บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของม้าน้ำ

ผลการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของม้าน้ำทั้งสามชนิดคือ *H. kuda*, *H. spinosissimus*, และ *H. trimaculatus* ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาสกัดด้วยวิธี phenol/chloroform เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ */Hind* III หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส พบว่าดีเอ็นเอที่ได้ของตัวอย่างทั้งหมดมีลักษณะความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์คือเป็นแถบดีเอ็นเอแถบเดียว มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส และเตรียมได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.1

การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ

เมื่อนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำที่เตรียมได้ข้างต้นในม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด ตัวอย่างละ 60 นาโนกรัม โดยประมาณ มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S rRNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าได้ผลิตผล PCR ที่เป็นรูปแบบเฉพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำ คือ *H. spinosissimus* มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 และ 650 คู่เบส *H. kuda* มีแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาด 900 คู่เบส โดยประมาณ, และ *H. trimaculatus* มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส เป็นแถบเข้ม 1 แถบ และขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบสอีก 3 แถบ เป็นแถบจาง ดังแสดงในภาพที่ 4.2

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ

1. ม้าน้ำ *H. spinosissimus*

เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* โดยการนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำจำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง คือจาก ต.บางเสร่ อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี จำนวน 18 ตัวอย่าง บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง จำนวน 5 ตัวอย่าง และ ต. ท่าพริก อ.เมือง จ. ตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จำนวน 60 นาโนกรัม โดยประมาณ มาทำการเพิ่มปริมาณที่บริเวณยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ CB3R-L (CATATTAAACCCGAATGATATTT) และ ไพรเมอร์ 12SAR-H (ATAGTGGGGGTATCTAATCCCAGTT) จำนวน 0.2 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing 45 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที extension 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ก่อนและหลังเข้ารอบอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที ตามลำดับ ภายหลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder และ λ */Hind* III พบว่าผลิตผล PCR ทุกตัวอย่าง มีขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 4.3

และในขั้นต่อมาได้ทำการทดสอบการย่อยผลิตผล PCR ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกเรสทริกชันเอนไซม์ที่ปรากฏรูปแบบของดีเอ็นเอ (DNA pattern) ชัดเจนเท่านั้น โดยใช้เอนไซม์ 7 ชนิด คือ *EcoR*I, *Hind* III, *Kpn*I, *Hae*III, *Msp*I และ *Taq*I พบว่ามีเพียง *EcoR*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I เท่านั้นที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ได้และเกิดรูปแบบที่จำเพาะ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นจึงเลือกทำการย่อยผลิตผล PCR ของทุกตัวอย่างด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ 4 ชนิดนี้ ผลการทดลองพบว่าภายหลังย่อยจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยที่เมื่อย่อยด้วย *EcoR*I, *Hae*III, *Hha* I, และ *Msp*I ได้รูปแบบที่จำเพาะของแถบดีเอ็นเอจำนวน 3, 6, 2, และ 3 แถบ ตามลำดับ โดยที่ม้าน้ำทุกตัวอย่างจากทั้งสามแหล่งมีรูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะเพียงแบบเดียวในแต่ละเรสทริกชันเอนไซม์ที่ทดสอบ ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 4.5 -4.8) ยกเว้นเรสทริกชันเอนไซม์ *Taq*I ที่ผลิตผล PCR เมื่อถูกย่อยแล้วปรากฏรูปแบบจำเพาะ 2 แบบ คือแบบที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ และแบบที่ 2 มี 5 แถบ โดยม้าน้ำทุกตัวอย่างมีรูปแบบจำเพาะที่เหมือนกันทั้งหมดในแบบที่ 1 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ (ภาพที่ 4.9 ช่อง 1, 2 และ 4) แต่มีเพียง 1 ตัวอย่างจากหมู่เกาะมัน อ. แกลง จ. ระยอง ที่มีรูปแบบจำเพาะที่ต่างออกไปเป็นแบบที่ 2 ที่มีแถบดีเอ็นเอ 4 แถบ (ภาพที่ 4.9 ช่อง 3)

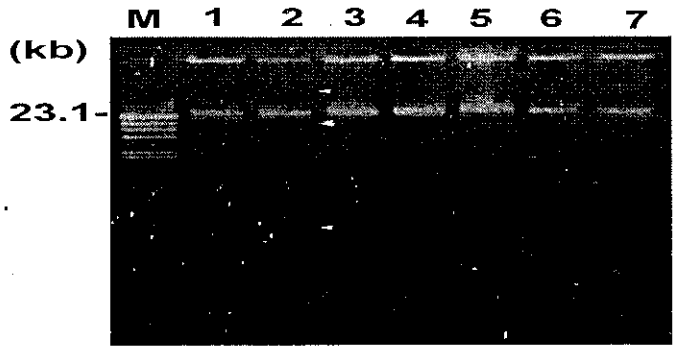
ตารางที่ 4.1 ขนาดของผลิตผล PCR ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เรสทริกชันเอนไซม์	ขนาดดีเอ็นเอ (คู่เบส)
EcoR I	960, 750, 290
Hae III	670, 380, 350, 270, 180, 150
Hha I	1,600, 400
Msp I	1,370, 400, 230
Taq I แบบที่ 1	1,050, 490, 290, 170
แบบที่ 2	680, 490, 370, 290, 170

2. ม้าน้ำ *H. kuda*

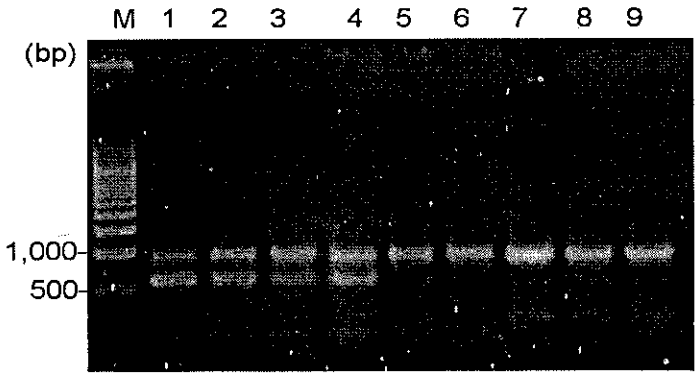
เมื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda* จำนวน 30 ตัวอย่างคือ จากต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี 26 ตัวอย่าง และจากต. ท่าพริก อ.เมือง จ.ตราด 4 ตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มจำนวนที่บริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ L8562 5-CTT CGA CCA ATT TAT GAG CCC-3 และ H943 5-GCC ATA TCG TAG CCC TTT TTG-3 และใช้อุณหภูมิการ denature เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที อุณหภูมิ annealing เท่ากับ40 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที อุณหภูมิ extension เท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ก่อนและหลังเข้ารอบใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามลำดับ ได้ผลิตผล PCR ที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส เป็นแถบเข้ม และ 300 คู่เบส เป็นแถบจาง ดังแสดงในภาพที่ 4.10

และเมื่อทดลองนำผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPaseในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 300 คู่เบส จำนวน 1 ตัวอย่าง มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 6 ตำแหน่ง จำนวน 3 ชนิดคือ *Eco*RI, *Hind*III และ*Kpn*I และเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 4 ตำแหน่ง จำนวน 4 ชนิดคือ *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Tag*I เพื่อทดสอบหารูปแบบจำเพาะที่เหมาะสม ปรากฏผลดังภาพที่ 4.11 โดยพบว่ามีเพียงเรสทริกชันเอนไซม์ *Hae*III เท่านั้นที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ที่มีขนาด 900 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบเข้มได้ (ภาพที่ 4.11 ช่อง 2) โดยได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และ 300 คู่เบส ส่วนผลิตผล PCR ที่มีขนาด 300 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบจางนั้นไม่ถูกย่อยด้วย *Hae*III แต่ถูกย่อยได้ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดอื่นคือ *Hha*I, *Msp*I และ *Tag*I ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 คู่เบส และ 100 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบที่จางมากทั้งสองแถบ และผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H.kuda* บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้ ไม่สามารถย่อยได้ด้วย *Eco*RI, *Hind*III และ*Kpn*I ดังแสดงในภาพที่ 4.11 ดังนั้นจึงเลือกใช้เฉพาะ *Hae*III เท่านั้นย่อยผลิตผล PCR ของทุกตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าปรากฏรูปแบบจำเพาะเพียงรูปแบบเดียวเท่านั้นในม้าน้ำจากทั้ง 3 แหล่ง (ภาพที่ 4.12)



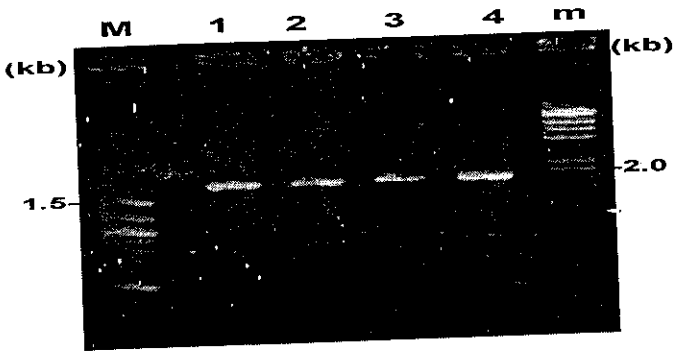
ภาพที่ 4.1 รูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของม้าน้ำ

ดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ของม้าน้ำ *H. kuda* (ช่อง1-2), *H. spinosissimus* (ช่อง3-5), และ *H. trimaculatus* (ช่อง6-7) ที่เตรียมจากเลือดในบัฟเฟอร์ TNES-Urea หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hind*III จำนวน 125 นาโนกรัม (ช่อง M)

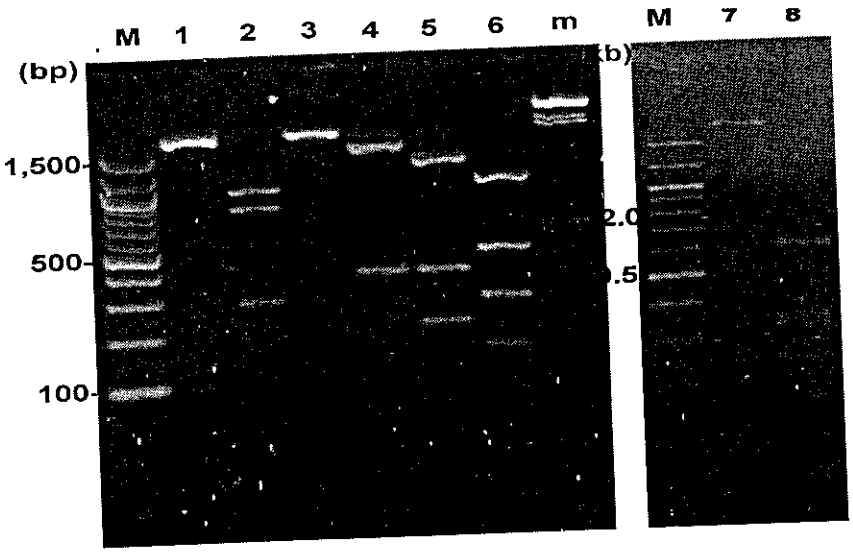


ภาพที่ 4.2 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน 18S rRNA ของม้าน้ำ

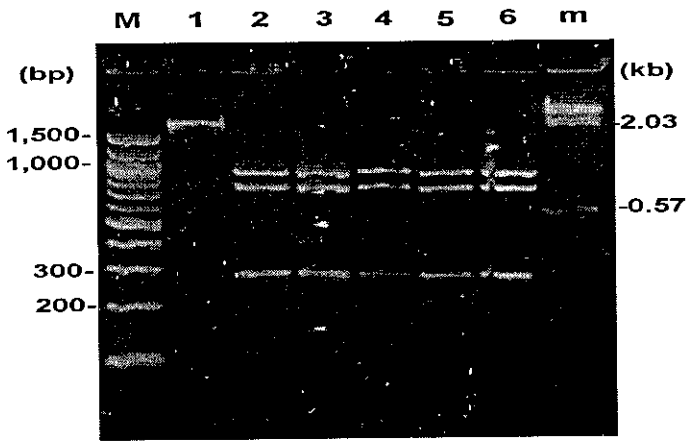
ผลิตผล PCR บริเวณยีน 18S rRNA ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* (ช่อง 1-4), *H. kuda* (ช่อง 5-6) และ *H. trimaculatus* (ช่อง7-9) แต่ละตัวอย่าง หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 500 bp DNA Ladder (ช่อง M)



ภาพที่ 4.3 รูปแบบผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างหลังทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ */Hind* III (ช่อง m)

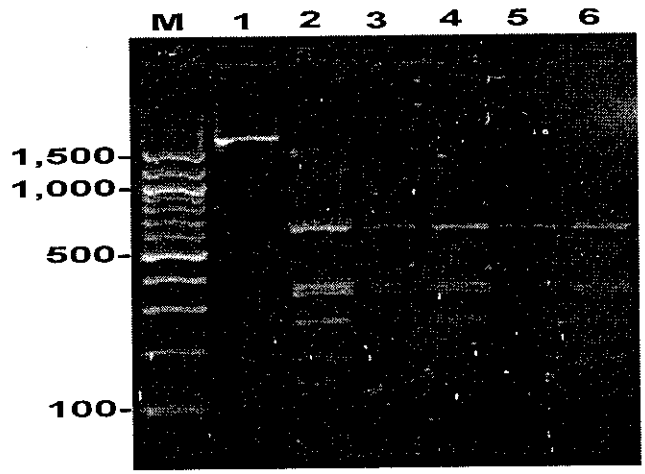


ภาพที่ 4.4 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริชันเอนไซม์ *EcoR*I, *Kpn*I, *Hha*I, *Msp*I, *Taq*I, *Hind*III และ *Hae*III (ช่อง 2-8 ตามลำดับ) หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder และ λ */Hind* III (ช่อง M และ m ตามลำดับ)



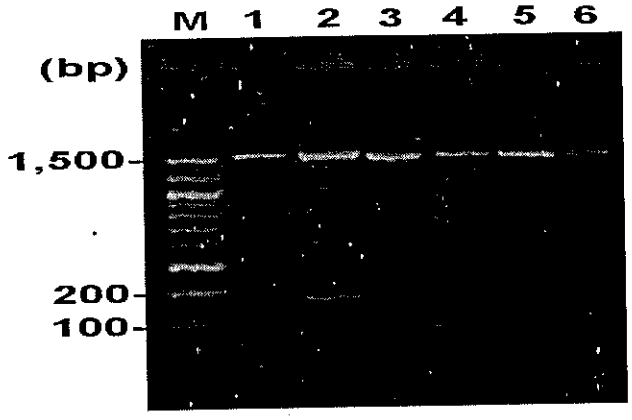
ภาพที่ 4.5 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *EcoR* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 2-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoR* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ */Hind* III (ช่อง m)



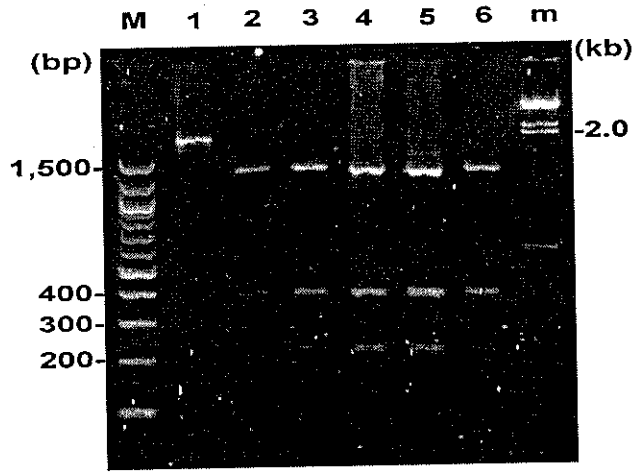
ภาพที่ 4.6 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hae* III

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 2-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hae* III หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ */Hind* III (ช่อง m)



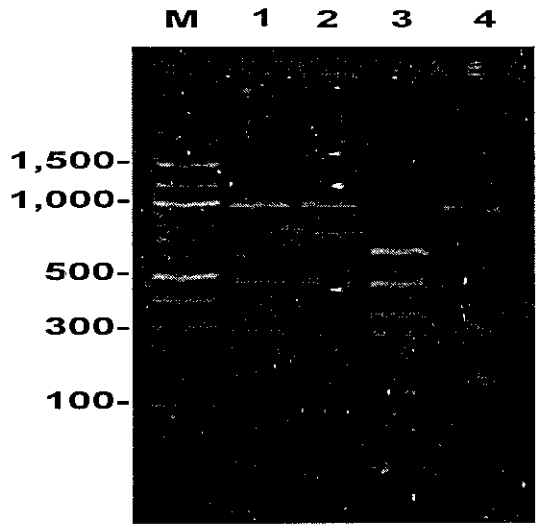
ภาพที่ 4.7 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Hha* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 1-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภาย ังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hha* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็น ลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA dder (ช่อง M)



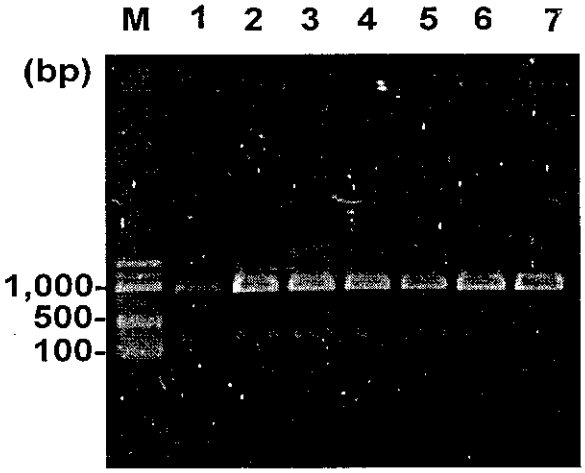
ภาพที่ 4.8 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Msp* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *spinosissimus* แต่ละตัวอย่างจาก จ. ชลบุรี (ช่อง 2-3) จ. ระยอง (ช่อง 4-5) และ จ. ตราด (ช่อง 6) ภาย ังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Msp* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็น ลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอก่อนย่อยด้วยเรสทริกชัน นไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M) และ λ /*Hind* III (ช่อง m)



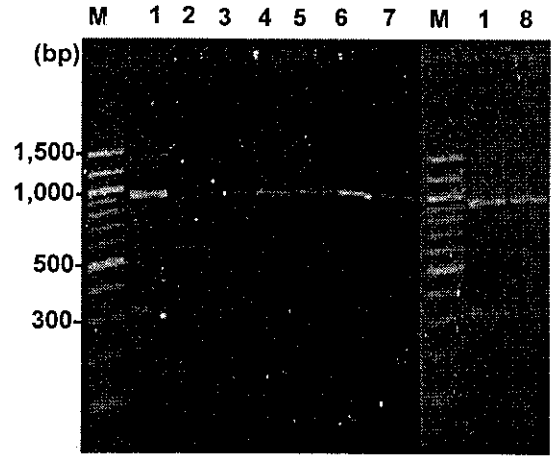
ภาพที่ 4.9 รูปแบบผลิตผล PCR ของ *H. spinosissimus* ภายหลังย่อยด้วย *Taq* I

ผลิตผล PCR บริเวณยีน cytochrome b ถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. spinosissimus* จาก จ. ชลบุรี (ช่อง 1-2) จ. ระยอง (ช่อง 3) และ จ. ตราด (ช่อง 4) ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Taq* I หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



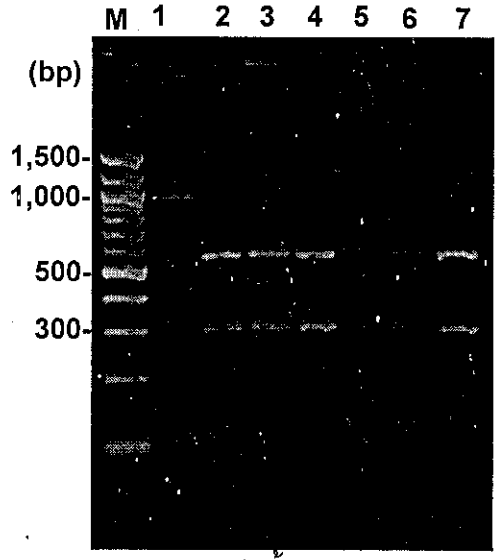
ภาพที่ 4.10 ผลิตผล PCR ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณยีน ATPase ของม้าน้ำ *H. kuda*

ผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* จากจ. ชลบุรี (ช่อง 4) และจากจ. ตราด (ช่อง 5-7) หลังทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา นาที ในอะกาโรสความเข้มข้น 1.8% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



ภาพที่ 4.11 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* หลังย่อยด้วย *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I, *Taq*I, *Eco*RI, *Hind*III และ *Kpn*I (ช่อง 2-8 ตามลำดับ) แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8% เปรียบเทียบกับผลิตผล PCR ก่อนย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)



ภาพที่ 4.12 รูปแบบผลิตผล PCR ของม้าน้ำ *H. kuda* ภายหลังย่อยด้วย *Hae*III

ผลิตผล PCR บริเวณยีน ATPase ในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* จากจ. ชลบุรี (ช่อง -5) และจากจ. ตราด (ช่อง 6-7) หลังย่อยด้วย *Hae*III แล้วทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ ว โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.8% เปรียบเทียบกับผลิตผล PCR ก่อนย่อยด้วย สทริกชันเอนไซม์ (ช่อง 1) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ช่อง M)