# การตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA เพื่อการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* โดยพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

# Determination of segments of the mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences for identifying among seahorse species in genus *Hippocampus* with PCR-RFLP

พิทักษ์ สูตรอนันต์[1*] ประกาศิต รัตนตันหยง[1] และ เสาวภา สวัสดิ์พีระ[2]

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Pitak Sootanan[1*], Prakasit Rattanatanyong[1] and Sowapa Sawatpeera[2]

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

[2]Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ของม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*; n=6) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*; n=6) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ คือ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA และคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 16S rRNA นำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบลำดับเบส แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูล GenBank เพื่อนำข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างม้าน้ำในสกุลเดียวกันที่มีความเหมือน มา align ก่อนวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะกับผลผลิตพีซีอาร์ เพื่อให้ได้แบบแผนอาร์เอฟแอลพีซึ่งให้ผลการตัดที่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ เมื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีด้วยเอนไซม์บางชนิดได้แก่ *Spe*I, *Nde*I, *Nla*III และ *Dra*I กับผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยคู่ไพรเมอร์ทั้งสามข้างต้น สามารถแสดงให้เห็นถึงการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามออกจากกันได้

## Abstract

The amplification of the mitochondrial 12S and 16S rRNA with a template of total DNA from muscle tissues of the spotted seahorse (*Hippocampus kuda*; n=6) and the hedgehog seahorse (*H. spinosissimus*; n=6) was studied. Three pairs of primers, L1091, H1478 and L1091, H2001 that specific with 12S rRNA and couple of L2510 and H3058 that specific with 16S rRNA were used in PCR reaction. The sequences of the PCR products were determined and compared with those of other species in GenBank database. The sequences were also used for selection of restriction enzymes, yielding species-specific restriction fragment length polymorphisms (RFLP). After calculation of corresponding RFLP-patterns of two species and the other species investigated with suitable restriction enzymes, the selected restriction enzymes: *Spe*I, *Nde*I, *Nla*III และ *Dra*I; were found to be sufficient for yielding the RFLP patterns specific to each the two species of seahorse.

**Keywords :** 12S rRNA, 16S rRNA, Nucleotide Sequence, PCR-RFLP, Species Identification, Seahorse, *Hippocampus*

*** Corresponding author.** E-mail: pitaksootanan@yahoo.com

## บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคระดับโมเลกุลของการตรวจสอบลำดับเบส (nucleotide sequencing) มีการพัฒนาไปมากกว่าอดีต ซึ่งรวมถึงราคาการตรวจสอบต่อหน่วยที่ลดต่ำลงด้วย จึงทำให้สามารถประยุกต์ใช้เทคนิคของการตรวจสอบลำดับเบสที่เคยยุ่งยากซับซ้อนในอดีตมาเป็นเทคนิคพื้นฐาน เพื่อทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสบางส่วน บนตำแหน่งของยีนจำเพาะทั้งที่อยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ซึ่งข้อมูลของลำดับเบสที่ได้นั้นสามารถนำมาเปรียบเทียบความเหมือน และการซ้ำกันกับข้อมูล ที่ปรากฏอยู่บนฐานข้อมูลที่มีในเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ไม่ว่าจะเป็นฐานข้อมูล GenBank ที่ NCBI (National Center for Biotechnology Information) DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ที่ประเทศญี่ปุ่น หรือ EBI (European Bioinformatics Institute) ที่ประเทศอังกฤษ โดยการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวทำให้รู้ว่าข้อมูลที่ได้เหมือนกับของผู้อื่นหรือไม่ หรือถ้าเป็นสิ่งมีชีวิตในสกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดกัน หรือในกรณีเป็นสิ่งมีชีวิตคนละประเภท ก็สามารถนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวมาวิเคราะห์และประยุกต์ได้หลากหลายแบบ เช่น การวิเคราะห์วิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตต่างชนิด หรือสิ่งมีชีวิตในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิด หรือต่างสายพันธุ์ ซึ่งในที่นี้จะเป็นการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส เพื่อนำมาใช้ในการตัดสินใจเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ ในตำแหน่งยีนที่จำเพาะ หรือที่เรียกว่าเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) ที่ในอดีตเมื่อทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายกับตำแหน่งยีนที่จำเพาะได้แล้ว ก็จำเป็นจะต้องทำการสุ่มเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการตัด เพื่อให้เกิดแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่แสดงความแตกต่าง ซึ่งต้องใช้เอนไซม์เป็นจำนวนมากในการสุ่มเลือก ดังนั้นหากรู้ว่าเอนไซม์ชนิดใดให้ผลที่ต้องการ ก็ไม่จำเป็นต้องสุ่มเลือกเอนไซม์ ทำให้ลดรายจ่ายที่เกิดขึ้นได้มาก

เหตุผลที่เลือกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) เป็นแหล่งดีเอ็นเอเป้าหมายในการศึกษานี้เนื่องจากเหตุผลหลักสามประการคือ (1) อัตราการเกิดวิวัฒนาการของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีค่าที่สูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) มาก รวมทั้งยังเต็มไปด้วยลำดับเบส ที่มีความหลากหลายที่สามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดได้ (Carrera และคณะ, 1999, Barriga-Sosa และคณะ, 2005, Girish และคณะ, 2005, Ishizaki และคณะ, 2005, Karaiskou และคณะ, 2005 และ Zhang และคณะ, 2006) (2) จำนวนสำเนาของโมเลกุลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีมากในเซลล์เซลล์หนึ่ง (มีประมาณ 600-6000 ชุด ของโมเลกุลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอต่อเซลล์สัตว์หนึ่งเซลล์) ทำให้มีปริมาณที่เพียงพอ ถึงแม้เซลล์ที่ต้องการทดสอบ จะผ่านกระบวนการแปรสภาพมาบ้าง (อ้างถึงโดย Zhang และคณะ, 2006) และ (3) ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอมีลักษณะการถ่ายทอดที่ส่งผ่านข้อมูลพันธุกรรมมาจากทางฝ่ายแม่เท่านั้นและไม่เกิดการผสมผสานข้อมูลพันธุกรรมจากฝ่ายพ่อ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงเป็นข้อมูลในแง่ของวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นโดยตรงต่อไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Karaiskou และคณะ, 2005) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA: rRNA) สามารถพบได้ในจีโนมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในสัตว์ทั้งขนาดเล็กที่ตำแหน่งยีน 12S rRNA (ขนาดประมาณ 819 - 975 คู่เบส ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง) และขนาดใหญ่ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA (ขนาดประมาณ 1571 - 1649 คู่เบส ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง) (Carrera และคณะ, 1999)

มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิต ที่อาศัยคู่ไพรเมอร์มาตรฐานที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน cytochrome *b* และ 12S rRNA ในบริเวณอนุรักษ์ (Kocher และคณะ, 1989) ซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาตำแหน่งยีนในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีการใช้ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตมากกว่า100 สปีชีส์ ที่มีทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางประเภท สำหรับการตรวจสอบแบบแผนพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพื่อการบ่งชี้ชนิด โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสก่อนนั้นได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายทั้งในตำแหน่งยีน 12S rRNA ได้แก่ การบ่งชี้ชนิดของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Girish และคณะ, 2005) และการบ่งชี้ชนิดของปลาในผลิตภัณฑ์ดองเค็ม (Zhang และคณะ, 2006) สำหรับตำแหน่งยีน 16S rRNA ได้แก่ การจำแนกปลาแซลมอน กับปลาเทราท์ (Carrera และคณะ, 1999) การจำแนกปลา *Macrorhamphosus scolopax* ที่มีลักษณะสัณฐานในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโต ที่คล้ายคลึงกับปลาในสกุล *Trachurus* ซึ่งมีถิ่นอาศัยในแถบเดียวกัน ซึ่งได้มีการศึกษาใน 5S rRNA ที่อยู่บนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอด้วย

(Karaiskou และคณะ, 2005) การบ่งชี้ชนิดของปลา 4 ชนิด ในกลุ่ม silversides "peces blancos" (*Chirostoma sp.*) และอีกสองชนิดที่ใกล้เคียงกัน (Barriga-Sosa และคณะ, 2005) และการบ่งชี้ชนิดของกลุ่มปลาปักเป้า ที่มีพิษกับที่ไม่มีพิษ (Ishizaki และคณะ, 2005)

สำหรับการศึกษาในม้าน้ำที่มีการรายงาน จะเกี่ยวข้องกับการตรวจสอบลำดับเบสของม้าน้ำชนิดต่างๆ ที่กระจายอยู่ทั่วโลก เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นถึงจุดเริ่มต้น และสายวิวัฒนาการของม้าน้ำชนิดต่างๆ (Casey และคณะ, 2003, Teske และคณะ, 2003) และการตรวจสอบวิวัฒนาการในแง่ของการตั้งครรภ์ และเลี้ยงดูลูกอ่อนของม้าน้ำกับปลาจิ้มฟันจระเข้ ที่ได้จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของกระเป๋าหน้าท้อง กับข้อมูลระดับโมเลกุล (Wilson และคณะ, 2001) ซึ่งตำแหน่งยีนที่มีการนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสคือตำแหน่งยีน 12S rRNA (Wilson และคณะ, 2001), 16S rRNA (Wilson และคณะ, 2001 และ Teske และคณะ, 2003), cytochrome b (Wilson และคณะ, 2001 และ Casey และคณะ, 2003), RP1 และ Aldolase (Teske และคณะ, 2003) นอกจากนั้นได้มีการศึกษาการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำโดยใช้แบบแผนอาร์เอพีดี ซึ่งอาศัยไพรเมอร์แบบสุ่มขนาดสิบเบสในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (พิทักษ์ สูตรอนันต์ และเสาวภา สวัสดิ์พีระ, 2549) โดยได้ทำการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอพีดีที่เกิดจากปฏิกิริยาของไพรเมอร์จำนวน 53 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แบบแผนอาร์เอพีดีที่จำเพาะกับชนิด และสามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำ 3 ชนิด ในสกุล *Hippocampus* คือ ม้าน้ำดำ (*H. kuda*) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) และ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus*) ได้ มีเพียงบางไพรเมอร์ที่ให้ผลไม่เด่นชัด

ในการทดลองนี้ มีเป้าหมายที่จะตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม ที่มีการเพาะเลี้ยงอยู่ในสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา แล้วนำลำดับเบสที่ตรวจสอบได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีความเหมือนหรือซ้ำกันของม้าน้ำชนิดอื่น ที่มีอยู่บนฐานข้อมูล GenBank เพื่อนำข้อมูลที่ได้มา align และเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีผลต่อการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำในสกุล *Hippocampus* และสามารถจำแนกม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามออกจากกันได้ แล้วนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้มายืนยันด้วยการทดลองโดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. ตัวอย่างม้าน้ำ

ตัวอย่างของม้าน้ำทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*; n=6) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*; n=6) ได้รับความอนุเคราะห์ และยืนยันชนิดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เสียชีวิตแล้ว และถูกแช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในที่เย็นเป็นเวลาประมาณ 2 ปี โดยม้าน้ำดำจับได้จากบริเวณชายหาดบางแสน ส่วนม้าน้ำหนามจับได้จากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร ทั้งสองบริเวณอยู่ในจังหวัดชลบุรี

### 2. การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำเนื้อส่วนโคนหางของม้าน้ำประมาณ 50 มิลลิกรัม มาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยกรรไกรและโกร่งบด แล้วนำมาผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเนสเค และ SDS ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อด้วยวิธี ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (Sambrook และคณะ, 1989 และ Hoelzel, 1998) นำสารละลายดีเอ็นเอของม้าน้ำที่ได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ คือไพรเมอร์ L1091 (5′-AAACTGGGATTAGATACCCCACTA-3′) H1478 (5′-GAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3′) และ H2001 (5′-AACCAGCTATCACCAGGC TCG-3′) (Kocher และคณะ, 1989) โดยจับคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001 ซึ่งจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 430 และ 990 คู่เบส ตามลำดับ และคู่ของไพรเมอร์ L2510 (5(-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3′) กับ H3058 (5′-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3′) (Palumbi และคณะ, 1991 อ้างถึงใน Wilson และคณะ, 2001) ซึ่งให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 620 คู่เบส

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร dNTP แต่ละชนิด อย่างละ 200 ไมโครโมลาร์, สารละลายบัฟเฟอร์ (*Taq* DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium Free: 100 mM Tris-Cl, pH 8.3; 500 mM KCl; 1% Triton®X-100) MgCl2 ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์แต่ละชนิด อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega) จำนวน 1

ยูนิต แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermo Hybaid รุ่น Px2 ภายใต้โปรแกรมที่เริ่มต้นด้วยขั้นตอนการทำให้เสียสภาพเริ่มต้น (initial denaturation step) (94 องศาเซลเซียส 5 นาที) แล้วตามด้วยวัฏจักรของอุณหภูมิ จำนวน 35 รอบ ที่ประกอบด้วย การทำให้เสียสภาพ (denaturation) (94 องศาเซลเซียส 30 วินาที) การเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) (50 องศาเซลเซียส 1 นาที) และการต่อสายดีเอ็นเอ (extension) (72 องศาเซลเซียส 1 นาที) แล้วตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายของการต่อสายดีเอ็นเอ (final extension) (72 องศาเซลเซียส 10 นาที) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำบริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen) ก่อนส่งผลผลิตพีซีอาร์ภายหลังการทำบริสุทธิ์แล้วในรูปของตะกอน พร้อมกับคู่ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นปลายฟอร์วอร์ดและรีเวอร์ส (forward and reverse primers) คือ L1091, H1478 และ H2001 และคู่ไพรเมอร์ L2510 และ H3058 ไปยังหน่วยบริการชีวภาพ (BSU: Bioservice Unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อตรวจหาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์

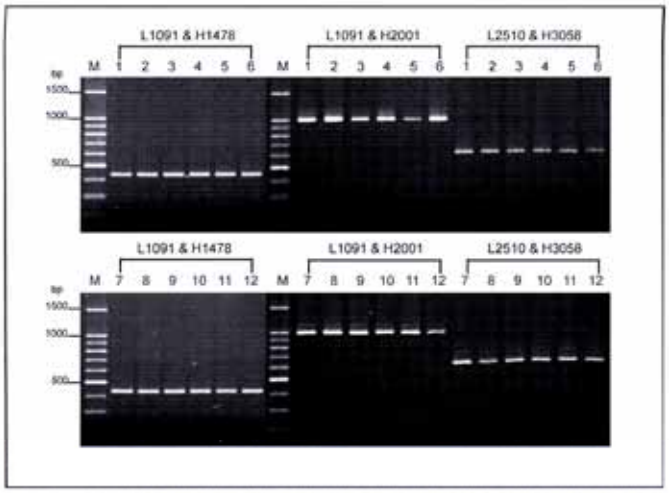
**3. การตรวจสอบ และการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบส และการวิเคราะห์ตำแหน่งตัด**

นำลำดับเบสทั้งหมด มาปรับให้แต่ละลำดับเริ่มต้นจากปลายของไพรเมอร์ L1091 แล้วทำการเปรียบเทียบความเหมือนด้วยการ align โดยใช้ ClustalW Multiple alignment (Thompson และคณะ 1994) ซึ่งเป็นโปรแกรมประยุกต์เพิ่มเติมที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.1 (Hall, 1999) เมื่อได้การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสจากปลายไพรเมอร์ฟอร์วอร์ดและรีเวอร์สของแต่ละตัวอย่างในแต่ละชนิดแล้ว ทำการปรับแต่งโดยอาศัยการเปรียบเทียบด้วยตา กับผลโครมาโตแกรมของลำดับเบสจากแต่ละปลายไพรเมอร์ของแต่ละตัวอย่าง ตัดลำดับในส่วนที่ไม่ชัดเจนออกไป แล้วนำตัวแทนของข้อมูลของลำดับเบสที่ได้ ไปตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกันของลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank โดยการใช้โปรแกรม blastn แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของม้าน้ำชนิดอื่นที่ได้มาทำการ align กับข้อมูลของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนามที่ทำการทดลอง แล้วตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบส พร้อมนำตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันนั้นมาวิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยอาศัยโปรแกรมประยุกต์ Restriction Mapping Utility ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.1 (Hall, 1999) เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างของสปีชีส์ของม้าน้ำเมื่อต้องมีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ต่อไป

ลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ที่ได้จากตัวอย่างหมายเลขที่ 1 ของแต่ละสปีชีส์ จะถูกนำไปเก็บไว้กับฐานข้อมูล GenBank มีเลขรหัส (accession number) ดังนี้คือ ลำดับเบสจากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ H2001ของตำแหน่งยีน 12S rRNA ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม มีเลขรหัสเป็น DQ452299 และ DQ452300 ตามลำดับ และ ลำดับเบสจากคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ของตำแหน่งยีน 16S rRNA ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม มีเลขรหัสเป็น DQ452301 และ DQ452302 ตามลำดับ

**4. การตรวจสอบการบ่งชี้ชนิดม้าน้ำดำและม้าน้ำหนามด้วยพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี**

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ทั้งสามคู่ข้างต้น ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม ซึ่งเป็นตัวอย่างคนละชุดกับที่ทำการตรวจสอบลำดับเบส มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (New England Biolabs) ที่คัดเลือกจากการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดเพื่อการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม โดยผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Spe*I (A′CTAG__T) ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Nde*I (CA′TA__TG) และ *Nla*III (__CATG′) และผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Dra*I (TTT′AAA) และ *Nla*III (__CATG′) โดยในปฏิกิริยาการตัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยผลผลิตพีซีอาร์ 0.5 ไมโครกรัม 10X ของเอนไซม์บัฟเฟอร์ที่จำเพาะ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ เอนไซม์จำนวน 10 ยูนิต นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำผลการตัดที่ได้ไปแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยแยกด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟเรซิสบนเจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้บัฟเฟอร์ TBE (45 mM Tris-borate, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (100bp DNA Ladder, Promega)




**ภาพที่ 1** แถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มขยาย โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478, L1091 กับ H2001 ที่จำเพาะกับยีน 12S rRNA และ L2510 กับ H3058 ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 6 คือ ม้าน้ำดำ และตัวอย่างหมายเลข 7 ถึง 12 คือ ม้าน้ำหนาม

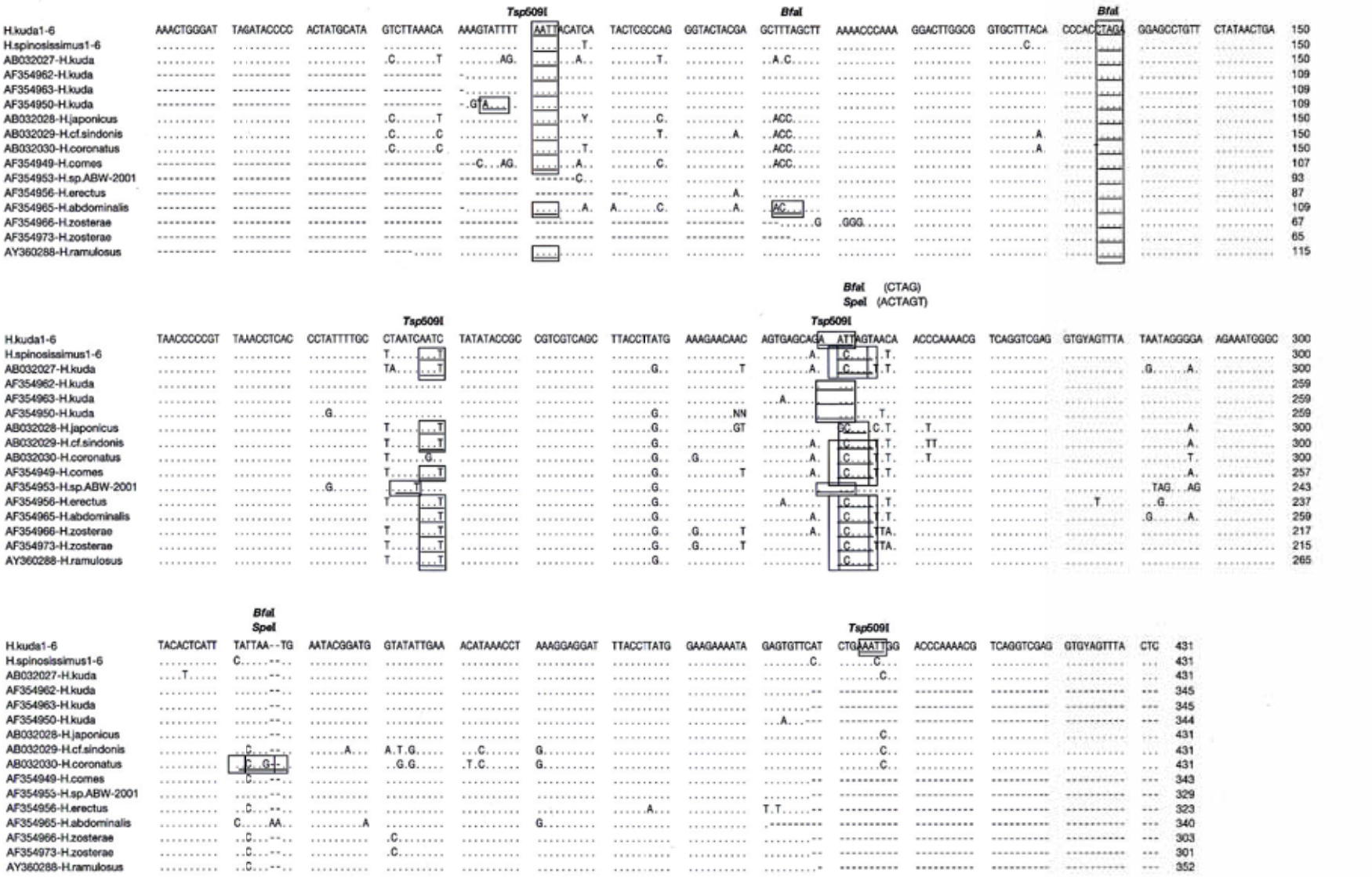
## ผลและอภิปรายผลการทดลอง

จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม ชนิดละ 6 ตัวอย่าง ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA และคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 16S rRNA ซึ่งตำแหน่งยีนทั้งสองอยู่บนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดประมาณ 430, 990 และ 620 ตามลำดับคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ ซึ่งม้าน้ำทั้งสอง ชนิดให้ผลผลิตขนาดเดียวกัน (ภาพที่ 1) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งสามคู่นี้ อ้างอิงมาจากงานวิจัยของ Wilson และคณะ (2001) ที่รายงานเพียงจำนวนของลำดับเบสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ของ 12S และ 16S rRNA ที่มีจำนวน 339 และ 497 คู่เบส ตามลำดับ โดยไม่ได้รายงานขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสามคู่

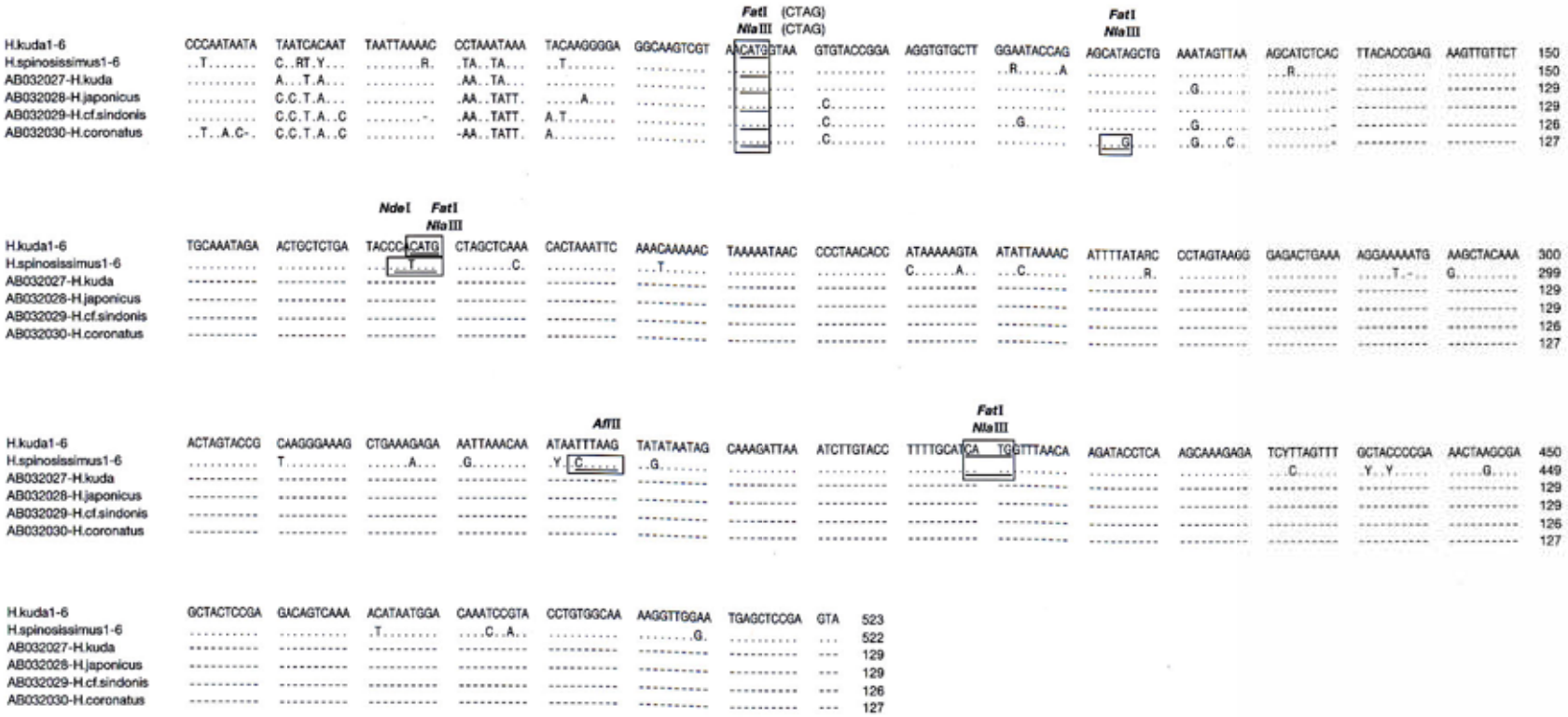
เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทั้งหมดไปหาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบความเหมือน แล้วทำการปรับแต่งจนได้เป็นลำดับเบสที่สมบูรณ์ พร้อมแสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ยกเว้นลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ซึ่งมีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดใหญ่ ทำให้บริเวณปลายของลำดับเบสในส่วนตำแหน่งจับโดยไพรเมอร์ H2001 ไม่ชัดเจน จึงสามารถรายงานลำดับเบสได้เพียง 954 และ 953 คู่เบส ของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม ตามลำดับ (ภาพที่ 3) สำหรับคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 สามารถตรวจสอบลำดับเบสได้เท่ากัน ทั้งในม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม คือ 431 คู่เบส (ภาพที่ 2) เมื่อพิจารณาผลของลำดับเบสที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ทำให้พบว่า ลำดับเบสของตำแหน่งจับโดยไพรเมอร์ H1478 (5′-GAGGGTG ACGGGCGGTGTGT-3′) มีการเปลี่ยนแปลง 1 ตำแหน่ง เป็น GAGAGTGACGGGCGGTGTGT (ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้) แต่ตำแหน่งดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์เนื่องจากมีเพียงตำแหน่งเดียว และไม่ได้อยู่ในตำแหน่งปลาย 3′ ที่จะส่งผลต่อการต่อสาย ส่วนผลลำดับเบสที่ได้ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 แสดงในภาพที่ 2 และ 3

สำหรับผลผลิตพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนาม สามารถตรวจสอบลำดับเบส ได้เท่ากับ 617 และ 620 ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เมื่อพิจารณาลำดับเบสระหว่างตัวอย่างม้าน้ำภายในชนิดเดียวกัน พบว่าม้าน้ำหนามตัวอย่างที่ 3 แตกต่างจากม้าน้ำหนามตัวอย่างอื่น โดยมีลำดับเบสในตำแหน่งที่ 266 เปลี่ยนจาก A ไปเป็น G ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลต่อการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตรวจสอบได้ คือ *Bfa*I (ภาพที่ 4)

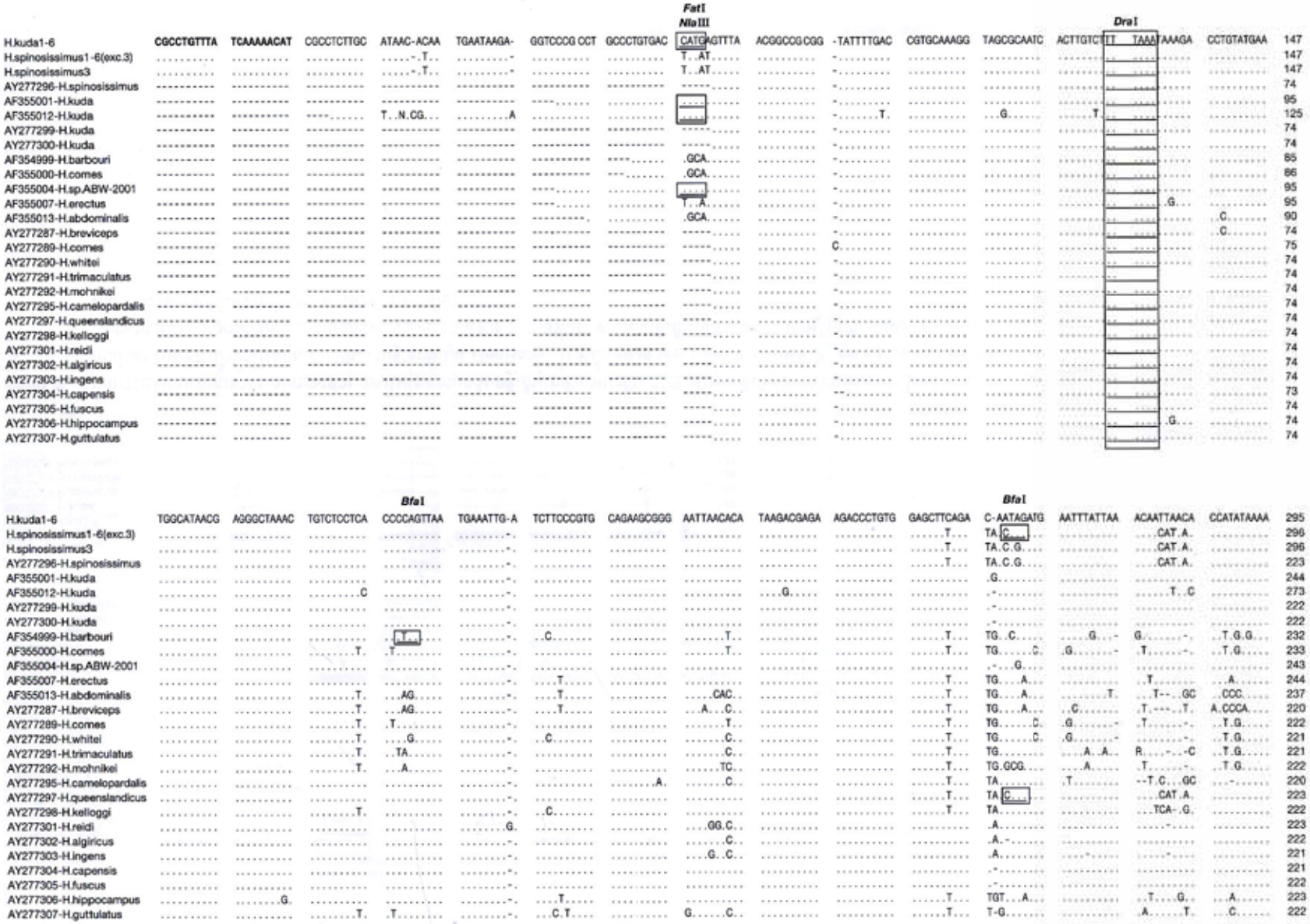
เมื่อนำข้อมูลของลำดับเบสที่ได้ของม้าน้ำดำจากตำแหน่งยีนทั้ง 12S rRNA และ 16S rRNA ไปตรวจสอบความเหมือน หรือการซ้ำกันของลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank โดยการใช้โปรแกรม blastn พบว่าได้ข้อมูลของม้าน้ำอีกหลายชนิด และพบข้อมูลของม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนามในตำแหน่งยีน 16S rRNA ส่วนตำแหน่งยีน 12S rRNA พบเพียงม้าน้ำดำ เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมา align และทำการตรวจสอบตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอาศัยโปรแกรมประยุกต์ Restriction Mapping Utility ที่มีอยู่ในโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.1 (Hall, 1999) สามารถวิเคราะห์ และแสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 2, 3 และ 4) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่วิเคราะห์นี้เป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 ตำแหน่ง และมีตำแหน่งจดจำที่จำเพาะซึ่งไม่มีเบสอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องอยู่ภายใน จากภาพที่ 2 ซึ่งเป็นตำแหน่งยีน 12S rRNA ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 แสดงตำแหน่งตัด



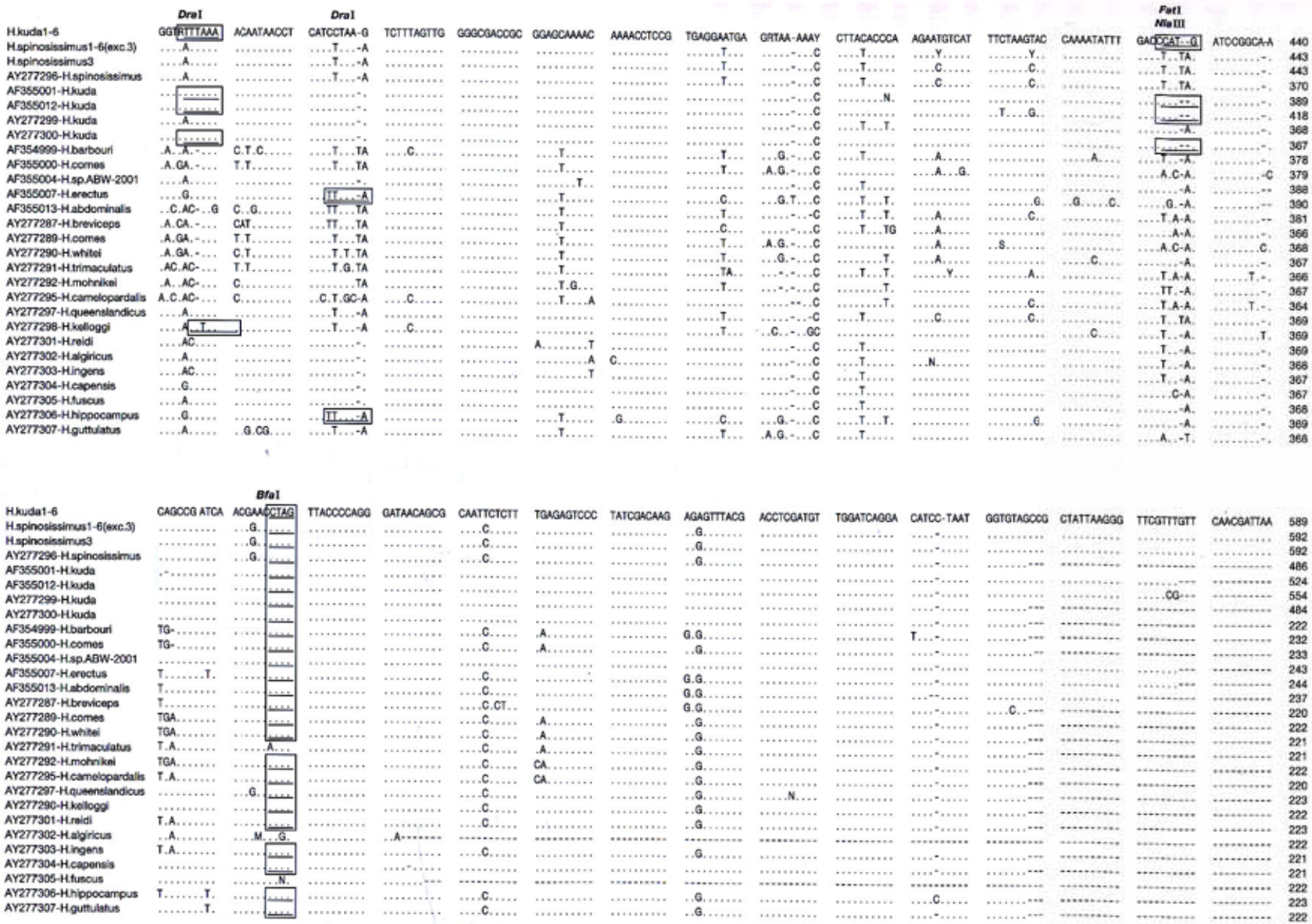

**ภาพที่ 2** ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 ของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม กับลำดับเบสของม้าน้ำในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงเป็นตัวทึบ จุด (.) แสดงเบสที่เหมือนกับดีเอ็นเอสายแรก การแทนที่เบส (substitution: transitions and transverstions) แสดงด้วยเบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอสายแรก สำหรับบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดแสดงด้วยการขีดเส้นใต้ และจำนวนเบสที่วิเคราะห์แสดงตัวเลขด้านขวามือ




**ภาพที่ 3** ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 ของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม กับลำดับเบสของม้าน้ำในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล GenBank ในที่นี้แสดงลำดับเบสต่อจากภาพที่ 2 จุด (.) แสดงเบสที่เหมือนกับดีเอ็นเอสายแรก การแทนที่เบส (substitution: transitions and transverstions) แสดงด้วยเบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอสายแรก สำหรับบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดแสดงด้วยการขีดเส้นใต้ และจำนวนเบสที่วิเคราะห์แสดงตัวเลขด้านขวามือ




**ภาพที่ 4** ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 16S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มขยายโดยไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 ของม้าน้ำดำและม้าน้ำหนาม กับลำดับเบสของม้าน้ำในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งตำแหน่งของไพรเมอร์แสดงเป็นตัวทึบ จุด (.) แสดงเบสที่เหมือนกับ ดีเอ็นเอสายแรก การแทนที่เบส (substitution: transitions and transverstions) แสดงด้วยเบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอสายแรก สำหรับบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดแสดงด้วยการขีดเส้นใต้ และจำนวนเบสที่วิเคราะห์แสดงตัวเลขด้านขวามือ

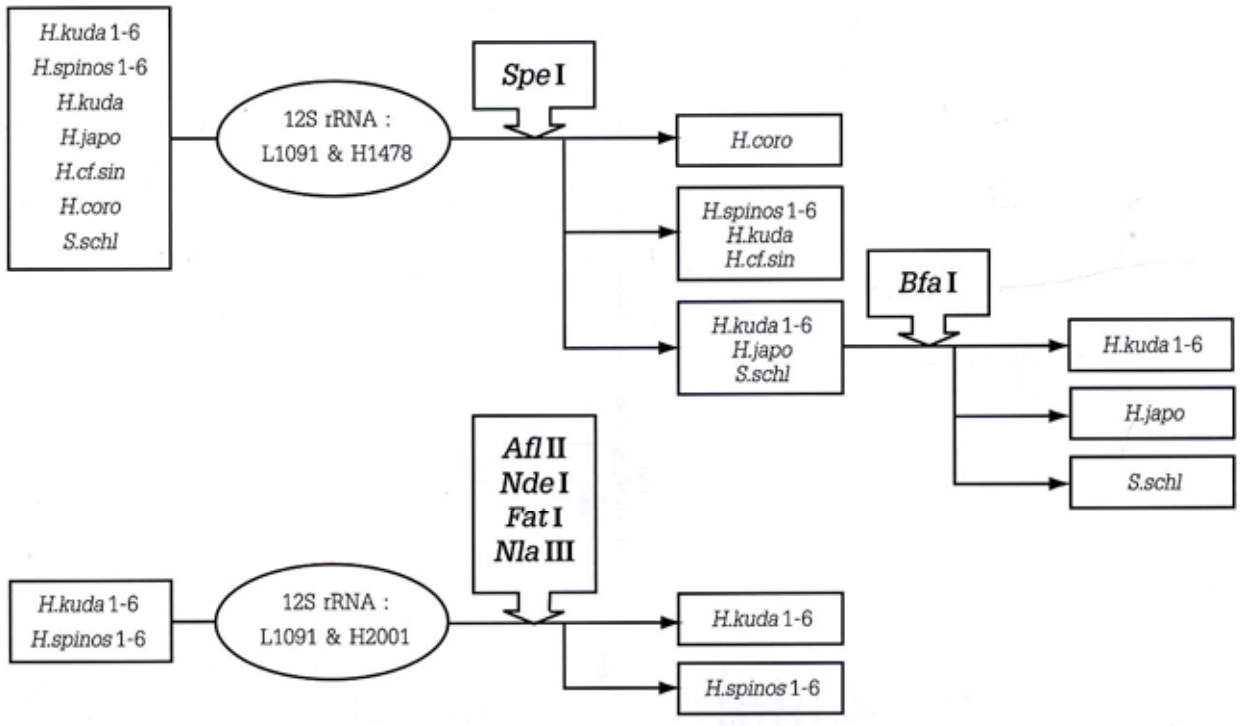



**ภาพที่ 4** (ต่อ)

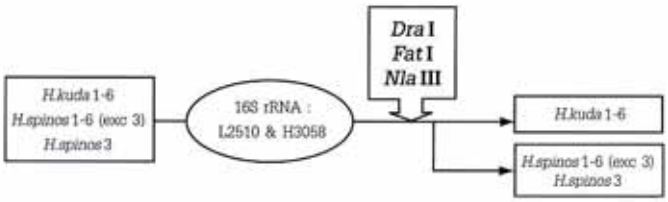
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| H.kuda1-6 | AGTCCTACGT | GATCTGAGTT | CAGACCGG | 617 |
| H.spinosissimus1-6(exc.3) | ..... | ..... | ..... | 620 |
| H.spinosissimus3 | ..... | ..... | ..... | 620 |
| AY277296-H.spinosissimus | ..... | ..... | ..... | 486 |
| AF355001-H.kuda | ..... | ..... | ..... | 524 |
| AF355012-H.kuda | ..... | ..... | ..... | 554 |
| AY277299-H.kuda | ..... | ..... | ..... | 484 |
| AY277300-H.kuda | ..... | ..... | ..... | 483 |
| AF354999-H.barbouri | ..... | ..... | ..... | 493 |
| AF355000-H.comes | ..... | ..... | ..... | 495 |
| AF355004-H.sp.ABW-2001 | ..... | ..... | ..... | 524 |
| AF355007-H.erectus | ..... | ..... | ..... | 526 |
| AF355013-H.abdominalis | ..... | ..... | ..... | 509 |
| AY277287-H.breviceps | ..... | ..... | ..... | 482 |
| AY277289-H.comes | ..... | ..... | ..... | 484 |
| AY277290-H.whitei | ..... | ..... | ..... | 483 |
| AY277291-H.trimaculatus | ..... | ..... | ..... | 482 |
| AY277292-H.mohnikei | ..... | ..... | ..... | 483 |
| AY277295-H.camelopardalis | ..... | ..... | ..... | 480 |
| AY277297-H.queenslandicus | ..... | ..... | ..... | 485 |
| AY277298-H.kelloggi | ..... | ..... | ..... | 485 |
| AY277301-H.reidi | ..... | ..... | ..... | 485 |
| AY277302-H.algiricus | ..... | ..... | ..... | 401 |
| AY277303-H.ingens | ..... | ..... | ..... | 483 |
| AY277304-H.capensis | ..... | ..... | ..... | 482 |
| AY277305-H.fuscus | ..... | ..... | ..... | 405 |
| AY277306-H.hippocampus | ..... | ..... | ..... | 486 |
| AY277307-H.guttulatus | ..... | ..... | ..... | 484 |

**ภาพที่ 4** (ต่อ)

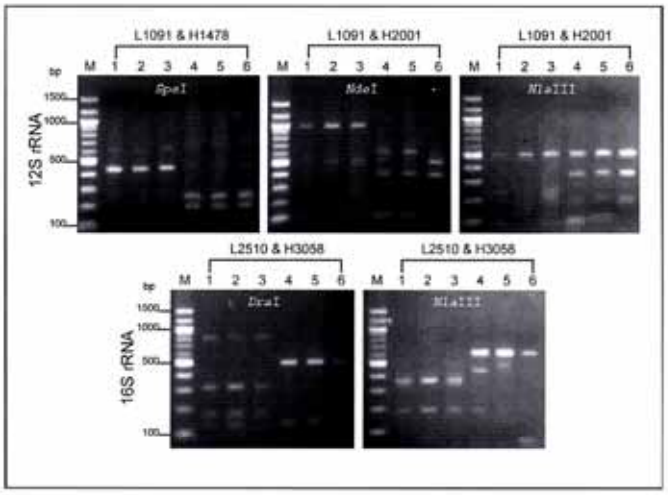
ของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสิ้น 3 ชนิด คือ *Bfa*I, *Spe*I และ *Tsp* 509I และเมื่อเลือกเฉพาะตัวอย่างที่มีลำดับเบสครบถ้วน เช่นเดียวกับม้าน้ำดำ และม้าน้ำหนามที่ทำการทดลอง พบว่าสามารถแสดงแผนผังการบ่งชี้ชนิด โดยอาศัยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Bfa*I และ *Spe*I เนื่องจาก *Tsp* 509I มีตำแหน่งตัดที่อยู่ในบริเวณที่ไม่มีลำดับเบสของหลายตัวอย่าง ดังนั้นสามารถสรุปแผนภูมิการแยกชนิดม้าน้ำตามแผนผังที่แสดงในภาพที่ 5 หากต้องการแยกม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามที่ทำการทดลองออกจากกัน ก็สามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์ *Spe*I ตัดผลผลิตพีซีอาร์ของคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 (ภาพที่ 7) แต่จากแผนผังในภาพที่ 5 จะพบว่ามีตัวอย่างของม้าน้ำดำที่ได้จากฐานข้อมูลให้ผลเช่นเดียวกับม้าน้ำหนาม แสดงว่าผลการจำแนกม้าน้ำสองชนิดนี้ออกจากกันอาจให้ผลที่ผิดพลาดได้ สำหรับผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H2001 จะแสดงให้เห็นการจำแนกม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามโดยการใช้เอนไซม์ *Afl*II, *Nde*I, *Fat*I และ *Nla*III (*Fat*I กับ *Nla*III มีลำดับเบสที่ตำแหน่งจดจำแบบเดียวกัน) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ ไม่แสดงตำแหน่งตัดบนผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 (ภาพที่ 2 และ 3) แต่เนื่องจากตัวอย่าง




**ภาพที่ 5** แผนผังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอตำแหน่งยีน 12S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478 และ L1091 กับ H2001




**ภาพที่ 6** แผนผังแสดงการจำแนกสปีชีส์ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ตำแหน่งยีน 16S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058




**ภาพที่ 7** แบบแผนอาร์เอฟแอลพีของผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*) โดยคู่ไพรเมอร์ L1091 กับ H1478, L1091 กับ H2001 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 12S rRNA และ L2510 กับ H3058 ที่จำเพาะกับตำแหน่งยีน 16S rRNA โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 3 คือ ม้าน้ำดำ และตัวอย่างหมายเลข 4 ถึง 6 คือ ม้าน้ำหนาม

ลำดับเบสของม้าน้ำชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank มีจำนวนน้อยกว่าลำดับเบสของไพรเมอร์คู่นี้ ทำให้การเปรียบเทียบจากแผนผังในภาพที่ 5 จะทำเพียงม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามที่ทำการทดลองเท่านั้น ซึ่งผลจากแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์บางชนิด ได้แก่ *Nde*I และ *Nla* III ก็ให้ผลที่สามารถจำแนกม้าน้ำสองชนิดนี้ออกจากกันได้ (ภาพที่ 7)

**ตารางที่ 1** แบบแผนอาร์เอฟแอลพีของผลผลิตพีซีอาร์ของตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA ของตัวอย่างม้าน้ำดำ (*Hippocampus kuda*) และม้าน้ำหนาม (*H. spinosissimus*)

| ตำแหน่งยีน | คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ | เอนไซม์ตัดจำเพาะ | ผลที่คาดว่าจะได้ | | ผลที่คาดว่าจะได้ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ม้าน้ำดำ | ม้าน้ำหนาม | ม้าน้ำดำ | ม้าน้ำหนาม |
| 12S rRNA | L1091 & H1478 | *Spe*I | 431 | 242<br>189 | 430 | 240<br>190 |
| | L1091 & H2001* | *Nde*I | 990 | 608<br>382 | 990 | 600<br>390 |
| | | *Nla*III | 498<br>212<br>166<br>114 | 498<br>325<br>167 | 490<br>210<br>180<br>110 | 490<br>320<br>180 |
| 16S rRNA | L2510 & H3058 | *Dra*I | 314<br>174<br>129 | 491<br>129 | 320<br>180<br>120 | 500<br>120 |
| | | *Nla*III | 359<br>185<br>73 | 620 | 350<br>190<br>80 | 620 |

*ลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจสอบได้ไม่สมบูรณ์ จึงนำขนาดผลผลิตพีซีอาร์จากการทดลองมาใช้

ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ของตำแหน่งยีน 16S rRNA โดยคู่ไพรเมอร์ L2510 กับ H3058 จากการวิเคราะห์ตำแหน่งตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพที่ 4) พบว่าเอนไซม์ *Bfa*I สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างภายในชนิดของม้าน้ำหนามได้ ดังนั้นจึงไม่นำมาพิจารณา จึงพบว่าการจำแนกม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนามสามารถทำได้โดยใช้เอนไซม์ *Dra*I, *Fat*I และ *Nla*III (ภาพที่ 6) และเมื่อทำการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Dra*I และ *Nla*III ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้แล้ว พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันคือ สามารถจำแนกม้าน้ำดำและม้าน้ำหนามออกจากกันได้ (ภาพที่ 7) ซึ่งสามารถสรุปผลการวิเคราะห์ด้วยแบบแผนอาร์เอฟแอลพีของตำแหน่ง 12S และ 16S rRNA ระหว่างม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนามของไพรเมอร์ทั้งสามคู่ได้ตามตารางที่ 1 ซึ่งแสดงผลที่คาดว่าจะได้จากการตรวจสอบลำดับเบส เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดลอง ซึ่งได้ค่าใกล้เคียงกัน

## สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบลำดับเบสบางส่วนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบนตำแหน่งยีน 12S และ 16S rRNA โดยอาศัยการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดบนลำดับเบสที่ได้ ซึ่งสามารถนำข้อมูลของลำดับเบสของม้าน้ำสกุลเดียวกันหรือชนิดเดียวกันที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบสำหรับการตัดสินใจเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อนำมาแสดงแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่ใช้ในการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำได้

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546 ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างม้าน้ำสำหรับการวิจัย ขอขอบคุณ คุณกรรณิการ์ ชวนประสิทธิ์กุล ที่ช่วยทำให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอขอบคุณ หน่วยบริการชีวภาพ (BSU: Bioservice Unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการตรวจหาลำดับเบสของผลิตผลพีซีอาร์

## เอกสารอ้างอิง

พิทักษ์ สูตรอนันต์ และเสาวภา สวัสดิ์พีระ. 2549. แบบแผนอาร์เอฟพีดีเพื่อการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำ 3 ชนิด (*Genus Hippocampus*). วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 11, 1: 71-77.

Barriga-Sosa, I.A., Pérez-Ramírez, M.Y., Soto-Aguirre, F., Castillo-Rivera, M. and Arredondo-Figueroa, J.L. 2005. Inter-specific variation of the mitochondrial *r16S* gene among silversides, "Peces Blancos", (Atherinopsidae: Menidiinae) and its utilization for species identification. *Aquaculture* 250: 637 - 651.

Carrera, E., Garcia, T. Céspedes, A. Gonzalez, I., Fernández, A., Hernández, P.E. and Martin, R. 1999. Salmon and trout analysis by PCR-RFLP for identity authentication. *Journal of Food Science* 64, 3: 410 - 413.

Casey, S. P., Hall, H. J., Stanley, H. F. and Vincent, A. C. J. 2003. The origin and evolution of seahorses (genus Hippocampus): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 261 - 272.

Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Yiswas, K.N., Shivakumar, B.M., Anand, M., Patel, M. and Sharma, B. 2005. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science* 70: 107 - 112.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser* 41: 95-98

Hoelzel, A. R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations*, 2nd., Oxford University Press, New York.

Ishizaki, S., Yokoyama, Y., Oshiro, N., Teruya, N., Nagashima, Y., Shiomi, K. and Watabe, S. 2005. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis

of a segment of the 16S rRNA gene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D.* Article in press.

Karaiskou, N., Triantafyllidis, A., Margaroni, M., Karatzas, D. And Triantaphyllidis, C. A. 2005. A double DNA approach for identifying *Macrorhamphosus scolopax* (Pisces, Centriscidae). *ICES Journal of Marine Science* 62: 1683 - 1690.

Kocher, T.D., Thomas,W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. and Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 86: 6196 - 6200.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Teske, P. R., Cherry, M. I. and Matthee, C. A. 2003. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: Hippocampus): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 273 - 286.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, submitted, June 1994.

Wilson, A. B., Vincent, A., Ahnesjö, I., and Meyer, A. 2001. Male Pregnancy in Seahorses and Pipefishes (Family Syngnathidae): Rapid Diversification of Paternal Brood Pouch Morphology Inferred From a Molecular Phylogeny. *J Hered* 92: 159-166.

Zhang, J., Huang, H., Cai, Z. and Huang, L.2006. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control* 17: 557 - 563.