



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP เพื่อสร้าง
แผนที่โครโมโซมในปลาดุกอุย

โดย สุภาวดี พุ่มพวง และคณะ

มิถุนายน 2544

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP เพื่อสร้างแผนที่
โครโมโซมในปลาตุ๊กต๋อ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.สุภาวดี พุ่มพวง

คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร

คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Scanned with

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ที่ช่วยให้คำแนะนำระหว่างการดำเนินการทดลองและตรวจแก้ไขรายงาน ขอขอบคุณ คุณพลชาติ ผิวเณร คุณจงกล บุญงาม คุณสุดาวัลย์ ศรีไพโรจน์ และคุณ ศรีจรรยา สุขมนมอนด์ จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง ที่ช่วยเก็บตัวอย่างปลาและผลิตปลา แอพพลอยด์ ขอขอบคุณ คุณสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวิ และคุณขันติพร พังนภาแก้ว จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ช่วยวิเคราะห์ตัวอย่างและสร้างแผนที่โครโมโซม และสุดท้ายผู้วิจัย ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายวิชาการ ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยหลังปริญญาเอกชิ้นนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/25/2542
ชื่อโครงการ : การจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP เพื่อสร้างแผนที่โครโมโซม
ในปลาดุกอุย
ชื่อนักวิจัย : ดร. สุภาวดี พุ่มพวง
ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
E-mail Address : FFISSDPP@KU.AC.TH
ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2542 – 30 มิถุนายน 2544

ปลาดุก (*Clarias spp.*) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ ความสำคัญของปลาดุกก่อให้เกิดการศึกษาและวิจัยด้านพันธุกรรมอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ปลาดุกแบบดั้งเดิมเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตไม่ได้ผลเท่าที่ควร การคัดพันธุ์ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม (Marker-assisted selection) เป็นแนวทางการปรับปรุงพันธุ์แบบใหม่ที่ได้รับความนิยมสูงในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ผู้วิจัยได้เลือกปลาดุกอุยเป็น model สำหรับโครงการคัดพันธุ์ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมที่จะดำเนินการในอนาคต วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาค้างนี้เพื่อประเมินความเหมาะสมของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP สำหรับวิเคราะห์จีโนมปลาดุกสกุล *Clarias* และสร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นของปลาดุกอุย เทคนิค AFLP มีข้อดีหลายประการคือ สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างและตรวจพบ AFLP ที่ใช้เป็นเครื่องหมายได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น มีความน่าเชื่อถือในการทำซ้ำสูงและเสียค่าใช้จ่ายในระดับปานกลาง ในการศึกษาความหลากหลายของ AFLP ในปลาดุกอุยและปลาดุกยักษ์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ สามารถสร้างแถบ AFLP ที่ชัดเจน 376 แถบ ในจำนวนนี้เป็น AFLP ที่พบเฉพาะปลาดุกอุย 57 แถบ และพบเฉพาะปลาดุกยักษ์ 38 แถบ ซึ่ง AFLP เหล่านี้มีประโยชน์สำหรับการแยกชนิดปลาดุก รวมทั้งการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ในการสร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นโดยใช้ปลาดุกอุยแฮพลอยด์ พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 32 คู่ สามารถสร้าง AFLP ที่เป็น polymorphic bands ทั้งหมด 162 แถบ แผนที่โครโมโซมเบื้องต้น ประกอบด้วย AFLP จำนวน 79 ตำแหน่งที่จัดเข้ากลุ่ม (linkage groups) ได้ 22 กลุ่มมีระยะทางแผนที่รวมเท่ากับ 1243.3 cM ส่วน AFLP อีกจำนวน 28 ตำแหน่งยังไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ จำนวนของ AFLP ในแต่ละกลุ่มมีค่าตั้งแต่ 2 ถึง 19 และระยะห่างระหว่าง AFLP แต่ละตำแหน่งมีค่าเฉลี่ย 15.74 cM แผนที่โครโมโซมนี้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับโครงการ QTL mapping ในอนาคต

คำหลัก : AFLP, linkage mapping, *Clarias spp.*

ABSTRACT

Project Code: PDF/25/2542
Project Title: Identification of AFLP markers for linkage mapping of catfish
Investigator: Supawadee Poompuang
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries
Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900.
E-mail Address: FFISSDPP@KU.AC.TH
Project Period: July 1, 1999 – June 30, 2001

Walking catfishes (*Clarias spp.*) are among the most important food fishes in Thailand. The aquacultural importance of catfish has given rise to research on its genetics including mapping its genome. From the practical viewpoint, the genetic map would provide the basis for detection of genes affecting economically important traits such as growth rate and disease resistance, and subsequent marker-assisted selection (MAS). Catfish has been chosen as a model system for future application of MAS. The aim of this work was to investigate the application of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for genome analysis in *Clarias spp.* AFLP analysis is a rapid, reliable and cost-effective technique for DNA fingerprinting and genetic mapping. AFLP produces a large number of markers per assay. Ten primer combinations were used to amplify DNA samples of *C. macrocephalus* and *C. gariepinus*. A total of 376 AFLP fragments were scored. Fifty-seven markers were found to be specific to *C. macrocephalus* and 38 markers were observed only in *C. gariepinus*. Developed AFLP markers will be useful for species identification, population studies and genomic mapping. The segregation of 107 AFLP markers was studied in 79 *C. macrocephalus* haploid embryo generated from a single female. The AFLP map consists of 79 loci placed into 22 linkage groups, with 28 loci remain unlinked. The number of markers per linkage group varies from 2 to 19. The map spans 1243.3 cM with an average spacing of 15.74 cM. This map can serve as the starting point for detection of quantitative trait loci (QTLs) in walking catfish.

Keywords : AFLP, linkage mapping, *Clarias spp.*

บทนำ (INTRODUCTION)

ปลาดุก (*Clarias spp.*) เป็นปลาพื้นเมืองที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศและมีการเพาะเลี้ยงมานานกว่า 20 ปี โดยเฉพาะปลาดุกอูย (*C. macrocephalus*) ซึ่งมีคุณภาพเนื้อดีที่สุดแต่เจริญเติบโตช้าและมีความต้านทานโรคต่ำ การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ต่อมาได้มีผู้นำปลาดุกยักซ์ (*C. gariepinus*) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดที่ทวีปแอฟริกามาผสมกับแม่ปลาดุกอูยได้ลูกผสมที่เรียกว่าปลาดุกบิกอูย (สุจินต์ และ คณะ 2533) ปลาดุกลูกผสมโตเร็วและต้านทานโรคดีกว่าปลาดุกอูยทำให้ได้รับความนิยมเลี้ยงในกลุ่มเกษตรกร ปัจจุบันการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมได้แทนที่ปลาดุกอูยถึง 90% อย่างไรก็ตามการเลี้ยงปลาดุกบิกอูยก่อให้เกิดภัยคุกคามต่อพันธุกรรมของปลาดุกอูยในธรรมชาติ เนื่องจากมีรายงานว่าปลาดุกลูกผสมซึ่งหลุดรอดจากบ่อเลี้ยงระหว่างน้ำท่วมสามารถผสมพันธุ์กับปลาดุกอูยในแหล่งน้ำธรรมชาติได้ ผลที่เกิดขึ้นคือพันธุกรรมของปลาดุกอูยอาจถูกทำลายถึงขั้นสูญพันธุ์ได้ แนวทางหนึ่งที่จะช่วยรักษาพันธุกรรมปลาดุกอูยคือการปรับปรุงพันธุกรรมปลาดุกอูยและชักชวนให้เกษตรกรกลับมาเพาะเลี้ยงปลาดุกอูยอนุรักษ์ปลาพื้นเมืองของไทยให้มากขึ้น

โดยหลักการของการปรับปรุงพันธุ์โดยการคัดพันธุ์ (Selection) สามารถแบ่งได้ 2 แนวทางคือ 1) Trait-based selection คือการคัดพันธุ์แบบดั้งเดิมที่ใช้ลักษณะภายนอก (phenotypes) เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งการแสดงออกของลักษณะภายนอกได้รับอิทธิพลอย่างสูงจากสิ่งแวดล้อม และ 2) Marker-based selection คือการคัดพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic markers) ค้นหาีนควบคุมลักษณะปริมาณโดยตรงในพ่อแม่พันธุ์ ตามทฤษฎีการคัดพันธุ์วิธีนี้มีความถูกต้องกว่าวิธีแรกเนื่องจากสิ่งแวดล้อมไม่มีผลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายพันธุกรรม การคัดพันธุ์วิธีนี้เรียกว่า marker-assisted selection (MAS) ซึ่งจะมีประโยชน์มากสำหรับการคัดเลือกลักษณะเศรษฐกิจที่ถูกจำกัดโดยเพศหรือแสดงออกล่าช้าในวัยเจริญพันธุ์ กล่าวโดยย่อการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ๆคือ 1) การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม 2) การสร้างแผนที่โครโมโซม และ 3) การหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci) หรือ QTLs

ผู้วิจัยได้เลือกปลาดุกอูยเป็น model ในการประยุกต์ใช้การคัดพันธุ์แบบ MAS ที่จะดำเนินการในอนาคตเนื่องจากความสำคัญทางเศรษฐกิจของปลาชนิดนี้และข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของปลาดุกอูยมีมากพอสมควร เป้าหมายหลักของการศึกษานี้เพื่อจำแนกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP สำหรับใช้สร้างแผนที่โครโมโซมของปลาดุก และวัตถุประสงค์ย่อยมีดังนี้ 1) ประเมินระดับความหลากหลาย ของ AFLP ในปลาดุกอูยและปลาดุกยักซ์ และ 2) สร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นของปลาดุกอูยโดยใช้ปลาแฮพลอยด์

เครื่องหมายพันธุกรรมชนิด AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

เทคนิค AFLP (Amplified fragment length polymorphism) ได้พัฒนาขึ้นโดย Vos และคณะ (1995) หลักการสำคัญของเทคนิค AFLP คือการเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) และเพิ่มปริมาณโดยขบวนการ polymerase chain reaction (PCR) วิธีปฏิบัติเริ่มด้วยการตัดตัวอย่างดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ rare cutter enzyme (เช่น *EcoRI*) และ frequent cutter enzyme (เช่น *MseI*) เหตุผลในการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดมีดังนี้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย frequent cutter enzyme จะมีขนาดเล็กเหมาะแก่การเพิ่มจำนวนด้วย PCR ส่วนการใช้ rare cutter enzyme เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอต้นแบบ (templates) เนื่องจากเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่ปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย frequent cutter enzyme และอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย rare cutter enzyme เท่านั้นที่จะได้รับการเพิ่มปริมาณ ปลายด้านหนึ่งของ templates จะถูกต่อกับ *EcoRI* adapter และอีกด้านหนึ่งจะถูกต่อกับ *MseI* adapter คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเข้าคู่กับ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter จำนวนชิ้นดีเอ็นเอหรือ AFLP ที่ จะได้รับการเพิ่มจำนวนจะขึ้นกับเบส 3 ตัว (selective bases) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงลำดับหรือลดจำนวนได้ทางด้าน 3' ของคู่ไพรเมอร์ และแยกขนาด AFLP โดยวิธี electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป ข้อดีของเทคนิค AFLP คือในปฏิกิริยาหนึ่งสามารถผลิตชิ้นดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูงและใช้เป็นเครื่องหมายได้จำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites) การศึกษา AFLP ทำได้เร็วเพราะไม่ต้องวิเคราะห์ลำดับและสังเคราะห์ไพรเมอร์ และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เทคนิค AFLP จะมีค่าความน่าเชื่อถือในการทำซ้ำ (reproducibility) สูงกว่า

ในงานวิจัยพันธุกรรมของสัตว์น้ำ AFLP ได้ถูกนำมาใช้สร้างแผนที่โครโมโซมสำหรับปลาเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลานิล (*Tilapia*) (Kocher และคณะ 1998; Agresti และคณะ 2000) ปลา rainbow trout (Young และคณะ 1998) และปลาดุกอเมริกัน (channel catfish) (Liu และคณะ 1998) รวมทั้งการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (Seki และคณะ 1999)

การทำแผนที่ยีน (genetic mapping)

แผนที่ยีนหรือแผนที่โครโมโซม (linkage map) คือความสัมพันธ์ (linkage relationships) ของระยะห่างระหว่างยีนหรือเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกัน และมีหน่วยเป็น centiMorgans (cM) ซึ่งคำนวณได้จากค่า recombination frequencies ของยีนสองคู่เนื่องจาก crossing over ของ homologous chromosomes ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ แผนที่ยีนมีความจำเป็นสำหรับการหาตำแหน่งและการโคลนยีน (positional cloning) ในงานวิจัยพันธุวิศวกรรม หรือการหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL mapping) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธี MAS

โดยทั่วไปการผลิตทรัพยากร สำหรับใช้สร้างแผนที่ยีน (mapping materials) ในสัตว์น้ำ เช่น ปลา ทำได้ 2 วิธีคือ 1) การสร้างครอบครัว (mapping family) และ 2) การผลิตปลาแฮพลอยด์ (haploid genetics) ในการสร้างครอบครัวเป็นการผสมระหว่างปลา 2 สายพันธุ์ (strains) หรือชนิด (species) ที่มีความแตกต่างของอัลลีลของยีนหรือเครื่องหมายพันธุกรรมระหว่างปลาสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ (P_1) เมื่อปลารุ่นลูก (F_1) เจริญพันธุ์สามารถทำการผสมพันธุ์ได้ 2 แบบคือ (1) ผสมพันธุ์ระหว่าง F_1 หรือ (2) ผสม backcross ระหว่าง F_1 กับพ่อหรือแม่ (P_1) แผนที่โครโมโซมสร้างจากการวิเคราะห์ข้อมูลการกระจายตัว (segregation) ของอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมในปลา F_2 หรือปลา backcross (Beckmann and Soller 1989) ส่วนปลาแฮพลอยด์ผลิตโดย นำไข่แม่ปลาที่มีสภาพ heterozygous หรือแม่ปลาลูกผสม (hybrids) ผสมกับน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเพื่อทำลายสารพันธุกรรม ลูกปลาจึงได้รับเฉพาะสารพันธุกรรมจากแม่และมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด การกระจายตัวของยีนหรือเครื่องหมายพันธุกรรม ระหว่างการสร้างไข่ของแม่ปลาตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอลูกปลาแฮพลอยด์ ข้อดีของการใช้ปลาแฮพลอยด์ คือ สามารถสร้างแผนที่ยีนได้ในเวลาที่สั้นกว่าการสร้างครอบครัว (Lie และคณะ 1994) ตัวอย่าง เช่น แผนที่โครโมโซมปลา zebrafish (Postlethwait และคณะ 1994) แผนที่โครโมโซมปลา Atlantic salmon (Slettan และคณะ 1997) และ แผนที่โครโมโซมปลานิล (Kocher และคณะ 1998) การผลิตปลาแฮพลอยด์สำหรับปลาดุกอยู่ทำได้ค่อนข้างสะดวก เนื่องจากมีความดกไข่ที่เหมาะสม เช่น ในปลาดุกอยู่ขนาด 200 กรัมจะมีไข่ประมาณ 20,000 ฟอง และลูกปลาแฮพลอยด์สามารถมีชีวิตได้นานถึง 3 วัน (Na-Nakorn และคณะ 1993) เนื่องจากการจำแนกเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด AFLP ในปลาดุกและการสร้างแผนที่โครโมโซมปลาดุกอยู่ ยังมีได้มีการศึกษามาก่อน และการใช้ปลาแฮพลอยด์ครั้งนี้ ทำให้การสร้างแผนที่โครโมโซมเบื้องต้นของปลาดุกเป็นไปได้ด้วยความรวดเร็ว

วิธีการทดลอง (MATERIALS AND METHODS)

1. การผลิตปลาแฮพลอยด์

ทำตามวิธีการของ Na-Nakorn และคณะ (1993) โดยคัดเลือกแม่ปลาดุกอยู่ 3 ตัวและปลาสวายเพศผู้ 1 ตัวจากประชากรปลาของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง เร่งการตกไข่โดยฉีด LHRH analogue (ชื่อการค้า Suprefact) ปริมาณ 30 $\mu\text{g/kg}$ ผสมกับ Domperidone (ชื่อการค้า Motilium) ปริมาณ 5 mg/kg ให้แม่ปลา และฉีด LHRH analogue ปริมาณ 15 $\mu\text{g/kg}$ ผสมกับ Domperidone ปริมาณ 5 mg/kg ให้กับปลาสวายเพื่อเร่งน้ำเชื้อ หลังจากฉีดฮอร์โมน 6 ชั่วโมงรีดน้ำเชื้อปลาสวายและเจือจาง 1 ต่อ 100 ส่วนด้วย Ringer's solution (0.1M NaCl; 40 mM KCl; 1.4 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 mM NaHCO_3 , pH 8.0) ฉายรังสีน้ำเชื้อโดยใช้ UV germicidal tube ขนาด 30 วัตต์ เป็นเวลา 2 นาที โดยมี

ระยะระหว่างหลอดและน้ำเชื้อ 30 เซนติเมตร รีดไข่แม่ปลาหลังจากฉีดฮอร์โมน 14 ชั่วโมง แม่ปลาแต่ละตัวมีไข่ประมาณ 5,000 ฟอง แบ่งไข่เป็นชุดๆ ละ 300-400 ฟองและผสมกับน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี ฟักไข่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 28 ± 2 °C ลูกปลาส่วนใหญ่ฟักเป็นตัวในเวลา 27-30 ชั่วโมง ไข่ปากคืบดึงเอาถุงไข่แดงออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ 2 ตาและเก็บตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 10% เพื่อสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 ปลาแฮพลอยด์

สกัดดีเอ็นเอจากปลาแฮพลอยด์ตามวิธีการของ Kocher และคณะ (1998) บดลูกปลาทั้งตัวในหลอดขนาด 1.5 ml ใส่สารละลาย TEN buffer (100 mM tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 250 mM NaCl) ปริมาณ 150 μ l, 20% SDS 10 μ l และ proteinase K 5 μ l บ่มตัวอย่างใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการมาตรฐาน (Sambrook และคณะ 1989) โดยใช้ phenol และ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอใน isopropanol ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C

2.2 ปลาตกอูย ปลาตกยักษ์ และปลาคูกผสม

เก็บตัวอย่างเลือดปลาโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 ml ดูดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่ใต้แนวกระดูกสันหลังบริเวณครีบท้อง เก็บเลือดปริมาณ 200-400 μ l ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติมสารละลาย TE เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Taggard และคณะ (1992) นำตัวอย่างเลือด 20-40 μ l ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติม TNES-Urea ปริมาณ 350 μ l เติม proteinase K (10 mg/ml) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 μ g/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทั้งไว้ข้ามคืน สกัดดีเอ็นเอขั้นแรกโดยเติม phenol ปริมาตร 400 μ l ขั้นที่สอง เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25:24:1 และขั้นที่สามเติม chloroform: isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 3 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่เติม LiCl ความเข้มข้น 5 M ปริมาตรเท่ากับตัวอย่างผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที ดูดเฉพาะสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1.5-2 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน ล้างดีเอ็นเอ 2 ครั้งด้วย ethanol 70% ปริมาตร 0.5-1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm 5 นาทีปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3. การจำแนกผลจากดีเอ็นเอชนิด AFLP

3.1 การเตรียม DNA templates

3.1.1 *Digestion:* ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *EcoRI* และ *Tru9I* ชนิดละ 10 units ย่อยดีเอ็นเอปริมาณ 0.5-1.0 μg ในหลอด microfuge ขนาด 200 μl ควบคุมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงใน Buffer A (Boehringer Mannheim) ซึ่งประกอบด้วย 33 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl 0.5 mM DTT และปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 40 μl

3.1.2 *Ligation:* เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกย่อยจากข้อ 3.1.1 ด้วย *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter โดยเติมสารละลาย 10 μl ซึ่งประกอบด้วย 5 pmol *EcoRI* adapter, 50 pmol *MseI* adapter, 1.2 mM ATP, Buffer A และ *T₄* DNA ligase 1.2 units ควบคุมปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เจือจางปฏิกิริยา 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น Ultrapure เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2 การเพิ่มจำนวน (Amplification)

3.1.1 *PCR I (pre-amplification)*

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.1.2 ปริมาณ 5 μl ผ่านขบวนการ PCR ขั้นแรกโดยใช้ primers ซึ่งเข้าคู่กับ adapter แต่ละตัว (ตารางที่ 1) และเพิ่มเบสอีก 1 ตัวด้าน 3'-end ของ primers ในปฏิกิริยารวม 50 μl ที่ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM MgCl_2 , 0.01% gelatin, 2 mM dNTPs, *EcoRI*+1 primer และ *MseI*+1 primer อย่างละ 75 ng และ *Taq* DNA polymerase 1 unit ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติจำนวน 25 รอบดังนี้ 1) 94 °C 30 วินาที 2) 56 °C 1 นาที และ 3) 72 °C 1 นาที เจือจางปฏิกิริยา 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น Ultrapure เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 °C

3.1.2 *PCR II (selective amplification)*

นำดีเอ็นเอจากข้อ 3.2.1 ปริมาณ 5 μl ผ่านขบวนการ PCR ขั้นที่สองโดยใช้ primers ซึ่งเข้าคู่กับ adapter แต่ละตัวและเพิ่มเบสอีก 3 ตัวด้าน 3'-end ของ primers ในปฏิกิริยารวม 20 μl ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.01% gelatin, 2 mM dNTPs, *EcoRI*+3 primer และ *MseI*+3 primer อย่างละ 30 ng และ *Taq* DNA Polymerase 0.4 unit ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติจำนวน 34 รอบดังนี้ 1) 94 °C 30 วินาที 2) 65 °C 30 วินาที และ 3) 72 °C 1 วินาที โดยในรอบแรกตั้งอุณหภูมิ (annealing temperature) ที่ 65 °C และลดลงรอบละ 1 °C จนถึง 56 °C และตั้งอุณหภูมิ 56 °C ต่อไปจนครบ 34 รอบ แล้วเติม loading dye