บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาจากผลิตภัณฑ์ซูชิ โดยซื้อจากร้านขายผลิตภัณฑ์ซูชิ ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี จากการสำรวจพบมีขายอยู่ใน 3 ตำบล ได้แก่ ตำบลจันทนิมิต ตำบลท่าช้าง และตำบลวัดใหม่ จำนวน 11 ร้าน ซึ่งเป็นร้านค้าประเภทร้านค้าแผงลอยในตลาด แผนกซุปเปอร์มาร์เก็ตในห้างสรรพสินค้า และร้านอาหารญี่ปุ่น โดยซื้อซูชิหน้าปลาที่ระบุว่าเป็นซูชิแซลมอนและทูน่า ชนิดละ 3-4 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 49 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1) โดยแต่ละตัวอย่างแยกบรรจุในถุงพลาสติกที่สะอาด ผนึกปากถุง และรักษาสภาพตัวอย่างโดยการแช่น้ำแข็งระหว่างการเดินทางเพื่อนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี โดยตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาจากผลิตภัณฑ์ซูชิแสดงดังภาพที่ 3.1 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) รักษาสภาพไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างไปสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดของซูชิ และรหัสตัวอย่าง

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของซูชิ	รหัสตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
แผนกซุปเปอร์มาร์เก็ต ห้างสรรพสินค้า A	ทูน่า	Tu-As-01, 02, 03, 04	4
	แซลมอน	Sal-As-01, 02, 03, 04	4
ร้านอาหารญี่ปุ่น ห้างสรรพสินค้า A	แซลมอน	Sal-Aj-01, 02, 03	3
ร้านอาหารญี่ปุ่น ห้างสรรพสินค้า B	แซลมอน	Sal-B-01, 02, 03	3
ร้านขายซูชิ ห้างสรรพสินค้า C	แซลมอน	Sal-C-01, 02, 03	3
ร้านอาหารญี่ปุ่น D	ทูน่า	Tu-D-01, 02, 03	3
	แซลมอน	Sal-D-01, 02, 03	3
ร้านอาหารญี่ปุ่น E	ทูน่า	Tu-E-01, 02, 03, 04, 05, 06	6
	แซลมอน	Sal-E-01, 02, 03	3
ร้านขายซูชิ ตลาดจตุจักร	แซลมอน	Sal-JJ-01, 02, 03, 04	4
ร้านขายซูชิ ตลาดน้ำพุ	แซลมอน	Sal-NP-01, 02, 03	3

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดของซูชิ และรหัสตัวอย่าง (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดของซูชิ	รหัสตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
ร้านขายซูชิ ตลาดเจริญสุข	แซลมอน	Sal-JS-01, 02, 03	3
ร้านขายซูชิ ตลาดเขาไร่ยา	แซลมอน	Sal-KY-01, 02, 03, 04	4
ร้านขายซูชิ ตลาดพึ่งจิตร	แซลมอน	Sal-PJ-01, 02, 03	3
รวมตัวอย่าง			**49**

หมายเหตุ: สัญลักษณ์ในรหัสตัวอย่างมีความหมาย ดังนี้ Sal = ปลาแซลมอน; Tu = ปลาทูน่า; As = แผนกซุปเปอร์มาร์เก็ต ห้างสรรพสินค้า A; Aj = ร้านอาหารญี่ปุ่น ห้างสรรพสินค้า A; B = ร้านอาหารญี่ปุ่น ห้างสรรพสินค้า B; C = ร้านขายซูชิ ห้างสรรพสินค้า C; D = ร้านอาหารญี่ปุ่น D; E = ร้านอาหารญี่ปุ่น E; JJ = ร้านขายซูชิ ตลาดจตุจักร; NP = ร้านขายซูชิ ตลาดน้ำพุ; JS = ร้านขายซูชิ ตลาดเจริญสุข; KY = ร้านขายซูชิ ตลาดเขาไร่ยา; PJ = ร้านขายซูชิ ตลาดพึ่งจิตร; 01-06 = ตัวอย่างที่ 1 ถึงตัวอย่างที่ 6;

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5 และ 1.5 ml
2. ปิเปต (Pipette)
3. ถุงมือ (Gloves)
4. ปากคีบ (Forceps)
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
8. เครื่องชั่งสาร (Balance)
9. เครื่องกวนสารเคมี (Hot Plate Stirrer)
10. เครื่องอุ่นสารในหลอดทดลอง (Heating Block Incubator)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycler)
12. ชุดแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าแบบแนวนอน (Electrophoresis Set)
13. ตู้แสงสีขาว และแสงอัลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet-visible Transilluminator)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

14. เครื่องถ่าย และวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)

15. นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)

16. กล้องถ่ายภาพ (Camera)

17. เครื่องดูด – จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto Pipette)

18. ปิเปต ทิป (Pipette tip)

สารเคมีในการทดลอง

1. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ

2. น้ำกลั่น (Distilled Water)

3. น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water)

4. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan) สำหรับทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

5. เอนไซม์ Proteinase K

6. สารละลาย 10x *Taq* buffer

7. สารละลาย 25 mM $MgCl_2$

8. 10 mM dNTP

9. 10 pmol Forward primer

10. 10 pmol Reverse primer

11. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

12. DNA template

13. ผงวุ้น Agarose

14. TBE (Tris-borate EDTA) Buffer

15. สารละลาย Red Safe

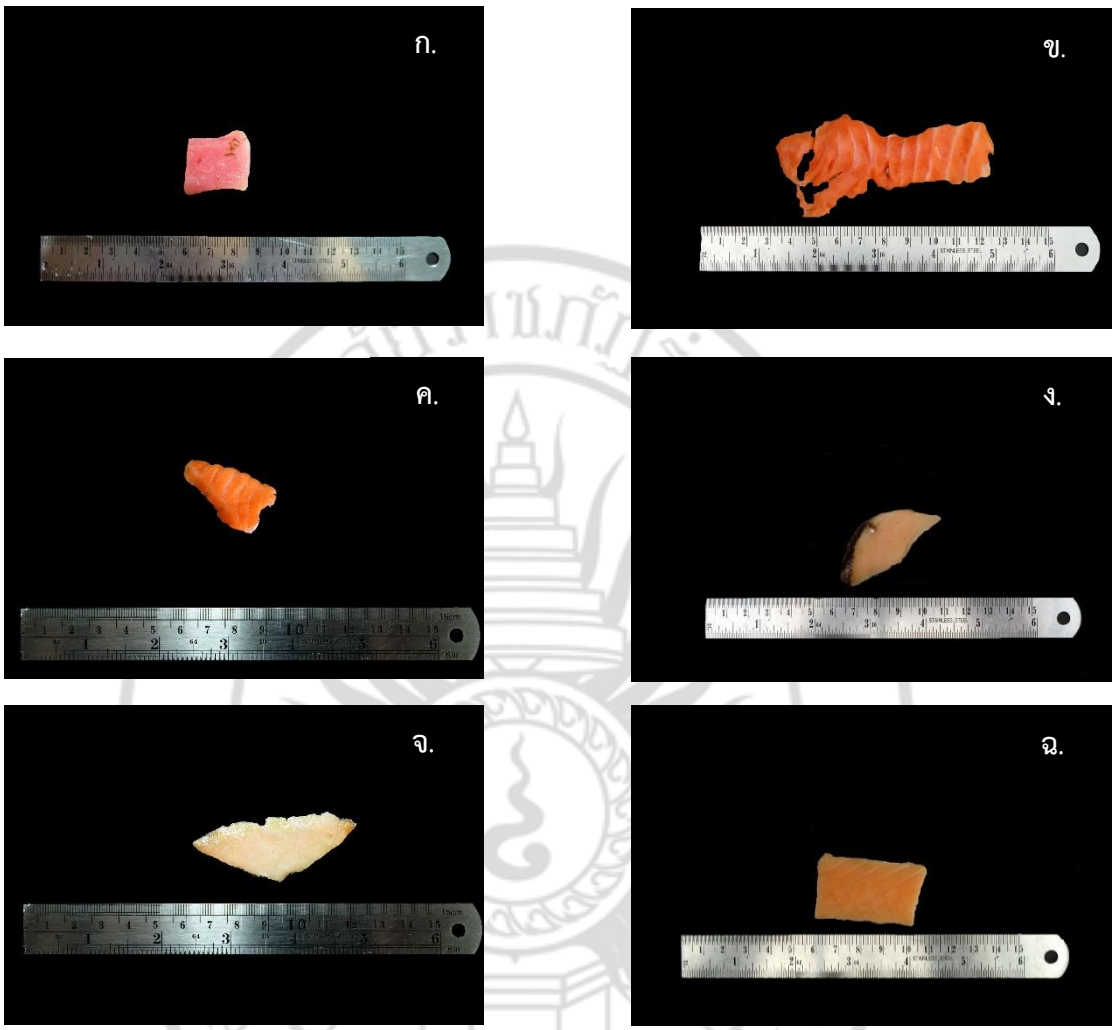
16. Ethidium Bromide

17. 100 bp Ladder (Biotechrabbit Gmbh, Germany)

18. Acetic Acid

19. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาจากผลิตภัณฑ์ซูชิ

ก. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาทูน่าจากแผนกซุปเปอร์มาร์เก็ต ห้างสรรพสินค้า A

ข. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากแผนกซุปเปอร์มาร์เก็ต ห้างสรรพสินค้า A

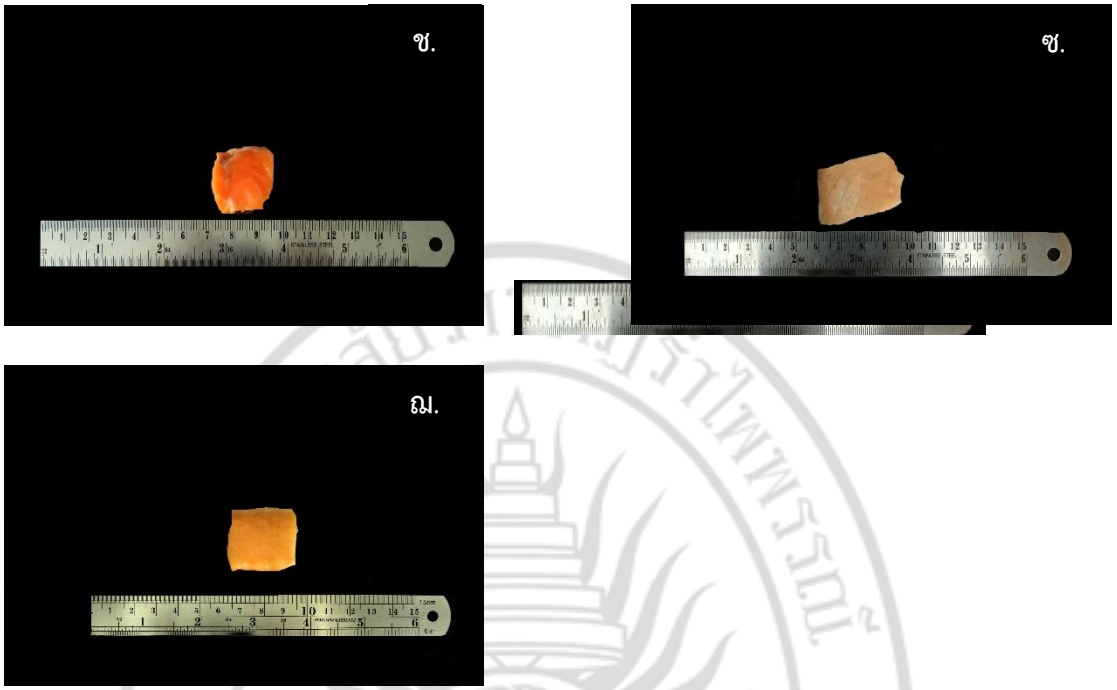
ค. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านอาหารญี่ปุ่น ห้างสรรพสินค้า B

ง. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านขายซูชิ ห้างสรรพสินค้า C

จ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านขายซูชิ ตลาดจตุจักร

ฉ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านขายซูชิ ตลาดน้ำพุ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาจากผลิตภัณฑ์ซูชิ (ต่อ)
ช. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านขายซูชิ ตลาดเจริญสุข
ซ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านขายซูชิ ตลาดเขาไร่ยา
ฌ. ตัวอย่างชิ้นเนื้อปลาแซลมอนจากร้านขายซูชิ ตลาดพึ่งจิตร

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อปลา

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อปลาจากผลิตภัณฑ์อาหารซูชิ โดยใช้เนื้อปลาปริมาณ 0.07 กรัม ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini kit (Flavogen, Taiwan) และดำเนินการสกัดตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัดทางการค้า มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของยีนไซโตโครม ออกซิเดส วัน (Cytochrome oxidase I; COI) ด้วยเทคนิค PCR โดยในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ (PCR mixture) ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Karinthanyakit, 2011) ดังนี้

น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่	30.9 ไมโครลิตร
10x *Taq* buffer	5.0 ไมโครลิตร
$MgCl_2$	4.0 ไมโครลิตร
25 mM dNTP	2.0 ไมโครลิตร
10 pmol Primer FishF1	0.8 ไมโครลิตร
10 pmol Primer FishR1	0.8 ไมโครลิตร
Taq DNA polymearase	0.5 ไมโครลิตร
DNA template	6.0 ไมโครลิตร

เมื่อเติมสารต่าง ๆ ลงในหลอดครบแล้ว ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาตร 6 ไมโครลิตร สำหรับหลอดที่ใช้ตรวจสอบสภาวะของ PCR ได้แก่ Negative control จะเติมน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร แทนสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่าง และ Positives control จะเติมดีเอ็นเอตัวอย่างที่เคยทำ PCR แล้ว ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ในการศึกษาครั้งนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI ในปลา ได้แก่ ไพรเมอร์ FishF1 และ FishR1 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดชิ้นส่วนประมาณ 700 คู่เบส (bp) (Ward et al., 2005) โดยมีลำดับเบสดังนี้

FishF1 5’ TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3’ (Forward primer)

FishR1 5’ TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3’ (Reverse primer)

สภาวะการทำงานของปฏิกิริยา PCR ที่ดัดแปลงจาก Ward และคณะ (2005) มีรายละเอียดดังนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	นาน	5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ	95 °C	นาน	30 วินาที	┐
Annealing	ที่อุณหภูมิ	45 °C	นาน	30 วินาที	├ 35 รอบ
Extension	ที่อุณหภูมิ	72 °C	นาน	1 นาที	┘
Final extention	ที่อุณหภูมิ	72 °C	นาน	10 นาที	

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนยีน COI ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบผลิตผลของ PCR (PCR product) ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis (ภาคผนวก ก)

การเตรียม PCR product ให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน COI จากปฏิกิริยา PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาทางการค้า GenepHlow™ Gel/PCR Kit เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนใน PCR product ที่ประกอบไปด้วย ไพร์เมอร์ เอนไซม์ dNTP DNA polymerase และเกลือ $MgCl_2$ จากนั้นนำ PCR product ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิคลีโอไทด์อัตโนมัติ

(Automated sequencer) ดำเนินการโดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ ไพรเมอร์ FishF1 และ FishR1

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อสร้างชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายสมบูรณ์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง โดยตรวจสอบลักษณะของกราฟโครมาโทแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Chromatogram) โดยใช้โปรแกรม MEGA V.6.0 (Tamura et al., 2013)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank และ BOLD

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Blast (Basic Local Alignment Search Tool) และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด BOLD (The Barcode of Life Data System) เพื่อตรวจหาชิ้นส่วนของยีน COI ในตัวอย่าง และตรวจสอบความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอจากตัวอย่างกับสิ่งมีชีวิต

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี