



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและ
การศึกษาหา candidate genes ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุกของหอยมุกน้ำจืด

Development of Molecular Markers Specific to Economically Important Species and
Study for Candidate Genes Producing Pearl of Freshwater Pearl Mussels

นามผู้วิจัย

นายเสวต วรรณรัตนรัฐ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์อุทัยวรรณ โกวิทวาทิ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและ
การศึกษาหา candidate genes ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุกของหอยมุกน้ำจืด

Development of Molecular Markers Specific to Economically Important Species and
Study for Candidate Genes Producing Pearl of Freshwater Pearl Mussels

โดย

นายเสวต วรรณรัตน์รัฐ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2554

เสวต วรรณรัตน์รัฐ 2554: การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และการศึกษาหา candidate genes ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมูกของหอยมูกน้ำจืด ปรินญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 77 หน้า

รวบรวมหอยกาน้ำจืดสายพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* (สามารถสร้างมูกได้ดี) *Hyriopsis desowitzi* และ *Hyriopsis myersiana* (สามารถสร้างมูกได้ดีปานกลาง) เพศผู้เพศเมียชนิดละ 4 ตัวอย่าง และหอยกาน้ำจืดสายพันธุ์ *Uniandra* sp. (ไม่สามารถสร้างมูกได้) 4 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 28 ตัวอย่างจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา ลุ่มน้ำมูล และลุ่มน้ำแม่กลอง สกัดดีเอ็นเอจากส่วนของแมนเทิลด้วยวิธีที่ประยุกต์จากวิธีของ Winnepeninnic *et al.* (1993) และ Stothard *et al.* (1995) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP พบว่ามี 9 คู่ไพรเมอร์จาก 24 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความต่างระหว่างหอยกาน้ำจืดสายพันธุ์ที่สร้างมูกได้ดี สร้างมูกได้ดีปานกลาง และไม่สามารถสร้างมูกได้ ทั้งหมด 28 แถบดีเอ็นเอ คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 15 แถบนามาโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พัฒนาไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 17 คู่ นำไปทดสอบกับตัวอย่างหอยทั้ง 28 ตัวอย่าง พบว่ามี 3 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความจำเพาะกับหอยพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ขณะที่ *Hyriopsis desowitzi*, *Hyriopsis myersiana* และ *Uniandra* sp. มีอย่างละ 1 คู่ไพรเมอร์ การศึกษาการแสดงออกของยีนในหอยมูกน้ำจืดสายพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ในระยะตัวอ่อน (glochidia) และระยะโตเต็มวัยโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP และ differential display จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค cDNA-AFLP โดยใช้ 64 คู่ไพรเมอร์พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 16 แถบดีเอ็นเอ ขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิค differential display โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 136 คู่ของ oligo dT/random primers พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 14 แถบดีเอ็นเอ ผลจากการโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 7 แถบดีเอ็นเอจาก differential display และ 6 แถบดีเอ็นเอจาก cDNA-AFLP และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับหอยพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ซึ่งเป็นพันธุ์ที่สร้างมูกได้ดีได้ถูกพัฒนาเพิ่มจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และตรวจสอบความจำเพาะกับสายพันธุ์เปรียบเทียบกับหอยสายพันธุ์อื่น

Sawate Vannarattananarat 2011: Development of Molecular Markers Specific to Economically Important Species and Study for Candidate Genes Producing Pearl of Freshwater Pearl Mussels. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 77 pages.

Four samples of each female and male freshwater Amblemid mussels, *Chamberlainia hainesiana* (producing pearl at high level), *Hyriopsis desowitzi* and *Hyriopsis myersiana* (producing pearl at moderate level) together with four samples of *Uniandra* sp. (not producing pearl) were collected from the Chao-phra-ya river, Mun river and Mae Klong river. DNA of all 28 samples were extracted from mantle tissues by the method modified from Winnepeninc *et al.* (1993) and Stothard *et al.* (1995). DNA fingerprints were generated using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique. Nine out of 24 primer pairs could be used to identify the species of Amblemid mussels. Fifteen clear bands from 28 specie specific DNA bands were selected for cloning and sequencing. Seventeen specie specific primer pairs were developed and then were tested with 28 samples of freshwater mussels. Three markers were found specific to *Chamberlainia hainesiana*, whereas one marker was specific to each species of *Hyriopsis desowitzi*, *Hyriopsis myersiana* and *Uniandra* sp. Comparison for different gene expression between glochidia and adult freshwater pearl mussel, *Chamberlainia hainesiana* was performed using cDNA-AFLP and differential display techniques. DNA fingerprints from cDNA-AFLP with 64 combinations of primer pairs produced 16 different DNA bands between glochidia and adult samples, whereas 14 different DNA bands were obtained from differential display with 136 pairs of oligo dT/random primers. Seven bands from differential display and six bands from cDNA-AFLP were cloned and sequenced and compare to database. All sequences obtained were found not match any sequences in Genbank. DNA marker specific to *Chamberlainia hainesiana*, the mussel that producing pearl at high level, was developed more from the DNA sequences obtained and tested for specificity compare to other mussels

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หงษ์ตระกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อุทัยวรรณ โกวิทวาทิ กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ การช่วยเหลือแก้ไขปัญหาต่างๆ ทั้งในด้านการทดลองและการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ คุณอ้อมเดือน มีจู๋ นักวิชาการประมงชำนาญการ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กาญจนบุรี ที่กรุณาให้ตัวอย่างหอย *Chamberlainia hainesiana* สำหรับการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอน มอบความรู้ อันเป็นประโยชน์ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุศาสตร์และภาควิชาสัตววิทยา รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ โดยเฉพาะสมาชิกห้อง NV4511 ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา คำแนะนำและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยปี 2550-2551 และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปี 2552 ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และสมาชิกในครอบครัวที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา

เสวต วรรณรัตน์รัฐ

มิถุนายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	41
สรุป	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter ทั้ง 2 ชนิด	29
2 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำ preselective amplification ด้วยเทคนิค AFLP	30
3 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำ selective amplification ด้วยเทคนิค AFLP	31
4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 และ 3 นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' สำหรับการทำ AFLP	32
5 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้เตรียม 6% denaturing polyacrylamide gel	33
6 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค differential display 70 ชนิด	37
7 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค differential display	38
8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิค AFLP และจำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะที่คัดเลือก	43
9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 17 คู่ที่พัฒนาจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP	51
10 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะกับพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด	52
11 ไพรเมอร์แบบคู่ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค differential display	59
12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> โดยเทคนิค differential display	66
13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> โดยเทคนิค cDNA – AFLP	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สัณฐานวิทยาของหอยกาบน้ำจืด	5
2	ลักษณะภายนอกของเปลือก	6
3	ลักษณะภายในของเปลือก	6
4	ลวดลายของบิกหรืออัมโบ	7
5	เปลือกรูปแบบต่างๆ ของหอยกาบน้ำจืด	8
6	วัฏจักรชีวิตของหอยกาบน้ำจืด	9
7	ขั้นตอนการทำ Differential display	17
8	ขั้นตอนการทำ cDNA-AFLP	18
9	หอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ที่ใช้ในการศึกษา	21
10	จีโนมิกดีเอ็นเอของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> (1-4 เพศผู้, 5-8 เพศเมีย), <i>Hyriopsis desowitzi</i> (9-12 เพศผู้, 13-16 เพศเมีย), <i>Hyriopsis myersiana</i> (17-20 เพศผู้, 21-24 เพศเมีย) และ <i>Uniandra sp.</i> (25-28) รวม 28 ตัวอย่าง จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 1% agarose gel	41
11	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT	44
12	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTA	45
13	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTC	46
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ หอยมุกน้ำจืด	50
15	ผลของการตรวจสอบไพรเมอร์ PM8(A), PM11(B), PM15(C) กับตัวอย่าง หอยมุกน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่างซึ่งให้ความจำเพาะกับ <i>Chamberlainia hainesiana</i>	54
16	ผลของการตรวจสอบไพรเมอร์ PM14(A), PM9(B), PM6(C) กับตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด ทั้ง 28 ตัวอย่างซึ่งให้ความจำเพาะกับ <i>Hyriopsis desowitzi</i> , <i>Hyriopsis myersiana</i> และ <i>Uniandra sp.</i> ตามลำดับ	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ผลของการตรวจสอบไพรเมอร์ PM4(A), PM5(B), PM10(C) , PM13(D) กับตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่างซึ่งให้ความจำเพาะกับสกุล <i>Hyriopsis</i>	56
18	ผลจากการทดสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ซึ่งมีความจำเพาะกับหอยพันธุ์ต่างๆกับ (A) หอยแครง (B) หอยแมลงภู่งจากการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis	57
19	อาร์เอ็นเอของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> จากตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย 5 ตัวอย่าง และระยะโตเต็มวัย 2 ตัวอย่าง จากการทำ electrophoresis ใน 1% agarose gel	58
20	ผลที่ได้จากการทำ differential display ในหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> ระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยโดยใช้ไพรเมอร์ (A) E14/T ₁₂ AG, E16/T ₁₂ AG, E18/T ₁₂ AG และไพรเมอร์ (B) OPF13/T ₁₂ CA, OPF14/T ₁₂ CA, OPF15/T ₁₂ CA	61
21	ตัวอย่างแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำ cDNA-AFLP ในหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> เปรียบเทียบระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย โดยใช้ไพรเมอร์ (A) E- AAC/ M- CTA, CTC, CTG, CTT (B) E -ACC/ M - CTA, CTC, CTG, CTT	63
22	ตัวอย่างแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำ cDNA-AFLP ในหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> เปรียบเทียบระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย โดยใช้ไพรเมอร์ (A) E – ACG/ M – CAA, CAC, CAG, CAT และ (B) E – AGG/ M - CTA, CTC, CTG, CTT	64
23	การตรวจสอบความจำเพาะกับพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ <i>Chamberlainia hainesiana</i> โดยใช้ไพรเมอร์ CAF9-F/ CAF9-R กับตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่าง	69

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
และการศึกษาหา candidate genes ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุกของหอยมุกน้ำจืด

Development of Molecular Markers Specific to Economically Important Species
and Study for Candidate Genes Producing Pearl of Freshwater Pearl Mussels

คำนำ

หอยมุกน้ำจืดจัดเป็นหอยกาบชนิดหนึ่ง ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีประโยชน์ต่อสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำ เนื่องจากหอยมีการกินอาหารแบบการกรอง (filter feeding) ดังนั้น ตะกอนและสารอินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณที่หอยอาศัยจะถูกกรองไปด้วย จึงทำให้น้ำบริเวณนั้นใส นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นอาหารได้ ซึ่งหอยมีโปรตีนสูงถึง 40.17% (ชันนารี, 2539 อ้างถึง Post, 1982) จึงมีผู้นิยมนำไปประกอบอาหาร ทั้งนี้ประเทศไทยมีความสามารถในการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบทางด้านสภาพภูมิอากาศและมีชนิดของหอยกาบน้ำจืดที่สามารถสร้างมุกได้ ประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดในเชิงการค้า ได้แก่ ญี่ปุ่น อินเดีย จีน ออสเตรเลีย (อัมพร, 2535 อ้างถึง Lyman, 1986) ในประเทศจีนมีอุตสาหกรรมการผลิตจากไข่มุกน้ำจืดซึ่งพบว่ามีกรดอะมิโน 17 ชนิดและแร่ธาตุ 8 ชนิด (อรภา และคณะ, 2529, 2547) ซึ่งทางการแพทย์มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง อาหารเสริม ส่วนเปลือกหอยของกาบน้ำจืดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายเช่น ทำกระดุมหรือสิ่งของเครื่องใช้ต่างๆ เพราะเปลือกของหอยบางชนิดมีลักษณะแวววาว สำหรับหอยมุกน้ำจืดที่มีเปลือกหนาสามารถนำมาใช้ทำเป็นนิวเคลียสได้เป็นอย่างดีเพื่อทำแกนสำหรับผลิตไข่มุกแบบมีแกนในหอยมุกทะเล หอยกาบน้ำจืดที่นิยมใช้ศึกษาการสร้างมุกอยู่ในวงศ์ Amblemidae อันดับ Unionoida ชั้น Bivalvia ไฟลัม Mollusca (Brandt, 1974) ซึ่งสามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย มี 7 ชนิด ได้แก่ *Chambelainia hainesiana*, *Hyriopsis bialatus*, *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi*, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*, *Pseudodon inoscularis cumingi*, *Pseudodon vondembuschianus ellipticus*, และ *Pseudodon sp.*

ปัจจุบันปริมาณของหอยลดน้อยลงมาก เนื่องจากสาเหตุหลายประการเช่น การเก็บหอยขึ้นมาจำนวนมากโดยไม่คำนึงถึงการอนุรักษ์ สภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำมีสภาพเสื่อมลง เนื่องจากการขยายตัวของโรงงานอุตสาหกรรม มีการปล่อยน้ำเสียที่ขาดการบำบัดลงไปในแหล่งน้ำทำให้หอยไม่สามารถอยู่ได้ รวมทั้งปลาที่เป็นผู้ให้อาศัยในการดำรงชีวิตของหอยลดจำนวนลงด้วย ซึ่งมีผลกระทบต่อวงจรชีวิตของหอยเป็นอย่างมาก ในฟาร์มเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดในต่างประเทศเช่น ญี่ปุ่น เยอรมัน ต้องมีการปิดฟาร์มลงไปเนื่องมาจากปริมาณหอยที่มีไม่เพียงพอ สำหรับในประเทศไทย การศึกษาหอยมุกน้ำจืดพบว่ามีข้อมูลน้อยมาก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษานานกว่า30 ปี และการจัดจำแนกเป็นเพียงการเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยเท่านั้น จากการศึกษาของ ประทุม (2545) พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถจำแนกหอยได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากพบว่าหอยกาน้ำจืดบางสกุล รูปร่างเปลือกหอยมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกได้อย่างชัดเจน กีกฤทธิ (2548) ได้ศึกษาการจัดจำแนกหอยกาน้ำจืดจากกลุ่มน้ำบางแห่งในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ของยีน *COI* พบว่าสามารถจำแนกหอยชนิดเดียวกันจากต่างแหล่งแต่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันได้ นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP กับหอยกาน้ำจืดที่สามารถสร้างมุกได้ดีและไม่สร้างมุกก็ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันพอสมควร จึงน่าจะมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และศึกษาหาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุกของหอยกาน้ำจืด ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลสำคัญเพื่อเป็นแนวทางการความเข้าใจเกี่ยวกับการสร้างมุกของหอยมุกน้ำจืดและนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ เพาะขยายพันธุ์ที่ถูกต้องเพื่อเป็นการอนุรักษ์หอยกาน้ำจืดให้คงอยู่และเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับชนิดของหอยมุกน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
2. เพื่อศึกษาหา candidate genes ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมุก



การตรวจเอกสาร

1. อนุกรมวิธานของหอยกาน้ำจืด (Brant, 1974)

(✓ สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา)

Kingdom	Animalia
Phylum	Mollusca
Class	Bivalvia
Subclass	Schizodontida
Order	Unionoida
Family	Amblemidae
Subfamily	Pseudodontinae
Genus	<i>Pilsbryoconcha</i>
Genus	<i>Pseudodon</i>
Subfamily	Hyriopsinae
Genus	<i>Hyriopsis</i> ✓
Genus	<i>Chamberlainia</i> ✓
Genus	<i>Cristaria</i>
Subfamily	Parreysiinae
Genus	<i>Parreysia</i>
Genus	<i>Unionetta</i>
Genus	<i>Scabies</i>
Genus	<i>Harmandia</i>
Genus	<i>Indonaia</i>
Subfamily	Rectidentinae
Genus	<i>Ensidens</i>
Genus	<i>Uniandra</i> ✓
Genus	<i>Physunio</i>
Genus	<i>Trapezoideus</i>

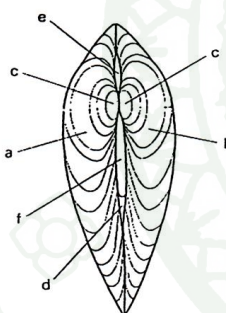
Subfamily Modellnainae

Genus *Modellnaia*

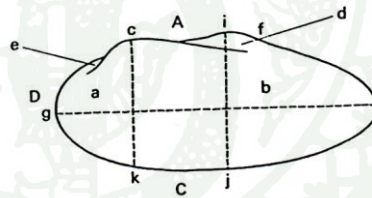
2. ลักษณะทั่วไปของหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae

หอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอยู่ในไฟลัม Mollusca อยู่ในชั้น Bivalvia พบอาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำจืดทั่วทุกภาคของประเทศไทย ลักษณะสำคัญของหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae คือ

เปลือก เปลือกมีขนาดกลางถึงใหญ่ ขนาดของเปลือกเท่ากันทั้ง 2 ข้างและปิดได้สนิท เปลือกทั้งสองประกบติดกันด้วยอิลาสติกลิเกเมนต์ (elastic ligament) และมีลักษณะทั่วไปของเปลือกดังภาพที่ 1



ก.



ข.

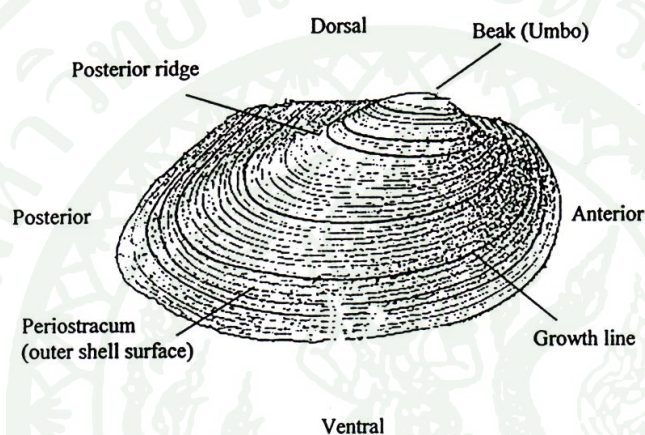
ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นฐานวิยาของหอยกาน้ำจืด

ก. ลักษณะเปลือกด้านบน a: เปลือกด้านซ้าย, b: เปลือกด้านขวา, c : umbones, d : escutcheon, e : lunule, f : external ligament

ข. ลักษณะทั่วไปของเปลือก a : anterior part, b : posterior part, c : umbo, d : escutcheon, e : lunule, f : posterior slope, i-j : height, c-k : perpendicular connecting umbones, A : upper หรือ dorsal edge, B : posterior edge, C : lower หรือ ventral edge, D : anterior edge

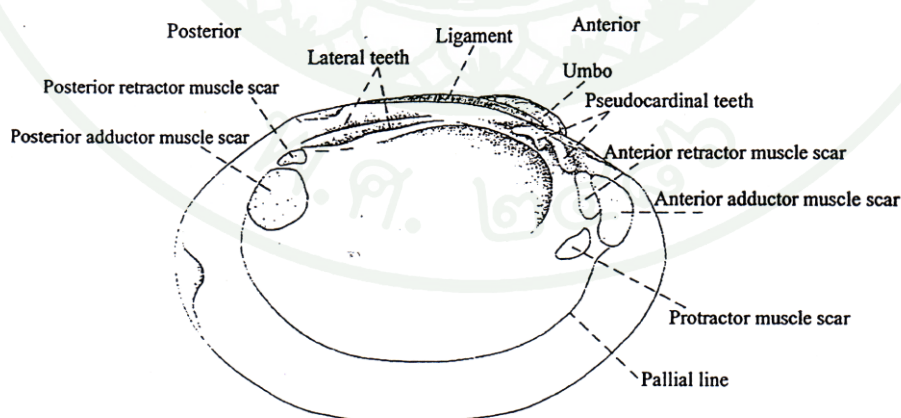
ที่มา: Pflegere (1990)

ด้านในของเปลือกยึดกันแน่นด้วยบานพับ (hinge) บานพับประกอบด้วยฟันแลเทอร์ล (lateral teeth) ซึ่งมีลักษณะยาวเรียวอยู่ใต้ลิแกเมนต์และอยู่ทางด้านท้ายของเปลือก ฟันชูโคคาร์ดินัล (pseudocardinal teeth) มีขนาดสั้นกว่าฟันแลเทอร์ลมากและอยู่ทางด้านหน้าของเปลือกอินเตอร์เดนทัม (interdentum) เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างฟันแลเทอร์ลและฟันชูโคคาร์ดินัล บริเวณไดอินเตอร์เดนทัมเป็นช่องปาก (beak cavity) ซึ่งจะติดกับปาก (beak) หรืออัมโบ (umbo) อัมโบอยู่ทางด้านบนก่อนไปทางด้านหน้าของเปลือก (ภาพที่ 2 และ 3)



ภาพที่ 2 ลักษณะภายนอกของเปลือก

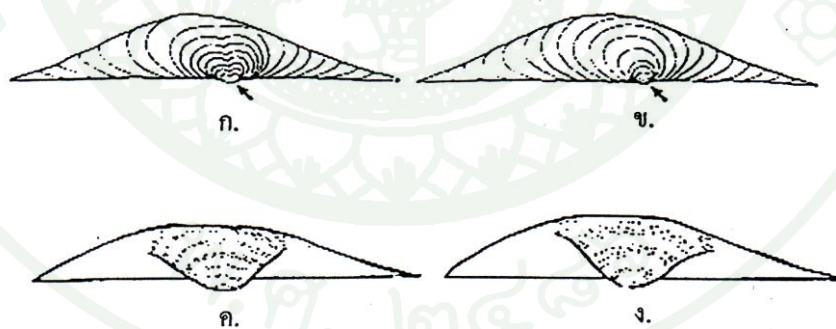
ที่มา: Pennak (1978)



ภาพที่ 3 ลักษณะภายในของเปลือก

ที่มา: Pennak (1978)

อัมโบ อัมโบมีลวดลายต่างๆ กัน (ภาพที่ 4) เช่น ลายหยัก (ภาพที่ 4 ก) ลายวงกลมซ้อน (ภาพที่ 4 ข) เป็นสันบาง (ภาพที่ 4 ค) หรือเป็นสันหนา (ภาพที่ 4 ง) ถัดจากพื้นแลเทอรัลซึ่งอยู่ทางด้านท้ายของเปลือกลงมาทางด้านล่างของเปลือกจะมีรอยกล้ามเนื้อ (muscle scar) ซึ่งมีลักษณะกลมใหญ่ๆ อยู่ 2 รอย คือ รอยกล้ามเนื้อฟีคัลรีแทรกเตอร์ (pedal retractor muscle scar) ซึ่งเป็นรอยที่เล็กกว่าและอยู่ใต้พื้นแลเทอรัลและรอยกล้ามเนื้อแอคคักเตอร์ด้านหลัง (posterior adductor muscle scar) ซึ่งเป็นรอยที่ใหญ่กว่าและอยู่ใต้กล้ามเนื้อฟีคัลรีแทรกเตอร์ด้านหลัง ด้านหน้าของเปลือกอยู่ในแนวเดียวกันกับรอยทั้งสองจะพบรอยกล้ามเนื้อซึ่งมีลักษณะกลมหรืออยู่ 3 รอย คือ รอยกล้ามเนื้อแอคคักเตอร์ด้านหน้า (anterior adductor muscle scar) ซึ่งอยู่ทางด้านหน้าของพื้นชูโคคาร์ดินัล และรอยกล้ามเนื้อฟีคัลโปรแทรกเตอร์ (pedal protractor muscle scar) ซึ่งอยู่ด้านล่างสุด นอกจากนี้ยังมีรอยที่ลักษณะเป็นเส้นโค้งอยู่ทางด้านล่างสุดของเปลือกด้านใน ซึ่งแสดงถึงส่วนของขอบแมนเทิล (mantle) ที่ติดกับเปลือกและเชื่อมระหว่างรอยกล้ามเนื้อทางด้านหน้าและหลัง ซึ่งเรียกว่า เส้นแพลเลียล (pallial line) ด้านนอกของเปลือกจะพบเส้นตามแนวนอนของเปลือกหรือเส้นการเติบโต (growth line) ซึ่งเป็นเส้นละเอียดเรียงซ้อนกัน โดยเริ่มจากบริเวณอัมโบไปสิ้นสุดทางด้านล่างของเปลือก ทางด้านหลังของเปลือกจะมีสันยาวตลอดแนวตั้งซึ่งอาจมีลักษณะโค้งนูนหรือเว้า

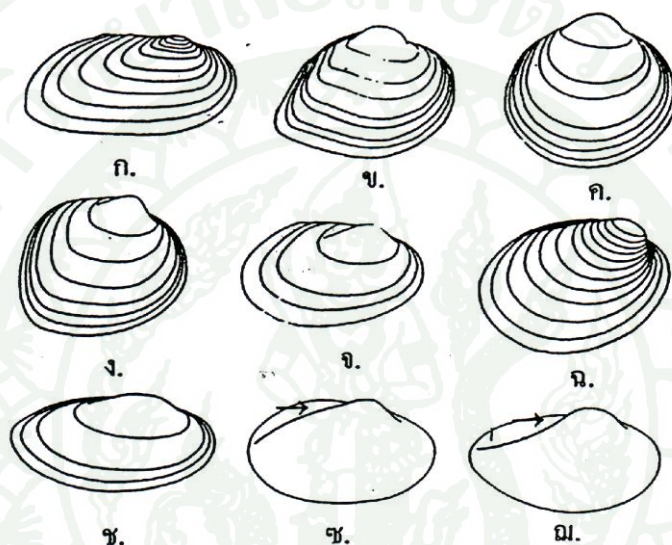


ภาพที่ 4 ลวดลายของปีกหรืออัมโบ

ก. ลายหยัก ข. ลายวงกลมซ้อน ค. เป็นสันบาง ง. เป็นสันหนา

ที่มา: Pennak (1989)

รูปร่างของเปลือก รูปร่างของเปลือกของหอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae มีหลายแบบด้วยกัน เช่นอาจจะเป็นรูปสี่เหลี่ยมด้านไม่เท่า รูปสามเหลี่ยม รูป 1/4 ของวงกลม รูปไข่และรูปรี ในบางชนิด ด้านหน้าและด้านหลังหรือเฉพาะด้านหลังจะมีแฉกตัวสูงขึ้นและยื่นออกมา มีลักษณะคล้ายปีก (wing) หรือบางชนิดมีสันด้านหลังโค้งนูนขึ้นหรือเว้าลงไปเปลือก (สุชาติ และคณะ, 2538) (ภาพที่ 5)



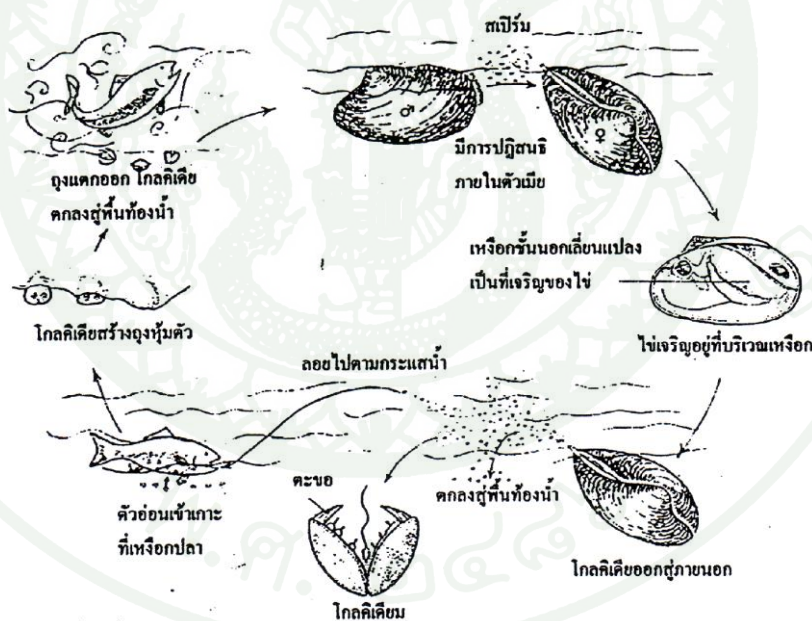
ภาพที่ 5 เปลือกรูปแบบต่างๆ ของหอยกาบน้ำจืด ก.รูปสี่เหลี่ยมด้านไม่เท่า ข. รูปสามเหลี่ยม ค. รูปกลม ง. รูป 1/4 ของวงกลม จ. รูปไข่ ฉ. และข. รูปรี ช. เปลือกมีสันด้านหลังโค้งนูน ฉ. เปลือกมีสันด้านหลังเว้าลง

ที่มา: Pennak (1989)

เปลือกของหอยกาบน้ำจืดวงศ์นี้ประกอบด้วย เปลือกชั้นนอกเรียกว่าเพอริโอสตราตัม (periostratum) ลักษณะบางมีสี ประกอบด้วยสารคอนคิโอลิน (conchiolin) ซึ่งเป็นสารโปรตีนของเขาสัตว์ เปลือกชั้นกลางเรียกว่า ปริสมาติก (prismatic) เป็นชั้นที่มีความหนาแน่นมากกว่าชั้นอื่นๆ ประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) และผลึกของแคลไซต์ (calcite) หรืออะราโกไนต์ (aragonite) เปลือกชั้นในเรียกว่าเนเคียส (nacreous) ซึ่งเป็นชั้นที่เป็นผลึกของแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีลักษณะเป็นแผ่นบางและมันวาวเรียงซ้อนกัน เป็นชั้นมุกและเป็นบริเวณที่มีการสร้างมุก (pearl) ในหอยบางชนิด (สุชาติ และคณะ, 2538)

3. วงจรชีวิตของหอยกาบน้ำจืด

หอยกาบน้ำจืดมีเพศแยกเป็นเพศผู้และเพศเมีย รังไข่และอวัยวะอยู่ด้านบนบน foot และเชื่อมต่อกับ suprabranchial chamber ด้วยท่อสั้นๆ หอยมูกน้ำจืดมีการผสมพันธุ์แบบภายใน เพศผู้จะปล่อยสเปิร์มออกสู่น้ำ ทางช่องน้ำออก จากนั้นสเปิร์มจะผสมกับน้ำเข้าไปผสมกับไข่ในเพศเมีย ทางช่องน้ำเข้า (incurrent siphon) ของหอยเพศเมียผ่าน ostia ของแผ่นเหงือกและปฏิสนธิกับไข่ในท่อน้ำ เหงือกของหอยเพศเมียจะพองออกเป็นถุงเรียก marsupial หรือ good chamber ตัวอ่อนหรือไกลคิเดียมออกจาก suprabranchial chamber ผ่านช่องน้ำออก ออกสู่น้ำและตกลงพื้น จากนั้นจะไปเกาะที่เหงือก ครีบก และเกล็ดของปลาที่เป็นโฮสต์ (host) ต่อจากนั้นจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่เรียกว่า จูวีไนล์ (juvenile) จึงหลุดออกจากโฮสต์ตกลงสู่พื้นท้องน้ำหากินเป็นอิสระและเจริญพัฒนาเป็นลูกหอยและตัวเต็มวัยต่อไป (Storer *et al.*, 1976) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของหอยกาบน้ำจืด

ที่มา: Storer *et al.* (1976)

4. การศึกษาเกี่ยวกับหอยกาบน้ำจืดและเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่งหรือในระดับต่างสปีชีส์ การที่จะใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้นั้นเนื่องจากเกิดความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ (polymorphism) (สุรินทร์, 2552) การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกตามวิธีการได้เป็น 2 วิธี วิธีแรกใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) โดยการนำ genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วย้ายชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกได้ไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) จากนั้นจึงไฮบริไดซ์ (hybridize) กับโพรบ (probe) ที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆที่มีการติดฉลากไว้ ดังนั้นจึงตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะที่จะไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเท่านั้น ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างขึ้นอยู่กับความแตกต่างของตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีนี้ ได้แก่ เครื่องหมาย RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อนนำมาตรวจสอบ วิธีนี้สามารถตรวจสอบได้ทั้งครั้งละหนึ่งตำแหน่ง (single locus detection) เช่น SSR (simple sequence repeat) เป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำสั้นๆเรียงต่อกัน หรือตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multi locus detection) ก็ได้เช่น RAPD (Random Amplify Polymorphic DNA) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม

4.1 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

พีซีอาร์ถูกคิดค้นโดย Mullis ในปี 1985 เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมีการเลียนแบบการจำลองตัวเองในเซลล์ (replication) โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น และดีเอ็นเอต้นแบบไม่ต้องอยู่ในสภาพที่ดี (วิสุทธิ, 2536) เทคนิคนี้เป็นที่นิยมเนื่องจากง่ายและรวดเร็วจึงได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆอีกมากมาย

องค์ประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ ไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์ ปริมาณใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมอยู่ที่ 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

2.ไพรเมอร์ เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์

3.เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีบางช่วงที่ใช้ อุณหภูมิสูง เอนไซม์ที่ใช้จึงควรที่จะทนความร้อนได้ เช่น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus*

4.ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ประกอบด้วย dATP, dGTP, dCTP, dTTP

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นองค์ประกอบสำคัญสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสในปฏิกิริยาพีซีอาร์

โดยวัฏจักรของพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว
2. Annealing เป็นการทำลดอุณหภูมิให้ไพรเมอร์เข้ามาจับ
3. Extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบต่อจากไพรเมอร์

4.2 Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)

เป็นเทคนิคหนึ่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ถูกพัฒนาขึ้น โดย Vos และ Zabeau ในปี 1993 เป็นการรวมเอาเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และพีซีอาร์เข้าด้วยกัน ซึ่งเป็นการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเพิ่มผลผลิตโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยมีหลักการก็นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด โดยชนิดหนึ่งมีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบสเรียกว่า rare cutter มีตำแหน่งตัดน้อยครั้งในจีโนม จึงช่วยลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ อีกชนิดหนึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสเรียกว่า frequent cutter มีตำแหน่งมากครั้งในจีโนม เพื่อให้ได้ขนาดดีเอ็นเอหลังการตัดที่เหมาะสม เอนไซม์ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII* (6 base cutter) ร่วมกับ *MseI* หรือ *TaqI* (4 base cutter) แต่ส่วนใหญ่มักใช้ *EcoRI* คู่กับ *MseI*

แล้วต่อชิ้นดีเอ็นเอด้วย adapter เพื่อเป็นบริเวณจับของไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter ต่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดและนิวคลีโอไทด์คัดลอก เพื่อลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณให้ลดลง โดยจะทำพีซีอาร์ 2 ครั้ง เรียก preselective amplification และ selective amplification การทำ preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ แต่การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอในคราวเดียวกันมีมากและไม่สามารถแยกออกจากกันได้ จึงต้องมีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์คัดลอกขึ้นบริเวณปลาย 3' ต่อจากนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ การเพิ่มนิวคลีโอไทด์คัดลอกนี้ขึ้นอยู่กับขนาดจีโนมของสิ่งมีชีวิต ถ้าจีโนมสิ่งมีชีวิตมีขนาดเล็กอาจจะไม่ต้องเพิ่มนิวคลีโอไทด์คัดลอกก็ได้ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้งนอกจากจะประกันว่าการคัดลอกชิ้นดีเอ็นเอถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้วยังเป็นการลด background ที่มักเห็นเป็นพื้นดำในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย ส่วน selective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกคัดลอกไว้แล้วให้จำเพาะขึ้น ก่อนการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจผลโดยการย้อมด้วยซิลเวอร์ ในเทรท แถบดีเอ็นเอที่พบปริมาณพอเหมาะจะอยู่ในช่วง 50-100 แถบ ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบสุ่ม ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับได้จากนิวคลีโอไทด์คัดลอกที่ใช้ ดังนั้นจึงเกิดการจับคู่หลายแบบ ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลายรูปแบบ ความแตกต่างหรือ polymorphism ที่เกิดขึ้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวได้ (สุรินทร์, 2552)

4.3 การศึกษาเกี่ยวกับหอยน้ำจืด

ด้านสัณฐานวิทยา

Graf (1997) ศึกษาหอยกาน้ำจืด *Fusconaia flava* วงศ์ Unionidae บริเวณตอนเหนือของแม่น้ำมิสซิสซิปปี บึงขนาดใหญ่และแม่น้ำเนลสัน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาศึกษาจากลักษณะการเพิ่มความใหญ่ ความยาวของเปลือก และลักษณะการพัฒนาของอัมโบปพบว่าลักษณะความหลากหลายของเปลือกจะสัมพันธ์กับบริเวณถิ่นที่อาศัยและขนาดของแหล่งน้ำ และยังพบอีกว่า *Fusconaia flava* เป็นพวกที่มีหลายลักษณะในชนิดเดียวกันโดยลักษณะความหลากหลายเป็นไปตามสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่

ประทุม (2545) รวบรวมและจำแนกหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ในลุ่มแม่น้ำมูล จาก สถานี 33 สถานีตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2542 ถึงเดือนเมษายน 2543 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบหอยกาน้ำจืดวงศ์นี้ 4 วงศ์ย่อย ได้แก่ Pseudodontinae, Hyriopsinae, Parrysiinae และ Rectidentinae แบ่งได้เป็น 10 สกุล 15 ชนิด 14 ชนิดย่อย โดยพบ *Pseudodon moscukris confregi* เป็นครั้งแรกในประเทศไทยและพบชนิดย่อยที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นชนิดย่อยใหม่

ด้านเซลล์วิทยา

Li and Havenhand (1995) ศึกษาวิเคราะห์โครโมโซมของหอย *Ostrea angasi* ในทวีป ออสเตรเลีย โดยนำเนื้อเยื่อของเหงือกมาทำเทคนิคการย้อม G-banding, C-banding และ silver stainig หรือ N-banding พบว่า *Ostrea angasi* จากแหล่งต่างๆที่นำมาศึกษา เช่น ในประเทศ ออสเตรเลีย ในประเทศนิวซีแลนด์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ $2n=2x=20$ แต่รูปร่างลักษณะ ของโครโมโซมแตกต่างกัน และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพวก *Ostrea angasi* ในแถบยุโรปจะมีความสัมพันธ์กันมากกว่าพวกที่พบในบริเวณแปซิฟิกตะวันตก

ชันนารี (2538) ได้จำแนกหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ในลุ่มน้ำยมและน่านของ ประเทศไทยจำนวน 7 ชนิด 4 ชนิดย่อย โดยใช้เซลล์จากเนื้อเยื่อเหงือกซึ่งมีอัตราการแบ่งตัวสูง พบว่าโครโมโซมของหอยทั้ง 7 ชนิด มีจำนวนเท่ากันคือ $2n=2x=38$ แต่จะมีความแตกต่างกันที่ ลักษณะรูปร่างของโครโมโซม โดยแต่ละชนิดจะมีความแปรผันของลักษณะรูปร่างที่มีความจำเพาะ ของแต่ละชนิด ทำให้ได้ข้อมูลที่สำคัญ ซึ่งจะนำไปใช้ประกอบกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี เครื่องหมายดีเอ็นเอ และลักษณะอื่นๆ ในการจัดจำแนกหมวดหมู่ของหอยกาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ต่อไป

Lee (2001) ศึกษาโครโมโซมของหอยกาน้ำจืดวงศ์ Sphaeriidae จากแม่น้ำทางเหนือหลาย แห่งในรัฐมิชิแกนประเทศสหรัฐอเมริกา โดยนำเอาส่วนของโกแนด (gonad) และตัวอ่อนที่อยู่ใน บริเวณเหงือกของแม่หอย มาทำเทคนิค squash แล้วย้อมด้วยสีย้อมโครโมโซม aceto-orcein พบว่ามี จำนวนโครโมโซม $2n=2x=152$ แต่จากการศึกษาหอยกาน้ำจืดวงศ์นี้ที่บริเวณอเมริกาเหนือและ ยุโรปได้มีผู้รายงานไว้ว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ $2n=2x=68-98$ แสดงว่าหอยกาน้ำจืดวงศ์ Sphaeriidae อาจจะเป็นพวกพอลิพลอยด์ ซึ่งปกติมักจะพบได้ยากในชั้นของ Bivalvia และคาดว่า น่าจะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้

ด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล

คึกฤทธิ์ (2548) ศึกษาการจัดจำแนกหอยกาน้ำจืดจากลุ่มน้ำเจ้าพระยาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ PCR-RFLP ของยีน *COI* เบื้องต้นพบว่าสามารถจำแนกหอยชนิดเดียวกันในแง่สถานวิทยาจากต่างแหล่ง และหอยที่มีลักษณะสถานวิทยาล้ายคลึงกันได้ นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP กับหอยที่รู้เพศแน่ชัด และหอยกาน้ำจืดพันธุ์ที่สร้างมุกได้และไม่สร้างมุก ก็ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันในเรื่องต้น

Yu *et al.* (2006) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของ *Pinctada fucata* (pearl oyster) ระหว่างประชากรที่เลี้ยงและประชากรธรรมชาติในตอนใต้ของจีนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP พบว่ามีความผันแปรสูงในระดับประชากร นอกจากนี้ Kong and Li (2007) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของ *Coelomactra antiquate* (Spengler) ระหว่างประชากรที่พบในธรรมชาติและประชากรที่เลี้ยงในประเทศจีนทางตอนเหนือและตอนใต้ พบประชากรมีความต่างทางพันธุกรรมระหว่างตอนเหนือและตอนใต้ ส่วนประชากรตอนใต้ทั้ง 2 บริเวณไม่มีความต่างกันทางพันธุกรรม

4.4 งานวิจัยการจำแนกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

Miao *et al.* (2009) ใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกยีนต้านทาน bacterial wilt ในมะเขือเทศ ซึ่งถูกกระตุ้นโดย *Ralstonia solanacearum* พบ 13 แอปติเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างต้นที่ต้านทานและต้นที่ไม่ต้านทาน จาก 256 คู่ไพรเมอร์ และมี 2 ไพรเมอร์ที่ถูกนำไปพัฒนาเป็น SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker เพื่อการจำแนกพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทาน และ Yi *et al.* (2009) ใช้ AFLP ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับสีเปลือกของมะเขือ (*Solanum melongena*) นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากแอปติเอ็นเอที่ได้มาพัฒนาเป็น SCAR markers และนำไปทดสอบกับดีเอ็นเอของมะเขือจำนวน 136 ตัวอย่าง พบ 2 คู่ไพรเมอร์ที่มีความสัมพันธ์กับสีเปลือกของมะเขือ (dark purple และ purplish red) JingPing *et al.* (2009) ใช้ AFLP ในการหาเครื่องหมายที่เชื่อมอยู่กับลักษณะ seedless ใน Ponkan mandarin หลังจากทดสอบด้วย 72 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 5 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกลักษณะดังกล่าวได้ เมื่อนำแอปติเอ็นเอ 5 แอปติเอ็นเอไปโคลน หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล พบว่ามี 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นยีน ซึ่งอาจทำให้เข้าใจกระบวนการมีลักษณะ seedlessness ในพืชตระกูล Citrus ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ถูกนำมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อพัฒนาเป็น SCAR markers Gao *et al.* (2007) ใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 100 ไพรเมอร์ จำแนก

เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับเพศของหน่อไม้ฝรั่ง พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างในเพศเมีย และได้พัฒนาเป็น SCAR markers ที่สามารถใช้ตรวจสอบหน่อไม้ฝรั่งเพศเมียได้ Osipova *et al.* (2003) ใช้ RAPD และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers ในการศึกษาความแตกต่างของ พันธุกรรมระหว่าง callus และ ต้นข้าวโพด พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างและนำมาพัฒนาเป็น SCAR marker ได้

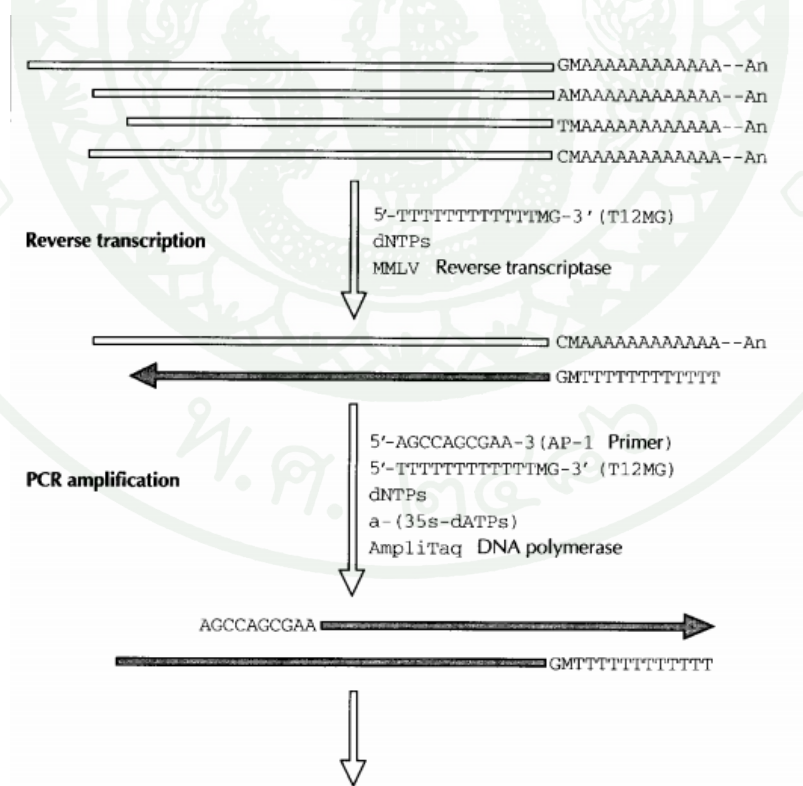
Wongnium *et al.* (2010) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและกำหนด ความสัมพันธ์ของกล้วยในประเทศไทย โดยนำกล้วย 110 ตัวอย่างมาทดสอบด้วยเครื่องหมาย AFLP และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) พบว่าสามารถแบ่งกล้วยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ซึ่งมีจีโนมเป็น AA กับ BB และพบ 8 คู่ ไพรเมอร์ที่สามารถระบุความจำเพาะกับพันธุ์ ซึ่งสามารถแยกกล้วยที่มีจีโนมเป็น A และ B ออกจาก กันได้อย่างชัดเจน สามารถตรวจได้ทั้งลูกผสมและสายพันธุ์ปกติ

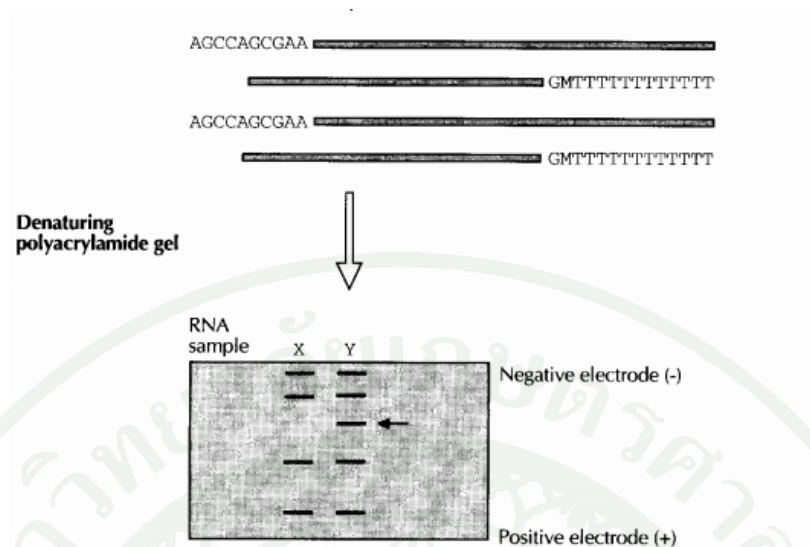
นอกจากจะมีการศึกษาในพืชแล้วยังมีงานวิจัยที่ศึกษาในสิ่งมีชีวิตอื่นๆเช่น Zhang *et al.* (2007) ใช้ AFLP และ DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ในการศึกษา Atlantic salmon และ rainbow trout โดยพัฒนา SCAR Markers ที่จำเพาะกับพันธุ์จาก AFLP สำหรับ rainbow trout และใช้ DGGE แยก Atlantic salmon ออกจาก rainbow trout โดยใช้ส่วนของยีน *mitochondrial cytochrome b* การวิเคราะห์การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความไวในการ ตรวจของ SCAR Markers ที่ได้มาจาก AFLP มีความไวกว่า DGGE จากการศึกษาครั้งนี้ค้นพบเพียง เครื่องหมายที่จำเพาะกับพันธุ์ของ rainbow trout นอกจากนี้ Sun *et al.* (2005) ศึกษาสาหร่าย Porphyra 27 ตัวอย่าง จาก 5 class ของประเทศจีนโดยใช้เครื่องหมาย AFLP 24 คู่ไพรเมอร์ จาก ปลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ M-CGA/E-AA และ M-CGA/E-TA ได้เลือกแถบดีเอ็นเอ 13 แถบมา หาลำดับ นิวคลีโอไทด์และพัฒนาเป็น SCAR markers ได้ 2 คู่ไพรเมอร์ การพัฒนาเครื่องหมาย โมเลกุลจำเพาะเป็นประโยชน์สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ และเพื่อประโยชน์ใน การอนุรักษ์

5. การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน

5.1 เทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลดิสเพลย์ (differential display, DD)

เทคนิคดิฟเฟอเรนเชียลดิสเพลย์ (differential display) ถูกพัฒนาขึ้นโดย Liang *et al.* (1992) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต่างกันระหว่าง 2 ตัวอย่างขึ้นไป ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายและไม่ซับซ้อน ในปฏิกิริยาประกอบไปด้วยการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยใช้ oligo dT เป็นไพรเมอร์ และเอนไซม์ reverse transcriptase ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ cDNA เป็นต้นแบบและคู่ไพรเมอร์ oligo dT ร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ตรวจสอบผลการแสดงออกโดยโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพที่ 7) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอเพื่อยืนยันการแสดงออก ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์, Northern blot, quantitative real-time PCR, in situ hybridisation หรือ RNase protection ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถหาชนิดใหม่ได้โดยไม่ต้องทราบข้อมูลจีโนม ราคาถูก ง่าย และรวดเร็ว

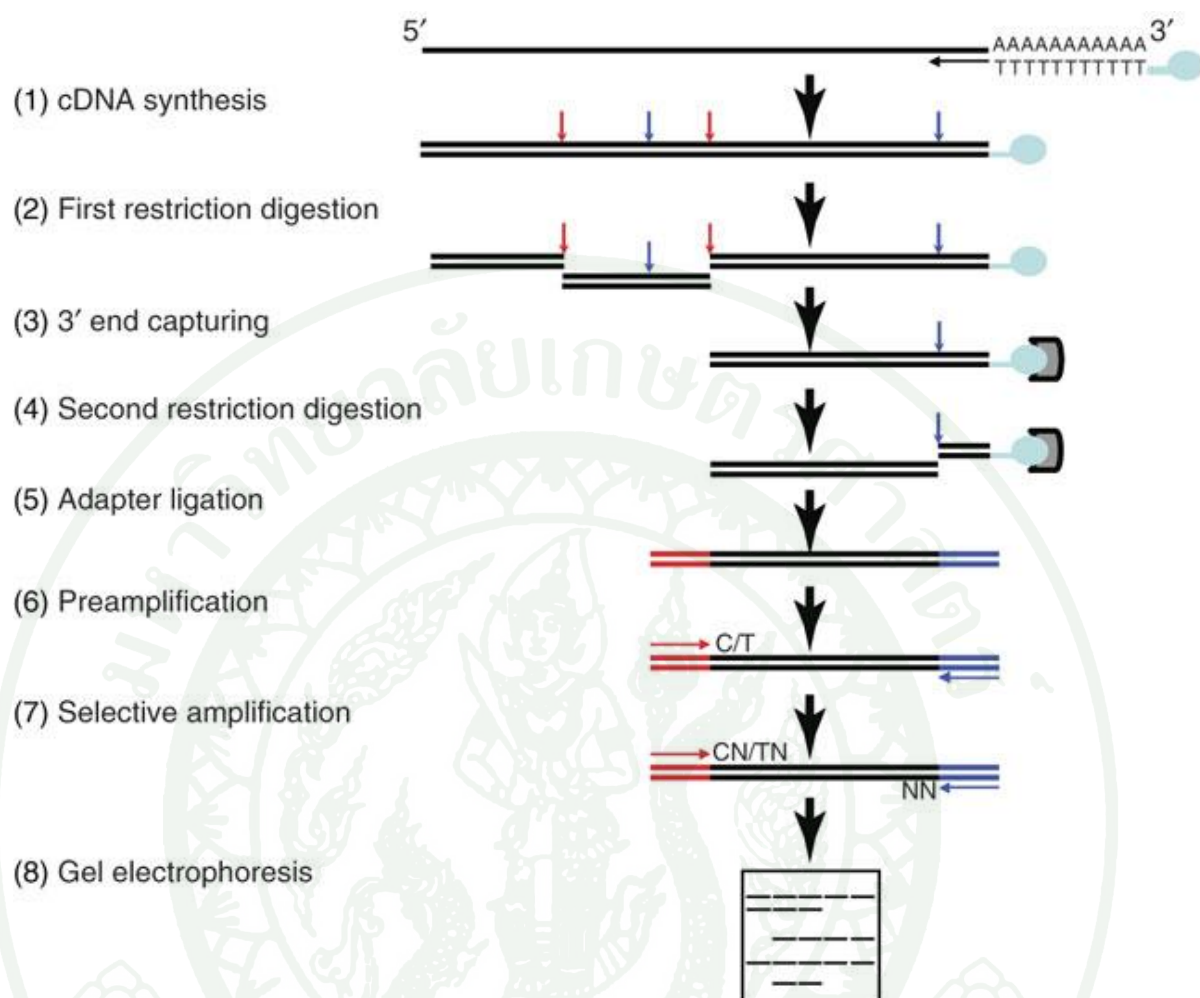




ภาพที่ 7 ขั้นตอนการทำ differential display (Liang *et al.*, 1992)

5.2 เทคนิค cDNA-AFLP

cDNA-AFLP พัฒนาโดย Bachem *et al.* (1998) เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่าง 2 ตัวอย่างขึ้นไป โดยใช้ร่วมกับเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยมีขั้นตอนคร่าวๆ 5 ขั้นตอนคือ 1) การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยใช้ oligo dT เป็นไพรเมอร์ และเอนไซม์ reverse transcriptase เพื่อให้ได้ cDNA ปริมาณมากนิยมติดฉลาก oligo dT ด้วย magnetic bead 2) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อ adapter 3) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 1 (preselective amplification) 4) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 (selective amplification) และ 5) การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการทำ cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1998)

5.3 งานวิจัยที่ศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค differential display และ cDNA-AFLP

Geuna *et al.* (2005) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผลในแอปริคอตด้วยเทคนิค cDNA-AFLP โดยใช้ 34 คู่ไพรเมอร์ พบ 256 แถบที่ให้ความแตกต่างใน 6 ระยะของการพัฒนา 125 แถบที่นำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าเป็นยีนที่อยู่ในกระบวนการของการเผาผลาญน้ำตาล โปรตีนไขมัน การส่งสัญญาณของฮอร์โมน Zeppa *et al.* (2002) วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างการพัฒนาการของรูปร่างของ *Tuber borchii* โดยใช้เทคนิค differential display พบ 15 โคลนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่พบในกระบวนการต่างๆหลายกระบวนการ เช่น dikaryosis, fruiting, cell division, mitochondrial division ซึ่งได้ยืนยันผลการแสดงออกที่แตกต่างกันโดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค Northern blot

Suprunova *et al.* (2007) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างต้นทนแล้งและไม่ทนแล้งในข้าวบาร์เลย์ ภายใต้สภาวะที่แห้งแล้งโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP พบ 11 TDFs (transcript derived fragments) ที่มีการแสดงออกที่แตกต่างระหว่างต้นทนแล้งและไม่ทนแล้ง มี 7 TDFs ที่มีการยืนยันผลโดยใช้ RT-PCR และสันนิษฐานว่าเป็น candidate gene ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งซึ่งตรงกับยีน *Hsdr4* (*Hordeum spontaneum* dehydration-responsive) ซึ่งมีบทบาทในการต้านทานการดึงน้ำออกจากพืช พบว่ายีน *Hsdr4* อยู่บริเวณแขนข้างยาวของโครโมโซม 3H ระหว่างเครื่องหมาย EBmac541 และ EBmag705 และ Venkatachalam *et al.* (2009) ค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างต้น *Hevea brasiliensis* Muell. ที่เป็นโรค Tapping Dryness (TPD) และต้นที่แข็งแรงโดยใช้เทคนิค differential display พบแถบดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีน *HbTOM20* และแสดงให้เห็นการแสดงออกที่ลดลงของยีน *HbTOM20* (*Hevea brasiliensis* translocase of outer mitochondrial membrane) โดยใช้เทคนิค Northern blot และ RT-PCR พบการสะสม mRNA ของยีน *HbTOM20* มากบริเวณเปลือกไม้ ซึ่งเชื่อว่าการลดลงของ *HbTOM20* ในต้นที่เกิดโรคอาจมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงระบบ metabolism ของ mitochondria นอกจากนี้ Tatlow *et al.* (2000) สกัด RNA จากเนื้อเยื่อลำไส้ (jejuna Peyer's patch tissue) ในแกะ และตรวจสอบการแสดงออกระหว่างเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ rotavirus และที่ไม่ติดเชื้อด้วยเทคนิค differential display เมื่อนำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเหมือนกับโปรตีน Sp17 (sperm protein17) ซึ่งได้มีการยืนยันผลด้วยเทคนิค Northern blot และ RT-PCR ต่อมา Li *et al.* (2006) ใช้ cDNA-AFLP ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในมะเขือเทศระหว่างกลุ่ม monogenic resistance

และ polygenic resistance ที่มีผลต่อการติดเชื้อ *Oidium neolycopersici* พบยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันซึ่งตรงกับยีนหลายกลุ่ม ได้แก่ plant defense, signal transduction, protein synthesis, protein degradation และ metabolism

Zhang *et al.* (2008) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในข้าวโพดระหว่างใบอ่อนและเกสรเพศเมียโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP กับ 64 คู่ไพรเมอร์ พบ 2,450 TDFs แบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม และพบว่า TDF-E1 ตรงกับโปรตีนที่ประกอบไปด้วย pentatricopeptide repeat (PRR) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า PRR1 มีการแสดงออกที่เกสรเพศเมียมากกว่าเนื้อเยื่อบริเวณอื่น จึงสันนิษฐานว่า PRR1 อาจจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ restoration of fertility ในข้าวโพด Dazhong *et al.* (1998) ตรวจสอบปริมาณ mRNA ในยอดต้นอ่อนของ winter wheat โดยใช้ differential display พบว่า VRC (vernalization related cDNA clone) 54 มีการแสดงออกที่ระยะ 20 วัน ไม่พบที่ระยะอื่นๆ และเมื่อยืนยันโดยการทำ Northern blot และวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า VRC 54 เป็นยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการผลิดอกออกผลซึ่งพบในพืชจำนวนมาก

Aquea *et al.* (2008) ใช้ cDNA-AFLP จำแนกยีนที่มีการแสดงออกระหว่างการเจริญเติบโตของต้นอ่อนในสน *Pinus radiata* พบการแสดงออกของ PrOTUBAIN (ovarian tumor-domain ubaldehyde-binding protein) ในหลายเนื้อเยื่อแต่แสดงออกมากใน embryogenic tissue

Kim *et al.* (2009) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของยีนจากเนื้อเยื่อหนูอายุต่าง ๆ กันด้วยเทคนิค differential display พบการแสดงออกที่แตกต่างกันโดยเมื่ออายุเพิ่มขึ้นพบระดับ mRNA ของ prosaposin สูงขึ้น จึงเชื่อว่า prosaposin หรือ interferon- γ เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการชราภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae (Brandt, 1974)

หอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae (ภาพที่ 9) ได้แก่

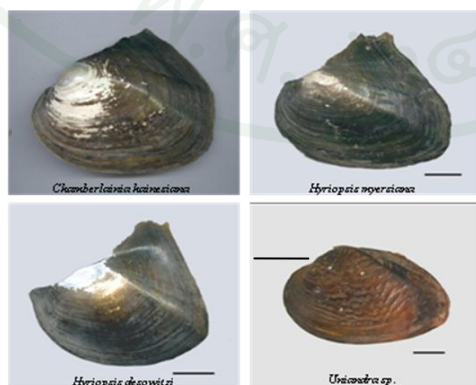
- พันธุ์ที่สร้างมุกได้ดี *Chamberlainia hainesiana* เพศผู้และเพศเมียชนิดละ 4 ตัวอย่าง
- พันธุ์ที่สร้างมุกได้ดีปานกลาง *Hyriopsis desowitzi* และ *Hyriopsis myersiana* เพศผู้และเพศเมียชนิดละ 4 ตัวอย่าง

- พันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างมุกได้ *Uniandra* sp. 4 ตัวอย่าง

รวม 4 สปีชีส์ จำนวน 28 ตัวอย่าง

หอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ที่นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ ได้แก่ *Chamberlainia hainesiana* ประกอบด้วย 2 ระยะคือ

- ระยะตัวอ่อนเป็นระยะที่ยังไม่สร้างมุกหรือเรียกว่าระยะไกลคิเดีย (glochidia)
- ระยะโตเต็มวัยที่สามารถสร้างชั้นมุกได้ โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนแมนเทิล (mantle)



ภาพที่ 9 หอยกาบน้ำจืดวงศ์ Amblemidae ที่ใช้ในการศึกษา

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างหอยกาบน้ำจืด

เอทานอลสัมบูรณ์ กรรไกร หลอดใส่สารขนาด 50 ml. คีม น้ำกลั่น ปากกาเคมี กระตัก น้ำแข็ง อุปกรณ์เครื่องแก้ว ไนโตรเจนเหลว กระบอกฉีดยา 10 ml และเข็ม

3. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง

3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

3.2 เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และปิเกตอร์ขนาดต่างๆ เป็นต้น

3.3 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น KS 125B บริษัท IKA Labortechnik Stufen, Germany

3.4 เครื่องคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่ออินเทอร์เน็ต

3.5 เครื่องฉายแสง ultraviolet และถ่ายภาพ (gel documentation) รุ่น DOC-PRINT-1000/26M บริษัท Vilber Lourmat, France

3.6 เครื่องซังทศนิยม 3 ตำแหน่งรุ่น AR 2130 บริษัท Adventurer™, USA

3.7 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR: polymerase chain reaction) รุ่น PTC-100™ บริษัท MJ Research, USA

3.8 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma, Germany, เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 บริษัท Century Scientific, England

3.9 เครื่อง spectrophotometer รุ่น lamda UV/VIS spectrophotometer บริษัท Perkin Elmer, USA

3.10 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis บริษัท Syngene, UK

3.11 ชุดเครื่องมือ acrylamide gel electrophoresis รุ่น protein II xi cell บริษัท Biorad, USA

3.12 ตู้เย็น รุ่น TH-890 บริษัท Sharp และตู้แช่ -20 °C บริษัท Mirage, China

3.13 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (hotbox oven) บริษัท Gallenkamp, Japan

3.14 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Gilson, France พร้อม tip ขนาด 10, 200

และ 1,000 μ l

- 3.15 หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Seiko, Japan
- 3.16 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1,500 μ l , 15 ml และ 50 ml
- 3.17 หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube)
- 3.18 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert, Germany
- 3.19 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระจกซังสาร กระจกติดป้ายถุงพลาสติก กระจกขาว เป็นต้น

4. สารเคมีและเอนไซม์

4.1 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในสกัดดีเอ็นเอ

- 4.1.1 ไนโตรเจนเหลว
- 4.1.2 phenol
- 4.1.3 chloroform
- 4.1.4 isoamylalcohol
- 4.1.5 isopropanol
- 4.1.6 เอทานอลสัมบูรณ์
- 4.1.7 TE buffer (10: 0.1 = 10 mM Tris pH 8.0: 0.1 mM EDTA)
- 4.1.8 RNase A บริษัท US Biological, USA
- 4.1.9 proteinase K (1 mg/ml) บริษัท Vivantis, USA
- 4.1.10 1% SDS extraction buffer (1% SDS w/v, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA)
- 4.1.11 2% CTAB lysis buffer (2% CTAB w/v, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA)
- 4.2 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ agarose gel electrophoresis
 - 4.2.1 agarose บริษัท Research Organics, USA

4.2.2 1X TBE buffer (10.8 g Tris base 5.5 g boric acid และ 4 ml 500 mM EDTA pH 8.0 ในน้ำ 1 ลิตร)

4.2.3 bromophenol blue และ xylene cyanol

4.2.4 แถบ DNA มาตรฐาน (DNA ladder mix) บริษัท GeneRuler™, USA

4.2.5 ethidium bromide (1 µg/ml) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

4.3 สารเคมีที่ใช้สกัดอาร์เอ็นเอ

ชุด Kits ของ Epicentre biotechnologies, USA

4.4 สารเคมีที่ใช้สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ชุด Kits ของ Fermentus, EU

4.5 สารเคมีที่ใช้สังเคราะห์ซีดีเอ็นเอสายคู่

4.5.1 10X reaction buffer for DNA Polymerase I

4.5.2 Ribonuclease H, *E.coli*

4.5.3 DNA Polymerase I, *E.coli*

4.5.4 T₄ DNA Polymerase บริษัท Fermentus, USA

4.5.5 EDTA pH8.0

4.6 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ AFLP และ cDNA-AFLP

4.6.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อ adapter

4.6.1.1 10X reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)

4.6.1.2 restriction enzyme (*EcoRI* และ *MseI*) บริษัท Fermentus, USA

4.6.1.3 *MseI* restriction enzyme บริษัท Fermentus, USA

4.6.1.4 *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter

4.6.1.5 T₄ DNA ligase บริษัท Fermentus, USA

4.6.1.6 10X T₄ ligation buffer (400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP) บริษัท Fermentus, USA

4.6.2 การทำ preselective amplification และ selective amplification

4.6.2.1 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการทำ PCR (10X PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP และ *Taq* DNA polymerase)

4.6.2.2 *Eco*RI primer+1, *Mse*I primer+1 และ *Eco*RI primer+3, *Mse*I primer+3

4.7 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ differential display

4.7.1 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)

4.7.2 50 mM $MgCl_2$

4.7.3 dNTP บริษัท Fermentus, USA

4.7.4 *Taq* DNA polymerase บริษัท Invitrogen Life Technology, Brazil

4.7.5 primers

4.7.6 ultra pure water

4.8 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการเตรียม denaturing polyacrylamide gel และการย้อมสีเงินด้วยเทคนิค silver staining

4.8.1 bind silane และ repel silane บริษัท Plusone,

4.8.2 acrylamide gel และ methylene bisacrylamide บริษัท Pharmacia Biotech,

Sweden

4.8.3 10 % APS (ammonium persulphate)

4.8.4 TEMED (*N*', *N*', *N*', *N*'-tetramethyl ethylenediamine)

4.8.5 TBE buffer

4.8.6 silver nitrate บริษัท MERCK, Germany

4.8.7 95 % ethanol

4.8.8 glycerol

4.8.9 glacial acetic acid

4.8.10 7.5 M Urea บริษัท USB Corporation, USA

4.8.11 denaturing loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromophenol blue)

4.8.12 developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 $\mu\text{g/ml}$ sodium thiosulphate)

4.9 สารเคมีที่ใช้ในการโคลน

4.9.1 อาหาร Luria-Bertani Medium (LB) และ Luria-Agar Medium (LA)

4.9.2 polyethylene glycol (PEG) 8000

4.9.3 MgCl_2

4.9.4 dimethyl sulfoxide (DMSO)

4.9.5 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactocide (X-gal)

4.9.6 isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG)

4.9.7 ampicillin

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด

1.1 นำหอยมุกน้ำจืดระยะโตเต็มวัยที่สามารถเพาะเลี้ยงไข่มุกได้ดี (*Chamberlainia hainesiana*) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี ที่สามารถสร้างมุกได้ดีปานกลาง (*Hyriopsis desowitzi* และ *Hyriopsis myersiana*) และที่ไม่สามารถสร้างมุกได้ (*Uniandra* sp.) จากแหล่งน้ำธรรมชาติ

1.2 เก็บตัวอย่างโกสคิเดียจากหอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* โดยใช้เข็มฉีดยาดูดโกสคิเดียจากบริเวณ water tube ล้างน้ำหลายๆครั้งจนเมือกของหอยหมด แล้วจึงดูด โกสคิเดียเก็บลงหลอดพลาสติก เก็บที่ -80°C

1.3 ใช้กรรไกรตัดบริเวณแมนเทิลของหอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* แช่ไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บที่ -80°C

2. วิธีสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอเป็นวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการของ Winnepeninc *et al.* (1993) และ Stothard *et al.* (1996) มีวิธีการดังนี้

2.1 นำหอยจากข้อ 1.1 มาตัดเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลใกล้กับ pallial line ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโถง เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดเนื้อเยื่อให้ละเอียดเหมือนผงแป้ง

2.2 นำตัวอย่างที่บดละเอียดใส่ใน eppendorf tube 1.5 μl ประมาณ 100 mg เติม 1% SDS extraction buffer ปริมาณ 600 μl เขย่าให้เข้ากันจากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K (1 mg/ml) ปริมาณ 60 μl นำไปบ่มที่ 60°C นาน 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว

2.3 เติม phenol จำนวน 1 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำส่วนของเหลวชั้นบนมาเติม phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 rpm นาน 15 นาที

2.4 นำของเหลวใสชั้นบนใส่ใน eppendorf tube แล้วทำซ้ำขั้นตอนที่ 2.3 อีกครั้งหรือจนกว่าจะได้สารละลายชั้นบนใส

2.5 นำของเหลวใสชั้นบนใส่ใน eppendorf tube หลอดใหม่แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเติม isopropanol 2 ใน 3 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที จะเห็นเส้นสายดีเอ็นเอลอยขึ้นด้านบน ใช้แท่งแก้วตะขอยกขึ้นมาล้างด้วย isopropanol เพื่อล้างเกลือออกแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ isopropanol ระเหยไปหมด

2.6 นำดีเอ็นเอที่ได้ใส่ลงใน eppendorf tube หลอดใหม่เติม TE-buffer (1:0.1) 50 μ l เพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วกำจัด RNA โดยเติมเอนไซม์ RNase (1 μ g/ml) ปริมาตร 1 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และเก็บดีเอ็นเอที่ละลายดีแล้วที่อุณหภูมิ -20 °C

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

3.1 ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อ adapter

ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Eco*RI ซึ่งเป็น rare cutter มีขนาดจดจำในการตัด 6 คู่เบส และ *Mse*I ซึ่งเป็น frequent cutter มีขนาดจดจำในการตัด 4 คู่เบส เชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้ง 2 ข้างที่ถูกตัดเข้ากับ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยองค์ประกอบสารเคมีต่าง ๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter ทั้ง 2 ชนิด

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA (100 ng/μl)	2.50	250 ng/50 μl
<i>Eco</i> RI (10 unit/μl)	0.25	2.5 unit/50 μl
<i>Mse</i> I (5 unit/μl)	0.50	2.5 unit/50 μl
10X buffer (+1X BSA)	2.50	0.5X
<i>Eco</i> RI adapter (10 μM)	1.00	0.2 μM
<i>Mse</i> I adapter (5 μM)	2.00	0.2 μM
T ₄ DNA ligase (5 unit/μl)	0.20	1 unit/50 μl
10X T ₄ ligation buffer	5.00	1X
ultrapure water	36.05 เพื่อปรับปริมาตรรวมเป็น 50 μl	

บ่มองค์ประกอบสารเคมีทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง

3.2 การทำ preselective amplification

เป็นการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับ adapter และตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I ที่ต่อกับนิวคลีโอไทด์นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' (primer E+1 และ primer M+1) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยองค์ประกอบสารเคมีต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำ preselective amplification ด้วยเทคนิค AFLP

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA (100 ng/μl)	2.00	200 ng/25 μl
10X PCR buffer	2.50	1X
MgCl ₂ (50 mM)	0.75	1.5 mM
dNTP (2 mM)	2.50	0.2 mM
<i>Eco</i> RI+1 primer (5 μM)	1.25	0.25 μM
<i>Mse</i> I+1 primer (5 μM)	1.25	0.25 μM
<i>Taq</i> polymerase (5 unit/μl)	0.10	0.5 unit/25 μl
ultrapure water	15.15 เพื่อปรับปริมาตรรวมเป็น 25 μl	

ผสมองค์ประกอบที่ใช้ทำ preselective amplification เข้าด้วยกันแล้วนำไปใส่เครื่อง PCR ที่ตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	30	วินาที	} ทำซ้ำ 25 รอบ
ขั้นที่ 2	56 °C	60	วินาที	
ขั้นที่ 3	72 °C	60	วินาที	
ขั้นที่ 4	คงอุณหภูมิที่ 4 °C			

แบ่งส่วนของสารละลายมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1.0% agarose gel และนำมาเจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE buffer (10:0.1) เพื่อนำมาทำต้นแบบในการเพิ่มปริมาณในการทำ selective amplification

3.3 การทำ selective amplification

เป็นการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ adapter และตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I ที่ต่อกับนิวคลีโอไทด์ 3 นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' (primer E+3 และ primer M+3) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยองค์ประกอบสารเคมีต่าง ๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการทำ selective amplification ด้วยเทคนิค AFLP

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA	5.00	
10X PCR buffer	2.00	1X
MgCl ₂ (50 mM)	0.60	1.5 mM
dNTP (2 mM)	2.00	0.2 mM
<i>Eco</i> RI+3 primer (5 μM)	1.00	0.25 μM
<i>Mse</i> I+3 primer (5 μM)	1.00	0.25 μM
<i>Taq</i> polymerase (5 unit/μl)	0.10	0.5 unit/20 μl
ultrapure water	8.30 เพื่อปรับปริมาตรรวมเป็น 20 μl	

ผสมองค์ประกอบที่ใช้ทำ selective amplification เข้าด้วยกันแล้วนำไปใส่เครื่อง PCR ที่ตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณ โดยโปรแกรม touch down จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 1	94 °C	30 วินาที	} 1 รอบ
ขั้นที่ 2	65 °C	30 วินาที	
ขั้นที่ 3	72 °C	60 วินาที	

ลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 1	94 °C	30	วินาที	} ทำซ้ำ 25 รอบ
ขั้นที่ 2	56 °C	60	วินาที	
ขั้นที่ 3	72 °C	60	วินาที	
ขั้นที่ 4	คงอุณหภูมิที่ 4 °C			

นำผลผลิตพีซีอาร์มาเติม AFLP loading buffer (98% formamide , 10mM EDTA , 0.1% bromophenol , 0.1% xylene cyanol) จำนวน 10 μl แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 95 °C 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่พร้อมสำหรับทำ polyacrylamide gel electrophoresis

สรุปลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 และ 3 นิวคลีโอไทด์ ที่ปลาย 3' สำหรับการทำ AFLP ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 และ 3
นิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' สำหรับการทำ AFLP

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-3'
<i>Mse</i> I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-3'
<i>Eco</i> RI+1 primer (E-A)	5'-AGACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>Mse</i> I+1 primer (M-C)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAC-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-AAC)	5'-AGACTGCGTACCAATTCAAC-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-AAG)	5'-AGACTGCGTACCAATTCAAG-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-ACA)	5'-AGACTGCGTACCAATTCACA-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-ACC)	5'-AGACTGCGTACCAATTCACC-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-ACG)	5'-AGACTGCGTACCAATTCACG-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-ACT)	5'-AGACTGCGTACCAATTCACT-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-AGC)	5'-AGACTGCGTACCAATTCAGC-3'
<i>Eco</i> RI+3 primer (E-AGG)	5'-AGACTGCGTACCAATTCAGG-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CAA)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CAC)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CAG)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CAT)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CTA)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CTC)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CTG)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACTG-3'

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์
<i>Mse</i> I+3 primer (M-CTT)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAACTT-3'

4. การตรวจสอบจีนดิเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล ล้างกระจกให้สะอาด เช็ดกระจกด้วย 95% ethanol แล้ว เช็ดกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเหมือนหูกระต่ายด้วย repel silene เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silene (1 μ l bind silene, 2.5 μ l glacial acetic acid และ 500 μ l 95% ethanol) ปล่อยให้แห้ง จากนั้น นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกบกัน โดยมี spacer ขึ้นตรงกลางหันหน้าที่ทำ bine silene และ repel silene เข้าหากัน

4.2 เตรียม 6% denaturing polyacrylamide gel ที่มีองค์ประกอบดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้เตรียม 6% denaturing polyacrylamide gel

สารที่ใช้	จำนวนที่ใช้
30% stock acrylamide (29 g acrylamide: 1 g bis-acrylamide ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml)	12 ml
ยูเรีย	27 g
10X TBE buffer	6 ml
10% ammonium persulphate	600 μ l
TEMED	35 μ l
น้ำกลั่น	21 ml เพื่อปรับปริมาตรรวมเป็น 60 ml

ผสมส่วนประกอบเข้าด้วยกันแล้วเทเจลลงระหว่างกระจกจนเต็มและเสียบหัวทิ้งไว้จนเจลแข็ง

4.3 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วทำการล้างกระจกและดึงหัวออก ประกอบกระจกเข้ากับชุด sequencing gel electrophoresis เติมสารละลาย 1X TBE buffer

4.4 ทำการ pre run ที่ 1,500 โวลต์ 30 นาที

4.5 ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาฉีดเพื่อไล่บูเรีย

4.6 โหลดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ผสม AFLP loading buffer ลงในช่อง แล้วเปิดเครื่องที่ 1,500 โวลต์ 3 ชั่วโมง

4.7 ปิดเครื่อง ดูบัพเฟอร์ออก นำเจลที่ได้ไปย้อมซิลเวอร์ในเตรทเพื่อตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอ

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีย้อมด้วยซิลเวอร์ในเตรท (ดัดแปลงจากวิธีของ Caetano-Anolles, 1997)

5.1 นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ลงใน fixative solution (10% acetic acid) 20 นาทีพร้อม เขย่า

5.2 นำมาแช่ต่อในน้ำกลั่น 30 นาที แล้วเปลี่ยนน้ำกลั่นแช่ต่ออีก 5 นาที

5.3 แช่กระจกลงใน 0.2% สารละลายซิลเวอร์ในเตรท 30 นาที ล้างน้ำกลั่น 10 วินาที

5.4 นำกระจกมาแช่ในสารละลาย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde และ 2 µg/ml sodium thiosulfate)

5.5 หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ใน stop solution (5% acetic acid และ 3% glycerol) นาน 3-5 นาที ตากให้แห้ง

6. การสกัดอาร์เอ็นเอ (โดยใช้ชุด Kits ของ Epicentre biotechnologies , USA)

6.1 บดตัวอย่างประมาณ 5 mg ในไนโตรเจนเหลว

6.2 เติม 300 µl ของ Tissue and cell lysis solution ที่ผสมด้วย 1 µl ของ 50 µg/µl proteinase K ผสมให้เข้ากัน

6.3 บ่มที่ 65 °C 15 นาที โดย Vortex ทุกๆ 5 นาที จากนั้นนำมาวางบนน้ำแข็ง 3-5 นาที

6.4 เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 µl ผสมให้เข้ากันโดยนำไป Vortex แล้วนำไป Centrifuge ที่ 10,000 rpm 10 นาที

6.5 ย้าย supernatant ใส่หลอดใหม่และทิ้งตะกอนไป แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยเติม Isopropanol 500 µl กลับหลอดไปมา 30-40 ครั้ง นำไป centrifuge ที่ 4 °C 10 นาที

6.6 เท isopropanol ทิ้งโดยไม่ให้ตะกอนหลุดออกมา

6.7 ย่อยดีเอ็นเอโดยเติม DNaseI 200 µl (RNase-Free DNaseI 5 µl ผสมกับ 1X DNase buffer 195 µl) บ่มที่ 37 °C 30 นาที

6.8 เติม 2X T and C lysis solution 200 µl ผสมโดยนำไป vortex 5 วินาที

6.9 เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 µl และ vortex 10 วินาที นำไปวางบนน้ำแข็ง 3-5 นาที

6.10 นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 10 นาที ย้าย supernatant ที่ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอลงในหลอดใหม่แล้วทิ้งตะกอน

6.11 ตกตะกอนอาร์เอ็นเอใน supernatant โดยเติม isopropanol 500 µl กลับหลอดไปมา 30-40 ครั้ง แล้วนำไป centrifuge ที่ 4 °C 10 นาที

6.12 เท isopropanol ทิ้งโดยไม่ให้ตะกอนหลุดออกมา

6.13 ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% ethanol 2 ครั้ง

6.14 ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอใน TE buffer 10-35 µl

6.15 เติม Scriptguard RNase Inhibitor 1 µl

7. การสังเคราะห์ single strand cDNA (โดยใช้ชุด Kits ของ Fermentus , EU)

7.1 ผสม template RNA 0.1-5 µl, primer oligo (dT)₁₈ (0.5 µg/µl) 1 µl และ DEPC-treated water เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 12 µl เบบๆ บนน้ำแข็ง

7.2 นำไปบ่มที่ 70 °C 5 นาที ทำให้เย็นบนน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเบาๆ

7.3 นำไปวางบนน้ำแข็งแล้วเติม 5X Reaction buffer 4 μ l, Ribolock™ Ribonuclease inhibitor (20 u / μ l) 4 μ l และ 10mM dNTP 2 μ l

7.4 เติม Revert Aid™ M-Mul V Reverse Transcriptase (200 u/ μ l) 1 μ l

7.5 บ่มที่ 42 °C 60 นาที

7.6 หยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 70 °C 10 นาที แล้วทำให้เย็นบนน้ำแข็ง

8. การสังเคราะห์ second strand cDNA (โดยใช้ชุด Kits ของ Fermentus , EU)

8.1 เติม 10X reaction buffer for DNA polymerase I 8 μ l , ultrapure water 68.8 μ l , ribonuclease H, *E.coli* 0.2 μ l (1 u/ μ l) และ DNA polymerase I, *E.coli* 3 μ l (30 u/ μ l) ลงไปใน single strand cDNA 20 μ l

8.2 ปั่นเหวี่ยงเบาๆให้สารละลายรวมอยู่ที่ก้นหลอด

8.3 บ่มที่ 15 °C 2 ชั่วโมง

8.4 เติม T₄ DNA polymerase 2.5 μ l (12.5U) และบ่มที่ 15 °C 5 นาที

8.5 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.5 M EDTA pH 8.0 5 μ l

8.6 ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี phenol/chloroform extraction

9. การวิเคราะห์การแสดงออกที่แตกต่างด้วยเทคนิค differential display

9.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 68 ชนิด และไพรเมอร์ oligo dT ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3' 2 ชนิด (ตารางที่ 6) ทำปฏิกิริยา พีซีอาร์กับ cDNA ของหอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ชัดเจนเหมาะสมที่จะนำไปใช้ศึกษาต่อไปโดยมีองค์ประกอบสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ไพรมเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค differential display 70 ชนิด

ชุดไพรมเมอร์	หมายเลขลำดับไพรมเมอร์	อ้างอิง/บริษัท
D	01, 04	Bioprobe
E	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Bioprobe
F	01, 02	Bioprobe
OPF	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPI	03, 04, 12, 14, 18	Operon Technologies
OPK	02, 14, 16	Operon Technologies
OPL	12, 13, 19	Operon Technologies
OPN	03, 04, 14, 20	Operon Technologies
APW	01, 02	
PRR	01, 02	Chen <i>et al.</i> 1997
RSR	01, 02, 03	Chen <i>et al.</i> 1997
TPXR	01, 02	Chen <i>et al.</i> 1997
T ₁₂ CA		
T ₁₂ AG		

ตารางที่ 7 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค differential display

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
cDNA	1.00	
10X PCR buffer	2.00	0.8X
MgCl ₂ (50 mM)	1.00	2mM
dNTP (2 mM)	1.50	0.12 mM
primer F(5 μM)	1.50	0.3 μM
primer R(5 μM)	1.50	0.3 μM
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.25	1.25 unit/25 μl
ultrapure water	16.25 เพื่อปรับปริมาตรรวมเป็น 25 μl	

อุณหภูมิสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเทคนิค differential display ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	3	นาที	} ทำซ้ำ 35 รอบ
ขั้นที่ 2	94 °C	30	วินาที	
ขั้นที่ 3	37 °C	45	วินาที	
ขั้นที่ 4	72 °C	45	วินาที	
ขั้นที่ 5	72 °C	5	นาที	
ขั้นที่ 6	คงอุณหภูมิที่ 4 °C			

9.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำผลผลิตของพีซีอาร์ปริมาตร 25 μl มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน acrylamide gel ความเข้มข้น 6 % ใน 1X TBE buffer โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 300 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง 30 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

เลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนจำนวน 136 คู่ไพรเมอร์มาทดสอบกับตัวอย่าง ดีเอ็นเอของหอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ทั้งระยะตัวอ่อนและระยะ โตเต็มวัย ชนิดละ 4 ตัวอย่าง

10 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (Benbouza, 2006)

- 10.1 นำกระจกที่มีเจลแช่ในสารละลาย fixative (10% ethanol, 0.5% acetic acid) 5 นาที
- 10.2 แช่กระจกลงในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.15% 7 นาที
- 10.3 ล้างน้ำกลั่น 1 นาที
- 10.4 ย้ายกระจกที่มีเจลมาแช่ในสารละลาย developer (15g NaOH และ 2 ml 37% formaldehyde)
- 10.5 หยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution (10% ethanol, 0.5% acetic acid) 5 นาที

11. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค cDNA-AFLP

ทำเหมือนการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ข้อ 3 แต่เปลี่ยนดีเอ็นเอต้นแบบ เป็น cDNA แทน โดยทดสอบตัวอย่าง cDNA ของหอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ระยะตัวอ่อน 5 ตัวอย่างและระยะ โตเต็มวัย 2 ตัวอย่างด้วย 64 คู่ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 4

12. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์และภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จตุจักร กรุงเทพฯ

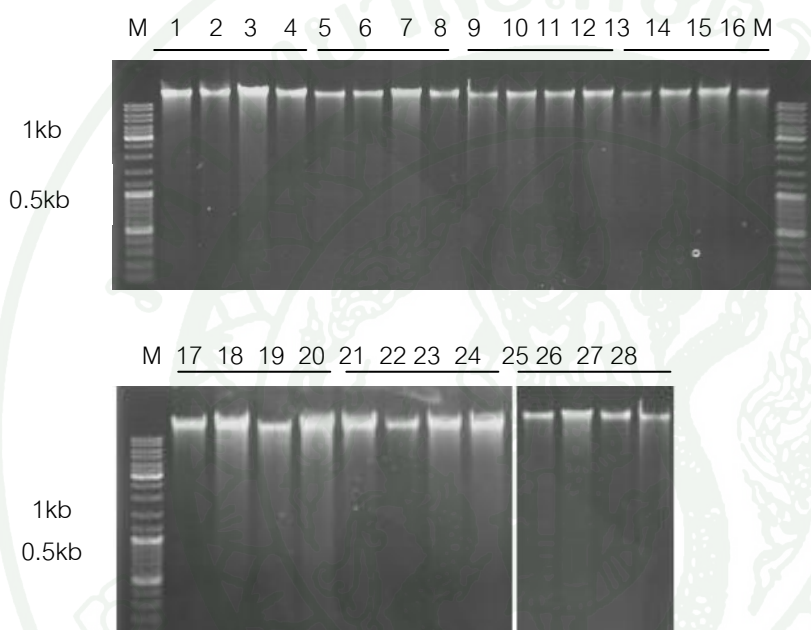
13. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มการทดลอง ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2550 สิ้นสุดการทดลองเดือนเมษายน 2553

ผลและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอของหอยมุกน้ำจืด

สกัดดีเอ็นเอจากแมนเทิลของหอยมุกน้ำจืดจำนวน 28 ตัวอย่าง โดยวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Winnepenninc *et al.* (1993) และ Stothard *et al.* (1996) วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ได้ดีเอ็นเอมีคุณภาพดี (ภาพที่ 10)



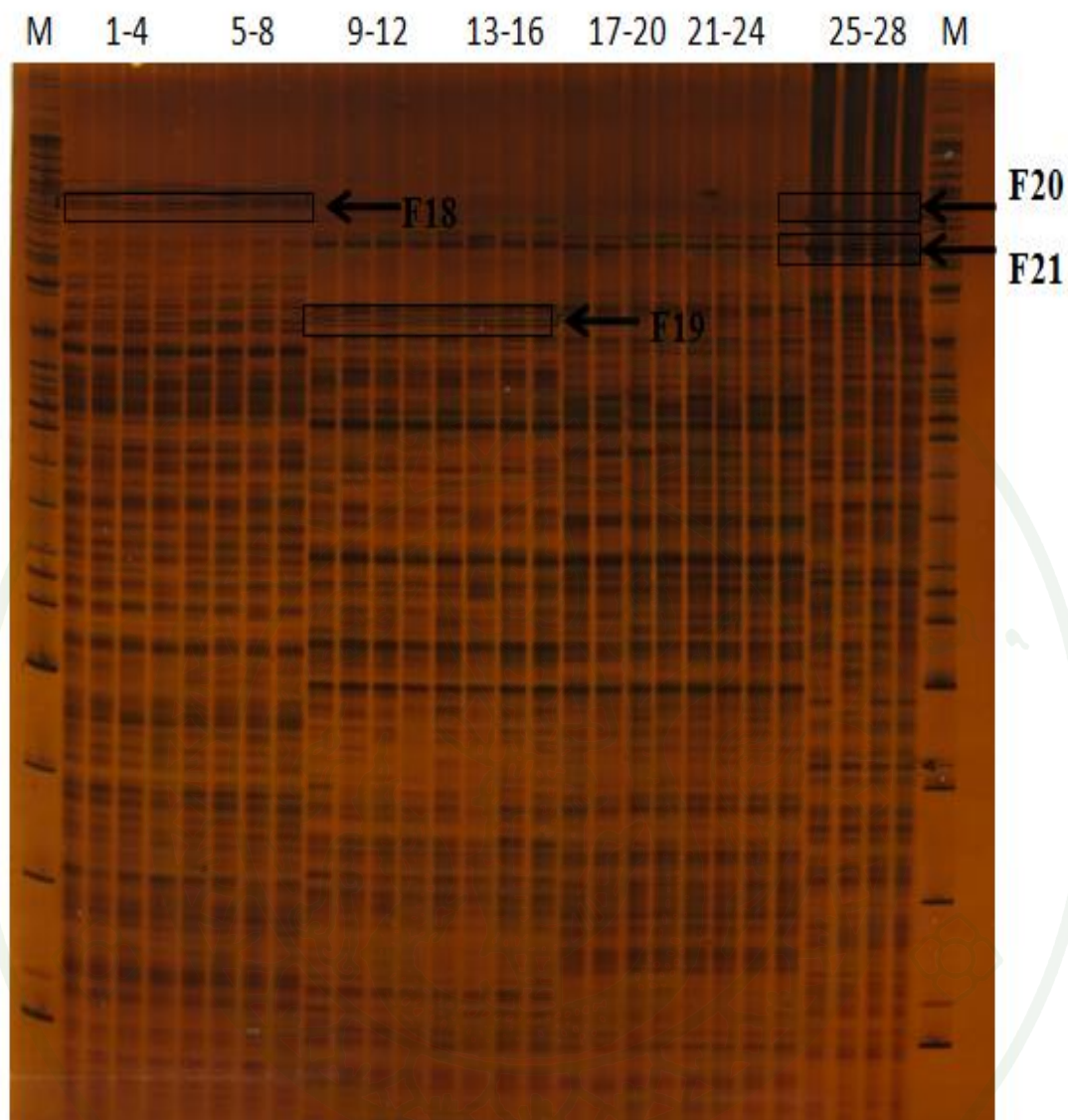
ภาพที่ 10 จีโนมดีเอ็นเอของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* (1-4 เพศผู้, 5-8 เพศเมีย), *Hyriopsis desowitzi* (9-12 เพศผู้, 13-16 เพศเมีย), *Hyriopsis myersiana* (17-20 เพศผู้, 21-24 เพศเมีย) และ *Uniandra sp.* (25-28) รวม 28 ตัวอย่างจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 1% agarose gel (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

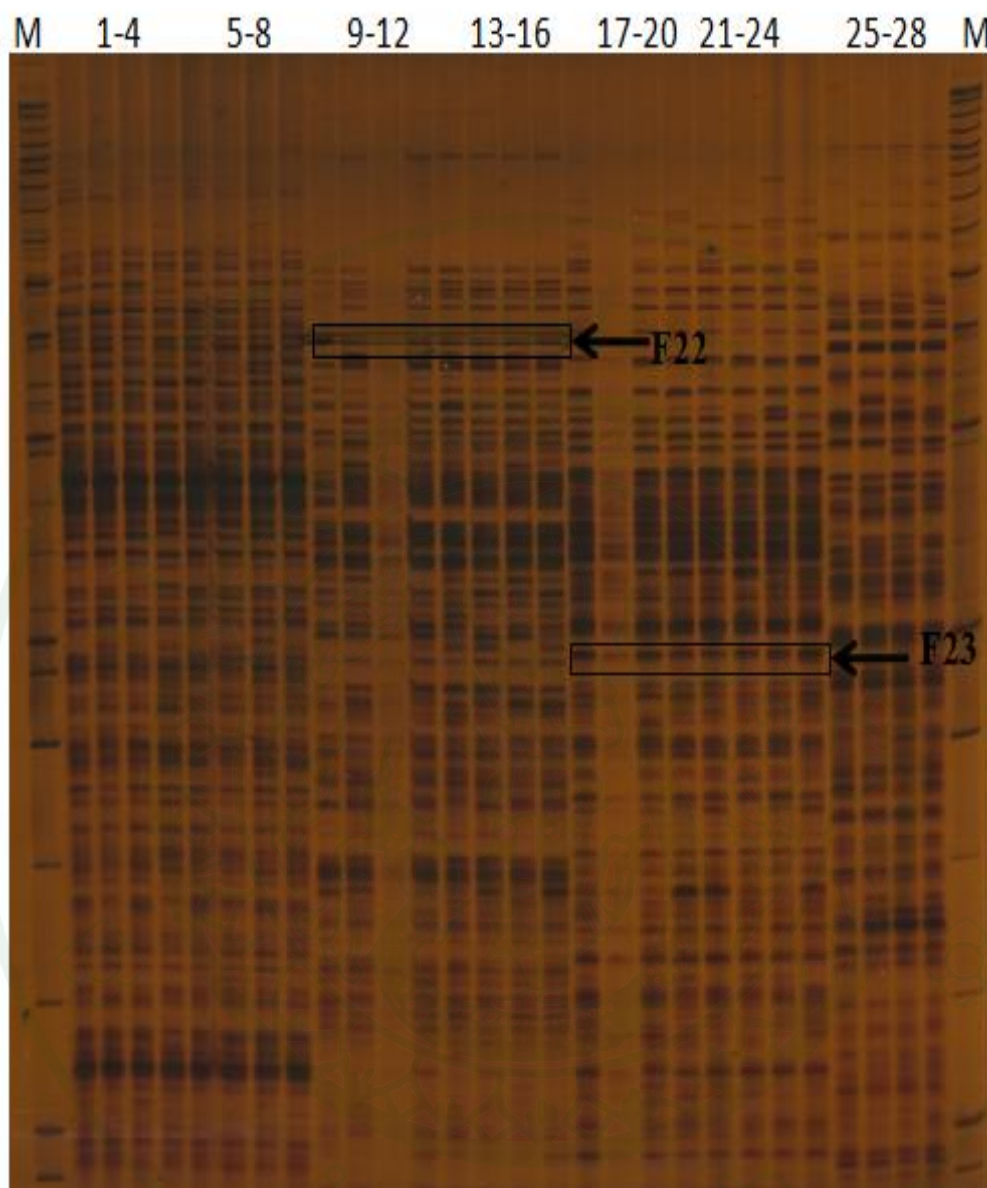
จากการทดสอบไพรเมอร์ E+3 และ M+3 ทั้งหมด 82 คู่ไพรเมอร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของ
หอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* 1 ตัวอย่าง คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ
ชัดเจนและจำนวนมาก 9 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 8) เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *EcoRI* adapter 3
ไพรเมอร์ และ *MseI* adapter 8 ไพรเมอร์ นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหอยมุกน้ำจืดจำนวนทั้ง
28 ตัวอย่าง คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน มีขนาดยาวพอสมควร และจำเพาะกับพันธุ์หอยกาบน้ำจืด
แต่ละสายพันธุ์จำนวน 28 แถบ (ภาพที่ 11-13)

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิค AFLP และจำนวนแถบดีเอ็นเอ
จำเพาะที่คัดเลือก

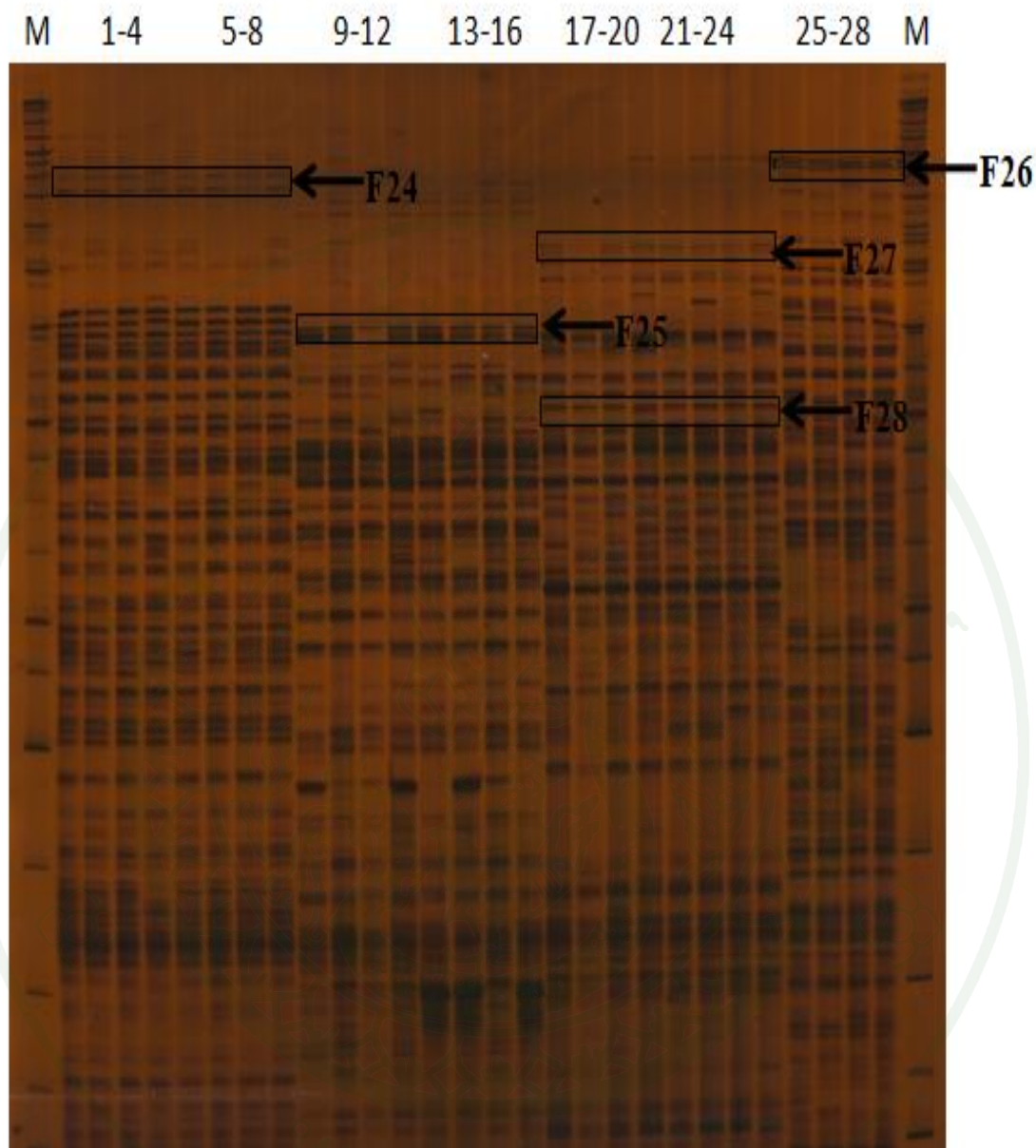
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำเพาะที่คัดเลือก
E-AAC/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'	0
E-AAC/M-CAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'	1
E-AAC/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'	4
E-AAC/M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'	2
E-AAC/M-CTA	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'	5
E-AAC/M-CTG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'	0
E-CAAM/M-AGA	5'-GACTGCGTACCAATTCCAA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'	4
E-CAG/M-AGA	5'-GACTGCGTACCAATTCCAA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'	6
E-CAG/M-AAT	5'-GACTGCGTACCAATTCCAA-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAAT-3'	6



ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* เพศผู้ (1-4) เพศเมีย (5-8), หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis disowitzi* เพศผู้ (9-12) เพศเมีย (13-16), หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* เพศผู้ (17-20) เพศเมีย (21-24) และ หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Uniandra* sp. (25-28) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์)



ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTA (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* เพศผู้ (1-4) เพศเมีย (5-8), หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis disowitzi* เพศผู้ (9-12) เพศเมีย (13-16), หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* เพศผู้ (17-20) เพศเมีย (21-24) และ หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Uniandra* sp. (25-28) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์)



ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTC (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* เพศผู้ (1-4) เพศเมีย (5-8), หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis disowitzi* เพศผู้ (9-12) เพศเมีย (13-16), หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* เพศผู้ (17-20) เพศเมีย (21-24) และ หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Uniandra* sp. (25-28) ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับสายพันธุ์

คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์หอยกาบน้ำจืดจากเทคนิค AFLP ได้ 28 แถบ ตัดแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกและเพิ่มปริมาณ โดยเทคนิคพีซีอาร์อีกครั้ง (re-amplification) ด้วยไพรเมอร์ Primer+3 ชุดเดิมที่ใช้เพิ่มปริมาณในเทคนิค AFLP ทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ ก่อนเลือก 15 แถบ ที่ชัดเจนและมีความยาวพอสมควร นำไปเชื่อมกับ pGEM-T Easy vector และถ่ายเข้าสู่ *E. coli* (XL-1 Blue) สกัดพลาสมิดสายผสมจากแบคทีเรีย และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 14) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้มาวิเคราะห์และรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ด้วยโปรแกรม CAP3 Sequence Assembly (Huang and Madan, 1999) ได้สายดีเอ็นเอทั้งสิ้น 18 สาย พัฒนาไพรเมอร์ได้จำนวน 17 คู่ (ตารางที่ 9)

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 3 Clone ที่1 (T7 promoter) (F3: *Hyriopsis myersiana* เพศผู้ ตัวอย่างที่ 3)

gatgagctctgagtaaAGATTTTCTCCAGTCCGTGGCAGAGTCCGTGAAAACTTCAGCAACGACAGGCGGCCAAGGAGGGTTTGGCTGAAGAACAACAGGGATTATTCAAGCCGATTACAACCGCTACTGAAAAAACTGCTTAGCGACTTGAACTGCTATCCTGGGAGAGCTTGATAATCAAGGTGAACCTTGTGAAAAAGGGTCTGCTTCAGGCAATAGAAAAAAGTACAGCTCTGCCCACTGAGAAAGGTGCTGCTGAGGGTCTGTTGgaattggtagcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 3 Clone ที่6 (T7 promoter) (F3: *Hyriopsis myersiana* เพศผู้ ตัวอย่างที่ 3)

gactgcgtaccaattcCAATGTTATAGTGTACAATAATTAGTTTTTGTACTAAAACAACATAAACTGCCTCTTTATAAAGCAGGCATTATTTAGGACTCCTATGAACAGCCTTATAAAAAATGAACCTTAAGTTACATTCCCTTGAAAAACCTTATAAAGAATGAAA ACTATAGTTACATTCTTGAATGACCTTATAAAGAATGAAGACTATAGTTATATTATCTTGAATGACCTTATAAAGAATGAAA ACTATGGTTACATACAAATCTtactcaggactcatcATgactgcgtaccaattcCAATTTTTACGAAAAATAATAATTGGGTAAAAATGTTTGTTC TAGCAACAATGGTAAAATTGGTACTGTTTACAGCAATTGGTATAATTCAGGAACTCTGTTTATCTAATATACATCTTAGGG AACAGTAGGAATACCATAATGTCACGTGATAAACGCGGCGTTCCACATTCTGATGCTGCCATGTCTATAACAATAACAATAA CCCGGTGCTACCATTCGTACTGCCATTCAAAGATTGCCAGACATCGCACCATCTtactcaggactcatc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 4 Clone ที่1 (T7 promoter) (F4: *Chamberlainia hainesiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 4)

gactgcgtaccaattcCAACGTAGAATAAAAAATGTCACAGGAAAGGAATCCAAGATAGCAATAACCGCTCATGAACCAACTGTCC GCGTTCATCGAGATAAATTCTCCGATTACGCCGTAGATATATCAATTATCGATCAAAACAGTGCTAGGATGGCCTGAAAT TCCACCGCCGATACCTCCGCATCCACCTAAACCAAAAAAGTCCAATTAGGTCACAGATACAAAGGCGTATTATGGTATCAATC TGTCATCGAGAGAAATATCTtactcaggactcatcATgactgcgtaccaattcCAAGATAAAATGCTCATGTGGAAAAACCCCACTTATTTT AAATAATAATTTGAAGTAAAAACAAGAAAAAGCTCCACCTGCAGCGGTTGACTGACAACTTCAAATCAATGAAAATTAGCT AATGTTGTAAACAATAACAATATTATCAACAAGATAAACTCCAAGAAATGATGAAGTGTGCCTTTGCAGGCACAATGAAA GAATAAATACTTCATTTTCAAATATTTCTTCAAACTTTAGAACAGAGGTGCTCTtactcaggactcatc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 5 Clone ที่2 (T7 promoter) (F5: *Hyriopsis desowitzi* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 2)

gactgcgtaccaatcCAGCATCACAGCGCTATCAACCGTAGTTCACTCATGCCCTTCGGGACAGAATTGCTCGTGGTGAATTACCCAC
CCAGAATAATTACCTAATAAACTTGTGGCAAATGATACGGCAATAAACACATTCAAAATAATAGCGATTTCATCGCATGTCA
AGGGTGAATATAATCAACCGATCCGGATTCTTTGTCCTCCACCACCGATTATGCCACATTtactcaggactc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 6 Clone ที่1 (T7 promoter) (F6: *Chamberlainia hainesiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 2)

gatgagtcctgagtaaAATCCCACCGGAGTAAACCCAGGGCATATTGACAACATCGTGTATACAGTATCATCTGGATCCGCAACCTGG
TCAAAACAGAACGATAATATCAAATATATCGCTACAACCACTGGTATATACAGGTTTCTGTGCTCAGTGCTACAAAATTTCGT
ATATTACTAGATATCTTGCGCGGTACACAACCGACGAATTTCCCGGTTGTGTCTGTATCATAGGTAACGGAGCTGAAGAA
AAATTTACTGGAACCACTGATAAAAAATGTACAATCAGCACACTACTACTATTGTCTGgaattggtacgcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 7 Clone ที่1 (T7 promoter) (F7: *Chamberlainia hainesiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 2)

gatgagtcctgagtaaAATTGGAGAGAAATGAAAATTGGGCCATTAGTATTGCAACAAACAGAAAGCAGTGATTATGATGACAAAAGG
TTGTACCCAGTCTGTGAATAGATTTTGACAATGAAAAGAGCATAGTCAGGGTGCACCTCTTTCATTACCAAAATTAACAGTAG
AATCCAGTGGAGAAAACATTTTATTGCTTGATAATGCTTTGAATAAACTGTAGTTGGTGGAAATGTATGGATTTTCTGCTG
ATAATGCATCATTGATGACTGgaattggtacgcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 7 Clone ที่9 (T7 promoter) (F7: *Chamberlainia hainesiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 2)

gatgagtcctgagtaaAATAGAAGGGGGGGCCTAGTAATGAACAATGTAGAACACTGTAAAGCACAAATTGTAAACCTGCAATATCC
AGTGTCCAATTGAAAAGTTCCCGAGTTCTTTCAAACAGATATTGTTTCCCTGCATGTAAATACTAGCACAAATATCATGTACA
CACTGGTGGTTGAACCTGACCTGATGACCTCTGTGCTCCTGCCTGATGTTTAGAACCTGGAAGGAAGACTGGTTTTGTTATCTGG
TGCCATCACAGTCAGTTCAAACTGgaattggtacgcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 8 Clone ที่3 (T7 promoter) (F8: *Hyriopsis desowitzi* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 3)

gactgcgtaccaatcCAGACTGAATATGGATTGTAAGATGGATGGACTCGCAATTCAGATCGGCAACATAGAGTTGGAAGAAGAGC
GTTAGACAAACAAGGTAAAAAGAACCCGCACTACGGATTGGAATGACCTGTTCTACGATTTCATTTCACTGCATTTGGTACTT
TACTTGAATGTGGTGTCAATTACGATGACCTACATACTTTATGAACAATAGGATTCACGTGATTGCTGTTACATTCATTTGGGT
TGAAAATCGCCACGTGTCGATTGTAACACCACAGTTTCAATGAAAGAAAGCACTCGTTAGCATTtactcaggactc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 10 Clone ที่3 (T7 promoter) (F10: *Uniandra sp.* ตัวอย่างที่ 3)

gatgagtcctgagtaaAATCTTATACGTTGCATTAGGTATCCTGAAATATCAGAAATTTATGAAGAGAATTTACTATCAGTGTAGGTCG
TTTTGACCCTGgaattggtacgcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 12 Clone ที่3 (T7 promoter) (F12: *Hyriopsis myersiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 3)

gatgagtcctgagtaaAATCTAATACGTTGTATTAGGTATCCTTAAATATCAGAAATTTATGAAGAGAATTTACTATCGGTGTAGGTCG
TTTTGACCCTGgaattggtacgcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 12 Clone ที่5 (T7 promoter) (F12: *Hyriopsis myersiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 3)

GatgagtcctgagtaaAGACACTCGGCGCATTCTGGACCCAGAATGGCATGACAACCAATGGTATGTTCCATCTGAAGCTGAGAAAG
CATGTTTTACTCTTCTCACCACGAACCTGGGTTTTGCCATTATCCCTTGGAAGATCAGGTTTCGAAAATTACTTCGCATTTCT
TACCCAGCAAAATATGGTTTCAGGGTCAGGTAATTTTCTACCTGgaattggtacgcagtc

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 18 Clone ที่1 (T7 promoter) (F18: *Chamberlainia hainesiana* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 1)

gactgcgtaccaattcAACAAATAAA**CCATGGGATGGATCCACATACTCCAAGTTCAGTGAAGTCCAGTGCAATGCTGTGCTCATCTAC**
AAAAACGATTCAGAACTATATTGCTTTACAGTCGAAAGCAATGCAGTACTGTACCAACCTATGGATACCATCCGTGCACTCA
GATGTTGTGTGAACTGACGTTATTTAGTGCTGACTAAAAATCAACTAAAAATGGGCACGGACCTCTCACTCTCTTGAGCCGG
AATTGGTATATTTGTTAGCGTGTGAAAGTCTCGGAAGACGATGCTTCAGACGTTGATGGGTCTGCATTTATGCTGACTTTGAG
AGTTTTCTTGACCATGCTACTTCTTATTGTAAGTGTCAACTTGGAGCATAACGGGTGCCGACAACGGTTAGCACAGGCATCAAC
GACAGACAGTCCAACTTATCTGTCTCTGAATTTGGAGATACATGTGTGTCTAAATAAGCCTCCTCATGGCACTAGAAAGTATGA
CCAGGATACAAGTAAAATGAACGACAATCCACGATGTTGAATCCGCAAAATCGACCAAGTGAATGATACATTCAACAACCTTG
AAAATGTTACTAATGATTT**GAATGCTGACATTGATGTTGCAAAAATAAGAGACACAGAGCCTAAAATGTAAAATAAACTC**
TGGGAGTtactcaggactcat

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 19 Clone ที่1 (T7 promoter) (F19: *Hyriopsis desowitzi* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 1)

GactgcgtaccaattcAAC**CCGTGATTGTTGGCTCGCTTGTA**ATACATTCACGGACAGAGATAAAGTCTTTGTTGTTTCAAATTGCTCT
CGAGCTAATATAGTGCTGAGCGCTTCTCCGGCATTTCCCAATATTTGTATAATGTTGATTAGTATATAGCAGCCACACCAGGA
TAAAGTTGTATGATAAGTAGTCAATGTCAACAAACAACGCTGAATGATACTCTTGGTTTTCTCCGTGCAAGTTAGACTGTCTG
TGAGAGACATTGTTTTTCCAACAGGAAATATTTAGTACACTTCATTCAAGGAAGTATTGCCACAGAATCTGGAAAGGAAAGA
GAGACTGGTTTATTATATTTTCATGTTTTT**CAGCTAAAATCTTGGTCTGCCCCAATGTtactcaggactcat**

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 20 Clone ที่1 (T7 promoter) (F20: *Uniandra* sp. ตัวอย่างที่ 1)

gactgcgtaccaattcAACCTCGATTATCAACAGCAGAATAATCACTGTGTAAGCTGTAATTGTATACTGCTATTGCAGTATTGCAACA
ATAATCCAAGACAATTCACCGTAGACGGAAAAATAACGATTTCGGTCATACATGAAACAATGTGATGCTGACGGGGGTGTGGG
CTAGT**tactcaggactcat**

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 21 Clone ที่1 (T7 promoter) (F21: *Uniandra* sp. ตัวอย่างที่ 2)

gactgcgtaccaattcAACAATGACCTCAGATAAAAAAATACTGATCAAAAGATCAGCCTCCGTTAGGCAAAATTTGGATTTCTTTG
CTGTAAACTACAAGGAGCGTTGGTTCTGTCTAAAAAAGTGGTCGGTTCGCCCTCCATGCTGCTGCCTGT**tactcaggactcat**

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 22 Clone ที่1 (T7 promoter) (F22: *Hyriopsis desowitzi* เพศผู้ ตัวอย่างที่ 1)

gactgcgtaccaattcAACACTATATTGTCCATGTTGATAAAATTTAGGATGCATACCTAAGTATATTTATTGCCATTCTTTCTTCT**CAA**
TTCTGCTTTTATGGCTATGATCAACTAGATTTATTAGATCATTCTAGTTCATAAAGGAATATGTGATTGACTTTTGAATGTAGT
TGAAACTACTGTACTGTTTCAGTGTGTATCAGGTTTTCTTTTCAGATTTGCAGATGTATGCTAAAGAAGACATGTTTTTTCAGTC
ATTTGCATGTTTGGTGTTTGTGCGACTACCGCTGTGACCTATATGACCTATAGCATACAGTGCATCTTCTATT**ACTGGCCTAACA**
TTGTATCAAAATAGTtactcaggactcat

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 25 Clone ที่1 (T7 promoter) (F25: *Hyriopsis desowitzi* เพศเมีย ตัวอย่างที่ 1)

gactgcgtaccaattcAACACGTATATTATGATGTAAGTTTTCTCAATGCAGTTCATCAAACAGATATTCTGTTTTTACCTCTTGATGCAT
TCTAACTTGGTAGACGTCGAGTAACATTCAAACACGCTCTAACCATTGTTGATGTTGCAACAGATATAAAGAAGCAGATGGA
TATCAGCTAAAACATCGTCTGAAGGAGCTTCTATATTTGAACGAATTTATCAAGAATGTGGCTAAAGCTGCATCAGGTTGATTC
TAGCATATAATTTCTGGTCCAGTATTATCGTTGATGAAACAACATATCAAAATACGACGAGGACGTGCTGCAGTTCATCGTGA
TCAGGCATTTATTGAACGAGTtactcaggactcat

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบที่ 27 Clone ที่1 (T7 promoter) (F27: *Hyriopsis myersiana* เพศผู้ ตัวอย่างที่ 2)

gactgcgtaccaattcAACATGAATAAATAACCAAAGTAAAGTATCTTGCACACATTATCTCTCGTAACACGTAAGCGGCGGCTGATC
TTGGCAGGATACTCGTATATTTCCGTAATTTTGTCCGTAGACAAAAAGGTCTCCACGGGCGGATCAGAGGGCATCGCGGGTC
GCAGTCGGCCCCGCGTACTGCAGTTTGAAGACCCCTGTTGTAGAGCTACATCTCTACCTTTCCATAAATCCACCCGCTTGAGT
GTATCATATTTGACCTTGACGGTATAGAGTtactcaggactcat

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด
(ขีดเส้นใต้คือลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่พัฒนาและตัวพิมพ์เล็กคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
adapter/ไพรเมอร์)

ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 17 คู่ที่พัฒนาจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP

ชื่อไพรเมอร์	5'-3' ลำดับเบสของไพรเมอร์ (จำนวนเบสทั้งหมด)	จำนวน GC และ ค่า Tm (°C)
PM1 (<i>Chamberlainia hainesiana</i>)	CGGAGTAAACCCAGGGCATA (20) TCGGTTGTGTACCGCGCAAG (20)	GC = 11 Tm = 62 GC = 12 Tm = 64
PM2 (<i>Hyriopsis myersiana</i>)	TCTTCCAGTCCGTGGCAGAG (20) CTATTGCCTGAAGCAGACCC (20)	GC = 12 Tm = 64 GC = 11 Tm = 62
PM3 (<i>Chamberlainia hainesiana</i>)	TCCAAGATAGCAATAACCGC (20) TCTCTCGATGACAGATTG (18)	GC = 9 Tm = 58 GC = 8 Tm = 52
PM4 (<i>Hyriopsis desowitzi</i>)	AACCGTAGTTCACCTCATGCCC (21) GCATAATCGGTGGTGGAGGAC (21)	GC = 11 Tm = 64 GC = 12 Tm = 66
PM5 (<i>Hyriopsis desowitzi</i>)	TGTAAGATGGATGGACTCGC (20) TCAAATCGACACGTGGGCG (19)	GC = 10 Tm = 60 GC = 11 Tm = 60
PM6 (<i>Uniandra sp.</i>)	ACGTTGCATTAGGTATCCTG (20) GGGTCAAACGACCTACACT (20)	GC = 9 Tm = 58 GC = 10 Tm = 60
PM7 (<i>Hyriopsis myersiana</i>)	AGACACTCGGCGCATTCTGG (20) GCTGGGGTAAGAAATGCGAA (20)	GC = 12 Tm = 64 GC = 10 Tm = 60
PM8 (<i>Chamberlainia hainesiana</i>)	AACCTGCAATATCCAGTGTCC (21) GAACTGACTGTGATGGCACC (20)	GC = 10 Tm = 62 GC = 11 Tm = 62
PM9 (<i>Hyriopsis myersiana</i>)	TGTACTAAAACAACATAAACTG(25) AGATTTGTATGTAACCATAGTTTC(25)	GC = 7 Tm = 64 GC = 7 Tm = 64
PM10 (<i>Hyriopsis myersiana</i>)	ATTGGGTAAAATGTTTGTCTAGC (24) GGTGCGATGTCTGGCAATC (19)	GC = 8 Tm = 64 GC = 11 Tm = 60
PM11 (<i>Chamberlainia hainesiana</i>)	CCAAGATAAAATGCTCATGTG (21) GAGCACCTCTGTTCTAAAG (19)	GC = 8 Tm = 58 GC = 9 Tm = 56
PM12 (<i>Chamberlainia hainesiana</i>)	TGGGCCATTTAGTATTGC (18) CATTTCCACCAACTACAG (18)	GC = 8 Tm = 52 GC = 8 Tm = 52
PM13 (<i>Hyriopsis desowitzi</i>)	CCGTGATTGTTGGCTCGCTTGTA (23) GGGCAGACCAAGATTTAGCTA (22)	GC = 12 Tm = 64 GC = 11 Tm = 62

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	5'-3' ลำดับเบสของไพรเมอร์ (จำนวนเบสทั้งหมด)	จำนวน GC และ ค่า Tm (°C)
PM14 (<i>Hyriopsis desowitzi</i>)	CAATTCTGCTTTTATGGCTATGA (23) GATACAATGTTAGGCCAGTA (20)	GC = 7 Tm = 64 GC = 7 Tm = 64
PM15 (<i>Chamberlainia hainesiana</i>)	CCATGGGATGGATCCACATACTC (23) TTTGCAACATCAATGTCAGCATTTC (24)	GC = 8 Tm = 64 GC = 11 Tm = 60
PM16 (<i>Hyriopsis desowitzi</i>)	CGTATATTATGATGTAAGTTTCC (24) CGTTCAATAAATGCCTAATC (20)	GC = 9 Tm = 58 GC = 8 Tm = 52
PM17 (<i>Hyriopsis myersiana</i>)	GCACACATTATCTCTCGTAAC (21) CTATACCGTCAAGGTCAAAT (20)	GC = 8 Tm = 58 GC = 9 Tm = 56

นำไพรเมอร์ที่ได้ทั้งหมด 17 คู่ไปทดสอบกับ 28 ตัวอย่างของหอยกาบน้ำจืดโดยใช้เทคนิค
พีซีอาร์ ใช้องค์ประกอบของสารเคมี อุณหภูมิและเวลาดังตารางที่ 10

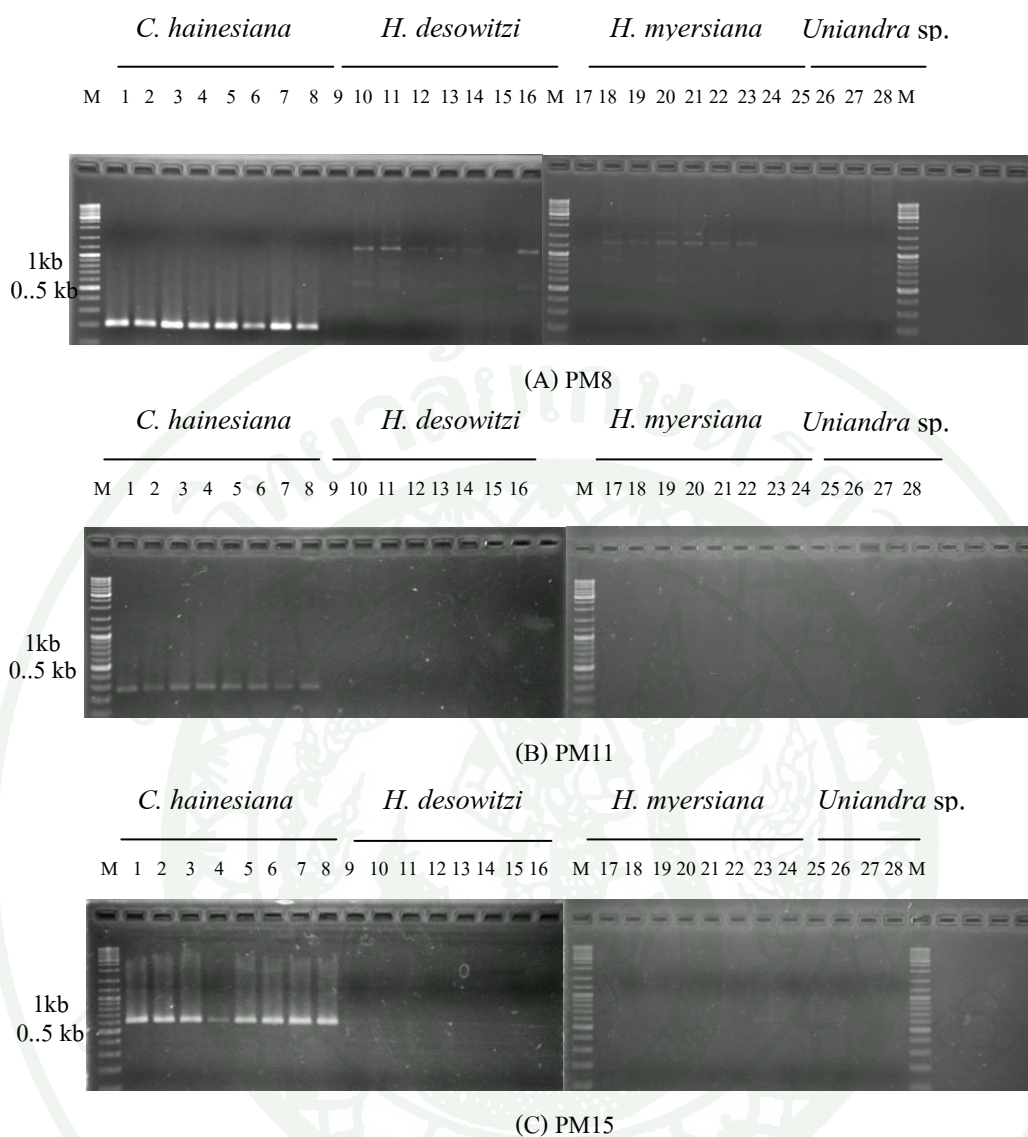
ตารางที่ 10 องค์ประกอบสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะกับพันธุ์หอยมุกน้ำจืด

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA (100 ng/μl)	1.00	100 ng/12.5 μl
10X PCR buffer	1.25	1X
MgCl ₂ (50 mM)	0.25-0.375	1.0-1.5 mM
dNTP (2 mM)	0.625	0.1 mM
Primer F (5 μM)	0.2-0.5	0.08-0.2 μM
Primer R (5 μM)	0.2-0.5	0.08-0.2 μM
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.10	0.5 unit/12.5 μl
ultrapure water	เพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้ 12.50	

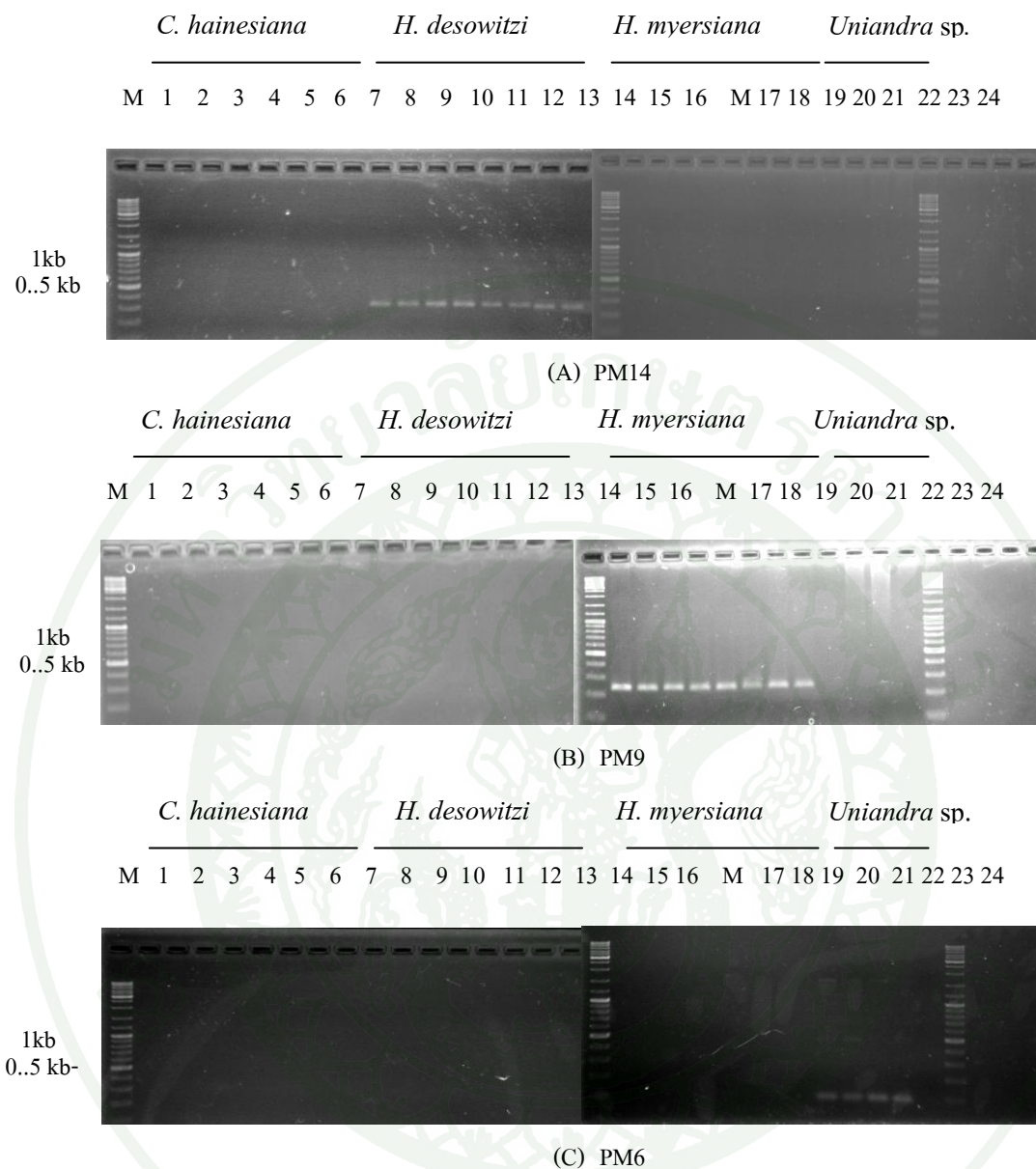
ขั้นที่ 1	94 °C	4	นาที	} ทำซ้ำ 25 รอบ
ขั้นที่ 2	94 °C	45	วินาที	
ขั้นที่ 3	59-65 °C	45	วินาที	
ขั้นที่ 4	72 °C	45	วินาที	
ขั้นที่ 5	72 °C	5	นาที	
ขั้นที่ 6	คงอุณหภูมิที่ 4 °C			

พบว่าทั้งหมด 10 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ระบุสายพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืดได้ โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Chamberlainia hainesiana* คือ PM8, PM11 และ PM15 (ภาพที่15) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Hyriopsis desowitzi* คือ PM14 (ภาพที่16A) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Hyriopsis myersiana* คือ PM9 (ภาพที่16B) ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Uniandra* sp. คือ PM6 (ภาพที่16C) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับทั้ง *Hyriopsis desowitzi* และ *Hyriopsis myersiana* คือ PM4, PM5, PM10 และ PM13 (ภาพที่17)

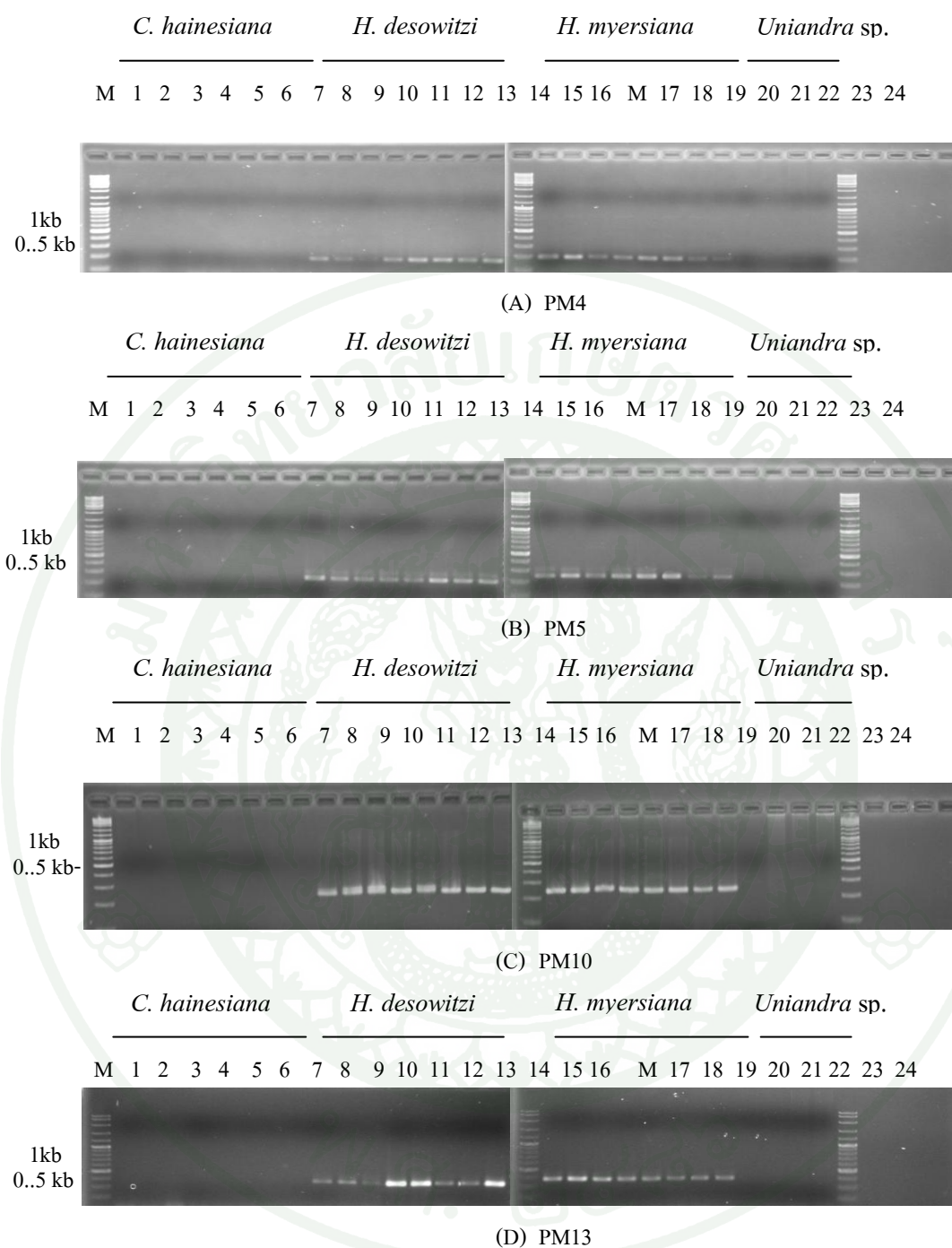
เมื่อนำไพรเมอร์จำเพาะกับพันธุ์ของหอยกาน้ำจืดมาทดสอบกับหอยที่สามารถหาได้ตามท้องตลาด พบว่าไพรเมอร์ทั้งหมดไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในตัวอย่างหอยชนิดอื่นๆ เช่น หอยแครงและหอยแมลงภู่ (ภาพที่18)



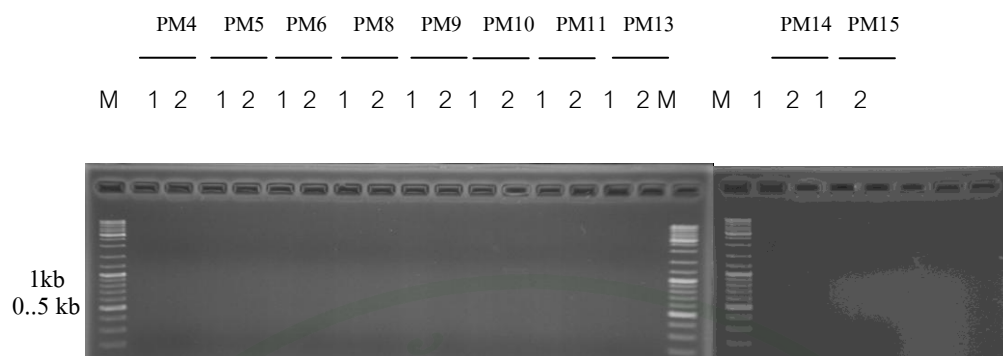
ภาพที่ 15 ผลของการตรวจสอบไพรเมอร์ PM8(A), PM11(B), PM15(C) กับตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด ทั้ง 28 ตัวอย่างซึ่งให้ความจำเพาะกับ *Chamberlainia hainesiana* (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, หมายเลข 1-8 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana*, 9-16 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis desowitzi*, 17-24 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* และ 25-28 = *Uniandra* sp.)



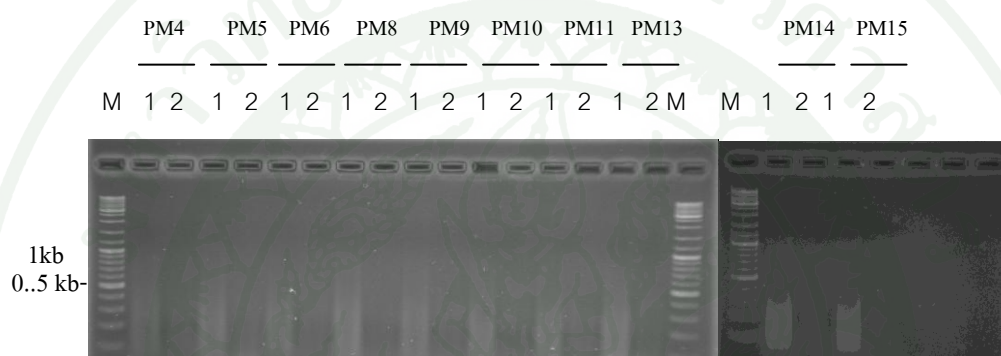
ภาพที่ 16 ผลของการตรวจสอบไพรเมอร์ PM14(A), PM9(B), PM6(C) กับตัวอย่างหอยมูกน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่างซึ่งให้ความจำเพาะกับ *Hyriopsis desowitzi*, *Hyriopsis myersiana* และ *Uniandra* sp.ตามลำดับ (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, N = Negative control, หมายเลข 1-8 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana*, 9-16 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis desowitzi*, 17-24 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* และ 25-28 = *Uniandra* sp.)



ภาพที่ 17 ผลของการตรวจสอบไพรเมอร์ PM4(A), PM5(B), PM10 (C), PM13(D) กับตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่างซึ่งให้ความจำเพาะกับสกุล *Hyriopsis* (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, หมายเลข 1-8 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana*, 9-16 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis desowitzi*, 17-24 = หอยกาน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* และ 25-28 = *Uniandra* sp.)



(A) หอยแครง



(B) หอยแมลงภู่

ภาพที่ 18 ผลจากการทดสอบไพรเมอร์ที่พัฒนาได้ซึ่งมีความจำเพาะกับหอยสายพันธุ์ต่างๆกับ

(A) หอยแครง (B) หอยแมลงภู่ จากการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis

การสกัดอาร์เอ็นเอจากหอยกาบน้ำจืด

สกัดอาร์เอ็นเอจากหอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* จากระยะตัวอ่อน (glochidia) ที่ยังไม่สร้างมุกและระยะโตเต็มวัยที่สร้างมุกได้แล้วในส่วน mantle โดยใช้ชุดสกัด (Epicentre biotechnologies , USA) วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอโดย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 อาร์เอ็นเอของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* จากตัวอ่อนระยะ โกลคิเดีย 5 ตัวอย่าง และระยะโตเต็มวัย 2 ตัวอย่าง จากการทำ electrophoresis ใน 1% agarose (G1-G5 = ตัวอ่อนหรือระยะ โกลคิเดีย และ A1-A2 = ระยะโตเต็มวัย)

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค differential display

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo dT จากนั้นนำ cDNA มาเจือจาง 200 เท่าแล้วจึงเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ oligo dT ที่เติมนิวคลีโอไทด์ 2 นิวคลีโอไทด์ ร่วมกับ random primer ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 68 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 11) คิดเป็น 136 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 72 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน นำมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างในตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดพันธุ์

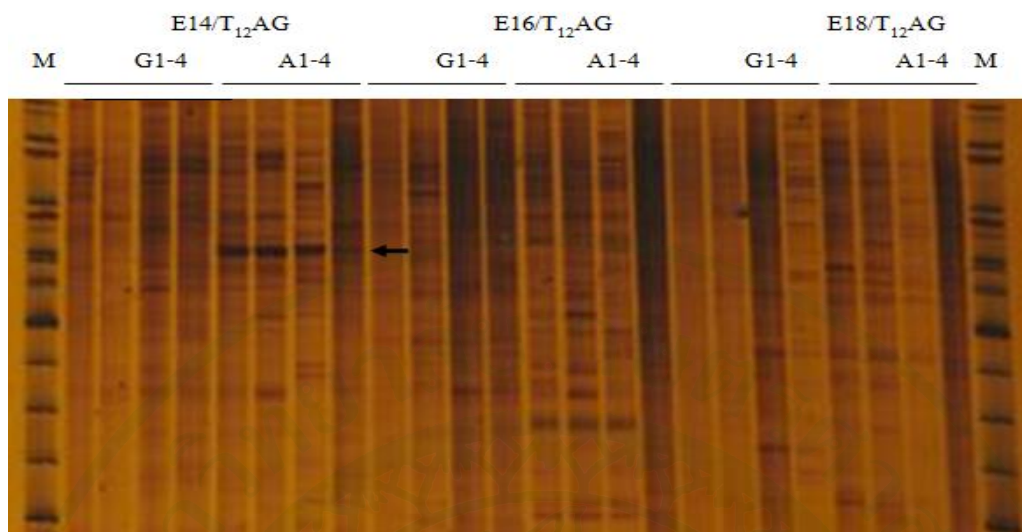
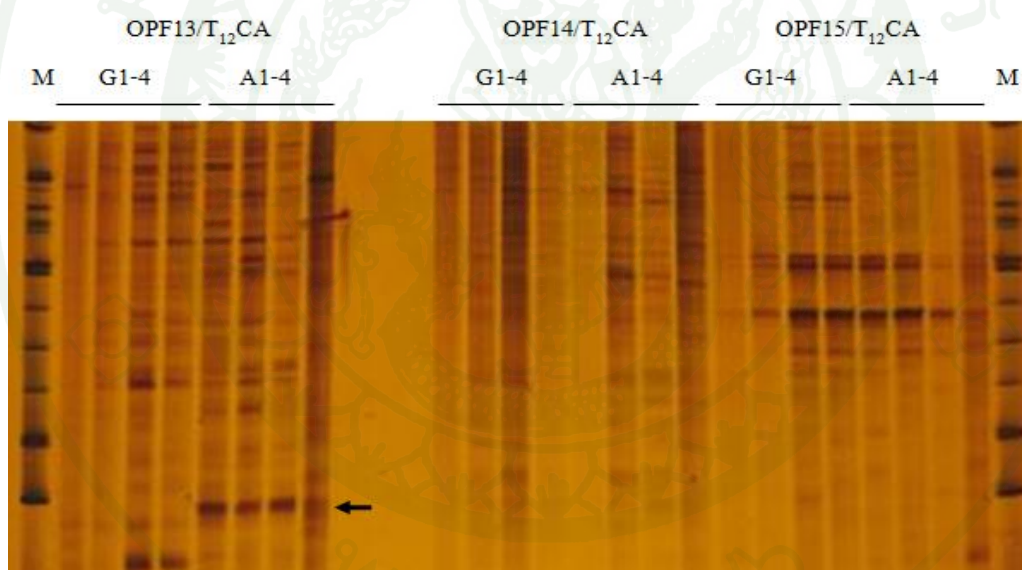
Chamberlainia hainesiana ระยะตัวอ่อน (glochidia) และระยะโตเต็มวัย (adult) ระยะละ 4 ตัวอย่าง รวม 8 ตัวอย่าง ตัดแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างทั้ง 2 ระยะ (ภาพที่ 20) ได้จำนวน 16 แถบ จากไพรเมอร์ 15 คู่ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับระยะโตเต็มวัย 15 แถบและจำเพาะกับระยะตัวอ่อน 1 แถบ

ตารางที่ 11 ไพรเมอร์แบบสุ่มที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค differential display

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
D01	ACCGCGAAGG	OPF11	TTGGTACCCC
D04	TCTGGTGAGG	OPF12	ACGGTACCAG
E1	CCCAAGGTCC	OPF13	GGCTGCAGAA
E2	GGTGCGGGAA	OPF14	TGCTGCAGGT
E3	CCAGATGCAC	OPF15	CCAGTACTCC
E4	GTGACATGCC	OPF16	GGAGTACTGG
E5	TCAGGGAGGT	OPF17	AACCCGGGAA
E6	AAGACCCCTC	OPF18	TTCCCGGGTT
E7	AGATGCAGCC	OPF19	CCTCTAGACC
E8	TCACCACGGT	OPF20	GGTCTAGAGG
E9	CTTCACCCGA	OP I03	CAGAAGCCCA
E10	CACCAGGTGA	OPI 04	CCGCCTAGTC
E11	GAGTGTCAGG	OPI12	AGAGGGCACA
E12	TTATCGCCCC	OPI 14	TGACGGCGGT
E13	CCCGATTGGG	OPI 18	TGTCCAGCCT
E14	TGCGGCTGAG	OPK 02	GTCTCCGCAA
E15	ACGCACAACC	OPK 14	CCCGCTACAC

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
E16	GGTTACTGTG	OPK16	GAGCGTCGAA
E17	CTACTGCCGT	OPL12	GGGCGGTACT
E18	GGACTGCAGA	OPL13	ACCGCCTGCT
E19	ACGGCGTATG	OPL 19	GAGTGGTGAC
E20	AACGGTGACC	OPN03	GGTACTCCCC
F01	ACGGATCCTG	OPN04	GACCGACCCA
F02	GAGGATCCCT	OPN 14	TCGTGCGGGT
OPF1	ACGGATCCTG	OPN 20	GGTGCTCCGT
OPF2	GAGGATCCCT	APW01	TGGTCACTGA
OPF3	CCTGATCACC	APW02	CGGCCCCCTGT
OPF4	GGTGATCAG	PRR01	TTCCAGTGCC
OPF5	CCGAATTCCC	PRR02	TGAGGATTGT
OPF6	GGGAATTCGG	RSR01	TAGGCGTGAC
OPF7	CCGATATCCC	RSR02	AGCGGACCAG
OPF8	GGGATATCGG	RSR03	GTCCGTACTA
OPF9	CCAAGCTTCC	TPXR1	CATTGGAAG
OPF10	GGAAGCTTGG	TPXR2	CTCAAGGTGG
T ₁₂ CA	TTTTTTTTTTTCA	T ₁₂ AG	TTTTTTTTTTTAG

(A) E14/T₁₂AG, E16/T₁₂AG, E18/T₁₂AG(B) OPF13/T₁₂CA, OPF14/T₁₂CA, OPF15/T₁₂CA

ภาพที่ 20 ผลที่ได้จากการทำ differential display ในหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana*

ระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย โดยใช้ไพรเมอร์ (A) E14/T₁₂AG, E16/T₁₂AG, E18/T₁₂

AG และไพรเมอร์ (B) OPF13/T₁₂CA, OPF14/T₁₂CA, OPF15/T₁₂CA (M = ดีเอ็นเอ

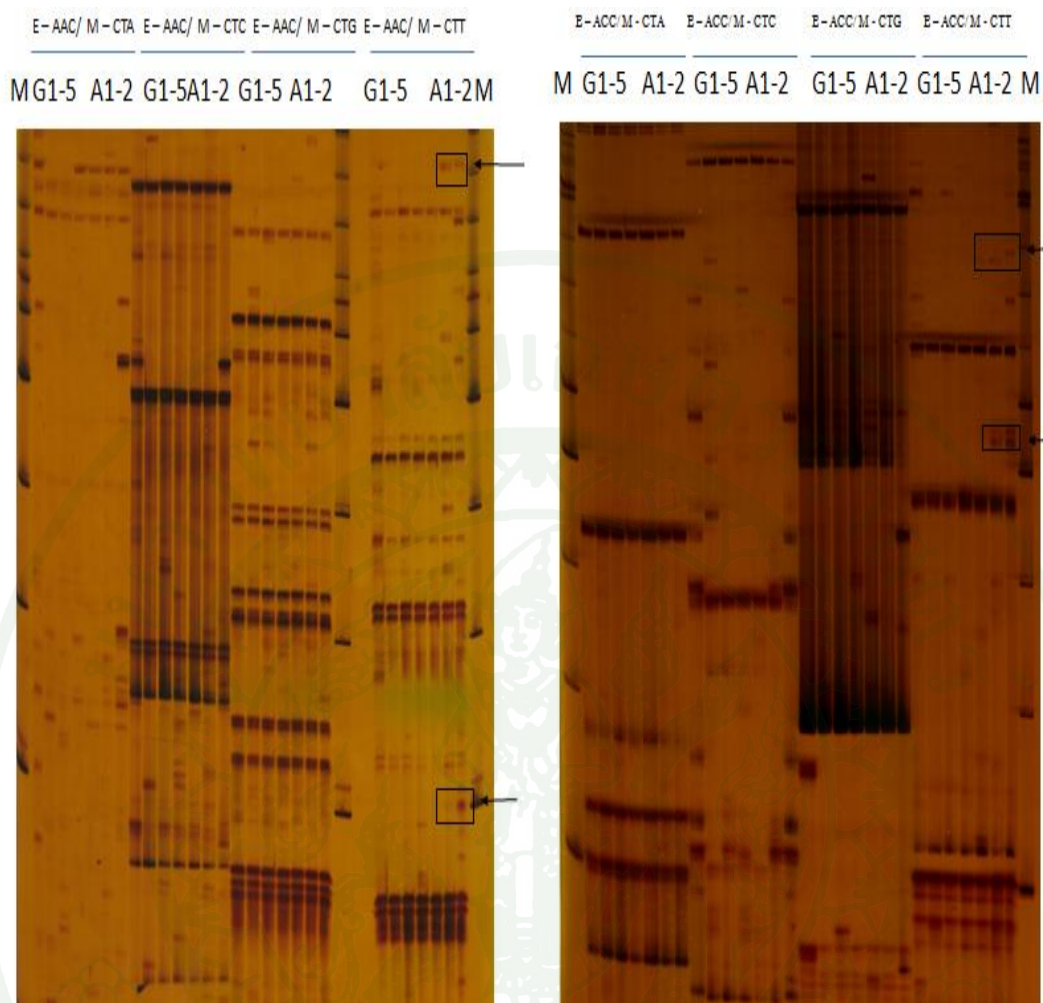
มาตรฐาน, G1-G4 = ระยะตัวอ่อน, A1-A4 = ระยะโตเต็มวัย)

← แสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค cDNA-AFLP

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ไพรเมอร์ oligo dT จากนั้นนำ cDNA มาสังเคราะห์ cDNA สายคู่ นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเฟลแอลพี ด้วยไพรเมอร์ E+3 และ M+3 ทั้งหมด 64 คู่ไพรเมอร์ กับตัวอย่าง cDNA ตัวอย่าง ระยะโกลกิดี 5 ตัวอย่างและ ระยะโตเต็มวัย 2 ตัวอย่าง รวม 7 ตัวอย่าง คัดแยกดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยกาบน้ำจืดสายพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* (ภาพที่ 21 และ 22) ได้จำนวน 14 แถบจากไพรเมอร์ 14 คู่ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับหอยระยะโตเต็มวัยทั้ง 14 แถบ แสดงให้เห็นว่าในระยะโตเต็มวัยมีการแสดงออกของยีนมากกว่าตัวอ่อนระยะโกลกิดี

มาก



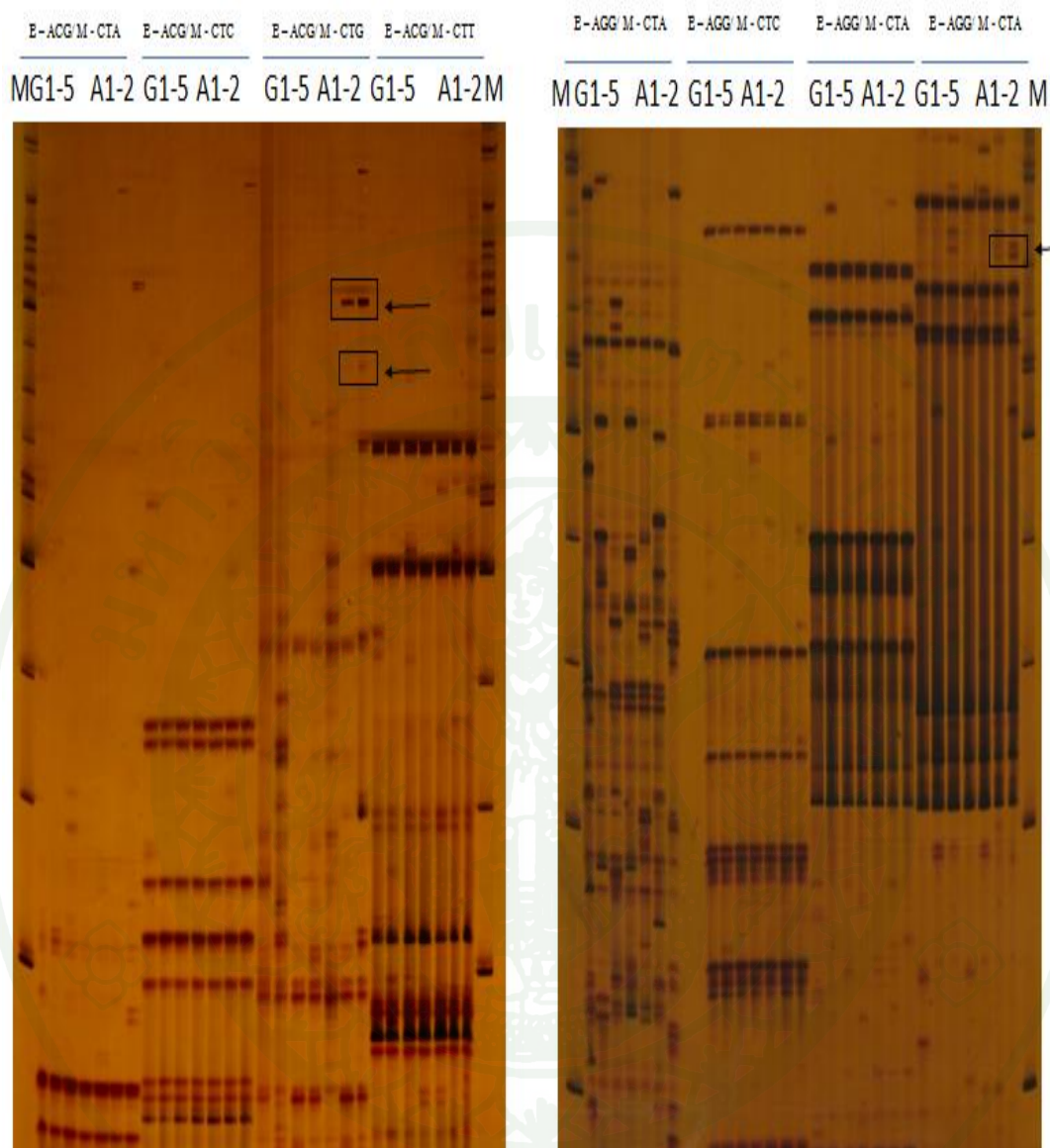
(A) E- AAC/ M-CTA, CTC, CTG, CTT

(B) E-ACC/ M-CTA, CTC, CTG, CTT

ภาพที่ 21 ตัวอย่างแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำ cDNA-AFLP ในหอยมุกน้ำจืดพันธุ์

Chamberlainia hainesiana เปรียบเทียบระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย โดยใช้ไพรเมอร์ (A) E- AAC/ M- CTA, CTC, CTG, CTT (B) E -ACC/ M - CTA, CTC, CTG, CTT (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, G1-G5 = ระยะตัวอ่อน, A1-A2 = ระยะโตเต็มวัย)

← แสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย



(A) E-ACG/ M-CAA, CAC, CAG, CAT

(B) E-AGG/ M-CTA, CTC, CTG, CTT

ภาพที่ 22 ตัวอย่างแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำ cDNA-AFLP ในหอยมุกน้ำจืดพันธุ์

Chamberlainia hainesiana เปรียบเทียบระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย โดยใช้ไพรเมอร์

(A) E – ACG/ M – CAA, CAC, CAG, CAT และ (B) E – AGG/ M - CTA, CTC, CTG,

CTT (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, G1-G5 = ระยะตัวอ่อน, A1-A2 = ระยะโตเต็มวัย)

← แสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัย

การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอ่อนระยะ โกลกิเดียและระยะ โตเต็มวัยของ หอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* จากเทคนิค differential display จำนวน 16 แถบ และเทคนิค cDNA-AFLP จำนวน 14 แถบ มาป้อนที่ 65°C เพื่อสกัดดีเอ็นเอจาก acrylamide gel นำไป ทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิมที่ใช้ทำ differential display และ cDNA-AFLP พบว่ามีแถบดีเอ็นเอ 12 แถบจากเทคนิค differential display และ 14 แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค cDNA-AFLP ที่สามารถ เพิ่มปริมาณได้ ในบางตัวอย่างไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อาจเนื่องมาจากการปนเปื้อน ระหว่างการตัดแถบดีเอ็นเอจาก polyacrylamide gel หรือปริมาณ ดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบอาจมีน้อย เกินไป (วงเดือน, 2545) หรืออาจมีสารบางอย่างซึ่งมีผลยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น ยูเรีย เป็นต้น (วงเดือน อ้างถึง Bhattacharjee *et al.*, 1997) จากนั้นเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGem T easy vector (Promega) แล้วถ่ายเข้าสู่ *E.coli* เลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ มีโคโลนีสีขาว มา ตรวจสอบขนาดเทียบกับดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค โคลนีพีซีอาร์ (colony PCR) แล้วนำมาหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 84 ถึง 335 นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 12 และ 13) และ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล จึงทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีนใด แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิค differential display และ cDNA-AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ดี โดยมียีนหลายยีนมีรายงานว่าได้มาจากใช้เทคนิค ดังกล่าว ได้แก่ยีนที่เกี่ยวข้องกับ fertility restoration ในข้าวโพด (Zhang and Zheng, 2008) , ยีนทน แล้งในข้าวบาร์เลย์ (Suprunova *et al.*, 2007) และยีน otubain-like cystein protease ใน *Pinus radiata* (Aquea *et al.*, 2008) เป็นต้น สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างมูกในหอยยังไม่มีรายงานใน ฐานข้อมูล รวมถึงกลไกเกี่ยวข้องกับการสร้างมูก ยังไม่มีรายงานมาก่อน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีนที่ เกี่ยวข้องอาจเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตหรือการสะสมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็น ส่วนประกอบสำคัญของมูก โดยน่าจะได้ศึกษาวิเคราะห์การแสดงออกที่ต่างกันของยีนจำเพาะใน กระบวนการดังกล่าวที่น่าจะเกี่ยวข้องโดยทั้งสองเทคนิค และควรเพิ่มตัวอย่างในการศึกษาและ จำนวนไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* โดยเทคนิค differential display (ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือลำดับเบสของไพรเมอร์)

ลำดับโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)
DD1	<u>CCAGATGCACT</u> AACAGTTGAAACAATAAATTATGTGCTT TTGATTCCAGGATTGGAGATAATACAGTACTAAAATCCTTTC TGCTTACCATTTATGTGAATTATCCACAGGTTTGTTCAGTC AAAGAATGCATAGATAGTATTTGTGTTAGACATAGGCCAGA CATCCAGGTCAGTTTGATATGCAAAAGCACTATCCCCCATGC TTTTTCTTGTCTATGCAGTGTACATCTATTGAAATAAAGAAG ACTTTTCTACTAAAAAAAAAAAA	273
DD3	<u>GGTGACTGTG</u> TAAATGATTTTGTAAAGAAAATGTTAACCAC GTTTTTACGTGAAATGTACTTGTTCATACTTATTTTGCTAA TATGATTTCTAAGTTGTACTGTATAGTCAGATACGTGATTTTC AAATTTAAATATTTGTAAATGTTTATGAATAAATGTAATTTTC AGTCATTAAATCCTTGTGCCTAAAAAAAAAAAA	202
DD4	<u>TGCTGCAGGT</u> CATCAACAGGAACGTGAAAATAAAAAGAAC ATCATTCAATGAAAATCACTTTATTAAATAGTTTAAGCCTAG GTACCTTTGTCAACCAACATGCCTACTTTTATAAGAAATATTT TATATCAAGGTCCACATTAAACATAAAATATTCTATTTCAGTG ATACATTTCTAGGCTTGAACCTATTTTTTAGATCAGAAAGCTG TATTTTATAAAAATTGACAATAAAACATATATCCTAAAAA AAAAAAA	256
DD5	<u>GGACTGCAG</u> CAATGGTGATATTAACGATCTCACTGAC ATGGCGTTGGAACCGGATGAGCCGACACTATAATGTACAAA AGCAGTGAACTACTCAACGAGTCACTGGGTACACGCATAA TCAAATGATTACATGAGATCAATAAAGATATTAATATGAAA AAAAAAA	172

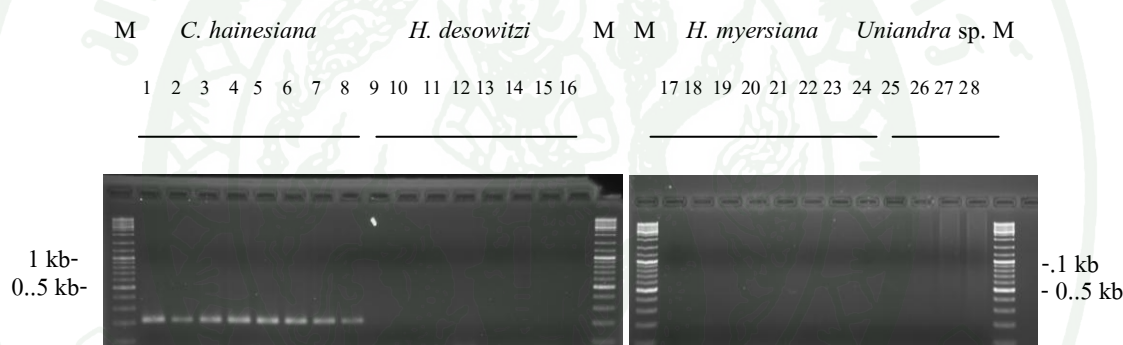
ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* โดยเทคนิค differential display (ส่วนที่ขีดเส้นใต้ คือลำดับเบสของไพรเมอร์) (ต่อ)

ลำดับโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)
DD7	<u>TTATCGCCCC</u> ATCGGATGGTTACGGCCACTCGAATCATCACC ACCATCATCATCATCGATGCATTTGCGTACCAGACAGGTTTGC CTGTCCCTGGCAATATCCCATATTTGCGGGCAGGTGCCACTAT TGCCCTCCTTGGCAAGTAAAATGCGGCTGGGTGTACTGCTGCA GACAATGGTGATATTAACGATCTCACTGACATGGCGTTGG AACCGGATGAGCCGACACTATAATGTACAAAAGCAGTGA ACTCAACGAGTCACTGGGTACACGCATAATCAAATGATTACA TGAGATCAATAAAGATATTAATATGAAAAAAAAAAAA	335
DD12	<u>GGCTGCAGAAA</u> ATGGTGATATTAACGATCTCACTGACATG GCGTTGGAACCGGGTGAGCCGACACTATAATGTACCAAGCAG CAAACACTCAACGAGTCACTGGGTACACGCATAATCAAAT GATTACTTGAGATCAATAAATTAATAATATGAAAAAAAA AAA	171
DD16	<u>GGGAATTCGG</u> CAATGGCTTTGGAGGAGGATACGGCTACAGC AGACGTCAGTAAATATTACTAAACAAGACAGACACAACCA AAGAATGGGACTCAACCGAACGAAAGTACAACGTCAATTTGA ACCATAGTTACGAATTTATTCTATTTTGTACTCTAATAAAATC GTTTGATTGAAAAAAAAAAAA	190

ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากแอมพลิฟิเคชันที่ให้ความแตกต่างระหว่างระยะตัวอ่อนและระยะโตเต็มวัยของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* โดยเทคนิค cDNA – AFLP (ส่วนที่ขีดเส้นใต้หมายถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์)

ลำดับโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)
CAF2	<u>GACTGCGTACCAATTCAACAAGATTGGA</u> ACTCCAAATCAACTAACAAAGTAACCAATTGGAATCAAGTTACTCAGGACTCATC	84
CAF3	<u>GACTGCGTACCAATTCAACCTACTGGCCTTGATCAATCGTGA</u> ACTTCACACATATATCGAGAATATGGAACAGGCAAAGTTACTCAGGACTCAT	94
CAF6	<u>GACTGCGTACCAATTCAACAAATCTTGCCA</u> ACTCCCCAAGGAGGGAGAGATCCCCCTTCAAGTTACTCAGGACTCAT	77
CAF8	<u>GACTGCGTACCAATTCACGAGTAAGTGA</u> ACCAGACAATTCCTCAAGAAAGTTTGATCCATCAGTGCTTCTTTCAACAGCATCATATCCTTTCTCTTTTTCCAAATGTGTAGTAGTTGTTTTCTTAGATAAATTTTCAGAACTATGTGCACTAGGATGAATGGAATCATCAAGTTCTCCTTGATCAGAAGGGTACATTTCAACAATTCATTACAAATGGAACTGGATTATATCTAAGCTACATGATCTCTGTGACAATATTGTGCCTGTTACTCAGGACTCAT	285
CAF9	<u>GACTGCGTACCAATTCACG</u> GAATCAACCCGAAGTGAGTTTCTCAGAGACGTGCAAGCGCCTTGTTGTTGAGTATGGCCATAGCGGGTTGTGGAATACCAAGTACGCTTACTGCAACATGATATCAGTTGATATGATTGCATGTTACCCGGGAAGTTTTCTCAGAATGGGTGAGTGTTCTGAGTATTTCAAGATATTCGGACATCCCACGCATGAAATGACACGAGTAGCTGTTACTCAGGACTCAT	246
CAF10	<u>GACTGCGTACCAATTC</u> ACTTGACCAGGCATTACATGCCATGTTGGTACAGCTGAATATACCTGCCAGTTAGGACAGACGAATTTGCTGACCTTGGTGTTACTCAGGACTCAT	113

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากเทคนิค cDNA-AFLP ที่มีขนาดยาวพอสมควรมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับพันธุ์หอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ซึ่งเป็นพันธุ์หอยกาบน้ำจืดที่สามารถสร้างมุกได้ดีและใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAF9 (CAF9F: 5'CGGAAATCAACCCGAAGTGA 3'/ CAF9R: 5' CTCGTGTCATTTTCATGCGTG 3') ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะกับหอยพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* ขนาด 220 คู่เบส จากการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ใน 1.5 % agarose gel โดยเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอหอย 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Chamberlainia hainesiana* พันธุ์ที่สร้างมุกได้ดี *Hyriopsis desowitzi* และ *Hyriopsis myersiana* พันธุ์ที่สร้างมุกได้ปานกลาง และ *Uniandra* sp. พันธุ์ที่ไม่สร้างมุก (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 การตรวจสอบความจำเพาะกับพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CAF9-F/CAF9-R กับตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่าง (M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, หมายเลข 1-8 = หอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana*, 9-16 = หอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis desowitzi*, 17-24 = หอยกาบน้ำจืดพันธุ์ *Hyriopsis myersiana* และ 25-28 = *Uniandra* sp.)

สรุป

1. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับชนิดของหอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่สร้างมุกได้ดี, *Hyriopsis desowitzi*, *Hyriopsis myersiana* เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่สร้างมุกได้ดีปานกลางและ *Uniandra* sp. เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างมุกได้โดยใช้เทคนิค AFLP จากการทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 82 คู่ไพรเมอร์และได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและชัดเจนทั้งหมด 9 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 28 แถบดีเอ็นเอ เลือก 15 แถบดีเอ็นเอที่มีความยาวพอเหมาะมาโคลนและหาลำดับเบส พัฒนาไพรเมอร์จากลำดับเบสได้ทั้งหมด 17 คู่ไพรเมอร์ หลังจากนั้นนำไปทดสอบกับตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดทั้ง 28 ตัวอย่าง หอยแครงและหอยแมลงภู่ พบว่ามี 3 คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพันธุ์ *Chamberlainia hainesiana*, 1 คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *Hyriopsis desowitzi*, 1 คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *Hyriopsis myersiana*, 1 คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *Uniandra* sp. และ 4 คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับหอยสกุล *Hyriopsis*

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างระยะตัวอ่อนหรือโกลกิดีซึ่งยังไม่สามารถสร้างมุกได้และระยะโตเต็มวัยซึ่งสามารถสร้างมุกได้แล้วโดยใช้เทคนิค differential display 136 คู่ไพรเมอร์และ cDNA-AFLP 64 คู่ไพรเมอร์ พบว่า differential display มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 16 แถบ และ cDNA-AFLP มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 14 แถบ เลือก 7 แถบที่ชัดเจนและมีความยาวพอเหมาะจากเทคนิค differential display และ 6 แถบจาก cDNA-AFLP นำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่ตรงกับในฐานข้อมูล GenBank

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คึกฤทธิ์ อนุพงษ์. 2548. การจัดจำแนกและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของหอยกาน้ำจีดวงศ์ *Amblemidae* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัคนารี มีสุขโข. 2539. คลาริโอไทป์ของหอยกาน้ำจีดวงศ์ *Amblemidae* ที่พบที่ลุ่มแม่น้ำยมและน่าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประทุม คำนาค. 2545. อนุกรมวิธานของหอยกาน้ำจีดวงศ์ *Amblemidae* ในลุ่มน้ำมูล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- วงเดือน สุวรรณชาติ. 2545. การศึกษาความแตกต่างของยีนที่แสดงออกในพริกพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนสเมื่อกระตุ้นด้วยเชื้อ *Colletotrichum capsici* ด้วยเทคนิค differential display. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตราฐ, เขาวลัษณ์ จิตราวมวงศ์ และศิริวรรณ จันทเมย์. 2538. สังขวิทยา. ศักดิโสภารการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 215 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่ประยุกต์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 269 น.
- อัมพร อึ้งปกรณ์แก้ว. 2535. อัลตราสตรัคเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียมหอยกาน้ำจีดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรภา นาคจินดา นาฎยา พิศพิจิต และวิจิตรา อินทร์เกลี้ยง. 2529. การศึกษาชีวประวัติบางประการของหอยมุกน้ำจืดในจังหวัดกาญจนบุรี, น. 17-28. ใน รายงานประจำปี 2529 สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาญจนบุรี. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา อ้อมเดือน มีชัย สาธิต โกวิทวาทิ อุทัยวรรณโกวิทวาทิ ภรรณกา ชัชวาลวานิช. 2547 รายงานความก้าวหน้าของการวิจัยปีที่ 3 ครั้งที่ 2 โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การศึกษาศักยภาพการผลิตไข่มุกจากหอยกาน้ำจืดวงศ์ *Amblemidae* ในประเทศไทย. 25 น.

Aquea F., F. Gutiérrez, C. Medina and P. Arce-Johnson. 2008. A novel Otubain-like cysteine protease gene is preferentially expressed during somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. **Mol. Bio. Rep.** 35: 567-573.

Bachem, C., R. Oomen and R. Visser. 1998. Transcription Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. **Plant Mol. Bio. Rep.** 16: 157-173.

Brandt, R.A.M. 1974. The non-marine aquatic mollusca of Thailand. **Archivfur Molluskenkunde.** 105: 1-423.

Dazhong Z., C. Min, C. Kang, W. Li, H. Hualiang and T. Kehui. 1998. Isolation of a vernalization-related cDNA clone (VRC) using mRNA differential display in water wheat. **Chinese Sci. Bull.** 43: 1201-1205.

Gao W.J., R.L. Li, Sh.F. Li., Ch.L. Deng and S.P. Li. 2007. Identification of two markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plants. **Russ. J. Genet.** 54: 816-821.

- Geuna, F., R. Banfi and D. Bassi. 2005. Identification and characterization of transcripts differentially expressed during development of apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit. **Tree Genet. Genome** 1: 69-78.
- Graf, D.L. 1997. **Morphology, Zoogeography, and Taxonomy of *Fusconaia flava* (Rafinesque) (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) in the Upper Mississippi, Great Lakes, and Nelson River Basins.** M.Sc. thesis, Northeastern University Boston.
- Huang and Madan. 1999. **CAP3 Assembly**. Available Source: <http://deepe2.psi.iastate.edu/aat/cap/cap.html>, Sep 4, 2009
- JingPing X., C. LiGeng, X. Ming, L. Halin and Y. WeiQi. 2009. Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers. **Sci. Hortic-Amsterdam**. 121: 505-510.
- Kim, N., A. Woo, J. Kim and C. Lee. 2009. Exploration of senescence-associated genes by differential display reverse transcription polymerase chain reaction: Prosaposin as a novel senescence-associated gene. **Arch. Pharm. Res.** 32: 737-745.
- Kong L. and Q. Li. 2007. Genetic comparison of cultured and wild population of the clam *Coelomactra antiquate* (Spengler) in China using AFLP markers. **Aquaculture** 271: 152-161.
- Lee, T. 2001. **Systematic revision of the Sphaeriinae (Mollusca, Bivalvia, Veneroida, Sphaeriidae).** Ph.D. thesis, University of Michigan.

- Liang P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of Eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** 257: 967-971.
- Li C., Y. Bai, E. Jacobson, R. Visser, P. Lindhout and G. Bonnema. 2006. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. **Plant Mol. Biol.** 62: 127-140.
- Li, X.X. and J.N. Havenhand. 1995. Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca, Bivalvia). Available Source: http://www.scienc.flinders.edu.au/biology/people/havenhand_j/abstracts.html, April 27, 2003.
- Miao, L., S. Shou, J. Cai, F. Jiang, Z. Zhu and H. Li. 2009. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. **Mol. Bio. Rep.** 36: 479-486.
- Osipova E., O.K., A.T., Yu. D. Z.S. and S.G. 2003. Analysis of Specific RAPD and ISSR Fragments in Maize (*Zea mays* L.) Somaclones and development of SCAR Markers on There Basis. **Russ. J. Genet.** 39: 1412-1419.
- Pennak, R.W. 1978. **Freshwater Invertebrate of the United States.** 2nd ed. Wiley Interscience Publication, New York. 803 p.
- Pennak, R.W. 1989. **Freshwater Invertebrate of the United States.** John Wiley and Sons. Inc. The United States of America, New York 628 p.
- Pflegere, V. 1990. **Molluscs.** Pografia, a.s., Prague Czech. 216 p.

- Stothard, J.R., S. Hughes and D. Rollinson. 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). **Acta Trop.** 61: 19-29.
- Storer, T.I., R.L. Usinger, R.C. Stebbins and J.W. Nybakken. 1976. **Genus Zoology.** 6th ed. United States of America. 902 p.
- Sun J., D. Jin, C. Zhou, Q. Yang, M. Weng, D. Duan, P. Xu, J. Ma and B. Wang. 2005. Identification of *Porphyra Lines* (Rhodophyta) by AFLP DNA Fingerprinting and Molecular Markers. **Plant Mol. Biol.** 23: 251-262.
- Suprunova, T., T. Krungman, A. Distelfeld, T. Fahima, E. Nevo and A. Korol. 2007. Identification of a novel gene (*Hsdr4*) involved in water-stress tolerance in wild barley. **Plant Mol. Biol.** 64: 17-34.
- Tatlow, D., R. Brownlie, L. A. Babiuk and P. Griebel. 2000. Differential display analysis of gene expression during the induction of mucosal immunity. **Immunogenetics** 52: 73-80.
- Venkatachalam P., A. Thulaseedharan and K. Raghothama. 2009. Molecular Identification and Characterization of a Gene Associated with the Onset of Tapping Dryness (TPD) Syndrome in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) by mRNA Differential display. **Mol. Biotechnol.** 41:42-52.
- Vos, P., R. Hoger, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de LEE, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Winnepenninc, B., T. Backeljau and R.D. Wachter. 1993. **Technical Tips.** 9(12): 407.

- Wongnium S., J. Somana, S. Swangpol, T. Seelanan, P. Chareonsap, S. Chadchawan and T. Jenjittikul. 2010. Genetic diversity and species-specific PCR-based markers from AFLP analyses of Thai bananas. **Biochem. Sys. Eco.** 38: 416-427.
- Yi L., S. Bao-juan, S. Guang-wen, L. Hou-cheng, L. Zhi-liang, L. Zhen-xing, W. Guo-ping and C. Ri-yuan. 2009. AFLP and SCAR Markers Associated with Peel Colorin Eggplant (*Solanum melongena*). **Agri. Sci. China** 8: 1466-1474.
- Yu, D. and K. Chu. 2006. Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* from southern China. **Aquaculture** 258: 220-227.
- Zeppa S., C. Guidi, A. Zambonelli, L. Potenza, L. Vallorani, R. Pierleoni, C. Sacconi and V. Stocchi. 2002. Identification of putative genes involved in the development of *Tuber borchii* fruit body by mRNA differential display in agarose gel. **Curr. Genet.** 42: 161-168.
- Zhang J., H. Wang and Z. Cai. 2007. The application of DGGE and SCAR for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Food control** 18: 672-676.
- Zhang J., R.B. Turkey and J.McD. Stewart. 2008. Comparative analysis of gene expression between CMS- D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. **Plant Cell Rep.** 27: 553-561.
- Zhang Z. and Y. Zheng. 2008. Identification of Candidate Genes Associated with Fertility Restoration in Maize S Cytoplasmic Male Sterility. **Plant Mol. Biol.** 26: 60-71.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายเสวต วรรณรัตน์รัฐ
เกิดวันที่	29 พฤษภาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2550)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	ตีพิมพ์ในวารสาร Thai Journal of Genetics
ทุนที่ได้รับการศึกษา	ทุนอุดหนุนวิจัยจาก สำนักกองทุนสนับสนุน การวิจัยโครงการทุนวิจัย มหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปี 2552 ทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา แห่ง มก. ปี 2550-2551