การตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเพศในเต่าตนุ *Chelonia mydas*

นางสาวรุ่งนภา ผาสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-079-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T149815S2

DETECTION OF SEX SPECIFIC DNA FRAGMENT FROM GREEN TURTLE *Chelonia mydas*

Miss Rungnapha Phasuk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemmistry

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic year 1997

ISBN 974-639-079-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเพศในเต่าตนุ *Chelonia mydas*
โดย	นางสาวรุ่งนภา ผาสุข
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

รุ่งนภา ผาสุข: การตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเพศในเต่าตนุ *Chelonia mydas* (DETECTION OF SEX SPECIFIC DNA FRAGMENT FROM GREEN TURTLE, *Chelonia mydas*) อ. ที่ปรึกษา: อ. ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. ศิริพร สิทธิประณีต, 93 หน้า, ISBN 974-639-079-1

เพื่อหาวิธีการตรวจเพศของลูกเต่าตนุโดยลูกเต่าที่ผ่านการตรวจสอบยังคงมีชีวิตอยู่จึงทำการทดลองเพื่อหาชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเพศของเต่าตนุโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม 2 เทคนิค คือ RFLP (เซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน) และ PCR-based DNA fingerprinting ใช้ GATA repeats จำนวน 21 เบส ซึ่งเป็นลำดับเบสที่จำลองมาจากส่วน conserved sequence ใน Bkm sequence ซึ่งเป็น sex-specific sequence ในสัตว์หลายชนิดโดยพบอยู่เป็นจำนวนมากใน W และ Y โครโมโซม เป็นดีเอ็นเอติดตามในการทำเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชันและเป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์ในงาน PCR ถึงแม้ผลของเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชันในเต่าตนุที่ทราบเพศแล้วจะพบชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ คือ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 8.35 กิโลเบส เฉพาะดีเอ็นเอของเต่าตนุเพศผู้หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในลูกเต่าเพราะดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดของลูกเต่ามักแตกหักไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในงาน RFLP เมื่อใช้เทคนิค PCRโดยมี GATA repeats จำนวน 21 เบส เป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์พบว่าที่อุณหภูมิ annealing 49°C สามารถตรวจความแตกต่างระหว่างเพศได้โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบสในเพศผู้จางกว่าในเพศเมียอย่างชัดเจน เมื่อนำไปใช้ตรวจสอบเพศของลูกเต่าตนุ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นลูกเต่าที่เสียชีวิตระหว่างการอนุบาลและนำมาจำแนกเพศโดยการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของโกแนดส่วนกลุ่มที่สองเป็นลูกเต่าที่มีชีวิตซึ่งเพาะฟักโดยการควบคุมอุณหภูมิและคาดเดาเพศจากอุณหภูมิที่ใช้เพาะฟัก จากการศึกษาพบว่าผลการจำแนกเพศโดยใช้เทคนิค PCR ตรงกับผลการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อโกแนดร้อยละ 75 และผลการจำแนกเพศโดยใช้เทคนิค PCR ตรงกับเพศของลูกเต่าที่คาดไว้จากการกำหนดอุณหภูมิในการเพาะฟักร้อยละ 67 แสดงว่าเทคนิค PCR นี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจเพศได้โดยมีความถูกต้องเกินร้อยละ 50

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

#C726133 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: *Chelonia mydas*/temperature sex determination/Bkm sequence/GATA repeats
RUNGNAPHA PHASUK: DETECTION OF SEX SPECIFIC DNA FRAGMENT FROM GREEN TURTLE, *Chelonia mydas*. THESIS ADVISOR KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D. 93 pp. ISBN 974-639-079-1

To determine sex in juvenile green turtle, GATA repeats 21 mers modified from Bkm sequence was designed as DNA probe and DNA primer for Southern-blot hybridization and PCR-based DNA fingerprinting technique, respectively. Bkm sequence was a sex-specific sequence highly distributed on W or Y chromosome of various animal species. The results from Southern-blot hybridization showed the DNA fragment of 8.35 Kb from *Hae* III digested green turtle DNA was specific for male. However, this technique was not suitable for the sex determination in juvenile green turtles since the chromosomal DNA from blood was randomly sheared during the extraction. PCR with annealing of 49° C showed different band intensity of 2.29 Kb amplified DNA fragment. This fragment in male green turtle was significantly lower than those of females. The PCR technique was then used for determination of sex in 2 groups of juvenile green turtles. Group I was dead turtles which their sex was determined using histology of gonad and group II was living turtles hatching in control temperature to sex favorable condition for male or female development. The results of sex analysis by PCR were corresponded to those in group I and II with 75% and 67%, respectively. The result indicates that this PCR technique can be used to differentiate sex with over 50% precision.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ดิฉันขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง เป็นอย่างสูงที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้ความรู้ให้ความช่วยเหลือแนะนำ และให้โอกาสอันมีค่ายิ่งตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คอยให้ความรู้ คำแนะนำและคำปรึกษาที่เป็นประโยชน์เสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ ที่ให้ความกรุณาให้ความรู้และคำปรึกษาในส่วนของการศึกษาเนื้อเยื่อ และเป็นกรรมการในการสอบรวมทั้งให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณนาวาเอก วินัย กล่อมอินทร์ และผู้ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเต่าตนุจากสถานีอนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเล ฐานทัพเรือสัตหีบ จ.ชลบุรี, กองเรือภาคที่ 3 จ.พังงา รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณ นายกเทศมนตรีเทศบาลศรีราชา และเจ้าหน้าที่ศูนย์ชีววิทยาทางทะเล จ. ภูเก็ต ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์เต่าทะเลเกาะมันใน อ. แกลง จ. ระยอง สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี และ อ.แหลมผักเบี้ย จ.ประจวบคีรีขันธ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ในภาควิชาชีวเคมี ชีววิทยาและชีววิทยาทางทะเลที่ให้ความกรุณา ให้ความรู้ คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานต่างๆ ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณคุณสัมพันธ์ สุวรรณรัตน์เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาและคุณนพดล กิตนะ นักศึกษาปริญาโทชีววิทยาที่ให้คำปรึกษาแนะนำและเป็นพี่เลี้ยงในงานการศึกษาเนื้อเยื่อ

ขอขอบคุณคุณชวนชม มวลประสิทธิ์พร คุณสุรชัย ลีพิทักษ์รัตน์ คุณบัณฑิตย์ ชื่นอิ่ม คุณกิตติศักดิ์ ณีศะนันท์ คุณวริษา ตั้งจริงใจ คุณธนาพร วีระประดิษฐ์ศิลป์ คุณดวงพร สีหนันทวงศ์ และคุณณัฐนันท์ ภูศรี ที่คอยให้ความช่วยเหลือเอาใจใส่ และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณพ่อ แม่ และพี่ๆ ที่ให้ความรักเอาใจใส่ให้กำลังทรัพย์และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดเวลา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญรูป.....ฌ

สารบัญตาราง.....ฎ

คำย่อ.....ฐ

บทที่

1. บทนำ.....1

2. เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ เคมีภัณฑ์ และการเตรียมสาร.....16

2.1 เครื่องมือ.....16

2.2 วัสดุภัณฑ์.....18

2.3 เคมีภัณฑ์.....19

2.3.1 สารเคมี.....19

2.3.2 เอนไซม์.....19

2.3.3 Kits.....20

2.4 การเตรียมอุปกรณ์.....20

3 วิธีทดลอง.....21

3.1 การเพาะฟักไข่เต่าตนุแบบควบคุมอุณหภูมิ.....21

3.2 สถานที่เก็บตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อของเต่าตนุ.....22

3.2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด.....22

3.2.2 การเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ.....22

3.3 การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเต่าตนุ.....23

3.4 การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์.....24

3.4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ.....24

3.4.2 การย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี haematoxylin และ eosin.....25

3.4.3 การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของโกแนดลูกเต่าตนุภายใต้
กล้องจุลทรรศน์.....25

3.5 การทำเซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน เพื่อตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้
ระบุเพศ.....26

3.5.1 การย่อยโครโมโซมัลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....26

3.5.2 การแยกชิ้นดีเอ็นเอหลังย่อยด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....27

3.5.3 การถ่ายโอนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยจากอะกาโรสขึ้นสู่แผ่นไนลอน
เมมเบรน.....27

3.5.4 การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม.....28

3.5.5 การไฮบริไดเซชัน (hybridization) 29

3.5.6 การทำออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograph) 30

3.6 การทำ RAPD เพื่อหาชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ 31

3.6.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ.....31

3.6.2 การเตรียมดีเอ็นเอไพรเมอร์.....31

3.6.3 การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศในเต่าตนุโดยการทำ RAPD.....31

3.7 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าตนุ.....32

3.7.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าตนุ.....32

3.7.2 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ.....33

3.7.3 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์.....34

3.7.4 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยการใช้กระแสไฟฟ้า.....34

3.7.5 การคัดเชื้อที่มีดีเอ็นเอลูกผสม.....35

4. ผลการทดลอง.....36

4.1 การเพาะฟักไข่เต่าตนุแบบควบคุมอุณหภูมิ.....36

4.2 การเตรียมโครโมโซมดีเอ็นเอของเต่าตนุ.....37

4.3 การหาชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศในเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วด้วยเทคนิค เซาท์เทิร์นบลอทไฮบริไดเซชัน.....40

4.4 การตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้วด้วยวิธี RAPD.....45

4.5 ผลการทดสอบการตรวจเพศในลูกเต่าตนุด้วยการทำ RAPD 46

4.6 การจำแนกเพศของลูกเต่าตนุโดยศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของโกแนด 49

4.7 การศึกษาคุณสมบัติของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบส ที่ได้จาก PCR-RAPD 56

5. วิจารณ์ สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 58

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง 58

5.2 สรุปผลการทดลอง.....64

5.3 ข้อเสนอแนะ.....65

รายการอ้างอิง.....66

ภาคผนวก.....74

ประวัติผู้เขียน.....93

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. ลักษณะหางเต่าทะเล.....6

2. ลักษณะโครโมโซมของเต่าตนุ.....9

3. เทคนิคไฮบริไดเซชัน.....11

4. หลักการของเทคนิค PCR 14

5. โครโมโซมัลดีเอ็นเอที่เตรียมจากเม็ดเลือดของเต่าตนุ.....38

6. โครโมโซมัลดีเอ็นเอของลูกเต่าตนุที่เตรียมได้จากเซลล์กล้ามเนื้อตับและหัวใจ.....39

7. การไฮบริไดซ์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ด้วย ดีเอ็นเอติดตาม GATA repeat จำนวน 21 เบส 43

8. การไฮบริไดซ์ชิ้นดีเอ็นเอจากเต่าตนุที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3A I ด้วย ดีเอ็นเอติดตาม GATA repeat จำนวน 21 เบส.....44

9. ผลการทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 49 °C ของเต่าตนุตัวเต็มวัยที่ทราบเพศแล้ว 47

10. แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 49 °C ของลูกเต่าตนุ.....48

11. ลักษณะอัณฑะของลูกเต่าตนุเพศผู้.....51

12. ลักษณะรังไข่ของลูกเต่าตนุเพศเมีย.....52

13. ลักษณะโกแนดของลูกเต่าตนุที่ยังไม่สามารถระบุเพศได้.....53

14. ผลการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.29 กิโลเบสจากการทำ PCR ออกมาเชื่อมกับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy.....57

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อเต่าทะเลเปรียบเทียบกับเนื้อสัตว์อื่นๆ.....2

2. คุณค่าทางโภชนาการของไข่เต่าทะเลเปรียบเทียบกับไข่เป็ดและไข่ไก่ต่อฟอง.....2

3. ปริมาณมูลค่าและประเทศที่ไทยส่งออกกระดองเต่าทะเลระหว่างปี พ.ศ.2516-2521.....4

4. ค่า OD_{260}, OD_{280}, อัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} : ค่า OD_{280} และ ปริมาณของ โครโมโซมัลดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเต่าตนุ.....41

5. เพศของลูกเต่าที่คาดว่าจะได้จากการกำหนดอุณหภูมิเพาะฟักเทียบกับเพศที่จำแนกจากผล PCR.....54

6. เพศของลูกเต่าตนุจากการศึกษาลักษณะโกแนดเทียบกับเพศที่จำแนกจากผล PCR.....55

คำย่อ

^{0}C - องศาเซลเซียส

ATP - adenosine 5' triphosphate

Bkm - Banded krait minor satellite

BSA - bovine serum albumin

bp - เบสแพร์ (base pairs)

$CaCl_2$ - แคลเซียมคลอไรด์

dATP - deoxyadenosine triphosphate

dCTP - deoxycytosine triphosphate

dGTP -deoxyguanosine triphosphate

dTTP -deoxythymidine triphosphate

DNA - deoxyribonucleic acid

EDTA - disodium ethylene diamine tetraacetate.$2H_2O$

IPTG - isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

LB - Luria-Bertani medium

Kb - กิโลเบสแพร์ (10^3 base pairs)

M - โมลาร์

mg - มิลลิกรัม

ml - มิลลิลิตร

mM - มิลลิโมลาร์

NaCl -โซเดียมคลอไรด์

ng - นาโนกรัม

$MgCl_2$ - แมกนีเซียมคลอไรด์

NaOH -โซเดียมไฮดรอกไซด์

µl - ไมโครลิตร

µM - ไมโครโมลาร์

OD - optical density

PCR - polymerase chain reaction

PVP - polyvinyl pyrolidone

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

SDS - sodium dodecyl sulfate

X-gal - 5-bromo-4 chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

ZFY - Zinc finger gene