แบบแผนอาร์เอพีดีเพื่อการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำ 3 ชนิด (Genus *Hippocampus*)

RAPD Patterns for Species Identification of Three Species of Seahorse (Genus *Hippocampus*)

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

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

Pitak Sootanan[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

แบบแผนอาร์เอพีดี (RAPD patterns) ที่ได้จากการเพิ่มขยายโดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี และอาศัยการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏร่วมกันของตัวอย่างภายในชนิดเดียวกันและปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากการตรวจสอบสอบไพรเมอร์จำนวน 53 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ให้แบบแผนอาร์เอพีดีที่จำเพาะกับชนิด และสามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำ 3 ชนิด ในสกุล *Hippocampus* คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* และม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)* ได้ มีเพียงบางไพรเมอร์ที่ให้ผลไม่เด่นชัด และจากข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ของแต่ละไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิด ก็สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อชนิดโดยอาศัยการตรวจสอบโดยเทคนิคพีซีอาร์ รวมถึงการนำข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของม้าน้ำต่อไปได้

คำสำคัญ : แบบแผนอาร์เอพีดี, การบ่งชี้ชนิด, ม้าน้ำ, *Hippocampus*

Abstract

The common bands of each sample within species and density of each common band of RAPD amplification were examined for the RAPD patterns. The result show that most of primer of 53 RAPD primers have species-specific patterns that can be used to identify three species of seahorse (Genus *Hippocampus*) such as the spotted seahorse *(Hippocampus kuda)*, the hedgehog seahorse *(H. spinosissimus)* and the three-spot seahorse *(H. trimaculatus)*, only a few primers was not clear. The species-specific bands of each primer can be applied to develop PCR technique for species-specific marker. Furthermore, this data can use as database for research of genetic population structure of seahorse.

Keywords : RAPD Patterns, Species Identification, Seahorse, *Hippocampus*

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

บทนำ

การบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้อนุกรมวิธานทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องการตัวอย่างที่มีความสมบูรณ์ และต้องเป็นตัวอย่างที่โตเต็มวัยแล้วเท่านั้น จึงสามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน หากตัวอย่างที่ต้องการพิสูจน์ชนิดเป็นเพียงเศษชิ้นเนื้อ หรือเป็นตัวอย่างที่ยังอยู่ในวัยอ่อน ก็จะไม่สามารถบ่งชี้ชนิดได้ ซึ่งการบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิตสามารถเพิ่มความถูกต้องแม่นยำได้ ด้วยการอาศัยเทคนิคที่เกี่ยวกับ การตรวจสอบโปรตีน และดีเอ็นเอ (อ้างถึงโดย Partis และ Wells, 1996) วิธีการตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวกับโปรตีนนั้นมักใช้เทคนิคอัลโลไซม์ (allozymes) เป็นหลัก แต่ข้อมูลที่ได้จากเทคนิคที่กล่าวนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ เนื่องจากโปรตีนเหล่านี้สามารถสูญเสียสภาพธรรมชาติได้โดยง่าย โดยในแต่ละอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตต่างกันก็มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันได้ ถึงแม้จะได้มาจากตัวอย่างเดียวกัน

สำหรับเทคนิคที่อาศัยการตรวจสอบดีเอ็นเอ จะไม่ขึ้นกับคุณภาพของตัวอย่างในระดับเดียวกันกับการตรวจสอบโปรตีน (Martinez และ Yman, 1998) ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอนั้นประกอบไปด้วย การใช้โพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะกับชนิด การวิเคราะห์โดยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP:restriction fragment length polymorphism) ที่รวมถึงการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกเพิ่มขยายโดยเทคนิคพีซีอาร์ของชิ้นดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอหรือไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ การตรวจสอบความหลากหลายเชิงโครงรูปของชิ้นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ที่ถูกเพิ่มขยาย (SSCP: single strand conformation polymorphisms) และการวิเคราะห์โดยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: random amplification of polymorphic DNA)

แม้ว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะถูกสลายจนมีขนาดเล็ก แต่ก็สามารถนำมาตรวจสอบได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ที่ทำให้เกิดแบบแผนของแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จากการรายงาน โดย Dias Neto และคณะ (1994) อ้างถึงโดย Martinez และ Yman, 1998) เทคนิคอาร์เอพีดีได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับชนิด (species-specific genetic markers) และความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์เลี้ยง (Appa Rao และคณะ, 1996) การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว เพื่อการบ่งชี้ชนิดของสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Martinez และ Yman, 1998; Saez และคณะ, 2004) และแสดงให้เห็นถึงการนำแบบแผนอาร์เอพีดีมาใช้ เพื่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับการบ่งชี้ชนิดของหนู (González และคณะ 2002) รวมทั้งได้มีการนำมาใช้ ในการบ่งชี้ชนิดของปลาได้ (Partis และ Wells, 1996)

การทดลองนี้มีเป้าหมายเบื้องต้นในการแสดงแบบแผนอาร์เอพีดี และข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม เพื่อการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* จำนวน 3 ชนิด คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* และ ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างม้าน้ำ

ตัวอย่างของม้าน้ำทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ม้าน้ำดำ (*H. kuda;* n=4) ม้าน้ำหนาม (*H. spinosisimus;* n=4) และ ม้าน้ำสามจุด (*H. trimaculatus;* n=3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและยืนยันชนิดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยม้าน้ำดำจับได้จากบริเวณชายหาดบางแสน ส่วนม้าน้ำหนามและม้าน้ำสามจุด จับได้จากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร ทั้งสองบริเวณอยู่ในจังหวัดชลบุรี ม้าน้ำแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองจะประกอบไปด้วยม้าน้ำเพศผู้ (ตัวอย่างหมายเลข 1, 2, 5, 6 และ 9) และเพศเมีย (ตัวอย่างหมายเลข 3, 4, 7, 8, 10 และ 11)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างม้าน้ำ จะอาศัยเนื้อส่วนโคนหางของม้าน้ำที่ตัดออกมาจากตัวอย่างของม้าน้ำตัวเต็มวัย ซึ่งถูกแช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ในที่เย็นเป็นเวลานาน 2 ปี โดยนำเนื้อที่ได้ประมาณ 50 มิลลิกรัม มาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยกรรไกรและโกร่งบด แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Hoelzel (1998) โดยนำตัวอย่างที่ละเอียดเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM Tris; pH 7.5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% (w/v) SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเอนไซม์โปรตีเนส-เค (20 มิลลิกรัม/

มิลลิลิตร) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 7000 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนที่เป็นชั้นน้ำนำไปสกัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) แล้วตามด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24 : 1) ในปริมาตรเดียวกันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายชั้นบนมาเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท ปริมาตร 0.1 เท่า ก่อนที่จะเติมเอธานอลบริสุทธิ์ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ รอจนตะกอนแห้งจึงละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณโดยการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสของเจลอะกาโรสที่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/HindIII (BioLabs)

3. ไพรเมอร์อาร์เอพีดี

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี เป็นไพรเมอร์ขนาด 10 เบส ที่ออกแบบและผลิตโดย Operon Technologies (Alameda, CA, USA) จำนวน 53 ไพรเมอร์ ซึ่งอยู่ในชุดไพรเมอร์ OPA, OPB และ OPC จำนวน 19, 20 และ 14 ไพรเมอร์ ตามลำดับ โดยไพรเมอร์เหล่านี้เป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primers) ที่มีค่า GC content ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์อาร์เอพีดี และข้อมูลของแถบดีเอ็นเอของม้าน้ำทั้งสามชนิด

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (คู่เบส)			จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อชนิด* (จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด**)			จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน***
			ม้าน้ำดำ	ม้าน้ำหนาม	ม้าน้ำสามจุด	ม้าน้ำดำ^{ABC}	ม้าน้ำหนาม^{ABD}	ม้าน้ำสามจุด^{ACDA}	
1	OPA-01	CAG GCC CTT C	400 - 1200	380 - 920	640 - 1320	2 (7)	1 (4)	0 (6)	2^{C}, 3^{D}
2	OPA-02	TGCCGA GCT G	500 - 750	340 - 500	370 - 1580	0 (3)	1 (2)	5 (14)	1^{A}, 2^{C}
3	OPA-03	AGT CAG CCA C	530 - 1400	295 - 640	470 - 1400	0 (5)	2 (4)	2 (12)	1^{A}, 3^{C}, 1^{D}
4	OPA-04	AAT CGG GCT G	350 - 1300	350 - 1300	600 - 1110	2 (10)	0 (6)	0 (5)	2^{A}, 3^{B}, 1^{C}, 1^{D}
5	OPA-05	AGG GGT CTT G	420 - 1500	750 - 1640	750 - 1640	0 (3)	0 (5)	1 (10)	2^{C}, 4^{D}
6	OPA-06	GGT CCC TGA C	350 - 1530	700 - 1500	700 - 1660	1 (7)	1 (5)	3 (9)	2^{A}, 1^{B}, 1^{C}, 1^{D}
7	OPA-07	GAA ACG GGT G	620	620	510 - 1680	0 (1)	0 (1)	6 (12)	1^{A}
8	OPA-08	GTG ACG TAG G	510 - 650	730 - 1760	280 - 1450	1 (2)	2 (8)	5 (8)	2^{D}
9	OPA-09	GGG TAA CGC C	370 - 1630	680 - 980	260 - 1200	2 (8)	0 (3)	1 (7)	1^{A}, 4^{C}, 1^{D}
10	OPA-10	GTG ATC GCA G	480 - 1300	520 - 610	480 - 1380	0 (7)	1 (4)	0 (9)	1^{A}, 2^{C}, 1^{D}
11	OPA-11	CAA TGC CCG T	370 - 1560	470 - 1560	370 - 1620	0 (7)	0 (5)	2 (8)	2^{A}, 1^{B}, 2^{C}, 1^{D}
12	OPA-12	TCG GCG ATA G	610 - 790	700 - 930	1110 - 1540	0 (2)	0 (2)	4 (6)	0
13	OPA-13	CAG CAC CCA C	510 - 1160	410 - 1250	380 - 1700	0 (8)	0 (11)	6 (17)	1^{A}, 2^{B}, 1^{C}, 8^{D}
14	OPA-14	TCT GTG CTG G	520 - 1300	280 - 1500	490 - 1750	0 (10)	2 (9)	2 (9)	3^{A}, 3^{B}, 2^{C}
15	OPA-15	TTC CGA ACC C	400 - 700	300 - 1580	400 - 1650	0 (4)	5 (13)	1 (9)	1^{A}, 1^{B}, 1^{C}, 4^{D}
16	OPA-17	GAC CGC TTG T	350 - 1440	350 - 700	410 - 1600	3 (10)	1 (7)	4 (11)	1^{A}, 4^{B}, 1^{C}, 1^{D}
17	OPA-18	AGG TGA CCG T	340 - 1120	290 - 1390	340 - 1750	0 (12)	1 (5)	2 (14)	1^{A}, 1^{B}, 6^{C}
18	OPA-19	CAA ACG TCG G	-	330 - 980	330 - 1480	0 (0)	1 (6)	3 (10)	4^{D}
19	OPA-20	GTT GCG ATC C	680 - 1280	350 - 1330	750 - 1230	0 (9)	1 (7)	1 (5)	2^{A}, 3^{B}, 2^{C}
20	OPB-01	GTT TCG CTC C	390 - 1750	500 - 900	390 - 1750	0 (12)	1 (6)	1 (12)	3^{A}, 1^{B}, 5^{C}
21	OPB-02	TGA TCC CTG G	310 - 1480	750 - 820	310 - 1680	0 (4)	1 (2)	5 (11)	1^{A}, 1^{C}
22	OPB-03	CAT CCC CCT G	470 - 900	340 - 1140	310 - 1400	0 (5)	1 (3)	1 (9)	2^{C}, 2^{D}

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์อาร์เอพีดี และข้อมูลของแถบดีเอ็นเอของม้าน้ำทั้งสามชนิด

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (คู่เบส)			จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อชนิด* (จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด**)			จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน***
			ม้าน้ำดำ	ม้าน้ำหนาม	ม้าน้ำสามจุด	ม้าน้ำดำ^{ABC}	ม้าน้ำหนาม^{ABD}	ม้าน้ำสามจุด^{ACDA}	
23	OPB-04	GGA CTG GAG T	380 - 1300	730	310 - 1420	5 (14)	0 (1)	4 (12)	1^{A}, 6^{C}
24	OPB-05	TGC GCC CTT C	700 - 1450	700 - 1450	440 - 1580	0 (4)	0 (4)	4 (11)	2^{A}, 1^{D}
25	OPB-06	TGCTCT GCC C	320 - 1350	420 - 920	420 - 1180	1 (6)	0 (4)	1 (7)	1^{A}, 1^{B}, 1^{D}
26	OPB-07	GGT GAC GCA G	380 - 1700	570 - 1220	380 - 1350	0 (14)	0 (2)	1 (12)	1^{A}, 7^{C}, 1^{D}
27	OPB-08	GTC CAC ACG G	650 - 1000	680 - 1070	410 - 1300	0 (6)	0 (3)	2 (9)	1^{A}, 3^{C}, 2^{D}
28	OPB-09	TGG GGG ACT C	410 - 890	470 - 1080	550 - 1360	1 (4)	3 (4)	2 (4)	1^{B}
29	OPB-10	CTG CTG GGA C	390 - 1300	650 - 800	420 - 1040	1 (7)	0 (3)	6 (11)	1^{B}, 1^{C}, 2^{D}
30	OPB-11	GTA GAC CCG T	320 - 1180	250 - 960	200 - 1480	1 (8)	1 (6)	4 (11)	2^{B}, 2^{C}, 1^{C}
31	OPB-12	CCT TGA CGC A	390 - 1300	350 - 1680	290 - 1420	0 (5)	1 (6)	0 (11)	2^{C}
32	OPB-13	TTC CCC CGC T	960	-	710 - 770	0 (1)	0 (0)	1 (2)	0
33	OPB-14	TCC GCT CTG G	590 - 1200	390 - 1200	320 - 1700	0 (5)	0 (7)	3 (8)	3^{A}, 2^{B}
34	OPB-15	GGA GGG TGT T	400 - 1380	400 - 1400	370 - 1400	2 (14)	0 (7)	0 (11)	2^{A}, 2^{B}, 5^{C}, 3^{D}
35	OPB-16	TTT GCC CGG A	330 - 1108	550 - 1620	510 -1620	1 (9)	0 (6)	0 (8)	1^{A}, 2^{B}, 3^{C}, 1^{D}
36	OPB-17	CCA CAG CAG T	230 - 1500	330 - 770	440 - 1440	0 (14)	1 (7)	0 (11)	2^{A}, 3^{B}, 4^{C}
37	OPB-18	CCA CAG CAG T	240 - 1160	300 - 1220	300 - 1680	2 (12)	0 (9)	3 (13)	3^{A}, 3^{B}, 3^{C}, 3^{D}
38	OPB-19	ACC CCC GAA G	560 - 1100	350 - 1100	480 - 1480	0 (2)	1 (6)	1 (6)	1^{A}
39	OPB-20	GGA CCC TTA C	550 - 1520	590 - 1210	400 - 1460	1 (7)	1 (4)	1 (10)	1^{A}, 1^{C}, 1^{D}
40	OPC-01	TTC GAG CCA G	290 - 1500	1010 - 1500	240 - 1560	1 (12)	0 (3)	2 (14)	1^{A}, 8^{C}, 1^{D}
41	OPC-02	GTG AGG CGT C	630 - 960	630 - 1650	310 - 1400	0 (2)	2 (5)	2 (15)	2^{A}, 1^{D}
42	OPC-03	GGG GGT CTT T	250 - 1150	420 - 1250	440 - 1410	2 (5)	0 (5)	1 (4)	1^{C}, 1^{D}
43	OPC-04	CCG CAT CTA C	370 - 1020	550 - 1540	410 - 1470	3 (8)	1 (6)	3 (7)	1^{A}, 3^{B}, 1^{D}
44	OPC-05	GAT GAC CGC C	300 - 1480	620 - 1020	340 - 1300	2 (11)	0 (4)	0 (8)	1^{A}, 2^{C}, 1^{D}
45	OPC-06	GAA CGG ACT C	470 - 1500	1070 - 1440	340 - 1580	1 (7)	0 (4)	2 (12)	2^{A}, 2^{B}
46	OPC-07	GTC CCG ACG A	610 - 1720	1080	310 - 1520	3 (8)	0 (1)	1 (7)	1^{A}, 1^{C}
47	OPC-08	TGG ACC GGT G	390 - 980	480 - 1500	300 - 1630	0 (10)	0 (8)	2 (11)	1^{A}, 1^{B}, 4^{C}, 2^{D}
48	OPC-09	CTC ACC GTC C	400 - 1280	400 - 900	370 - 1500	0 (8)	0 (6)	1 (6)	3^{B}, 2^{C}
49	OPC-10	TGT CTG GGT G	360 - 1050	320 - 1050	290 - 1050	0 (7)	0 (7)	2 (10)	1^{A}, 2^{B}, 4^{C}
50	OPC-11	AAA GCT GCG G	360 - 1470	360 - 1450	420 - 1250	1 (15)	0 (12)	0 (7)	1^{A}, 4^{B}, 1^{C}, 2^{D}
51	OPC-12	TGT CAT CCC C	280 - 1150	380 - 1360	280 - 1360	1 (8)	0 (10)	1 (6)	3^{B}, 1^{C}, 1^{D}
52	OPC-13	AAG CCT CGT C	400 - 1250	400 - 1460	460 - 1650	1 (10)	0 (5)	2 (7)	4^{B}, 2^{C}
53	OPC-14	TGC GTG CTT G	440 - 1280	440 - 1150	440 - 1380	1 (6)	1 (7)	1 (8)	2^{A}, 2^{C}, 1^{D}

* จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อชนิด คือ จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในม้าน้ำชนิดอื่นเลย

** จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมด คือ จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทุกตัวอย่างจากม้าน้ำชนิดเดียวกัน

*** จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบร่วมกัน คือ จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ตัวอย่างต่างชนิดกันก็สามารถพบแถบดีเอ็นเอนั้นเป็นแถบดีเอ็นเอจำเพาะได้

ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{A} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ทั้ง 3 ชนิด

ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{B} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ระหว่างม้าน้ำดำ กับม้าน้ำหนาม

ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{C} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ระหว่างม้าน้ำดำ กับม้าน้ำสามจุด

ถ้าแสดงค่าเป็น 1^{D} แสดงว่า มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน 1 แถบ ระหว่างม้าน้ำหนาม กับม้าน้ำสามจุด

4. การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพรีเมอเรส

การเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ โดยการวิเคราะห์อาร์เอพีดี อาศัยการดัดแปลงข้อมูลจาก RAPD 10mer Kit Technical Information (QIAGEN, 2002) และทำปฏิกิริยาในเครื่อง Thermo Hybaid รุ่น Px2 โดยการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอในปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี 1 ไมโครลิตร (5 pmol), สารละลายบัฟเฟอร์ (*Taq* DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium Free: 100 mM Tris-Cl, pH 8.3; 500 mM KCl; 1% Triton® X-100) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 มิลลิโมลาร์ dNTP แต่ละชนิด อย่างละ 100 ไมโครโมลาร์ สารละลายดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega) จำนวน 0.5 ยูนิต แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพรีเมอเรส ภายใต้โปรแกรมจำนวน 45 รอบ ที่ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 36 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที

5. อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส

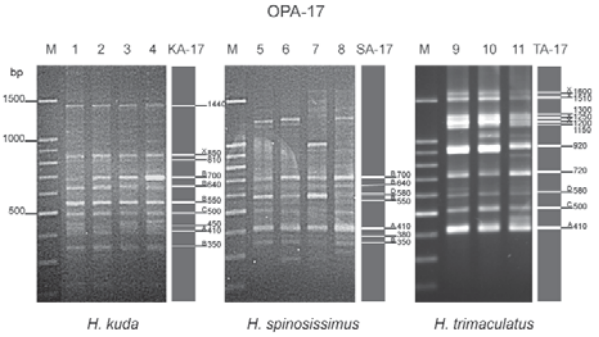
นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอ มาแยกขนาด โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (100bp DNA Ladder, Promega) ภายใต้อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส (15 X 10) ที่ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยใช้เวลาในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้บัฟเฟอร์ 1X TBE ประมาณ 1.5 ชั่วโมง ที่ 100 โวลต์/เซนติเมตร แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นำผลที่ได้มาตรวจสอบและถ่ายภาพโดยเครื่องถ่ายภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Gel document, SYNGENE)

6. การแสดงแบบแผนอาร์เอพีดี และการตรวจสอบข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ

จากผลภาพของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของม้าน้ำแต่ละชนิด นำมาสร้างแบบแผนอาร์เอพีดี โดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันในทุกตัวอย่างภายในชนิดเดียวกันที่มีความชัดเจน และทำซ้ำได้ มาแสดงเป็นแถบบาร์โค้ดที่มีความหนาบางของแถบแตกต่างกัน ขึ้นกับปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอ พร้อมบอกขนาดของแถบดีเอ็นเอเป็นคู่เบส โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส จากแบบแผนอาร์เอพีดีของแต่ละไพรเมอร์ นำมาตรวจสอบการปรากฏร่วมกันของแถบดีเอ็นเอกับม้าน้ำต่างชนิด โดยใช้สัญลักษณ์เป็น A, B, C, D และ X โดย A แทนการปรากฏร่วมกันของทั้งสามชนิด B แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนาม C แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำดำกับม้าน้ำสามจุด และ D แทนการปรากฏร่วมกันของม้าน้ำหนามกับม้าน้ำสามจุด สำหรับ X จะแทนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในบางตัวอย่างของชนิดอื่น แล้วนำข้อมูลที่ได้ของแต่ละไพรเมอร์ มาแสดงลงในตารางเพื่อแสดงข้อมูลที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อชนิด จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมดของแต่ละชนิด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

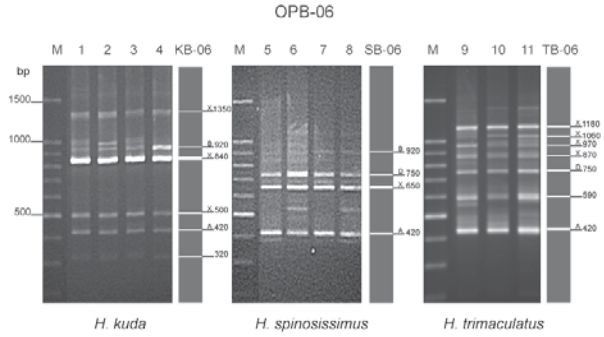
จากการตรวจสอบแบบแผนอาร์เอพีดีที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาอาร์เอพีดีของไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 53 ไพรเมอร์ของม้าน้ำสกุล *Hippocampus* จำนวน 3 ชนิด คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* และม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)* ซึ่งแบบแผนอาร์เอพีดีทั้งหมดที่ตรวจสอบสามารถทำซ้ำได้ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่าลักษณะของแบบแผนอาร์เอพีดีมีลักษณะจำเพาะในแต่ละชนิด โดยพิจารณาได้จาก แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันของทุกตัวอย่างในชนิดเดียวกัน และปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอเหล่านั้น โดยแสดงตัวอย่างของแบบแผนอาร์เอพีดีได้ดังภาพที่ 1, 2 และ 3 ที่เป็นผลจากไพรเมอร์ OPA-17, OPB-06 และ OPC-04 ตามลำดับ โดยแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้แต่ละชนิด จะแสดงเป็นแถบบาร์โค้ดที่มีความหนาบางของแถบแตกต่างกัน ขึ้นกับปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอ พร้อมบอกขนาดของแถบดีเอ็นเอเป็นคู่เบส โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ซึ่งกำหนดชื่อแบบแผนอาร์เอพีดี ตามชนิดของม้าน้ำและไพรเมอร์ที่ใช้ เช่น ม้าน้ำดำกับไพรเมอร์ OPA-17 ก็จะมีชื่อว่า KA-17 เป็นต้น (ภาพที่ 1) และในแต่ละภาพจะแสดงการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบว่าได้ปรากฏร่วมกันกันม้าน้ำชนิดอื่นหรือไม่ ข้อมูลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้ง 53 ไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 แบบแผนอาร์เอพีดี ที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ OPA-17 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ตัวอย่าง หมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)*

KA-17, SA-17 และ TA-17 คือ แบบแผนอาร์เอพีดีในรูปแบบบาร์โค้ดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุด ตามลำดับ ที่เกิดจากไพรเมอร์ OPA-17

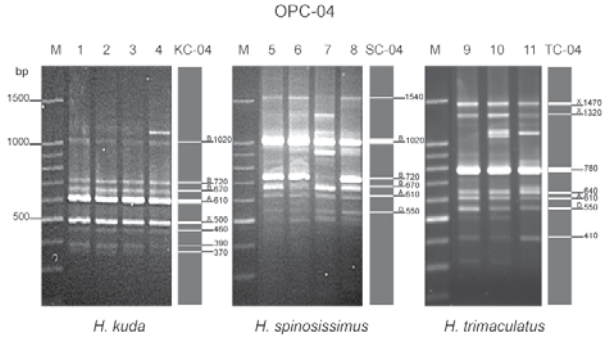


ภาพที่ 2 แบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ OPB-06 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ตัวอย่าง หมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)*

KB-06, SB-06 และ TB-06 คือ แบบแผนอาร์เอพีดี ในรูปแบบบาร์โค้ดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุด ตามลำดับ ที่เกิดจากไพรเมอร์ OPB-06

จากผลของแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากไพรเมอร์ โดยส่วนใหญ่พบว่า ผลเบื้องต้นสามารถนำมาใช้สำหรับการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำทั้งสามชนิดออกจากกันได้ เนื่องจากแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้มีความจำเพาะกับชนิด ดังตัวอย่างในภาพที่ 1, 2 และ 3 และจากข้อมูลงานวิจัยของ Martinez และ Yman (1998) ที่แสดงให้เห็นว่าแบบแผนอาร์เอพีดีนั้นมักจะจำเพาะกับชนิด (species-specific) โดยมีบางไพรเมอร์ที่ให้แบบแผนที่มีความหลากหลายสูงหรือโพลีมอร์ฟิคภายในชนิด (polymorphic patterns within a species) ในขณะที่บางไพรเมอร์ให้ความหลากหลายที่ต่ำหรือโมโนมอร์ฟิคภายในชนิด (monomorphic patterns within species) และมีเพียงไม่กี่ไพรเมอร์เท่านั้นที่ไม่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ หรือรูปแบบที่ทำซ้ำไม่ได้ ซึ่งในกรณีของการเลือกใช้ไพรเมอร์ เพื่อบ่งชี้ชนิดนั้น จะเลือกไพรเมอร์ให้ความหลากหลายที่ต่ำหรือโมโนมอร์ฟิคภายในชนิด นอกจากนั้นยังพบแถบดีเอ็นเอที่พบในบางตัวอย่างของแต่ละชนิดของม้าน้ำ (ภาพที่ 1, 2 และ 3) ซึ่งแถบดีเอ็นเอเหล่านี้แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของม้าน้ำแต่ละชนิด แต่ในการตรวจสอบเบื้องต้นนี้มีตัวอย่างน้อย จึงมุ่งเป้าไปที่ diagnostic markers ซึ่งถ้าจะให้มีความแน่นอนจะต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างในแต่ละชนิดให้มากกว่านี้



ภาพที่ 3 แบบแผนอาร์เอพีดี ที่ได้จากเพิ่มขยายดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ของตัวอย่างม้าน้ำ 3 ชนิด โดยไพรเมอร์ OPC-04 แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 4 คือ ม้าน้ำดำ *(H. kuda)* ตัวอย่าง หมายเลข 5 ถึง 8 คือ ม้าน้ำหนาม *(H. spinosissimus)* ตัวอย่างหมายเลข 9 ถึง 11 คือ ม้าน้ำสามจุด *(H. trimaculatus)*

KC-04, SC-04 และ TC-04 คือ แบบแผนอาร์เอพีดี ในรูปแบบบาร์โค้ดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุดตามลำดับ ที่เกิดจากไพรเมอร์ OPC-04

จากการตรวจสอบข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากแบบแผนอาร์เอพีดีของทุกไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) คือช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อชนิด จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมดของแต่ละชนิด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกัน จะเห็นว่าช่วงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบนั้นอยู่ในช่วง 230 ถึง 1,760 คู่เบส จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะทั้งหมดที่ตรวจสอบ มีตั้งแต่ 0 ถึง 17 แถบ ซึ่งพบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของม้าน้ำดำ ม้าน้ำหนาม และม้าน้ำสามจุด เป็นจำนวนมากสุดเท่ากับ 5, 5 และ 6 แถบ ตามลำดับ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันของทั้งสามชนิด (A) พบมากสุด เท่ากับ 3 แถบ และระหว่างคู่ของชนิด ได้แก่ม้าน้ำดำกับม้าน้ำหนาม (B) ม้าน้ำดำกับม้าน้ำสามจุด (C) และ ม้าน้ำหนามกับม้าน้ำสามจุด (D) พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏร่วมกันมากสุดเท่ากับ 4, 8 และ 8 แถบ ตามลำดับ จากข้อมูลในตารางที่ 1 สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการบ่งชี้ชนิดของม้าน้ำทั้งสามชนิดได้ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เด่นชัดซึ่งจำเพาะต่อชนิด เช่นเดียวกับการบ่งชี้ชนิดของหนูทั้งสามชนิดในสกุล *Calomys* ที่อาศัยการปรากฏของแถบดีเอ็นเอร่วมกัน (common band) ของตัวอย่างชนิดเดียวกัน (González และคณะ, 2002) และจากข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาเครื่องหมาย SCAR (sequenced characterized amplified region markers) ที่แสดงความจำเพาะ ต่อชนิดของม้าน้ำมากขึ้น ซึ่งอาศัยวิธีการตรวจสอบโดยเทคนิค พีซีอาร์ โดยการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับชนิด และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับออกแบบไพรเมอร์ เพื่อนำมาสร้างเครื่องหมายที่จำเพาะกับม้าน้ำชนิดนั้นต่อไป (Dalla Valle และคณะ, 2002)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเป็นการบ่งชี้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการบ่งชี้ชนิดของตัวอย่างม้าน้ำทั้งสามชนิดได้ โดยอาศัยแบบแผนอาร์เอพีดีที่ได้จากไพรเมอร์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะกับแต่ละชนิด ถึงแม้จะมีไพรเมอร์บางส่วนที่ให้ผลไม่เด่นชัด ซึ่งการศึกษานี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นเพื่อการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมของม้าน้ำ ที่สามารถนำไปประยุกต์ในขั้นตอนต่อไป คือการสร้างเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการบ่งชี้ชนิด และการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546 ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างม้าน้ำสำหรับการวิจัย และขอขอบคุณ คุณกรรณิการ์ ชวนประสิทธิ์กุล และ คุณวนิดา อาสน์สถิต ที่ช่วยทำให้งานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Appa Rao K. B. C., Bhat K. V. and Totey S. M. 1996. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 13: 135 - 138.

Dalla Valle L., Zanella L., Belvedere P. and Colombo L. 2002. Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damselae* subsp. Piscicida (Vibrionaceae). *Aquaculture* 207: 187 - 202.

González Ittig R.E., Chiappero M.B., Blanco A., Provensal C. and Gardenal C.N. 2002. Accurate identification of three cryptic species of rodents of the genus *Calomys* using RAPD-PCR and mitDNA RFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 425 - 432.

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

Martinez I. and Yman I. M. 1998. Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International*, Vol. 31, No. 6 - 7: 459 - 466.

Partis L. and Wells R. J. 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes* 10: 435 - 441.

Saez R., Sanz Y. and Toldrá F. 2004. PCR-based fin gerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Science* 66: 659 - 665.