

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

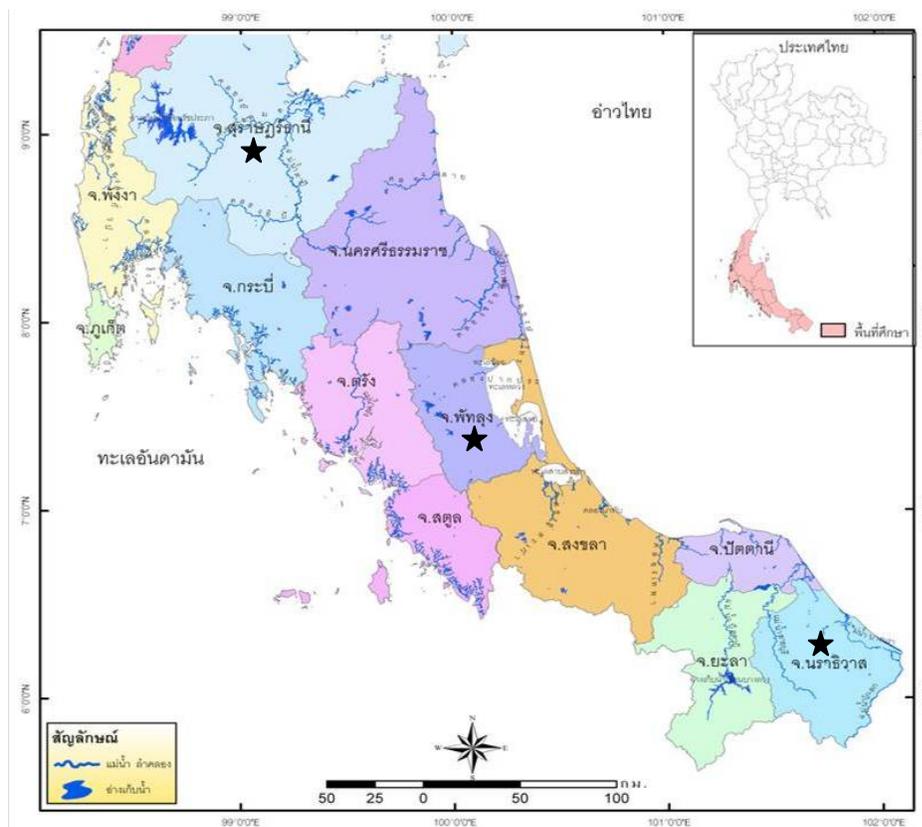
การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาคูกลำพันจาก 3 แหล่ง คือประชากรจาก อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอสุไหง ปาตี จังหวัดนราธิวาส จำนวนแหล่งละ 5 ตัวอย่าง และประชากรจากอำเภอตะโหมด จังหวัดพัทลุง จำนวน 4 ตัวอย่าง แช่ในฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี

รวบรวมตัวอย่างปลาคูกลำพันจาก 3 แหล่ง (ภาพที่ 3.1) คือ อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอสุไหง ปาตี จังหวัดนราธิวาส จำนวนแหล่งละ 50 ตัวอย่าง และประชากรจาก อำเภอตะโหมด จังหวัดพัทลุงจำนวน 49 ตัวอย่าง ตัดครีบหางของปลาคูกลำพันแต่ละตัว ขนาด 1 X 1 เซนติเมตร แช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนน้ำยาแอลกอฮอล์ 1 – 2 ครั้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 3.1 แผนที่เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาตุ๊กลาพันธ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานบางประการ

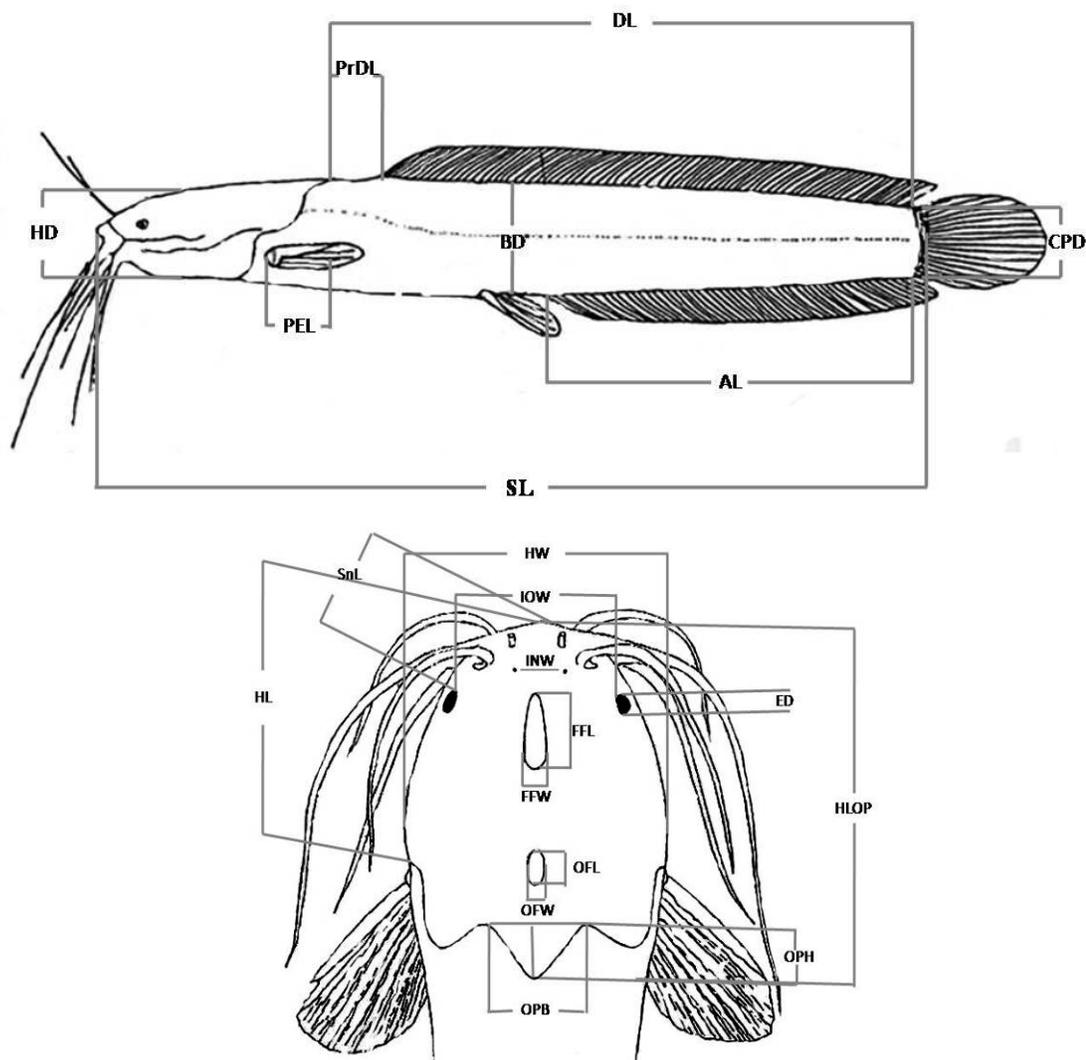
อุปกรณ์

1. ปลาตุ๊กลาพันธ์ทั้งตัว
2. อุปกรณ์วัดขนาด เช่น ไม้บรรทัด สายวัด เวอเนียร์คาลิเปอร์
3. สมุดจดบันทึก
4. โปรแกรมวิเคราะห์ผล เช่น โปรแกรม NTSYS-pc Package v.2.1, SPSS และโปรแกรม Sigma Plot v.10

วิธีการศึกษา

วัดขนาดและจดบันทึกข้อมูลของลักษณะ สัณฐานเชิงปริมาณ ของปลาตุ๊กลาพันธ์จำนวน 24 ลักษณะ ดังนี้ ส่วนหัว ความยาวหัว (Head Length, HL) ความลึกหัว (Head Depth, HD) ความกว้างของหัว (Head Width, HW) ความยาวของจะงอยปาก (Snout Length, SnL) เส้นผ่านศูนย์กลางตา (Eye

Diameter, ED) ระยะห่างระหว่างตา (Inter Orbital Width, IOW) ระยะห่างระหว่างรูจมูก (Inter Nostril Width, INW) ความยาวร่องหัวส่วนหน้า (Frontal Fontanel Length, FFL) ความกว้างร่องหัวส่วนหน้า (Frontal Fontanel Width, FFW) ความยาวร่องหัวส่วนหลัง (Occipital Fontanel Length, OFL) ความกว้างร่องหัวส่วนหลัง (Occipital Fontanel Width, OFW) ความยาวเงี่ยง (Spine Length) ความยาวของฐานท้ายทอย (Occipital Process Base, OPB) ความกว้างของฐานท้ายทอย (Occipital Process High, OPH) ส่วนลำตัว ความยาวมาตรฐาน (Standard Length, SL) ความลึกลำตัววัดที่ทวารหนัก (Body Depth at Anus, BD) ความลึกคอคอดหาง (Caudal Peduncle Depth, CPD) ความยาวระหว่างกะโหลกถึงครีบก้น (Predorsal Length, PrDL) ความยาวฐานครีบก้น (Length of Dorsal Fin Base, DL) ความยาวฐานครีบก้น (Length of Anal Fin Base, AL) ความยาวครีบทู (Pectoral Fin Length, PFL) ความยาวครีบท้อง (Ventral Fin Length, VFL) ความยาวหัว (Head Length) และ ความยาวของกะโหลก (Head Length to Occipital Process, HLOP) (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 การวัดลักษณะต่างๆ ของปลาดุกลำพันบริเวณลำตัวและบริเวณหัว

การวิเคราะห์ข้อมูล

หาสัดส่วนค่าต่างๆ เป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวหัว และสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวมาตรฐานของปลาแต่ละประชากร

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One Way ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานเชิงปริมาณระหว่างปลาดุกลำพันแต่ละแหล่ง

วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Multivariate Morphometric Analysis ตามวิธีการวิเคราะห์ตัวประกอบหลัก (Principal Component Analysis ; PCA) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc Package โดยการทดสอบหาเวกเตอร์ไอเก็น (Eigenvectors) และค่าไอเก็น (Eigenvalues) จากเมทริกซ์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Matrix) ที่วิเคราะห์ได้หลังจากการปรับข้อมูลลักษณะสัณฐานเชิงประมาณ 24 ลักษณะ ให้อยู่ในรูปมาตรฐานเชิงเส้น (Linear Standardization) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปแสดงผลความสัมพันธ์ทางลักษณะสัณฐานเชิงประมาณ ของปลาตุ๊กตาพันธุ์ทั้งหมด โดยสร้างเป็นกราฟการกระจายโดยโปรแกรม Sigma Plot

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ ชุด Agarose Gel Electrophore
2. อุปกรณ์ Polyacrylamide Gel Electrophoresis
3. อุปกรณ์ถ่ายภาพ (Gel Document)
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
5. เครื่องไมโครเซนตริฟิวส์ (Microcentrifuge)
6. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
7. อุปกรณ์ผ่าตัดสำหรับตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างครีบบางปลาตุ๊กตาพันธุ์
8. Micropipette พร้อม Tip
9. PCR Themocycler
10. Microtube

สารเคมี

1. Absolute Ethanol
2. Acrylamide
3. Agarose
4. Ammonium Persulfate (APS)
5. Bind Silane และ Repel Silane

6. Bisacrylamide
7. Boric Acid
8. Chloroform
9. Deoxyribonucleosidetriphosphates (dNTPs)
10. Ethidium Bromide Solution Ethylene Diimine Tetra Acetic Acid (EDTA)
11. Formaldehyde 37 %
12. Glacial Acetic Acid
13. Isoamyl Alcohol
14. Magnesium Chloride
15. Restriction Enzyme
16. N,N,N',N',- Tetramethylenediamine (TEMED)
17. PCR Buffer
18. Phenol
19. Proteinase K
20. Silver Nitrate
21. Sodium Acetate
22. Sodium Carbonate
23. Sodium Chloride
24. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
25. Sodium Thiosulfate
26. T4 DNA Ligase
27. *Taq* Polymerase
28. Tris – Base
29. Urea
30. Xylene
31. 100 bp DNA Ladder

ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาตุ๊กลำพัน โดยเลือกใช้ตัวอย่างไพรเมอร์จากรายที่ 3.1 จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์
Adapter Primers	
<i>Eco</i> RI Adapter Forward	5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'
<i>Eco</i> RI Adapter Reverse	5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3'
<i>Mse</i> I Adapter Forward	5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'
<i>Mse</i> I Adapter Reverse	5' TAC TCA GGA CTC AT 3'
Preselective Amplification Primers	
E ⁺ _A	5' GAC TGC GTA CCA ATT CA 3'
M ⁺ _C	5' GAT GAG TCC TGA GTA AC 3'
Selective Amplification Primers	
E ⁺ _{AAC}	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAA C 3'
E ⁺ _{ACT}	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAC T 3'
E ⁺ _{ACC}	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAC C 3'
M ⁺ _{CAG}	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA G 3'
M ⁺ _{CTG}	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACT G 3'
M ⁺ _{CCT}	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACC T 3'

วิธีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

1. การสกัดดีเอ็นเอจากปลาตุ๊กลำพัน

สกัดดีเอ็นเอจากครีบหางของปลาตุ๊กลำพัน ด้วยวิธี Proteinase K / Phenol – Chloroform โดยดัดแปลงจากวิธีของ โรมานา – เอคว์ อีเคดา บาสิโอ และ ทานิกุชิ (Romana – Eguia, Ikeda, Basiao and Taniguchi. 2004 : 131 – 150) มีวิธีการดังนี้

นำครีบบางปลาคุณภาพขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ที่แช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาใส่หลอดทดลอง ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ TNES – Urea จำนวน 700 ไมโครลิตร ใช้กรรไกรตัดตัวอย่างให้ละเอียด เติม Proteinase K จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และทำการเขย่าตัวอย่างทุกๆ 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย PCI (Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol ในอัตราส่วน 25 : 24 : 1) จำนวน 700 ไมโครลิตร เขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย PCI และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย CI (Chloroform : Isoamyl Alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1) จำนวน 700 ไมโครลิตร เขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย CI และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ pH 5.2 ปริมาตร 1 ใน 10 ของสารละลายที่ได้ เติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ได้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายออกจากหลอดให้เหลือส่วนที่เป็นตะกอนที่อยู่บริเวณก้นหลอด เติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 300 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ค่อยๆ เทสารละลายออกจากหลอด ล้างตะกอนอีกครั้ง แล้วคว่ำหลอดลง จะมีส่วนที่เป็นตะกอนของดีเอ็นเอเป็นสีขาว ค่ำทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าดีเอ็นเอจะแห้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตรลงในหลอดเพื่อละลายตัวอย่างดีเอ็นเอ เก็บ ดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงและวิธีการวัดการเรืองแสงร่วมกับเอซีเดียมโบรไมด์ โดยใช้วิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส

2.1 วิธีการวัดการดูดกลืนแสง

เนื่องจากดีเอ็นเอมี องค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ สูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนดูดกลืนได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร ดังนั้นจึงใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 µg/ml

สามารถดูดกลืนแสงได้ ค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) = 1 ปริมาณวัดได้ โดยวิธีนี้จะแน่นอนและสามารถตรวจสอบคุณภาพได้ โดยการเปรียบเทียบค่า OD_{260} และ OD_{280} สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260} / OD_{280} ประมาณ 1.8 ถ้าได้ค่ามากแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนและถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล วิธีการปฏิบัติ คือนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้เจือจางลงแล้ววัดค่า OD_{260} และ OD_{280} แล้วจึงคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้อง จากสูตร ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ($\mu\text{g} / \text{ml}$) = $OD_{260} \times 50 (\mu\text{g} / \text{ml}) \times \text{Dilution Factor}$ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552 : 248 - 249)

2.2 วิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส Agarose Gel Electrophoresis

นำดีเอ็นเอที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X Loading Dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วมาใส่ในแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ตั้งกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 25 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร จากนั้นนำเจลไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต สังเกตการเรืองแสงของ ดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบกับผลการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้เครื่อง Gel Document

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอฟแอลพี

3.1 ย่อยดีเอ็นเอของปลาคูกลำพัน ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Digestion) ใช้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* (ตารางที่ 3.2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิบัติการย่อยดีเอ็นเอ

องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิบัติการ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. NEBuffer 2 (10x)	3.00
2. BSA (100x)	0.30
3. <i>EcoRI</i> (20 U/ μl)	0.25
4. <i>MseI</i> (10 U/ μl)	0.50
5. DNA (100 ng/ μl)	5.00
6. Sterile Distilled Water	20.95
รวม	30.00

3.2 เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ Adapter (Ligation) โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอด้วย *EcoRI* Adapter และ *MseI* Adapter (ตารางที่ 3.3) บ่มที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. T4 DNA Ligase Buffer with 10 mM ATP (10x)	3.0
2. <i>EcoRI</i> Adapter (5 pmole)	2.8
3. <i>MseI</i> Adapter (50 pmole)	2.8
4. T4 DNA Ligase (400 U/ μ l)	0.5
5. Sterile Distilled Water	0.9
6. ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	20.0
รวม	30.0

3.3 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขั้นที่ 1 (Preselective Amplification) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.4) โดยใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขั้นที่ 1

องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. PCR Buffer (10x)	4.0
2. MgCl ₂ (50 mM)	2.0
3. dNTPs (10 mM)	0.8
4. Primer E+ _A (50 pmole)	1.0
5. Primer M+ _C (50 pmole)	1.0
6. <i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/μl)	0.5
7. Sterile Distilled Water	29.7
8. ดีเอ็นเอที่ได้รับการเชื่อมต่อ	1.0
รวม	40.0

3.4 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขั้นที่ 2 (Selective Amplification) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 เบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จาก Preselective Amplification เจือจางลง 5 เท่า (ตารางที่ 3.5) โดยใช้โปรแกรม Touch Down PCR ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และลดอุณหภูมิลงในขั้น Annealing ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส จำนวน 4 รอบ และต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 36 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3.5 องค์ประกอบและปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขั้นที่ 2

องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1. PCR Buffer (10x)	2.0
2. MgCl ₂ (50 mM)	0.6
3. dNTPs (10 mM)	0.4
4. Primer E _{ANN} ⁺ (50 pmole)	0.5
5. Primer M _{CNN} ⁺ (50 pmole)	0.5
6. <i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/μl)	0.1
7. Sterile Distilled Water	14.9
8. ดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณขั้นที่ 1 ที่ทำเจือจางแล้ว	1.0
รวม	20.0

3.5 แยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี Denaturing Polyacrylamide Gel

3.5.1 เตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยนำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย Bind Silane (Bind Silane 4 ไมโครลิตร Glacial Acetic Acid 1 ไมโครลิตร และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 995 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลติดกระจก เช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย Repel Silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5 นาที แล้วนำกระจกทั้งสองแผ่นประกอบเข้าชุด โดยวาง Spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจก

3.5.2 เตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล ใช้เจลความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ของ Acrylamide : Bisacrylamide (19 : 1) (ตารางที่ 3.6) เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็มแล้วเสียบหัว ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.6 องค์ประกอบของโพลีอะครีลาไมด์เจล

องค์ประกอบ	ปริมาณ
1. 40% Polyacrylamide (19:1)	11.25 มิลลิลิตร
2. 10X TBE Buffer	7.50 มิลลิลิตร
3. Urea	33.75 กรัม
4. Sterile Distilled Water	21.68 มิลลิลิตร
5. 10% Ammonium Persulfate*	750.00 ไมโครลิตร
6. TEMED*	37.50 ไมโครลิตร
รวม	75.00 มิลลิลิตร

หมายเหตุ * เดิมก่อนเทเจล

3.5.3 แยกขนาดของซันดีเอ็นเอ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยนำเจลที่แข็งตัวแล้ว ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออก แล้วประกบ อบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟเรซิส เติม 1X TBE Buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่างของ Chamber ทำการ Pre - Run โดยใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ นาน 30 นาที เตรียมตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR AFLP โดยผสมกับ loading dye (98% Formamide, 10 mM EDTA, 0.1% Bromophenol Blue, 0.1% Xylene Cyanol) ในปริมาณเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอ แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วฝั่งกลับในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นจึงหยอดตัวอย่างลงในช่องเจล แล้วรัน (Run) อิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง

3.5.4 ย้อมแถบดีเอ็นเอโดยวิธี Silver Staining นำกระจกด้านที่มีเจลแช่ในสารละลาย Fixative (10% Acetic Acid) นาน 30 นาที เขย่าเบาๆ แล้วล้างน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที หลังจากนั้นแช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.2% Silver Nitrate) นาน 30 นาที แล้วนำเจลล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วประมาณ 10 วินาที นำเจลแช่ในสารละลาย Developer (2.5% Sodium Carbonate, 0.17% Formaldehyde, 5% Sodium Thiosulfate) ที่เย็นจัดเขย่าอย่างสม่ำเสมอจนกว่าจะสังเกตเห็นแถบ

ดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำเจลแช่ในสารละลาย Stop (10% Acetic Acid) นาน 3 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยบันทึกข้อมูล การมีหรือไม่มี แถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปลาทุกลำพัน โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบเป็น 1 และที่ไม่ปรากฏแถบเป็น 0 จากนั้นนำไปคำนวณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากร ได้แก่ เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิก Nei's Gene Diversity (H_T) Shannon's Information Index (I_s) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ของ Nei. (1973) (G_{ST}) ด้วยโปรแกรม POPGENE Version 1.31 (Nei, 1978) คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมของ Nei (1972) และนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Means) ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc Package