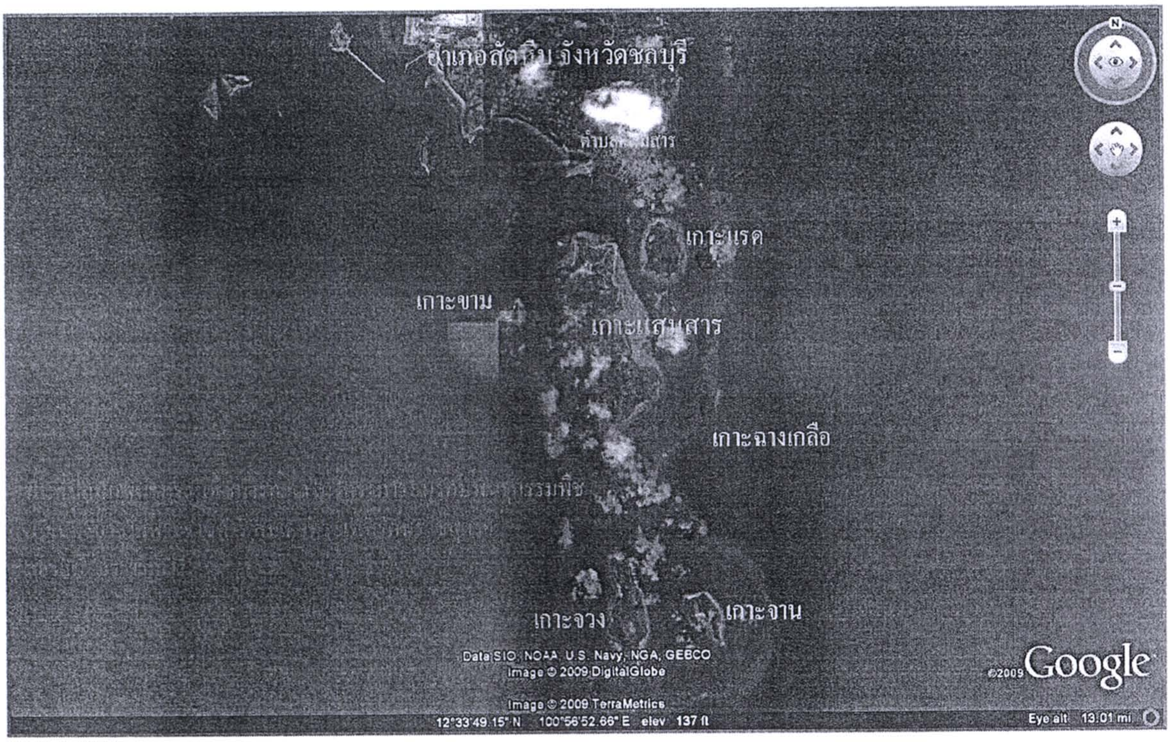
วิธีการศึกษา

การรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างปูน้ำเค็มจำนวนทั้งสิ้น 14 สปีชีส์จากครอบครัว Galenidae, Xanthidae, Eriphiidae, Oziidae, Menippidae และ Grapsidae (ซึ่งเป็นกลุ่มปูใบ้ และปูแสม) (ตารางที่ 1) จากบริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะฉางเกลือ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ภาพที่ 4) โดยจะใช้ตัวอย่างที่จัดจำแนกชนิดด้วยสัณฐาน จากโครงการย่อย ความหลากหลายทางชีวภาพของกุ้ง ปู และ กั้ง บริเวณเกาะแสมสาร เกาะแรด เกาะฉางเกลือ และเกาะขาม อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี และใช้จำนวนตัวอย่าง 1-5 ตัวอย่างต่อสปีชีส์ เก็บรักษาตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95%



ภาพที่ 4 แผนที่พื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล เกาะแสมสารและเกาะใกล้เคียง อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (จากแผนการวิจัย ทรัพยากรชีวภาพทางทะเลในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชทางทะเล หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี : องค์ความรู้ผันสู่วิถีไทยและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน)

ตารางที่ 1 ชนิดของปูที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้ระบบทางอนุกรมวิธานระดับแฟมิลี และสปีชีส์ของ Ng et al. 2008

	Family (Ng et al. 2008), Superfamily (Ng et al. 2008)	Species (สัญลักษณ์)	จำนวนตัวอย่าง 16SrRNA, 18SrRNA
	Ingroup		
1.	Galenidae Alcock, 1898; Galenoidae Samoulelle, 1819	*Halimede octhodes* (Haoc)	3, 1
2.		*Galene bispinosa* (Gabi)	4, 1
3.	Xanthidae MacLeay, 1838; Xanthoidea MacLeay, 1383	*Leptodius exaratus* (Leex)	2, 1
4.		*Atergatis integerrimus* (Atin)	4, 3
5.		*Atergatis floridus*(Atfl)	4, 4
6.		*Lophozozymus pictor* (Lopi)	3, 4
7.	Eriphiidae* MacLeay, 1838; Eriphioidea MacLeay, 1838	*Eriphia smithii* (Ersm)	6, 8
8.	Oziidae* Dana, 1851; Eriphioidea MacLeay, 1838	*Ozius guttatus* (Ozgu)	4, 4
9.		*Epixanthus frontalis* (Epfr)	2, 3
10.	Menippidae* Ortmann, 1893; Eriphioidea MacLeay, 1838	*Myomenippe hardwickii* (Myha)	1, 0
11.		*Menippe rumphii* (Meru)	2, 1
Outgroups			
1.	Grapsidae** MacLeay, 1838; Grapsoidea MacLeay, 1838	*Metopograpsus frontalis* (Mefr)	3, 3
2.		*Metapograpsus oceanicus* (Meoc)	2, 3
3.		*Metopograpsus latifrons* (Mela)	1, 1

หมายเหตุ * เป็นสมาชิก superfamily เดียวกันคือ Eriphioidea MacLeay, 1838 และ ** เป็นสมาชิกของ superfamily ที่มีสัณฐานแตกต่างจากปูชนิดที่ 1-11

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการจะประกอบไปด้วย (1) การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อของตัวอย่างปู (2) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) (3) การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้เทคนิคเจลอิเลคโทรโฟริซิส (gel electrophoresis) ซึ่งจะแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า และตรวจการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide (4) การทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์เพื่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

<u>สกัดดีเอ็นเอ</u>

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ด้วยวิธีการสกัดมาตรฐาน (Aljanabi and Martinez 1997) หรือใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan R.O.C) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดแล้วด้วยสารละลาย TE (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH 8.0) จนกว่าจะมีการวิเคราะห์ขั้นถัดไป

<u>เพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์</u>

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ในไมโตคอนเดรีย และยีน 18S rRNA ในนิวเคลียสโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ปฏิกิริยาลูกโซ่; PCR; ตารางที่ 2) ใน 1 ปฏิกิริยา (30 µl) จะใช้ส่วนผสมดังนี้ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบประมาณ 10-100 ng บัฟเฟอร์ความเข้มข้น1 เท่า (เจือจางจากสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า) นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต(dNTPs) ความเข้มข้นทั้ง 4 เบส 0.24-0.1 mM แมกนิเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 mM ไพรเมอร์แต่ละสาย ที่ความเข้มข้น 0.2 µmol และ *Taq* DNA polymerase 2 unit

การเพิ่มดีเอ็นเอในสารละลายปฏิกิริยาจะผ่านการเพิ่มลดอุณหภูมิในเครื่อง thermocycler (Gene Amp System 9700, Applied Biosystems, USA) โดยวัฏจักรการเพิ่มลดอุณหภูมิประกอบไปด้วย 3 ชุด คือ (1) วัฏจักร 1 รอบของการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็น 2 เส้น (denaturing temperature, 94°C) เป็นเวลา 3 นาที (2) วัฏจักร 40 รอบของ denaturing temperature นาน 1 นาที การลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพร์เมอร์เกาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature, 48 และ 49 °C, ตารางที่ 3) เป็นเวลา 1 นาที และการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เอนไซม์ DNA polymerase ซ่อมสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ให้สมบูรณ์ (extension temperature, 72 °C) เป็นเวลา 1.5 นาที และ (3) วัฏจักร 1 รอบ ของ extension temperature นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก Fratini et al. 2005; Giribet et al. 1996)

ตารางที่ 2. รายละเอียดของส่วนผสมพีซีอาร์ของยีน 16SrRNA และ 18SrRNA ในปฏิกิริยา 30 µl

Composition	16S rRNA (Fratini et al., 2005)	18S rRNA (Giribet et al., 1996)
10X PCR **buffer**	3 µl	3 µl
dNTPs (10 µM)	0.24 mM	0.1 mM
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5 mM	1.5 mM
Forward Primer (10 µM)	0.5 µM	0.42 µM
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µM	0.42 µM
Distilled water		
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.5 U	0.5 U
DNA template	10-20 ng	10-20 ng
Total	30 µl	30µl

ตารางที่ 3 รายละเอียดของไพรเมอร์ พร้อมรายละเอียดของอุณหภูมิที่ไพรเมอร์ เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่ทดสอบในการศึกษาในครั้งนี้

Gene	Primer Sequences	Size (bp)	Annealing temp	Reference
16SrRNA	F : 5'-AGA TAG AAA CCA ACC TGG-3' R : 5'-TGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'	~600 bp	48°C	Fratini et al., 2005
18SrRNA	5F : 5'-GCG AAA GCA TTT GCC AAG AA-3' 9R : 5'-GAT CCT TCC GCA GGT TCA CCT AC-3'	~800 bp	49°C	Giribet et al., 1996

<u>**ประเภทของเครื่องหมายพันธุกรรม**</u>

การศึกษานี้วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเครื่องหมายพันธุกรรม 2 ประเภท คือ ยีนบนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ 1 ยีนคือ ยีน 16S rRNA และยีนที่อยู่ในนิวเครียส 1 ยีน คือยีน 18S rRNA เนื่องจากยีนเหล่านี้มีระดับของการกลายพันธุ์เหมาะสมสำหรับการแยกจีนัส และสปีชีส์สำหรับสัตว์กลุ่มปูน้ำเค็ม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 245697
เลขเรียกหนังสือ

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ ด้วยชุดทำความสะอาดผลผลิตพีซีอาร์ สำเร็จรูป (HiYeild Gel/PCR DNA Fragment extraction kit, RBC Bioscience) เพื่อกำจัดนิวคลีโอไทด์อิสระ และชิ้นไพรเมอร์ส่วนเกิน ตรวจสอบความคมเข้ม และปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้ว ด้วย agarose gel (Winfrey et al. 1994) ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ สารดีเอ็นเอที่ย้อมติดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะเรืองแสง ภายใต้แสง UV เทียบความเข้มกับดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 คู่เบส (M23 100 bp) จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ABI 3100 (บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย) การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวใช้ระบบวิเคราะห์อิเล็คโตรโฟริซิสอัตโนมัติ (automated sequencer) ซึ่งอาศัยหลักการตรวจสอบคลื่นแสงที่ปลดปล่อยจากฉลากเรืองแสงบนเครื่องหมายพันธุกรรม เมื่อกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ ข้อมูลจะเป็น electropherogram ที่แสดง peak ของเบสหนึ่งๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

จัดและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ความสอดคล้องกันระหว่างนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ และ ความชัดเจนของ peak) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Sequence Scanner v. 1 (Applied Biosystems, USA) จากนั้นจัดเรียง (align) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แก้ไขแล้วของตัวอย่าง โดยใช้ algorithm ClustalW ที่มีอยู่ในซอฟท์แวร์ BioEdit version 7.05.3 (Hall, 1999) หลักการของการ align คือ การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อยสองเส้นให้มีจำนวนนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากที่สุด และ มีจำนวนช่องว่างที่เพิ่ม (gap) น้อยที่สุด การ align จะบ่งบอกตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์ระหว่างสาย นิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายนิวคลีโอไทด์ ของปู ชนิดต่างๆ โดยใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้ คือ (1) ค่าเฉลี่ยจำนวนเบสองค์ประกอบของแต่ละเบส (Bases Composition) (2) จำนวนตำแหน่งที่มีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ (Variable sites) และที่สามารถนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Parsimony informative sites) (3) ความแตกต่างทางวิวัฒนาการระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ 7 สาย ที่แสดงเป็นจำนวนการแทนที่เบสต่อตำแหน่ง (ใต้แนวเส้นทะแยงมุม) และค่า standard error (เหนือแนวเส้นทะแยงมุม) โดยใช้ Maximum Composite Likelihood model (Tamura et al., 2011) ค่าดัชนีเหล่านี้สามารถคำนวณได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MEGA version 5.0 (Tamura et al., 2011)

ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้แผนภูมิต้นไม้ ที่สร้างจากข้อมูลสัณฐาน และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (ยีนบนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ และยีนในนิวเคลียส) โดยวิธีต่อไปนี้ คือ (1) Minimum Evolution (Rzhetsky and Nei, 1992) ซึ่งใช้การสร้างเปรียบเทียบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่งในแต่ละหน่วยอนุกรมวิธาน แผนภูมิที่ดีที่สุดจะเป็นแผนภูมิฯ ที่มีค่ารวมของความยาวแขน (branch length) ระหว่างสายนิวคลีโอไทด์บนแผนภูมิ น้อยที่สุด และ (2) Maximum likelihood ซึ่งมีการทดสอบหาอัตราการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ที่เหมาะกับสายนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยโมเดลที่อธิบายอัตราการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ระหว่างตัวอย่าง ที่ดีที่สุด คือโมเดลที่ให้ค่า BIC (Bayesian Information Criterion) ต่ำที่สุด แผนภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการจัดกลุ่มโดยวิธีนี้ คือแผนภูมิที่มีค่า likelihood สูงสุด ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มของหน่วยอนุกรมวิธาน ได้จากการสุ่มข้อมูล Parsimony information sites แบบ bootstrap จำนวน1000 ครั้ง (ได้ 1000 แผนภูมิฯ) จากนั้นนำเสนอการแผนภูมิฯที่จัดกลุ่มโดยรวม (Consensus Tree) แบบ Majority Rule (จะนำเสนอตัวเลขสนับสนุนการจัดกลุ่มเฉพาะที่ปรากฏในแผนภูมิมากกว่า 50%) วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Mega version 5.0 (Tamura et al., 2011)