิดความสับสนว่าควรจะจัดอยู่ในชนิดใดแน่ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่ใช้แยกชนิดได้ดีนอกเหนือไปจากการแยกด้วยรูปสัณฐาน ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบชนิดกุ้งที่กระจายอยู่ในประเทศไทยได้ ตลอดจนไม่สามารถคัดเลือกชนิดที่เหมาะสมเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่นได้ งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) มาใช้ตรวจสอบความแตกต่างของกุ้งสองชนิดนี้ ในที่สุดพบแถบดีเอ็นเอที่น่าสนใจซึ่งเมื่อนำไปศึกษาลำดับเบสและออกแบบ specific primers ได้ 3 ชุด พบว่าสามารถไปใช้ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างได้เป็นแบบแผนต่าง ๆ อย่างน้อย 7 แบบแผน สำหรับแยกชนิดของ *P. merguiensis* และ *P. indicus* โดย *P. merguiensis* มีแบบแผนเป็นแบบที่ 3-7 ในขณะที่พบแบบแผนแบบที่ 1 และ 2 ใน *P. indicus*

Abstract

Several lines of evidene have suggested a high potential for intensive farming of banana prawn in Thailand. However, farming experiences for the banana prawns show that they do not grow to marketable sizes and are susceptible to diseases. It was suggested that seed quality, i.e., broodstock selection may be the cause of the failure in intensive farming of banana prawn. Banana prawns are found in Thailand in fact included two genera which are very similar in morphology, namely, *P. merguiensis* and *P. indicus*. Apart from the morphology, which is sometime ambigous to interprete, there are no any other reliable method to identify these two species. Therefore, the study of genetic variations among banana prawns and the broodstock selection for intensive farming can not be done. In this study, the DNA patterns obtained from random amplified polymorphic DNA (RAPD) were compared between *P. merguiensis* and *P. indicus*. Several specific DNA fragments were isolated and sequenced. Three pairs of primer were desired for the PCR reactions, at least 7 haplotypes were observed and used as genetic markers for the species identity. Type 3-7 were found in *P. merguiensis* and type 1-2 were observed in *P. indicus*

สารบัญเรื่อง

บทที่		หน้า
1.	บทนำ	1-6
2.	วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัยฯ	7-12
3.	ผลการวิจัย	13-42
4.	ข้อวิจารณ์	43-48
	สรุปและข้อเสนอแนะ	49
	เอกสารอ้างอิง	50-51

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงลำดับเบสของ RAPD primer 9-10
2. แสดงลักษณะเปรียบเทียบของ *P. merguiensis* และ *P. indicus* 13
3. แสดงตัวอย่างกุ้งทั้งหมดและชนิดของบางตัวอย่างที่แยก โดยสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์ 14
4. แสดงส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง 19
5. สรุปข้อมูลของโคลนของดีเอ็นเอที่สนใจพร้อมลำดับเบส ของ specific primer ที่ออกแบบจากโคลนนั้น ๆ 40

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงส่วนต่างๆของกุ้งแชบ๊วยพร้อมชื่อเรียก	3
2.	แสดงโครงสร้างของอวัยวะเพศของกุ้งสองชนิด	4
3.	แสดง restriction map ของเวคเตอร์ pGEM-T Easy	11
4.	แสดงแบบแผนไอโซไซม์ของตัวอย่างกลุ่ม A และ E บน 5% polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อย้อมเจลด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ A) ADH, B) G-6-PDH, C) SCDH และ D) 6-PDH	17-18
5.	แสดงแบบแผนดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง 2 ตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐาน (phenol/chloroform extraction) และ ที่ใช้ Chelex^{R}100	20
6.	แสดงแบบแผน RAPD ที่ได้จากการทำ screening เพื่อหา primer ที่เหมาะสม	21
7.	แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer OPC 06	24
8.	แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 114	25
9.	แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 150	26
10.	แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 701	27
11.	แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 787	28
12.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างกลุ่ม A และ กลุ่มE ที่ได้จากการเปรียบเทียบแบบแผน RAPD จาก primer ห้าชนิดคือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787	29
13.	แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอของโคลน 06/1 และ 06/2	30

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14.	แสดงลำดับเบสของโคลน 06/1 พร้อม putative coding frame	32-33
15.	แสดงลำดับเบสของโคลน 06/2 พร้อม putative coding frame	34-35
16.	เปรียบเทียบลำดับเบสของ 06/1 และ 06/2	36
17.	แสดงลำดับเบสของโคลน 701 พร้อม putative coding frame	37
18.	แสดงลำดับเบสของโคลน 787/1 พร้อม putative coding frame	38-39
19.	แสดงผลการ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่ม A และ E ด้วย specific primer 06/1	41
20.	แสดงผลการ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่ม A และ E ด้วย specific primer 701	41
21.	แสดงผลการ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่ม A และ E ด้วย specific primer 787/1	42
22.	ภาพวาดแสดงแบบแผนดีเอ็นเอของตัวอย่างต่างๆที่ได้จากการทำ PCR โดยมี 06/1, 701 และ 787/1 เป็น specific primer	48

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัยฯ

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction
ADH	Alcohol dehydrogenase
G-6-PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
SCDH	Succinate dehydrogenase
6-PDH	6-Phosphogluconate dehydrogenase
LDH	Lactate dehydrogenase
GLD	Galactose dehydrogenase
bp	base pair
CTAB	Hexadesyl trimethyl ammonium bromide
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TE	Tris-EDTA
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
DTT	Diethyldithiocarbamic acid
TEMED	Tetramethyl ethylenediamine

บทที่ 1
บทนำ

หลักการเหตุผลและผลงานที่มีมาก่อน

ในระหว่างสัตว์น้ำด้วยกัน กุ้งจัดเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางเศรฐกิจสูงเพราะเป็นที่นิยมบริโภคและมีความต้องการในตลาดโลกสูง ทำให้มีปริมาณการจับกุ้งเพิ่มมากขึ้น จนปัจจุบันจำนวนกุ้งในธรรมชาติลดน้อยลงทุกที ประเทศในแถบเอเชียไม่ว่าจะเป็นจีน ไต้หวัน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย จึงต่างหันมาศึกษาเพื่อทำการเพาะเลี้ยงกุ้งจนกลายเป็นอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกสำคัญที่นำเงินเข้าประเทศปีละมากๆ สำหรับประเทศไทยพบว่าพื้นที่ชายทะเลโดยรอบทั้งแถบทะเลอันดามันและอ่าวไทย มีสภาพภูมิอากาศและระบบนิเวศวิทยาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งหลายประเภทเช่น กุ้งกุลาดำ (Black tiger) กุ้งกุลาลาย (Flower) กุ้งแชบ๊วย (White หรือ Banana) กุ้งโอดัก (Pink) และกุ้งหัวมัน (Yellow) ในการเพาะเลี้ยงกุ้งพบว่าโดยทั่วไปแบ่งวิธีการออกเป็น 3 ประเภทคือ

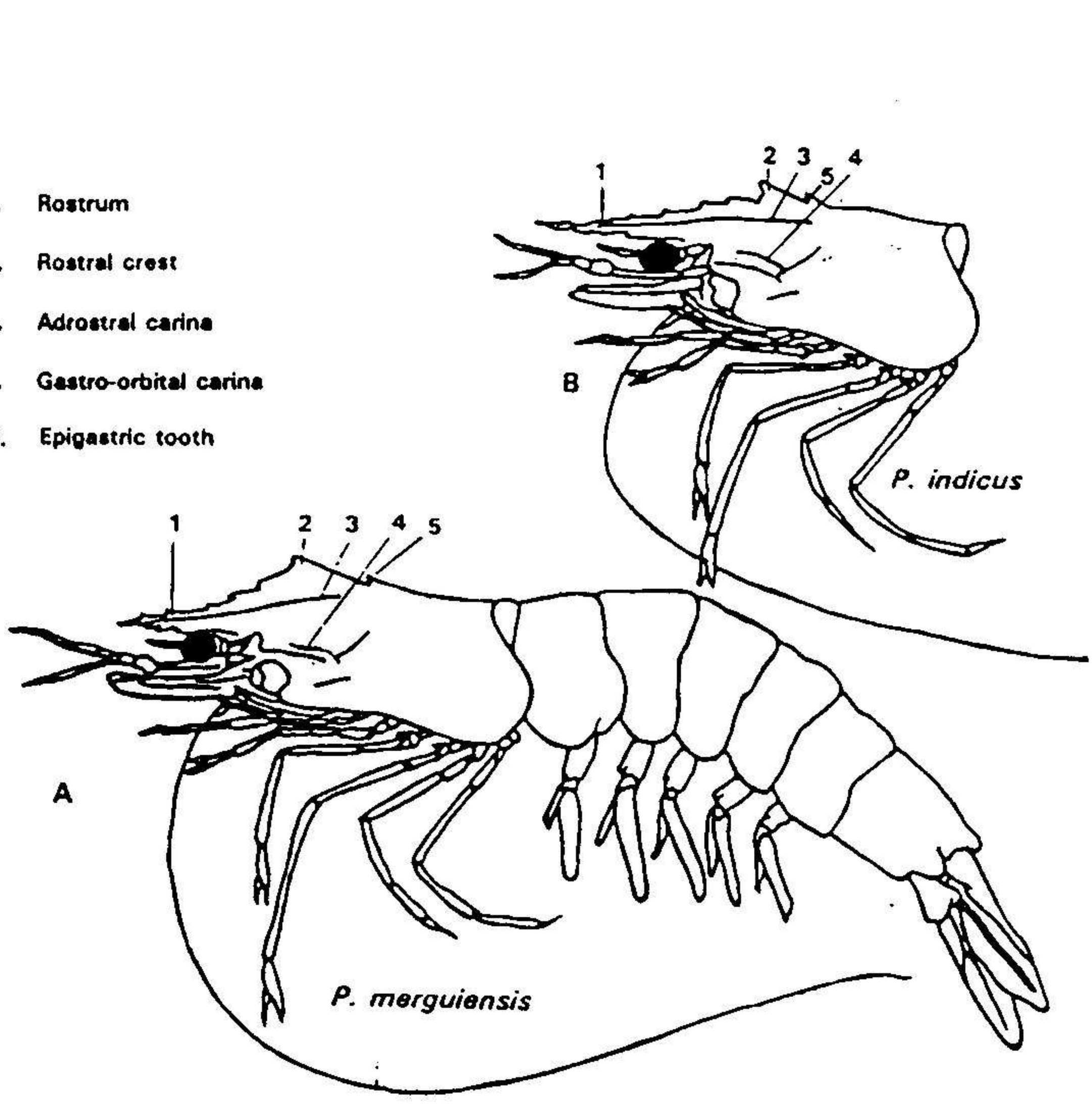
1. ระบบการเลี้ยงกุ้งแบบดั้งเดิมหรือแบบไม่หนาแน่น (Extensive system) เป็นการดัดแปลงพื้นที่ที่อยู่ใกล้ทะเลให้เป็นบ่อเล็กๆ สำหรับเก็บกักน้ำทะเล แล้วอาศัยลูกกุ้งจากแหล่งน้ำธรรมชาติลูกกุ้งในบ่อจะเจริญเติบโตโดยใช้อาหารธรรมชาติที่เกิดขึ้นเองในระบบของบ่อ วิธีนี้ให้ผลผลิตต่ำ (40-70 กก.ต่อไร่ต่อปี) และไม่แน่นอน
2. การเลี้ยงกุ้งแบบกึ่งพัฒนาหรือกึ่งหนาแน่น (Semi-intensive system) เป็นการพัฒนาวิธีการเลี้ยงจากแบบดั้งเดิมโดยใช้ลูกกุ้งจากโรงเพาะฟักลูกกุ้งไปปล่อยเสริม และ ดัดแปลงพื้นที่นากุ้งแบบดั้งเดิมบางส่วนเพื่อให้สามารถใช้พื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีนี้สามารถผลิตกุ้งได้ประมาณ 80-100 กก.ต่อไร่ต่อปี
3. การเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาหรือแบบหนาแน่น (Intensive system) มีการสร้างบ่อเลี้ยงที่ได้มาตรฐาน มีระบบควบคุมสภาพน้ำและดูแลรักษาบ่อด้วยเทคโนโลยีต่างๆ มีอาหารหลักที่ใช้เลี้ยงคืออาหารอัดสำเร็จรูป ลูกกุ้งได้จากโรงเพาะฟัก ระบบการเลี้ยงแบบนี้สามารถให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ประมาณ 2,000-4,000 กก.ต่อไร่ต่อปี

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นสามารถทำได้เฉพาะกุ้งกุลาดำเท่านั้น เนื่องจากวิธีการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูงตลอดจนราคาของกุ้งกุลาดำในตลาดโลกที่สูง ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่หันมาเลี้ยงกุ้งกุลาดำแทนการเลี้ยงกุ้งชนิดอื่น เป็นที่ทราบกันดีว่าการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพียงชนิดเดียวในประเทศแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทย ก่อให้เกิดปัญหาและความเสี่ยงในเชิงธุรกิจสูง เพราะนอกจากมีความผันแปรของราคาในตลาดโลกที่ขึ้นลงตามปริมาณผลผลิตรวมแล้ว (Saiprasit and Nakaluk, 1989) ยังก่อให้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดอีกด้วย แนวทางแก้ปัญหาทางหนึ่งที่อาจทำได้คือการศึกษาเพื่อเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดอื่นที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ

ไม่ยิ่งหย่อนกว่ากุ้งกุลาดำควบคู่ไปด้วย ปัจจุบันพบว่ากุ้งแชบ๊วยจัดเป็นอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยม ราคาในตลาดโลกมักสูงกว่ากุ้งกุลาดำ (ข้อมูลจาก Kiang Huat Sea-Gull Trading Frozen Food Co.,Ltd., Songkla) สามารถหาแม่พันธุ์กุ้งชนิดนี้ได้ง่ายทั้งในนากุ้ง ชายฝั่งและป่าชายเลนของไทย อย่างไรก็ตามได้มีผู้พยายามเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบหนาแน่นโดยใช้สภาวะและวิธีการแบบเดียวกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แต่ไม่ประสพความสำเร็จเนื่องจากไม่สามารถเลี้ยงจนได้ขนาดที่ต้องการในตลาด และกุ้งที่เลี้ยงก็ติดโรคได้ง่าย เกษตรกรผู้ทำการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยและนักวิจัยผู้พัฒนาวิธีการเลี้ยงได้ตั้งข้อสังเกตว่าเมื่อกุ้งเจริญเติบโตในบ่อเลี้ยงจนได้น้ำหนักประมาณ 6-8 กรัม (ขนาดเล็กกว่าที่จับได้ในธรรมชาติ และไม่เป็นที่นิยมของตลาดโลก) ก็จะค่อยๆหายไปโดยคาดว่าอาจเกิดจากการกินกันเอง (ข้อมูลจากงานวิจัยของดร.อุดส่าห์และคณะ ในโครงการวิจัยเรื่อง "Development of Techniques for Intensive Farming of Banana Prawn" ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยของสวทช) โดยทั่วไปกุ้งแต่ละชนิดมีพฤติกรรมการกินอาหาร การเลือกที่อยู่อาศัย และการอยู่ร่วมกันที่แตกต่างกันไป จากการศึกษาการกระจายตัวของกุ้งชนิดต่าง ๆ ครอบคลุมทุกพื้นที่ของอ่าว Carpenteria ประเทศออสเตรเลีย พบว่าโอกาสที่จะพบกุ้งแต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่ที่มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระบบนิเวศน์ของพื้นที่นั้น ๆ (Somers et al.,1987) ได้แก่ ลักษณะพื้นผิวและตะกอนดิน (sediment) ที่อาศัย (Somers, 1987; Coles et al., 1987) ชนิดของอาหารธรรมชาติ (Wassenberg and Hill, 1987) และสภาพธรรมชาติของน้ำทะเลในแต่ละบริเวณ (Staples and Vance, 1987) เป็นต้น ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ประสบความสำเร็จก็ต้องมีวิธีการจำเพาะสำหรับกุ้งชนิดนี้ด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาพฤติกรรมของกุ้งแต่ละชนิดก่อนที่จะนำมาเลี้ยง จากการศึกษาของดร.อุดส่าห์และคณะพบว่ามีอุปสรรคในการวิเคราะห์พฤติกรรมของกุ้ง ทั้งนี้เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยที่พบในอ่าวไทยมีอยู่สองชนิดคือ *P. merguiensis* และ *P. indicus* ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีการเด่นชัดที่ใช้แยกระหว่างสองชนิดนี้ วิธีการที่มักใช้ในการจำแนกสัตว์น้ำโดยทั่วไปคือดูความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา (รูปที่ 1) โดย *P. merguiensis* และ *P. indicus* มีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันคือ

1. *P. merguiensis* กรีมีลักษณะเป็นสันคมและสูง มีฟันกรีบน 7-8 ซี่ และด้านล่างมี 4-5 ซี่ ไม่มีสัน hepatic และไม่มีสัน gastro-orbital อวัยวะเพศเมียมีรูปร่างต่างจากของ *P. indicus* ดังในภาพที่ 2
2. *P. indicus* เรียกกันทั่วไปว่ากุ้งแชบ๊วย กุ้งขาว กุ้งหางแดง มีขนาดใหญ่ เปลือกบาง สีนวล บางครั้งอาจมีสีชมพูอ่อน มีสันกรี (rostral crest) ไม่สูง ส่วนมากในระยะตัวเต็มวัยปลายกรีจะยาวเลยปลายของโคนหนวดคู่สั้น กรีด้านบนมีฟัน 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 4-5 ซี่ สันข้างกรียาวเลยฟันกรีซี่สุดท้าย กุ้งชนิดนี้ไม่มีสัน hepatic มีสัน gastroorbital ridge นูนชัดเจน อวัยวะเพศผู้แผ่นตรงกลางจะชี้ไปทางด้านหน้า แผ่นด้านข้างจะม้วนเข้าหากัน อวัยวะเพศเมีย แผ่นบนเป็นแอ่งกว้าง แผ่นล่างมีรูปร่างกลม (รูปที่ 2)

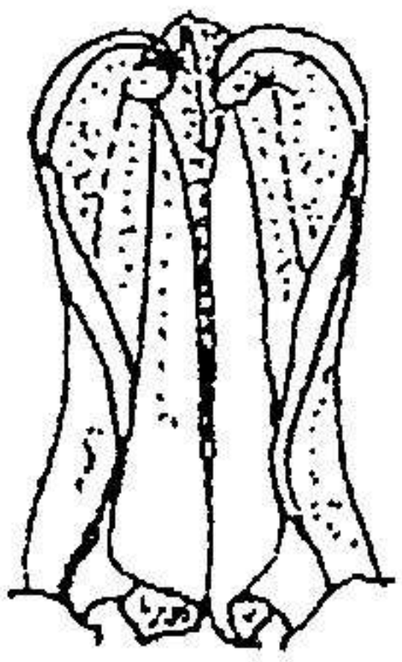
1. Rostrum
2. Rostral crest
3. Adrostral carina
4. Gastro-orbital carina
5. Epigastric tooth



รูปที่ 1 แสดงส่วนต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วยพร้อมชื่อเรียกของส่วนประกอบ

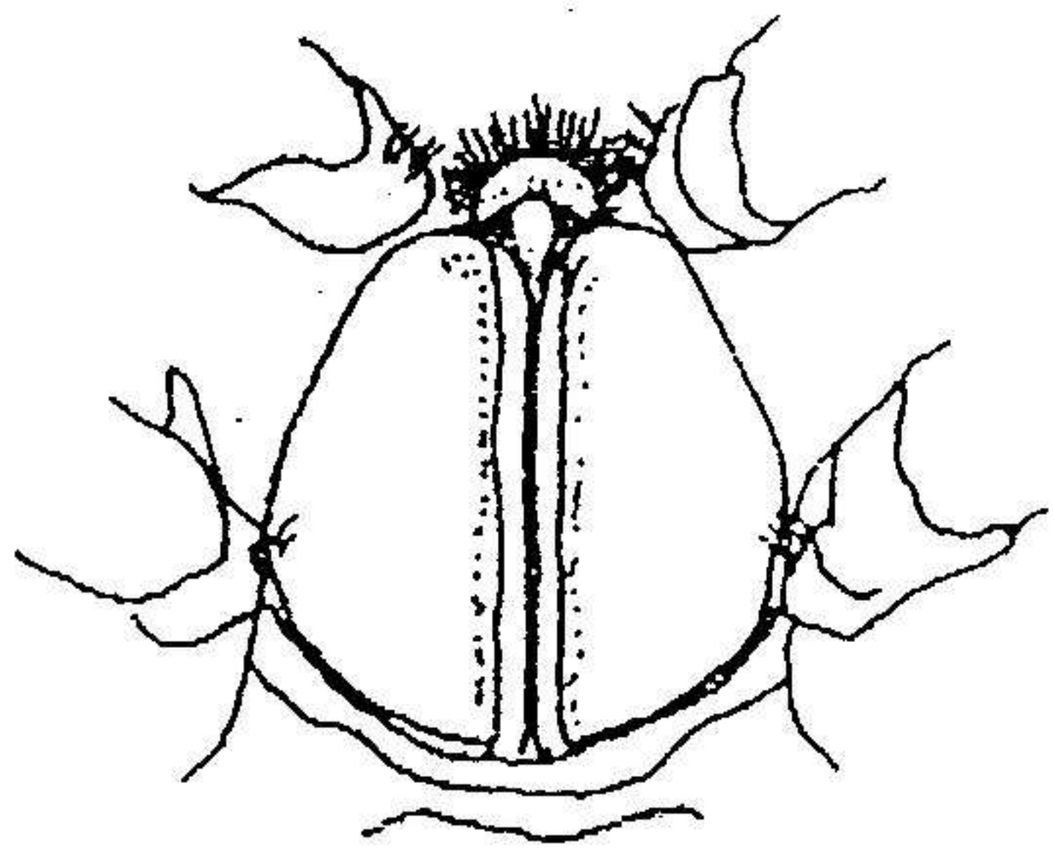
A) *P. merguiensis* B) *P. indicus*

A)



0.4

อวัยวะเพศผู้

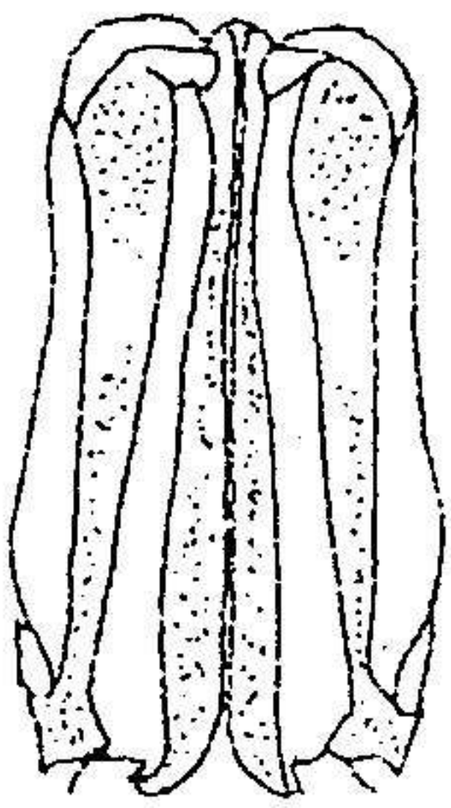


0.6

อวัยวะเพศเมีย

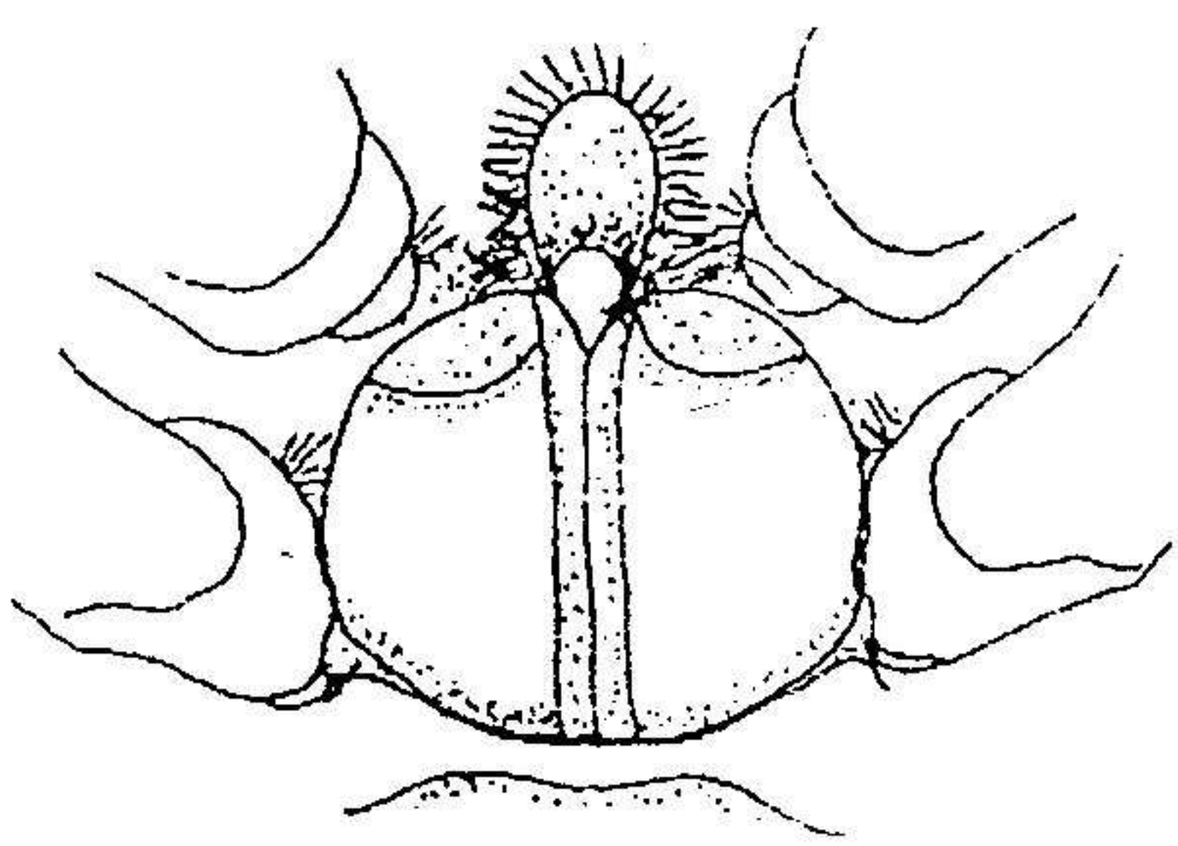
กุ้งแชบ๊วย หรือ กุ้งขาว *Penaeus merguensis* de Man

B)



0.5

อวัยวะเพศผู้



0.5

อวัยวะเพศเมีย

กุ้งแชบ๊วย หรือ กุ้งขาว *Penaeus indicus* H. Milne-Edwards

รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของอวัยวะเพศของกุ้งสองชนิด

A). *P. merguiensis* B) *P. indicus*

อย่างไรก็ตามพบว่าการแยกชนิดด้วยสัณฐานวิทยาระหว่าง *P. merguiensis* และ *P. indicus* ไม่สามารถทำได้อย่างแม่นยำ เพราะกุ้งบางตัวมีลักษณะบางประการที่ผสมผสานระหว่างทั้งสองชนิด ทั้งนี้อาจเกิดจากการความหลากหลายในพันธุกรรมของแต่ละชนิดหรือมีการผสมพันธุ์ข้ามชนิด ซึ่งก็ยังไม่มีผู้ใดศึกษาในรายละเอียด ดังนั้นน่าที่จะมีการจำแนกให้ได้เสียก่อนว่ากุ้งที่นำมาศึกษานั้นเป็นชนิดใด จึงจะทำให้สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งแต่ละชนิดในธรรมชาติ ตลอดจนศึกษาพฤติกรรมของกุ้งและพัฒนาวิธีการเลี้ยงได้

ในการจำแนกชนิดสัตว์น้ำนอกจากการดูจากรูปสัณฐานแล้ว ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมที่ก้าวหน้าในปัจจุบัน โดยใช้หลักการของ Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้มีการพัฒนาวิธีการโดยใช้ primer สายสั้น ๆ (5-20 nucleotides) ที่มีลำดับเบสแบบไม่เฉพาะเจาะจงมา จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย และทำให้มีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอบางส่วน แล้วศึกษาแบบแผนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย polyacrylamide gel electrophoresis สิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมต่างกันจะให้แบบแผนที่ต่างกัน วิธีนี้พบว่ามีประโยชน์ในการใช้แยกสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ ซึ่งได้ผลดี (Bassam et al, 1991; Lehmann et al, 1992; Culpepper et al, 1991; Riley et al, 1991; Williams et al, 1990) เทคนิคไม่ยุ่งยากและทราบผลการทดลองได้ในเวลาอันรวดเร็ว เรียกเทคนิคดังกล่าวว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในงานวิจัยเรื่องกุ้งก็พบว่ามีการใช้เทคนิคดังกล่าวได้แก่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการหาตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมเพื่อการเพาะพันธุ์ในกุ้ง *P. vannamei* และกุ้งกุลาดำ (Garcia et al., 1994, 1995, 1996)

คณะวิจัยฯจึงมีความสนใจที่จะนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบกุ้งแชบ๊วย ข้อมูลจากแบบแผน RAPD และลำดับเบสของดีเอ็นเอที่น่าสนใจสามารถนำไปใช้ในการหาตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล (molecular marker) ที่สำคัญสำหรับการจำแนกชนิด และตัวบ่งชี้ดังกล่าวอาจนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยในธรรมชาติ ตลอดจนใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ในอนาคตได้

วัตถุประสงค์โครงการ

1. เพื่อหาวิธีการตรวจสอบชนิดของกุ้งแชบ๊วยที่สะดวกรวดเร็วและแม่นยำ
2. เรียนรู้และพัฒนาการใช้เทคนิค RAPD เพื่อประโยชน์ในการศึกษาพันธุกรรมของสัตว์น้ำอื่น

ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์

การคัดเลือกชนิดกุ้งแชบ๊วยที่ถูกต้องเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในธรรมชาติ พฤติกรรมความเป็นอยู่และการเจริญเติบโตของกุ้งซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบหนาแน่น ทำให้เกษตรกรมีวิธีการเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพคุ้มค่าการลงทุน นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มทางเลือกที่นอกเหนือไปจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแต่เพียงชนิดเดียวซึ่งมักประสบกับสภาวะราคาที่ไม่แน่นอนและการเกิดโรค และในอนาคต

ยังอาจพัฒนาไปถึงการคัดเลือกกุ้งชนิดอื่นหรือผสมชนิดที่ดีมาเลี้ยง เป็นการขยายอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยเพื่อการส่งออก และนำเงินเข้าประเทศปีละมาก ๆ

ผลกระทบทางสังคม

เป็นการนำเทคโนโลยีใหม่ที่ทันสมัยมาใช้ช่วยเหลือเกษตรกร ทำให้การเกษตรอุตสาหกรรมในประเทศมีความสามารถทัดเทียมนานาประเทศ ได้ผลิตผลพร้อมที่จะแข่งขันในตลาดโลก การจำแนกชนิดด้วย RAPD ยังช่วยทำให้มีโอกาสศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อการอนุรักษ์และใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างระมัดระวัง

การพัฒนาเทคโนโลยี

สามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดที่แม่นยำสำหรับใช้ในการตรวจสอบชนิดกุ้งและได้ตัวบ่งชี้สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งทั้งสองชนิด ข้อมูลที่ได้ยังเป็นประโยชน์ต่อการใช้เทคโนโลยีเดียวกันหรือนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนาสัตว์น้ำอื่น

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างกุ้ง

ได้แก่กุ้งที่ได้จากชายฝั่งทะเลอันดามัน และอ่าวไทย โดยเป็นกุ้งสดมีชีวิตหรือเมื่อตายก็เก็บรักษาทันทีในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ แบ่งตัวอย่างตามช่วงเวลาและสถานที่ที่ได้ตัวอย่างมาคือ

กลุ่ม A ได้แก่ตัวอย่างจากทะเลอันดามัน จังหวัดสตูล เมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2539 จำนวน 49 ตัวอย่าง

กลุ่ม B ได้แก่ตัวอย่างจากอ่าวไทย เกาะยอ จังหวัดสงลา เมื่อวันที่ 7 พฤศจิกายน 2539 จำนวน 39 ตัวอย่าง

กลุ่ม C ได้แก่ตัวอย่างจากตลาดสด เกาะยอ จังหวัดสงขลา จำนวน 7 ตัวอย่าง เมื่อวันที่ 10 มกราคม 2540 เป็นตัวอย่างที่มีไว้เพื่อทดสอบว่าตัวอย่างที่ไม่สด จะสามารถนำมาใช้ในการศึกษา RAPD ได้หรือไม่

กลุ่ม D ได้แก่ตัวอย่างที่เป็น *P. monodon* เป็นตัวอย่างที่ใช้สำหรับเป็น control เพื่อหา specific primer ของกุ้งแชบ๊วย ได้จากจังหวัดภูเก็ต วันที่ 18 เมษายน 2540

กลุ่ม E ได้แก่ตัวอย่างจากอ่าวไทย จังหวัดสุราษฎร์ธานี วันที่ 14 พฤษภาคม 2540 จำนวน 36 ตัวอย่าง

กุ้งเหล่านี้แต่ละตัวถูกตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาคร่าว ๆ ด้วยตาเปล่าว่าเป็นกุ้งชนิดใด ยกเว้นตัวอย่าง A21-A49 กลุ่ม B และ C เนื่องจากขณะเก็บตัวอย่างส่วนหัวไม่อยู่ในสภาพที่ตรวจสอบได้

2. การสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง

2.1 ตัดเนื้อเยื่อที่แช่แข็งเป็นชิ้นบางๆ ปริมาณ 0.3 กรัม สับให้ละเอียดและบรรจุลงในหลอด eppendorf ที่แช่เย็น

2.2 เติม homogenising buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 1mM EDTA) 1 มิลลิลิตร

2.3 ใช้ Glass hand homogeniser บดสารละลายขึ้นลง จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.4 นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 2 ชม. แยกส่วนใสออกมาปั่นต่อด้วยความเร็วเท่าเดิมอีก 1 ชม.

2.5 นำส่วนใสที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

2.6 แยกโปรตีนด้วย polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีปฏิกิริยาเอนไซม์ต่อไปนี้ alcohol dehydrogenase (ADH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH), succinate dehydrogenase (SCDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PDH), lactate dehydrogenase (LDH) และ galactose dehydrogenase (GLD)

3. การสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอ (Chromosomal DNA)

การสกัดตัวอย่างอาจทำได้หลายวิธี ดังแสดงในหัวข้อผลการทดลอง ในที่สุดจากผลการทดลองสรุปว่าจะทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธีการต่อไปนี้

3.1 หั่นเนื้อเยื่อกุ้งที่แช่แข็งออกเป็นชิ้นบาง ๆ ปริมาณ 35-50 มิลลิกรัมด้วยมีดคม สับให้ละเอียด บรรจุเนื้อเยื่อที่สับนี้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.5%SDS, 20 mM DTT บ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชม.

3.2 เติม proteinase K ให้มีความเข้มข้นเป็น 100 µg/ml บ่มที่ 60°ซ นาน 30-60 นาที

3.3 สกัดสารละลายในข้อ 3.2 ด้วย phenol:chloroform หนึ่งครั้งแล้วตามด้วย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) และ chloroform-isoamyl alcohol (24:1) อีกอย่างละหนึ่งครั้ง

3.4 นำส่วนใสมาผสมกับสารละลายปริมาตรหนึ่งเท่าตัวของ isopropanol และเก็บที่ -20°C นานอย่างน้อย 1 ชม.

3.5 ปั่นเบา ๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกลงมายังก้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol และทำให้แห้งด้วยความดัน

วิธีการในข้อ 3.3 เป็นการทำดีเอ็นเอให้สะอาดด้วย phenol:chloroform ซึ่งอาจแทนที่ได้เมื่อใช้ Chelex 100^{R}(Bio-Rad) ในสารละลายสกัด เหมาะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างครั้งละมาก ๆ

4. การสุ่มหา primer ที่เหมาะสมสำหรับทำ RAPD กับดีเอ็นเอของตัวอย่าง

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างจากกลุ่ม A, E และ D อย่างละ 2 ตัวอย่าง มาทำ PCR โดยใช้ primer ชนิดต่างๆดังแสดงในตารางที่ 1 ด้วยโปรแกรม 94°C 4 นาที 1 รอบ และ 94°C 20 วินาที 37°C 20 วินาที 72 °C 20 วินาที 35 รอบ ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

Primer ใดที่ให้แบบแผนที่ดี จะถูกเลือกไว้ทำ PCR ต่อกับตัวอย่างชุดเดิม แต่เปลี่ยนอุณหภูมิ annealing จาก 37°C เป็น 40 °C-50 °C และ เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำ PCR กับตัวอย่างอื่น ๆ ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ RAPD primer

primer เหล่านี้ได้จากหน่วย BioServiceUnit (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จำนวน 3 ชุด บริษัท Operon (OPC) ประเทศสหรัฐอเมริกา และ จาก University of British Columbia (UBC) ประเทศแคนาดา

Primer Number	Nucleotide Sequence 5' to 3'	Primer Number	Nucleotide Sequence 5' to 3'
BSU-1100	ACGGTACACT	UBC- 147	GTGCGTCCTC
BSU-1101	GCAAGTAGCT	UBC- 149	AGCAGCGTGG
BSU-1102	CCGAGCTG	UBC- 150	GAAGGCTCTG
OPC- 01	TTCGAGCCAG	UBC- 701	CCCACAACCC
OPC- 02	GTGAGGCGTC	UBC- 702	GGGAGAAGGG
OPC- 03	GGGGGTCTTT	UBC- 703	CCAACCACCC
OPC- 04	CCGCATCTAC	UBC- 704	GGAAGGAGGG
OPC- 05	GATGACCGCC	UBC- 705	GGAGGAAGGG
OPC- 06	GAACGGACTC	UBC- 706	GGTGGTTGGG
OPC- 07	GTCCCGACGA	UBC- 707	CCCAACACCC
OPC- 08	TGGACCGGTG	UBC- 708	GGGTTGTGGG
OPC- 09	CTCACCGTCC	UBC- 709	CCTCCTCCCT
OPC- 10	TGTCTGGGTG	UBC- 710	GGTGGTGGGT
OPC- 11	AAAGCTGCGG	UBC- 711	CCCTCTCCCT
OPC- 12	TGTCATCCCC	UBC- 712	GGGTGTGGGT
OPC- 13	AAGCCTCGTC	UBC- 713	CCCTCCCTCT
OPC- 14	TGCGTGCTTG	UBC- 714	GGGTGGGTGT
OPC- 15	GACGGATCAG	UBC- 715	CCACCACCCA
OPC- 16	CACACTCCAG	UBC- 716	GGAGGAGGGA
OPC- 17	TTCCCCCCAG	UBC- 717	CCCACACCCA
OPC- 18	TGAGTGGGTG	UBC- 718	GGGAGAGGGA
OPC- 19	GTTGCCAGCC	UBC- 719	CCCACCCACA
OPC- 20	ACTTCGCCAC	UBC- 720	GGGAGGGAGA
UBC- 130	GGTTATCCTC	UBC- 721	CCCTTCCCTC
UBC- 131	GAAACAGCCT	UBC- 722	CCTCTCCCTC
UBC- 132	AGGGATCTCC	UBC- 723	CCCTCTCCTC
UBC- 133	GGAAACCTCT	UBC- 724	CTCCCTCCTC
UBC- 134	AACACACGAG	UBC- 725	GGGTTGGGTG
UBC- 135	AAGCTGCGAG	UBC- 726	GGTGTGGGTG
UBC- 136	TACGTCTTGC	UBC- 727	GGGTGTGGTG
UBC- 137	GGTCTCTCCC	UBC- 728	GTGGGTGGTG
UBC- 138	GCTTCCCCTT	UBC- 729	CCCAACCCAC
UBC- 139	CCCAATCTTC	UBC- 730	CCACACCCAC
UBC- 140	GTCGCATTTC	UBC- 731	CCCACACCAC
UBC- 141	ATCCTGTTCG	UBC- 732	CACCCACCAC
UBC- 142	ATCTGTTCGG	UBC- 733	GGGAAGGGAG
UBC- 143	TCGCAGAACG	UBC- 734	GGAGAGGGAG
UBC- 144	AGAGGGTTCT	UBC- 735	GGGAGAGGAG
UBC- 145	TGTCGGTTGC	UBC- 736	GAGGGAGGAG
UBC- 146	ATGTGTTGCG	UBC- 737	GGTGGGTGTG

ตารางที่ 1 (ต่อ)

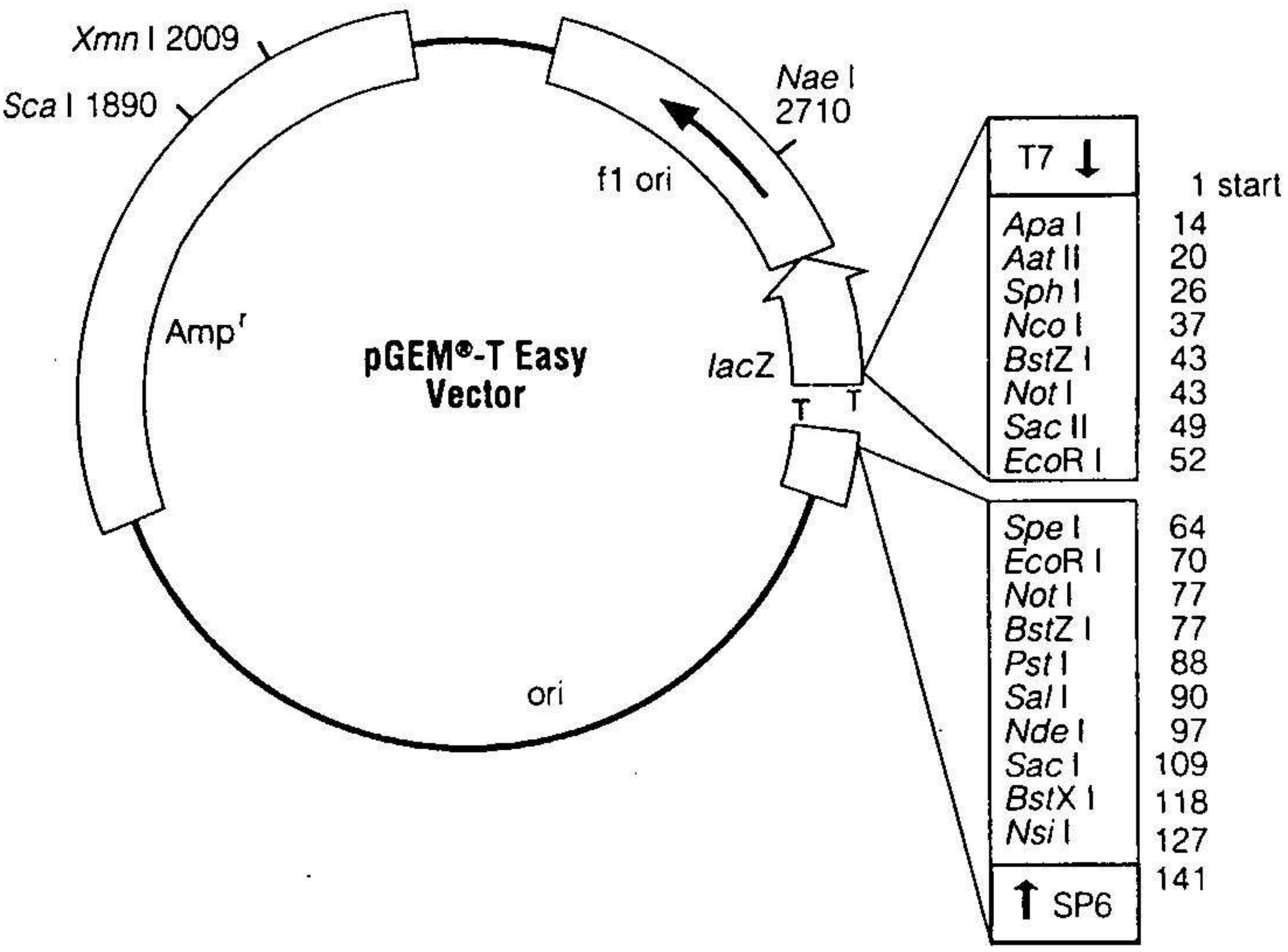
Primer Number	Nucleotide Sequence 5' to 3'	Primer Number	Nucleotide Sequence 5' to 3'
UBC- 738	GGTGGGTGGT	UBC- 776	CTTCCCTCCT
UBC- 739	GGAGGGAGAG	UBC- 777	GGAGAGGAGA
UBC- 740	GGAGGGAGGA	UBC- 778	CCACACCACA
UBC- 741	CCTCCCTCTC	UBC- 779	CCTTTCTCCC
UBC- 742	CCTCCCTCCT	UBC- 780	CCTCTTCCTC
UBC- 743	CCACCCACAC	UBC- 781	GGGAAGAAGG
UBC- 744	CCACCCACCA	UBC- 782	GGGAAGAGAG
UBC- 745	GGGAAGAGGG	UBC- 783	GGTGGGTTGT
UBC- 746	GGGTGTTGGG	UBC- 784	GTGGGTGTTG
UBC- 747	CCACCAACCC	UBC- 785	CACCCAACCA
UBC- 748	CCCTTCTCCC	UBC- 786	TCCCTTCCTC
UBC- 749	GGGAGGAGAG	UBC- 787	CCCTTCTTCC
UBC- 750	GGGTGGTGTG	UBC- 788	CCTTCCCTCT
UBC- 751	CCCACCACAC	UBC- 789	GGAAGGGAGA
UBC- 752	CCCTCCTCTC	UBC- 790	GGGTGTGGTT
UBC- 753	GGGAGGAGGA	UBC- 791	GTGGGTTGTG
UBC- 754	GGGTGGTGGT	UBC- 792	CAACCCACAC
UBC- 755	CCCACCACCA	UBC- 793	CTCCTCTCTC
UBC- 756	CCCTCCTCCT	UBC- 794	GAGGGGAAAG
UBC- 757	GGAAGGGAGG	UBC- 795	TGGTGTGGGT
UBC- 758	GGTTGGGTGG	UBC- 796	AGAGGGAGGA
UBC- 759	CCAACCCACC	UBC- 797	CCACCAACAC
UBC- 760	CCTTCCCTCC	UBC- 798	GAGAGGAAGG
UBC- 761	GAGAGGAGGG	UBC- 799	TGTGGTGGTG
UBC- 762	GTGTGGTGGG	UBC- 800	TCTCCCTCCT
UBC- 763	CACACCACCC		
UBC- 764	CTCTCCTCCC		
UBC- 765	AGGGAGGAGG		
UBC- 766	TGGGTGGTGG		
UBC- 767	ACCCACCACC		
UBC- 768	TCCCTCCTCC		
UBC- 769	GGGTGGTGGG		
UBC- 770	GGGAGGAGGG		
UBC- 771	CCCTCCTCCC		
UBC- 772	CCCACCACCC		
UBC- 773	GGGTTGTTGG		
UBC- 774	GGTGTGTGGT		
UBC- 775	GGTTTTGTGG		

5. การแยกดีเอ็นเอด้วยชุดแยกกระแสไฟฟ้า

แยกดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis หรือ 5% polyacrylamide gel electrophoresis โดยมี 100 bp marker (Promega) เป็นดีเอ็นเอมาตราฐานสำหรับบอกขนาด ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

6. การโคลนดีเอ็นเอที่สนใจ

ตัดแถบดีเอ็นเอที่สนใจจากเจล ละลายดีเอ็นเอออกจากเจลและทำดีเอ็นเอให้สะอาดโดยการสกัดด้วย phenol:choloroform นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM^{R}-T Easy (Promega) ซึ่งมี restriction map ดังรูปที่ 3 นำดีเอ็นเอสายผสมไป transform เข้าสู่แบคทีเรีย DH5α [F ϕ80d*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *pho*A *hsd*R17 (r_k^-, m_k^-) *sup*44λ^- *thi*-1 *gyr*A96*rel*A1.] ตรวจสอบดีเอ็นเอที่โคลนได้โดยการตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วย *Eco*RI และเทียบขนาดบน 1-1.4% agarose gel electrophoresis



รูปที่ 3 แสดง restriction map ของเวคแตอร์ pGEM-T Easy ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่ใช้ในการโคลน PCR-product โดยโคลนเข้าที่ส่วนของปลาย T ของเวคเตอร์

7. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สนใจ

เตรียมดีเอ็นเอที่โคลนได้จากข้อ 6 จากแบคทีเรียด้วยวิธี alkaline lysis (2) ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ด้วย phenol:chloroform แล้วนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี Fluorescence-based automated DNA sequencing โดยใช้ sequencing kit ของ Perkin Elmer ดังรายละเอียดต่อไปนี้

7.1 ผสมสารละลายเหล่านี้ในหลอดขนาด 0.2 มล.

Terminator Pre mix	8	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ (0.2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	1.5-2.5	ไมโครลิตร
Primer (T7/SP6)	3.2	พิโครไมล
น้ำกลั่น	X	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

7.2 ทำ PCR โดยมีโปรแกรมดังต่อไปนี้

96°C 10 วินาที 50°C 5 วินาที 60°C 4 นาที 25 รอบ

7.3 การทำ PCR product ให้สะอาด

เตรียมหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเติมสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอด

3M Sodium acetate, pH 4.8	2	ไมโครลิตร
95% Ethanol	50	ไมโครลิตร
สารละลายที่ได้จากการทำ PCR	20	ไมโครลิตร

วางบนน้ำแข็งนาน 10 นาที ปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีนาน 15-30 นาที ล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอลล์ 70% และทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย 4 ไมโครลิตรของ loading buffer ซึ่งประกอบด้วย deionized formamide 5 ไมโครลิตร และ 1 ไมโครลิตร ของ 50 mM EDTA pH 8.0

7.4 การเตรียม sequencing gel

เตรียมเจลที่มีส่วนผสมของยูเรีย 35 กรัม 10.5 มล. ของ 40% acrylamide stock 350 ไมโครลิตรของ 10% ammonium persulfate และ TEMED 39.3 ไมโครลิตร

8. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

นำข้อมูลจากลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS หรือ วิเคราะห์ผ่าน BLAST เพื่อหา homology กับยีนที่มีอยู่ใน gene bank

ส่วนการวิเคราะห์แบบแผนของ RAPD ทำโดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst ของ BIO-RAD

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบตัวอย่างตามสัณฐานวิทยา

ได้สำรวจตัวอย่างแต่ละกลุ่มตามสัณฐานวิทยาคร่าว ๆ ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปเก็บ ทั้งนี้ให้ความสำคัญกับตัวอย่างที่เป็นกุ้งแชบ๊วย อย่างไรก็ตามกุ้งในกลุ่ม A และ B ที่ได้มาพบว่ามี *Metapenaeus sp.* ปนอยู่ด้วยและได้เก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบ นำตัวอย่างเป็นแชบ๊วยมาสำรวจรายละเอียดโดยเริ่มจากดูส่วนของสันกรี (rostrum) ว่าสูงหรือต่ำและนูนเป็นสามเหลี่ยมหรือไม่ ตรวจสอบลักษณะของอวัยวะเพศซึ่งค่อนข้างสับสนในบางตัวอย่างเพราะจากอนุกรมวิธานระบุลักษณะของอวัยวะเพศเมียที่ใช้ในการแยกชนิดได้ตามรูปที่ 2 แต่ผู้วิจัยพบตัวอย่างที่มีลักษณะของอวัยวะเพศเมียที่กำกึ่งระหว่างรูปร่างสองแบบ ส่วนการแยกชนิดของตัวอย่างเพศผู้ด้วยอวัยวะเพศทำได้ยากเนื่องจากกุ้งสองชนิดมีลักษณะอวัยวะเพศผู้ใกล้เคียงกันมาก ต่อจากนั้นจึงแยก carapase ออก ล้างให้สะอาดแล้วใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอดูรายละเอียดเพื่อวัดความยาวของ adrosal carina และ gastro-orbital carina ว่าเป็นไปตามตารางที่ 2 หรือไม่ จดผลการสำรวจลักษณะข้างต้นโดยระบุ M หรือ I เมื่อลักษณะดังกล่าวตรงกับที่ควรจะเป็นของ *P. merguiensis* หรือ *P. indicus* และแสดงผลของในตารางที่ 3 ซึ่ง จะเห็นว่ามีหลายตัวอย่างที่มีลักษณะปนกัน สรุปผลการสำรวจด้วยรูปสัณฐานเบื้องต้นนี้ พบตัวอย่างที่มีลักษณะตามอนุกรมวิธานว่าเป็น *P. indicus* 15 ตัวอย่างและที่เป็น *P. merguiensis* เพียง 6 ตัวอย่าง เท่านั้น ตัวอย่างที่เหลือไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นชนิดใด ด้วยสาเหตุของความสับสนของการแยกชนิดโดยรูปร่างเช่นนี้ (การแยกชนิดขึ้นอยู่กับความเห็นของแต่ละบุคคลผู้ทำหน้าที่แยกด้วย) ทำให้ผู้วิจัยต้องหาวิธีอื่นซึ่งในที่นี้คือการใช้แบบแผนไอโซไซม์เพื่อจัดชนิดของกุ้งในเบื้องต้นให้ได้เสียก่อนที่จะศึกษาด้วยแบบแผนดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะ เปรียบเทียบของ *P. merguiensis* และ *P. indicus* ที่ใช้ในการแยกชนิด
(ดัดลอกจาก A Guide to Penaeoid Shrimp Found in Thai Waters และ A Guide to Australian Penaeid Prawns)

	P. merguiensis	*P. indicus*
1. Rostrum	Shorter; almost straight	Longer and forming a sigmoidal curve
2. Rostral crest	Higher and more or less triangular	Shallower and not triangular

ตารางที่ 2 (ต่อ)

	P. merguiensis	*P. indicus*
3. Adrostral carina	Not reaching epigastric tooth	Reaching epigastric tooth
4. Gastro-orbital carina	Shorter, occupying the middle 1/3 distance between the hepatic spine and the orbital angle	Occupying posterior 2/3 distance between hepatic spine and orbital angle

ตารางที่3 แสดงตัวอย่างกุ้งทั้งหมดและชนิดของบางตัวอย่างที่แยกโดยสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์

No. ตัวอย่าง	เพศ	รายละเอียดของรูปร่าง			สรุปชนิดแยกโดยสัณฐานวิทยา	การแยกชนิดด้วยไอโซไซม์	หมายเหตุ
		P	R	GO			
A1	female	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND	
A2	male	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND	
A3	male	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND	
A4	male	ND	ND	ND	*Metapenaeus sp.*	ND	
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	*Mix*	*P. indicus*	
A11	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*	
A12	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. indicus*	
A13	female	?	I	I	ไม่ชัดเจน	*P. indicus*	
A14	female	I	I	?	ไม่ชัดเจน	*P. indicus*	
A15-A49					*Metapenaeus sp.* และ *P. indicus*	ND	เนื้อเยื่อส่วนหัวเสียสภาพเนื่องจากปัญหาการเก็บรักษา จึงไม่นำมาใช้ศึกษา
B1	-	-	I	I	ไม่ชัดเจน	ND	
B9	-	-	I	I	ไม่ชัดเจน	ND	
B10	-	I	I	I	*P. indicus*	ND	
B16	male	-	I	I	ไม่ชัดเจน	ND	
B18	male	-	?	?	ไม่ชัดเจน	ND	
B19	male	?	I	I	ไม่ชัดเจน	ND	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No. ตัวอย่าง	เพศ	รายละเอียดของรูปร่าง			สรุปชนิดแยกโดยสัณฐานวิทยา	การแยกชนิดด้วยไอโซไซม์	หมายเหตุ
		P	R	GO			
B20		?	I	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	
B23	male	-	I	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	
C1-C7					*P. merguiensis*	ND	
					หรือ P. indicus		
D1-D6					*P. monodon*	ND	
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*	
E6	female	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*	
E7	female	M	M	I	*Mix*	*P. merguiensis*	
E8	female	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*	
E9	female	I	I	I	*P. indicus*	*P. merguiensis*	
E10	female	M	M	M	*P. merguiensis*	*P. merguiensis*	
E11	male	?	I	I	*การแยกไม่ชัดเจน*	*P. indicus*	
E12	male	?	M	I	*Mix และ แยกไม่ชัดเจน*	*P. merguiensis*	
E13	female	I	I	I	*P. indicus*	มีปัญหาการตรวจสอบ	
E14	female	M	I	M	*Mix*	*P. merguiensis*	
E15	male	?	I	I	*ไม่ชัดเจน*	*P. merguiensis*	
E16	female	I	I	I	*P. indicus*	ND	
E17	male	?	M	M	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E18	female	I	I	I	*P. indicus*	ND	
E19	male	?	I	I	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E20	male	?	I	I	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E21		?	M	I	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E22		?	M	I	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E23	male	?	M	I	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E24		?	M	I	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E25	female	I	M	I	*Mix*	ND	
E26	female	I	I	I	*P. indicus*	ND	
E27	female	M	I	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E28	female	I	I	I	*P. indicus*	ND	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

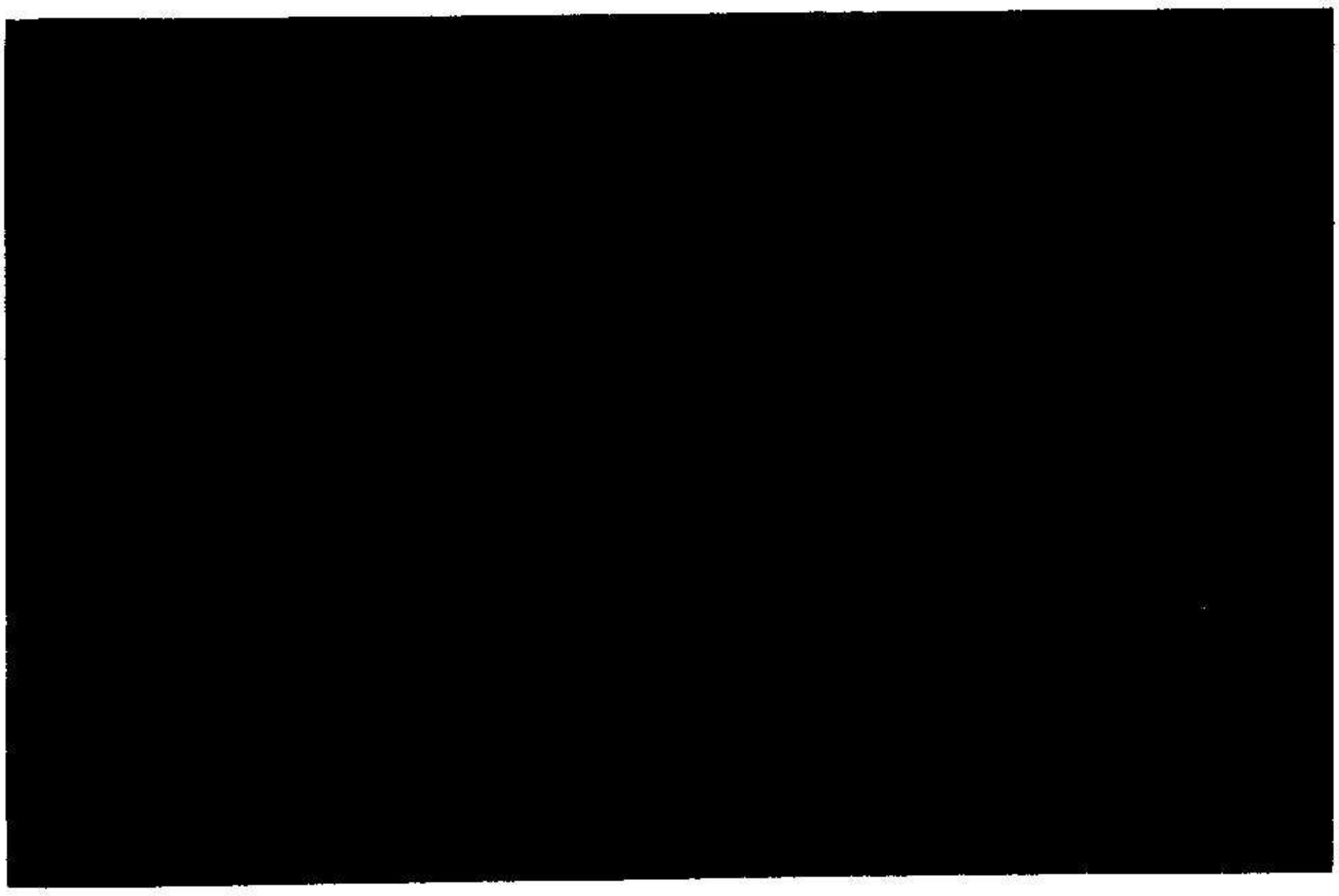
No. ตัวอย่าง	เพศ	รายละเอียดของรูปร่าง			สรุปชนิดแยกโดยสัณฐานวิทยา	การแยกชนิดด้วยไอโซไซม์	หมายเหตุ
		P	R	GO			
E29	female	M?	I	I	*Mix*	ND	
E30	female	I	I	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E31	female					ND	
E32	male	?	M	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E33	female	I	M	I	*Mix*	ND	
E34	female	I	I	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	
E35	female	M	I	I	*Mix*	ND	
E36	female	I	I	?	*ไม่ชัดเจน*	ND	

P = Petesma, R = Rostrum, GO = Gastro-orbital, ND = ไม่ได้ตรวจสอบ, ? = ไม่แน่ใจว่าควรจัดเป็นชนิดใด, M? = มีความโน้มเอียงว่าเป็น *P. merguiensis* แต่ไม่มั่นใจ

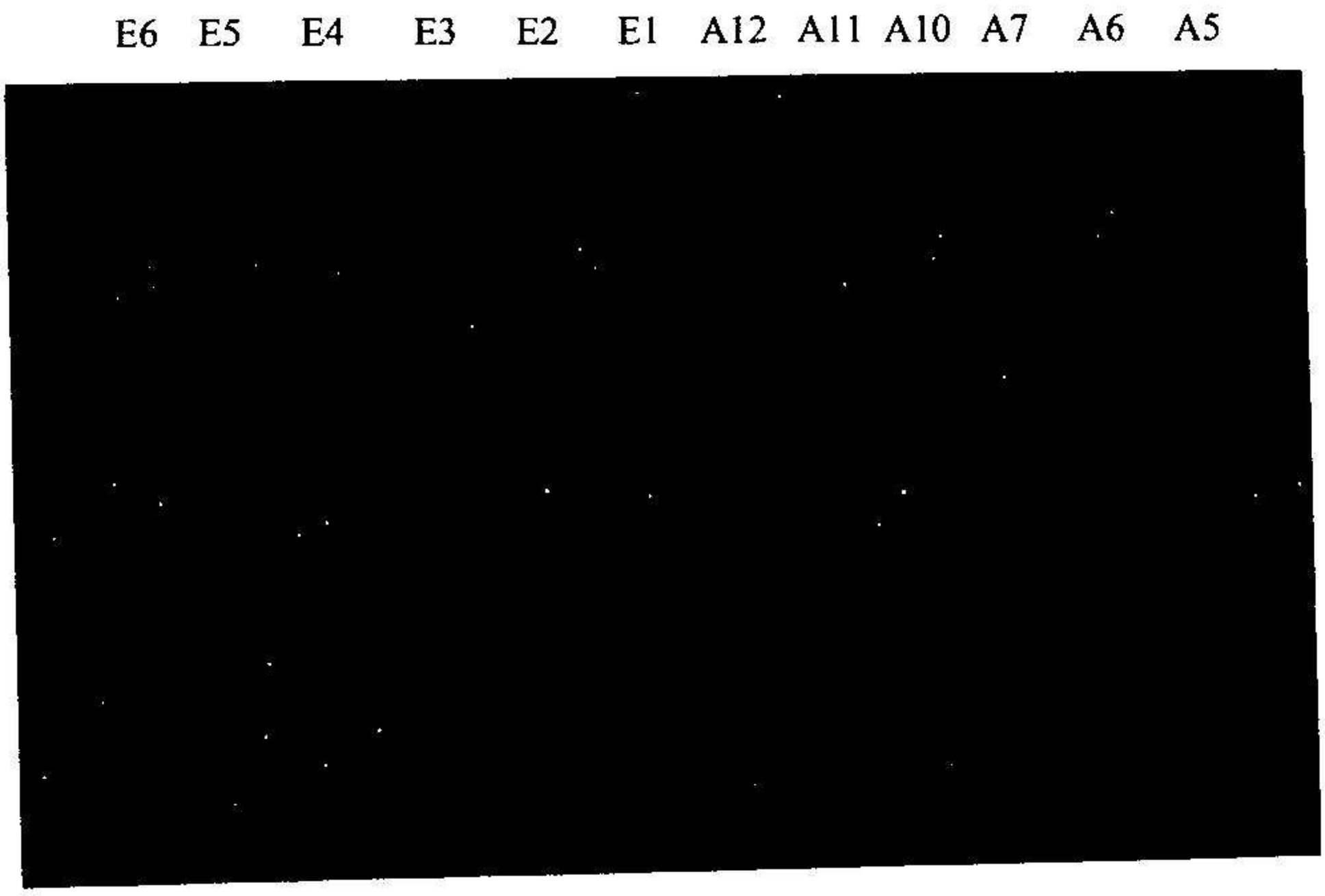
2. การตรวจสอบแบบแผนไอโซไซม์ของตัวอย่าง

สกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อแช่แข็งของตัวอย่างกุ้งที่แยกชนิดด้วยสัณฐานวิทยาแล้วในข้อ 1 โดยเลือกตรวจสอบตัวอย่าง A5-A14 และ E1-E15 แยกแถบโปรตีนด้วยอิเลคโตรโฟลีซีสและย้อมสีปฏิกิริยาเอนไซม์คือ alcohol dehydrogenase (ADH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH), succinate dehydrogenase (SCDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PDH), lactate dehydrogenase (LDH) และ galactose dehydrogenase (GLD) จากแบบแผนที่ได้พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ ADH, SCDH, G-6-PDH, และ 6-PDH ในการตรวจสอบสามารถแยกกุ้งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ตามการมีและไม่มีของไอโซเมอร์ขนาดใหญ่ ดังแสดงผลของบางตัวอย่างในรูปที่ 4 แบบแผนที่แตกต่างกันนี้นำมาใช้ระบุชนิดตามตารางที่ 3 พบว่าบางตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกับการแยกชนิดกุ้งด้วยสัณฐานวิทยา บางตัวอย่างให้ผลขัดแย้งกัน ดังจะได้อธิบายในหัวข้อวิจารณ์ผลการทดลองต่อไป อย่างไรก็ตามการแยกชนิดด้วยแบบแผนของไอโซไซม์ทำให้จัดกลุ่มตัวอย่างได้คือ A5-A14 เป็น *P. indicus* และ E1-E15 ส่วนมากเป็น *P. merguiensis* ยกเว้น E11 เป็น *P. indicus* และ E 13 มีปัญหาการตรวจสอบ เข้าใจว่าเกิดจากการเก็บรักษาตัวอย่างไม่ดี และได้เลือกตัวอย่าง A5-A14 และ E1-E15 ไปตรวจสอบต่อด้วยดีเอ็นเอ สำหรับตัวอย่างที่เหลือเนื่องจากมีรูปสัณฐานไม่ชัดเจนจึงยังไม่ศึกษาในครั้งนี้

A) Alcohol dehydrogenase

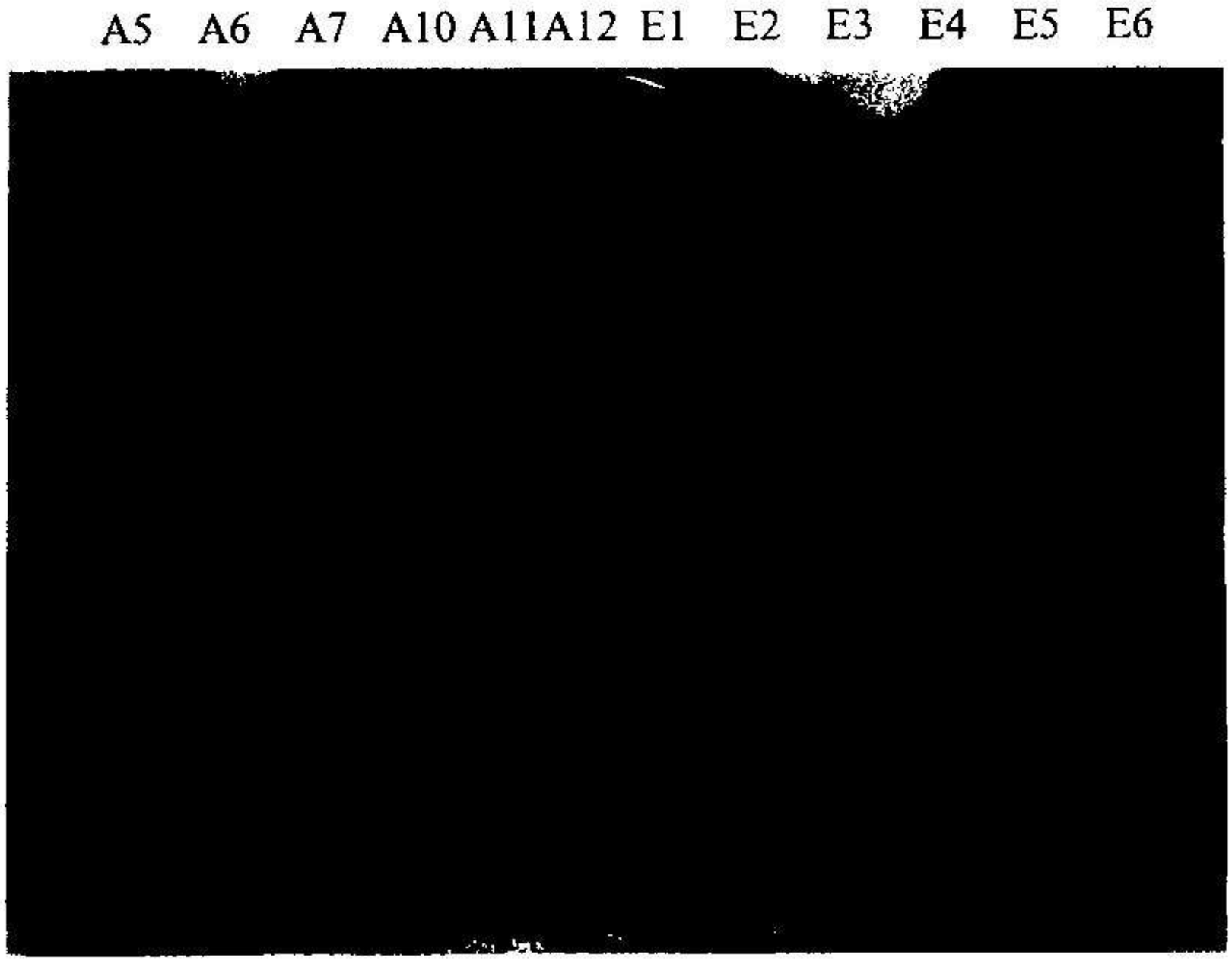


B) Glucose-6-phosphate dehydrogenase

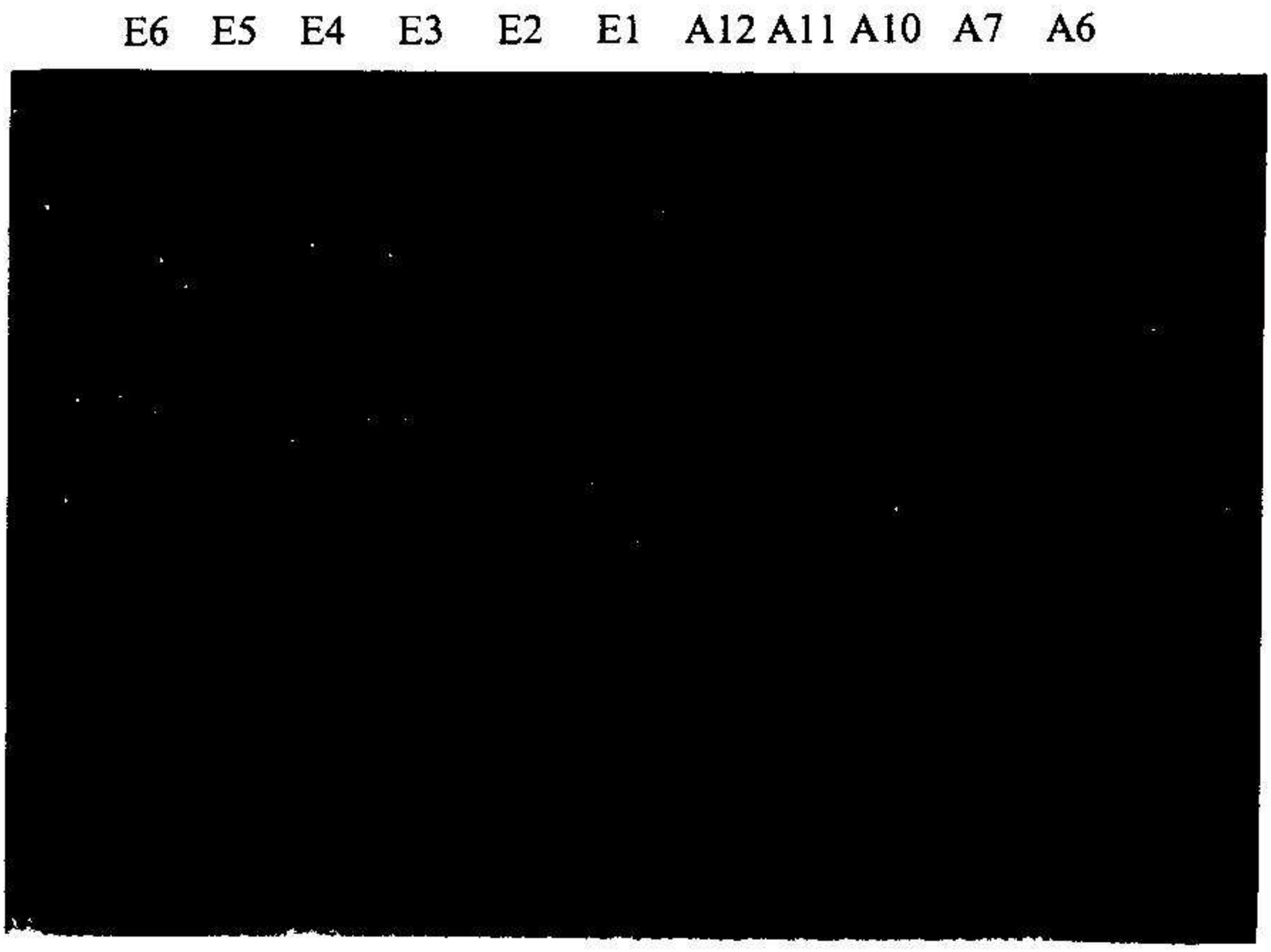


รูปที่ 4 แสดงแบบแผนไอโซไซม์ของตัวอย่างกลุ่ม A และ E บน 5% polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อย้อมเจลด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ A) ADH, B) G-6-PDH

C) Succinate dehydrogenase



D) 6-Phosphogluconate dehydrogenase



รูปที่ 4 (ต่อ) แสดงแบบแผนไอโซไซม์ของตัวอย่างกลุ่ม A และ E บน 5% polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อย้อมเจลด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ C) SCDH และ D)6-PDH

3. การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง

ในการสกัดดีเอ็นเอก่อนอื่นต้องทำให้เซลล์แตกซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีเช่นการบดเนื้อเยื่อด้วยครกหรือการปั่นด้วยแท่งเหล็กสำหรับตัดในหลอดบรรจุขนาดเล็กหรือการสับละเอียดด้วยมีด ในที่นี้เลือกใช้การสับเนื้อเยื่อที่ละลายแล้วบนน้ำแข็งด้วยมีดขนาดเล็ก เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบแบบแผนของตัวอย่างแต่ละตัวโดยการทำ PCR ที่ใช้ primer แบบไม่จำเพาะ การปนเปื้อนของเนื้อเยื่อแต่ละตัวเพียงเล็กน้อยจะทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ การใช้ใบมีดขนาดเล็กทำให้สะดวกต่อการเตรียมอุปกรณ์ที่ต้องเปลี่ยนใหม่ทุกครั้งเมื่อมีการเตรียมตัวอย่างครั้งละ มาก ๆ ได้

โดยทั่วไปการเตรียมโครโมโซมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตให้ได้ผลดี พบว่าขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ว่าจะสามารถยับยั้งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ nuclease ได้มากน้อยเพียงใด นอกจากนั้นก็ยังมีขั้นตอนทำดีเอ็นเอให้สะอาด ในการทดลองนี้ ได้ใช้บัฟเฟอร์ 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

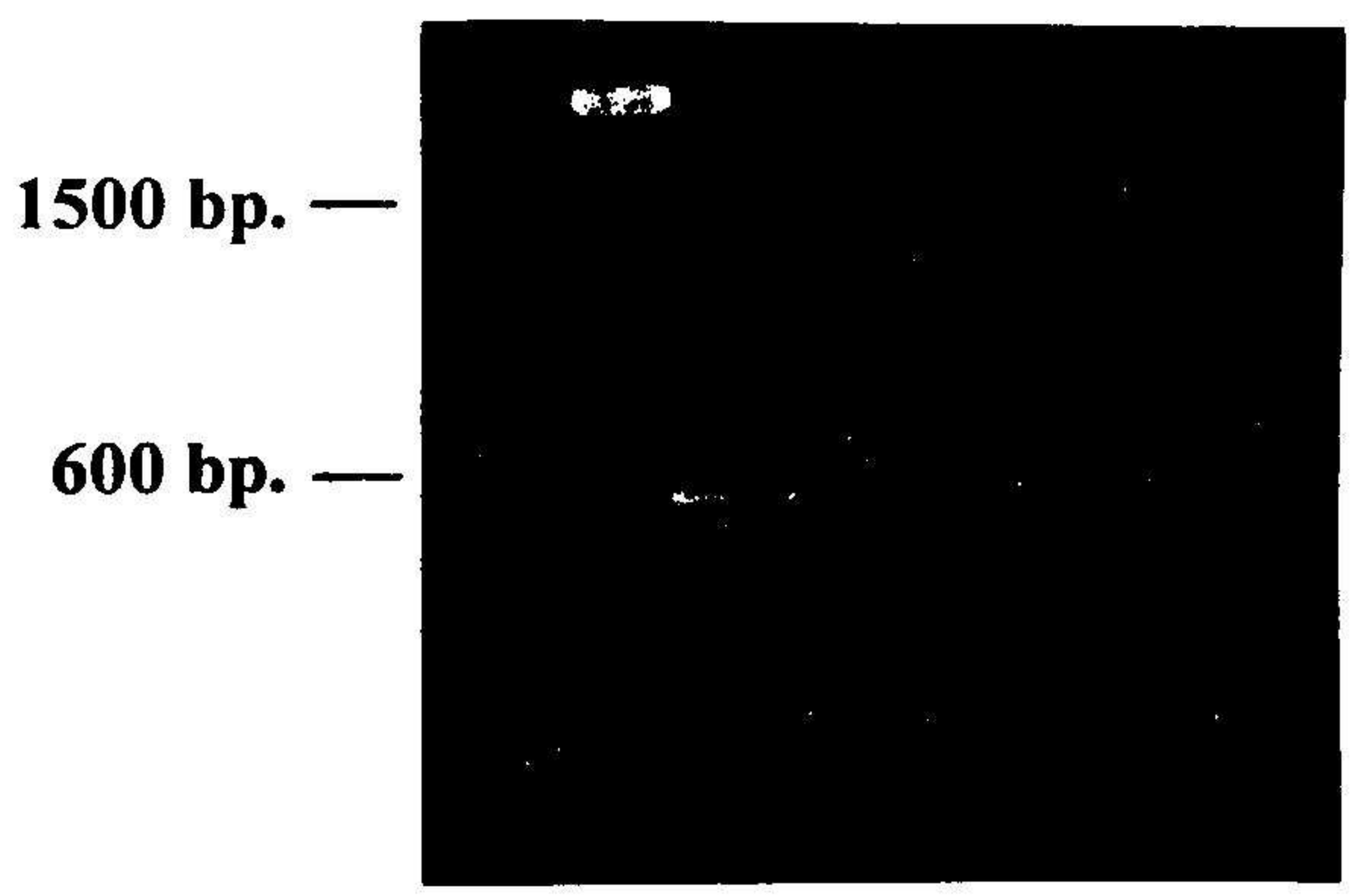
ตารางที่ 4 แสดงส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง

Type of Buffer	Buffer compositions	Amount of DNA (μg DNA/mg tissue)	OD260/ OD280
Buffer 1	10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.5%SDS, 20 mM DTT	0.5	1.23
Buffer 2	0.7M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% CTAB	0.23	1.88
Buffer 3	0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.5%SDS, 20 mM DTT	1.58	1.9
Buffer 4	0.7M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% CTAB, 5% Chelex ^{R}100	0.43	1.8
Buffer 5	0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.5%SDS, 20 mM DTT, 5% Chelex ^{R}100	3.29	1.9

บัฟเฟอร์ที่ 1 แตกต่างจากบัฟเฟอร์อื่นคือมีเกลือความเข้มข้นน้อยกว่า พบว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือความเข้มข้นสูง 0.7 M จะได้ดีเอ็นเอปริมาณมากกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีเกลือความเข้มข้นต่ำ บัฟเฟอร์ที่ 2 และ 4 เป็นบัฟเฟอร์ที่มี CTAB (Hexadesyl trimethyl ammonium bromide) เป็นส่วน

Central Library
Prince of Songkla University

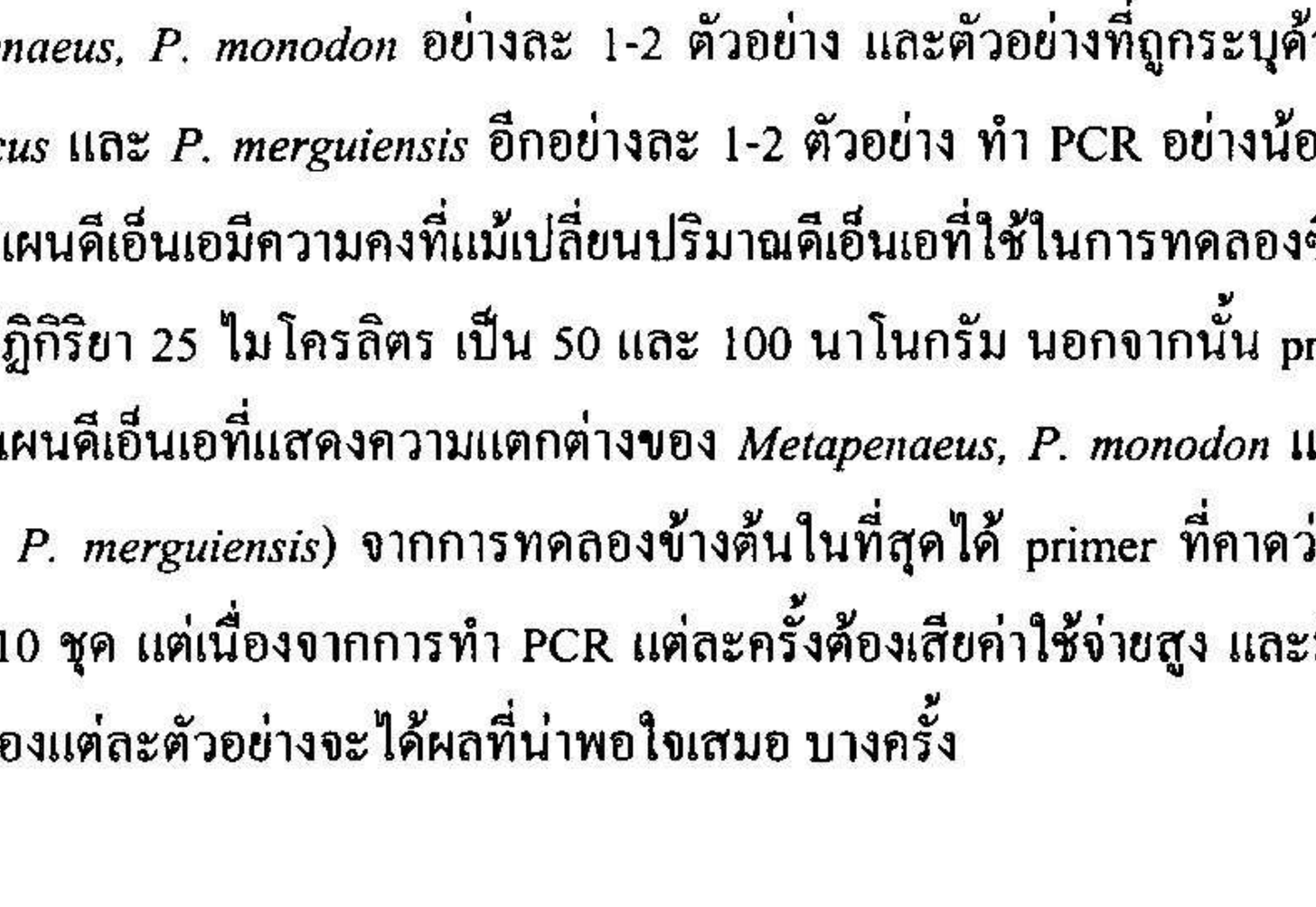
ประกอบ พบว่าสารนี้ไม่ช่วยในการสกัดดีเอ็นเอมากนักและในทางตรงกันข้ามกลับทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่มี CTAB บัฟเฟอร์ที่ 5 เป็นสารละลายที่มีการเติม Chelex^{R}100 ซึ่งเป็น chelating agent ตัวหนึ่ง ที่มีรายงานว่าใช้ได้ผลดีในการสกัดดีเอ็นเอจากสารตัวอย่างหลายชนิดโดยไม่ต้องเติม proteinase K และ ไม่ต้องสกัดต่อด้วย phenol:chloroform (14) ในการทดลองนี้พบว่าได้ดีเอ็นเอปริมาณมากกว่าการใช้บัฟเฟอร์ประเภทอื่นซึ่งอาจเนื่องจากไม่มีการสูญเสียดีเอ็นเอไปในขั้นตอนของ phenol:chloroform ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปทำ PCR ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 5 ซึ่งแสดง PCR product เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ phenol/chloroform และ ที่ใช้ Chelex^{R}100 พบว่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นบัฟเฟอร์นี้จึงเหมาะที่จะใช้เมื่อต้องทำการทดลองกับตัวอย่างครั้งละมากๆ อย่างไรก็ตามเนื่องจากในการทดลองแรกๆยังไม่ได้สั่งซื้อ Chelex^{R}100 มาใช้งาน และเพื่อให้การเตรียมตัวอย่างทั้งหมดอยู่เป็นวิธีการเดียวกัน จึงได้ใช้บัฟเฟอร์ 3 ตลอดการทดลอง



รูปที่ 5 แสดงแบบแผนดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้ง 2 ตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐาน (phenol/chloroform extraction), lane 1 และ 2 และ ที่ใช้ Chelex^{R}100, lane 3 และ 4

4. การคัดเลือก primer ที่เหมาะสมสำหรับทำ RAPD

การนำเทคนิค RAPD มาใช้เพื่อเปรียบเทียบชนิดของกุ้งแชบ๊วย ก่อนอื่นต้องสำรวจหา primer ที่เหมาะสมสำหรับทำ PCR ซึ่งให้แบบแผนแสดงความแตกต่างของกุ้งสองชนิด ในที่นี้ได้สำรวจ primer ทั้งสิ้น 223 ชุด แต่ละชุดมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีโปรแกรมที่ใช้ในการสำรวจคือ 94°C 5 วินาที 37°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ primer ใดที่ให้แบบแผนชัดเจน มีจำนวนแถบดีเอ็นเอไม่มากหรือน้อยเกินไปจะถูกเลือกไว้ก่อน ดังรูปที่ 6 เป็นการทำ RAPD กับตัวอย่าง 3-6 ตัวอย่างกับ primer หมายเลขต่างๆ ในที่นี้ได้แก่ UBC 701, 814, 815 และ 703 จะเห็นว่า primer 814 เป็น primer ที่ใช้ไม่ได้เนื่องจากไม่เกิดการ amplify ใดๆ ส่วน primer 701 เป็น primer ที่ให้ผลการ amplify ที่ดีเป็นต้น หลังจากนั้นจึงใช้ primer ที่เลือกไว้มาทำการทดลองซ้ำกับตัวอย่างซึ่งประกอบด้วย *Metapenaeus, P. monodon* อย่างละ 1-2 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ถูกระบุด้วยสัณฐานวิทยาว่าเป็น *P. indicus* และ *P. merguiensis* อีกอย่างละ 1-2 ตัวอย่าง ทำ PCR อย่างน้อย 3 ครั้งเพื่อตรวจสอบว่าแบบแผนดีเอ็นเอมีความคงที่แม้เปลี่ยนปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองซึ่งปกติคือ 25 นาโนกรัม ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร เป็น 50 และ 100 นาโนกรัม นอกจากนั้น primer ที่ถูกเลือกยังต้องให้แบบแผนดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของ *Metapenaeus, P. monodon* และ กุ้งแชบ๊วย (*P. indicus* และ *P. merguiensis*) จากการทดลองข้างต้นในที่สุดได้ primer ที่คาดว่าจะสามารถนำไปศึกษาต่อได้ 10 ชุด แต่เนื่องจากการทำ PCR แต่ละครั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง และมิได้หมายความว่าการทดลองของแต่ละตัวอย่างจะได้ผลที่น่าพอใจเสมอ บางครั้ง



รูปที่ 6 แสดงแบบแผน RAPD ที่ได้จากการทำ screening เพื่อหา primer ที่เหมาะสม โดยในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร มีดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม $MgCl_2$ 3.5 mM ความเข้มข้นของ primer เป็น 0.2 μM และมีโปรแกรมการทำ PCR คือ 94°C 5 วินาที 37°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ

อาจต้องทดลองซ้ำเนื่องจากความผิดพลาดของผู้ทำการทดลองเองหรือความแปรปรวนของเครื่องมือและสารเคมี ดังนั้นจึงได้เลือก primer เพียง 5 ชุดมาทำทดลองก่อนคือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 หากแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จาก primer 5 ชุดนี้ สามารถนำไปสู่การหา specific primer ได้ก็ยังไม่จำเป็นที่ต้องใช้ primer ชุดอื่นในขณะนี้ แต่ถ้าไม่ได้ก็ต้องตรวจสอบแบบแผนจาก primer อื่นเพิ่มเติมหรือสุ่มหาต่อไป

5. การปรับสภาวะสำหรับทำ PCR โดยใช้ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787

ในขั้นตอนต่อไปคือการศึกษาว่าควรจะทำ PCR สภาวะใดกับ primer ทั้งห้าชุดคือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787 จึงจะได้แบบแผนชัดเจนที่สุด การเปลี่ยนแปลงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมคือ เปลี่ยนปริมาณ Mg^{++} และ annealing temperature จากการทดลองพบว่าปริมาณ Mg^{++} ที่ 3.5 mM เป็นปริมาณที่เหมาะสม ส่วน annealing temperature ได้ทดลองใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 37°C เพราะการเปลี่ยน annealing temperature ให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มความจำเพาะของ primer ในการทำ PCR แต่ขณะเดียวกันอาจเกิดปัญหาว่าเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยลงจนอาจทำให้สูญเสียแถบ ที่น่าสนใจไป ในที่นี้ได้ทดลองเปรียบเทียบแบบแผนที่ได้จากการใช้อุณหภูมิที่ 40°C, 42°C, 44°C, 50°C พบว่า primer ทั้ง 5 ชนิด ให้แบบแผน PCR ที่อุณหภูมิ 40°C- 44°C คล้ายคลึงกับแบบแผนที่ 37°C แต่ดีกว่า คือที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้แถบคมชัดขึ้น มี background ต่ำ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มถึง 50°C การ amplify เกิดได้ไม่ดี แถบย่อย ๆ หายไปบ้างหรือหายไปเกือบหมดเหลือแต่แถบหลัก ๆ ไว้ ในที่สุดได้เลือกใช้ annealing temperature ที่ 42°C สำหรับ UBC 787 และที่ 44°C สำหรับ OPC 06, UBC 114, UBC 150 และ UBC 701 ในการทดลองต่อ ๆ ไป

6. การเปรียบเทียบแบบแผน RAPD ของแต่ละตัวอย่าง

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ของแต่ละ primer ตามหัวข้อที่ 5 แล้วจึงเริ่มทำการทดลองกับตัวอย่างกลุ่มต่างๆโดยเลือกใช้ A5-A14 และ E1-E15 ก่อน นำ PCR product ไปแยกด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis บันทึกผลการทดลอง 2 แบบคือ เก็บภาพด้วยกล้องวิดิโอบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst ของ BIO-RAD และเก็บภาพอีกครั้งด้วยกล้องถ่ายภาพใช้ฟิลม์ขาวดำ สาเหตุที่ต้องทำทั้งสองแบบเพราะพบว่าการเก็บภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ จะได้รายละเอียดที่คมชัดกว่าใช้กล้องวิดีโอและจำเป็นสำหรับใช้ในการรายงานผลการวิจัย แต่การเก็บข้อมูลด้วยกล้องวิดีโอผ่านคอมพิวเตอร์จะทำให้สามารถวิเคราะห์แบบแผนได้ทันที

รูปที่ 7-11 แสดงแบบแผนที่ได้จาก primer ทั้ง 5 ชนิด ตัวอย่างในภาพทั้งหมดได้แก่ตัวอย่างกลุ่ม A คือ A5-A14 และกลุ่ม E คือ E1-E15 ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

OPC 06

แบบแผนดีเอ็นเอประกอบด้วยแถบประมาณ 10-14 แถบ ขนาดระหว่าง 200-1,500 bp. ในจำนวนแถบเหล่านี้ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่าง 500-600 bp. ในแต่ละตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยที่ทำการทดลองโดยมีแถบที่บริเวณนี้ 1-4 แถบ (รูปที่ 6 บริเวณลูกศรชี้) ส่วนตัวอย่างกุ้งชนิดอื่นเช่น *Metapenaeus* และ *P. monodon* ไม่พบแถบที่เข้ม ณ. บริเวณดังกล่าว จึงตั้งข้อสัณ นิษฐานว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 500-600 bp. ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย OPC 06 นี้ อาจมีความสำคัญต่อการนำไปใช้แยกชนิดของกุ้งแชบ๊วยได้ จึงเลือกโคลนดีเอ็นเอ 2 แถบจากตัวอย่าง E7 ดังจะได้กล่าวในหัวข้อถัดไป

UBC 114

ได้แถบดีเอ็นเอที่ มีขนาดระหว่าง 200-1,000 bp. จำนวน 12-15 แถบ แถบชัดซึ่งปรากฏและไม่ปรากฏในบางตัวอย่างได้แก่แถบที่ขนาด 900 bp. (รูปที่ 8 ของกลุ่ม A มี background สูงอาจเกิดจากเป็นการทดลองซ้ำโดยใช้ primer ที่เก็บไว้นานเพื่อเก็บภาพมาแสดงเนื่องจากภาพเดิมชำรุด แต่ดังที่กล่าวข้างต้นว่าเราได้เก็บข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ร่วมด้วย ดังนั้นในการวิเคราะห์แถบด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จึงไม่มีปัญหาอะไร)

UBC 150

ได้แถบดีเอ็นเอระหว่าง 200-1,500 bp. จำนวน 10-16 แถบ (รูปที่ 9) ไม่พบแถบเด่นที่อาจนำไปใช้หา specific primer ได้ แต่แบบแผนที่ได้ชัดเจนพอสำหรั บการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่าง จากรูปพบว่าตัวอย่างที่ E5-E10 ได้แถบไม่ครบถ้วนทั้งนี้เกิดจากความแปรปรวนในการทำ RAPD อย่างไรก็ตามได้ทำการทดลองซ่อมในตัวอย่างที่มีปัญหา และเวลาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สามารถนำแถบที่เกิดจากการทดลองซ่อมไปแทนที่แถบเดิมที่ไม่ชัดเจนได้ และได้ใช้วิธีการเช่นนี้กับทุกกรณีที่มีปัญหา

UBC 701

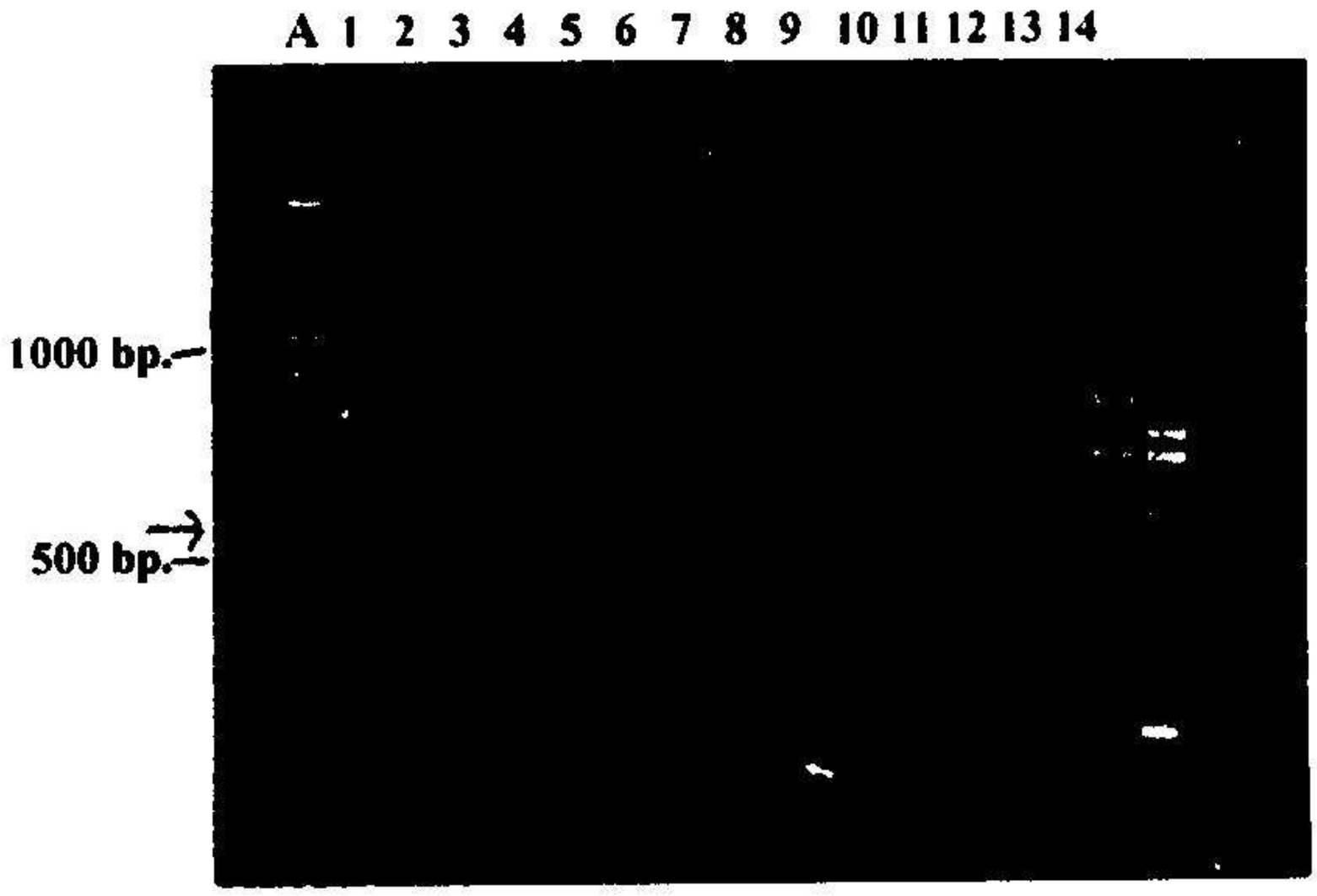
ได้แบบแผนประกอบด้วยแถบกระจายสม่ำเสมออยู่ระหว่าง 200-1,500 bp. เช่นเดียวกับสอง primer แรก เป็น primer ที่ให้แบบแผนของแต่ละตัวอย่างค่อนข้างจะแตกต่างกันมาก (มี polymorphism) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าแถบที่ 200 bp.ซึ่งเป็นแถบเข้มชัดเจน (รูปที่ 10) มักปรากฏและไม่ปรากฏในบางตัวอย่าง

UBC 787

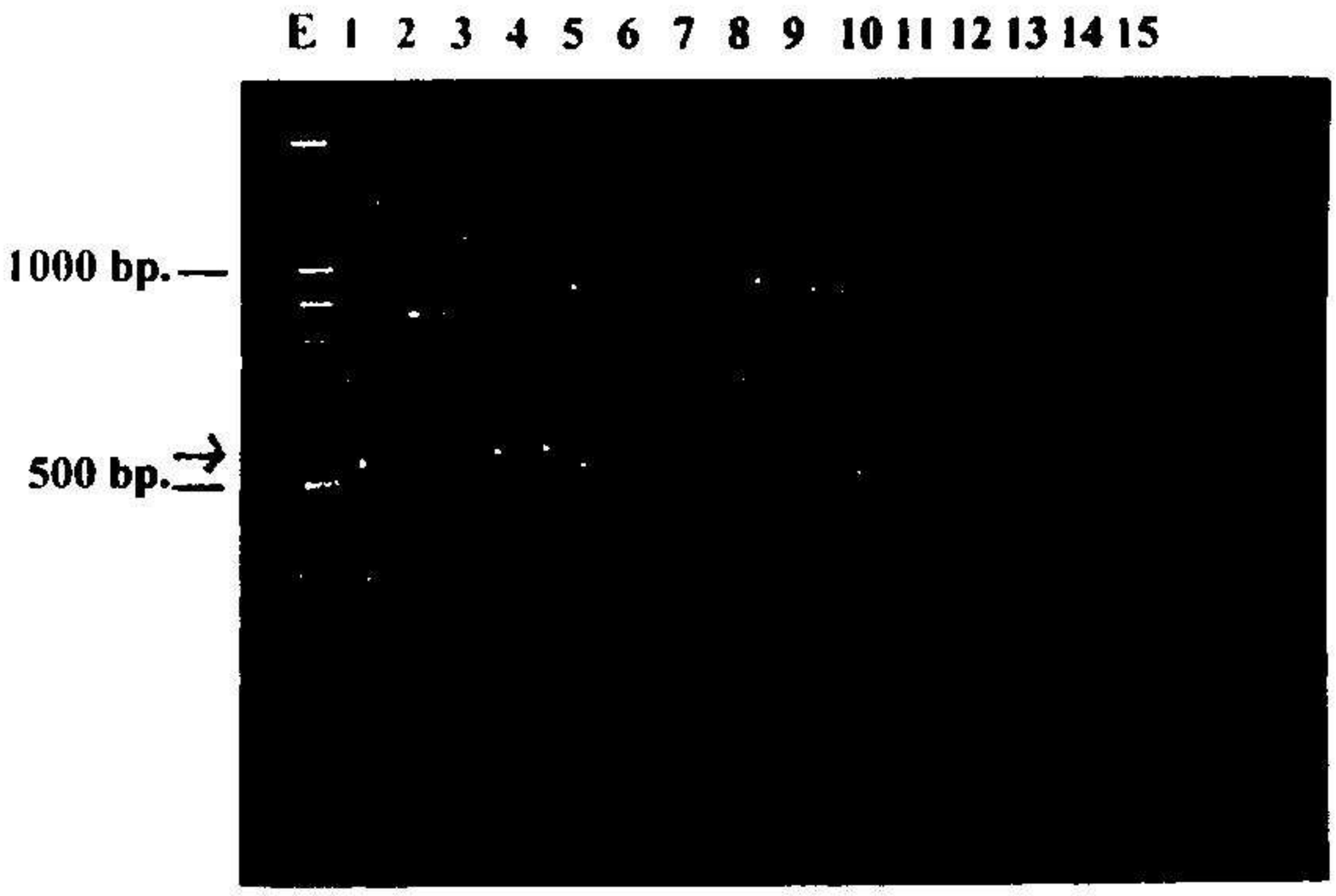
ประกอบด้วยแถบความเข้มสม่ำเสมอตลอดช่วง 200-1,300 bp. แต่มีอยู่หนึ่งแถบที่ 600 bp. ซึ่งปรากฏเป็นแถบเข้มกว่าแถบอื่น แถบเข้มอาจหายไป (เช่น E1) หรือเปลี่ยนตำแหน่งไปอยู่ที่ 500 bp.ในบางตัวอย่างเช่น A11 หรือ ที่ 550 bp.ของ E2, E6 (รูปที่ 10) เป็นต้น การที่จะทราบว่าแถบเข้มเหล่านี้มี homology กันหรือไม่ หรือเกิดจากการ amplify ณ. locus เดียวกันบนโครโมโซมหรือไม่ ก็

ต้องโคลนดีเอ็นเอเหล่านี้ไปหาลำดับเบสและออกแบบ specific primer จึงเลือกโคลนแถบที่ 600 bp. จากตัวอย่าง E3 เพื่อศึกษาต่อ

A)

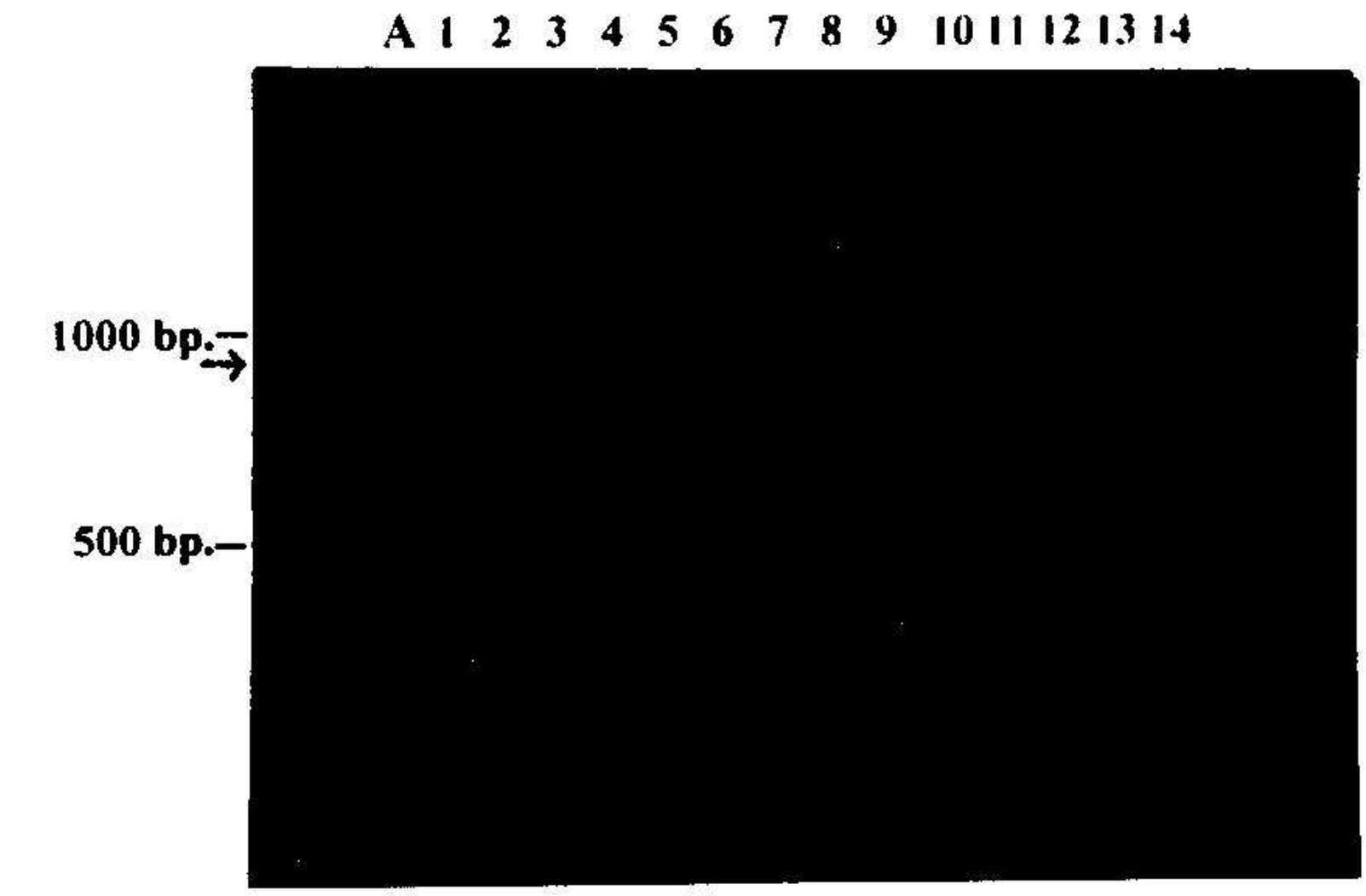


B)

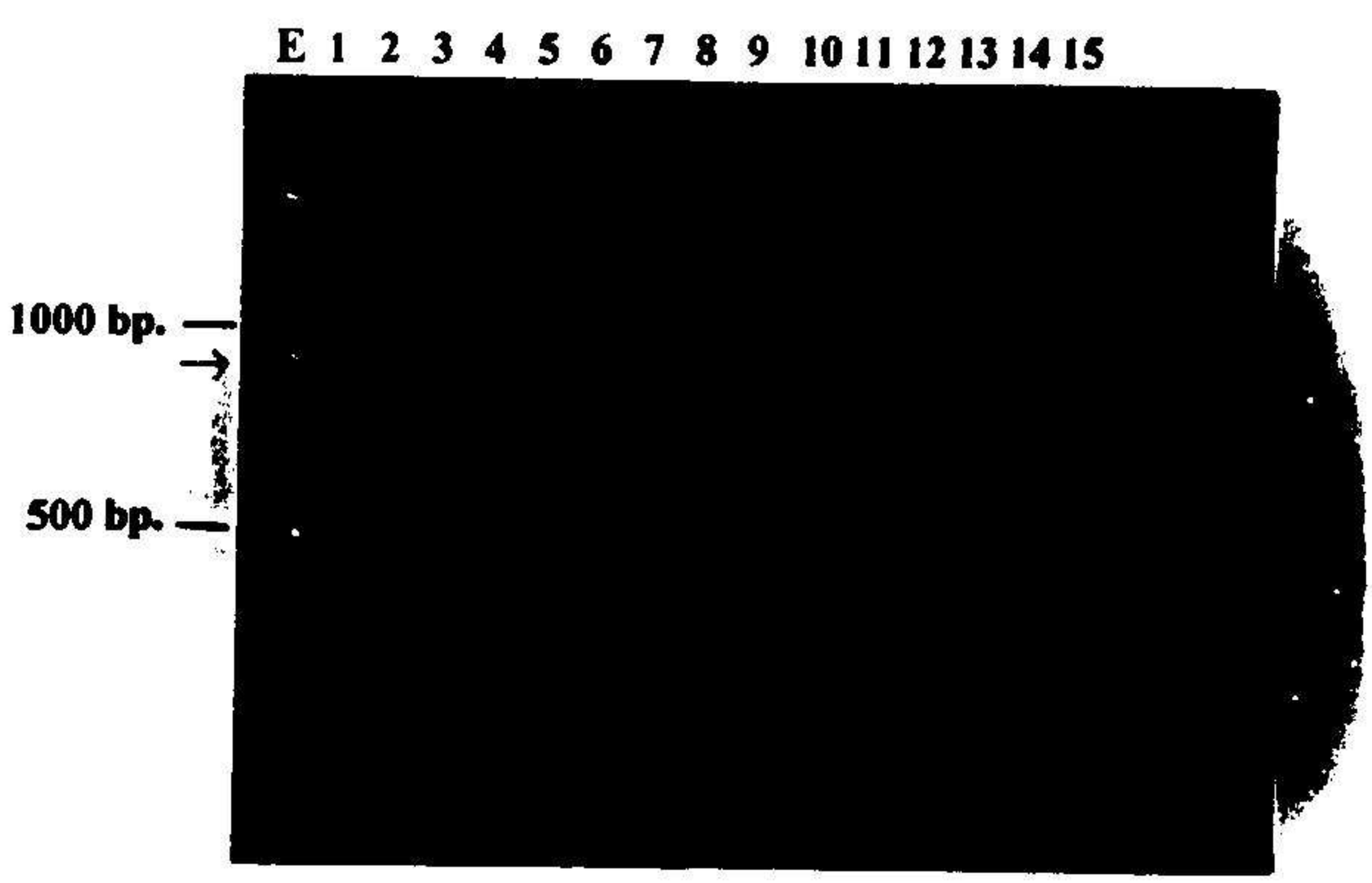


รูปที่ 7 แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer OPC06 มีโปรแกรมของ PCR คือ 94°C 5 วินาที 44°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ แยก PCR product ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ขนาด 11x15 ซม. ใช้ Tris-borate buffer pH 8.0 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 80 V นาน 5 ชม. (molecular weight marker ที่อยู่ปลายซ้ายและขวาของเจลคือ 100 bp. ladder)

A)

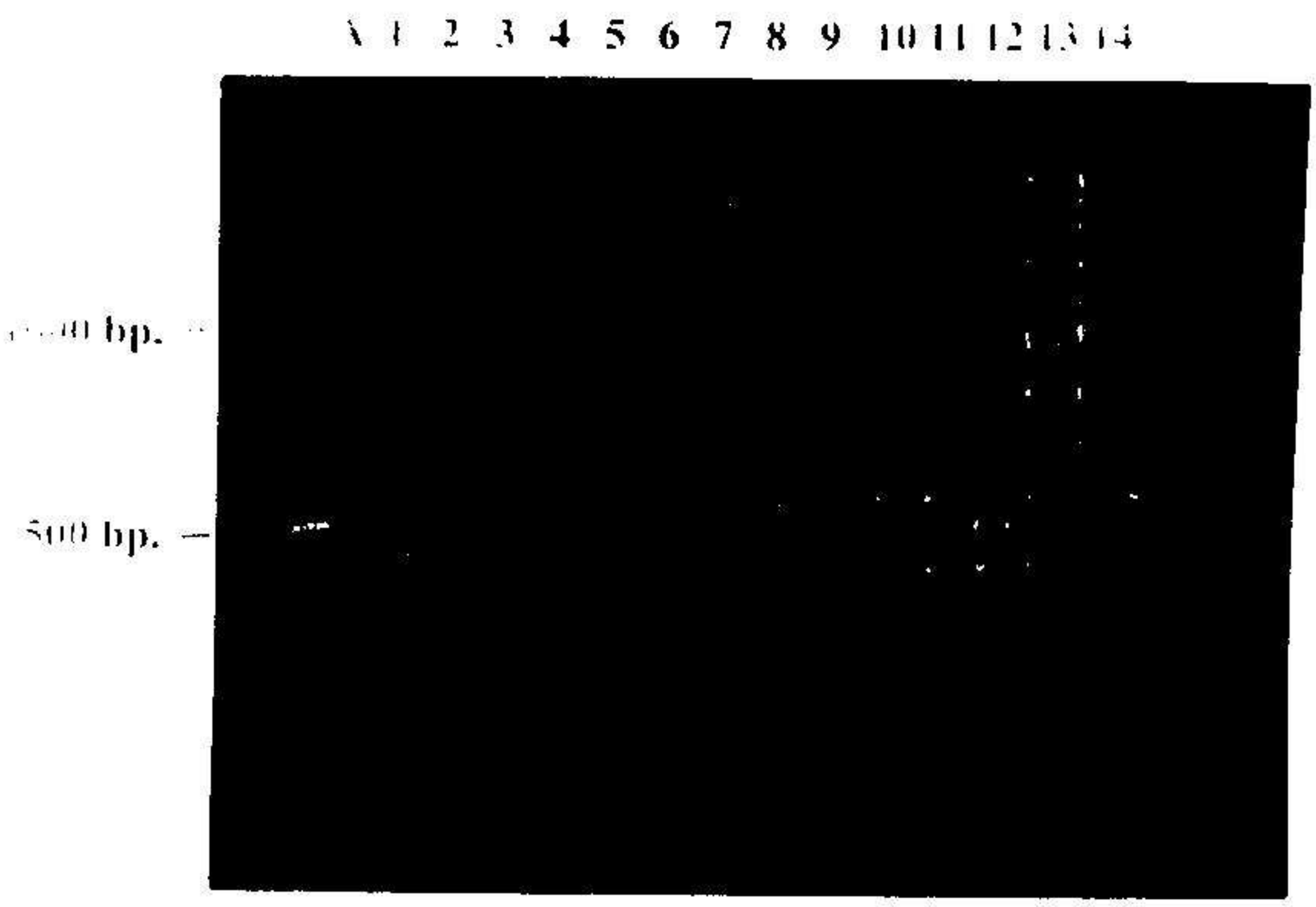


B)

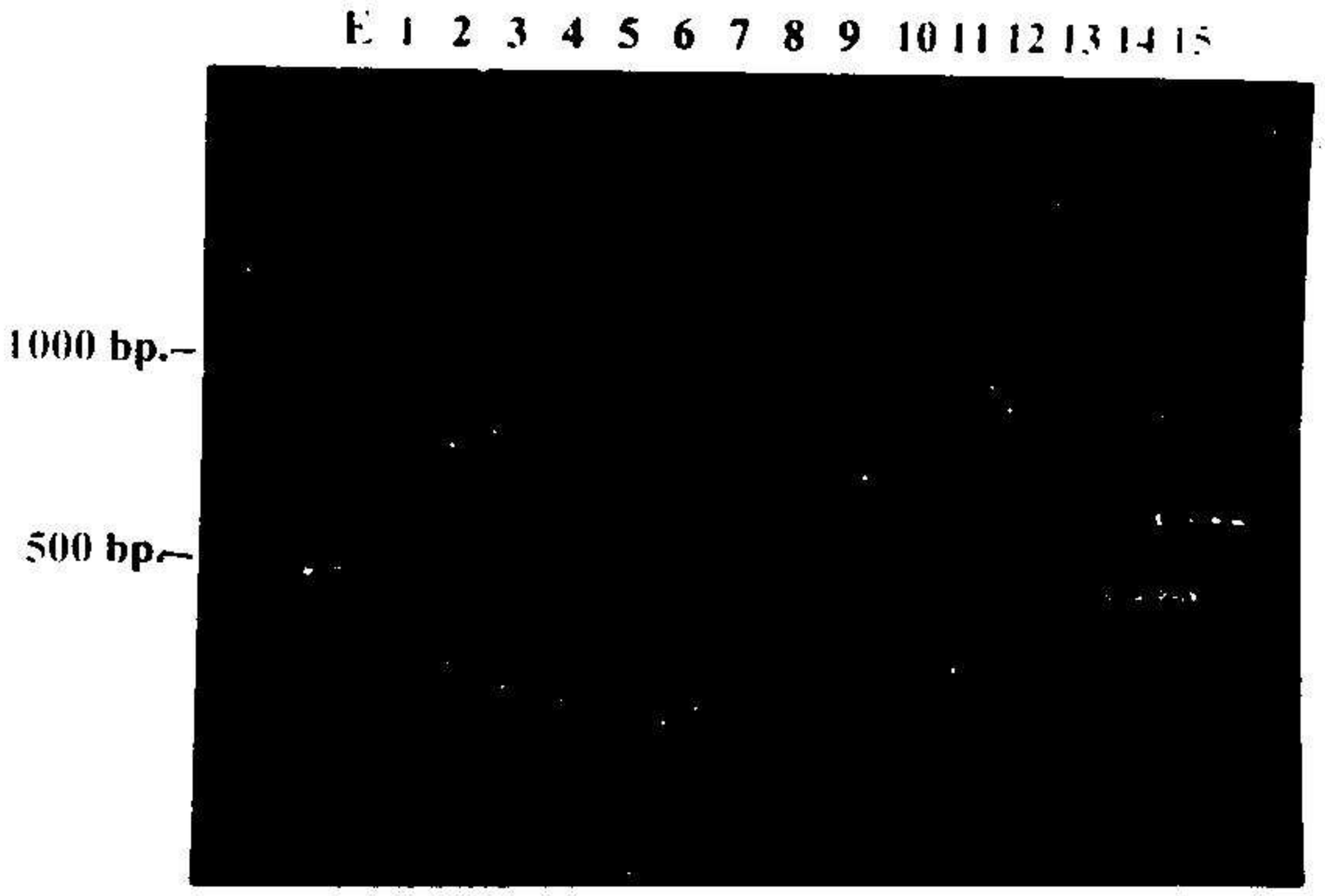


รูปที่ 8 แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC114 มีโปรแกรมของ PCR คือ 94°C 5 วินาที 44°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ แยก PCR product ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ขนาด 11x15 ซม. ใช้ Tris-borate buffer pH 8.0 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 80 V นาน 5 ชม. (molecular weight marker ที่อยู่ปลายซ้ายและขวาของเจลคือ 100 bp. ladder)

A)



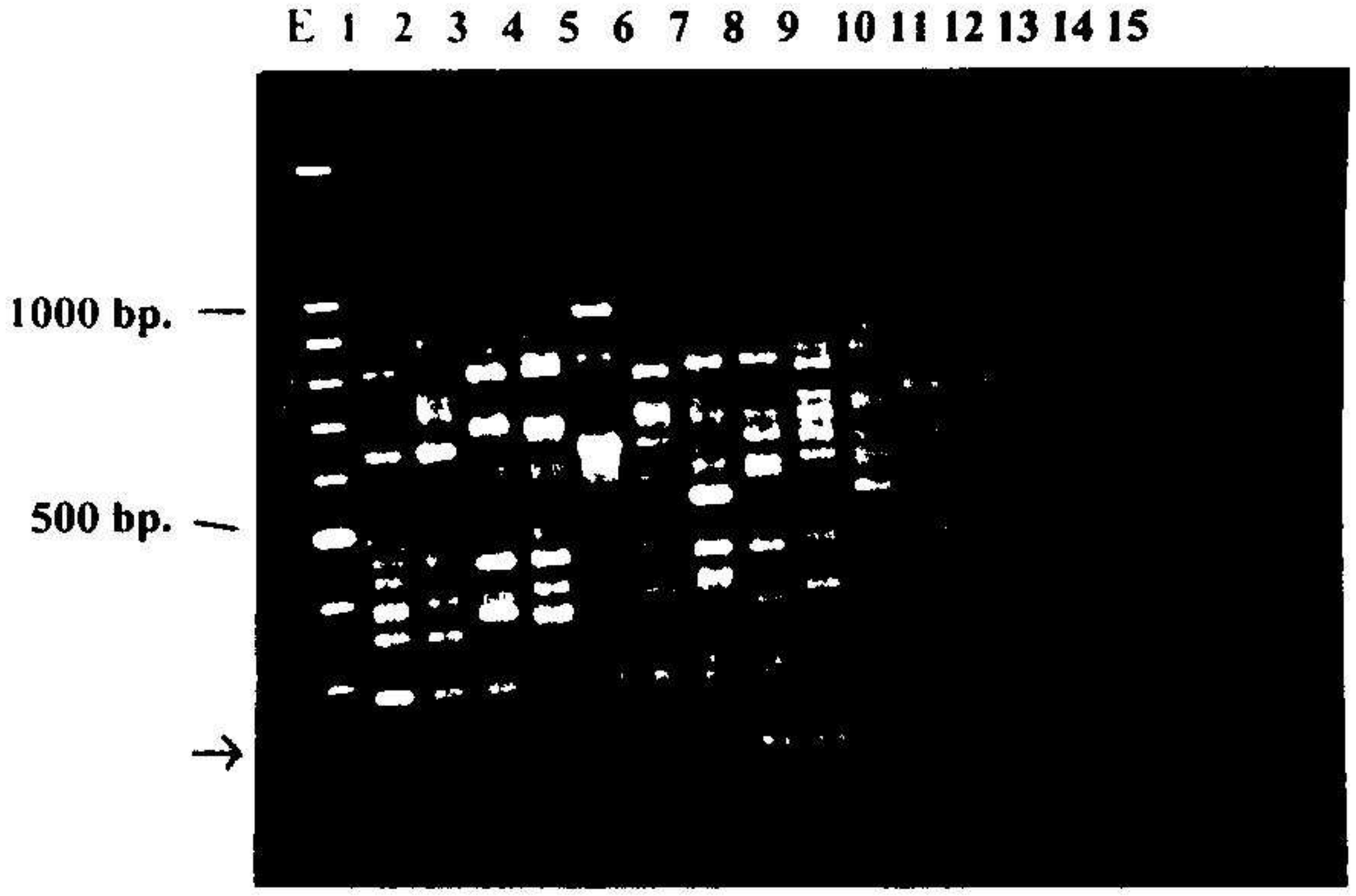
B)



รูปที่ 9 แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 150 มีโปรแกรมของ PCR คือ 94°C 5 วินาที 44°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ แยก PCR product ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ขนาด 11x15 ซม. ใช้ Tris-borate buffer pH 8.0 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 80 V นาน 5 ชม. (molecular weight marker ที่อยู่ปลายซ้ายและขวาของเจลคือ 100 bp. ladder)

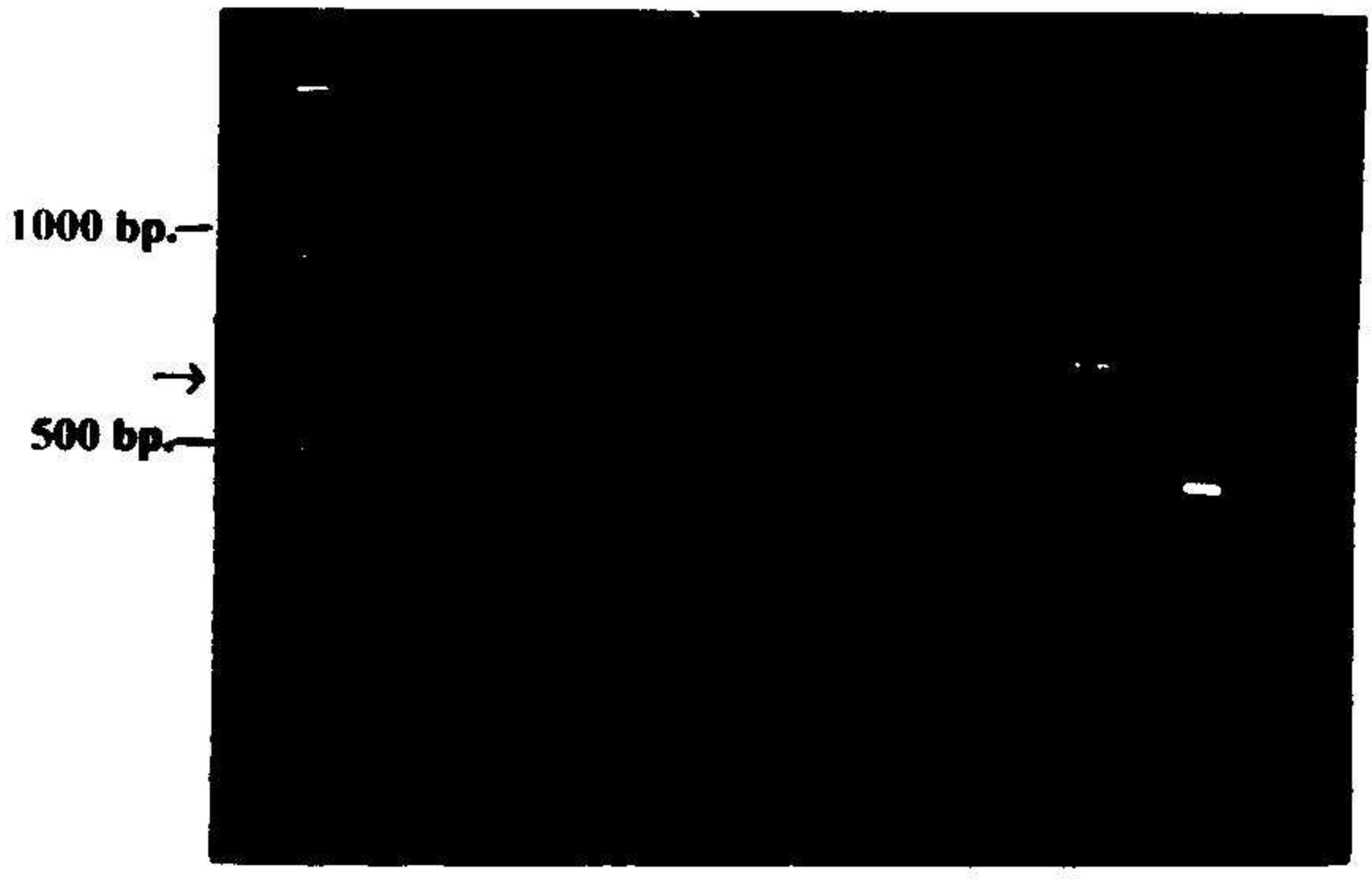
A)

B)

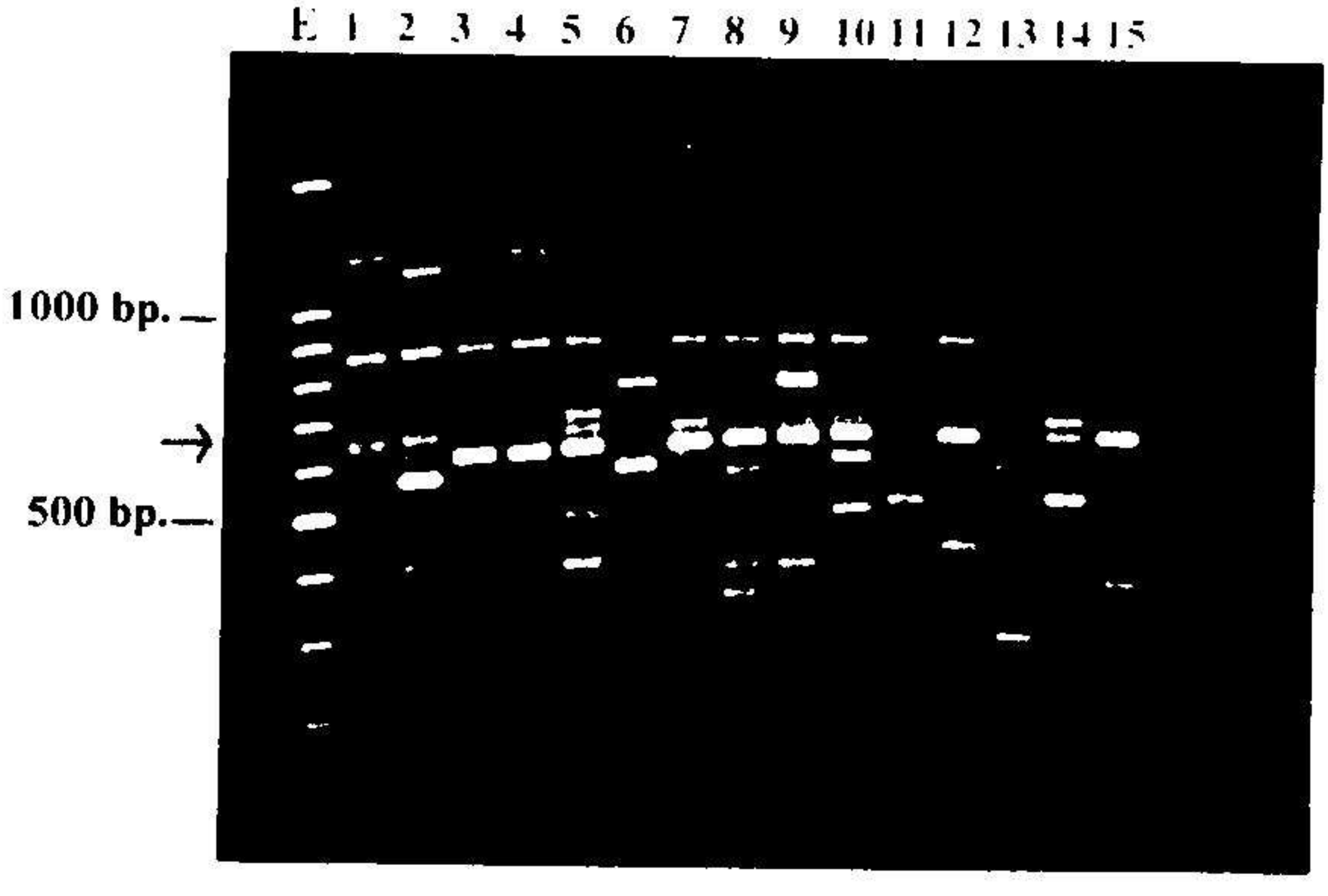


รูปที่ 10 แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 701 มีโปรแกรมของ PCR คือ 94°C 5 วินาที 44°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ แยก PCR product ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ขนาด 11x15 ซม. ใช้ Tris-borate buffer pH 8.0 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 80 V นาน 5 ซม. (molecular weight marker ที่อยู่ปลายซ้ายและขวาของเจลคือ 100 bp. ladder)

A)



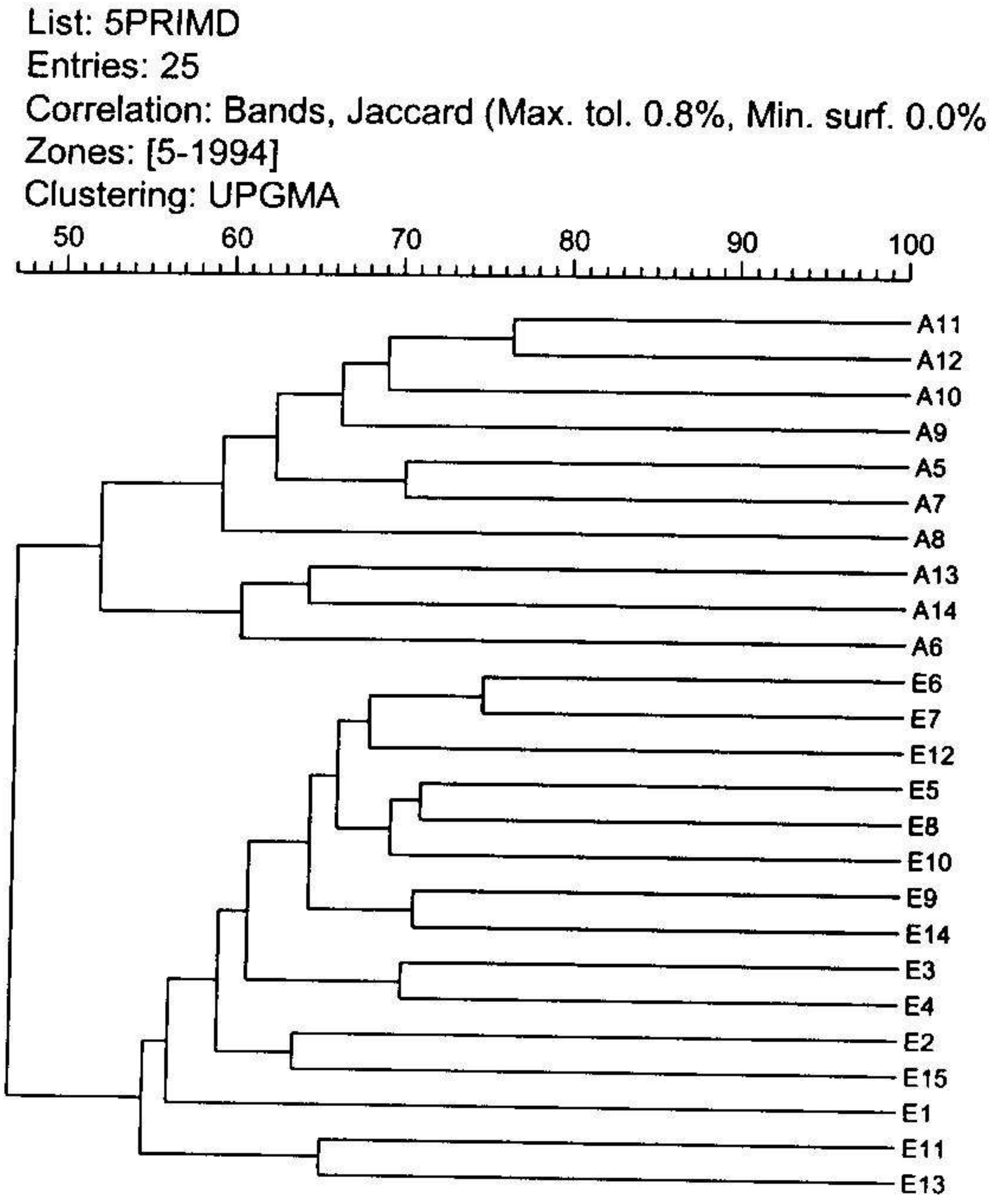
B)



รูปที่ 11 แสดงแบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A) กลุ่ม A และ B) กลุ่ม E โดยใช้ primer UBC 787 มีโปรแกรมของ PCR คือ 94°C 5 วินาที 42°C 20 วินาที 72°C 35 รอบ แยก PCR product ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ขนาด 11x15 ซม. ใช้ Tris-borate buffer pH 8.0 และใช้กระแสไฟฟ้าที่ 80 V นาน 5 ชม. (molecular weight marker ที่อยู่ปลายซ้ายและขวาของเจลคือ 100 bp. ladder)

7. การใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอ

วิเคราะห์แบบแผน RAPD ของตัวอย่าง A5-A14 และ E1-E15 ด้วยโปรแกรม Molecular Analyst Software ของ BIO-RAD โปรแกรมดังกล่าวสามารถเปรียบเทียบแบบแผนของแต่ละตัวอย่างและคำนวณค่า similarity โดยใช้วิธี unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) แสดงผลเป็น dendrogram ดังรูปที่ 12 ข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำมาช่วยระบุความใกล้เคียงของตัวอย่างแต่ละตัว และเป็นข้อมูลประกอบในการพิจารณาหา specific primer สำหรับการจำแนกชนิดกุ้ง



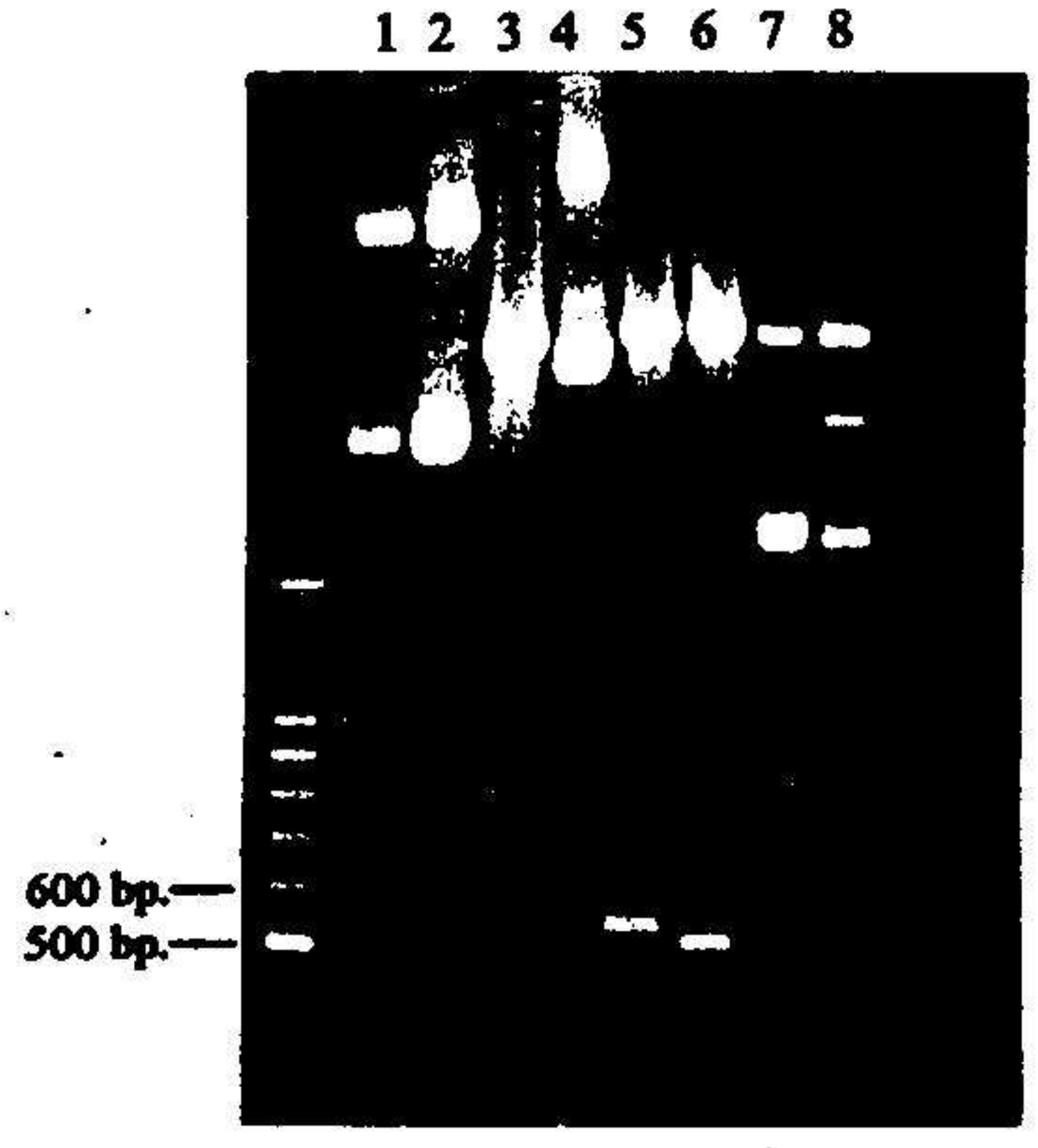
รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างกลุ่ม A และ กลุ่ม E ที่ได้จากการเปรียบเทียบแบบแผน RAPD จาก primer ห้าชนิดคือ OPC 06, UBC 114, UBC 150, UBC 701 และ UBC 787

8. การโคลนดีเอ็นเอจากแถบที่น่าสนใจ

จากผลการทดลองในหัวข้อที่ 6 จะเห็นว่ามีแถบดีเอ็นเอที่น่าสนใจหลายแถบ (รูปที่ 7-11 บริเวณที่ลูกศรชี้) จึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นดังรายละเอียดต่อไปนี้

8.1 แถบดีเอ็นเอจาก OPC 06

ได้แก่ดีเอ็นเอสองขนาดระหว่าง 450-500 bp. เนื่องจากเป็นแถบที่พบในเกือบทุกตัวอย่างของกุ้งแชบ๊วย เลือกตัดวุ้นบริเวณที่มีดีเอ็นเอสองแถบของตัวอย่าง E7 (รูปที่ 7B) ละลายดีเอ็นเอออกจากวุ้น ทำดีเอ็นเอให้สะอาดและเชื่อมดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy (รูปที่ 3) ก่อนนำไป transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมที่ได้โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI พบว่าได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดตรงกับแถบที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำ PCR ด้วย OPC 06 เรียกโคลนเหล่านี้ตามขนาดจากมากไปน้อยว่า 06/1 และ 06/2 (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอของโคลน 06/1 และ 06/2 ซึ่งได้จากการโคลนแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450-550 bp. ของตัวอย่าง E7 ที่ทำ PCR ด้วย primer OPC 06 ตรวจสอบโคลนโดยตัดด้วย *Eco*RI จากรูป lane 1-2, เวคเตอร์ pGEM-TEasy; lane 3, เวคเตอร์ pGEM-TEasy ตัดด้วย *Eco*RI; lane 4, โคลน 06/1; lane 5, โคลน 06/1 ตัดด้วย *Eco*RI; lane 6, โคลน 06/2 ตัดด้วย *Eco*RI(lane 7-8 เป็นดีเอ็นเอที่ไม่เกี่ยวข้องกับงานนี้)

8.2 แถบดีเอ็นเอจาก UBC 114, UBC 701 และ UBC 787

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ 8.1 คือเลือกโคลนดีเอ็นเอขนาด 900 bp. 200 bp. และ 600 bp. ที่เกิดจากการทำ PCR โดยใช้ UBC 114, UBC 701 และ UBC 787 ตามลำดับ ตรวจสอบดีเอ็นเอของแต่ละโคลนโดยตัดดีเอ็นเอด้วย *Eco*RI แล้วเปรียบเทียบว่าตรงกับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการหรือไม่ ให้ชื่อของแต่ละโคลนตามชื่อ primer คือ โคลน 114, 701, และ 7871/ (600 bp.)

9. การหาลำดับเบสของแต่ละโคลนและออกแบบ specific primer

นำดีเอ็นเอที่โคลนได้ในหัวข้อที่ 8 ไปหาลำดับเบส โดยใช้ sequence ของ T7 และ SP6 เป็น primer ได้ลำดับเบสของโคลนต่าง ๆ และสรุปข้อมูลได้ดังต่อไปนี้

9.1 โคลนของ 06

โคลนของ 06/1 และ 06/2 มีลำดับเบสที่แน่นอนคือ 521 bp., และ 493 bp. ตามลำดับ (รูปที่ 14, 15) พบว่าลำดับเบสทั้งสองโคลนมีความคล้ายคลึงกันมากดังแสดงในรูปที่ 16 แต่โคลนของ 06/2 มี putative coding frame ของโปรตีนที่มีจำนวนกรดอะมิโน 96 หน่วย ในขณะที่ไม่พบ open reading frame ขนาดยาวใน 06/1 เลย และ เนื่องจากทั้งสองโคลนมีลำดับเบสคล้ายคลึงกันมาก จึงได้ออกแบบ specific primer เพียงคู่เดียวตามตารางที่ 5

9.2 โคลนของ 114

เนื่องจากเป็นโคลนที่มีขนาดใหญ่การทำ sequencing เพื่อทราบลำดับเบสของทั้ง5' และ3' ค่อนข้างยุ่งยากกว่าโคลนอื่น จากการทดลองปรากฏว่ามีปัญหาการอ่านลำดับเบสที่ปลาย 3' ทำให้ไม่สามารถออกแบบ specific primer ได้ในที่นี้ คาดว่าอาจเกิดจากการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอไม่สะอาดพอ และจะต้องมีการหาลำดับเบสใหม่อีกครั้ง

9.3 โคลนของ 701

ดีเอ็นเอมีขนาด 212 bp. เมื่อใช้โปรแกรม DNASIS คาดคะเน open reading frame พบความเป็นไปได้ที่จะมีรหัสสำหรับแปลเป็น polypeptide ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 40 หน่วย (รูปที่ 17)

9.4 โคลนของ 787

โคลนที่ได้มีขนาด 602 bp. จากลำดับเบสไม่พบ open reading frame ที่น่าสนใจหรือแนวโน้มที่อาจเป็นรหัสของโปรตีนจริงๆ (รูปที่ 18) ได้ออกแบบ primer โดยใช้โคลนของ 787/1 ดังตารางที่ 5

รูปที่ 14 แสดงลำดับเบสของโคลน 06/1 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัสทั้ง 3 frames

```
          387                 396                 405                 414                 423                 432
ACA GAT AGA TAA ACA GAT ATA GAT AGG TTC ACA GAC AGA TAG ATA CAT AAA TAA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ***
 ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
  ... *** ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... *** ... ...

          441                 450                 459                 468                 477                 486
ATA AAC AAA CAG ATA AAC AGA TAA ATA AAC TTA TCC CGA GCT AAA TTG ATG GTC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... Met Val
 *** ... ... ... *** ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... *** ... ...
  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ...

          495                 504                 513
AAG GAC ATT CCA GAG TCG AAG GAG AGA GTC CGT TC 3'
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --
Lys Asp Ile Pro Glu Ser Lys Glu Arg Val Arg
 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

รูปที่ 14 (ต่อ) แสดงลำดับเบสของโคลน 06/1 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัสทั้ง 3 frames

```
                9                  18                  27                  36                  45                  54
5' GAA CGG ACT CTC TCC TTC GAC TCT GGG AAT GTC CTT AAC CAT CAA TTT AGC TCG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   Glu Arg Thr Leu Ser Phe Asp Ser Gly Asn Val Leu Asn His Gln Phe Ser Ser
    Asn Gly Leu Ser Pro Ser Thr Leu Gly Met Ser Leu Thr Ile Asn Leu Ala Arg
     Thr Asp Ser Leu Leu Arg Leu Trp Glu Cys Pro *** ... ... ... *** ... ...

                63                  72                  81                  90                  99                 108
GGA TAA GTT TAT TTA TCT GTT TAT CTG TTT GTT TAT TTA TTT ATG TAT CTA TCT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Gly *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... Met Tyr Leu Ser
 Asp Lys Phe Ile Tyr Leu Phe Ile Cys Leu Phe Ile Tyr Leu Cys Ile Tyr Leu
  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

              117                 126                 135                 144                 153                 162
GTC TGT GAA CCT ATC TAT ATC TGT TTA TCT ATC TGT CTA TCT GTT AAT CTA TCA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Val Cys Glu Pro Ile Tyr Ile Cys Leu Ser Ile Cys Leu Ser Val Asn Leu Ser
 Ser Val Asn Leu Ser Ile Ser Val Tyr Leu Ser Val Tyr Leu Leu Ile Tyr Gln
  ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ...

              171                 180                 189                 198                 207                 216
ATT ATA TAT TGT TTA TGT ATC TAT TTA TCT ATT TGA TTT TAT TGT AGT AAA GTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Ile Ile Tyr Cys Leu Cys Ile Tyr Leu Ser Ile *** ... ... ... ... ... ...
 Leu Tyr Ile Val Tyr Val Ser Ile Tyr Leu Phe Asp Phe Ile Val Val Lys Leu
  ... ... ... ... Met Tyr Leu Phe Ile Tyr Leu Ile Leu Leu *** *** ... ***

              225                 234                 243                 252                 261                 270
AGG AAT TTC AAG ATC TCA TTT ATT AAG TTC AAA TTT CAA CAA TAG TAT ACA AGA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ...
 Gly Ile Ser Arg Ser His Leu Leu Ser Ser Asn Phe Asn Asn Ser Ile Gln Asp
  ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

              279                 288                 297                 306                 315                 324
CAA GTT CTC AAT AAT TGC ATA GTT TTT AGA CGA TAA GTT TGA AAT TTT AAT ATA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... *** ... ... ... ...
 Lys Phe Ser Ile Ile Ala *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ***
  ... ... ... *** ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... *** ... ...

              333                 342                 351                 360                 369                 378
AAT ATA TAT ATA TCT GTT TAT GAC TAA TTA TGG TTT GAG ACT ATT TCA CTG TGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ...
 .. ... ... ... ... ... Met Thr Asn Tyr Gly Leu Arg Leu Phe His Cys Val
  ... ... ... ... ... ... *** ... ... Met Val *** ... ... ... ... ... ...
```

รูปที่ 15 แสดงลำดับเบสของโคลน 06/2 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัสทั้ง 3 frames

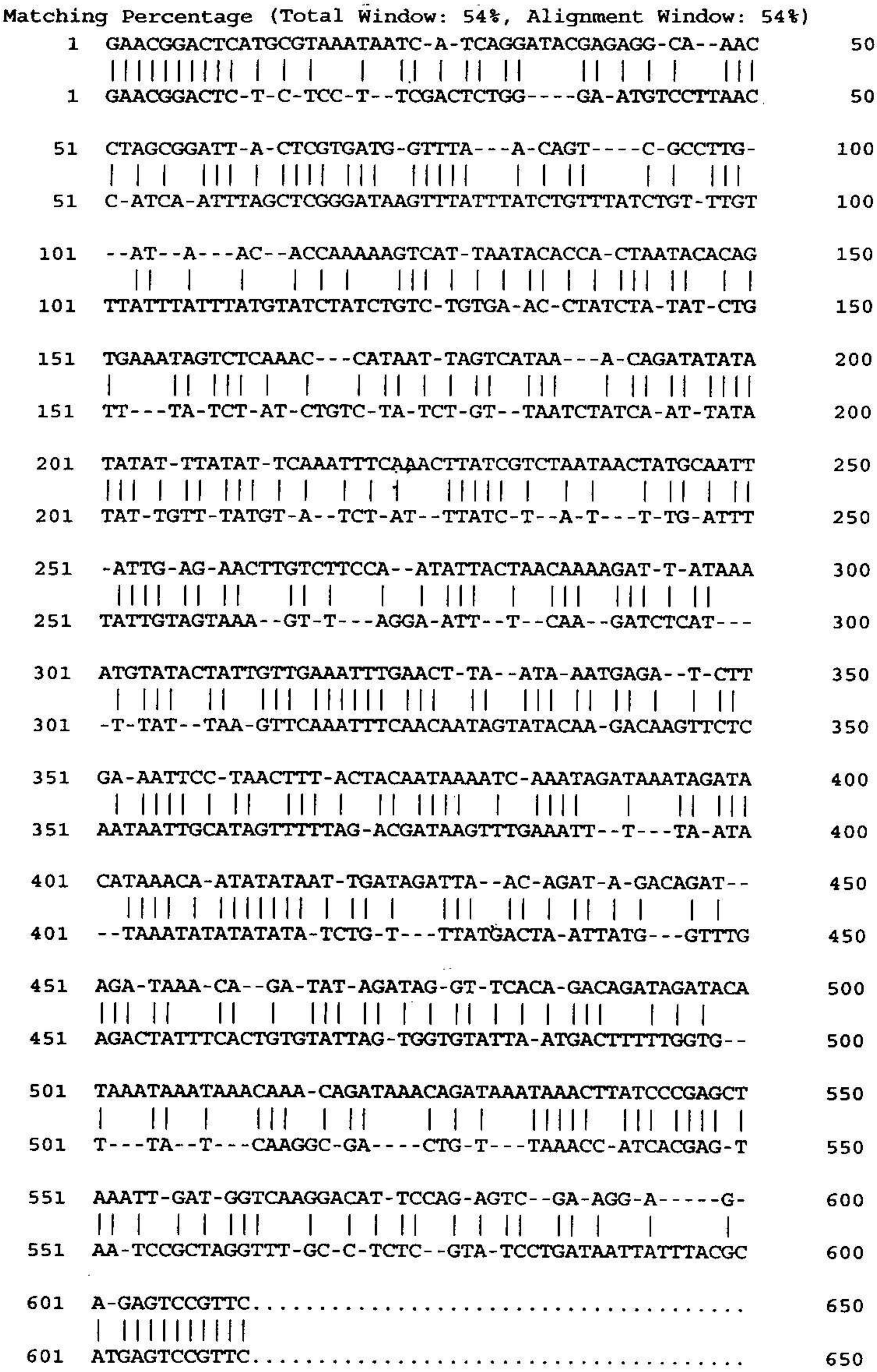
```
         387          396          405          414          423          432
ATT AGT GGT GTA TTA ATG ACT TTT TGG TGT TAT CAA GGC GAC TGT TAA ACC ATC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... Met Thr Phe Trp Cys Tyr Gln Gly Asp Cys *** ... ...
 Leu Val Val Tyr *** *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

  *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

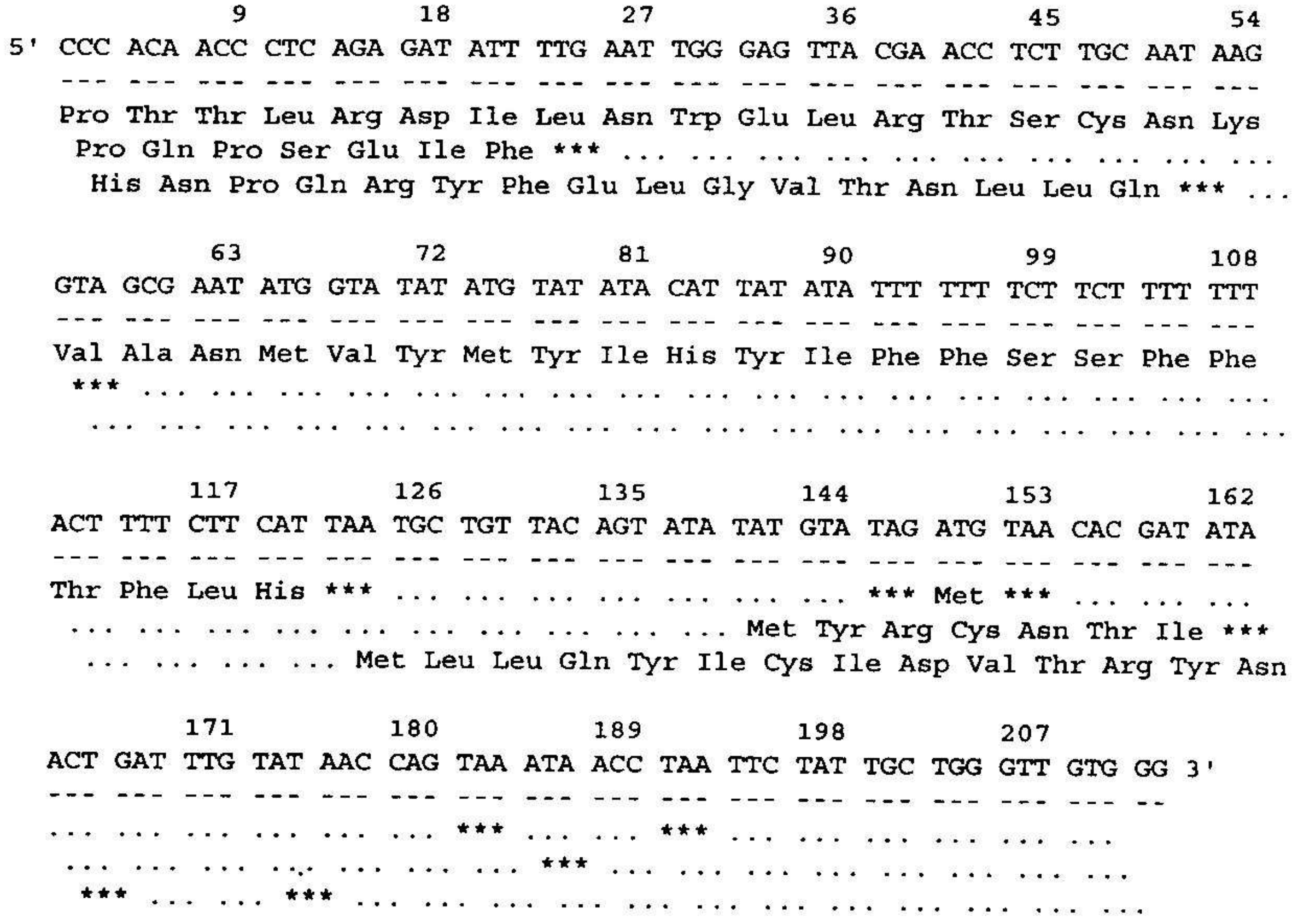
```
         441          450          459          468          477          486
ACG AGT AAT CCG CTA GGT TTG CCT CTC GTA TCC TGA TAA TTA TTT ACG CAT GAG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** *** ... ... ... ... ...
 ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... Met Ser
  ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ...
```

```
TCC GTT C 3'
--- --- -
... ...
 Pro Phe
  ...
```

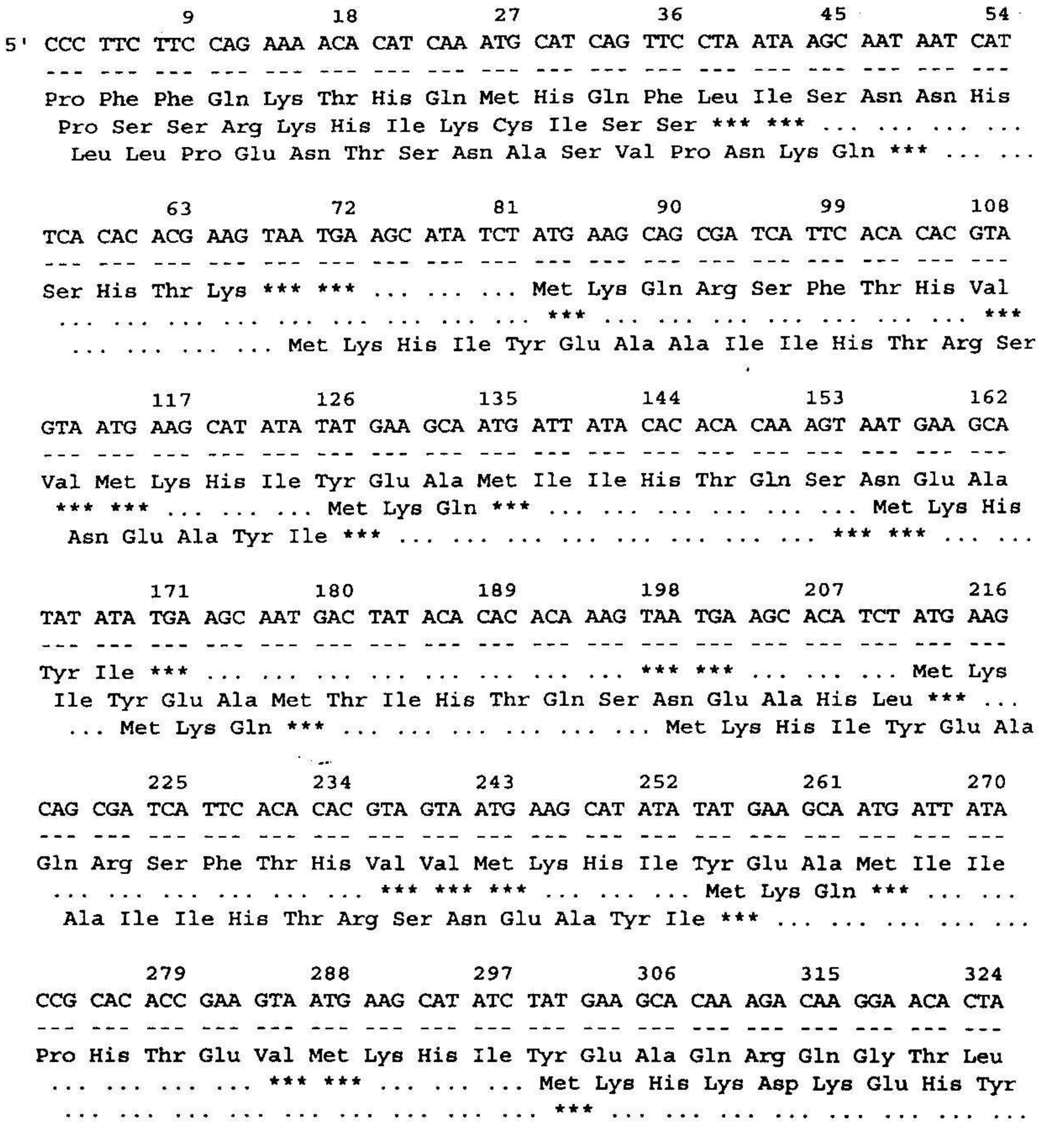
รูปที่ 15 (ต่อ) แสดงลำดับเบสของโคลน 06/2 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัสทั้ง 3 frames



รูปที่ 16 เปรียบเทียบลำดับเบสของ 06/1 (สายบน) และ 06/2 (สายล่าง) พบว่ามีส่วนที่คล้ายคลึงกันตลอดทั้งสายดีเอ็นเอ



รูปที่ 17 แสดงลำดับเบสของโคลน 701 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัสทั้ง 3 frames



รูปที่ 18 แสดงลำดับเบสของโคลน 787/1 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัสทั้ง 3 frames

```
          387           396           405           414           423           432
ACA ACT TAG GTA TGA ATC CTA CTA CAA CTG TAT TAA AGA TGA GAT GGT GGA CAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... *** ... *** ... ... ... ... ... ... *** ... *** ... ... ... ...
 ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... Met Val Asp Ile

  ... ... ... Met Asn Pro Thr Thr Thr Val Leu Lys Met Arg Trp Trp Thr ***

          441           450           459           468           477           486
AAA TAT CCA TGA CTG AAC CAG TTG TGG GTG GGA TTA TGA ATG AAA AAT AAA TGG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... *** Met Lys Asn Lys Trp
 Asn Ile His Asp *** ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ...
  ... ... Met Thr Glu Pro Val Val Gly Gly Ile Met Asn Glu Lys *** Met Asp

          495           504           513           522           531           540
ACA ACG TAC AAT ACT GAA AAC GTT TTA AGG GAC GAG ACA GAA TAA CAC GAA ACA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Thr Thr Tyr Asn Thr Glu Asn Val Leu Arg Asp Glu Thr Glu *** ... ... ...
 ... ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ...
  Asn Val Gln Tyr *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

          549           558           567           576           585           594
CAT TCA TCA TCA GAA TTG TAA AAT GAA AAA AAA GAA AAA AAA AAA TAC TGA GGA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... *** ...
  ... ... ... ... ... ... ... Met Lys Lys Lys Lys Lys Lys Asn Thr Glu Glu
   ... ... ... ... ... ... ... *** ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

AAG AAN GG 3'
--- --- --
... ...
 Arg Xxx
  ... ...
```

รูปที่ 18 (ต่อ) แสดงลำดับเบสของโคลน 787/1 พร้อม putative coding frame ที่ได้จากการแปลรหัส ใน 3 frames

10. แบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ specific primer

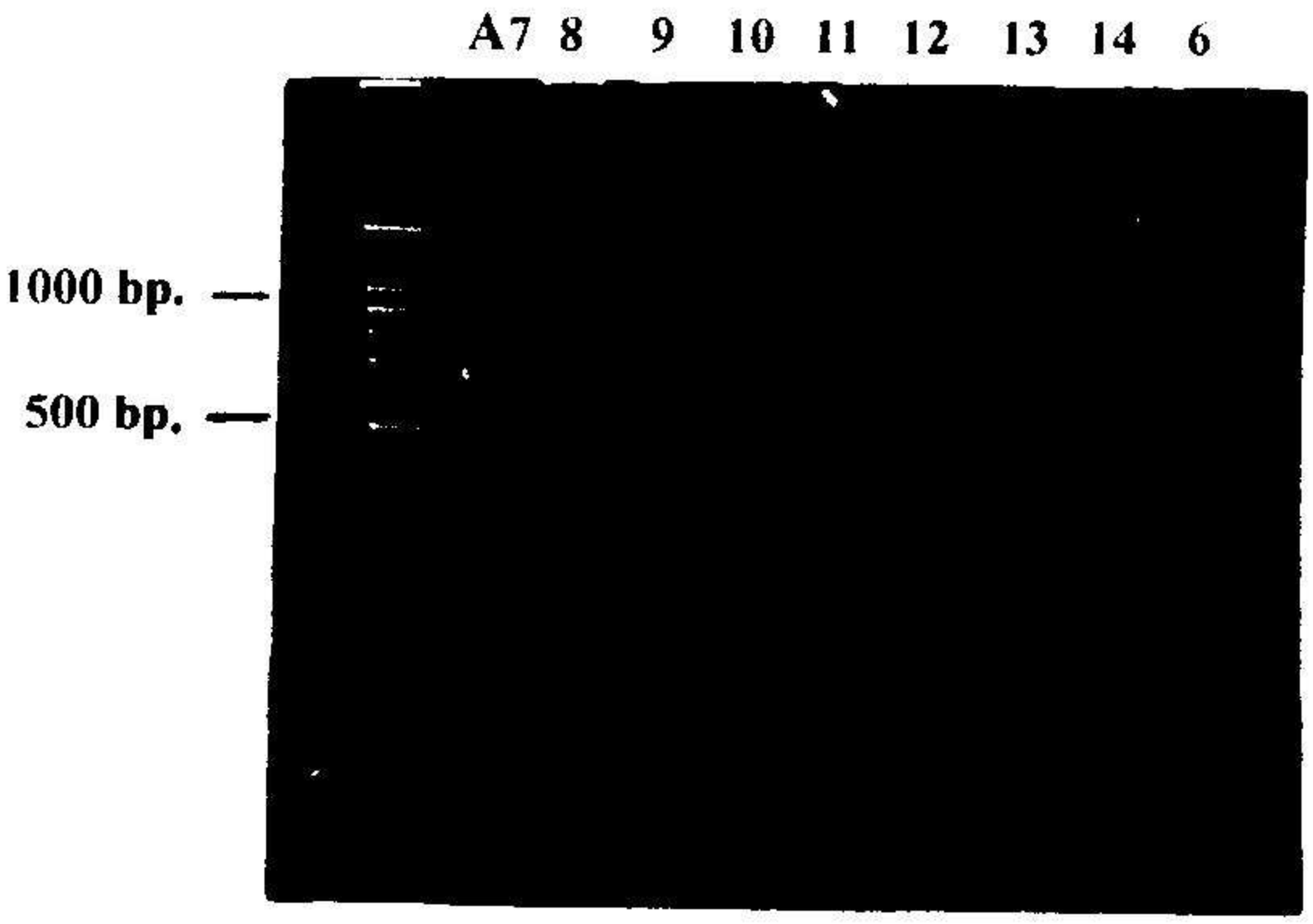
ออกแบบ specific primer ของดีเอ็นเอแต่ละชนิดจากลำดับเบสในข้อ 9 ด้วยโปรแกรม DNASIS ดังตารางที่ 5

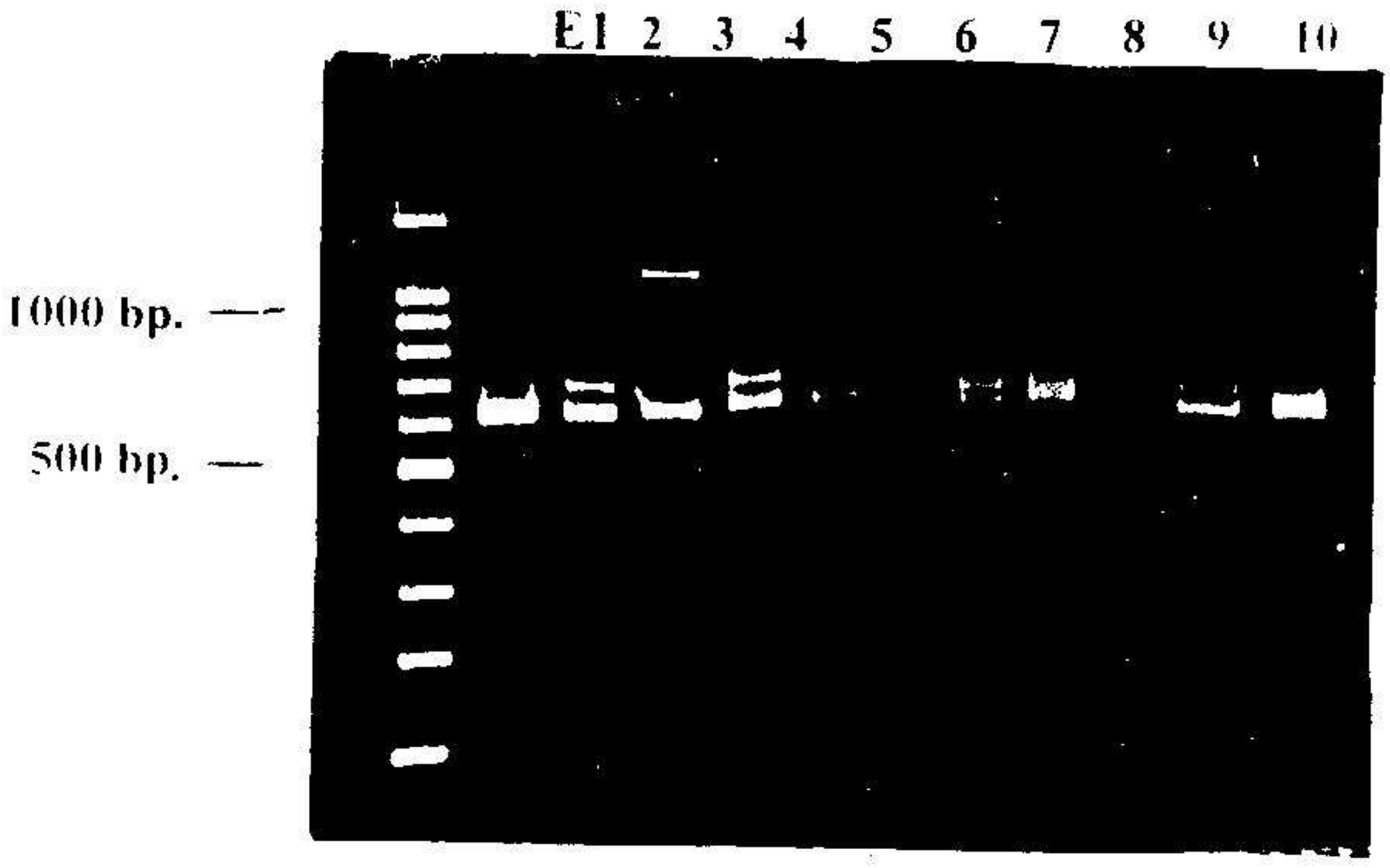
ตารางที่ 5 สรุปข้อมูลจากโคลนของดีเอ็นเอที่สนใจ พร้อมลำดับเบสของ specific primer ที่ออกแบบจากโคลนนั้น ๆ

F หมายถึง forward primer และ R หมายถึง reverse primer

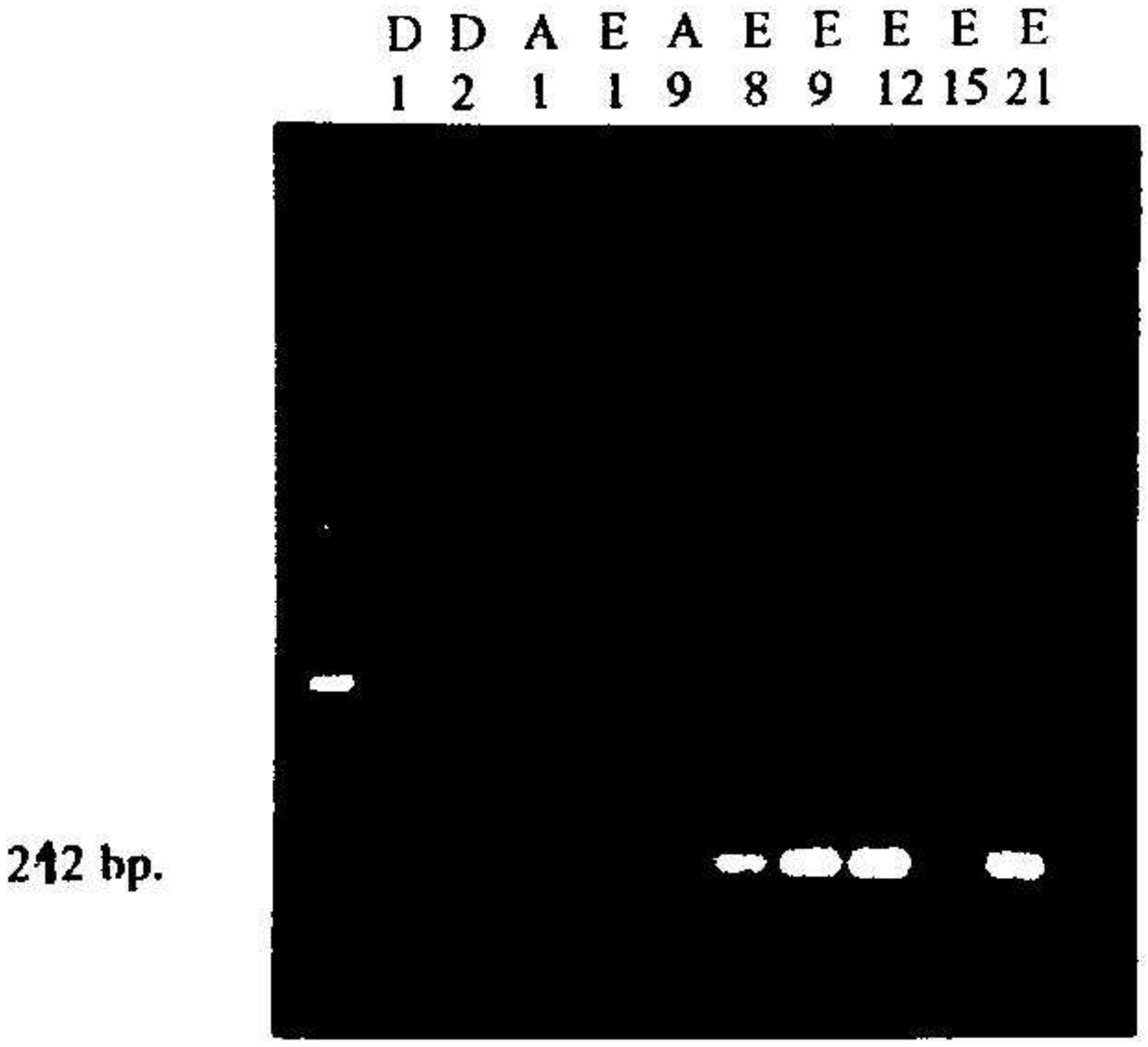
ชื่อโคลน	ชื่อ primer ที่ใช้ทำ RAPD	ขนาดจริงของโคลน (bp)	ลำดับเบสของ specific primer จาก 5'-->3'
06/1	OPC 06	521	F: TGC GTA AAT AAT CAT CAG R: ACT CTC TCC TTC GAC TCT
701	UBC 701	212	F: ACC CTC AGA GAT ATT TTG R: CCC AGC CCT AGA ATT AGG
787/1	UBC 787	602	F: CCC TTC TTC CTC AGT ATT R: TCA AAT GCA TCA GTT CCT

เมื่อนำ specific primer 06/1 ไปใช้ทำ PCR กับตัวอย่างกลุ่ม A และ E แล้วแยกแถบด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis พบว่าทุกตัวอย่างได้แถบตรงกันที่ 520 bp. (ไม่ได้แสดงรูป) แต่เมื่อนำ PCR product ของตัวอย่างชุดเดียวเดียวกันนี้ไปแยกด้วย 5% polyacrylamide gel eletrophoresis พบว่าสามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้ละเอียดและชัดเจนขึ้น (รูปที่ 19) โดยดีเอ็นเอบริเวณนี้มีความแตกต่างกันหลายแบบคือ 1. มีเพียงหนึ่งแถบ (เช่น A12-A14 ส่วน A7, A8 ดูเหมือนพบแถบบาง ๆ ร่วมด้วย เข้าใจว่าเกิดจากการจับของ primer กับส่วนอื่นของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสใกล้เคียง เพราะเมื่อเพิ่ม annealing temperature ให้สูงขึ้น แถบบางนี้จะหายไป) เมื่อเทียบตัวอย่างที่มีหนึ่งแถบด้วยกัน พบว่าแถบเดี่ยวนั้นมีขนาดไม่เท่ากัน (A12 มีขนาดเล็กกว่า A13) 2. มีสองหรือสามแถบเข้ม (เช่น E1- E4, E6, E7, E9, E10, E14) 3. ได้แถบบาง ๆ หนึ่งหรือสามแถบ (E5, E8, E11, E12, E13, E15)





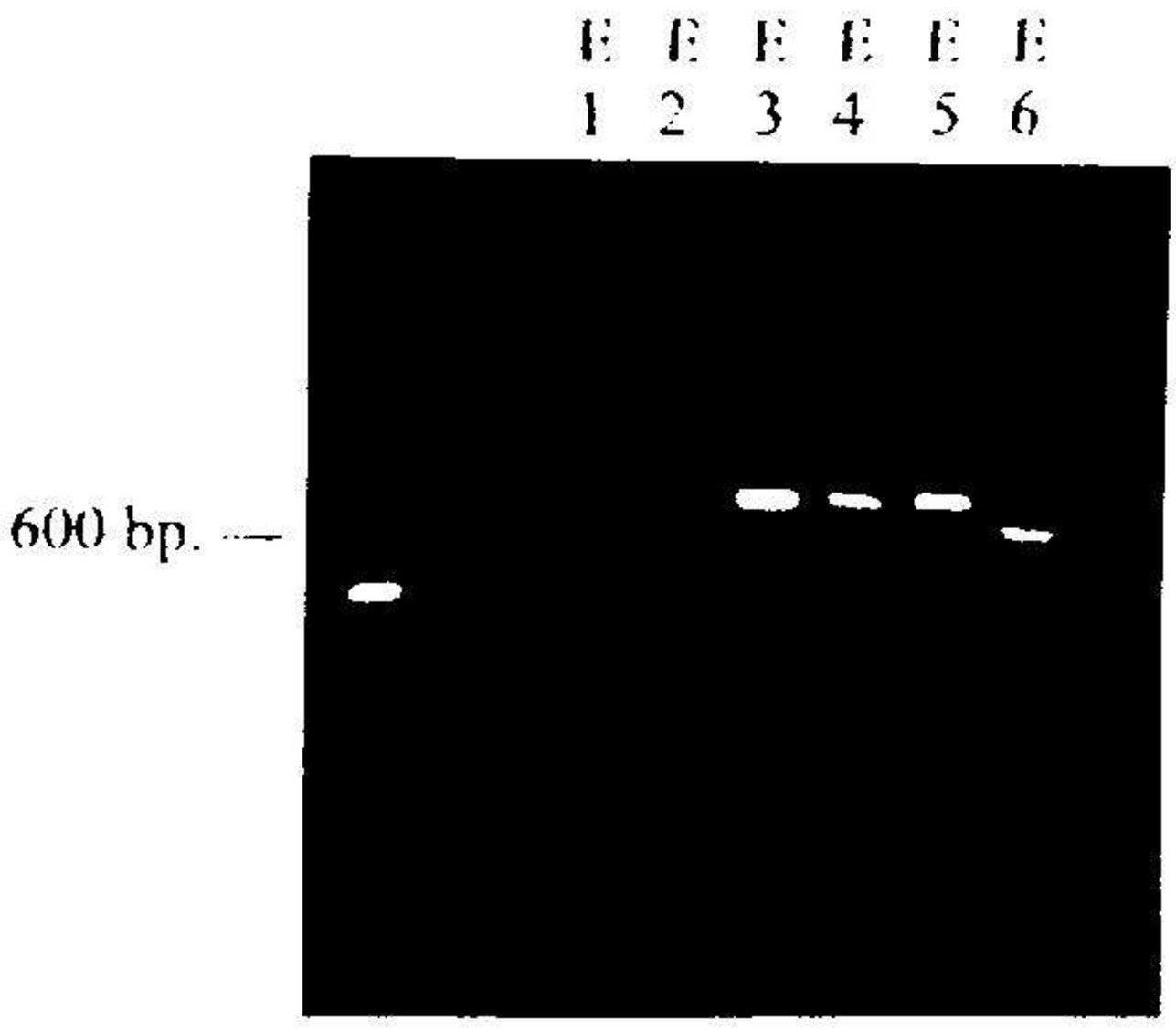
รูปที่ 19 แสดงผลการ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่ม A และ E ด้วย specific primer 06/1 แยกแถบดีเอ็นเอด้วย 5% polyacrylamide gel electrophoresis

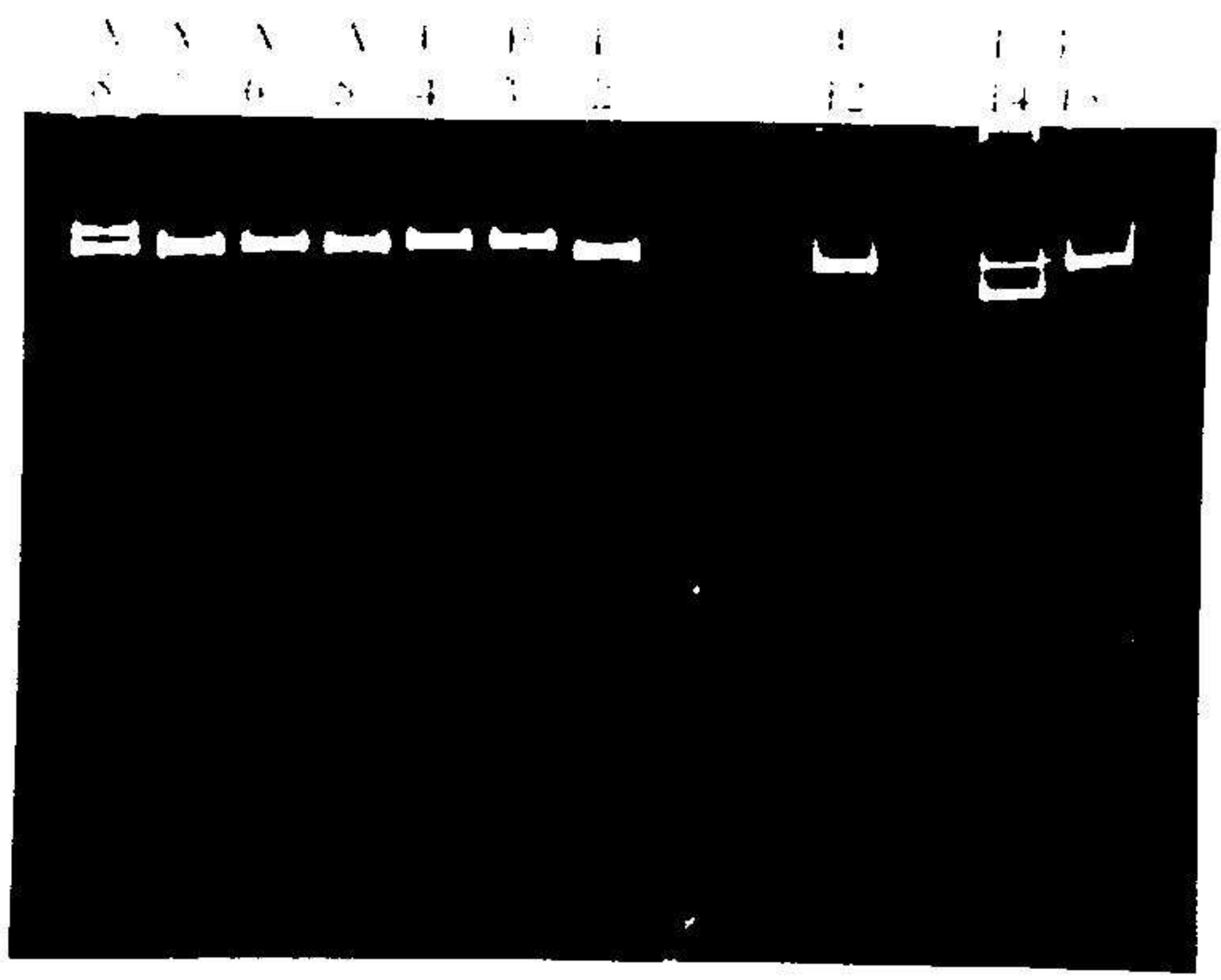


รูปที่ 20 แสดงผลการ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่ม A, Dและ E ด้วย specific primer 701 แยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

รูปที่ 21 แสดงผลการทำ PCR โดยใช้ specific primer 701 จะเห็นว่ายังคงได้แถบที่ตำแหน่ง 200 bp เช่นเดียวกับการทำ RAPD พบแถบนี้ปรากฏในบางตัวอย่างและหายไปในบางตัวอย่าง การปรากฏหรือไม่ปรากฏในตัวอย่างที่ทดสอบด้วย specific primer ก็สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ RAPD (เช่นตัวอย่าง E1, E8, E12, E15 ในรูปที่ 10 และ 20) และสังเกตว่าไม่เกิดแถบใดๆจากตัวอย่าง D1, D2 ซึ่งเป็น *P. monodon* และ A1 ซึ่งเป็น *Metapenaeus sp.*

รูปที่ 21 แสดงผลการทำ PCR ด้วย specific primer 787/1 พบว่าได้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกับการตรวจสอบด้วย RAPD ของ UBC 787 คือ ไม่เกิดการ amplify ในตัวอย่าง E1 หรือแถบที่ได้ของ E2, E3, และ E6 เหมือนกับแถบที่ปรากฏเข้มที่สุดของแบบแผน RAPD ของตัวอย่างนั้นๆ แสดงว่าแถบเข้มที่ 550 bp. ของ E2, E6 หรือ 500 bp. ของ A11 (ไม่ได้แสดงรูป) หรือ 600 bp. ของ E3 และตัวอย่างอื่น ๆ ต่างถูก amplify ได้ด้วย specific primer เดียวกัน และที่ locus นี้มีอย่างน้อย 3 alleles ความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้จะมีความสัมพันธ์กับชนิดของกุ้งหรือไม่ จะได้กล่าวต่อไป





รูปที่ 21 แสดงผลการ amplify ดีเอ็นเอตัวอย่างกลุ่ม A และ E ด้วย specific primer 787 แยกแถบดีเอ็นเอด้วย 1.8% agarose (บน) และ 5% polyacrylamide gel electrophoresis (ล่าง)

บทที่ 4
ข้อวิจารณ์

ตัวอย่างกุ้งที่นำมาทดลองครั้งนี้ได้จากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ขนาดโตเต็มที่มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่ละตัวมีความยาวประมาณ 10 ซม. แบ่งตัวอย่างออกเป็นกลุ่มตามระยะเวลาที่เก็บคือ กลุ่ม A-E แต่มีเพียง A5-A14 และ E1-E15 ที่ใช้ในทุกการทดลอง กล่าวคือเป็นชุดตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบชนิดด้วยวิธีต่าง ๆ ครบทุกวิธีคือ 1. ดูสัณฐานวิทยาโดยละเอียดตามอนุกรมวิธาน (Grey et al., 1983 และ Chaitiamvong and Supongpan, 1992) 2. ใช้แบบแผนไอโซไซม์ 3. ใช้เทคนิค RAPD 4. ใช้ specific primer เพื่อทำ PCR สาเหตุที่เลือกตัวอย่างเพียงเท่านี้สำหรับการทดลองทั้งสี่แบบเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ถูกระบุชนิดด้วยสัณฐานวิทยาได้ชัดเจนที่สุดโดย A5-A14 มีลักษณะตรงตามอนุกรมวิธานว่าเป็น *P. indicus* (ความจริงมีตัวอย่าง *P. indicus* ที่ชัดเจนอีกมากในกลุ่ม A แต่เนื่องจากเกิดเหตุขัดข้องทำให้ส่วนหัวจนถึงลำตัวปล้องที่ 2 ของตัวอย่างเหล่านั้นเสียสภาพโดยได้ตรวจสอบเพียงลักษณะของ Rostrum เท่านั้น ยังไม่ได้ตรวจสอบ Rostral crest, Adrosal carina และ Gastro-orbital จึงไม่นำตัวอย่างดังกล่าวมาใช้ ประกอบกับตัวอย่างทั้ง 10 ตัวนี้มีข้อมูลของรูปสัณฐานและข้อมูลอื่นซึ่งจะได้กล่าวต่อไประบุชัดเจนว่าเป็น *P. indicus* ส่วนตัวอย่างกลุ่ม E ซึ่งตอนแรกผู้วิจัยคาดว่าทั้ง 30 ตัวเป็น *P. merguiensis* แต่เมื่อตรวจสอบรูปสัณฐานโดยละเอียดกลับพบว่ามี *P. merguiensis* เพียง 6 ตัว (E1-E3, E5, E6, E8 และ E10) ตัวอย่างส่วนที่เหลือเป็น *P. indicus* (E4, E9) และพวกที่ระบุชนิดได้ยากเนื่องจากมีลักษณะไม่ตรงตามอนุกรมวิธานเพราะมีลักษณะของ *P. indicus* และ *P. merguiensis* ปนกัน (E7, E11, E12, E14, E15) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกิดความสับสน ในการดูลักษณะของอวัยวะเพศผู้และเพศเมีย แม้ต่อมาจะได้สำรวจเพิ่มเติมจากกลุ่มอื่นก็ไม่พบกุ้งที่มั่นใจว่าเป็น *P. merguiensis* อีก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามี *P. merguiensis* ในแหล่งธรรมชาติที่เก็บมาไม่มากหรือกลุ่มที่แยกลักษณะได้ยากความจริงก็คือ *P. merguiensis* แต่มีรูปร่างต่างไป ดังนั้นเพื่อไม่ให้เป็นการเสียเวลาจึงได้เลือก E1-E15 สำหรับทดลองต่อไป

Heales และคณะได้เคยรายงานการใช้ไอโซไซม์สำหรับแยกชนิดของกุ้ง juvenile โดยมีเอนไซม์สำคัญที่ใช้ตรวจสอบหลายชนิดคือ ADH, G-6-PDH, SCDH, 6-PDH, LDH และ GLD ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำตัวอย่าง A5-A14 และ E1-E15 มาสกัดและแยกโปรตีนด้วย polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าสามารถใช้แบบแผนที่ได้จากการย้อมสีปฏิกิริยาของเอนไซม์ (activity stain) ADH, G-6-PDH, SCDH และ 6-PDH แบ่งตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่มตามการมีและไม่มีไอโซฟอร์มขนาดใหญ่ เมื่อเทียบผลกับการแยกด้วยสัณฐานวิทยาพบว่าตัวอย่างที่ไม่มีไอโซฟอร์มขนาดใหญ่เป็น *P. indicus* และ ตัวอย่างที่มีไอโซฟอร์มขนาดใหญ่เป็น *P. merguiensis* ผลการสำรวจชนิดที่ระบุโดยแบบแผนไอโซไซม์ของกลุ่ม A สอดคล้องกับการดูรูปร่าง ในขณะที่บางตัวอย่างของกลุ่ม E มีแบบแผนไอโซไซม์ที่แปลผลขัดแย้งกับการดูรูปร่างเช่น E4

และ E9 ซึ่งหากใช้แบบแผนไอโซไซม์ในการแยกก็จะถูกจัดเป็น *P. merguiensis* แต่เนื่องจากการตรวจสอบรูปสัณฐานจากตัวอย่างที่ไม่ชัดเจนมักเกิดความผิดพลาดได้ง่าย ในที่นี้จึงจัด E4 และ E9 อยู่ในกลุ่มของ *P. merguiensis* ตามการแยกชนิดโดยไอโซไซม์ไปก่อน รวมทั้งตัวอย่างที่มีรูปร่างไม่ชัดเจนก็ถูกจัดชนิดตามไอโซไซม์ด้วยคือ E7, E11, E12, E14, E15 เป็น *P. merguiensis* อย่างไรก็ตามแม้การตรวจสอบแบบแผนของไอโซไซม์จะเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้แพร่หลายสำหรับแยกชนิดของพืชและสัตว์ แต่จากการทดลองพบว่าเป็นวิธีที่ไม่สะดวกเนื่องจากต้องใช้เนื้อเยื่อปริมาณมาก ต้องระวังเรื่องการเก็บตัวอย่างและสกัดโปรตีน กล่าวคือต้องเก็บตัวอย่างที่ยังไม่ตายหรือเพิ่งตายและแช่เย็นทันที การสกัดโปรตีนแต่ละครั้งอาจให้ผลของการย้อมสีปฏิกิริยาเอนไซม์ไม่แน่นอนเพราะเอนไซม์หลายชนิดหรือบางไอโซฟอร์มไม่เสถียร ทำให้ได้ผลการทดลองแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน การแปลผลจึงพลอยคลาดเคลื่อนไปด้วย

เมื่อได้ตัวอย่างของกุ้งสองชนิดข้างต้นแล้ว (เป็น *P. indicus* 10 ตัว และ *P. merguiensis* 6-15 ตัว) ขั้นตอนต่อไปคือการสกัดดีเอ็นเอสำหรับทำ PCR โดยได้ทดลองลองใช้บัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ในที่สุดพบว่าบัฟเฟอร์ที่มีเกลือ NaCl 0.7M ใช้เตรียมดีเอ็นเอได้ดี สารละลาย CTAB ซึ่งนิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชไม่มีความจำเป็นในที่นี้ นอกจากนั้นการใช้ Chelex^{R} 100 ร่วมด้วยจะช่วยให้ไม่ต้องผ่านขั้นตอนทำดีเอ็นเอให้สะอาดด้วย phenol:chloroform จึงสะดวกในการทดลองกับตัวอย่างครั้งละมาก ๆ

จากการสำรวจ primer ทั้งสิ้น 223 ชุด เพื่อทำ RAPD ได้เลือก primer ที่เหมาะสมไว้ห้าชุดคือ OPC 06 (GAACGGACTA), UBC 114 (TGACCGAGAC), UBC 150 (GAAGGCTCTG), UBC 701 (CCCACAACCC) และ UBC 787 (CCCTTCTTCC) เมื่อตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละ primer ในการทำ PCR พบว่าสามารถใช้สภาวะที่ ใกล้เคียงกันคือ 94°C 5 วินาที 42°C-44°C 20 วินาที และ 72°C 20 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ นำแบบแผนของ ตัวอย่างทั้งสองกลุ่มคือ A5-A14 และ E1-E15 ที่ได้จากการทำ RAPD ด้วย primer ห้าชนิดซึ่งรวมกันแล้วจะได้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 75 แถบมาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Molecular Analyst ของ BIO-RAD วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวอย่างโดยใช้ *Jaccard*'s coefficient ในการคำนวณค่า similarity นำค่าที่ได้ไปทำ cluster analysis ด้วยวิธี unweighted pair group average (UPGMA) และแสดงผลเป็น dendrograms จาก dendrograms จะเห็นว่าสามารถแยกกุ้งกลุ่ม A และ E ซึ่งเป็นคนละชนิดออกจากกัน และมีข้อสังเกตคือ E3 และ E4 ซึ่งถูกระบุด้วยรูปสัณฐานว่าเป็นกุ้งต่างชนิด (E3 เป็น *P. merguiensis* และ E4 เป็น *P. indicus*) แต่กลับมีค่า similarity ใกล้เคียงกัน (ค่า similarity ที่ได้จากแบบแผนทั้งห้า primer หรือ จากแต่ละ primer ก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือ E3 และ E4 คล้ายกัน) สอดคล้องกับการระบุชนิดด้วยไอโซไซม์คือทั้งสองตัวอย่างเป็น *P. merguiensis* ในที่นี้เชื่อว่าข้อมูลระดับ โปรตีนและดีเอ็นเอละเอียดและถูกต้องมากกว่าการใช้รูปร่าง ข้อสังเกตนี้แสดงให้เห็นถึงความคลาดเคลื่อนของการระบุชนิดโดยสัณฐานวิทยา ด้วยเหตุผลเดียวกันนี้ตัวอย่าง E9 และตัวอย่างที่มีรูปร่างไม่แน่นอนจึง

ควรเป็น *P. merguiensis* ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการใช้แบบแผน RAPD เพื่อจำแนกชนิด ทำให้มีความเชื่อมั่นว่าตัวอย่างกลุ่ม A คือ *P. indicus* และยืนยันว่ากลุ่ม E มีทั้งตัวอย่างที่เป็น *P. merguiensis* ที่มีรูปร่างตามอนุกรมวิธานและ *P. merguiensis* ที่มีรูปร่างไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจะยิ่งดีและน่าเชื่อถือมากขึ้นหากมีการใช้จำนวนชุดของ primer มากกว่านี้ (Pierre และ คณะ) แต่ก็ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากค่าใช้จ่ายของการทำ PCR แต่ละครั้งค่อนข้างสูง ประกอบกับแบบแผนเท่าที่มีอยู่ก็แสดงให้เห็นถึงโอกาสที่จะคัดเลือกแถบดีเอ็นเอบางแถบไปศึกษาและเตรียมเป็น specific primer โดย specific primer ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาพันธุกรรมของกุ้งมากกว่า จึงได้จำกัดการศึกษาในที่นี้อยู่เพียงแค่ห้า primer ก่อน และคาดว่าอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมในโอกาสต่อไป

การออกแบบ specific primer เริ่มต้นโดยสำรวจแบบแผน RAPD ของห้า primer จากตัวอย่างสองกลุ่ม พบว่าแถบดีเอ็นเอบริเวณ 500-600 bp. ที่ได้จากการทำ RAPD ด้วย OPC-06 มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างคือบางตัวอย่างมีเพียงหนึ่งแถบ บางตัวอย่างมีมากกว่าหนึ่งแถบจนถึงสี่แถบ แถบที่อยู่ตรงกันของแต่ละตัวอย่างมิได้หมายความว่าดีเอ็นเอนั้นจะต้องมีลำดับเบสเหมือนกัน (มี homology) หรือ amplify จาก locus เดียวกันและในทางตรงกันข้ามก็อาจเป็นไปได้ว่าแถบที่ไม่ได้อยู่ณ.ตำแหน่งเดียวกันอาจมีลำดับเบสบางส่วนที่ homology กันได้ นอกจากนั้นแถบเดียวหนาทึบที่เห็นบน agarose gel electrophoresis อาจมิได้เป็นแถบเดียวแต่ประกอบด้วยดีเอ็นเอหลายขนาดที่ใกล้เคียงกัน ต้องแยกด้วย polyacrylamide gel จึงจะเห็นความแตกต่าง ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ของแต่ละตัวอย่าง จึงโคลนดีเอ็นเอสองขนาดที่ 521 bp. (06/1) และ 493 bp. (06/2) เพื่อนำข้อมูลมาใช้ออกแบบ specific primer ต่อไปดังแสดงในตารางที่ 5 และได้ทำการทดลองทำนองเดียวกันนี้กับดีเอ็นเอขนาด 212 bp ของ UBC 701 และ 602 bp.(787/1) ของ UBC 787 นอกเหนือไปจากการออกแบบ specific primer แล้ว ยังได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสของแต่ละโคลนด้วยโปรแกรม DNASIS ว่ามี open reading frame หรือไม่ พบว่ามีเพียงโคลนของ 06/2 ที่แสดง putative coding frame ซึ่งเมื่อนำไปเทียบกับข้อมูลจาก Gene Bank แล้วพบว่าบางส่วนของกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับ Bkm-like protein ของ *Drosophila melanogaster* แต่มี % homology ไม่สูงนัก (53%) อย่างไรก็ตามเนื่องจากโคลนที่ได้นี้เป็นการทำ PCR จาก genomic DNA ทำให้อาจมีส่วนของ intron อยู่ด้วยทำให้การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนมีความหมายไม่มากนัก จึงควรที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปจาก cDNA แทน

ผลการนำ specific primer ไปใช้ทำ PCR กับตัวอย่างทั้งกลุ่ม A และ E และตัวอย่างในกลุ่มอื่นพบว่า specific primer 06/1 ให้แบบแผนที่แตกต่างกันระหว่าง *P. indicus* และ *P. merguiensis* โดย *P. indicus* มีดีเอ็นเอเกิดขึ้นเพียงแถบเดียว แต่แถบที่ได้ของแต่ละตัวอย่างมีขนาดไม่เท่ากันเช่น แถบเดี่ยวของ A12 มีขนาดเล็กกว่าของ A13 เป็นต้น ส่วน *P. merguiensis* ที่มีรูปสัณฐานชัดเจนจะมีสองแถบขึ้นไป โดยแถบคู่นี้อาจอยู่ชิดกันมากเช่น E5, E10 หรือ อยู่ห่างกันเช่น E2 ส่วนตัวอย่างที่

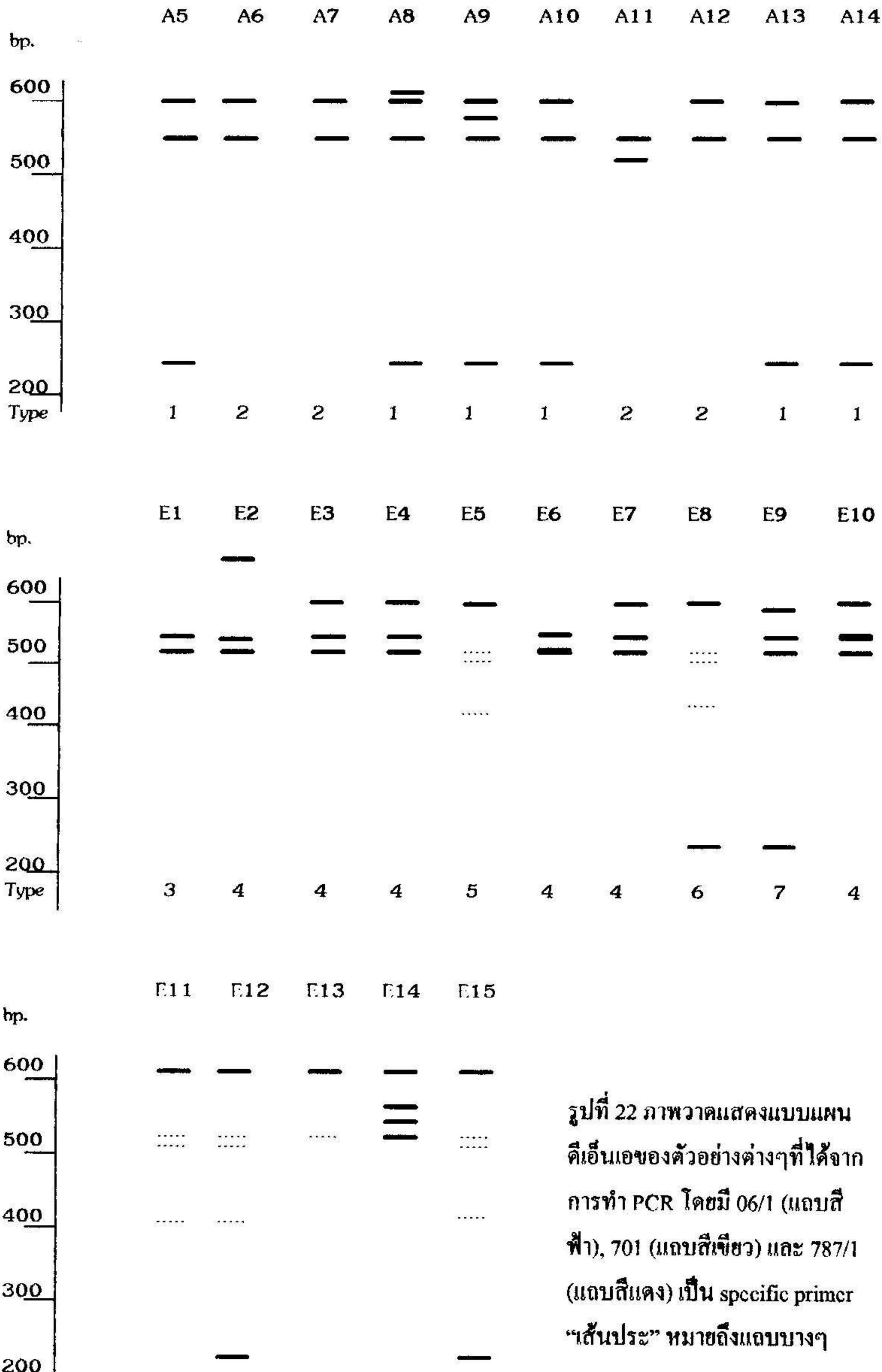
มีรูปสัณฐานไม่ชัดเจน เราจะพบว่ามีการ amplify ของดีเอ็นเอแตกต่างไปเช่น E11, E12, E14, E15 เห็นเป็น แถบบางๆ 3 แถบ การทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าสามารถใช้ specific primer 06/1 ในการระบุชนิดของกุ้งแชบ๊วยโดยผลการทดสอบสอดคล้องกับการสำรวจด้วยวิธีอื่นๆ และยังให้รายละเอียดทางพันธุกรรมของกุ้งในสองกลุ่มนี้ด้วย

เมื่อทำ PCR กับตัวอย่างดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยโดยใช้ specific primer 701 จะได้แถบดีเอ็นเอที่ 212 bp. ในบางตัวอย่างและไม่ปรากฏแถบในบางตัวอย่างโดย 7 ตัวอย่างของ A5-14 มีแถบที่ 212 bp และอีก 3 ตัวอย่างคือ A7, A11 และ A12 ไม่มีแถบ 212 bp. ในขณะที่ 4 ตัวอย่างของกลุ่ม E มีแถบ 212 bp. ส่วนที่เหลืออีก 11 ตัวอย่างไม่มีแถบดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างอื่นเพิ่มเติมก็พบว่าตัวอย่างที่คาดว่าเป็น *P. indicus* 33 ตัว พบที่มีแถบ 212 bp. 28 ตัวอย่างและไม่มีแถบ 5 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากการมีและไม่มีแถบที่ 212 bp. ไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นมากเท่าการใช้ primer 06/1 จึงทำให้ไม่อาจสรุปได้ในที่นี้ว่าจะใช้การมีแถบที่ 212 bp. เป็น molecular marker สำหรับระบุชนิดของ *P. indicus* ด้วยได้หรือไม่ เพียงแต่ตั้งข้อสังเกตว่าตัวอย่างที่มีรูปร่างชัดเจนว่าเป็น *P. indicus* มักมีแถบที่ 212 bp.

ในการ amplify ด้วย specific primer 787/1 ก็ให้ผลการทดลองคล้ายคลึงกับ specific primer 701 คือเมื่อใช้ในการทำ PCR กับดีเอ็นเอของกลุ่ม A เกือบทุกตัวอย่างจะได้แถบตรงกันที่ 600 bp. ยกเว้น A11 ที่ได้แถบขนาดเล็กลงเหลือ 500 bp. ในขณะที่พบความหลากหลายในกลุ่ม E คือ ไม่ปรากฏแถบใดๆเลย (E1, E12) หรือปรากฏแถบ 600 bp.(E3, E4, E5) หรือได้แถบขนาด <600 bp. (E2, E6) หรือได้แถบคู่ (E14)

เมื่อนำแบบแผนที่เกิดจาก specific primer ทั้งสามชนิดของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกันก็พบว่าสามารถแยกออกได้เป็น 7 แบบแผนดังรูปที่ 22 โดยกลุ่ม A มีแบบแผนดีเอ็นเอเป็น แบบ 1 และ 2 เท่านั้น ส่วนกลุ่ม E มีแบบแผนแบบ 3-7 แสดงว่าแบบแผน 1 และ 2 เป็นแบบแผนของ *P. indicus* และ แบบแผน 3-7 คือแบบแผนของ *P. merguiensis* กุ้งสองกลุ่มนี้ได้มาจากคนละแหล่งคือ กลุ่ม A มาจากทะเลอันดามันและกลุ่ม E มาจากอ่าวไทย จึงอาจเป็นไปได้ว่ามี *P. merguiensis* มากในอ่าวไทย และ *P. indicus* มากในทะเลอันดามัน ข้อสังเกตนี้สอดคล้องกับรายงานของ Chaitiamvong (1992) ที่สำรวจชนิดของกุ้งในอ่าวไทยและพบว่าเป็น *P. merguiensis* เมื่อสำรวจตัวอย่างกุ้งเพิ่มเติมในกลุ่มอื่นคือ กลุ่ม B ซึ่งมาจากเกาะยอ จ. สงขลา ก็พบว่าได้แบบแผนเป็นแบบ 3-7 อย่างไรก็ตามคงต้องมีการสำรวจตัวอย่างจำนวนมากกว่านี้จากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มเติมก่อนที่จะสรุปการกระจายตัวของกุ้งทั้งสองชนิดนี้ในทะเลโดยรอบประเทศไทยได้ นอกจากนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแบบแผนที่ 1 และ 3 เป็นแบบแผนของ *P. indicus* และ *P. merguiensis* พันธุ์แท้ตามลำดับ และกุ้งที่มีแบบแผนแบบที่ 2, 4-7 อาจเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง *P. indicus* และ *P. merguiensis* เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอร่วมกันหลายแถบ ซึ่งการผสมข้ามพันธุ์นี้เป็นที่สังเกตของนักอนุกรมวิธานมาช้านานแต่ยังไม่มีผลการทดลองใดยืนยันและยังอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด

ความสับสนเมื่อแยกทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้นอกจากการแยกชนิดแล้วยังมีประโยชน์เพื่อเป็นแนวสำหรับหา DNA marker เพิ่มเติม หรือนำ DNA marker ที่มีอยู่แล้วไปใช้สำรวจประชากรกุ้งเพื่อตรวจสอบชนิดในแหล่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติ ตลอดจนการตรวจสอบโดยใช้จำนวน marker และจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ให้ได้ข้อมูลว่ากุ้งสองชนิดมีผสมข้ามพันธุ์กันหรือไม่อย่างไรต่อไป



รูปที่ 22 ภาพวาดแสดงแบบแผนดีเอ็นเอของตัวอย่างต่างๆที่ได้จากการทำ PCR โดยมี 06/1 (แถบสีฟ้า), 701 (แถบสีเขียว) และ 787/1 (แถบสีแดง) เป็น specific primer "เส้นประ" หมายถึงแถบบางๆ

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ในการสำรวจ RAPD primer ที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน 223 ชุดได้ primer 5 ชุดที่ใช้ในการทำ RAPD กับตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยแล้วได้แบบแผนที่ชัดเจน โดยมีสภาวะการทำ PCR คือ 94°C 4 นาที 1 รอบ และ 94°C 20 วินาที 42°C- 44°C 20 วินาที 72 °C 20 วินาที 35 รอบ เมื่อนำการมีหรือไม่มีของแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 75 แถบมาใช้ในการแสดงความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างพบว่าสามารถระบุแถบที่น่าสนใจอย่างน้อย 5 แถบที่มีความเกี่ยวพันกับการแยกชนิดของ *P. indicus* และ *P. merguiensis*
2. ได้โคลนแถบดีเอ็นเอที่น่าสนใจที่เกิดจากการทำ RAPD ในข้อ 1 ทราบลำดับเบสของโคลน 06/1 (510 bp.), 06/2 (493 bp.), 701 (212 bp.) และ 787/1 (602 bp.) ข้อมูลลำดับเบสเหล่านี้ถูกนำไปใช้ออกแบบ specific primer 3 ชุด นอกจากนั้นยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่เกิดจากการแปลรหัสของ 06/2 คล้ายคลึงกับ Bkm-like protein ของ *Drosophila melanogaster*
3. แบ่งแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ specific primer ที่ออกแบบจากโคลน 06/1, 701 และ 787/1 ออกเป็น 7 แบบแผน แบบแผนดังกล่าวสามารถใช้ในการแยกชนิดของกุ้งโดย *P. indicus* มีแบบแผนเป็นแบบที่ 1-2 ส่วน *P. merguiensis* มีแบบแผนแบบ 3-7
4. ในการวิจัยขั้นต่อไป เมื่อเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากแหล่งต่างๆ โดยแบ่งตำแหน่งที่เก็บให้ชัดเจน เราสามารถนำแบบแผนดีเอ็นเอทั้ง 7 แบบไปใช้ศึกษาการกระจายอยู่ของกุ้งแชบ๊วยตามแหล่งต่างๆของประเทศไทย ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งสองชนิด และอาจใช้ในการระบุว่าเกิดการผสมข้ามพันธุ์ของกุ้งทั้งสองหรือไม่
5. ยังมีโคลนที่หาลำดับเบสได้ไม่สมบูรณ์ในครั้งนี้ (ได้แก่ 114) และแบบแผนที่ได้จากการทำ RAPD ด้วย primer อื่นที่สำรวจไปแล้ว ซึ่งน่าจะต้องทำการศึกษาต่ อไปทั้งนี้เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) มากขึ้น และใช้ตัวบ่งชี้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งสองชนิดนี้ ตลอดจนพิสูจน์ว่ามีการผสมข้ามพันธุ์ของกุ้งทั้งสองหรือไม่ต่อไป
6. อาจใช้ specific primer ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้หรือครั้งต่อไปในการศึกษาพันธุกรรมของกุ้งอื่น
7. เนื่องจากโคลน 06/2 มีแนวโน้มว่าอาจเป็น coding region ของโปรตีนชนิดหนึ่ง จึงอาจทำการทดลองเพื่อดูว่ามีการสังเคราะห์ mRNA จาก coding region ดังกล่าวหรือไม่และเนื่องจาก specific primer ที่ออกแบบจากโคลน 06/2 มีความซ้ำซ้อนกับ specific primer 06/1 และใช้ในการ amplify ได้ไม่ดีเท่า 06/1 จึงควรต้องมีการออกแบบใหม่ และศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. 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.
2. Bassam,B.J., Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P.M. (1992) DNA amplification fingerprinting of bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:70-76
3. Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., and Gresshoff, P.M. (1992) Primer-template interaction during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. Mol. Gen. Genet. 235:157-165
4. 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.
5. Coles, R.G., Lee Long, W.J., Squire, B.A., Squire, L.C. and Bibby, J.M.. (1987) Distribution of seagrasses and associated juvinile commercial penaeid prawns in north-eastern Queensland water. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 38: 103-119
6. Culpepper, J.H., Sayavedra-Soto, L.A., Bassam, B.J., and Gresshoff, P.M. (1991) Characterization of *Cornus* (Dogwood) genotypes using DNA fingerprinting. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(6):1103-1107
7. Garcia, D.K., Maura A. F., Laurel R. and Alcivar-Warren, A.A. (1994) Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic technoques. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 3(5), 270-280
8. Garcia, D.K., Arun, K.D. and Alcivar-Warren, A.A. (1996) Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*
9. Garcia D.K. and Benzie, J.A.H. (1995) RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. Aquaculture 130, 137-144
10. Grey, D.L. and Dall, W. (1983) A Guide to the Australian Penaeid Prawns Northern Territory Government.
11. Heales, D.S., Polzin, H.G. and Staples, D.J. (1985). Identification of the postlarvae of the commercially important *Penaeus* species in Australia. Pp. 41-46 In P.C. Rothlisberg, B.J.

Hill and D.J. Staples (Ed.) Second Australian National Prawn Seminar, NPS2, Cleveland, Australia, 368 p.

12. Lehmann, P.F., Lin, D., and Lasker, B.A. (1992) Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. J. Cli. Microbiol. 30:3249-3254
13. Riley, D.E., Samadpour, M., and Krieger, J.N. (1991) Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by single repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers. J. Cli. Microbiol. 29:2746-2751
14. Saiprasit, B. and Nakaluk, J. (1989) A situation of aquaculture of *Penaeus monodon* in Thailand, Shrimp farmer workshop paper, Department of Fisheries and American Soy Bean Association, Songkla, Thailand, p.1-10.
15. Somers, I.F. (1987) Sediment type as a factor inthe distribution of commercial prawn species in the Western Gulf of Carpenteria, Australia. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 38:133-149
16. Somers, I.F., Pioner, I.R., and Harris, A.N. (1987) A study of the species composition and distribution of commercial penaeid prawns of Torres Strait. Aust. J. Mar. Freshw.Res. 38:47-61
17. Staples, D.J. and Vance, D.J. (1987) Comparative recruitment of the banana prawn, *Penaeus merguiensis* in five estuaries of the south-eastern Gulf of Carpenteria, Australia. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 38:29-45
18. Walsh, P.S., Metzger, D.A. and Higuchi, R. (1991) DNA extraction for PCR. Biotechniques 10, 506
19. Wassenberg, T.J., and Hill, B.J. (1987) Natural diet of the tiger prawns *Penaeus esculentus* and *penaeus seminsultus*. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 38: 169-182
20. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic. Acids. Res. 18:6531-6535