บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 ประชากร

เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาที่อยู่ในสกุล *Chitala* ที่พบในประเทศไทย 3 ชนิดคือ ปลากราย (*C. ornata*) ปลาตองลาย (*C. blanci*) และปลาสะตือ (*C. lopis*) และนำมาจำแนกชนิดปลาโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ธวัช ดอนสกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

4.2 วิธีดำเนินการวิจัยด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล

4.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) โดยใช้ DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany)

ย่อยเนื้อเยื่อปลาด้วย lysis buffer (ดูวิธีเตรียมที่ภาคผนวก ก) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปฏิบัติตามขั้นตอนในคู่มือที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

4.2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบีด้วยวิธีพีซีอาร์

การเตรียมสารผสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบี ปริมาตร 25 ไมโครลิตรต่อ 1 หลอดทดลอง ประกอบด้วย น้ำกลั่น 17.15 ไมโครลิตร 10X PCR Buffer (Invitrogen, U.S.A.) 2.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTP's mix 0.5 ไมโครลิตร 50 mM $MgCl_2$ 0.75 ไมโครลิตร 10 µM ไพรเมอร์ L และ 10 µM ไพรเมอร์ H (ตารางที่ 3) 1.25 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอต้นแบบ 1.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase 2.5 U/ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณไซโทโครมบีและไพรเมอร์ดัดแปลงจาก Brito *et al.* (1997) ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 94 °C 3 นาที หลังจากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 50 °C 2 นาที และ 72 °C 2 นาที ทำซ้ำ 30 รอบ อุณหภูมิสุดท้าย 72 °C 15 นาที จากนั้นตรวจสอบขนาดของบริเวณยีนไซโทโครมบีที่เพิ่มปริมาณได้ (ประมาณ 1,140 คู่เบส) ด้วยกระแสไฟฟ้า

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (Brito *et al.*, 1997)

ชื่อของไพรเมอร์	ลำดับเบส
ไพรเมอร์ L	5' AAT GAC TTG AAG AAC CAC CGT 3'
ไพรเมอร์ H	5' CTT TGG GAG TTG GGG GTG AGA 3'

- **การแยกขนาดสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า** (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989)

ตรวจสอบขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ โดยละลาย agarose gel 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน 1X TBE Buffer เทวุ้นที่ละลายดีแล้วลงถาดเตรียมแผ่นวุ้นที่มีหวีวางไว้ ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง ดึงหวีออกจากแผ่นวุ้นอย่างระมัดระวัง วางถาดลงในเครื่องให้กระแสไฟฟ้า เท 1X TBE Buffer ให้ท่วมแผ่นวุ้น ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอ 9 ไมโครลิตร กับ 10X BlueJuice Gel Loading Buffer (Invitrogen, U.S.A.) (65% (w/v) Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.3% (w/v) Bromophenol Blue) 1 ไมโครลิตร ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ใช้ Hyper Ladder II เป็น DNA marker มาตรฐานในการบ่งบอกขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้ หลังจากนั้นย้อมแผ่นวุ้นด้วยสารละลาย ethidium bromide และล้างสารละลายส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต และถ่ายรูป

4.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดออกจากแผ่นวุ้น

ใช้ชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในคู่มือที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

4.2.4 การเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอพาหะและนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989)

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองคือ pGEM-T Easy Vector (Promaga, U.S.A.) เตรียมโดยใส่ดีเอ็นเอพาหะ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตรในหลอดทดลอง เอนไซม์ไลเกส 1 ไมโครลิตร 2X Buffer

7.5 ไมโครลิตร ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ เก็บที่ 4 °C 16 ชั่วโมงหรือข้ามคืน

นำคอมพิเทนท์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue (Stratagene, U.S.A.) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย เซลล์ 150 ไมโครลิตรและ 80% กลีเซอรอล 50 ไมโครลิตร) ออกจาก Deep freeze -70 °C มาทิ้งให้ละลายบนน้ำแข็ง ดูด ligation mixture 15 ไมโครลิตร ที่ 4 °C ผสมลงในหลอดคอมพิเทนท์เซลล์ ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่น้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C 2 นาทีทันที และนำไปแช่น้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 20 นาที เติมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 1,000 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 2 ชั่วโมง ก่อนครบเวลาบ่มประมาณ 30 นาที ผสม IPTG (200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 6 ไมโครลิตร กับ X-gal (40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองใหม่ และดูดสารผสมหยดบนผิวอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ เกลี่ยทาให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน วางทิ้งให้แห้ง

เมื่อบ่มคอมพิเทนท์เซลล์ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำไปปั่นที่ 9,400 g 5 นาที ดูดอาหารเหลวด้านบนทิ้ง เหลือไว้ประมาณ 100 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์ในหลอดทดลองกระจาย แล้วดูดใส่บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar ที่มี IPTG และ X-gal จานละ 50 ไมโครลิตร เกลี่ยทาให้ทั่ว คว่ำลงและนำไปบ่มที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน และคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวนำไปตรวจสอบการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอพาหะกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ต่อไป

4.2.5 การตรวจสอบการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอพาหะกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989)

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยโคโลนีที่มีสีขาวขีดลงบนผิวอาหารแข็ง LB Agar ในจานเพาะเชื้อใบใหม่ เพื่อเก็บโคโลนีไว้ใช้อ้างอิงต่อไป คว่ำลงและนำไปบ่มที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อครบเวลา ใช้ปลายไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อที่ลากไว้มาเล็กน้อยใส่ลงในอาหารเหลว 5 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

แบ่งเชื้อในอาหารเหลว 1.5 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้เพื่อนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป) ปั่นที่ความเร็ว 16,800 g 3 นาที ดูดเอาส่วนที่เป็นอาหารเหลวออกจนหมด ทำให้เซลล์กระจายด้วย GTE 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เติม 1% SDS/ 0.2 N NaOH (น้ำกลั่น 140 ไมโครลิตร 1N NaOH 40 ไมโครลิตร และ 10% SDS 20 ไมโครลิตร) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม 5M KAc 150 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปแช่น้ำแข็ง

7 นาที นำไปปั่นแยกเศษเซลล์ออกที่ความเร็ว 16,800 g 3 นาที นำส่วนสารละลายใสใสในหลอดทดลองหลอดใหม่ (ทำซ้ำอีกครั้ง ถ้าสารละลายที่ได้ยังมีเศษเซลล์อยู่) เติมเอทานอลสัมบูรณ์ 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ที่ -70 °C 5 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 44,000 g 10 นาที ล้างพลาสมิดด้วย 70% เอทานอล ปั่นแยกอีกครั้ง 3 นาที ดูด 70% เอทานอลทิ้ง ปล่อย พลาสมิดให้แห้งที่ 55 °C ประมาณ 5 นาที ละลาย พลาสมิดด้วย TE 5 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 15 ไมโครลิตร

ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แทรกอยู่ในพลาสมิดโดยผสมพลาสมิด 8 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Eco*RI (15,000 Uต่อมิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร 10X Buffer 2 ไมโครลิตร RNase A (เจือจาง 1/10) 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นลง 5-10 วินาที บ่มที่ 37 °C 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น เลือกโคลนที่มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 1,140 คู่เบส นำไปสกัด พลาสมิดเพื่อส่งหาลำดับเบสต่อไป

4.2.6 การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดเพื่อศึกษาลำดับเบส

ใช้ชุดสกัดพลาสมิด Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในคู่มือที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ เมื่อได้พลาสมิดเป็นที่เรียบร้อย ส่งตัวอย่างพลาสมิดเพื่อศึกษาลำดับเบสโดยวิธี dideoxy chain termination โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer ที่บริษัท Macrogen Inc. (Republics of South Korea)

4.2.7 การวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกทรี

การวิเคราะห์ข้อมูลทางลำดับเบสดีเอ็นเอ ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่างๆ ดังนี้

4.2.7.1 Chromas (McCarthy, 2001)

เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบและเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอซึ่งได้จากกระบวนการหาลำดับเบส ข้อมูลลำดับเบสจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบ FASTA ไฟล์ ก่อนนำเข้าสู่โปรแกรม Clustal X

4.2.7.2 Clustal X (Thomson and Gibson, 2003)

เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอ (multiple alignment)

4.2.7.3 **PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods) version 4.0b10** (Swofford, 1998)

เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับการสร้างไฟโลเจเนติกทรี ซึ่งใช้หลักวิธีวิเคราะห์แบบ neighbor-joining และ maximum parsimony

4.3 วิธีดำเนินการวิจัยด้านเซลล์พันธุศาสตร์

4.3.1 การศึกษาโครโมโซมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (ดัดแปลงจาก เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และคณะ, 2547)

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (GIBCO BRL, U.S.A.) จำนวน 4 มิลลิลิตร ผสมยาปฏิชีวนะ 200 U Penicillin-Streptomycin 2 หยด เติม 20% Fetal Bovine Serum (FBS) 1 มิลลิลิตร เติม 5% ไฟโทฮีมแอกกลูตินิน (PHA) 100 มิลลิลิตร ทำให้ปลาหมดความรู้สึกชั่วคราวโดยใช้ความเย็นจากน้ำแข็ง ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 26 ซึ่งมี Heparin เจาะเลือดจากหัวใจ 0.2 มิลลิลิตร (ดูที่ภาคผนวก ข) ใส่ในอาหารที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันนำไปปมที่อุณหภูมิ 22-37 °C นาน 96 ชั่วโมง ก่อนครบเวลา 1 ชั่วโมง ตรึงโครโมโซมโดยเติม โคลชิซีนความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปใส่ตู้อบบ่มต่อจนกระทั่งครบเวลา ใช้ Pasteur pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์นำมาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1,300 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดอาหารด้านบนทิ้งไป เหลืออาหารและเซลล์ที่ก้นหลอดประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม 0.075 M KCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำกลับไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นนาน 10 นาที แล้วดูสารละลายส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยาคงสภาพคาร์นอย (กรดอะซิติก : เมทานอล 1: 3) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นจัดทีละหยดอย่างช้าๆ พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา นำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นนาน 10 นาที นำไปปั่นที่ 2,360 g เป็นเวลา 10 นาทีและดูดส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยครั้งสุดท้ายให้เหลือสารติดก้นหลอดประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้ Pasteur pipette หยดเซลล์ลงบนสไลด์ที่แช่เย็นแผ่นละ 1-2 หยด ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำมาย้อมด้วย 10% Giemsa เป็นเวลา 15-20 นาที โดยระหว่างย้อมให้นำไปตั้งไว้ในตู้เย็น นำสไลด์ขึ้นจากสีย้อมแล้วล้างสีที่เกินพอด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งในอากาศ นำไปตรวจหาโครโมโซมระยะเมทาเฟสด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า คัดเลือกเซลล์ที่กระจายดี เพื่อนำมาถ่ายรูปโครโมโซม

4.3.2 **การศึกษาโครโมโซมโดยวิธีกดให้แบน** (squash) (ดัดแปลงจาก Denton and Howell, 1969; Ramirez, 1980.)

ตัดขอบครีบหางปลากราย 3 ตัว และปลาตองลาย 1 ตัว ให้มีความกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลายโคลชิซีนที่มีความเข้มข้น 0.05% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตดูดสารละลายโคลชิซีน ออกเบาๆ จนหมด โดยไม่ถูกชิ้นส่วนครีบที่แช่ไว้ ล้างชิ้นส่วนครีบด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง หลังจากนั้นเติม 0.075 M KCl เพื่อให้เซลล์พองตัว ทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตดูดสารละลาย KCl ออก เติม 50% น้ำยาคงสภาพกรดอะซิติกลงไปแทนที่ ทิ้งไว้ 15-30 นาที เมื่อครบเวลา เปลี่ยนน้ำยาคงสภาพอีก 1 ครั้ง ใช้ปิเปตดูดออก ย้อมชิ้นส่วนครีบด้วย 2% อะซิโต-ออซีน เป็นเวลา 10 นาที ใช้ปากคีบคีบชิ้นส่วนครีบนำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ขูดเซลล์ครีบปลาด้วยใบมีดเบาๆ ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ปลายเข็มช่วยเขี่ยเศษเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ออก หยด 2% อะซิโต-ออซีน 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และนำไปวางระหว่างกระดาษกรอง ใช้ปลายยางลบหรือนิ้วมือกดลงบนกระดาษกรอง จนกระทั่งสีย้อมบนสไลด์ใส นำไปตรวจหาโครโมโซมระยะเมทาเฟสด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า คัดเลือกเซลล์ที่กระจายดี เพื่อนำมาถ่ายรูปโครโมโซม

ในกรณีที่ต้องการทดลองซ้ำในปลาตัวเดิม ควรปล่อยปลาไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้เซลล์ที่ครีบหางได้สร้างทดแทนขึ้นใหม่ แล้วจึงตัดหางส่วนที่งอกใหม่นั้นไปทำการทดลองต่อไป