

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ เป็นการสำรวจชนิดของปลา โดยการเก็บตัวอย่างปลาจากสถานที่ธรรมชาติ ตลาดสดตามแหล่งชุมชน

#### 3.1 ข้อมูลและแหล่งที่มาของข้อมูล

รวบรวมข้อมูลการศึกษาทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของปลา จากเอกสารและงานวิจัยที่เผยแพร่ในฐานข้อมูลงานวิจัย และจากการสอบถามชาวบ้าน และชาวประมงในพื้นที่

#### 3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ปลาเนื้ออ่อนที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ คือลำน้ำพอง และลำน้ำชี จากการนำมาขายในตลาดสดของชาวบ้าน และที่ได้จากการสอบถามชาวบ้าน และชาวประมงในพื้นที่

#### 3.3 เครื่องมือในการวิจัย

การสำรวจในภาคสนาม (field survey) หรือการลงมือปฏิบัติมีความสำคัญต่อการวิจัยเชิงคุณภาพทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง และแม่นยำ

#### 3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานเป็น 4 ขั้นตอน

##### ขั้นตอนที่ 1 การสำรวจพันธุ์ปลาปักเป้า

ทำการสำรวจพันธุ์ปลาปักเป้า ที่พบในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 สาย คือ แม่น้ำโขง แม่น้ำชี แม่น้ำมูล เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลาที่จับได้ โดยเฉพาะขนาดและลักษณะสีภายนอก

การรักษาตัวอย่างปลา การเก็บรักษาตัวอย่างปลานั้นจะใช้วิธีดองในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10% โดยอัตราส่วนน้ำยา 1 ส่วนต่อน้ำ 3 ส่วน แล้วจึงนำมาดองในน้ำยาแอลกอฮอล์เข้มข้น 70% ในกรณีที่ตัวอย่างปลามีขนาดใหญ่จะทำการผ่าท้องเสียก่อน เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปภายในช่องท้อง หรืออาจใช้วิธีฉีดยาน้ำยาเข้าไปในช่องท้องก็ได้ การจำแนกชนิดปลาที่จับได้จะกระทำในห้องปฏิบัติการ

## ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของปลาปักเป้า

ทำการเตรียมโครโมโซมโดยตรง (direct chromosome preparation) เป็นวิธีที่เลือกเอาเซลล์ในร่างกายที่กำลังมีการแบ่งตัวมาศึกษาโครโมโซม เป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลา โดยการฉีดโคลชิซินความเข้มข้น 0.01% เพื่อยับยั้งการทำงานของ spindle fiber ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องของปลา ทิ้งไว้ 1.30 ชั่วโมง จากนั้นผ่านน้ำไต และเหวี่ยงกลับให้ละเอียดร่วมกับ 0.075 M KCl ซึ่งทำให้เซลล์พองตัว (hypotonic solution) เพื่อที่โครโมโซมจะมีการกระจายตัวดี โดยการเติมสารละลาย จำนวน 6-8 มล. ลงในตะกอนเซลล์ บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (vortex mixture) เมื่อครบกำหนดทำการแยกเอา KCl ออก โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดส่วนใสทิ้ง ทำการตรึงเซลล์ (fixation) โดยการเติมน้ำยาตรึงเซลล์ที่แช่เย็นและเตรียมใหม่เสมอ (fresh cold fixative) ที่มีอัตราส่วนของ methanol : glacial acetic acid เป็น 3 : 1 ใช้หลอดหยด โดยหยดน้ำยาตรึงเซลล์ที่ละหยด พร้อมกับผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย เติมนจนได้ปริมาตรประมาณ 8 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้งไป ทำซ้ำจนได้สารละลายที่ใสและมีตะกอนขาวของเซลล์ที่กันหลอด ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็น โดยให้หยดสูงจาก สไลด์ 2-3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตก และโครโมโซมแผ่กระจายดี ทำการฝังสไลด์ให้แห้ง เพื่อนำไปย้อมด้วยสีจิมซ่า 20% แช่สไลด์นาน 20-45 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปาปล่อยไว้ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาโครโมโซมต่อไป

### การย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบซี

1. ในกรณีที่ตะกอนเซลล์เก็บอยู่ในน้ำยาตรึงเซลล์ (methanol: glacial acetic acid เป็น 3: 1) ที่อุณหภูมิ 4°C ต้องทำการเปลี่ยนน้ำยาตรึงเซลล์ใหม่ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ทำการดูดส่วนน้ำยาตรึงเซลล์ด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปใหม่ประมาณ 2-5 มล. ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนเซลล์
2. ใช้ micropipette ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัด (แช่ในน้ำแข็งให้เย็นจัด) ประมาณ 3 หยด โดยไม่ซ้ำตำแหน่งเดิม หยดให้สูงจากสไลด์ประมาณ 2 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตกกระจาย และโครโมโซมมีการแผ่กระจายตัวดี ทิ้งสไลด์ให้แห้ง จึงนำมาตรวจโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า (X400) โดยปรับแสงให้น้อยที่สุด เลือกลงสไลด์ที่โครโมโซมระยะเมทาเฟส และมีการกระจายตัวของโครโมโซมดีไว้ย้อมแถบสีแบบบอร์ ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

3. หยดสารละลาย 50% silver nitrate ลงบนสไลด์โครโมโซม 2 หยด ตามด้วยหยด 50% สารละลาย gelatin 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
4. นำสไลด์ไปต้มในตู้บ่มอุณหภูมิ 65°C นาน 3 ชั่วโมง
5. นำสไลด์ออกมาจุ่มในน้ำกลั่นเพื่อให้กระจกปิดหลุดออก แล้วนำสไลด์มาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง
6. ย้อมด้วยสีจิมซ่า 10% นานประมาณ 1 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

### การตรวจสอบโครโมโซม

ดัดแปลงจากวิธีการของ กันยาร์ตัน ไชยสุต (2532) โดยทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟส ที่มีโครโมโซมไม่สั้นหรือยาวเกินไป และมีการกระจายตัวของโครโมโซมไม่ซ้อนทับกัน มีจำนวนโครโมโซมครบ ถ่ายภาพโครโมโซมของปลาวางศ์ปลาทุกชนิดอย่างละ 20 เซลล์ ด้วยเลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X

### การจัดทำคาริโอไทป์

คาริโอไทป์ คือ การศึกษารายละเอียดของโครโมโซมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยศึกษาทั้งจำนวนโครโมโซม และรูปร่างโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์ใช้โครโมโซมจากระยะเมทาเฟสเพียง 1 เซลล์ มาเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ในการจัดทำคาริโอไทป์ เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายดีไม่ทับซ้อนกันมาก และสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ชัดเจน ถ่ายภาพเซลล์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X แล้วนำภาพเซลล์ที่ได้มาทำการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) ซึ่งโครโมโซมคู่เหมือนนี้จะมีความคล้ายคลึงกันมากทั้งขนาดและรูปร่าง จับคู่เหมือนของโครโมโซม โดยให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแห่งตรงกัน จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาชนิดและขนาดของโครโมโซมแต่ละแห่ง โดยมีการคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

การคำนวณหาค่า relative length (RL) นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแห่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง (\sum LT)}}$$

การคำนวณหาค่า centromeric index (CI) นี้สามารถช่วยในการจัดชนิดของโครโมโซมได้โดยค่า CI ที่ได้นำมาใช้จัดชนิดของโครโมโซม ดังนี้

$$\text{ค่า centromeric index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.500–0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.600–0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.700–0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

โครโมโซมที่มี CI อยู่ระหว่าง 0.900–1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

การจัดขนาดของโครโมโซม โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย แบ่งออกเป็น 3 ขนาด ดังนี้ โครโมโซมขนาดใหญ่ (large=L) คือ โครโมโซมคู่ที่มีขนาดความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) คือ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

### ขั้นตอนที่ 3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของปลาปักเป้า

#### การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ

สกัดดีเอ็นเอจากครีบ เนื้อเยื่อ ด้วยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience) ตามขั้นตอนการสกัดที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดสารสกัด ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

#### ขั้นตอนการการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลาโดยชุดสารสกัด Genomic DNA extraction kit

1. ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาให้ได้ 20 มิลลิกรัม ลงในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GT buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด
2. เติม proteinase k ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ระหว่างที่บ่มให้กลับหลอดไปมาทุก 5 นาที

3. เติม GB buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันประมาณ 5 วินาที เพื่อให้ตัวอย่างผสมกัน นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และกลับหลอดทุก 5 นาที
4. ในขั้นตอนนี้ นำ Elution buffer (200 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง) อุณหภูมิห้อง 70 องศาเซลเซียส
5. เมื่อครบเวลาแล้ว นำสารละลายในหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่
6. หลังจากบ่มที่ 70 องศาแล้ว เติม RNaseA ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
7. เติม Ethanol 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด vortex ประมาณ 10 วินาที จะปรากฏเส้นสายขึ้น
8. ย้ายสารละลายใสในหลอด GD column (วาง GD column ลงในหลอด collection tube) ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่ซึ่งสารละลายที่ได้
9. เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column และปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาทีที่ซึ่งสารละลายในหลอด collection tube
10. เติม Wash buffer (ที่เติม ethanol แล้ว) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที
11. เทสารละลายทิ้ง และย้ายหลอดไปที่ collection tube ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 3 นาที (ปกติจะเติม 100 ไมโครลิตร ถ้าต้องการความเข้มข้นของ DNA มาก เติม 15-50 ไมโครลิตร)
12. เปลี่ยนหลอด GD column วางในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ที่อุ่นไว้แล้ว ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 2 นาที
13. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm 30 วินาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์
14. เก็บหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตรในข้อ 13 ที่มีสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) และตรวจคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้

### ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนของปลา แต่ละชนิด ไปสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และ หาอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรกับ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ และทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อศึกษาด้านคุณภาพ ได้แก่ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และปริมาณ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณได้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณเงินที่ต้องการ บริเวณที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 1 บริเวณ คือ บริเวณเงิน COI โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับดีเอ็นเอ ดังนี้

Fish F1 -5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'-

Fish R1 -5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA 3'-

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอโดยประมาณได้

### ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ส่วนประกอบของสารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา	ปริมาตร (µl)
1. DNA template	100 ng	1
2. Primer (20 µM)	2.0 µM	2
3. Master mix (2x)	1.0 x	20
4. น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Deionized water)	-	7
ปริมาตรรวม	-	30

### ขั้นตอนปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอไรเซชันในการทำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ใช้เครื่อง Thermal cycler รุ่น G-Strom ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1** Hit lid ที่ 110 °C

**ขั้นตอนที่ 2** เพิ่มรอบ 35 รอบ ประกอบด้วย

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 53 °C เป็นเวลา 40 วินาที

Elongation ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 40 วินาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ

**ขั้นตอนที่ 3** store ที่ 10 °C เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าจะนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกจากเครื่อง

#### การวิเคราะห์ผล

ส่งผลผลิต PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทแปซิฟิก ไชเอ็นซ์ จำกัด และเมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอมาแล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 6 (Tamura *et al.*, 2012) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปลาหมู และส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาหมูที่ได้ทั้งหมดไปเก็บไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อขอรับรหัสของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number)

**ขั้นตอนที่ 4** การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาปักเป้าที่พบในแม่น้ำสายหลักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 สาย คือ แม่น้ำโขง แม่น้ำชี และ แม่น้ำมูล

ใช้ไพรเมอร์ที่เป็น Universal primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทป์ ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่เป็นเบสคู่สม จำนวน 20 ชนิด ดังตาราง 3.1 ให้ได้ผลผลิตของ PCR ได้หลายๆ ชิ้น ที่แสดงความหลากหลายในหลายระดับตั้งแต่ตัวอย่างภายในประชากร ระหว่างประชากร และระหว่างชนิด ไพรเมอร์ที่ใช้จะเป็น ลำดับเบสซ้ำอย่างง่าย (Simple repeat ) โดยใช้ส่วนประกอบของสารละลายในปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอไรเซชันที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอไรเซชัน ตามขั้นตอนที่กำหนดดังตารางที่ 3.2 หลังจากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้ว แยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.2 % บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต นำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากทุกไพรเมอร์มาวิเคราะห์ผลเพื่อใช้ในการตรวจสอบความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของปลาจากลำน้ำต่าง ๆ โดยการสร้างแผนผังด้วยโปรแกรม NTSYS เวอร์ชัน 2.1

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปลา ด้วยเทคนิค RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
S61	TTCGAGCCAG
S62	GTGAGGCGTC
S63	GGGGGTCTTT
S64	CCGCATCTAC
S65	GATGACCGCC
S66	GAACGGACTC
S67	GTCCCGACGA
S68	TGGACCGGTG
S69	CTCACCGTCC
S70	TGTCTGGGTG

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยวิธีการ RAPD

ส่วนประกอบของสารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
1. DNA template	100 ng	1
2. Primer (20 μM)	2.0 μM	2
3. Master mix (2x)	1.0 x	10
4. น้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (Deionized water)	-	7
ปริมาตรรวม	-	20



### ขั้นตอนปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ในวิธีการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ใช้เครื่อง Thermal cycle ซึ่งการทำงานประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1** Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ

**ขั้นตอนที่ 2** Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 37-58 °C เป็นเวลา 1 นาที

Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 30 รอบ

**ขั้นตอนที่ 3** Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ