บทที่ 5

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอ

การเตรียมดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุลของม้าน้ำนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษา ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องทดลองเตรียมดีเอ็นเอจากส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆ ทั้งจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อตับ และเนื้อเยื่อไต แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมได้ยังไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป (ไม่ได้รายงานในผลการทดลอง) และเนื่องจากม้าน้ำเป็นปลาที่มีโครงร่างแข็งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของร่างกาย การเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อดังกล่าวจึงทำได้ไม่สะดวกนัก ในที่สุดจึงพบว่าเมื่อใช้วิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของม้าน้ำที่มีชีวิต จะเตรียมดีเอ็นเอได้ดีที่สุด โดยดัดแปลงวิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากเลือดของคน (Gelhaus *et.al.*, 1995) และจากเนื้อเยื่อของปลาชนิดอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea (Asahida *et.al.*, 1996) โดยทำการเจาะเลือดที่บริเวณโคนหางของม้าน้ำตัวอย่างละ 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาเตรียมดีเอ็นเอจะเตรียมได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อของปลาชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ (0.5-2.6ไมโครกรัมต่อเนื้อเยื่อ 1 มิลลิกรัม) (Asahida *et.al.*, 1996) ในด้านคุณภาพของดีเอ็นเอพบว่ามีลักษณะความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hind*III จะมีขนาดมากกว่า 23.1 kbp สามารถนำไปเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลขั้นต่อไปได้ เช่นเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของปลาชนิดอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 6 หรือ 8 โมลาร์ เพื่องานศึกษาด้านพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิค PCR (Gelhaus *et.al.*, 1995), เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Bardakci and Skibinski, 1994; Asahida *et.al.*, 1996), เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)(Chow *et.al.*, 1993) หรือนำไปใช้หาลำดับเบส (DNA sequencing) (Bartlett and Davidson, 1991) เป็นต้น แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของยูเรียในบัฟเฟอร์ และระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดของม้าน้ำจะมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วย โดยพบว่าถ้าเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 4 โมลาร์ หรือใช้ความเข้มข้นของยูเรียมากกว่านี้และเก็บเลือดไว้เป็นระยะเวลานานมากกว่า 12 เดือน ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จะมียูเรียตกค้างและไม่สามารถที่จะทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไปได้ (ไม่ได้รายงานในผลการทดลอง) ซึ่งจะแตกต่างจากรายงานของ Asahida *et.al.* (1996) ที่สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้จากเนื้อเยื่อของปลาที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 3 ปี ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 6 หรือ 8 โมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเจาะและเก็บเลือดของม้าน้ำเพียงเล็กน้อยไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 4 โมลาร์ เพื่อใช้สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอภายในระยะเวลา 1 ปี ก็เป็นวิธีที่สะดวกทั้งในการปฏิบัติภาคสนาม และในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนการขน

ย้าย และการเก็บรักษา และดีเอ็นเอที่ได้มีความสมบูรณ์และปริมาณมากพอที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป อีกทั้งตัวอย่างม้าน้ำที่มีชีวิตที่ใช้ในการทดลองนี้ยังสามารถปล่อยกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติเดิมได้

การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำโดยใช้เทคนิค PCR ในบริเวณยีน 18S rRNA โดยเมื่อนำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างของม้าน้ำที่เตรียมได้ข้างต้นในม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด คือ *H. spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* ตัวอย่างละ 60 นาโนกรัมโดยประมาณ มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ ไพรเมอร์ 18S-1 (GGGCAAGTCTGGTGCC) และ18S-2 (GGTCTGTGATGCCCTT) ใช้อุณหภูมิ denature ที่ 95°ซ เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55°ซ เวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72°ซ เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 2 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ 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 ทั้งนี้เมื่อทดลองเปลี่ยนค่าอุณหภูมิของการ annealing ให้มีค่าต่ำลง จะพบรูปแบบเฉพาะตัวเช่นกันแต่จำนวนแถบของดีเอ็นเอจะมากขึ้นและมีแถบจางมากกว่าแถบเข้มซึ่งยากต่อการวิเคราะห์ขนาดที่แน่นอนของแต่ละแถบ และเมื่อใช้อุณหภูมิของการ annealing ให้สูงขึ้นความเข้มของแถบจางก็จะลดลงบ้างแต่ยังคงปรากฏรูปแบบจำเพาะตัวเช่นเดียวกับที่รายงานในครั้งแรก ดังนั้นตำแหน่งยีน 18S rRNA ของม้าน้ำจะให้รูปแบบที่มีความจำเพาะตัวต่อชนิดของม้าน้ำได้

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ

การศึกษาความหลากหลายภายในประชากรของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันนิยมศึกษาในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอส่วนหนึ่งของจีโนมและมีการเปลี่ยนแปลงสูงกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอ โดยเฉพาะตำแหน่ง control region หรือ D-loop region และยีน ATPase (Thomus and Wayne, 1996) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิค RFLP มาใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสของบริเวณดังกล่าวของม้าน้ำที่พบแพร่กระจายทั่วไปในบริเวณภาคตะวันออกของประเทศไทยเพียงสองชนิดคือ *H. spinosissimus* และ *H. kuda* การที่ไม่ได้ทำการศึกษาในม้าน้ำ *H. trimaculatus* เนื่องจากทำการเก็บตัวอย่างได้น้อยมากไม่เพียงพอที่จะวิเคราะห์ความแปรผันภายในประชากรได้ และด้วยเหตุที่จำกัดด้วยงบประมาณและปริมาณตัวอย่างม้าน้ำที่เก็บได้จึงทำให้ต้องแยกศึกษายีนแต่ละชนิดในม้าน้ำแต่ละชนิด โดยศึกษา ตำแหน่ง control region หรือ D-loop region ในม้าน้ำ *H. spinosissimus* และยีน ATPase ใน *H. kuda* โดยทำการเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในบริเวณยีนดังกล่าวของม้าน้ำก่อนด้วยเทคนิค PCR แล้วจึงย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะตัวของดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างในทุกแหล่ง

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. spinosissimus

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. spinosissimus* จำนวนทั้งหมด 24 ตัวอย่าง (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) โดยการเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากเลือดที่เก็บไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TNES-Urea แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เตรียมด้วยเทคนิค PCR แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมระดับโมเลกุลของม้าน้ำมาก่อน จึงดัดแปลงวิธีการวิจัยจากรายงานของ Okazaki *et.al.* (1996) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมในปลา pilchards บริเวณเขต anti-tropical โดยวิเคราะห์บริเวณยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งครอบคลุมบริเวณ D-loop โดยใช้ไพรเมอร์ CB3R-L และไพรเมอร์ 12SAR-H ซึ่งมีลำดับเบส CATATTAAACCCGAATGAATATTT และ ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT ผลิตผล PCR มีขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส แล้วย่อยด้วย *Aci* I, *Afa* I, *Alu* I, *Bfa* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I และ *Taq* I เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะตัวของดีเอ็นเอ นอกจากนี้มีรายงานของ Tabata *et.al.* (1997) ที่ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลา Bream 5 สายพันธุ์จากทะเลแดง โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ย่อยผลิตผล PCR ซึ่งอยู่ในช่วงบริเวณยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้เช่นกัน รวมถึงแนวทางในการทดสอบความแปรผันในบริเวณไมโตคอนเดียลดีเอ็นเอของปลาชนิดอื่นๆ (Bartlett and Davidson, 1991; Carr and Marshall, 1991; Lockwood *et.al.*, 1993) ดังนั้นในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. spinosissimus* นี้จึงทดลองใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเดียวกับที่ Okazaki *et.al.* (1996) ศึกษา แต่พบว่าไม่สามารถเพิ่มผลิตผล PCR ได้ที่อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา PCR ตามที่ Okazaki *et.al.* (1996) รายงาน ต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและเวลาใหม่เป็นอุณหภูมิ denature 94°ซ เวลา 1 นาที annealing 45°ซ เวลา 1 นาที และ extension 72°ซ เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบที่อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 3 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ตามลำดับ จึงได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส ในทุกตัวอย่าง จากนั้นเมื่อนำผลิตผล PCR ที่ได้มาย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 6 ตำแหน่ง คือ *EcoR*I, *Hind*III และ *Kpn*I และเรสทริกชันเอนไซม์ที่มีบริเวณจดจำ 4 ตำแหน่ง คือ *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่าทุกเอนไซม์ย่อยได้ยกเว้น เฉพาะ *Hind*III และ *Kpn*I ที่ไม่สามารถย่อยได้ จากการทดลองนี้แสดงว่าในช่วงของยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของม้าน้ำ *H. spinosissimus* นี้ไม่มีบริเวณจดจำลำดับเบสของ *Hind*III และ *Kpn*I แต่มีบริเวณจดจำลำดับเบสของ *EcoR*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I ซึ่งการทราบชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยได้นี้จะเป็นประโยชน์ในการทำโคลนเพื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ต่อไป ซึ่งจะสามารถเลือกชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งสามารถทำแผนที่ยีน (restriction map) (Beckenbach, 1991) จากผลการทดลองนี้แม้จะพบว่าเมื่อย่อยผลิตผล PCR ทุกตัวอย่างแล้วปรากฏรูปแบบจำเพาะเพียงแบบเดียวเหมือนกันหมดในแต่ละเอนไซม์ ยกเว้นมีเพียง *Taq*I เท่านั้นที่พบรูปแบบจำเพาะ 2 แบบ แสดงว่ามีความแปรผันใน

ชากรของม้าน้ำชนิดนี้และพบภายในแหล่งเดียวกัน คือที่ บริเวณหมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง ซึ่งมีรูป
เจำเพาะที่ต่างออกไป

อย่างไรก็ตามอาจพบรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ *H. spinosissimus* หลากหลายมากขึ้นถ้า
ชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์โดยเฉพาะชนิดที่มีบริเวณจดจำ 4 ลำดับเบส และเพิ่มจำนวนตัวอย่างม้าน้ำ
ากกว่านี้และจากหลายแหล่ง ซึ่งจะทำให้ข้อมูลความแปรผันภายในประชากรของม้าน้ำมีความสมบูรณ์
ยิ่งขึ้น และหากนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตำแหน่งยีน cytochrome b ถึงยีน 12S rRNA ของม้าน้ำนี้ไปหา
บนิวคลิโอไทด์ (DNA sequencing) และเปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างจะทำให้ทราบถึงความแปรผันทาง
ุกรรมที่แน่ชัดขึ้น รวมถึงเป็นแนวทางให้ทราบถึงความสัมพันธ์ในสายวิวัฒนาการของม้าน้ำ และที่สำคัญ
ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในด้านอื่นๆ อีกมาก (Bartlett and Davidson, 1991; Carr
-shall, 1991; Lockwood *et.al.*, 1993; Iguchi *et.al*, 1997)

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. kuda

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *H. kuda* นั้นยังไม่มีรายงานการ
ษาด้านพันธุกรรมมาก่อน ในครั้งนี้จึงทดลองศึกษาในบริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ
าะเป็นบริเวณที่มีอัตราการแทนที่และความหลากหลายสูงอีกตำแหน่งหนึ่ง โดยดัดแปลงวิธีการศึกษา
มที่รายงานโดย Chow and Ushiama (1995) ที่ศึกษาโครงสร้างประชากรของปลา albocore
unnus alalunga) ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองกับม้าน้ำ *H. kuda* จาก 2 แหล่ง คือ จังหวัดชลบุรี
ะจังหวัดตราด จำนวน 30 ตัวอย่าง คือจาก ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง และจาก
ท่าพริก อ.เมือง จ.ตราด จำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในตำแหน่งยีน
Pase ใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 40°ซ ได้ผลิตผล PCR 2 แถบ มีขนาด 900 และ 300 คู่เบสโดย
ะมาณ แต่แถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสจะเป็นตำแหน่งที่ไม่มีความจำเพาะ เพราะเมื่อทดลองเพิ่ม
มหภูมิในช่วง annealing ให้สูงขึ้นแถบนี้ก็จะหายไปหรือจางกว่าเดิม แต่ที่อุณหภูมิของการ annealing
40°ซ นี้จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสเสมอในทุกตัวอย่าง และเมื่อทดสอบการย่อยด้วยเรสทริกชัน
นไซม์ 7 ชนิด คือ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่ามีเพียง *Hae*III เท่านั้นที่
เมารถย่อยผลิตผล PCR ขนาด 900 คู่เบสได้ และไม่ย่อยแถบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ด้วย แสดงว่า
แบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสนี้ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์รูปแบบที่จำเพาะตัวหลังย่อยด้วยเรสทริกชัน
นไซม์ ดังนั้นเลือกใช้เฉพาะ *Hae*III เท่านั้นย่อยผลิตผล PCR ทุกตัวอย่าง พบว่าได้รูปแบบดีเอ็นเอที่
เพาะตัวเพียงแบบเดียว จึงเป็นไปได้ว่ายังไม่พบความแปรผันทางพันธุกรรมภายในประชากรม้าน้ำทั้ง
องแหล่ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการกระจายตัวของประชากรม้าน้ำชนิดนี้ในบริเวณกว้าง หรืออาจเนื่อง
าจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในแต่ละแหล่งมีน้อยเกินไป ทำให้ยังไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมก็
นได้ แต่ทั้งนี้ในการเก็บตัวอย่างม้าน้ำแต่ละครั้งมีข้อจำกัดหลายประการที่ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่าง
จำมาก เช่น ฤดูกาล และต้องอาศัยชาวประมงในการเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ในปัจจุบันจำนวนประชากร

ของม้าน้ำลดลงอย่างมาก อีกทั้งขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับแหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งแพร่กระจาย ลักษณะการดำรงชีวิต รวมทั้งแหล่งการทำประมงที่แน่ชัดนอกจากเหตุผลดังที่กล่าวมาแล้ว ในด้านเทคนิค การศึกษาด้วย RFLP ก็ควรที่จะเพิ่มชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ให้มากขึ้น เพราะเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกัน ทำให้มีโอกาสพบรูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะและมีความหลากหลายเกิดขึ้นได้

นอกจากนี้การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมยังสามารถตรวจสอบได้โดยศึกษาจากแบบแผนของโปรตีนโดยใช้วิธี starch-gel electrophoresis (นงลักษณ์ สกุลญานนทวิทยา และคณะ, 2537; Nugroho *et.al*, 1997) หรือศึกษาดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เช่นกันแต่จะไม่ทราบบริเวณที่แน่นอนและใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวที่ขนาดสั้นกว่าปกติ (8-10 นิวคลีโอไทด์) มีเบส GC ประมาณ 50-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถ้าการสุ่มมีความจำเพาะในส่วนของดีเอ็นเอที่แปรผันมากก็จะได้แบบแผนที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้ ดังเช่นที่ Bardakci and Skibinsi (1993) บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์และสับสปีชีส์ของปลาหมอเทศได้ หรือในทำนองเดียวกับการศึกษาในปลา zebra fish เป็นต้น (Johnson *et.al*, 1994) หรือใช้เทคนิค PCR-SSCP วิเคราะห์ตำแหน่งยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ได้จะมีความจำเพาะต่อชนิดเช่นเดียวกัน (Hartmut *et.al*,1997)

สรุปผลการทดลอง

การเตรียมดีเอ็นเอ

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการวิเคราะห์ด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุลของม้าน้ำ ทำโดยการเจาะเลือดที่บริเวณโคนหางของม้าน้ำตัวอย่างละ 20-50 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ในบัฟเฟอร์ TNES-Urea ที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 ปี สามารถเตรียมดีเอ็นเอได้ประมาณ 2-5 ไมโครกรัมต่อเลือด 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอมีลักษณะความเป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hind*III จะมีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส และสามารถนำไปเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลขั้นต่อไปได้

การศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของม้าน้ำ

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำ 3 ชนิด คือ *H. spinosissimus*, *H. kuda* และ *H. trimaculatus* โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณยีน 18S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมจากตัวอย่างเลือดในบัฟเฟอร์ TNES-Urea โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส GGGCAAGTCTGGTGCC และ GGTCTGTGATGCCCTT ที่อุณหภูมิ denature เท่ากับ 95°ซ เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55°ซ เวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72°ซ เวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ และเพิ่มการใช้อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 2 นาที และ 72°ซ เวลา 5 นาที ในช่วงเวลาก่อนและหลังครบรอบตามลำดับ ผลิตผล PCR ที่ได้เป็นรูปแบบจำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำ โดยที่ *H. spinosissimus* มี

แถบดีเอ็นเอ 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

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. spinosissimus

ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. spinosissimus* จากตัวอย่างทั้งหมด 24 ตัวอย่าง คือ 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 ทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตั้งแต่บริเวณยีน cytochrome b จนถึง 12S rRNA ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส จากนั้นย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่าทุกเอนไซม์ย่อยได้ยกเว้น *Hind*III และ *Kpn*I ที่ไม่สามารถย่อยได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ทั้งสี่ชนิดย่อยผลิตผล PCR ของตัวอย่างม้าน้ำ *H. kuda* ทุกตัวอย่าง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะตัวของดีเอ็นเอ จากผลการทดสอบพบเพียงรูปแบบเดียวทุกเอนไซม์ ยกเว้น *Taq*I ที่มี 2 รูปแบบ แสดงว่ามีความแปรผันในประชากรของม้าน้ำชนิดนี้และพบภายในแหล่งเดียวกัน คือที่หมู่เกาะมัน อ.แกลง จ. ระยอง ซึ่งมีรูปแบบจำเพาะที่ต่างจากแหล่งอื่น

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ H. kuda

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำ *H. kuda* จากตัวอย่างที่ จังหวัดชลบุรี จำนวน 26 ตัวอย่าง และจังหวัดตราด จำนวน 4 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ในบริเวณยีน ATPase ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอของม้าน้ำ *H. kuda* แต่ละตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ผลิตผล PCR ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 300 คู่เบส จากนั้นย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Hae*III, *Hha*I, *Msp*I และ *Taq*I พบว่ามีเพียง *Hae*III ชนิดเดียวที่สามารถย่อยผลิตผล PCR ขนาด 900 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เรสทริกชันเอนไซม์ชนิดนี้ย่อยผลิตผล PCR ของตัวอย่างม้าน้ำ *H. kuda* ทุกตัวอย่าง จากผลการทดสอบพบเพียงรูปแบบเดียว ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 และ 300 คู่เบส ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงยังไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิดของม้าน้ำ *H. kuda*