บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter); Beckman
2. เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Microcentrifuge) GS-15; Beckman
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Minimicrocentrifuge) DW-41; Qualitron
4. เจลแชมเบอร์ (Gel chamber) HE 33; Hoefer
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน (Autoclave) SS-240; Tomy
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); Memmert
7. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transluminator) UVTM-19; Hoefer
8. ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette) P20, P200, P1000; Gilson
9. กล้องโพลารอยด์ (Direct screen instant camera) PhotoMan DS-34; Hoefer
10. เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า (Power supply) PS 500 XT; Hoefer
11. ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) 808; Carbolite
12. เครื่อง Thermalcycler; Perkin Elmer

วัสดุภัณฑ์

1. ฟิล์มโพลารอยด์ (Polariod film) 667; Polarioad
2. ทิปสำหรับปิเปตต์อัตโนมัติ (Pipe tip)
3. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เคมีภัณฑ์

1. Isoamyl alcohol; Merck
2. Chloroform; Univar
3. Phenol; Riedel-de Hean
4. Sodium adetate; Fluka
5. Magnesium chloride; Fluka
6. Calciam chloride; Fluka
7. Boric acid; May & Baker
8. Sodium dodecyl sulfate; Fluka
9. Sodium chloride; Fluka

10. Trizma hydrochloride; Sigma
11. Ethylene diaine tetraacetate; Mallinckrodt
12. Sucrose; Fluka
13. Triton X-100; Fluka
14. Absolute ethanol; Fluka
15. Tricaine methane salfonate; Finquel
16. Standard DNA ((/Hind III); Promega
17. Bromophenol blue; Fluka
18. Xyline cyanol FF; Fluka
19. Glycerine; Merck
20. Agarose gel; USB
21. Ribonuclease A; Fluka
22. Proteinase K; Fluka
23. Ethidium bromide; Fluka

เครื่องแก้วและสารละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง ทำให้สะอาดและปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส เยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หรือกรองผ่านกระดาษ รองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตร

พรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตำแหน่งยีน 18S rRNA

   18S-GGGCAAGTCTGGTGCC

   18S-GGTCTGTGATGCCCTT

2. ตำแหน่งยีน cytochrome b จนถึงยีน 12S rRNA ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

   CB3R-L 5-CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT-3

   12SAR-H 5-ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT-3

3. ตำแหน่งยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

   L8562 5-CTT CGA CCA ATT TAT GAG CCC-3

   H943 5-GCC ATA TCG TAG CCC TTT TTG-3

ไพรเมอร์ทั้งหมดสังเคราะห์โดยหน่วยบริการศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

แเอ็นเอมาตรฐาน (Standard DNA Marker)

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

1. λ DNA/ *Hind* III หลังทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 7 ขนาด คือ 3.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 และ 0.7 กิโลเบส ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ โดยประมาณเท่ากับ 120, 49, 33.5, 4.5, 12, 10.5 และ 3 นาโนกรัม ตามลำดับ

2. 100 bp DNA ladder หลังทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 8 ขนาด อ 1,500, 1,000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100 ตามลำดับ

ำน้ำที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างม้าน้ำที่ใช้ในการทดลอง คือ *Hippocampus kuda*, *H. spinosissimus* และ *H. trimaculatus* เป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 3.1) ซึ่งเก็บรวบรวมจากชาวประมงในแหล่งต่าง ๆ ในภาคตะวันออก องประเทศไทย ดังนี้

H. kuda จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง คือจาก ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง และ าก ต.ท่าพริก อ.เมือง จ.ตราด จำนวน 4 ตัวอย่าง

H. spinosissimus จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง จาก ต.บางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี 18 ตัวอย่าง ริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง 5 ตัวอย่าง และ ต. ท่าพริก อ.เมือง จ. ตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง

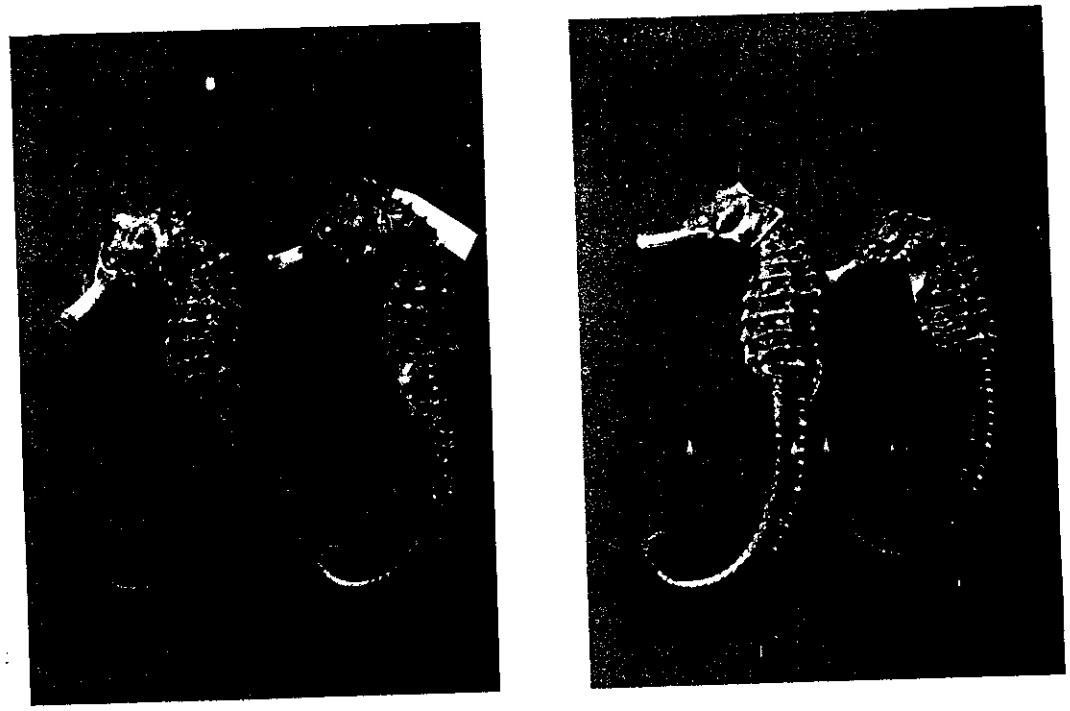
ธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

1. การเตรียมตัวอย่างเลือดเพื่อการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสลบตัวอย่างม้าน้ำด้วย Tricaine methane salfonate (ภาคผนวก) ความเข้มข้น 200 ppt ป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาเจาะเก็บเลือดที่บริเวณโคนหางแต่ละตัวอย่างประมาณ 20-50 มโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ TNES-Urea (ภาคผนวก) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ห้อง เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอในลำดับต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำสารละลายตัวอย่างเลือด จำนวน 50 ไมโครลิตรผสมในบัฟเฟอร์ TNES-Urea จำนวน 450 ไมโครลิตร ใน หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Protinase K (ภาคผนวก) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 5 ชั่วโมง เติมสารละลายฟีนอล (Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol; 25 : 24 : 1) จำนวนเท่ากับปริมาตรเดิมแล้วเขย่าโดยกลับหลอดขึ้นลงเบาๆ จนสารละลายเป็นเนื้อ ดียวกัน นำไปปั่นแยกชั้นสารละลายที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายชั้นบนลงในหลอดทดลอง หม่ แล้วเติมสารละลายฟีนอลจำนวนเท่ากับปริมาตรเดิม เขย่าเบาๆ ทำซ้ำเช่นเดิมจนกระทั่งไม่มีคราบ โปรตีนปรากฏในระหว่างชั้นของสารละลาย นำสารละลายส่วนบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol จำนวน 2-2.5 เท่าของปริมาตรเดิมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°ซ อย่างน้อย 3 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย เอท งานอล 70% ปั่นที่ 13,500 rpm อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วจึงละลายด้วย น้ำกลั่นจำนวน 20-50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ



(A) (B) (C)

ภาพที่ 3.1 ม้าน้ำตัวเต็มวัย เพศเมีย (ซ้าย) และเพศผู้ (ขวา); *H. kuda* (A), *H. spinosissimus* (B) และ *H. trimaculatus* (C)

3. การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโตร
ิริซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานจำนวน 125 นาโนกรัม โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8
เอร์เซ็นต์ กระแสไฟ 80 โวลต์ เคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวกในบัฟเฟอร์ TBE (ภาคผนวก 6) ใช้เวลาประมาณ 1
วโมง ใช้สีติดตาม (tracking dye) (ภาคผนวก3) เป็นตัวติดตาม หรือสังเกตจากตำแหน่งสีของ
romophenol blue ให้มีตำแหน่งห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้อมเจลที่ได้ในสาร
ะลายเอทธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 20 นาที ส่องดูแถบดี
อ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตร
ฐานที่มีขนาด 23.1, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32 และ 0.57 กิโลเบส ซึ่งจะมีดีเอ็นเอประมาณ 59.7, 24.3, 16.9,
11.2, 5.9, 5.2 และ 1.4 นาโนกรัม ตามลำดับ

สำหรับการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอตัวอย่าง ทำโดยนำค่าระยะทางที่ดีเอ็นเอตัวอย่างเคลื่อนที่ในเจล
เปรียบเทียบค่าจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐานกับระยะ
ทางที่ดีเอ็นเอมาตรฐานเคลื่อนที่

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และการตรวจสอบผลิตผล PCR

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 3 แต่ละตัวอย่างประมาณ 60 นาโนกรัม แล้วเติมสารต่างๆ ดังตารางที่
3.1 ลงในหลอดทดลองผนังบางขนาด 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันในที่เย็น แล้วนำไปเข้า
เครื่อง thermalcycler ตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR ในเครื่อง thermalcycler ดังนี้

1. ตำแหน่งยีน18S rRNA

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S rRNA โดยใช้ ไพรเมอร์ 18S-1
(GGGCAAGTCTGGTGCC) และ18S-2 (GGTCTGTGATGCCCTT) ใช้อุณหภูมิ 95°ซ เวลา 30 วินาที 55°
ซ เวลา 30 วินาที และ 72°ซ เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 2 นาที
และ 72°ซ เวลา 5 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ

2. ตำแหน่งตั้งแต่ยีน cytochome b จนถึงยีน 12S rRNA ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ใช้อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที 45°ซ เวลา 1 นาที และ 72°ซ เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และใน
ช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบที่อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 3 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ตามลำดับ

3. ตำแหน่งยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ใช้อุณหภูมิ 95°ซ เวลา 1 นาที 40°ซ เวลา 1 นาที และ 72°ซ เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และใน
ช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบที่อุณหภูมิ 95°ซ เวลา 3 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ตามลำดับ เมื่อครบ
เวลานำผลิตผล PCR มาตรวจสอบ โดยใช้ผลิตผล PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับสีติดตามในอัตราส่วน
5 ต่อ 1 นำ มาทำอิเล็กโตรโฟริซีสความเข้มข้นของอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในบัฟ
เฟอร์ TBE ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเจลที่ได้ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 20 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder และ λ/*Hind* III

5. **การทำผลิตผล PCR ให้บริสุทธิ์** (ตามคำแนะนำของบริษัท Life Technologies)

นำผลิตผล PCR ในข้อ 5 จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย binding solution (H_1)จำนวน 400 ไมโครลิตร (สำหรับผลิตผล PCR จำนวนเท่ากับ 100 ไมโครลิตรหรือน้อยกว่า) จากนั้นนำสารละลายผสมใส่ลงในหลอด spin cartridge แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม Wash Buffer (H_2) จำนวน 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง และนำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด spin cartridge ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ TE ที่ทำให้อุ่นก่อนที่อุณหภูมิ 65-70 °ซ จำนวน 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อรอการวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สาร	ปริมาตรที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย
ดีเอ็นเอแม่พิมพ์	1 ไมโครลิตร	60 นาโนกรัม
น้ำกลั่น	77.8 ไมโครลิตร	-
บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 10 เท่า	10 ไมโครลิตร	-
ไพรเมอร์ตัวที่ 1	1 ไมโครลิตร	0.2 ไมโครโมลาร์
ไพรเมอร์ตัวที่ 2	1 ไมโครลิตร	
แมกนีเซียม	6 ไมโครลิตร	1.5 ไมโครโมลาร์
Taq DNA Polymerase	0.4 ไมโครลิตร	2 ยูนิต
dNTPs	0.8 ไมโครลิตร	0.2 มิลลิโมลาร์
ปริมาตรรวม	**100 ไมโครลิตร**	-

6. **การย่อยผลิตผล PCR ด้วยเรสทริชันเอนไซม์**

นำผลิตผล PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิด ผสมกับบัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอประมาณ 10 นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ยกเว้นเอนไซม์ *Taq*I บ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาด้วยสีติดตามในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 จากนั้นนำปริมาตรทั้งหมดมาทำเจลอิเล็กโตรโฟริซีส โดยใช้ความเข้มข้นของอะกาโรส 2

เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลที่ได้ในสารละลาย
เดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นนาน 20 นาที ส่องดูแถบดีเอ็น
ยใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบการเรืองแสงกับดีเอ็นเอมาตรฐาน
op DNA ladder และ λ/*Hind* II

ชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์และบัฟเฟอร์

เรสทริกชันเอนไซม์ที่เลือกใช้ในการทดลองได้แก่

1. บริเวณจดจำประกอบด้วยการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ 6 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่

1.1 *Eco*RI

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...G↓AATTC...3'

3'...CTTAA↑G...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับ
ฟอร์ ประกอบด้วย 50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.025% Triton X-100, pH 7.5

1.2 *Hind*III

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...AA↓GCTT...3'

3'...TTCG↑AA...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์
ะกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA
50% Glycerrol

1.3 *Kpn*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...GGTAC↓C...3'

3'...C↑CATGG...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ที่ประกอบ
10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7.0 และ 100 µl/ml BSA

2 บริเวณจดจำประกอบด้วยการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ 4 นิวคลีโอไทด์

2.1 *Hae*III

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...GG↓CC...3'

3'...CC↑GG...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ ที่
กอบด้วย 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM $MgCl_2$ และ1 mM DTT

2.2 *Hha*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...GC↓GC...3'

3'...CG↑CG...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 50 mM potassium, 20 mM Tris acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT , pH 7.0 และ 100 µl/ml BSA

2.3 *Msp*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...C↓CGG...3'

3'...GGC↑C...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.9 และ 1 mM DTT

2.4 *Taq*I

เป็นเรสทริกชันเอนไซม์ซึ่งมีบริเวณจดจำและตำแหน่งตัดคือ 5'...T↓CGA...3'

3'...AGC↑T...5'

ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นจำนวน 10 ยูนิตต่อปฏิกิริยา และใช้ร่วมกับบัฟเฟอร์ประกอบด้วย 100 mM NaCl , 10 mM Tri-HCl, 10 mM $MgCl_2$, pH 8.4 และ 100 µl/ml BSA

7. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำด้วยเทคนิค RFLP

ทำการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำแต่ละตัวอย่างในแต่ละแหล่งหลังย่อยผลิตผล PCR ของแต่ละตัวอย่างด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกันในทุกเอนไซม์ที่เลือกใช้ โดยที่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำชนิด *H. kuda* จะวิเคราะห์ที่ตำแหน่งยีน ATPase ส่วนม้าน้ำ *H. spinosissimus* วิเคราะห์ตำแหน่งตั้งแต่ยีน cytochrome b จนถึงยีน 12S rRNA ส่วนม้าน้ำ *H. trimaculatus* มีจำนวนตัวอย่างน้อยมากจึงไม่ได้ทำการศึกษา

139061
ว๙๗.๖๗
ว๖๕๘ ก
๓๑