บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดลำดับอนุกรมวิธาน

ม้าน้ำ (seahorse) จัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Grzimek, 1973)

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Osteichthyes

Order: Gasterosterfomes

Family: Syngnathidae

Genus: *Hippocampus*

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของม้าน้ำ

ม้าน้ำจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลา มีรูปร่างลักษณะเด่นคือ ส่วนหัวคล้ายกับม้า มีถุงหน้าท้องเหมือนจิงโจ้ เกล็ดหุ้มลำตัวของม้าน้ำได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเปลือกแข็งคล้ายเกราะหุ้มที่มีผิวขรุขระมีตากลิ่งกลอกซ้ำเลืองได้รอบด้าน แต่ละข้างยังทำยังทำงานได้อิสระ ขณะว่ายน้ำจะใช้ครีบหลังที่เป็นแผ่นบางใสโบกพริ้วตลอดเวลา ขณะเดียวกันครีบหาง 1 คู่ จะช่วยพยุงตัวให้ตรง และมีหางเรียวสำหรับยึดเกาะอยู่กับที่ในขณะที่คลื่นทะเลซัดอยู่ตลอดเวลา ม้าน้ำสามารถเปลี่ยนสีได้โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆเช่นสภาพแวดล้อม ความเค็ม อุณหภูมิ และสภาพธรรมชาติเพื่อเป็นการพรางศัตรูที่จะเข้ามาทำอันตราย เช่นปลาต่างๆ ที่มีขนาดใหญ่กว่า โดยจะเกาะนิ่งอยู่กับที่และมีการเคลื่อนไหวเป็นบางครั้งเท่านั้น (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2540) ม้าน้ำชอบอาศัยอยู่ตามเสาโป๊ะ โพงพาง หรือหลบซ่อนอยู่ตามใต้น้ำ ระดับน้ำไม่ลึกมากนัก อาหารของม้าน้ำได้แก่ ไรน้ำ กุ้ง เคย เป็นต้น ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียคือ ม้าน้ำเพศผู้จะมีถุงหน้าท้องที่มีลักษณะพองออกมีไว้สำหรับบรรจุไข่ของเพศเมีย หลังจากการผสมพันธุ์ ส่วนเพศเมียไม่มีถุงหน้าท้องและเว้าเข้าซึ่งความแตกต่างนี้สามารถเห็นได้ชัดเมื่อม้าน้ำมีอายุ 5-6 เดือนขึ้นไป ช่วงฤดูผสมพันธุ์ของม้าน้ำคือช่วงเดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์ ซึ่งช่วงนี้อุณหภูมิในน้ำทะเลจะต่ำลงอยู่ระหว่าง 20-28 องศาเซลเซียส

ม้าน้ำมีถิ่นแพร่กระจายอยู่ในน่านน้ำทั่วโลกใน 6 ทวีปด้วยกัน ทั้งทวีปอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป แอฟริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย จากการสำรวจม้าน้ำในปัจจุบันมีรายงานว่าพบอยู่ประมาณ 32 ชนิด (Lourie *et.al.*, 1999) มีขนาดแตกต่างกันเช่น *H. ingens* ที่พบในมหาสมุทรแปรซิฟิกฝั่งตะวันออก มีลำตัวยาว 40 เซนติเมตร ส่วน *H. bargibanti* พบที่ New Caledonian มีลำตัวยาว 1.5 เซนติเมตร หรือ *H. hudsonius* ซึ่งเป็นม้าน้ำที่นิยมเลี้ยงกัน ในสหรัฐอเมริกาและยุโรป มีลำตัวยาว 20 เซนติเมตร และม้าน้ำแคระ *H. zosterae* มีความยาวเพียง 2.5-5 เซนติเมตร เท่านั้น ส่วนในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนพบม้าน้ำ

หลายชนิดเช่นกันคือ *H. kuda*, *H. japonicus*, *H. trimaculatus* และ *H. histrix* เป็นต้น (ทวี หอมชง และคณะ, 2529).

สำหรับประเทศไทยและน่านน้ำใกล้เคียงมีรายงานอ้างถึงว่ามีอยู่ประมาณ 5 ชนิด คือ *H. abdominalis*, *H. trimaculatus*, *H. histrix*, *H. spinosissimus* และ *H. kuda* (คณะประมง, 2523) แต่ส่วนใหญ่พบอยู่ 3 ชนิด (ขนิษฐา เจริญวิจิตรศิลป์, 2536) คือ

H. kuda มีหัวขนาดใหญ่ จมูกหนาและยาว ลำตัวมีโครงร่างหนา และใหญ่ ครีบหูบางใสอยู่ทางด้านหลังของแก้ม และครีบหลังจำนวน 1 อัน ใช้โบกพัดในการเคลื่อนที่ ขนาดความยาวประมาณ 20-25 เซนติเมตร พื้นผิวลำตัวมีสีเหลือง สีดำ หรือสีม่วง และสามารถเปลี่ยนสีลำตัวได้ พบอยู่ในน้ำลึกระดับกลางและบริเวณน้ำลึกที่สุดอยู่ลึกกว่า

H. trimaculatus มีจุดสีดำ 3 จุดอยู่บนส่วนหลังของกระดูกวงแหวนบนลำตัวที่ 1, 4 และ 7 ตามลำดับ หัวมีขนาดเล็ก จมูกเล็กและหงายขึ้น ลำตัวบางและกว้าง หางม้วนงอได้ อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำหรือความลึกระดับกลาง ลูกม้าน้ำจะพบอยู่บริเวณผิวเป็นส่วนใหญ่ ลำตัวมีสีเหลืองซีด อาศัยอยู่ตามเสาโป๊ะหลักหอยแมลงภู่หรือตามดงสาหร่าย บริเวณชายฝั่ง พบบริเวณชายฝั่งทะเลในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น ปากีสถาน ออสเตรเลีย และมหาสมุทรแปรซิฟิก

H. histrix เป็นม้าน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณน้ำใสสะอาดห่างจากฝั่ง เช่น บริเวณเกาะที่มีแนวปะการังกัลปังหา เป็นม้าน้ำที่มีสีสันสวยงาม มักมีสีแดงออกน้ำตาลแดง มีหนามรอบหัว และข้อต่อของกระดูกวงแหวนทั้งหมด จะไม่พบหนามบริเวณท้องและใกล้ๆหาง มงกุฎไม่สูง จมูกบาง และหนามส่วนบนมีสีน้ำตาลดำ พบในบริเวณชายฝั่งอินโดแปรซิฟิก

สำหรับการแพร่กระจายของม้าน้ำในภาคตะวันออกของไทยนั้น มีรายงานจากศรัณย์ ขยันการนาวี (2540) ทำการสำรวจม้าน้ำที่ท่าเทียบเรือตำบลบางเสร่ อ.สัตหีบ จังหวัดชลบุรี พบม้าน้ำ 2 ชนิดคือ *H. histrix* และ *H. trimaculatus* โดยเป็นม้าน้ำที่จับได้จากเรือประมงอวนลากกุ้งบริเวณเกาะริ้น เกาะมารวิชัย และเกาะไผ่มี 2 ชนิดซึ่งจะจับได้พร้อมกัน แต่ม้าน้ำที่จับได้ส่วนใหญ่เป็น *H. histrix* เนื่องจากพบในบริเวณเขตน้ำลึก ส่วน *H. trimaculatus* จะพบในบริเวณเขตน้ำตื้นและใกล้ชายฝั่ง ซึ่งเป็นเขตห้ามทำการประมงอวนลาก

สำหรับม้าน้ำ *H. spinosissimus* นั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทย แต่ปรากฏชื่ออยู่ในคู่มือวิเคราะห์พรรณปลาของคณะประมง (2523) เท่านั้น มีเพียงรายงานการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของ Lourie *et.al.*(1999) ที่ได้รายงานถึงการแพร่กระจายของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ว่ามีการแพร่กระจายอยู่ในน่านน้ำบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตามแนวชายฝั่งประเทศศรีลังกา มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และออสเตรเลีย ลักษณะของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ที่ Lourie *et.al* (1999) รายงานไว้คือมีจำนวนวงแหวนบนลำตัวเท่ากับ 11 วง และมีความยาวของจะงอยปากน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวของหัว นอกจากนี้ยังมีชนิดที่คล้ายกันกับม้าน้ำชนิดนี้คือ *H. barbouri* และ *H. histrix* โดยพบว่ามักมีการเรียกชื่อวิทยาศาสตร์สับสนในระดับชนิดระหว่างม้าน้ำชนิด *H. spinosissimus* และ *H. histrix*

ดีเอ็นเอ

เซลล์ คือ หน่วยย่อยของสิ่งมีชีวิตที่สามารถแสดงพฤติกรรมทางชีวเคมี ประกอบด้วยสองส่วนหลักคือ ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโครโมโซมซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ และโปรตีนบางชนิดนอกจากนี้ภายในนิวเคลียสยังมีส่วนที่เรียกว่านิวคลีโอลัส ซึ่งประกอบด้วยอาเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ โดยที่นิวเคลียสเป็นศูนย์ควบคุมกิจกรรมต่างๆของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และเป็นแหล่งสะสมพันธุกรรมคือดีเอ็นเอ (วิโรจน์ โชติพิพัฒน์วรกุล, 2540)

โครงสร้างของดีเอ็นเอเกิดจากดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ได้แก่ dATP, dGTP, dTTP และ dCTP มาเชื่อมต่อกันเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สายยาว ความแตกต่างของดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวของเบสบนสายดีเอ็นเอนั้นๆ มีความแตกต่างกัน เบสที่พบทั่วไปในดีเอ็นเอมี 4 ชนิดได้แก่ ไซโทซีน (C) ไธมีน (T) อะดีนีน (A) และ กัวนีน (G) ดีเอ็นเอของยูคาริโอตจะมีลักษณะเป็นเส้นคู่บิดเป็นเกลียว นอกจากดีเอ็นเอที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ยูคาริโอตแล้ว ยังพบดีเอ็นเอปริมาณเล็กน้อยมากในส่วนของไซโตพลาสซึม ซึ่งมีองค์ประกอบแตกต่างจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ดีเอ็นเอในไซโตพลาซึมจะอยู่ในส่วนของไมโตคอนเดรีย ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีโมเลกุลที่เล็กมากเมื่อเทียบกับโครโมโซมของนิวเคลียส และปรากฏในลักษณะของวงแหวนเกลียวคู่ (circular double-stranded) ประกอบด้วยดีเอ็นเอขนาด 14,000-26,000 คู่เบส ในสัตว์ทั่วไป ส่วนในปลามีขนาดประมาณ 15,200-19,800 คู่เบส (Billinhyon and Hebert, 1991) มียีนที่เป็นรหัสสังเคราะห์โปรตีน 13 ชนิด, tRNA 22 ชนิด, rRNA 2 ชนิด, และไม่ทราบรหัสประมาณ 1,000 คู่เบส เรียกว่า control region หรือ A-T rich region ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง หรือเรียกว่า D-loop region ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุกรรมมาใช้เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างชนิดและระหว่างประชากรภายในชนิดเดียวกัน ซึ่งส่วนใหญ่จะวิเคราะห์จากความหลากหลายของรูปแบบเฉพาะตัวของไมโตคอนเดรียเนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นตัวแทนของดีเอ็นเอส่วนหนึ่งในจีโนม ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอประมาณ 5-10 เท่า (Thomas and Wayng, 1996)

การเตรียมดีเอ็นเอ

เซลล์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ เช่น เส้นผม ตัวอสุจิ เลือด และน้ำลาย เป็นต้น การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เหล่านี้ต้องคำนึงถึงชนิดและส่วนประกอบของเซลล์นั้นๆ เพื่อที่จะสามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งต้องคำนึงถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ให้มีสภาพดีเอ็นเอสายยาวมากที่สุด การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด นับว่าทำได้ง่ายและสะดวกที่สุด ส่วนของเลือดที่นำมาสกัดดีเอ็นเอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส สำหรับเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ เช่น ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื่อยคลาน และนกเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีนิวเคลียส ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอเริ่มจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟท (sodium dodecyl sulfate, SDS) แล้วทำการย่อยโปรตีนต่างๆด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชื่อ proteinase K จากนั้นทำการตก

ตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายฟีนอลและ คลอโรฟอร์ม โดยที่ดีเอ็นเอจะอยู่ในชั้นน้ำซึ่งสามารถตกตะกอนโดยใช้เอทธานอล (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541)

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้การตรวจหาตำแหน่งของดีเอ็นเอหลังอิเล็กโตรโฟริซีสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอทธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการแวาวแสง (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531) อิเล็กโตรโฟริซีสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของ ประจุ ขนาด และรูปร่าง ของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้นการแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531) โดยผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) ที่ใช้กันทั่วไปคือ อะกาโรสเจล (agarose gel) และโพลีเอคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) หรือส่วนผสมระหว่างอะกาโรสเจลและโพลีเอคริลาไมด์เจล โดยที่อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่ำจะสามารถแยกดีเอ็นเอ ที่มีขนาดใหญ่กว่า 500-1,000 คู่เบสได้ ในขณะที่อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นสูงและโพลีเอคริลาไมด์เจลส่วนใหญ่จะใช้ศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539)

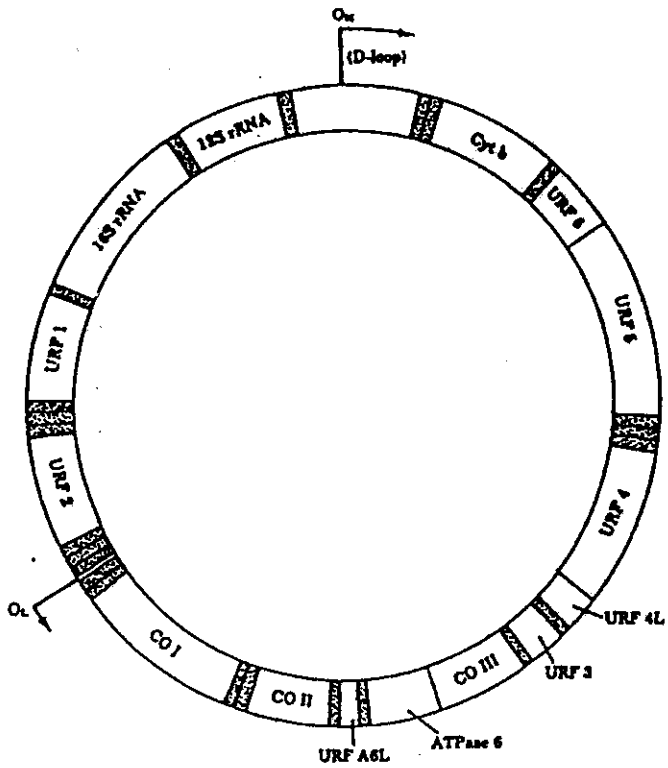
ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

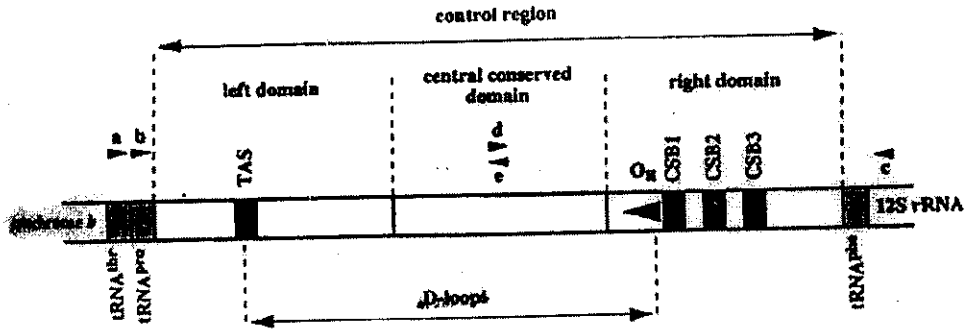
1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ

อัตราส่วนของประจุลบต่อมวลของดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอมีโครงรูปต่างๆกัน 3 แบบคือ ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (supertherlical circular) ดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (liner DNA) และปลายเปิด (linear) หรือดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular) ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (supertherlical circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (liner DNA) และดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular)





ภาพที่ 2.1 แผนภาพไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของหนู

CO I, CO II และ CO III : cytochrome oxidase subunits

Cyt b : cytochrome b

URFs : unidentified reading frames

O_H และ O_L : Origins of heavy and light strand DNA replication

3. ความเข้มข้นของเจล

เจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดั้งนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่เจลที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ความเข้มข้นของอะกาโรสที่เหมาะสมสำหรับแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆกัน

ความเข้มข้นของอะกาโรส (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของดีเอ็นเอ (คู่เบส)
0.5	1-30
0.7	0.8-12
1	0.5-10
1.2	0.4-7
1.5	0.2-3

ที่มา: วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539

4. อิเล็กโตรโฟริซีสบัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในกระบวนการอิเล็กโตรโฟริซีส ประกอบด้วย EDTA กับ Tris-acetate (TAE) หรือ Tris-borate (TBE) pH ประมาณ 7.5-8.0 การเลือกใช้บัฟเฟอร์ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของบัฟเฟอร์โดยที่บัฟเฟอร์ TAE เป็นบัฟเฟอร์ชนิดที่มีความจุ (buffering capacity) ค่อนข้างต่ำ จะสูญเสียความเป็นบัฟเฟอร์ได้ง่ายเมื่อทำอิเล็คโตรโฟริซีสเป็นเวลานานส่วนบัฟเฟอร์ TBE เป็นบัฟเฟอร์ที่มี buffering capacity สูง และกรดบอริคสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

5. กระแสไฟฟ้า

โดยทั่วไปในการทำอิเล็กโตรโฟริซีส มักจะทำในสภาวะแรงดันคงที่ โดยมีค่าแรงดันไฟฟ้าที่เหมาะสมความเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงจะแปรโดยตรงกับปริมาณค่าแรงดันไฟฟ้า ถ้าค่าแรงดันไฟฟ้าสูงเกินไปการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่มีขนาดใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ

การตรวจตำแหน่งของดีเอ็นเอ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

การตรวจตำแหน่งของดีเอ็นเอหลังการทำอิเล็กโตรโฟริซีสจะทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอทธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปจับระหว่างเบสคู่สมของดีเอ็นเอเกลียวคู่โดยการอินเตอร์

0.5-1.0 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15-16 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลที่ใช้หลังย้อมเสร็จเรียบแล้ว ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อขจัดเอทธิเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้จับกับดีเอ็นเอออก

การตรวจแถบดีเอ็นเอหลังย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ จะทำโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต เมยาวคลื่นต่ำๆส่องอะกาโรสเจล สารเชิงซ้อนของเอทธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอมีคุณสมบัติดูดแสงที่เมยาวคลื่น 300 และ 360 นาโนเมตร และปล่อยแสงวาวสีส้มออกมาที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

กิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction (PCR))

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือที่เรียกว่า In vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเขยายปริมาณ DNA เป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นเอาศัยองค์ประกอบต่างๆคือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded A) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่เกิดขึ้นจากการแยกสายของดีเอ็นเอต้นแบบทั้งสองเส้นออกจากกันเป็นนเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) ขั้นตอนนี้ทำให้เกิดขึ้นโดยอาศัยความร้อน สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่กัน (complementary nds) และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequences) ตรงกันข้าม ที่จะสามารถจับเข้าคู่กับสายได้ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ประการคือ (1) โอลิโกนิวคลีกด์ไพรเมอร์ 2 สายซึ่งต้องใช้สำหรับตั้งต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยที่ ไพรเมอร์จะจับได้อย่างจำเพาะลาย 3′ ของดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นคู่ของมัน (2) เอนไซม์ DNA polymerase และ (3) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ว คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบที่จำเป็นอีก เช่น บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ แต่ละรอบกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้หภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิต่ำ 50-58 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์ารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ในทิศทางจาก 5′ ′ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียสการาะห์จะดำเนินตามลำดับทั้งสามขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งเรียก mplified product หรือผลิตผล PCR (PCR products) จำนวนมากมาย ลักษณะการเพิ่มผลิตผล PCR จะเป็น exponential โดยหลังการทำ PCR จำนวน n รอบ ผลิตผล PCR ที่เกิดขึ้นจะเท่ากับ 2^n ถ้าการทำเทคนิค PCR มีทธิภาพการผลิต 100 เปอร์เซ็นต์ (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539)

จัยที่เหมาะสมในการทำ PCR

ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการทำ PCR มีดังนี้ (มนตรี อัตถทิพพหลกุล และวัชรี อัตถทิพพหลกุล, 2536)

1. ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ ควรมีขนาดความยาวประมาณ 20-30 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วย G+C ประมาณ 50-
เปอร์เซ็นต์ และควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับทางปลาย 3′ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของ
นเอแม่พิมพ์ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ควรมีความจำเพาะที่ไม่พบในบริเวณอื่นๆ ของสาย
นเอแม่พิมพ์ การเรียงนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3′ ของไพรเมอร์ในกรณีที่ใช้ทั้งคู่ไม่ควรจะเป็นคู่สมกัน
ป้องกันการเกิด primer-dimer และแต่ละส่วนไม่ควรมี palindromic sequence เพื่อป้องกันการเกิดโครง
งทุติยภูมิของไพรเมอร์

2. ค่า melting temperature (Tm)

ค่า melting temperature ของแต่ละไพรเมอร์ ควรอยู่ใกล้เคียงกัน และอยู่ในช่วง 55-80 องศา
เซียส นอกจากนี้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ ถ้าปริมาณไพรเมอร์
เกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) ได้

3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้โดยทั่วไปประมาณ 1.0-2.5 หน่วย ต่อ 100
ครลิตร การใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงจนเกินไปจะทำให้เกิดผลิตผล PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น

4. ความเข้มของแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+})

Mg^{2+} มีผลต่อการจับของไพรเมอร์และความถูกต้องของเอนไซม์ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกิน
จะเกิดผลิตผล PCR ลดลง โดยทั่วไปเทคนิค PCR แบบไม่จำเพาะแต่ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกิน
ะทำให้ได้ผลิตผล PCR ลดลงโดยทั่วไปเทคนิค PCR ที่ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 ไมโคร
าร์ Mg^{2+} ที่ใช้ประมาณ 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้ามีการใช้ dNTPs ในปริมาณสูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้ม
ของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้น

5. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ใน PCR มี pH 7.0 ส่วนความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200
ครโมลาร์ การใช้ปริมาณ dNTPs ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จะก่อให้เกิด mispriming ของดีเอ็นเอตั้งต้น
: misincorporation ของ dNTPs

6. บัฟเฟอร์สำหรับ PCR

บัฟเฟอร์มาตรฐานที่นิยมใช้คือ Tris-HCl pH 8.3-8.8 ความเข้มข้น 10-50 มิลลิโมลาร์ และ KCl ที่
เมเข้มข้นประมาณ 50 มิลลิโมลาร์ โดยที่ KCl ทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้าความเข้มข้น
เ KCl มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

7. Primer annealing

การเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในขั้น primer annealing ขึ้นกับลำดับเบส ความยาวและความ
เข้มของไพรเมอร์ที่ใช้

8. Primer extension

เวลาที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่นี้ ขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

9. Denaturation

ช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการ denaturation ส่วนใหญ่คือ 94-95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือเวลาสั้นไป จะทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายมีการแยกสายที่ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณผลิตผล PCR ที่ควรได้ลดลง แต่ถ้าตั้งอุณหภูมิสูง หรือเวลายาวเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพเร็วเกินไป

10. ปัจจัยอื่นๆ

มีปัจจัยอื่นอีกหลายประการที่มีผลกระทบต่อเทคนิค PCR เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภายชนะต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ควรล้างให้ปราศจากสารซักฟอก (detergent) โดยเฉพาะน้ำที่ใช้ในงานควรมีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสเป็นต้น

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นหนึ่งในหลายๆเทคนิคในการศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆซึ่งเกิดจาก deletion, insertion, inversion หรือ point mutation โดยการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (restriction enzyme) ที่เหมาะสม ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งในสภาวะที่เหมาะสมก็จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เหมือนเดิมเสมอแต่ถ้าเป็นดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสที่ตำแหน่งจดจำต่างกันแม้เพียงตำแหน่งเดียวหรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งดังกล่าวเอนไซม์ก็จะไม่ตัดตำแหน่งนั้นทำให้เกิดแบบแผนที่จำเพาะและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (agarose gel electrophresis) เทคนิค RFLP สามารถนำมาบ่งบอกความแตกต่างของแต่ละชนิดและหรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆได้ (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2542)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

การเตรียมดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตเป็นวิธีการเบื้องต้นก่อนที่จะนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปใช้เพื่อวิเคราะห์ จึงมีงานวิจัยหลายงานที่พยายามปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอให้สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ง่าย สะดวก และรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังคิดวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ให้ได้นานที่สุด และดีเอ็นเอยังคงสามารถใช้วิเคราะห์พันธุกรรมได้ในลำดับต่อไป เช่น

Asahida *et.al.*(1996) ได้พัฒนาขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ โดยทำการทดลองกับปลาฟลาวเดอร์ *Paratichthys Olivaceus* และปลาเฮอริ่ง *Clupea harengus* ที่เก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อตับไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (6 M, 8 M Urea; 10 Mm Tris-HCl, pH 7.8; 125 NaCl;10 mM EDTA; 1 % SDS)

ไว้เป็นเวลานาน 1 เดือนถึง 3 ปี ที่อุณหภูมิ 10-32 องศาเซลเซียส แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ ว่าสามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ประมาณ 0.5-2.6 ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อ 1 มิลลิกรัม

Gelbaus and Pirmez (1995) ได้ดัดแปลงขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์ โดยการตก เอนดีเอ็นเอในที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงและเก็บรักษาเลือดไว้ในที่ที่เพิ่มความเข้มข้นของยูเรียเป็น 8 โม และใช้ EDTA, citric หรือ heperin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด พบว่าเลือดจำนวน 75 ไมโครลิตร ารถเตรียมดีเอ็นเอได้ 1-2 ไมโครกรัม

Walsh *et.al.* (1991) ทำการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือด อสุจิ เยื่อบุข้างแก้ม และเส้นผม โดยดัดแปลง วิธีการของ Singer-Sam *et.al.* (1989) ซึ่งอาศัยการต้มเซลล์ในสารละลายคีเล็กซ์เรซิน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง งานวิจัยพบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีคีเล็กซ์เรซินนั้นมีประสิทธิภาพดีแม้ว่าจะเป็นตัวอย่างเก่า และดีเอ็น เตรียมได้นั้นยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง HLA และDQ α ได้ด้วยเทคนิค PCR แต่พบว่าเซลล์ เซนิดเช่น อสุจิไม่สามารสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ด้วยวิธีต้มอย่างเดียวแต่ต้องอาศัยขั้นตอน pretreatment การใส่ Proteinase K หรือทำ DTT treatment

Shedlock *et.al.* (1997) รายงานการเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อย าน และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่เก็บรักษาไว้ในฟอร์มาลีน โดยการเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ด้วยวิธี อลคลอโรฟอร์ม และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ไปเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งยีน 16 S rRNA และ ochrome b พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เสียสภาพ (degrade) ได้

สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอเพิ่งงานศึกษาด้านพันธุกรรมของม้าน้ำนั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด ดังนั้น านวิจัยนี้จึงทำการทดลองเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของม้าน้ำเก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ดัดแปลงตามวิธีการของ Asahida *et.al.* (1996) ดีเอ็นเอที่เตรียมได้นี้จะนำไปวิเคราะห์ด้านความแปรผัน งพันธุกรรมต่อไปด้วยเทคนิค PCR และ RFLP ดังตัวอย่างงานที่ทำการศึกษาในทำนองเดียวกัน เช่น

การศึกษาวิวัฒนาการของปลาสกุล *Euphausiids* ในมหาสมุทรแอนตาร์กติก และสับแอนตาร์กติกโดย tarnello *et.al.* (1996) เตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของปลาที่เก็บรักษาในเอทธานอล70เปอร์เซ็นต์จากนั้นนำ ีเอที่เตรียมได้มาวิเคราะห์โดยการเพิ่มปริมาณยีน 16 rRNA ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการแยก กจากกันตามสายวิวัฒนาการ (divergence) ของปลา *Superba* และ *E. Crystallorophias* จาก าสมุทรแอนตาร์กติค และ *E. Vallentini* จากสับแอนตาร์กติกเมื่อเวลาประมาณ 20 ล้านปีมาแล้ว

นอกจากนี้สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของสิ่งมีชีวิต วกันหรือต่างชนิดกันได้ด้วยเทคนิค RFLP (Restriction length polymorphism) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการ เสายดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งในสภาวะเหมาะสมจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย นไซม์แบบเดิมเสมอ แต่ถ้าเป็นดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจดจำต่างกันแม้เพียงตำแหน่งเดียวก็จะไม่ตัดตำแหน่ง ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะได้เป็นอย่างดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เจะวิเคราะห์จากความหลากหลายของรูปแบบจำเพาะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เนื่องจากไมโตคอนเดรี ดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ โดยเฉพาะบริเวณ control region และ ยีน ATPase

แต่ด้วยเหตุที่การตรวจแบบแผนที่จำเพาะหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RFLP ต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมากและต้องเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ แต่เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใช้บางครั้งมีปริมาณน้อย หรือมีดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่นปนเปื้อนทำให้ไม่สามารถนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาใช้ตรวจลายพิมพ์โดยเทคนิค RFLP ได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมนำเทคนิค PCR มาร่วมใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย โดยที่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณน้อยมาก นอกจากนี้ข้อดีของเทคนิค PCR คือใช้เวลาเพียง 1-2 วัน แปลผลง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2541) สำหรับงานที่ใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์ความหลากหลายของรูปแบบจำเพาะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้นมีตัวอย่างเช่น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เตรียมจากตับ และไข่ของปลาดุกอุย (*Clarius macrocephalus*) ที่อาศัยในแม่น้ำเจ้าพระยาใน 3 จังหวัดคือ อยุธยา ปทุมธานี และกรุงเทพฯ โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด คือ *EcoRI, HindIII, AvaII* และ *Sau I* ปรากฏว่าสามารถแบ่งรูปแบบดีเอ็นเอได้เป็น 18 แฮบโพไทป์ (haplotye) โดยตัวอย่างจากอยุธยามี 8 แฮบโพไทป์ ปทุมธานีมี 14 แฮบโพไทป์ กรุงเทพมี 7 แฮบโพไทป์ และค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทป์ของประชากรภายในแต่ละจังหวัดมีค่า 0.01062, 0.01079 และ0.00474 ตามลำดับ ส่วนค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่างจังหวัดมีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่าประชากรปลาดุกอุยของอยุธยาและปทุมธานีมีค่าใกล้เคียงกันจนดูเหมือนว่ามาจากแหล่งเดียวกัน (นิภาพร ก้านทอง, 2539)

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดของปลา Bream (*Pagrus major*) 5 สายพันธุ์ โดย Tabata *et.al.* (1997) ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากประเทศญี่ปุ่นทางภาคตะวันตก แล้วนำเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาจำนวน 50-100 มิลลิกรัม เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (10 mM Tris-HCl pH 7.5 , 10 mM EDTA, 125 Mm NaCl, 0.5 เปอร์เซนต์ SDS, 8 M Urea) แล้วทำการสกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน cytochrom b ถึงยีน 12 S rRNA ด้วยไพรเมอร์ L-15560 (CATATTAAACCCGAATATATTT) และ H1067 (ATAATAGGGTATCTAATCCTAGTTT) ได้ผลิตผล PCR ขนาด 2.1 กิโลเบส เมื่อย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 6 ชนิด คือ *HaeIII, HhaI, MspI, TaqI, RsaI* และ *HinfI* พบว่าเกิดรูปแบบจำเพาะ 61 แบบ

การศึกษาวิวัฒนาการของปลาเทราสีน้ำตาล (*Salmo trutta*) จากประเทศสเปน โดย Moran *et.al.* (1996) ทำการเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสีขาวที่เก็บไว้ในแอลกอฮอล์ แล้วนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ความแปรผันของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยการใช้เรสทริกชันเอนไซม์จำนวน 4 ชนิดคือ *AvaII, EcoRI, BamHI* และ *XbaI* พบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นตัวติดตามทางพันธุกรรม (genetic marker) ในการจำแนกประชากรปลาเทราสีน้ำตาลสายพันธุ์ Hatchery ออกจากประชากรสายพันธุ์พื้นเมือง นอกจากนี้ยังสนับสนุนทฤษฎีวิวัฒนาการของปลาเทราสายพันธุ์ Hatchery ว่ามีสายวิวัฒนาการแยกมาจากบรรพบุรุษดั้งเดิม

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของปลาแอลบาคอร์ (*Thunnus alalunga*) โดย Chow and Ushima (1995) ทำการรวบรวมตัวอย่างจำนวน 620 ตัวอย่าง จากมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก

และแหลมกู๊ดโฮป และเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสด แช่แข็ง และตัวอย่างที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ นำผลิตผล PCR มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *MseI* และ *RsaI* พบว่าเกิดรูปแบบจำเพาะ 7 แบบ จากค่าการกระจายของแฮบโพลไทป์พบว่าไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างจากมหาสมุทรแปซิฟิกเหนือ และแปซิฟิกใต้ เช่นเดียวกับมหาสมุทรแอตแลนติกเหนือและแอตแลนติกใต้ รวมทั้งแหลมกู๊ดโฮป แต่พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างจากมหาสมุทรแอตแลนติกและแปซิฟิก

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลา Pilchards ในสกุล *Sardinops* โดย Okazaki *et.al.* (1996) เก็บตัวอย่างปลา Pilchards จำนวน 95 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจาก 9 แหล่ง และตัวอย่างปลาจะเก็บรักษาในเอทานอลหรือถูกแช่แข็งแล้วทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสีขาว แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งยีน cytochrome b ถึงยีน 12 S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ CB3R-L (CATATTAAACCCGAATGATATTT) และ 12SAR-H (ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT) ได้ผลิตผล PCR ขนาด 2.0 กิโลเบส แล้วย่อยผลิตผล PCR ด้วยเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่ง จำนวน 10 ชนิด คือ *AciI*, *AfaI*, *AluI*, *BfaI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MboI*, *MseI*, *MspI* และ *TagI* ซึ่งให้เกิดรูปแบบจำเพาะทั้งสิ้น 78 แบบ ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปลา Pilchards จากประเทศญี่ปุ่น ออสเตรเลีย และแอฟริกาใต้มีต้นกำเนิดมาจากประชากรปลา Pilchards จากแปซิฟิกตะวันออก

Bremer *et.al.* (1996) ศึกษาโครงสร้างประชากรปลากะโทงแทงดาบ (*Xiphias gladius*)โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 247 ตัวอย่าง จากมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ทำการเตรียมดีเอ็นเอโดยสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (เอทานอล หรือไอโซโพพานอล) นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง control region ด้วยเทคนิค PCR แล้วนำผลิตผลผล PCR ที่ได้ ไปหาลำดับเบสอัตโนมัติ (sequencing) และยืนยันผลด้วยการทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิดคือ *RsaI*, *DraI*, *MseI* ซึ่ง ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะ 68 แบบ และแบ่งประชากรเป็น 2 กลุ่ม

Rosel and Block (1996) ทำการศึกษาโครงสร้างประชากรของปลากะโทงแทงดาบ (*Xiphias gladius*) ที่เก็บตัวอย่างจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน มหาสมุทรแอตแลนติก มหาสมุทรแปซิฟิก จำนวนทั้งสิ้น 159 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และ DNA Sequence พบว่าตำแหน่ง control region ของปลากะโทงแทงดาบมีขนาดประมาณ 835 คู่เบส จากนั้นทำการประเมินลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ในตำแหน่ง contrc region ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ปลาย 5′ พบว่าตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่าง มีรูปแบบจำเพาะ121 แบบ และความหลากหลายของแฮบโพไทป์ทั้งหมดมีค่าประมาณ 0.994 แสดงว่ามีความหลากหลายในระดับสูง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในกลุ่มตัวอย่างที่มีรูปแบบจำเพาะนี้สามารถแบ่งตัวอย่างเป็นสองกลุ่มตามความแตกต่างของสภาพภูมิศาสตร์ และเมื่อวิเคราะห์ความแปรผันของโมเลกุลพบความหลากหลายใน 3 แหล่งนี้ แสดงว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมประชากรปลากะโทงแทงดาบมีกระจายอยู่ทั่วโลก ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมหาสมุทรสูงมาก

นอกจากนี้ Chow *et.al.* (1997) ได้ใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์รูปแบบจำเพาะของจีโนไทป์ตำแหน่ง
ol region ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของปลากะโทงเทง
(*Xiphias gladius*) ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆของมหาสมุทรแปซิฟิก มหาสมุทรแอตแลนติก มหาสมุทร
ย กู๊ดโฮ๊ป และทะเลเมดิเตอร์เรเนียน โดยเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด แช่แข็ง หรือเก็บรักษาไว้ในเอทา
แล้วเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ซึ่งผลิตผล PCR ที่ได้จะถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิด คือ
DdeI, *HhaI* และ *RsaI* ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะ 52 แบบ และสามารถแบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ
ากรจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และมหาสมุทรแอตแลนติกตะวันตกเฉียงเหนือ อีกกลุ่มคือประชากรที่เหลือ
งด

จากรายงานวิจัยที่มีผู้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดังที่กล่าวมา ในการศึกษา
รั้งนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเตรียมดีเอ็นเอของม้าน้ำได้ และใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์ตำแหน่งที่
าะของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในบริเวณยีน ATPase และบริเวณยีน cytrochrome b ถึงยีน12S rRNA
ำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของ
าที่พบแพร่กระจายอยู่ในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทย