บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาโดยใช้วิธีการลงอวนและทอดแหในแม่น้ำจันทบุรี โดยมีจุดเก็บตัวอย่างจำนวน 4 จุด ได้แก่ จุดที่ 1 บริเวณสะพานบ้านน้ำรัก ตำบลท่าหลวง อำเภอมะขาม จุดที่ 2 บริเวณคลองบ้านแก้ว ตำบลท่าช้าง อำเภอเมือง จุดที่ 3 บริเวณสะพานกิจจานนท์ ตำบลเกาะขวาง อำเภอเมือง และจุดที่ 4 บริเวณสะพานเบญจมานุสรณ์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง โดยจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 4 จุด ที่เลือกในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเพราะสภาพพื้นที่ไม่ลาดชัน กระแสน้ำค่อนข้างนิ่ง ซึ่งเอื้ออำนวยให้ผู้วิจัยสามารถลงไปเก็บตัวอย่างได้ง่าย

ตัวอย่างปลาที่รวบรวมได้ รวมทั้งสิ้น 26 ชนิด นำมาแช่ในน้ำแข็งโดยทันที โดยปลาแต่ละตัวอย่างแยกบรรจุในถุงพลาสติกใสที่สะอาด ผนึกปากถุง แล้วแช่แข็งระหว่างการเดินทาง เพื่อนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี เพื่อนำมาถ่ายภาพและทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
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)
14. เครื่องถ่าย และวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)
15. นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
16. กล้องถ่ายภาพ (Camera)
17. เครื่องดูด – จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto Pipette)
18. ปิเปต ทิป (Pipette tip)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สารเคมีในการทดลอง ได้แก่ สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR การทำผลิตผล PCR ให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

1. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ
   1.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ
   1.2 เอนไซม์ Proteinase K
2. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR
   2.1 น้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water)
   2.2 สารละลาย 10X *Taq* buffer
   2.3 สารละลาย 25 mM $MgCl_2$
   2.4 10 mM dNTP
   2.5 10 pmol Forward primer
   2.6 10 pmol Reverse primer
   2.7 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Biotechrabbit Gmbh, Germany)
   2.8 DNA template
3. สารเคมีสำหรับการทำผลิตผล PCR ให้บริสุทธิ์
   3.1 ชุดน้ำยาสำเร็จรูป GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan)
4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis
   4.1 น้ำกลั่น (Distilled Water)
   4.2 ผงวุ้น Agarose
   4.3 0.5X TBE (Tris-borate EDTA) Buffer
   4.4 สารละลาย Red Safe
   4.5 100 bp DNA ladder (Biotechrabbit Gmbh, Germany)

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การตรวจสอบชนิดของปลาตัวอย่าง

จำแนกชนิดปลาตัวอย่างในเบื้องต้น โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้หนังสือสารานุกรมปลาไทยของ สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวช (2543 : หน้า 50-170) และ เอกสารงานวิจัยของ สิทธิพัฒน์ แผ้วฉ่ำ, สนธยา กูลกันยา และคณิสร ล้อมเมตตา (2551 : หน้า 1-60) รายละเอียดตัวอย่างปลาทั้ง 26 ตัวอย่าง ซึ่งจำแนกชนิดได้ 26 ชนิด แสดงดังตารางที่ 3.1

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของแต่ละตัวอย่าง โดยนำมาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสำหรับนำมาสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดตัวอย่างปลาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

รหัสตัวอย่าง	ชนิดของปลา	สถานที่เก็บตัวอย่าง
F-01	ปลาชิวควาย	สะพานบ้านน้ำรัก
F-02	ปลาบู่ทราย	สะพานบ้านน้ำรัก
F-03	ปลาตะเพียนขาว	สะพานบ้านน้ำรัก
F-04	ปลากระดี่	สะพานบ้านน้ำรัก
F-05	ปลานิล	สะพานบ้านน้ำรัก
F-06	ปลากราย	สะพานบ้านน้ำรัก
F-07	ปลาช่อน	สะพานบ้านน้ำรัก
F-08	ปลาหมอช้างเหยียบ	สะพานบ้านน้ำรัก
F-09	ปลากระสง	สะพานบ้านน้ำรัก
F-10	ปลาแป้นแก้ว	สะพานบ้านน้ำรัก
F-11	ปลาชิวหางดอก	คลองบ้านแก้ว
F-12	ปลาชิวหางแดง	คลองบ้านแก้ว
F-13	ปลากริม	สะพานบ้านน้ำรัก
F-14	ปลาเข็ม	สะพานบ้านน้ำรัก
F-15	ปลาสร้อยนกเขา	สะพานบ้านน้ำรัก
F-16	ปลารากกล้วย	สะพานบ้านน้ำรัก
F-17	ปลาแรด	สะพานบ้านน้ำรัก
F-18	ปลาชะโด	สะพานบ้านน้ำรัก
F-19	ปลาหมอไทย	สะพานบ้านน้ำรัก
F-20	ปลาสลิด	สะพานบ้านน้ำรัก
F-21	ปลาข้าวเม่า	สะพานกิจจานนท์
F-22	ปลาสลิดหิน	สะพานเบญจมานุสรณ์
F-23	ปลาตะกรับ	สะพานเบญจมานุสรณ์
F-24	ปลาแป้นเขี้ยว	สะพานเบญจมานุสรณ์
F-25	ปลาดอกหมาก	สะพานเบญจมานุสรณ์
F-26	ปลาคุด	สะพานเบญจมานุสรณ์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลาทั้ง 26 ชนิด โดยใช้เนื้อเยื่อปลาปริมาณ 0.07 กรัม สกัดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen, Taiwan) และดำเนินการสกัดดีเอ็นเอตามคำแนะนำของผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (ดัดแปลงจาก สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545 : หน้า 63 (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 : pp. 39) 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

เมื่อเติมสารต่างๆ ลงในหลอดครบแล้ว ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 6 ไมโครลิตร ลงไป สำหรับหลอดที่ใช้ตรวจสอบสภาวะของ PCR ได้แก่ Negative control จะเติมน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ ปริมาตร 6 ไมโครลิตร แทนสารละลายของดีเอ็นเอตัวอย่าง และ Possitive control จะเติมดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เคยทำ PCR ขึ้นแล้ว ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ในการศึกษาครั้งนี้ ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ ไพรเมอร์ FishF1/FishR1, FishF2/FishR2 (Ward et al., 2005 : pp. 1847-1857) และ FishBarCOI-1L/FishBarCOI-1H ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 650-750 คู่เบส (bp) โดยมีลำดับเบสดังนี้

FishF1	5’-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3’
FishF2	5’-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3’
FishR1	5’-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3’
FishR2	5’-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3’
FishBarCOI-1H	5’-ATTCCCATGTAGCCGAAGGGTTC-3’
FishBarCOI-1L	5’-GTGGCAATCACACGCTGATT-3’

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สภาวะการทำงานของปฏิกิริยา PCR (ดัดแปลงจาก Ward et al., 2005 : pp. 1847-1857) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

- Intial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 ˚C นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้น	
- Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 ˚C นาน 30 วินาที	35 รอบ
- Annealing	ที่อุณหภูมิ 45 ˚C นาน 30 วินาที	
- Extention	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 ไพรเมอร์ เอนไซม์ dNTP DNA polymerase และเกลือ $MgCl_2$ จากนั้นนำ PCR product ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (Automated sequencer) ดำเนินการโดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นเป็นชุดเดียวกันกับที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อสร้างชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่สมบูรณ์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง โดยตรวจสอบลักษณะของกราฟโครมาโทแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Chromatogram) โดยใช้โปรแกรม MEGA V.6.0 (Tamura et al., 2013 : pp. 2725-2729)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด Barcode of Life Data System (BOLD)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม Blast (Basic Local Aligment Search Tool) และฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด BOLD (http://www.boldsystems.org) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดังกล่าวเป็นชิ้นส่วนของยีน COI ที่ต้องการหรือไม่ และรหัสพันธุกรรมดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชนิดใด โดยค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการระบุชนิดอยู่ในช่วง 97% – 100% (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, 2556 : หน้า 174-184)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี