

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 อุปกรณ์

- กรรไกรผ่าตัด (Surgical scissors)
- กระดาษเช็ดกระจก Kimwipes
- ขวด Duran ขนาด 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น Beakers Flask Cylinders และ Reagent bottle
- เครื่องเขย่าสาร (Shaker: VS-201D, Vision Scientific)
- เครื่องคนสารละลาย (Magnetic Stirrer: HS115, Heraeus)
- เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่ง (Digital balancing; CP2202S: Sartorius)
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Digital balancing; BP2215: Sartorius)
- เครื่องถ่ายภาพได้แสงยูวี (UV Transilluminator; G Box HR: SynGene)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge; Biofuge 13: Heraeus)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge; 320R: Hettich)
- เครื่องผสมสาร  
(Vortex mixer; Genie II Model G560E: Scientific Industrie)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal Cycle; iCycler: Bio-RAD)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter; 420A: Orion)
- เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer: MCF)
- เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก (Mini centrifuge; PMC 860: Stratagene)
- ชุด Agarose gel electrophoresis (Mini-Sub Cell GT: Bio-RAD)

- ชุด Polyacrylamide gel electrophoresis  
(Sequi-gen<sup>®</sup> GT Sequencing Cell: Bio-RAD)
- ตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Freezer; 8600: LabX)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freeze: Sanyo)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator: Sumsung)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; FCO-150: Whatman)
- เตาอบไมโครเวฟ (Microwave: Sharp)
- ถุงมือยาง (Disposable gloves)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave; SX-700: Tomy)
- หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (AXYGENI)
- หลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Circulation water bath: Memmert)
- Micropipette ขนาด 0.2 10 และ 200 มิลลิลิตร (CappAero)
- Micropipette ขนาด 20 100 และ 1000 มิลลิลิตร (Gilson)
- Tip ขนาด 0.2 10 20 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

### 3.1.2 สารเคมีสำหรับการทดลอง

- Absolute ethanol ( $C_2H_6O$ : Merck)
- Acrylamide ( $C_3H_5NO$ : Promega)
- Agarose electrophoresis grade (Sigma chemicals)
- Ammonium peroxydisulfate (APS,  $(NH_4)_2S_2O_8$ : Promega)
- Ammonium Persulfate ( $(NH_4)_2S_2O_8$ : Promega)
- Bis-Acrylamide (Promega)
- Bi-Silane (Glass bond: BDH chemical)
- Boric Acid ( $H_3BO_3$ : Merck)
- Bromophenol blue (Fisher scientific)
- Ethidium bromide ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ : Promega)
- Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA: Merck)
- 37% Formaldehyde (BDH chemical)

- Glacial acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ : Merck)
- Glycerol (Promega)
- Guanidine hydrochloride (Promega)
- Hydrochloric acid (HCl: Sigma chemicals)
- Isopropanol (Merck)
- Liquid nitrogen (นครกิจ)
- N N N' N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED: Fluka chemika)
- Proteinase K (Promega)
- Repel (Bio-Science)
- RNase inhibitor (Promega)
- Silica gel (Promega)
- Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ : Merck)
- Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : BDH chemical)
- Sodium chloride (NaCl: Merck)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS: Molekula)
- Sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : Fisher scientific)
- Tris-Base (Promega)
- Urea (BDH chemical)

### 3.1.3 สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

- Oligo nucleotide primers (Biobasic)
- *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen)

## 3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการวิจัย ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการวิเคราะห์พันธุศาสตร์ปริมาณ เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม ที่อายุ 3 4 5 และ 6 เดือน จากนั้นประมาณค่าการผสมพันธุ์ ของลักษณะน้ำหนักตัว (EBV\_BW6) ที่อายุ 6 เดือน เพื่อมาใช้ในการจำแนกกุ้งกุลาดำ ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตสูง (ค่าการผสมพันธุ์เป็นบวก ) และกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตต่ำ (ค่าการผสมพันธุ์เป็นลบ ) ขั้นตอนที่สองเป็นการวิเคราะห์พันธุกรรม เพื่อหารูปแบบของ เครื่องหมายดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลต์ที่จำเพาะกับกุ้งกุลาดำ และสุดท้ายเป็นการวิเคราะห์หา ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์กับกุ้งในกลุ่มที่มีการ เจริญเติบโตสูง

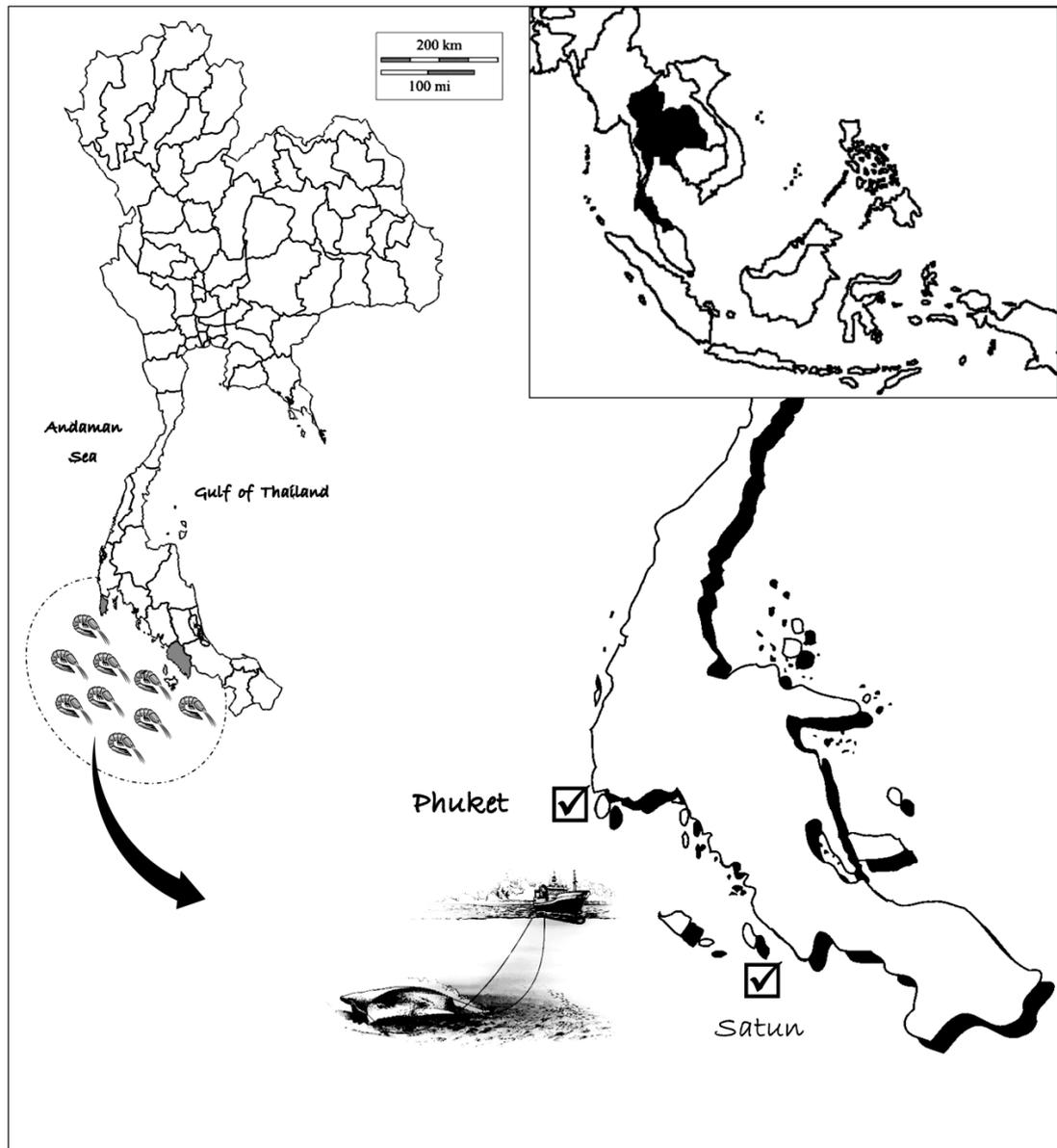
### 3.2.1 ประชากรพื้นฐาน

พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากธรรมชาติ ภายใต้การดูแลของหน่วยกักกันโรคจาก พ่อแม่พันธุ์กุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ.นครศรีธรรมราช ที่รวบรวมจากทะเลทางฝั่งอันดามัน บริเวณจังหวัดภูเก็ตและสตูล (ภาพที่ 3.1)

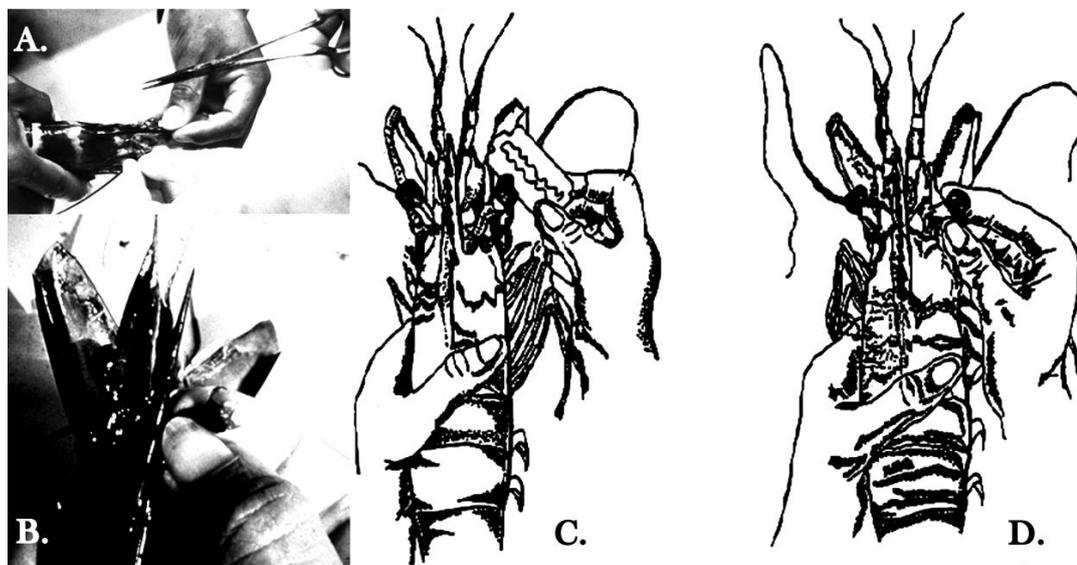
#### ก. การเตรียมแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

แม่กุ้งกุลาดำกึ่งไข่แก่ที่ผ่านการตรวจโรคไวรัสทั้ง 7 โรค คือ Yellow-Headed Virus (YHV), Gill-Associated Virus (GAV), White Spot Syndrome Virus (WSSV), Monodon Baculo Virus (MBV), Infectious Hypodermal Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) และ Taura Syndrome Virus (TSV) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ RT-PCR จะถูกนำมาพักภายในโรงเพาะฟักเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ โดยจะทำการเลี้ยงแม่พันธุ์กุ้งในบ่อซีเมนต์แยกตามครอบครัวที่คลุมด้วยผ้าใบสีดำ โดยมีการควบคุม ปริมาณแสงสว่างแบบอิงธรรมชาติ หรือ อาจจะใช้การปิดและเปิดไฟ โดยเปิดไฟให้แสงสว่าง 13 ชั่วโมงและปิดไฟให้มืด 11 ชั่วโมง ระหว่างการเลี้ยงจะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเข้าและน้ำถ่ายออก ตลอดเวลา ซึ่งน้ำที่ใช้จะผ่านการกรองและฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต (UV) ไอโซน หรือ คลอรีน ควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ในช่วง 27.5-29.0 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเค็ม 28-36 ส่วนในพัน และลึกระมาณ 35-50 เซนติเมตร

นำแม่พันธุ์กุ้งมาทำการบิหรือตัดตา (eyestalk ablation) (ภาพที่ 3.2) เพื่อเร่งให้มีการพัฒนาไข่เร็วขึ้น เนื่องจากการบิตาจะไปยับยั้ง gonad inhibiting hormone ทำให้ความถี่ในการวางไข่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 3.1 แผนที่แสดงตำแหน่งที่ทำการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ



ภาพที่ 3.2 การบีบตาหรือตัดก้านตาแม่พันธุ์กุ้ง

#### ข. การเลี้ยงดูลูกพันธุ์กุ้งกุลาดำ

หลังจากแม่กุ้งวางไข่ ลูกกุ้งกุลาดำที่ระยะ PL15 จะถูกสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปตรวจการติดเชื้อไวรัสทั้ง 7 โรค คือ Yellow-Headed Virus (YHV), Gill-Associated Virus (GAV), White Spot Syndrome Virus (WSSV), Monodon Baculo Virus (MBV), Infectious Hypodermal Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV), Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) และ Taura Syndrome Virus (TSV) จากนั้นลูกกุ้งที่ผ่านการตรวจโรคจะถูกนำไปเลี้ยงเลี้ยงต่อ โดยเลี้ยงแยกตามครอบครัวในบ่อซีเมนต์ที่มีปริมาตรน้ำ 12 ลูกบาศก์เมตร ที่ระดับความเค็ม 25 ส่วนในพัน โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสลับกับไรน้ำเค็ม ตรวจวัดค่า ความเค็ม (salinity) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และ ความเป็นด่าง (alkalinity) ทุกวัน

ค่าแอมโมเนียอิสระ ( $\text{NH}_3$ ) ไนไตรท์ ( $\text{NO}_2^-$ ) ไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) ความเป็นด่างรวม (total alkalinity) และ แมกนีเซียม (magnesium hardness) จะทำการตรวจวัดทุกๆ 3 วัน นอกจากนี้ยังมีการควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อด้วยการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดทุกวันและดูดตะกอนทุกๆ 2 วัน ด้วยท่อดูดตะกอนกลางบ่อ

### 3.2.2 การเก็บข้อมูล

การศึกษาค้างนี้จะทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำในรูปของความยาวรวมและน้ำหนักตัวรายตัว ทำการบันทึกข้อมูลครั้งแรกเมื่อกุ้งมีอายุครบ 3 เดือน และจะทำการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตต่อเนื่องทุกๆ 1 เดือน (30 วัน) ณ เดือนที่ 4 5 และ 6 ตามลำดับ

สำหรับลักษณะความยาวรวมรายตัวจะทำการวัดในรูปของความยาวเหยียด ซึ่ง จะทำการวัดจากส่วนหัวที่บริเวณปลายกรีไปจนถึงส่วนปลายของหาง (ภาพที่ 3.3)

### 3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์

ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจนมี อายุครบ 6 เดือน จากนั้นจะทำการสุ่มตัวอย่างกุ้ง ครอบครวละ 4 ตัว จากทั้งหมด 12 ครอบครว (4 ตัวอย่าง ต่อ 1 ครอบครว) เพื่อเป็นตัวแทนในการสกัดดีเอ็นเอ สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะกับกุ้งกุลาดำ

#### ก. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างกุ้งกุลาดำในแต่ละครอบครวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Proteinase K Incubation method ดัดแปลงมาจากวิธีของ Wuthisuthimethavee et al. (1999) (ภาพที่ 3.4) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

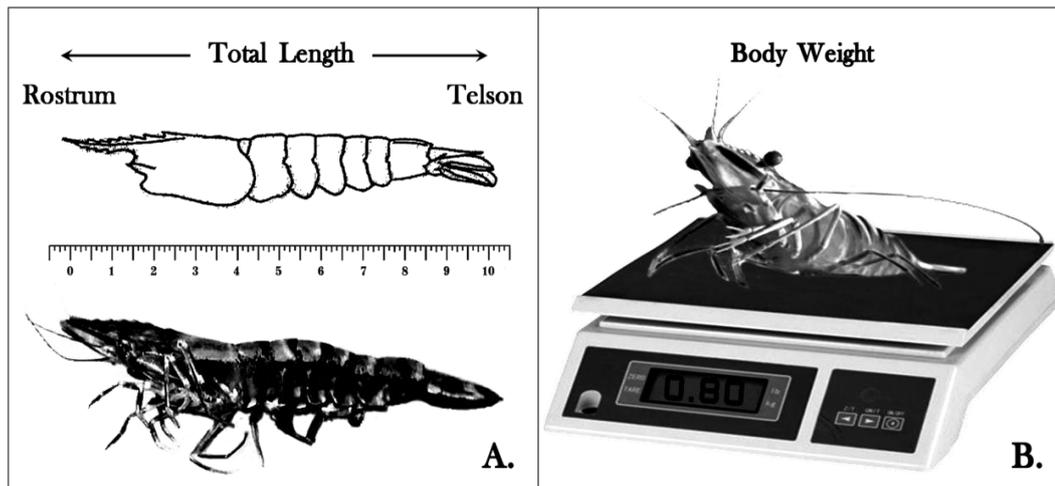
1) **Sample:** ตัดเอาเฉพาะส่วนของขาว่ายน้ำ (pleopod) ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบดจนตัวอย่างละเอียด

2) **Cell lysis:** เติม Extraction buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ ประมาณ 5 นาที สังเกตว่าถ้าเซลล์แตกสลายจะข้นกว่าเดิม จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเอาเฉพาะ ส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ ประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

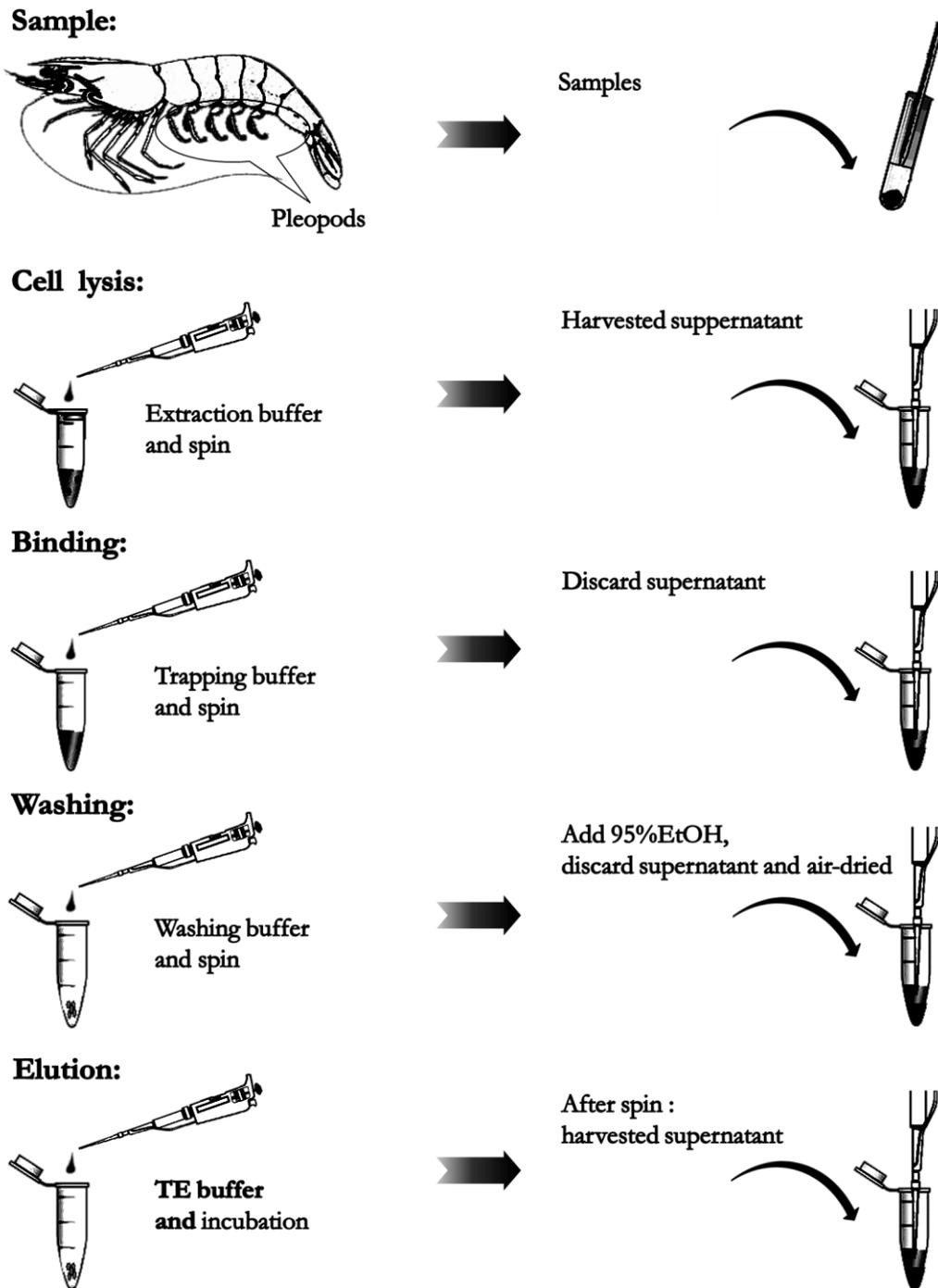
3) **Binding:** นำส่วนใสด้านบน ที่ได้มาผสมด้วย Trapping buffer ให้ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดูดเอา ส่วนใสด้านบนทิ้ง เก็บไว้เฉพาะตะกอนด้านล่าง (cell pellet)

4) **Washing:** ล้างทำความสะอาดตะกอนด้านล่างด้วยการเติม Washing buffer ประมาณ 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นเติม 95% ethanol ประมาณ 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิห้อง จนแน่ใจว่าเหลือเฉพาะตะกอนเท่านั้น

5) **Elution:** หลังจากนำไประเหย ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และใช้ไมโครปิเปตต์ ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบนไว้ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือนำตัวอย่างที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.3 การเก็บข้อมูลของลักษณะการเจริญเติบโต ในรูปของความยาวรวม (total length) (A.) และน้ำหนักตัว (body weight) (B.) รายตัว



ภาพที่ 3.4 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Proteinase K Incubation method

## ข. การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 2 วิธีการ คือ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 3.5) และการตรวจสอบการดูดกลืนแสง (UV Absorption) ตามลำดับ

### 1) การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วย 1% อะกาโรสเจล โดยชั่งผงอะกาโรส 0.7 กรัม ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลาย 0.5X TBE buffer ปริมาตร 70 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอุ่นให้ละลายด้วยตุ๋บไมโครเวฟ ใช้เวลาประมาณ 1-2 นาที รอให้อุ่นจนสามารถใช้มือจับได้ จึงนำไปเทลงในถาดเตรียมเจลและวางหัวสำหรับ บำทำช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที ครบกำหนดเวลาดึงหรือออกอย่างระมัดระวัง แล้วนำถาดเจลไปวางลงใน chamber ที่มีสารละลาย 0.5X TBE buffer ตรวจสอบให้ระดับสารละลายอยู่เหนือแผ่นเจล จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผ่านการผสมด้วย Sequence Stop Solution (อัตราส่วน 1:1) ลงในหลุม ประมาณ 10 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบ ปริมาณกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ( $\lambda$ DNA) ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 100 300 500 900 และ 1,000 นาโนกรัม ตามลำดับ ปรับกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 40 นาที ตรวจสอบระยะการเคลื่อนที่ เมื่อ loading dye เคลื่อนลงมาประมาณครึ่งถาด ให้ทำการหยุดเครื่อง ย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 15 นาที และล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่อง Gel documentation และทำการบันทึกผล ตามลำดับ

## 2) การตรวจสอบการดูดกลืนแสง (UV Absorption)

การตรวจสอบการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers ที่ความยาวคลื่น A260 และ A280 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ ทั้งหมดจากค่า Optical Density (O.D.) หรือ Absorbance (A.) ที่ 260 นาโนเมตร โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (}\mu\text{g/ml)} = \text{ค่า OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

เมื่อ:

$\text{OD}_{260}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

50  $\mu\text{g/ml}$  = ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่  $\text{OD}_{260}$  เท่ากับ 1

พิจารณาความบริสุทธิ์ของแถบดีเอ็นเอกับค่าอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 ดังนี้

- 1.65 - 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์
- $> 1.85$  แสดงว่า มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน
- $\leq 1.65$  แสดงว่า มีโปรตีน หรือ ฟีนอลปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ

หลังจากตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ ทำการเจือจาง สารละลายดีเอ็นเอ ทั้งหมดด้วย  $T_{0.1}E$  buffer ให้เหลือความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และรวมตัวอย่างดีเอ็นเอของกึ่งในครอบครัวเดียวกัน ให้เหลือเพียง 1 ตัวอย่าง

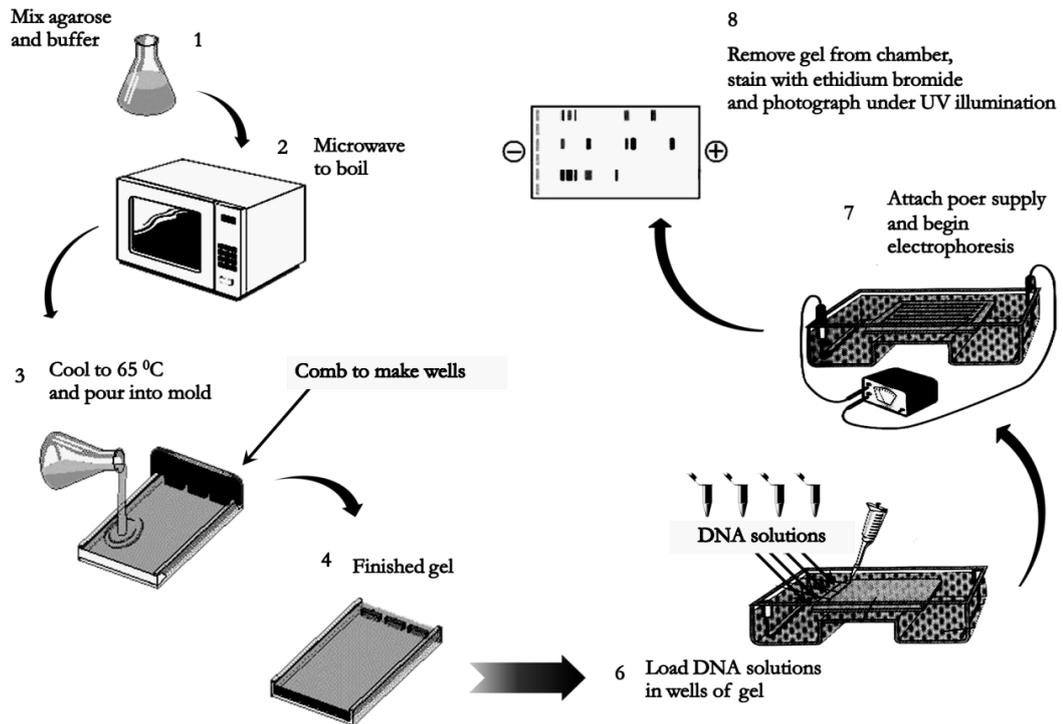
### ค. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจำนวน 90 ตำแหน่ง (ตารางภาคผนวกที่ ข.1) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งจะใช้สารละลายทั้งหมดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อการทำปฏิกิริยา 1 ครั้ง (ตารางที่ 3.1) จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมเพื่อควบคุมอุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยา ดังนี้

Pre-denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 4 นาที	}	1 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 นาที		35 รอบ
Annealing	55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 นาที		
Extension	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที		
Final extension	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที		1 รอบ
Soak	4 องศาเซลเซียส			$\alpha$

ตารางที่ 3.1 สารละลายสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ต่อ 1 ปฏิกิริยา

สารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA Template (10 ng/ $\mu$ l)	20 นาโนกรัม	2
Taq PCR Master Mix Kit (2X)	1X	10
Forward primer (10 $\mu$ M)	0.5 ไมโครโมลาร์	1
Reverse primer (10 $\mu$ M)	0.5 ไมโครโมล	1
Distilled water		6.0
<b>รวม</b>	<b>20</b>	



ภาพที่ 3.5 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

### ง. การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

เนื่องจากอัลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ มีขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงนำผลผลิตพีซีอาร์ในแต่ละตัวอย่างผสมด้วย Sequence Stop Solution (อัตราส่วน 1:1) แล้วนำไปแยกขนาดด้วย 5% โพลีอะคริลาไมด์เจล โดยมีวิธีการดังนี้

#### 1) การเตรียมกระจก

ทำความสะอาด chamber และ spacer ด้วย 95% ethanol ด้วยกระดาษ Kimwipes จำนวน 2 รอบ จากนั้นเช็ดซ้ำด้วยสารละลาย Repel 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เจลเกาะติดกับ chamber จากนั้นนำกระจกที่ล้างทำความสะอาดแล้วมาเช็ดทำความสะอาดด้วย 95% ethanol ด้วยกระดาษ Kimwipes จำนวน 2 รอบ และเช็ดซ้ำด้วยสารละลาย Bind silane เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจกดียิ่งขึ้น และเช็ดซ้ำด้วย 95% ethanol อีก 2 รอบ ตามลำดับ

ประกอบชุดกระจกให้เรียบร้อย โดยนำกระจกทั้ง 2 แผ่น มาประกบเข้าชุด และวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่าง นำชุดกระจกมาวางในแนวนอนแล้วค่อยๆ เติม 5% โพลีอะคริลาไมด์เจล (ตารางที่ 3.2) ลงในช่องว่างระหว่างกระจกกับ chamber จนเต็มและเสียบหัวทางด้านเรียบเพื่อตรึงผิวหน้าเจล (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ) จากนั้นปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง

**ตารางที่ 3.2** ส่วนประกอบของสารละลายในการเตรียม 5% โพลีอะคริลาไมด์เจล

สารละลาย	ปริมาณ
5% acrylamide gel	60 มิลลิลิตร
10% APS	600 ไมโครลิตร
TEMED	40 มิลลิลิตร

## 2) การทำอิเล็กโตรโฟเรซิส

เมื่อเจลแข็งตัวสมบูรณ์ นำชุดกระจกไปต่อกับเครื่องจ่าย

กระแสไฟฟ้าที่เข้าชุดกัน เติมสารละลาย 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก) ดึงหัวออก จากนั้นใช้กำลังไฟฟ้า 55 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที จนเจลมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส

ดูดล้างผิวหน้าเจลโดยใช้ไมโครปิเปตต์ จากนั้นเสียบหัวลงไปอีกครั้ง โดยสลับเอาด้านที่เป็นพื้นปลาเสียบลงไปแทน เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยอดตัวอย่าง จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ทีผสมด้วย Sequence Stop Solution มาหยอดลงในหลุมประมาณ 3 ไมโครลิตร และลดกำลังไฟฟ้าให้เหลือ 50 วัตต์ จากนั้นจึงเริ่มการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสโดยใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

### จ. การย้อมดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver staining

หลังจากการแยกขนาดไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ด้วย 5% โพลีอะคริลาไมด์ เจล จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาย้อมด้วยวิธี Silver staining ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) **Fixation:** นำแผ่นเจลที่ติดอยู่กับกระจกแช่ลงในสารละลาย Fixative solution ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ด้วยการเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าสาร เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดกับเจล ครบกำหนดเวลาให้ เทสารละลาย Fixative solution เก็บไว้ จากนั้นล้างทำความสะอาดแผ่นเจลด้วย RO water ปริมาตร 1 ลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ด้วยการเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร

2) **Staining:** ย้อมแผ่นเจลโดยการแช่ลงในสารละลาย Staining solution ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที ด้วยการเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าสาร จากนั้นล้างทำความสะอาดแผ่นเจลด้วย RO water ปริมาตร 1 ลิตร โดยการจุ่มผ่านน้ำเท่านั้น

3) **Developing:** นำแผ่นเจลมาแช่ลงในสารละลาย Developing solution ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการแช่เย็น จากนั้นเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าสาร จนเริ่มมองเห็นแถบดีเอ็นเอ

4) **Stop:** เมื่อแถบดีเอ็นเอเริ่มมีสีเข้มให้ทำการหยุดปฏิกิริยา โดยการเทสารละลาย 10% acetic acid (จากขั้นตอนการ Fixation) ลงไปบนผิวหน้าแผ่นเจลทันที เขย่าเบาๆ บนเครื่อง shaker จนกว่าจะหมดฟองอากาศ จากนั้นล้างทำความสะอาดแผ่นเจลด้วย RO water ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยการเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน ประมาณ 1 คืน หรือ จนกว่าแผ่นเจลจะแห้งสนิท

### จ. การจัดเตรียมข้อมูล

หลังจากการแยกขนาดไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอด้วย 5% โพลีอะคริลาไมด์ เจล จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลและเก็บข้อมูลความผันแปรทางพันธุกรรมของกุ่มกุลาดำเพื่อสร้างเป็นตารางเมทริกซ์ โดยทำการแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป Binary data คือ ให้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ (presence) เป็น “1” และไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ (absence) เป็น “0”

### 3.2.4 โครงสร้างของข้อมูล

นำข้อมูลความยาวและน้ำหนักกึ่งที่อายุ 3 4 5 และ 6 เดือน ตามลำดับ ในแต่ละครอบครัว มาจัดเก็บเป็นระบบ (numeric system) (ตารางที่ 3.3) โดยแยกเป็น 2 แฟ้ม ดังนี้

#### ก. แฟ้มพันธุ์ประวัติ (Pedigree file)

- หมายเลขประจำตัวสัตว์ (Animal ID: Animal)
- หมายเลขประจำตัวพ่อพันธุ์ (Sire ID: Sire)
- หมายเลขประจำตัวแม่พันธุ์ (Dam ID: Dam)

#### ข. แฟ้มข้อมูล (Data file)

- หมายเลขประจำตัวสัตว์ (Animal ID: Animal)
- แหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์ (Location: Locate)
- ความยาว (Total length : TL)
- น้ำหนัก (Body weight : BW)

ตารางที่ 3.3 โครงสร้างของข้อมูลกึ่งกุลาดำที่ใช้ในการศึกษา

รายการ	สัญลักษณ์	ข้อมูล	ความหมาย
หมายเลขประจำตัวสัตว์	Animal ID	Q13	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 1
		Q14	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 2
		Q15	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 3
		Q16	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 4
		Q19	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 5
		Q20	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 6
		Q21	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 7
		Q15	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 3
		Q16	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 4
		Q19	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 5
		Q20	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 6

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

รายการ	สัญลักษณ์	ข้อมูล	ความหมาย
		Q21	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 7
		Q27	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 8
		Q29	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 9
		Q34	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 10
		Q61	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 11
		Q62	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 12
		Q63	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 13
		Q74	ประชากรกึ่งในครอบครัวที่ 14
หมายเลขประจำตัวพ่อพันธุ์	Sire ID	0	ไม่ทราบหมายเลขพ่อพันธุ์
หมายเลขประจำตัวแม่พันธุ์	Dam ID	0	ไม่ทราบหมายเลขแม่พันธุ์
แหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์	Location	1	จ. ภูเก็ต
		2	จ. สตูล
ข้อมูลการเจริญเติบโต	Total length	TL3	ความยาวรายตัว ที่อายุ 3 เดือน
		TL4	ความยาวรายตัว ที่อายุ 4 เดือน
		TL5	ความยาวรายตัว ที่อายุ 5 เดือน
		TL6	ความยาวรายตัว ที่อายุ 6 เดือน
	Body weight	BW3	น้ำหนักรายตัว ที่อายุ 3 เดือน
		BW4	น้ำหนักรายตัว ที่อายุ 4 เดือน
		BW5	น้ำหนักรายตัว ที่อายุ 5 เดือน
		BW6	น้ำหนักรายตัว ที่อายุ 6 เดือน

### 3.2.5 การวิเคราะห์พันธุ์ประวัติ (Pedigree analysis)

ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสัตว์ด้วยวิธี Molecular relatedness (Eding and Meuwissen, 2001; 2003) โดยใช้ข้อมูลของจากอัลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ที่จำเพาะกับกึ่งกุลาดำ โดยเริ่มจากหาค่า ดัชนีความเหมือน ทางพันธุกรรม (similarity index) (Jacquard, 1983; Caballero and Toro, 2000; Toro et al., 2002) ของกึ่งกุลาดำในแต่ละครอบครัว (สมการที่ 1) จากนั้นนำค่าความ เหมือนที่ได้ไปคำนวณค่า ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (molecular coancestry) (Toro et al., 2002; 2003) (สมการที่ 2 และ 3) และนำค่าความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ไปคำนวณต่อเพื่อหาค่า Molecular relatedness (สมการที่ 4) ตามลำดับ (Blonk et al., 2010)

การศึกษาในครั้งนี้ แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 4 ชุดการคำนวณ ตามจำนวนของ เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่แสดงผลเป็นโพลิมอร์ฟิซึม ซึ่งมีข้อมูลที่สมบูรณ์เพียง 69 ตำแหน่ง (จาก 76 ตำแหน่ง ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้) และเปรียบเทียบกับการคำนวณแบบไม่มี พันธุ์ประวัติ (unknown pedigree) คือ ให้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสัตว์เป็นศูนย์ ดังนี้

- ชุดการคำนวณที่ 1 = ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 15 ตำแหน่ง
- ชุดการคำนวณที่ 2 = ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 40 ตำแหน่ง
- ชุดการคำนวณที่ 3 = ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 69 ตำแหน่ง
- ชุดการคำนวณที่ 4 = ไม่มีพันธุ์ประวัติ

#### ก. ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม

คำนวณค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity index) ด้วยวิธี Molecular similarity index ตามวิธีของ Li and Horvitz (1953) ดังสมการต่อไปนี้

$$S_{xy,l} = \frac{1}{4} [I_{ac} + I_{ad} + I_{bc} + I_{bd}] \quad (1)$$

จากนั้นคำนวณ ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมที่คาดหวัง (expected similarity) ตามวิธีของ Lynch (1988) ดังสมการต่อไปนี้

$$\mathbf{E}[\mathbf{S}_{xy,l}] = f_{xy,l} + (1 - f_{xy})\mathbf{S}_l \quad (2)$$

#### ข. ค่าความสัมพันธ์ทางเครือญาติ

คำนวณค่าความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (molecular coancestry) จากค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Method of moments estimator ตามวิธีของ Ritland (1996) ดังสมการต่อไปนี้

$$\hat{f}_{xy} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \frac{\mathbf{S}_{xy,l} - s_l}{1 - s_l}, \quad (3)$$

#### ค. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสัตว์ 2 ตัว (unbiased estimator of relatednes) โดยการคำนวณจากค่าความสัมพันธ์ทางเครือญาติ ด้วยวิธี Molecular relatedness ตามวิธีของ Blonk et al. (2010) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\hat{\mathbf{r}}_{xy} = \frac{2}{L} \sum_{l=1}^L \mathbf{S}_{xy,l} \quad (4)$$

เมื่อ

$S_{xy,l}$	=	ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม
$E[S_{xy,l}]$	=	ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมที่คาดหวัง
$f_{xy}$	=	ค่าความสัมพันธ์ทางเครือญาติระหว่างสัตว์ตัวที่ X และ Y
$r_{xy}$	=	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
$L$	=	จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์
$S_l$	=	ความน่าจะเป็นที่จะพบอัลลีลของสัตว์ตัวที่ X และ Y ที่ตำแหน่ง l
$a, b$	=	อัลลีลที่พบในสัตว์ตัวที่ X
$c, d$	=	อัลลีลที่พบในสัตว์ตัวที่ Y

### 3.2.6 การวิเคราะห์พันธุศาสตร์ปริมาณ (Quantitative genetic analysis)

#### ก. การประมาณค่าองค์ประกอบของความแปรปรวนทางพันธุกรรม

การประมาณค่าองค์ประกอบความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วมทางพันธุกรรม (variance and covariance components) ด้วยวิธี Restricted Maximum Likelihood procedure (REML) โดยใช้ Average Information (AI) algorithm (Patterson and Thompson, 1971) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ASReml (Gilmour et al., 2002) สามารถแสดงแบบหุ่นจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$y_{ijkl} = \mu + \text{Locate}_i + \text{Fam}_j + \text{Animal}_k + e_{ijkl}$$

เมื่อ

$y_{ijkl}$	=	ค่าสังเกตของลักษณะความยาวและน้ำหนักตัวของกึ่งกุลาดำ
$\mu$	=	ค่าเฉลี่ยของลักษณะความยาวและน้ำหนักตัวของกึ่งกุลาดำ
$\text{Locate}_i$	=	อิทธิพลคงที่ของแหล่งพ่อแม่พันธุ์ i (i = 1, 2)
$\text{Fam}_j$	=	อิทธิพลคงที่ของครอบครัวที่ j (j = 1, 2, 3 ..., 12)
$\text{Animal}_k$	=	อิทธิพลสุ่มของกึ่งกุลาดำครอบครัวที่ k โดย $\text{animal}_k \sim \text{NID}(0, \sigma_a^2)$
$e_{ijkl}$	=	อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม $e_{ijkl} \sim \text{IID}(0, \sigma_e^2)$

### ข. ค่าอัตราพันธุกรรม

การประมาณค่าอัตราพันธุกรรม ในรูปอัตราพันธุกรรมอย่างแคบ (narrow sense heritability) (Falconer and Mackey, 1996) โดยใช้ค่าความแปรปรวนที่ได้จากการประมาณด้วยวิธี REML (Patterson and Thomson, 1971) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ASReml (Gilmour et al., 2002) สามารถแสดงสมการทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_e^2}$$

เมื่อ

$h^2$	=	ค่าอัตราพันธุกรรมอย่างแคบ
$\sigma_a^2$	=	ความแปรปรวนเนื่องจากยีนแบบบวกสะสม
$\sigma_e^2$	=	ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

### ค. ค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสหสัมพันธ์ของลักษณะปรากฏ

ค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสหสัมพันธ์ของลักษณะปรากฏของลักษณะความยาวรวมและน้ำหนักตัวของกุ่มกุลาดำ สามารถคำนวณได้จากค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแต่ละลักษณะและ ความแปรปรวนร่วมทางพันธุกรรมระหว่างลักษณะทั้งสอง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ASReml (Gilmour et al., 2002) สามารถเขียนแสดงในรูปสมการได้ดังนี้ (Becker, 1985)

#### 1) ค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic correlation)

$$r_{GG} = \frac{COV_{G(XY)}}{\sqrt{\sigma_{G(X)}^2 \cdot \sigma_{G(Y)}^2}}$$

ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (S.E.(r<sub>GG</sub>)) สามารถคำนวณตามสูตรของ Falconer, (1981) ดังนี้

$$\text{S.E.}(r_{GG}) \cong \frac{1 - r_{G(XY)}^2}{\sqrt{2}} \cdot \sqrt{\frac{\text{S.E.}(h_x^2) \cdot \text{S.E.}(h_y^2)}{h_x^2 h_y^2}}$$

2) ค่าสหสัมพันธ์ทางลักษณะปรากฏ (phenotypic correlation)

$$r_{PP} = \frac{\text{COV}_{P(XY)}}{\sqrt{\sigma_{P(X)}^2 \cdot \sigma_{P(Y)}^2}}$$

เมื่อ

<b>COV<sub>G(XY)</sub></b>	=	ความแปรปรวนร่วมทางพันธุกรรมระหว่างลักษณะ X และ Y
<b>σ<sup>2</sup><sub>G(X)</sub></b>	=	ความแปรปรวนทางพันธุกรรม
<b>σ<sup>2</sup><sub>G(Y)</sub></b>	=	ความแปรปรวนทางพันธุกรรม
<b>S.E.(h<sup>2</sup><sub>X</sub>)</b>	=	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะ X
<b>S.E.(h<sup>2</sup><sub>Y</sub>)</b>	=	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะ Y
<b>COV<sub>P(XY)</sub></b>	=	ความแปรปรวนร่วมทางลักษณะปรากฏระหว่างลักษณะ X และ Y
<b>σ<sup>2</sup><sub>P(X)</sub></b>	=	ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ
<b>σ<sup>2</sup><sub>P(Y)</sub></b>	=	ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ

### ง. การประเมินค่าการผสมพันธุ์

ประมาณค่าการผสมพันธุ์ (Estimated Breeding Value; EBV) ของลักษณะความยาวและน้ำหนักตัวของกึ่งกุลาดำ ที่อายุ 6 เดือน ด้วยวิธี Best Linear Unbias Prediction (BLUP) (Henderson, 1984) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ASReml (Gilmour et al., 2002) สามารถแสดงสมการทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}, \text{ และ } \mathbf{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_a^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

สมการ Mixed Model Equation (MME) นำเสนอโดย Henderson (1984) สำหรับการประมาณค่า  $\boldsymbol{\beta}$  ( $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ ) และทำนายค่า  $\mathbf{a}$  ( $\hat{\mathbf{a}}$ ) ดังนี้

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{X} & \mathbf{Z}'\mathbf{Z} + \alpha\mathbf{A}^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\boldsymbol{\beta}} \\ \hat{\mathbf{a}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'\mathbf{y} \end{bmatrix}, \text{ เมื่อ } \alpha = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2}$$

จากนั้นคำนวณค่าความแม่นยำ (Accuracy; ACC) โดยมีสูตรดังนี้

$$\text{ACC} = \sqrt{1 - \frac{(\text{S.E.})^2}{\sigma_a^2}}$$

เมื่อ

- $y$  = เวกเตอร์ของลักษณะความยาวและน้ำหนักตัว
- $\beta$  = เวกเตอร์ของอิทธิพลคงที่
- $a$  = เวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่มสำหรับตัวสัตว์
- $e$  = เวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่มส่วนที่เหลือ
- $X, Z$  = เมตริกซ์เอกลักษณ์ของอิทธิพลคงที่และอิทธิพลสุ่ม ตามลำดับ
- $\sigma_a^2$  = ความแปรปรวนเนื่องจากอิทธิพลจากตัวสัตว์
- $\sigma_e^2$  = ความแปรปรวนเนื่องจากความคลาดเคลื่อน
- $I$  = เมตริกซ์เอกลักษณ์ (identity matrix)
- $A$  = เมตริกซ์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (numerator relationship matrix)
- $A^{-1}$  = ส่วนกลับของเมตริกซ์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

### 3.2.7 การหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

หลังจากได้ค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะน้ำหนักตัว ที่อายุ 6 เดือน จากนั้นนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (T-test) เพื่อทำการแบ่งกุ้งกุลาดำเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตสูง คือ ครอบครัวที่มีค่าการผสมพันธุ์เป็นบวก
- กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตต่ำ คือ ครอบครัวที่มีค่าการผสมพันธุ์เป็นลบ

จากนั้นแปลงข้อมูลจากการแบ่งกลุ่มประชากรให้อยู่ในรูป Binary data คือ

- รหัส 1 คือ กุ้งกลุ่มที่มีลักษณะการเจริญเติบโตสูง
- รหัส 0 คือ กุ้งกลุ่มที่มีลักษณะการเจริญเติบโตต่ำ

#### ก. ความถี่ของอัลลีลต่างๆ ที่พบ

นำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ในแต่ละตำแหน่งมาวิเคราะห์หาความถี่ ตามวิธี ของ Falconer and Mackay (1996) ด้วยสมการดังนี้

$$P_i = \frac{\sum n_i}{N}$$

เมื่อ

<b><math>P_i</math></b>	=	ความถี่อัลลีลที่ i
<b><math>n_i</math></b>	=	จำนวนอัลลีลที่ i
<b><math>N</math></b>	=	จำนวนอัลลีลทั้งหมด

หลังการคำนวณความถี่ของอัลลีลในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ จากนั้นจะตัดอัลลีลในตำแหน่งที่มีความถี่ต่ำกว่า 0.3 เปอร์เซนต์ ออกจากการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป (ศรีนวล, 2553 และ มนต์ชัย, 2552)

ข. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์กับกับกึ่งกุลาดากลุ่มที่มีการเจริญเติบโตสูง

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง อัลลีลของเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละตำแหน่ง กับกึ่งกุลาที่มีลักษณะการเจริญเติบโตสูง ด้วยวิธี Logistic regression analysis (LRA) (Allison, 1997) ด้วยโปรแกรม SPSS (Version 11.5) โดยมีรูปแบบสมการดังนี้ ซึ่งมีรูปแบบสมการดังนี้

$$\ln \left[ \frac{P_i}{1 - P_i} \right] = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i + e_{ij}$$

จากนั้นประมาณค่า  $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_i$  ด้วยวิธี Maximum Likelihood และทำนายความน่าจะเป็นของการพบอัลลีลต่างๆ ในกึ่งกุลาที่มีลักษณะการเจริญเติบโตสูงด้วยสมการดังนี้

$$\hat{P}_i = \frac{e^{\beta_0 + \beta_i}}{(1 + e^{\beta_0 + \beta_i})}$$

เมื่อ

$P_i$	=	ความน่าจะเป็นของการพบอัลลีลต่างๆ
$\beta_0$	=	จุดตัดแกน Y ของสมการถดถอย
$\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_i$	=	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของอัลลีล (1, 2, 3, ...i)
$X_1, X_2, \dots, X_i$	=	ตัวแปรหุ่นของอัลลีล (1, 2, 3, ...i)
$e_{ij}$	=	ค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำนาย

### 3.3 สถานที่ทำการวิจัย

3.3.1 หน่วยกักกันโรคจากพ่อแม่พันธุ์กุ้ง หน่วยวิจัยกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

3.3.2 ห้องปฏิบัติการอควาควิลเจอร์รี่ในมิดส์ หน่วยวิจัยกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์