



คู่มือการจำแนกชนิดปลาปักเป้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ผลการวิจัย

โครงการ “การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกปลาปักเป้าในประเทศไทย”

คณะผู้วิจัย

ดร.ประดิษฐ์ แสงทอง และ รศ.ดร.เลิศลักษณ์ เงินศิริ

กุมภาพันธ์ 2553



คู่มือการจำแนกชนิดปลาปักเป้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ผลการวิจัย

โครงการ “การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกปลาปักเป้าในประเทศไทย”

คณะผู้วิจัย

1. ดร.ประดิษฐ์ แสงทอง

2. รศ.ดร.เลิศลักษณ์ เงินศิริ

สังกัด

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในเอกสารนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัยพร้อมทั้งคำแนะนำจากผู้ทรงคุณวุฒิแก่โครงการวิจัย จนสามารถดำเนินการวิจัยได้แล้วเสร็จ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนเครื่องมือและสิ่งจำเป็นต่างๆ ในการทำวิจัยอย่างต่อเนื่องจนเสร็จสิ้นโครงการ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับแหล่งทุนและการพัฒนาข้อเสนอโครงการวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล และ คุณบดินทร์ อธิพิงษ์ คณะทำงานจากกรมประมงที่อนุเคราะห์ตัวอย่างปลาและตัวอย่างลูกชิ้นปลา

ขอขอบคุณ คุณสนธยา กุลกัลยา สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและข้อมูลทางอนุกรมวิธานของปลาปักเป้า

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ดร.ดำนัย พินอยู่วงศ์ ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดช่วงโครงการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ ผศ. มยุรี จัยวัฒน์ ผู้ประสานงานชุดโครงการ “อาหารปลอดภัยและการพัฒนาอาชีพทางเลือกฯ” ที่กรุณาให้โอกาสและคำแนะนำในการบริหารโครงการ รวมถึงชี้แนะประเด็นการวิจัยที่เป็นประโยชน์ยิ่ง

ประดิษฐ์ แสงทอง

กุมภาพันธ์ 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล	2
ขอบเขตของการใช้คู่มือการจำแนกปลาปักเป้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล	2
คำจำกัดความ	3
คุณลักษณะของเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการระบุชนิดปลาปักเป้า	4
เครื่องหมายโมเลกุล 7 แบบเพื่อการระบุชนิดปลาปักเป้า	7
แผนภาพแสดงขั้นตอนการปฏิบัติเพื่อใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุล	8
วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของปลาปักเป้า	9
วิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของปลาปักเป้า	11
องค์ประกอบของปฏิกิริยาเพื่อการตรวจสอบการปนเปื้อนของปลาปักเป้า	15
เครื่องหมาย KU_sRUFR1	15
รายละเอียดของปลาแต่ละชนิดจำนวน 24 ชนิดในฐานข้อมูล GenBank	18
เครื่องหมาย Mul_ILS	46
เครื่องหมาย pfSR_FLI66	48
เครื่องหมาย pfSR_FLL678	51
เครื่องหมาย pfSR_FLS108	54
เครื่องหมาย MulCB_TT	58
เครื่องหมาย TFV_BciVI	60
การใช้เครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเนื้อปลาหลายชนิดผสมกัน....	61
การใช้เครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอต้นแบบจากลูกชิ้นปลา.....	64
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65

บทนำ

ปลาปักเป้า (pufferfish) เป็นปลากระดูกแข็งมีแหล่งอาศัยทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็มแพร่กระจายอยู่ในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ปลาปักเป้ามีสารพิษชื่อว่า Tetrodotoxin ซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิตต่อมนุษย์ โดยในปลาปักเป้าทะเลจะมีสารพิษสะสมมากในไข่ ตับ ลำไส้ และผิวหนัง ส่วนในเนื้อจะเป็นบริเวณที่มีพิษน้อยที่สุด สำหรับปลาปักเป้าน้ำจืด ผิวหนังจะมีสารพิษมากที่สุด รองลงมาคือ ไข่ เนื้อ ตับ และลำไส้ สารพิษของปลาปักเป้าสามารถทนความร้อนได้ พบว่าเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที พิษดังกล่าวก็ยังสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างรุนแรงเช่นเดิม (สมาคมการประมงแห่งประเทศไทย, 2549)

ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตหรือเจ็บป่วยจากการบริโภคปลาปักเป้าอย่างต่อเนื่อง และปัญหามีแนวโน้มจะรุนแรงขึ้น เนื่องจากมีผู้นำปลาปักเป้ามาแล่เนื้อเพื่อขายหรือนำเนื้อปลาปักเป้ามาแปรรูปเป็นอาหารในรูปแบบต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาปักเป้าชนิดที่ชาวประมงจับได้เป็นจำนวนมากในแต่ละวัน คือ ปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *L. spadiceus*, *L. lunaris* และ *L. inermis* (ประดิษฐ์ และ เลิศลักษณ์, 2553) ซึ่งประชาชนผู้บริโภคไม่มีโอกาสทราบเลยว่าเนื้อปลาหรืออาหารที่วางขายอยู่นั้นปรุงมาจากปลาปักเป้า ปัญหาดังกล่าวนี้อย่างส่งผลถึงประสิทธิภาพในการบังคับใช้กฎหมายของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเนื่องจากหน่วยงานเหล่านั้นก็ไม่มีเครื่องมือสำหรับพิสูจน์การปนเปื้อนของปลาปักเป้าในอาหารเช่นกัน จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเครื่องมือในการจำแนกปลาปักเป้าที่สามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่เป็นปลาทั้งตัว เนื้อปลาแล่ หรืออาหารแปรรูปที่มีเนื้อปลาปักเป้าเป็นส่วนประกอบ โดยพบว่ามีเอกสารวิชาการจำนวนหนึ่งรายงานตรงกันว่ายีน *Cytochrome b* (*Cytb*) และ *small subunit ribosomal RNA* (*12S rRNA*) ในจีโนมของไมโทคอนเดรียสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการจำแนกและระบุชนิดของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ยีนมาใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อระบุชนิดปลาปักเป้าที่แพร่กระจายอยู่ในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล

1. เพื่อระบุชนิด สกุล หรือ วงศ์ ของปลาปักเป้าชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารสด และอาหารแปรรูป
2. เพื่อเป็นเครื่องมือของหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการบังคับใช้กฎหมายเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภค
3. เพื่อเป็นแนวทางการวิจัยและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ
4. เพื่อใช้เป็นตัวอย่างจริงในการเรียนการสอนวิชาที่เกี่ยวข้อง

ขอบเขตของการใช้คู่มือการจำแนกปลาปักเป้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

1. เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบชนิด (spceies) หรือกลุ่มทางอนุกรมวิธานที่สูงกว่าชนิด ได้แก่ สกุล (genus) หรือ วงศ์ (family) ของปลาปักเป้า โดยวิเคราะห์ได้จากผลที่เครื่องหมายโมเลกุลแสดงให้เห็นโดยตรง หรือโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank
2. เครื่องหมายโมเลกุลสามารถใช้ตรวจสอบสารละลาย total genomic DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างสดและแปรรูป (สุก) รวมทั้งตัวอย่างที่ผสมอยู่กับวัตถุดิบในการปรุงอาหารชนิดอื่นๆ
3. เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถตรวจสอบความเป็นพิษของตัวอย่างชิ้นเนื้อหรืออาหารที่นำมาวิเคราะห์ได้
4. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือที่กล่าวถึงในคู่มือ อ้างอิงจากสิ่งที่ใช้ในขั้นตอนการวิจัยโดยระบุผู้ผลิตหรือตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทยไว้สำหรับผู้ใช้ที่ไม่คุ้นเคยกับวัสดุอุปกรณ์เหล่านั้น ซึ่งผู้ใช้คู่มือสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการที่ผู้ใช้คู่มือปฏิบัติงานอยู่

คำจำกัดความ

ความหมายของคำที่ปรากฏในคู่มือเป็นดังต่อไปนี้

เครื่องหมายโมเลกุล	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์หรือตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแสดงเอกลักษณ์หรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต
ปลาปักเป้า	ปลาในวงศ์ Tetraodontidae และ Diodontidae
ปลา outgroup	ปลาอื่นที่ไม่ใช่ปลาปักเป้าในตารางที่ 1
ตัวอย่าง	ปลาทั้งตัว ชิ้นเนื้อสด เนื้อสุก หรือผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่างๆ ทั้งที่เป็นเนื้อดิบหรือปรุงสุก
ชนิด	ในความหมายเพื่อระบุกลุ่มทางอนุกรมวิธานจะหมายถึง species
สกุล	ในความหมายเพื่อระบุกลุ่มทางอนุกรมวิธานจะหมายถึง genus
วงศ์	ในความหมายเพื่อระบุกลุ่มทางอนุกรมวิธานจะหมายถึง family
ฐานข้อมูล GenBank	ฐานข้อมูลที่รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ และให้บริการโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม มี URL คือ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
โปรแกรม blast	โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ให้บริการโดยฐานข้อมูล GenBank เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยจะแสดงผลให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใดบ้างในฐานข้อมูล
multiplex PCR	ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีองค์ประกอบเป็นไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ สามารถระบุชนิดปลาปักเป้าได้หลายชนิดพร้อมกัน
species-specific PCR	ปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีองค์ประกอบเป็นไพรเมอร์ 1 คู่ สามารถระบุชนิดปลาปักเป้าได้ 1 ชนิด
total genomic DNA	สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วยดีเอ็นเอจากจีโนมในนิวเคลียสและจีโนมในไมโทคอนเดรีย
universal primer	คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีพีซีอาร์ได้จากปลาทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

คุณลักษณะของเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการระบุชนิดปลาปักเป้า

เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการการจัดจำแนกปลาปักเป้าแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ เครื่องหมายที่ตรวจสอบแบบจำเพาะต่อชนิดปลา และเครื่องหมายที่ตรวจสอบแบบไม่จำเพาะต่อชนิดปลา ซึ่งเครื่องหมายทั้ง 2 กลุ่มมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนี้

เครื่องหมายกลุ่มที่ 1 เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบแบบจำเพาะต่อชนิดปลา เครื่องหมายชนิดนี้จะให้ผลบวกกับตัวอย่างจากปลาชนิดที่เป็นเป้าหมายเท่านั้น ซึ่งเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นกำหนดให้มีคุณสมบัติดังนี้

1. เพื่อความสะดวกในการใช้ประโยชน์ เครื่องหมายที่เหมาะสมคือ เครื่องหมายจากวิธีพีซีอาร์ (PCR) ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จำเพาะต่อชนิดปลาปักเป้า (species-specific PCR) กรณีที่ไม่มีบริเวณเหมาะสมเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดจะใช้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ในการระบุชนิด

2. เครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิดปลาปักเป้าด้วยวิธีพีซีอาร์จะให้ผลผลิตพีซีอาร์เมื่อมีดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาปักเป้าชนิดที่กำหนดเท่านั้น ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบเป็นดีเอ็นเอจากปลาปักเป้าหรือปลาชนิดอื่นจะไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์

3. ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเล็ก ทำให้มีโอกาสูงในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยๆ เช่นในกรณีดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อปลาสุกหรือเนื้อปลาที่ถูกแปรรูปด้วยวิธีอื่นๆ นอกจากนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบของปลาต่างชนิดกันก็มีขนาดที่แตกต่างกันจนสามารถมองเห็นได้ชัดเจนด้วยวิธีการตรวจสอบที่ไม่ยุ่งยาก

4. เครื่องหมายจากวิธีพีซีอาร์สามารถเพิ่มปริมาณโดยใช้องค์ประกอบและสถานะของปฏิกิริยาใกล้เคียงกัน และสามารถพัฒนาเป็น multiplex PCR ซึ่งจะใช้งานได้สะดวก รวดเร็ว แต่ยังคงมีความแม่นยำของผลการวิเคราะห์คงเดิม

5. เครื่องหมาย multiplex PCR สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ได้ทั้งกรณีดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาปักเป้าเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิด

เครื่องหมายกลุ่มที่ 2 เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบแบบไม่จำเพาะต่อชนิดปลา ได้แก่ คู่ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปลาปักเป้าและปลาอื่นๆ ได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ (universal primer) เพื่อใช้ประโยชน์ 2 ประการ คือ

1. เครื่องหมาย universal primer เป็นเครื่องมือตรวจสอบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายสำหรับระบุชนิดอยู่ในสารละลาย total genomic DNA ที่กำลังตรวจสอบหรือไม่ เนื่องจากในทางปฏิบัติ ถ้าพบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายก็สามารถสรุปผลได้จากขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น แต่ในกรณีที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอจะไม่สามารถสรุปได้ว่าการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอนั้นเป็นเพราะตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอไม่มีเนื้อปลาปักเป้าชนิดที่ต้องการตรวจสอบปนเปื้อนอยู่ หรือ เป็นเพราะการสกัดดีเอ็นเอล้มเหลวจึงไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบในสารละลายที่ได้ ดังนั้น การใช้เครื่องหมายที่เป็น universal primer จะช่วยยืนยันว่าในสารละลายมีดีเอ็นเอต้นแบบของยีนเป้าหมาย แต่เหตุผลที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพราะไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาปักเป้าชนิดที่กำลังตรวจสอบอยู่ ซึ่งนำไปสู่ข้อสรุปว่าไม่มีการปนเปื้อนของเนื้อปลาปักเป้าชนิดนั้นในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

2. ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก universal primer สามารถนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงที่ถูกลำดับไว้ในฐานข้อมูล GenBank ผลการเปรียบเทียบจะสามารถระบุชนิด สกุล หรือวงศ์ ของปลาที่ปนเปื้อนในตัวอย่างได้สะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น ถึงแม้ว่าขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จะยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงก็ตาม แต่ก็มีความแม่นยำมากขึ้นด้วยเช่นกัน

สำหรับไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 ซึ่งจำเพาะต่อชนิดปลาปักเป้า ได้ผ่านการทดสอบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในปลาปักเป้าชนิดอื่นและปลาชนิดอื่นที่นำมาใช้เป็น outgroup โดยปลา outgroup ที่ใช้ในการทดสอบมีจำนวน 14 ชนิด จาก 13 สกุล 5 อันดับ (order) ดังนี้

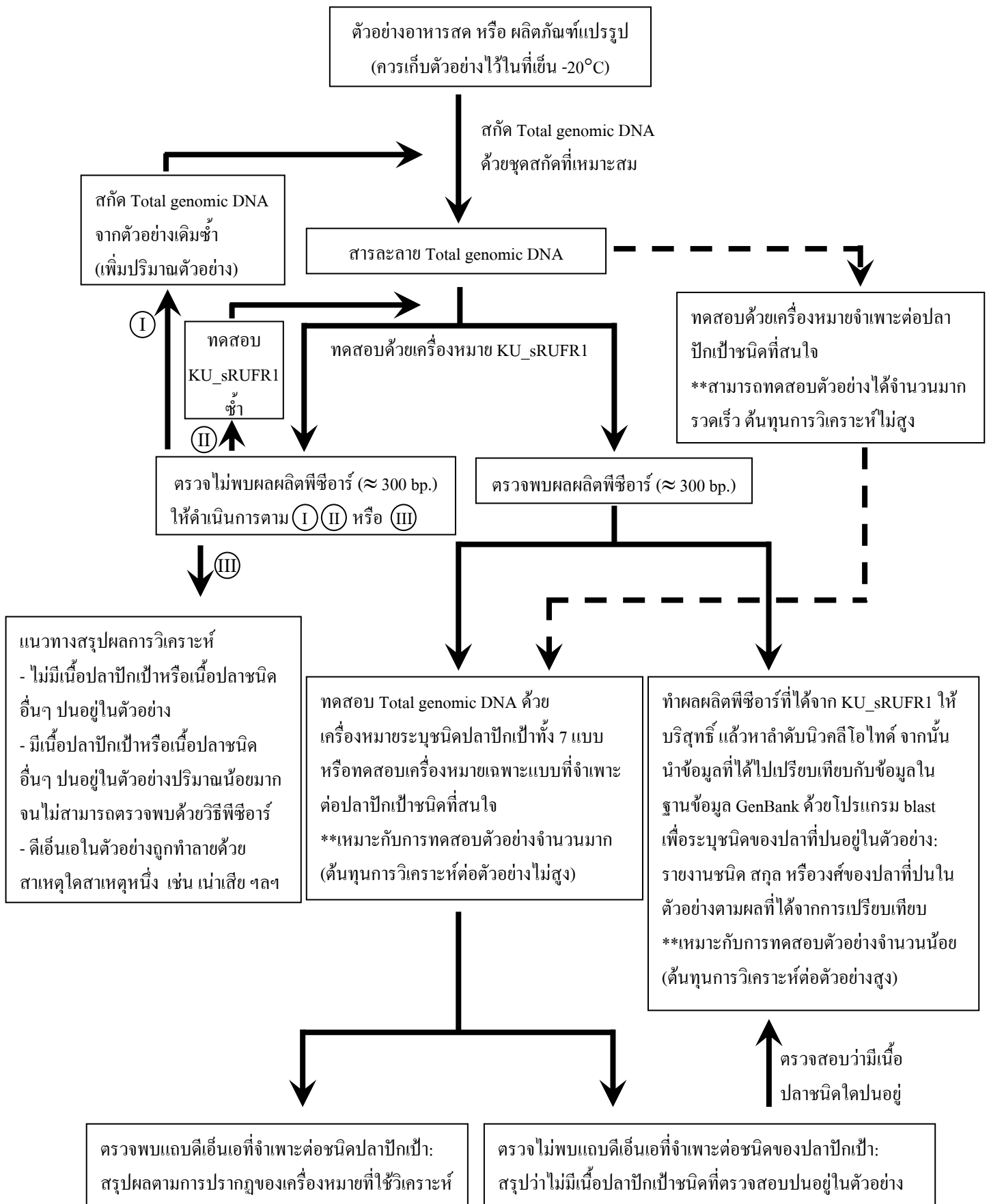
1. ปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>)	order Perciformes	family Latidae
2. ปลาลำเลียง (<i>Seriolina nigrofasciata</i>)	order Perciformes	family Carangidae
3. ปลาตาเดียว (<i>Psettodes erumei</i>)	order Pleuronectiformes	family Psettodidae
4. ปลาน้ำดอกไม้ (<i>Sphyraena putnamae</i>)	order Perciformes	family Sphyraenidae
5. ปลาจะละเม็ดดำ (<i>Parastromateus niger</i>)	order Perciformes	family Carangidae
6. ปลาจะละเม็ดขาว (<i>Pampus argenteus</i>)	order Perciformes	family Stromateidae
7. ปลาทรายแดงญี่ปุ่น (<i>Nemipterus japonicus</i>)	order Perciformes	family Nemipteridae
8. ปลาทุรา (<i>Eleutheronema tetradactylum</i>)	order Perciformes	family Polynemidae
9. ปลากระรัง (<i>Cephalopholis boenak</i>)	order Perciformes	family Serranidae
10. ฉลามหูดำ (<i>Carcharhinus limbatus</i>)	order Carcharhiniformes	family Carcharhinidae
11. ปลาอินทรี (<i>Scomberomorus commerson</i>)	order Perciformes	family Scombridae
12. ปลากระบอก (<i>Mugil cephalus</i>)	order Mugiliformes	family Mugilidae
13. ปลากราย (<i>Chitala ornata</i>)	order Osteoglossiformes	family Notopteridae
14. ปลานิล (<i>Oreochromis niloticus</i>)	order Perciformes	family Cichlidae

ผลที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลซึ่งจำเพาะต่อปลาปักเป้าแต่ละชนิดจะไม่ถูกรบกวนหรือทำให้สับสน แม้ว่าจะมี total genomic DNA ของปลา outgroup เหล่านี้ปะปนอยู่

เครื่องหมายโมเลกุล 7 แบบเพื่อการระบุชนิดปลาปักเป้า

1. เครื่องหมาย KU_sRUF1 เป็น universal primer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปลาปักเป้าได้ 11 ชนิดและปลาอื่นๆ 14 ชนิด โดยสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สำเร็จ แล้วนำฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank รวม 24 ชนิด
2. เครื่องหมาย Mul_ILS เป็นไพรเมอร์สำหรับ multiplex PCR ที่สามารถจำแนกชนิดปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* ได้ 3 ชนิด คือ *L. spadiceus*, *L. lunaris* และ *L. inermis*
3. เครื่องหมาย pfSR_FLI66 เป็นไพรเมอร์สำหรับ species-specific PCR ที่จำเพาะต่อปลาปักเป้า *L. inermis*
4. เครื่องหมาย pfSR_FLL678 เป็นไพรเมอร์สำหรับ species-specific PCR ที่จำเพาะต่อปลาปักเป้า *L. lunaris*
5. เครื่องหมาย pfSR_FLS108 เป็นไพรเมอร์สำหรับ species-specific PCR ที่จำเพาะต่อปลาปักเป้า *L. spadiceus*
6. เครื่องหมาย MulCB_TT เป็นไพรเมอร์สำหรับ multiplex PCR ที่จำเพาะต่อสกุล *Tetraodon* และสามารถจำแนกปลาปักเป้าชนิด *T. nigroviridis* ออกจากชนิด *T. fluviatilis* และ *T. fangi*
7. เครื่องหมาย TFV_BciVI เป็นเครื่องหมาย PCR-RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BciVI* เพื่อจำแนก *T. fluviatilis* และ *T. fangi*

แผนภาพแสดงขั้นตอนการปฏิบัติเพื่อใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุล



วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของปลาปักเป้า

1. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนม (total genomic DNA)

- 1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ($\geq 16,000 \times g$)
- 1.2 เครื่องเขย่าปรับความเร็วได้
- 1.3 เครื่องชั่ง ตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส
- 1.4 ตู้แช่ (-20 องศาเซลเซียส)
- 1.5 ตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส)
- 1.6 กรรไกร มีดผ่าตัด และถุงมือ
- 1.7 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- 1.8 ปิเปตขนาด 20 100 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 1.9 หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 หรือ 1.7 มิลลิลิตร

2. ชุดสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนม (Total genomic DNA)

- 2.1 Genomic DNA Extraction Mini Kit; (RBC Bioscience, Taiwan)
- 2.2 Genomic DNA Mini Kit (Tissue); (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)
- 2.3 GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies Sdn. Bhd, Malaysia)
- 2.4 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany)

3. สารเคมี เอนไซม์ วัสดุและเครื่องมือสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

- 3.1 เครื่องพีซีอาร์; MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, Singapore)
- 3.2 เอนไซม์ DNA polymerase: *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Lithuania)
- 3.3 เอนไซม์ DNA polymerase: High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas, Lithuania)
- 3.4 นิวคลีโอไทด์; dNTP Set (4x25 μ mol) ; (Fermentas, Lithuania)
- 3.5 หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

4. ชุดสกัดผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification Kit)

- 4.1 NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, USA)
- 4.2 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ; (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)
- 4.3 QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Germany)

5. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

เอนไซม์ *Bci*VI (New England BioLabs Inc., USA)

6. เครื่องมือและสารเคมีเพื่อแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

6.1 ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (MiniRun Gel Electrophoresis System GE-100; Hangzhou Bioer Tech. co., Ltd., China) พร้อมอุปกรณ์แปลงกระแสไฟฟ้า

6.2 ผงเจลอะกาโรส (molecular biology grade) เอซีเดียมโบรไมด์ สารละลายบัฟเฟอร์ Tris/ Borate/EDTA (บัฟเฟอร์ TBE)

6.3 ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบขนาด ได้แก่ DNA Ladder Low Range และ 1 kb DNA Ladder Mix (fermentas, Lithuania)

6.4 อุปกรณ์บันทึกภาพแผ่นเจล Gel Document (BioDoc-It TM Imaging System , UVP, USA)

6.5 ไมโครเวฟและเทอร์โมมิเตอร์

7. เครื่องคอมพิวเตอร์ต่อเชื่อมอินเทอร์เน็ตสำหรับคำนวณและวิเคราะห์ผล

8. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Blastn (Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide) จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ใช้เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

วิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของปลาปักเป้า

วิธีดำเนินการและใช้วัสดุอุปกรณ์ในแต่ละขั้นตอนของการตรวจสอบเป็นดังนี้

1. การสกัดดีเอ็นเอ (total genomic DNA)

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อปลาสด

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อปลาสดสามารถดำเนินการได้โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Extraction Mini Kit; (RBC Bioscience), Genomic DNA Mini Kit (Tissue); (Geneaid Biotech Ltd.,) หรือ DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) ดำเนินการตามคำแนะนำผู้ผลิต

ยกเว้น : ให้ใช้เนื้อเยื่อจากกล้ามเนื้อปลา 30 – 50 มิลลิกรัมแทน 20 มิลลิกรัมตามคำแนะนำ โดยสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อปลาสดซึ่งสกัดด้วยชุดสกัดเหล่านี้ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจสอบโดยเจลอิลีคโตรโฟรีซิสและให้ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แตกต่างกัน

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อปลาแปรรูป

ชุดสกัดที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเนื้อปลาแปรรูปคือ GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies Sdn. Bhd, Malaysia) ดำเนินการตามคำแนะนำผู้ผลิต โดยผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาแปรรูปต่างๆ ให้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะสกัดดีเอ็นเอ

2. เอนไซม์และไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 เครื่องหมายโมเลกุลที่เพิ่มปริมาณเพื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิลีคโตรโฟรีซิสจะทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, Lithuania)

2.2 เครื่องหมายโมเลกุลที่เพิ่มปริมาณเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์จะทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas, Lithuania)

2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ใช้ตัวอักษรและความหมายของตัวอักษร ตามข้อกำหนดต่อไปนี้

รหัสแทนกรดนิวคลีอิก	ความหมาย
A	Adenosine
C	Cytidine
G	Guanine
T	Thymidine
U	Uracil
R	G A (pu R ine)
Y	T C (p Y rimidine)
K	G T (K etone)
M	A C (a M ino group)
S	G C (Strong interaction)
W	A T (W eak interaction)
B	G T C (not A) (B comes after A)
D	G A T (not C) (D comes after C)
H	A C T (not G) (H comes after G)
V	G C A (not T, not U) (V comes after U)
N	A G C T (a N y)
-	gap

3. การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ชุดสกัด QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, Germany)

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3. สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (automated sequencer) ซึ่งใช้หลักการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ในกระบวนการจำลองตัวเองที่เบสตำแหน่งเฉพาะด้วย ddNTP (Dideoxynucleic acid) ตามวิธีของ Sanger *et al.* (1977) ซึ่งอาจดำเนินการโดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของห้องปฏิบัติการเอง หรือใช้บริการจากหน่วยบริการต่างๆ เช่น บริษัท macrogen (เกาหลีใต้) หรือ 1st BASE (มาเลเซีย) เป็นต้น

5. การตรวจสอบและแยกขนาดดีเอ็นเอโดยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose electrophoresis)

เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นมีขนาดตั้งแต่ 100 ถึง 400 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเล็ก ดังนั้น การตรวจสอบต้องใช้เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ตามปกติ (0.8-1.0 เปอร์เซ็นต์) โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 3 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE

การเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

กรณีใช้ถาด (tray) เตรียมเจลขนาด $11 \times 6 \times 1$ เซนติเมตร (กว้าง $\times$ ยาว $\times$ สูง) ปริมาตร สารละลายอะกาโรสที่เหมาะสม คือ 25 มิลลิลิตร มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ชั่งผงอะกาโรสหนัก 0.75 กรัม ในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (อุณหภูมิห้อง) จนน้ำหนัก 25 กรัม

หมายเหตุ ก่อนชั่งผงอะกาโรสให้ปรับเครื่องชั่งเป็น 0.00 กรัม แล้วชั่งอะกาโรสและ เติมบัฟเฟอร์จนได้น้ำหนัก 25 กรัม ให้นำขวดรูปชมพู่เข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 โดยไม่ต้องปิดหรือปรับ เครื่องชั่งให้เป็น 0.00 กรัม

2. เขย่าด้วยมือประมาณ 30 วินาที หรือจนกว่าผงอะกาโรสทั้งหมดลอยฟุ้งใน สารละลายบัฟเฟอร์

3. ให้ความร้อนขวดรูปชมพู่ด้วยไมโครเวฟ ความร้อนปานกลาง ประมาณ 1 นาที แล้วเขย่าขวดรูปชมพู่ซ้ำๆ ประมาณ 10 วินาที แล้วให้ความร้อนอีกครั้งนาน 20 วินาที จากนั้นเขย่า ขวดรูปชมพู่ซ้ำๆ สังเกตสารละลายที่ได้ว่ายังมีผงอะกาโรสเหลืออยู่หรือไม่ หากมีก็ให้ความร้อนซ้ำ 20 วินาที สลับกับเขย่าจนได้สารละลายใสเป็นเนื้อเดียว

หมายเหตุ ขณะให้ความร้อนขวดรูปชมพู่ ให้นำน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ แล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟไปพร้อมกันด้วย

4. ชั่งขวดรูปชมพู่ด้วยเครื่องชั่งที่ใช้ในข้อ 1. จะพบว่าน้ำหนักที่ได้้น้อยกว่า 25 กรัม เนื่องจากน้ำบางส่วนระเหยออกไป เติมน้ำกลั่นที่อุ่น (ในข้อ 3.) จนน้ำหนักเป็น 25 กรัม ให้ความ ร้อนประมาณ 10 วินาที (หรือจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว) แล้ววางขวดรูปชมพู่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. วัดอุณหภูมิสารละลายอะกาโรสด้วยเทอร์โมมิเตอร์จนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเทในถาดเตรียมเจล เสียบหัว จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 นาที

6. นำถาดเตรียมเจลแช่ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) ต่อไปอีก 10 นาที ก่อนนำไปใช้

การตรวจสอบขนาดของซันดิเอ็นเอที่เป็นผลผลิตพีซีอาร์หรือผลการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดำเนินการโดยผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสารละลาย loading buffer (น้ำตาลซูโครส 4 กรัม, สี bromophenol blue 25 มิลลิกรัม, เติมน้ำกลั่นจนเป็น 10 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 คือใช้สารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร (หรือ 10 ไมโครลิตร ต่อ 2 ไมโครลิตร) แล้วหยอดสารละลายผสมที่ได้ลงในช่องของแผ่นเจลอะกาโรสที่เตรียมไว้

กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการแยกขนาดซันดิเอ็นเอมีแรงเคลื่อน 50 โวลต์ เป็นเวลา 110 นาที จากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วดูภายใต้แสง UV บันทึกภาพเจลที่ได้

องค์ประกอบของปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของปลาปักเป้า

เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละแบบในคู่มือจะมีองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาดังนี้

1. เครื่องหมาย KU_sRUF1

เครื่องหมาย KU_sRUF1 คือ คู่มือไพรเมอร์ที่มีคุณสมบัติเป็น universal primer ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 เส้นคือ KU_sRUF1 และ KU_sRUR1 ซึ่งมีลำดับดังนี้

KU_sRUF1 : 5'-TGCCAGCCRCCGCGGTT

KU_sRUR1 : 5'-CCGCCAAGTCCKTTGGGTT

เมื่อใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จะมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. MgCl ₂ (25 mM)	2.50	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer KU_sRUF1 (10 pmol)	2.00	ไมโครลิตร
5. Primer KU_sRUR1 (10 pmol)	2.00	ไมโครลิตร
6. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
7. ultrapure H ₂ O	12.80	ไมโครลิตร
8. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	}	35 รอบ
94°C	30 วินาที		
58°C	30 วินาที		
72°C	30 วินาที		
72°C	1 นาที		
4°C	forever		

ปฏิกิริยาจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 290 คู่เบส ในปลาเกือบทุกชนิด ยกเว้นในปลาน้ำดอกไม้ ที่มีขนาดใหญ่กว่า 300 คู่เบส (ภาพที่ 1) ซึ่งคาดว่าเป็นความแตกต่างตามปกติของยีน *12S rRNA* ในสิ่งมีชีวิตที่มีสายวิวัฒนาการต่างกัน

ในกรณีที่ใช้คู่ไพรเมอร์ KU_sRUF1 และ KU_sRUR1 สำหรับพิสูจน์ว่ามีดีเอ็นเอต้นแบบในสารละลาย (ไม่ได้มีจุดประสงค์ของการเพิ่มปริมาณเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์) จะสามารถใช้องค์ประกอบและสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิด ทำให้ในทางปฏิบัติทำงานได้ง่ายขึ้น ถึงแม้ว่าแถบดีเอ็นเอจะจางลงแต่ก็ยังชัดเจนมากพอสำหรับตรวจสอบได้ โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

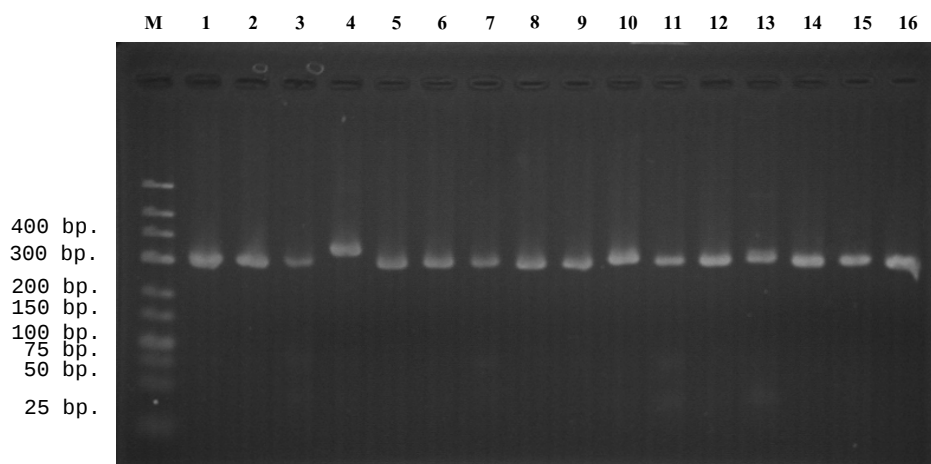
1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. $MgCl_2$ (25 mM)	1.00	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer KU_sRUF1 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
5. Primer KU_sRUR1 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
6. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
7. ultrapure H_2O	16.30	ไมโครลิตร
8. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	} 35 รอบ
94°C	30 วินาที	
64°C	30 วินาที	
72°C	30 วินาที	
72°C	1 นาที	
4°C	forever	

ผลิตพีซีอาร์ที่ได้ยังคงมีขนาดเท่าเดิม (290 คู่เบส)

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ KU_sRUF1 และ KU_sRUR1 ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาปักเป้าและปลาในกลุ่ม Outgroup แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ KU_sRUF1 และ KU_sRUR1 (universal primer) ของปลาชนิดต่างๆ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในช่อง 1 – 16 ดังนี้ 1. ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) 2. ปลาสำลี (*Seriolina nigrofasciata*) 3. ปลาตาเดียว (*Psettodes erumei*) 4. ปลาน้ำดอกไม้ (*Sphyrina putnamae*) 5. ปลากะโหลกดำ (*Parastromateus niger*) 6. ปลากะโหลกขาว (*Pampus argenteus*) 7. ปลาทรายแดงญี่ปุ่น (*Nemipterus japonicus*) 8. ปลากระเบน (*Eleutheronema tetradactylum*) 10. ปลากะรัง (*Cephalopholis boenak*) 10. ฉลามหูดำ (*Carcharhinus limbatus*) 11. ปลาอินทรี (*Scomberomorus commerson*) 12. ปลากระบอก (*Mugil cephalus*) 13. ปลาทราย (*Chitala ornata*) และ 14. ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) 15. ปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* 16. ปลาปักเป้าสกุล *Tetraodon* โดยใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุล KU_sRUFR1 ที่นำฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ และรหัส accession number ในฐานข้อมูล GenBank ของปลาชนิดต่างๆ

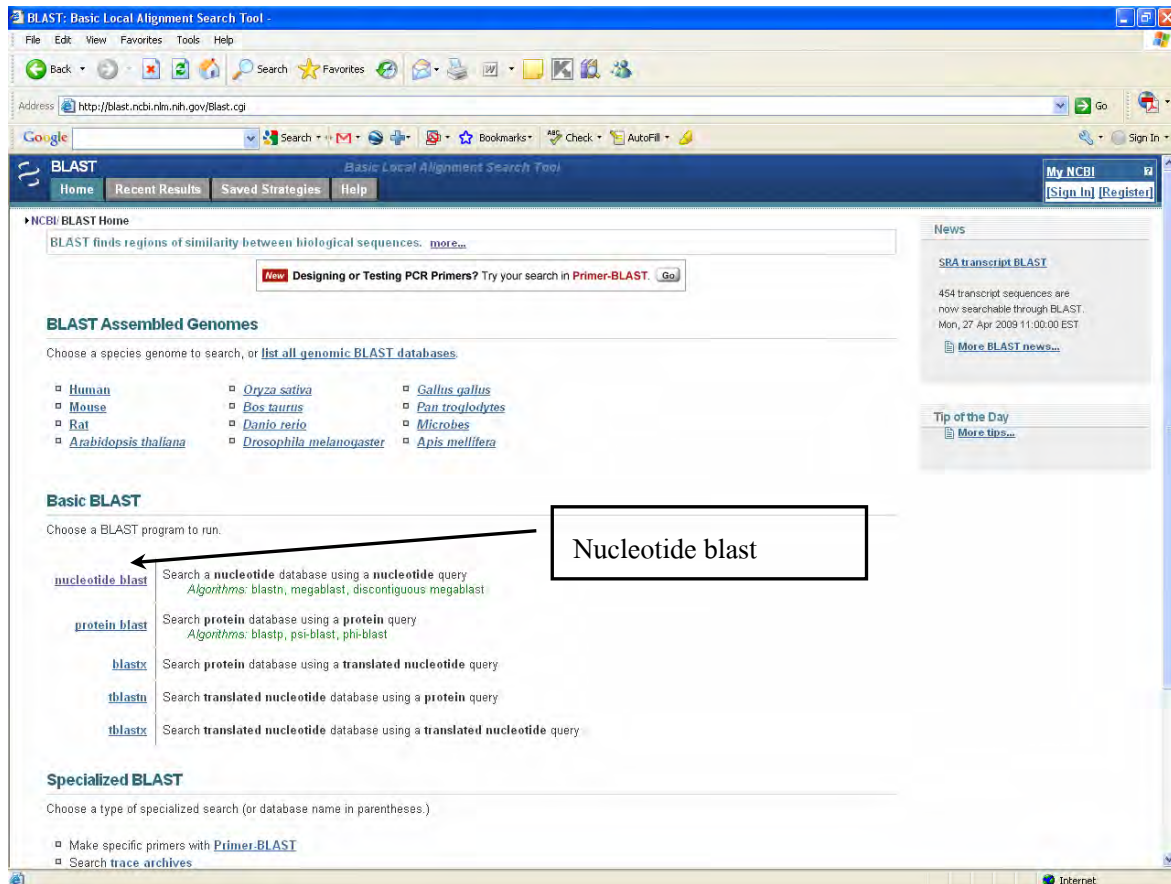
ลำดับ	ชื่อสามัญ (ไทย)	ชื่อสามัญ (อังกฤษ)	ชื่อวิทยาศาสตร์	accession no.
1	ปลาปักเป้า	smooth golden pufferfish	<i>Lagocephalus inermis</i>	GQ249104
2	ปลาปักเป้าหลังเขียว	Green rough-backed puffer	<i>Lagocephalus lunaris</i>	GQ249105
3	ปลาปักเป้า	Hafl-smooth golden pufferfish	<i>Lagocephalus spadiceus</i>	FJ792638
4	ปักเป้าเขียวจุด	green spotted puffer	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	FJ792639
5	ปักเป้าตาแดง	target puffer	<i>Tetraodon fangi</i>	GQ249110
6	ปักเป้าเขียว	green pufferfish	<i>Tetraodon fluviatilis</i>	GQ337007
7	ปลาปักเป้าลายพาดกลอน	lattice blaasop	<i>Takifugu oblongus</i>	GQ337006
8	ปลาปักเป้าลายร่างแห	Reticulated pufferfish	<i>Arothron reticularis</i>	GQ249106
9	ปลาปักเป้าหนามสั้น	Rounded porcupinefish	<i>Chilomycterus orbicularis</i>	GQ249107
10	ปลาปักเป้าหนามทุเรียน	spot-fin porcupinefish	<i>Diodon hystrix</i>	GQ249108
11	ปลาปักเป้าหนามทุเรียน	Black blotched porcupinefish	<i>Diodon liturosus</i>	GQ249109
12	ปลากะพงขาว	barramundi perch	<i>Lates calcarifer</i>	FJ775179
13	ปลาสำลี	Blackbanded trevally	<i>Seriolina nigrofasciata</i>	FJ792626
14	ปลาตาเดียว	Indian spiny turbot	<i>Psettodes erumei</i>	FJ792627
15	ปลาน้ำดอกไม้	Giant Seapike	<i>Sphyaena jello</i>	FJ792628
16	ปลาจะละเม็ดดำ	Black pomfret	<i>Parastromateus niger</i>	FJ792629
17	ปลาจะละเม็ดขาว	Silver pomfret	<i>Pampus argenteus</i>	FJ792630
18	ปลาทรายแดงญี่ปุ่น	Japanese threadfin bream	<i>Nemipterus japonicus</i>	FJ792631
19	ปลากูเร	Fourfinger threadfin	<i>Eleutheronema tetradactylum</i>	FJ792632
20	ปลาฉลามหูดำ	Blacktip reef shark	<i>Carcharhinus melanopterus</i>	FJ792633
21	ปลาอินทรีบั้ง	Spanish mackerel	<i>Scomberomorus commerson</i>	FJ792634
22	ปลากะบอก	Flathead mullet	<i>Mugil cephalus</i>	FJ792635
23	ปลากลาย	Clown featherback	<i>Chitala ornata</i>	FJ792636
24	ปลานิล	Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	FJ792637

การใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อการระบุชนิดทำได้โดยใช้โปรแกรม Blast ผ่านระบบอินเทอร์เน็ต

โปรแกรม Blast มี URL ดังนี้

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

แล้วเลือกคลิกที่ **nucleotide blast**



ผลการเลือกคลิกที่ nucleotide blast จะให้ผลดังนี้

The screenshot shows the NCBI Nucleotide BLAST search page. Four numbered annotations in Thai are present:

1. พื้นที่วางลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence input area)
2. คลิก Other (Click Other in the Database dropdown)
3. คลิก Somewhat similar sequences (blastn) (Click Somewhat similar sequences (blastn) in the Optimize for section)
4. คลิก Blast (Click the BLAST button)

ในหน้าที่ปรากฏขึ้นนี้จะมีบริเวณที่สำคัญดังนี้

1. บริเวณสำหรับวางลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการตรวจสอบ (ตัวอย่างในหน้า 21)
2. หัวข้อ Database ให้เลือก Others
3. หัวข้อ Optimize for ให้เลือก Somewhat similar sequences (blastn)
4. แล้วเลือกคลิก BLAST

ผลการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม blast จะสามารถระบุได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ใดในฐานข้อมูล GenBank ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการตรวจสอบมากที่สุด โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *12S rRNA* ดังนั้นถ้าปรากฏความเหมือน (identities) มากกว่า 95% ก็เชื่อได้ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตชนิด (species) เดียวกัน ดังตัวอย่างการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. spadiceus* จากจังหวัดชุมพร

>pCpLS06u-KU_sRUF1
AGGGCAGTTATACGCTTTGGAAGGCATGAAGCACATCCACGAAAGTAGCCTTACCCCACTTGAATCCACGAAAGCTAAGATACAAA
CTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACAACGACCCCCCCTACAATCAAACCTCCGCCTGGGTACTACGAGCATTAGC
TTAAACCCCAACGGACTTGG

ผลที่ได้ปรากฏว่าเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *L. spadiceus* ที่ฝากในฐานข้อมูล 97% โดยดูจากค่า Identities ที่มีค่าเท่ากับ 97%

```
> gi|225421142|gb|FJ792638.1 Lagocephalus spadiceus 12S ribosomal RNA gene,  
partial sequence;  
mitochondrial  
Length=344
```

Score = 322 bits (356), Expect = 4e-85
Identities = 188/192 (97%), Gaps = 2/192 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	AGGGCAGTTATACGCTTTTGAAGGCATGAAGCACATCCACGAAAGTAGCCTTACCCCCT	60
Sbjct	152	AGGGCAGTTATACGCTTTTGAAGGCATGAAGCACATCCACGAAAGTAGCCTTACCCCCT	211
Query	61	TGAATCCACGAAAGCTAAGATACAAAC TGGGATTAGATACCCCCTATGCTTAGCCCTAA	120
Sbjct	212	TGAATCCACGAAAGCTAAGATACAAAC TGGGATTAGATACCCCCTATGCTTAGCCCTAA	271
Query	121	ACAACGAcaccccccaTACAATCAAAC TCGCCTGGGTACTACGAGCAT TAGCTTAAAACC	180
Sbjct	272	ACAACGA-CCCCACCTACAATCAAAC TCGCCTGGGTACTACGAGCAT TAGCTTAAAACC	330
Query	181	CAACGGACTTG	192
Sbjct	331	CAA-AGACTTG	341

อย่างไรก็ตาม หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลมาก่อน ผลการ blast ก็จะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงที่สุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ ซึ่งจะช่วยให้ทราบว่าตัวอย่างที่วิเคราะห์เป็นปลาในกลุ่มปลาปักเป้าหรือไม่

ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงของปลาในตารางที่ 1 ซึ่งนำฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ปลาปักเป้า (*Lagocephalus inermis*)

LOCUS GQ249104 292 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION *Lagocephalus inermis* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ249104
 VERSION GQ249104.1 GI:253741324
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lagocephalus inermis* (smooth blaasop)
 ORGANISM *Lagocephalus inermis*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Tetradontoidea; Tetraodontidae; *Lagocephalus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..292
 /organism="*Lagocephalus inermis*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-SkLI01"
 /db_xref="taxon:229056"
 rRNA <1..>292
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgagaagcc caagttgtca gccttcggcg taaagagtgg
 61 ttagaatagc ccgtttaaac tgaggtcgaa caccttcaaa gcagtcatac gctctcgaag
 121 gcatgaagca cacttacgaa agtaacctca cccgatttga acccacgaaa gctaagacac
 181 aaactgggat tagatacccc actatgccta gccctaaaca acgacattaa ttacactcaa
 241 actccgcccc ggtactacga gcattagctt aaaacccaaa gaacttggcg gg

ปลาปักเป้าหลังเขียว (*Lagocephalus lunaris*)

LOCUS GQ249105 292 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION *Lagocephalus lunaris* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ249105
 VERSION GQ249105.1 GI:253741325
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lagocephalus lunaris* (green rough-backed puffer)
 ORGANISM *Lagocephalus lunaris*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Tetraodontoidea; Tetraodontidae; *Lagocephalus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..292
 /organism="*Lagocephalus lunaris*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-TrLL01"
 /db_xref="taxon:204814"
 rRNA <1..>292
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgagtggcc caagttgtta gccctcggcg taaagagtgg
 61 ttagagcgac acacacaaca ctgaggccga acaccttcag agcagtgata cgcttcggaa
 121 ggcatgaagc acaccacga aagtagcctc acccaacttg aaccacgaa agctaagaca
 181 caaactggga ttaggtaccc cactatgctt agccctaaac aacgacacca attacaccaa
 241 aactccgcca ggtactacg agcattagct tgaaaccaa cggacttggc gg

ปลาปักเป้า (*Lagocephalus spadiceus*)

LOCUS FJ792638 344 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Lagocephalus spadiceus* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792638
 VERSION FJ792638.1 GI:225421142
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lagocephalus spadiceus* (half-smooth golden pufferfish)
 ORGANISM *Lagocephalus spadiceus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes; Tetradontoidea; Tetraodontidae; *Lagocephalus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 344)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 344)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..344
 /organism="*Lagocephalus spadiceus*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-TrLS16"
 /db_xref="taxon:435151"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>344
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttgc aaaaagctgt acgccagcac taggaaggcg gagttctgcc
 61 agccgcccgc gttatacgag aggcccaagt tgtaaccct cggcgtaaag agtggttaga
 121 gtaccctac agactaaggc cgaacacctt cagggcagtt atacgctttc gaaggcatga
 181 agcacatcca cgaaagtagc cttacccac ttgaatccac gaaagctaag atacaaactg
 241 ggattagata cccactatg cttagcccta aacaacgacc ccacctaca tcaaactccg
 301 cctgggtact acgagcatta gcttaaaacc caaagacttg gcgg

ปลาปักเป้าเขียวจุด (*Tetraodon nigroviridis*)

LOCUS FJ792639 293 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Tetraodon nigroviridis* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792639
 VERSION FJ792639.1 GI:225421143
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Tetraodon nigroviridis* (spotted green pufferfish)
 ORGANISM *Tetraodon nigroviridis*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Tetradontoidea; Tetraodontidae; Tetraodon.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 293)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 293)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..293
 /organism="Tetraodon nigroviridis"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-RnTN05"
 /db_xref="taxon:99883"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>293
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgagaggcc caagttgtta gccccggcg taaagagtgg
 61 ttaaacacac aaacacacaaa ctgaggccga acaccctcaa ggcagttata cgctcccag
 121 gacatgaaga acaattacga aggtagcctc atccccttg aaccacgaa agctagggta
 181 caaactggga ttagataccc cactatgcct agccctaaac aatgatattc taatacattc
 241 cctatccgcc cgggtactac gagcattagc ttaaaacca acggacttgg cgg

ปลาปักเป้าตาแดง (*Tetraodon fangi*)

LOCUS GQ249110 290 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION Tetraodon fangi 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ249110
 VERSION GQ249110.1 GI:253741330
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Tetraodon fangi
 ORGANISM Tetraodon fangi
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes; Tetraodontoidea; Tetraodontidae; Tetraodon.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 290)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 290)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..290
 /organism="Tetraodon fangi"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-AyTF01"
 /db_xref="taxon:658184"
 rRNA <1..>290
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 gccagcctcc gcggttatac gagagacca agttgttagc ccccggcgta aagagtgggt
 61 agatactaaa catcaaacgt aggccgaaca ccctcaaggc agttatacgc tcccgaggac
 121 atgaagtaca attacgaaag tagcctcacc cccttgaacc cacgaaagct aggacacaaa
 181 ctgggattag atacccact atgcctagcc ctaaacaatg ataccaacat acactcccca
 241 tccgcccggg tactacgagc attagcttaa aacccaaagg acttggcggg

ปลาปักเป้าเขียว (*Tetraodon fluviatilis*)

LOCUS GQ337007 289 bp DNA linear VRT 05-AUG-2009
 DEFINITION *Tetraodon fluviatilis* voucher KUGEN_ECpf-AdTV01 12S ribosomal RNA
 gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ337007
 VERSION GQ337007.1 GI:254972483
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Tetraodon fluviatilis* (green pufferfish)
 ORGANISM *Tetraodon fluviatilis*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Tetradontoidea; Tetraodontidae; Tetraodon.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 289)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 289)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..289
 /organism="Tetraodon fluviatilis"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-AdTV01"
 /db_xref="taxon:47145"
 rRNA <1..>289
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 cagcctccgc ggttatacga gagaccaag ttgttagccc ccggcgtaaa gagtggttag
 61 atactaaata ccaaactgag gccgaacacc ctcaaggcag ttatacgctc ccgagggcat
 121 gaagaacaat tacgaaagta gcctcacccc cttgaaccc acgaaaagcta ggacacaaac
 181 tgggattaga taccacctta tgccctagccc taaacaatga taccaatata cactccccat
 241 ccgcccgggt actacgagca ttagcttaaa acccaaagga acttggcgg

ปลาปักเป้าลายพาดกลอน (*Takifugu oblongus*)

LOCUS GQ337006 272 bp DNA linear VRT 05-AUG-2009
 DEFINITION Takifugu oblongus voucher KUGEN_ECpf-SuTk005 12S ribosomal RNA
 gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ337006
 VERSION GQ337006.1 GI:254972482
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Takifugu oblongus (lattice blaasop)
 ORGANISM Takifugu oblongus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Tetradontoidea; Tetraodontidae; Takifugu.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 272)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 272)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..272
 /organism="Takifugu oblongus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-SuTk005"
 /db_xref="taxon:204816"
 rRNA <1..>272
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 cagccgccgc ggttatacga gagaccaag ttgtagcca acggcgtaaa ggggtggttag
 61 aactataaac aacaaactga gaccgaacac ctcaaggct gttatacgt tccgaagcaa
 121 cgaagaacaa taacgaaagt agcctcacta actcgaaccc acgaaagcta ggacacaaac
 181 cgggattaga taccaccta tgcctacccc taaacacgat atgaaactac gtacatatcc
 241 gcccggttac tacgagcatt agcttaaaac cc

ปลาปักเป้าลายร่างแห (*Arothron reticularis*)

LOCUS GQ249106 292 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION Arothron reticularis 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ249106
 VERSION GQ249106.1 GI:253741326
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Arothron reticularis (reticulated pufferfish)
 ORGANISM Arothron reticularis
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes; Tetradontoidea; Tetraodontidae; Arothron.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..292
 /organism="Arothron reticularis"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-Arec"
 /db_xref="taxon:658176"
 rRNA <1..>292
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg cgcgggttat acgagagacc caagttgtta gcccccgcg taaagagtgg
 61 ttaaatacac aacatttaac tgaggccgaa catcctcaag gcagttatac gctcccgagg
 121 acatgaagaa caatcacgaa agtagcctca tcccatttga acccacgaaa gctaggacac
 181 aaactgggat tagatacccc actatgccta gccctaaaca acgataccac caatacatcc
 241 ccatccgccc ggggtactacg agcattagct taaaacccaa cggacttggc gg

ปลาปักเป้าหนามสัน (*Cyclichthys orbicularis*)

LOCUS GQ249107 290 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION *Cyclichthys orbicularis* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION GQ249107
 VERSION GQ249107.1 GI:253741327
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Cyclichthys orbicularis* (birdbeak burrfish)
 ORGANISM *Cyclichthys orbicularis*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes; Diodontidae; *Cyclichthys*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 290)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 290)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..290
 /organism="*Cyclichthys orbicularis*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-Corb"
 /db_xref="taxon:658182"
 rRNA <1..>290
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcgggttat acgagaggcc caagttgtta ggcaccggcg taaaggggtgg
 61 ttaaggcaaa tacctaaact aaagccgaac atcttccaag ccgtcatacg cacacgaaga
 121 taagaagccc aataacgaaa gtggctctaa tatgcctgaa tccacgaaag ctatgacaca
 181 aactgggatt agatacccca ctatgcctag ccctaaacat tgacagtaaa ctcaccaact
 241 gtccgcccgg gaactacgag cattagctta aaaccaacg gacttggcgg

ปลาปักเป้าหนามทุเรียน (*Diodon hystrix*)

LOCUS GQ249108 270 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION *Diodon hystrix* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION GQ249108
 VERSION GQ249108.1 GI:253741328
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Diodon hystrix* (spot-fin porcupinefish)
 ORGANISM *Diodon hystrix*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Diodontidae; *Diodon*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 270)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 270)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..270
 /organism="Diodon hystrix"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-Dhys"
 /db_xref="taxon:223145"
 rRNA <1..>270
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 cgcggttata cgagagaccc aagttgtag gcatcggcgt aaaggggtgt taaggcaata
 61 cccaaactaa agccgaacat ctccaagcc gtcatacgca cacgaagaca agaagcccga
 121 taacgaaagt ggctctaacc tgcctgaacc cacgaaagct atgacacaaa ctgggattag
 181 atacccact atgcctagcc ctaaaccatg acagtaaatt caccaactag tccgcccggg
 241 aactacgagc accagcttaa aacccaacgg

ปลาปักเป้าหนามทุเรียน (*Diodon liturosus*)

LOCUS GQ249109 289 bp DNA linear VRT 18-JUL-2009
 DEFINITION *Diodon liturosus* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION GQ249109
 VERSION GQ249109.1 GI:253741329
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Diodon liturosus* (black-blotched porcupinefish)
 ORGANISM *Diodon liturosus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Tetraodontiformes;
 Diodontidae; *Diodon*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 289)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 289)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, 50 Phahon Yothin Rd, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..289
 /organism="Diodon liturosus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-Dlit"
 /db_xref="taxon:304257"
 rRNA <1..>289
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tgccagccgc cgcggttata cgagagaccc aagttgttag gcatcggcgt aaaggggtggt
 61 taaggcaaat acccaacta aagccgaaca tcttccaagc cgtcatacgc acacgaagac
 121 aagaagccca ataacgaaag tggctctaac ctgcctgaac ccacgaaagc tatgacacaa
 181 actgggatta gatacccccac tatgcctagc ctaaacatt gacagtaaat tcactaactg
 241 tccgcctggg aactacgagc accagcttaa aacccaaagg acttggcgg

ปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*)

LOCUS FJ775179 285 bp DNA linear VRT 29-MAR-2009
 DEFINITION *Lates calcarifer* isolate OG01rcs 12S ribosomal RNA gene, partial
 sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ775179
 VERSION FJ775179.1 GI:225580015
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lates calcarifer* (barramundi perch)
 ORGANISM *Lates calcarifer*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Percoidei; Latidae; *Lates*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 285)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identification in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 285)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..285
 /organism="*Lates calcarifer*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="OG01rcs"
 /db_xref="taxon:8187"
 rRNA <1..>285
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ccgccgcggt tatacgagag gcccaagctg acaaaccacg gcgtaaagag tggttaagga
 61 aacttgaaac taaagtcgaa cgctctcttc gagctgttat acgcgtacga gactacgaag
 121 ctacgccacg aaagtgcact tacaaccctt gacccacga aagctaagaa acaaaactggg
 181 attagatacc ccactatgct tagccgtaaa cattgatatt acattacact taatatccg
 241 cccgggaatt acaagcacta gcttaaaacc caacggactt ggcgg

ปลาสำลี (*Seriolina nigrofasciata*)

LOCUS FJ792626 214 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Seriolina nigrofasciata* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792626
 VERSION FJ792626.1 GI:225421130
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Seriolina nigrofasciata*
 ORGANISM *Seriolina nigrofasciata*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Carangoidei; Carangidae; *Seriolina*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 214)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 214)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..214
 /organism="*Seriolina nigrofasciata*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG02"
 /db_xref="taxon:436009"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>214
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgagaggcc taagttgata gacagcggcg taaagagtgg
 61 ttaaggaaag tacaaaacta aagccgaacg ccttcagaac tgtcatacgt cttcgaaggt
 121 atgaagcccg accacgaaag tggctttatt cccctgaac ccacgaaagc taaggaaaca
 181 actgggatta gatacccac tatgcttagc cctg

ปลาตาเดียว (*Psettodes erumei*)

LOCUS FJ792627 292 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Psettodes erumei* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION FJ792627
 VERSION FJ792627.1 GI:225421131
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Psettodes erumei* (Indian spiny turbot)
 ORGANISM *Psettodes erumei*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Pleuronectiformes;
 Psettodidae; Psettodidae; Psettodes.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..292
 /organism="Psettodes erumei"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG03"
 /db_xref="taxon:195640"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>292
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgatgaggg tcaagctgac agacaacggc gtaaagagtg
 61 gttaggggtt acaaaaaata aagccgaacg ctctctaagc tggtatacgc gcatgcgaga
 121 gtatgaagcc caactacgaa agtggcctta ctacacctga acccagaaa gctaagaaac
 181 aaactgggat tagatacccc actatgctta gccttaaaca ttgattgtac cctacaccta
 241 caatccgccc ggaattaca aacattagtt caaaaccaa aggacttggc gg

ปลาน้ำดอกไม้ (*Sphyraena jello*)

LOCUS FJ792628 264 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Sphyraena jello 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION FJ792628
 VERSION FJ792628.1 GI:225421132
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Sphyraena jello (pickhandle barracuda)
 ORGANISM Sphyraena jello
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Scombroidei; Sphyraenidae; Sphyraena.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 264)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 264)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..264
 /organism="Sphyraena jello"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG04"
 /db_xref="taxon:445362"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>264
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 aaactaaagc tctggaacgg cttctagggt gttacacgct tccgaaggta cgaagcccaa
 61 tcacgaaagt agctttaatc ctacacgtgac tccacgaaag ctgagaaaca aactgggatt
 121 agatacccca ctatgctcag ccctaaacat cgattgtata acacaacccc gatccgcccg
 181 ggtattacgc acgccccctt tctttatttc tatttatctt ttaccccccc ccccccttg
 241 gctgaaaccc aagggaattg gcgg

ปลาจะละเม็ดดำ (*Parastromateus niger*)

LOCUS FJ792629 291 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Parastromateus niger* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792629
 VERSION FJ792629.1 GI:225421133
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Parastromateus niger* (black pomfret)
 ORGANISM *Parastromateus niger*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Carangoidei; Carangidae; *Parastromateus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 291)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 291)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..291
 /organism="Parastromateus niger"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG05"
 /db_xref="taxon:435272"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>291
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg gccgcggtta tacgagaggg tcaagttgac agacaacggc gtaaagagtg
 61 gttaaggaaa atacactaac taaagcggaa caccctcata gctgttatac gcttccgagg
 121 gcatgaaccc caaccacgaa ggtggcctta cattacctga acccacgaaa gctaagaaac
 181 aaactgggat tagatacccc actatgctta gccttaaaca ttgattgttt accacatcaa
 241 acatccgccc gggaattacg aacactagtt taaaacccaa cgacttggcg g

ปลาจะละเม็ดขาว (*Pampus argenteus*)

LOCUS FJ792630 292 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Pampus argenteus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION FJ792630
 VERSION FJ792630.1 GI:225421134
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Pampus argenteus (silver pomfret)
 ORGANISM Pampus argenteus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Stromateoidei; Stromateidae; Pampus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 292)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..292
 /organism="Pampus argenteus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG06"
 /db_xref="taxon:206143"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>292
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgaaaggct caagttgata aacttcggcg taaagtgtgg
 61 ttaaggaaat ttttcaacta aagccgaacg cctataaaag cagtgtacg cttattaagg
 121 catgaagccc ctctacgaaa gtggctttat aaaccctgaa tccacaaaag ctatgaaaca
 181 aactgggatt agatacccca ctatgcttag ccataaacat tgatagaata ctacatattt
 241 ctatccgcct gggaattacg agcattagct taaaacccaa cggacttggc gg

ปลาทรายแดงญี่ปุ่น (*Nemipterus japonicus*)

LOCUS FJ792631 299 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Nemipterus japonicus* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792631
 VERSION FJ792631.1 GI:225421135
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Nemipterus japonicus* (Japanese threadfin bream)
 ORGANISM *Nemipterus japonicus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Percoidei; Nemipteridae; Nemipterus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 299)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 299)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..299
 /organism="Nemipterus japonicus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG07"
 /db_xref="taxon:445358"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>299
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcgggttag acgagggact caagttgata gccccggcg taaagcgtgg
 61 ttaaatgaaa taaaagaata aagccgaaaa catctctatg cagtaacaag taagttagta
 121 ggaagaacaa ttacgaaagt agctttaaaa tattgatgcc acgaaagctg gggaacaaac
 181 tgggattaga gacccatta tgcccagtc taaacgtaaa cgagatgaca ccaatccctc
 241 gttcgcttgg taattacgag cacaactaat acgagcttaa aaccaacgg acttggcgg

ปลาทุเร (Eleutheronema tetradactylum)

LOCUS FJ792632 295 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Eleutheronema tetradactylum 12S ribosomal RNA gene, partial
 sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792632
 VERSION FJ792632.1 GI:225421136
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Eleutheronema tetradactylum
 ORGANISM Eleutheronema tetradactylum
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
 Percoidei; Polynemidae; Eleutheronema.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 295)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 295)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..295
 /organism="Eleutheronema tetradactylum"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG08"
 /db_xref="taxon:210139"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>295
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcgggttat acgagaggcc caagttgaca gaccacggcg taaagagtgg
 61 ttagggaaat ttctaaacta aagccgaacg cttcctgaga gctgttatat gcataatcgaa
 121 gtatgaagac caacaacgaa agtggcttta acctttaacc tgaaccacg agagctaagg
 181 aacaaactgg gattagatac ccactatgc ttagccctaa acattgactg tgaactacac
 241 cccacatccg cccgggaact acgaacgtaa gtttaaaacc caacggactt ggcgg

ปลาฉลามหูดำ (*Carcharhinus melanopterus*)

LOCUS FJ792633 301 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Carcharhinus melanopterus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792633
 VERSION FJ792633.1 GI:225421137
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Carcharhinus melanopterus (blacktip reef shark)
 ORGANISM Carcharhinus melanopterus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Chondrichthyes;
 Elasmobranchii; Galeomorphii; Galeoidea; Carcharhiniformes;
 Carcharhinidae; Carcharhinus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 301)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 301)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..301
 /organism="Carcharhinus melanopterus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-0G10"
 /db_xref="taxon:263686"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>301
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgagtaact catattaaca caccgccggcg taaagagtga
 61 ttaaagaatg acctctaact actaaagttt agacctcata aaactgttat acgtatccat
 121 gagtgggaata aacaacaacg aaagtgactt tatatattaa ggaaccttga tgtcacgaca
 181 gttgggaccc aaactaggat tagataccct actatgcccc accacaaact taaacaacat
 241 ccactatat tgttcgccag agtactacaa gcgctagctt aaaacccaaa ggacttggcg
 301 g

ปลาอินทรีบัง (*Scomberomorus commerson*)

LOCUS FJ792634 290 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION *Scomberomorus commerson* 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792634
 VERSION FJ792634.1 GI:225421138
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Scomberomorus commerson* (narrow-barred Spanish mackerel)
 ORGANISM *Scomberomorus commerson*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Scombroidei; Scombridae; *Scomberomorus*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 290)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 290)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..290
 /organism="Scomberomorus commerson"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-0G11"
 /db_xref="taxon:218798"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>290
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg cgcgggttat acgagaggcc caagttgaca gccccggcg taaagcgtgg
 61 ttaaggcata ctttaaaact aaagccgaat atcttcagag cagttatag catccgaaga
 121 cacgaagccc caccacgaaa gtggctttat gacacctgat ccacgaaaag ctaggacaca
 181 aactgggatt agatacccca ctatgcctag ccgtaaacat tgatagaact atacaccctc
 241 tatccgctg ggtactacga gcattagctt aaaaccaac gacttggcgg

ปลากระบอก (*Mugil cephalus*)

LOCUS FJ792635 293 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Mugil cephalus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION FJ792635
 VERSION FJ792635.1 GI:225421139
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Mugil cephalus (flathead mullet)
 ORGANISM Mugil cephalus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Mugilomorpha;
 Mugilidae; Mugil.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 293)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 293)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES
 source 1..293
 /organism="Mugil cephalus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-OG12"
 /db_xref="taxon:48193"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>293
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg ccgcggttat acgagaggtc caagttgaca gccatcggcg caaagagtgg
 61 ttaagtgacc ccaatacaac taaagtcgaa cgcccccaag gccgttatac gtactcggag
 121 gtatgaagca cgactacgaa agtggcttta aaattcctga cccacgaaa gctgtgaaac
 181 aaactgggat tagatacccc actatgctca gccctaaact ttgatagtct agttacactc
 241 actatccgcc cgggtactac gagctttagc ttaaaaccca aaggacttgg cgg

ปลากราย (*Chitala ornata*)

LOCUS FJ792636 301 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Chitala ornata 12S ribosomal RNA gene, partial sequence;
 mitochondrial.
 ACCESSION FJ792636
 VERSION FJ792636.1 GI:225421140
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Chitala ornata
 ORGANISM Chitala ornata
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Osteoglossomorpha;
 Osteoglossiformes; Notopteridae; Chitala.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 301)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in
 Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 301)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart
 University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..301
 /organism="Chitala ornata"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-0G13"
 /db_xref="taxon:112145"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>301
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg cgcgggttaa acgagaggcc ctagttgata aaaccacggc gttaaagggtg
 61 gtttaaggaaa gcaaaacaaa ttaaagccaa atggcccttt ggccgtcata cgcttctagg
 121 tgtccgaagc ccaattatac gaaagtagct ttattaaagc ccacctgacc ccacgaaagc
 181 tgagaaacaa actgggatta gataccacac tatgctcagc cataaaccta gacatccaac
 241 tacaattaga cgtccgcccg ggtactacga gcattagctt gaaacccaaa ggacttggcg
 301 g

ปลาไนล (Oreochromis niloticus)

LOCUS FJ792637 289 bp DNA linear VRT 25-MAR-2009
 DEFINITION Oreochromis niloticus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial.
 ACCESSION FJ792637
 VERSION FJ792637.1 GI:225421141
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Oreochromis niloticus (Nile tilapia)
 ORGANISM Oreochromis niloticus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Labroidei; Cichlidae; African cichlids; Pseudocrenilabrinae; Tilapiini; Oreochromis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 289)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Development of molecular markers for pufferfish identifications in Thailand
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 289)
 AUTHORS Sangthong,P. and Ngernsiri,L.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-FEB-2009) Department of Genetics, Kasetsart University, Paholyothin Road, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..289
 /organism="Oreochromis niloticus"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="KUGEN_ECpf-0G14"
 /db_xref="taxon:8128"
 /country="Thailand"
 rRNA <1..>289
 /product="12S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 ttgccagccg cgcgggttat acgagaggct caagttgacg gacatcggcg taaagagtgg
 61 ttaggaagtc tttcaaaact aagccgaacg cctcagaac tgttatagct acccgagggt
 121 aagaagcccc cctacgaaag tggctttata tctccgaccc cacgaaagct gcgaaacaaa
 181 ctgggattag ataccccact atgccagcc ctaaactttg atagcccact acaccgcta
 241 tccgccggg tactacgagc actagcttaa aaccctaaagg acttggcgg

2. เครื่องหมาย Mul_ILS

เครื่องหมายโมเลกุล Mul_ILS อาศัยเทคนิค multiplex PCR สามารถระบุชนิดปลาปักเป้าได้ 3 ชนิดคือ *L. inermis* *L. lunaris* และ *L. spadiceus* โดยประกอบด้วย 6 ไพรเมอร์ ดังนี้

pfSR_FLI66	:	5'- CCGTGAGAATGCCCTACAATC
pfSR_RLI307	:	5'- CGACCTCAGTTTAAACGGGCTA
pfSR_FLL678	:	5'-CGTCAGGTCCAGGCGTAGCT
pfSR_RLL746	:	5'-AAATGTGCGTTTCAGCACAAGG
pfSR_FLS108	:	5'-GGTATCAGGCTCACCCGAC
pfSR_RLg246	:	5'-TCGTATAACCGCGGTGGCT

มีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. MgCl ₂ (25 mM)	1.00	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer pfSR_FLS108 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
5. Primer pfSR_RLg246 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
6. Primer pfSR_FLL678 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
7. Primer pfSR_RLL746 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
8. Primer pfSR_FLS108 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
9. Primer pfSR_RLg246 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
10. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
11. ultrapure H ₂ O	12.30	ไมโครลิตร
12. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

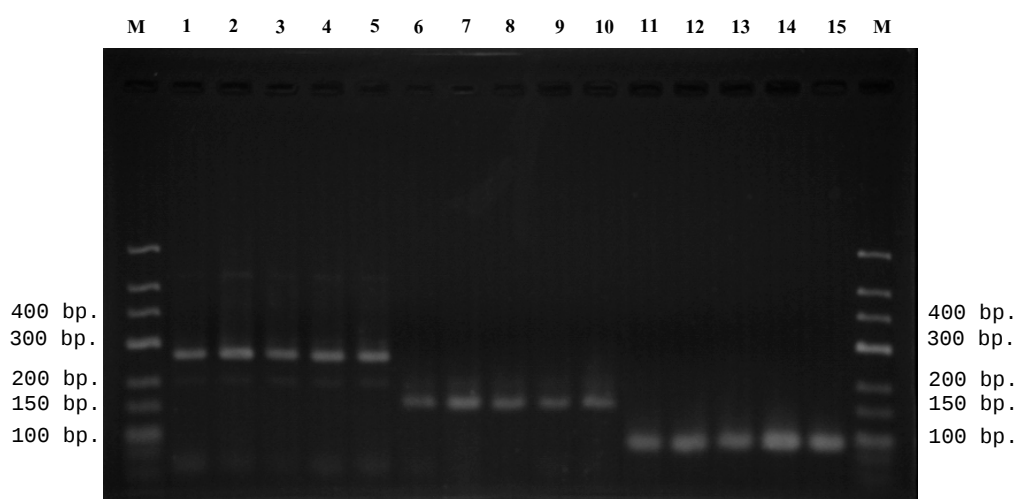
PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	}	35 รอบ
94°C	30 วินาที		
69°C	30 วินาที		
72°C	30 วินาที		
72°C	1 นาที		
4°C	forever		

ผลการเพิ่มปริมาณเครื่องหมายโมเลกุล Mul_ILS โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก *L. inermis* *L. spadicius* และ *L. lunaris* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จะให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดต่างๆ ดังนี้

<i>L. inermis</i>	ขนาด	260 คู่เบส
<i>L. spadicius</i>	ขนาด	160 คู่เบส
<i>L. lunaris</i>	ขนาด	100 คู่เบส

แถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้นเจล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ เครื่องหมายโมเลกุล Mul_ILS มี Total genomic DNA ของปลาปักเป้า *L. inermis* (ช่อง 1-5) *L. spadicius* (ช่อง 6-10) และ *L. lunaris* (ช่อง 11-15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 260 160 และ 100 คู่เบส ซึ่งจำเพาะต่อปลาแต่ละชนิดตามลำดับ

3. เครื่องหมาย pfSR_FLI66

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ระบุชนิดปลาปักเป้า *L. inermis* คือ คู่ไพรเมอร์ pfSR_FLI66 กับ pfSR_RLI307 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้

pfSR_FLI66 : 5'- CCGTGAGAATGCCCTACAATC
 pfSR_RLI307 : 5'- CGACCTCAGTTTAAACGGGCTA

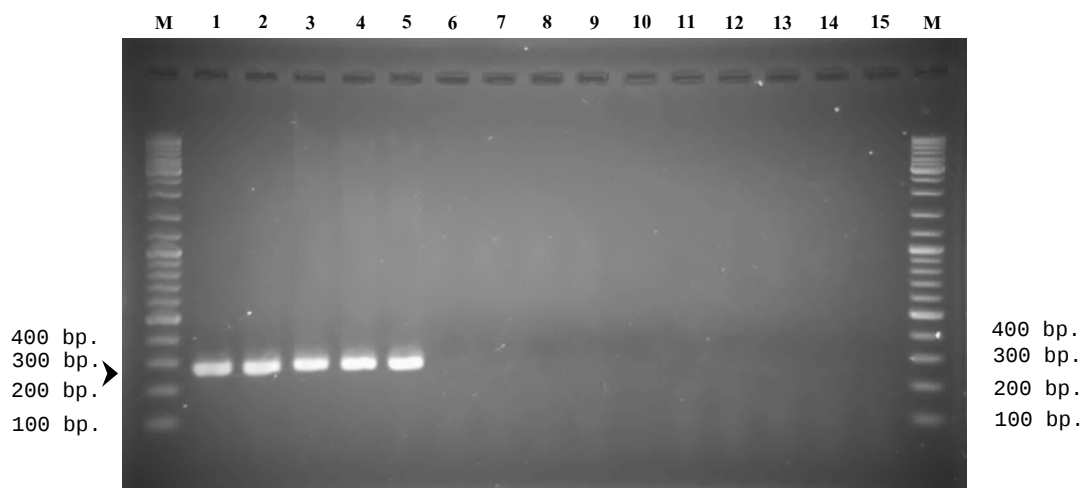
โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมাত্র 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. MgCl ₂ (25 mM)	1.00	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer pfSR_FLI66 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
5. Primer pfSR_RLI307 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
6. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
7. ultrapure H ₂ O	16.30	ไมโครลิตร
8. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

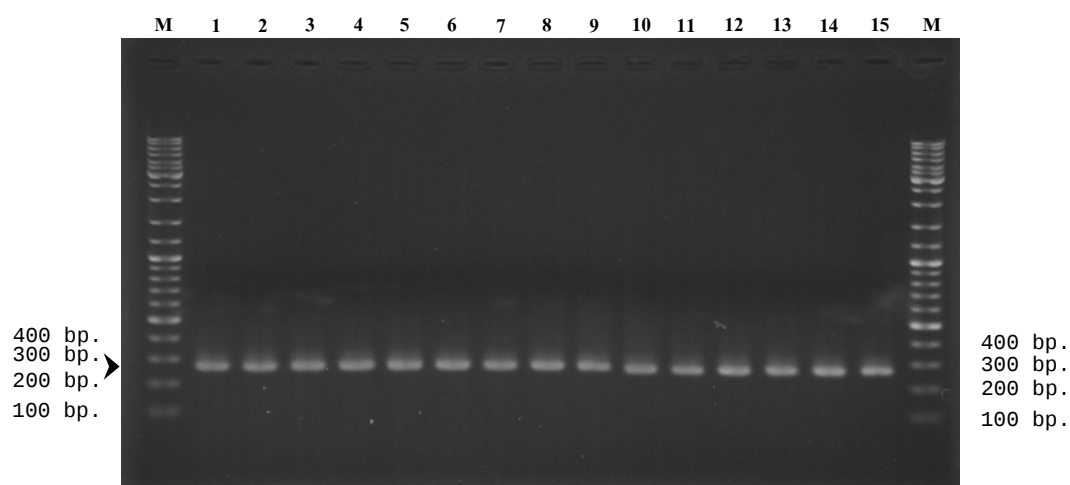
PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	} 35 รอบ
94°C	30 วินาที	
63°C	30 วินาที	
72°C	30 วินาที	
72°C	1 นาที	
4°C	forever	

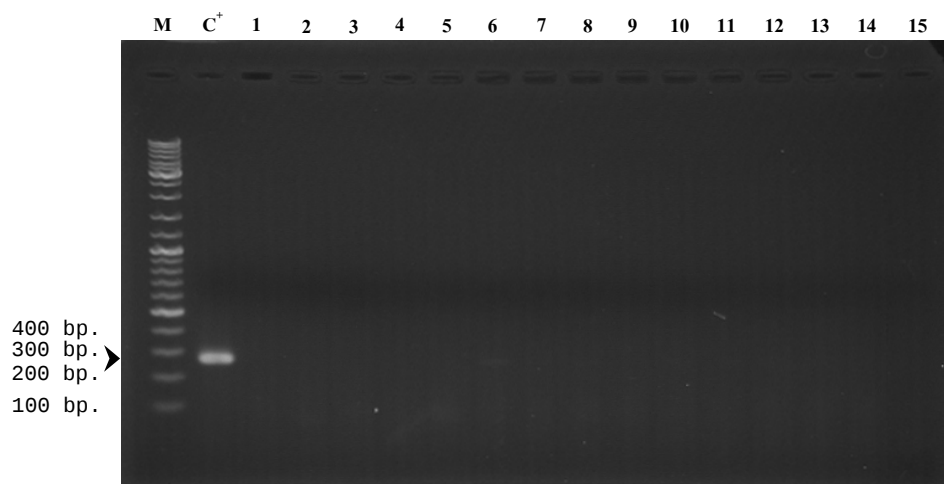
คู่ไพรเมอร์ pfSR_FLI66 กับ pfSR_RLI307 มีความจำเพาะกับปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 260 คู่เบส ซึ่งจะไม่ปรากฏในปลาอื่น (ภาพที่ 3 – 5)



ภาพที่ 3 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLI66 กับ pfSR_RLI307 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* (ช่องที่ 1 – 5) *L. lunaris* (ช่องที่ 6 – 10) และ *L. spadiceus* (ช่องที่ 11 – 15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ 1 kb DNA Ladder Mix (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) ลูกศร (►) แสดงตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 260 คู่เบส) เฉพาะช่อง 1-5



ภาพที่ 4 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLI66 กับ pfSR_RLI307 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* (ช่องที่ 1 – 15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ 1 kb DNA Ladder Mix (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) ลูกศร (►) แสดงตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 260 คู่เบส) ในตัวอย่างปลาทุกตัว



ภาพที่ 5 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLI66 กับ pfSR_RLI307 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าหรือปลาชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *L. inermis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ Total genomic DNA ของปลาปักเป้า *L. inermis* เป็น positive control (ช่อง C⁺) ใช้ 1 kb DNA Ladder Mix (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 260 คู่เบส) เฉพาะผลผลิตพีซีอาร์ของ positive control ที่ตำแหน่งลูกศร (➤)

4. เครื่องหมาย pfSR_FLL678

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ระบุชนิดปลาปักเป้า *L. lunaris* คือ คู่ไพรเมอร์ pfSR_FLL678 กับ pfSR_RLL746 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้

pfSR_FLL678 : 5'-CGTCAGGTCCAGGCGTAGCT
pfSR_RLL746 : 5'-AAATGTGCGTTTCAGCACAAGG

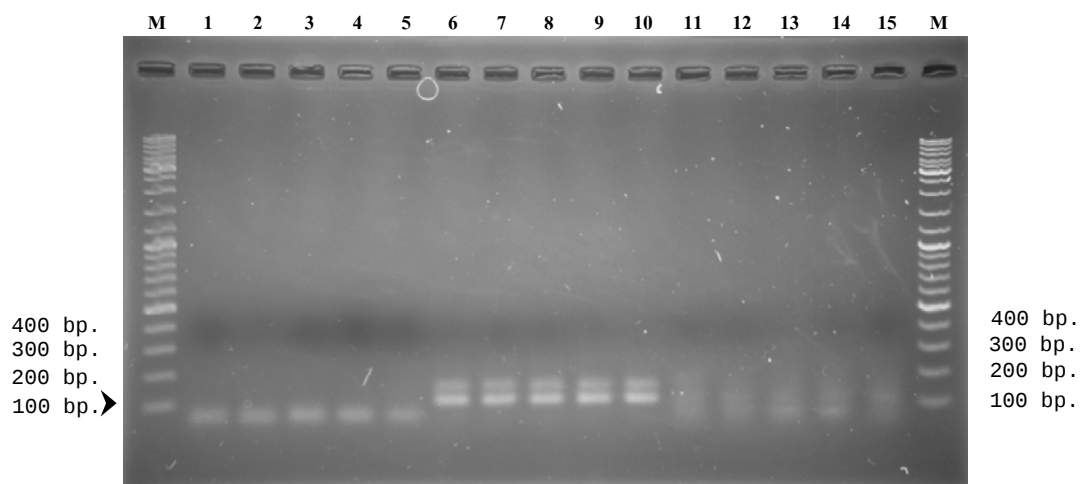
โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. MgCl ₂ (25 mM)	1.00	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer pfSR_FLL678 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
5. Primer pfSR_RLL746 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
6. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
7. ultrapure H ₂ O	16.30	ไมโครลิตร
8. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

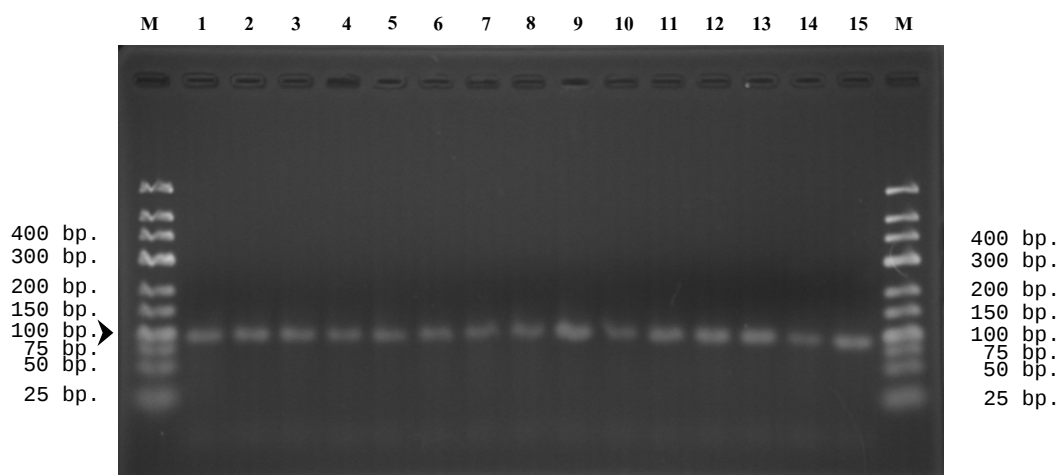
PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	} 35 รอบ
94°C	30 วินาที	
69°C	30 วินาที	
72°C	30 วินาที	
72°C	1 นาที	
4°C	forever	

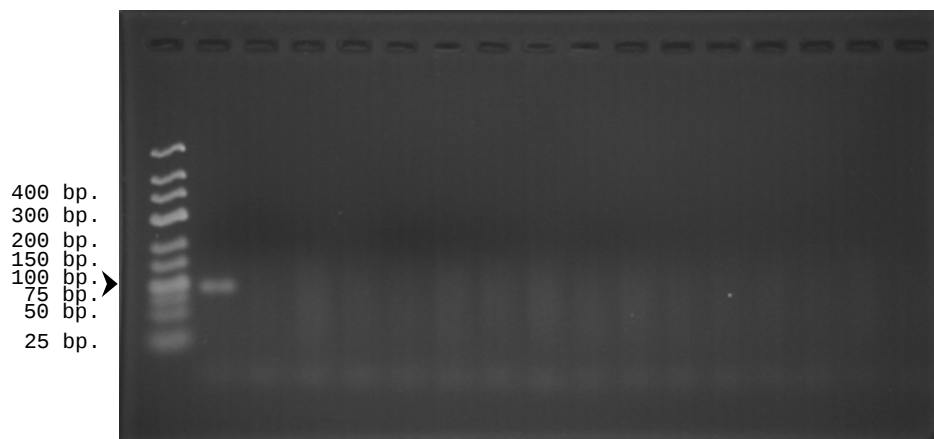
คู่ไพรเมอร์ pfSR_FLL678 กับ pfSR_RLL746 มีความจำเพาะกับปลาปักเป้าชนิด *L. lunaris* โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 100 คู่เบส ซึ่งจะไม่ปรากฏในปลาอื่น (ภาพที่ 6 – 8)



ภาพที่ 6 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLL678 กับ pfSR_RLL746 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* (ช่องที่ 1 – 5) *L. lunaris* (ช่องที่ 6 – 10) และ *L. spadiceus* (ช่องที่ 11 – 15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ 1 kb DNA Ladder Mix (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) ลูกศร (▶) แสดงตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 100 คู่เบส) เฉพาะช่อง 6 – 10



ภาพที่ 7 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLL678 กับ pfSR_RLL746 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าชนิด *L. lunaris* (ช่องที่ 1 – 15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) ลูกศร (▶) แสดงตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 100 คู่เบส) ในตัวอย่างปลาทุกตัว



ภาพที่ 8 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLL678 กับ pfSR_RLL746 มี Total genomic DNA ของปลาปักเป้าหรือปลาชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *L. lunaris* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ Total genomic DNA ของปลาปักเป้า *L. lunaris* เป็น positive control (ช่อง C⁺) ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 100 คู่เบส) เฉพาะผลผลิตพีซีอาร์ของ positive control ที่ตำแหน่งลูกศร (➤)

5. เครื่องหมาย pfSR_FLS108

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ระบุชนิดปลาปักเป้า *L. spadiceus* คือ คุ้ไพรเมอร์ pfSR_FLS108 กับ pfSR_RLg246 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ดังนี้

pfSR_FLS108 : 5'-GGTATCAGGCTCACCCCGAC

pfSR_RLg246 : 5'-TCGTATAACCGCGGTGGCT

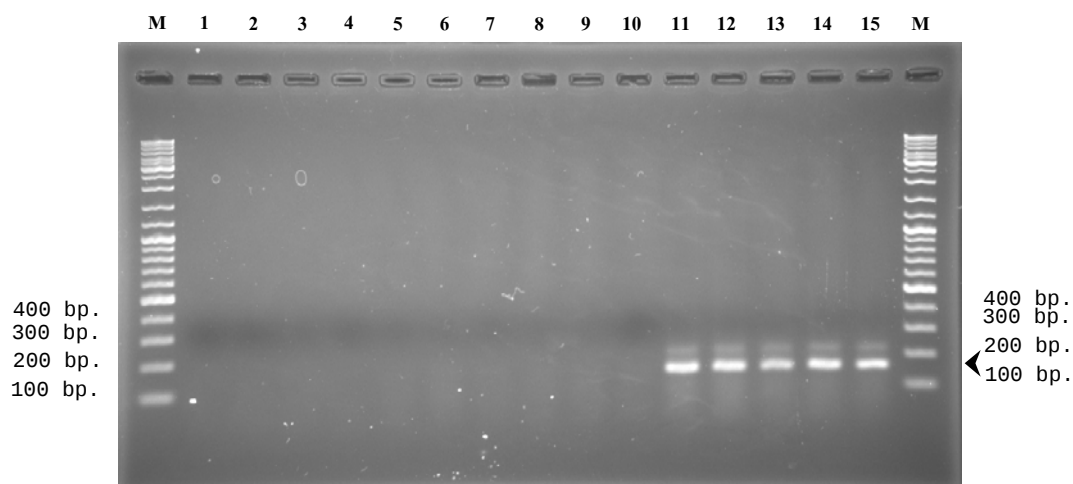
โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. MgCl ₂ (25 mM)	1.00	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer pfSR_FLS108 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
5. Primer pfSR_RLg246 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
6. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
7. ultrapure H ₂ O	16.30	ไมโครลิตร
8. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

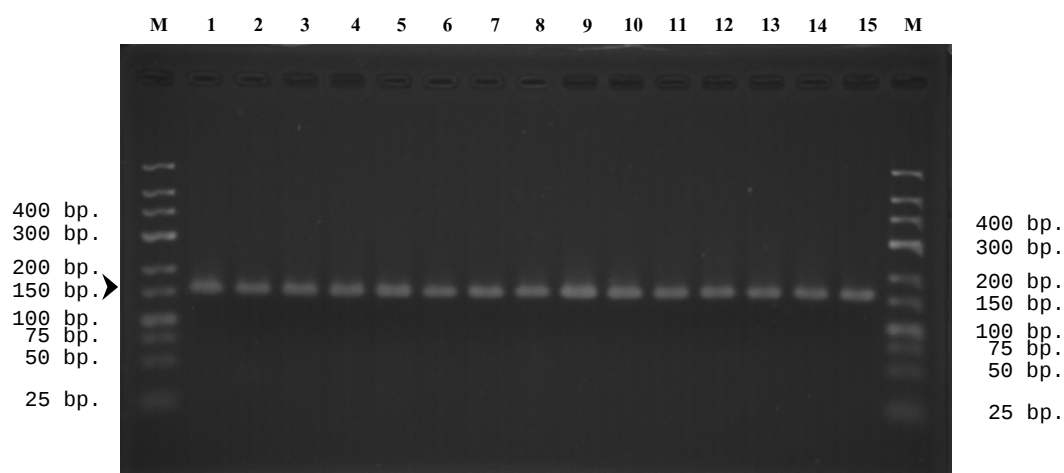
PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	} 35 รอบ
94°C	30 วินาที	
66°C	30 วินาที	
72°C	30 วินาที	
72°C	1 นาที	
4°C	forever	

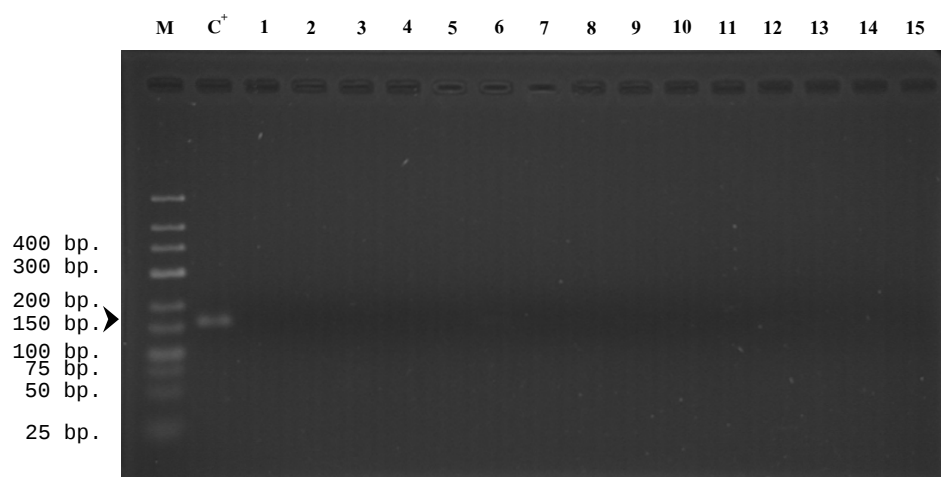
คุ้ไพรเมอร์ pfSR_FLS108 กับ pfSR_RLg246 มีความจำเพาะกับปลาปักเป้าชนิด *L. spadiceus* โดยให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 160 คู่เบส ซึ่งจะไม่ปรากฏในปลาอื่น (ภาพที่ 9-11)



ภาพที่ 9 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLS108 กับ pfSR_RLg246 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* (ช่องที่ 1 – 5) *L. lunaris* (ช่องที่ 6 – 10) และ *L. spadiceus* (ช่องที่ 11 – 15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ 1 kb DNA Ladder Mix (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) ลูกศร (▶) แสดงตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 160 คู่เบส) เฉพาะช่อง 11 – 15

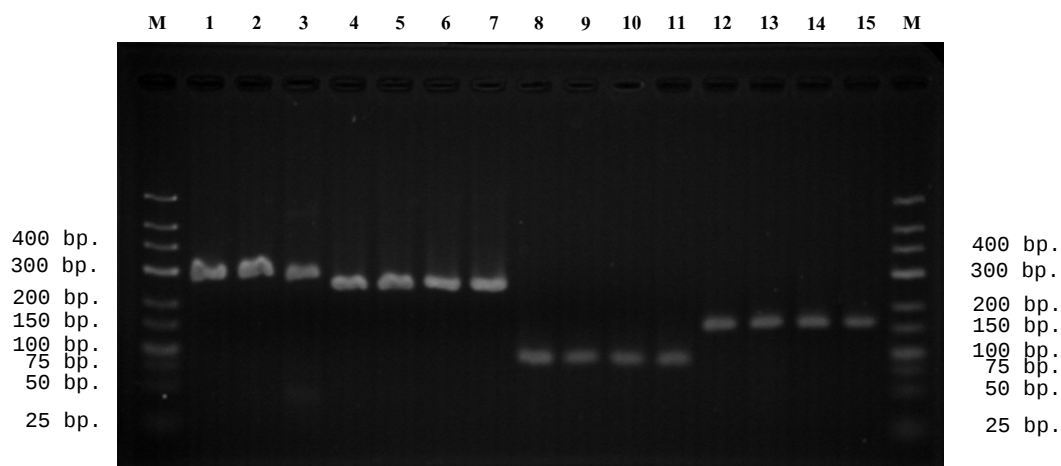


ภาพที่ 10 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLS108 กับ pfSR_RLg246 มี Total genomic DNA ของ ปลาปักเป้าชนิด *L. spadiceus* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) ลูกศร (▶) แสดงตำแหน่งของผลผลิตพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 160 คู่เบส) ในตัวอย่างปลาทุกตัว



ภาพที่ 11 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ pfSR_FLS108 กับ pfSR_RLg246 มี Total genomic DNA ของปลาปักเป้าหรือปลาชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *L. spadiceus* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และ Total genomic DNA ของปลาปักเป้า *L. spadiceus* เป็น positive control (ช่อง C⁺) ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (ขนาดประมาณ 160 คู่เบส) เฉพาะ ผลผลิตพีซีอาร์ของ positive control ที่ตำแหน่งลูกศร (➤)

ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากเครื่องหมายโมเลกุลลำดับที่ 1 ถึง 5 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ
แสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์คู่ต่างๆ คือ คู่ที่ 1 KU_sRUF1 - KU_sRUR1 (universal primer; ช่อง 1 – 3) คู่ที่ 2 pfSR_FLI66 - pfSR_RLI307 (*L. inermis* specific primer; ช่อง 4 – 7) คู่ที่ 3 pfSR_FLL678 - pfSR_RLL746 (*L. lunaris* specific primer; ช่อง 8 – 11) คู่ที่ 4 pfSR_FLS108 กับ pfSR_RLg246 (*L. spadiceus* specific primer; ช่อง 12 – 15) ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M)

6. เครื่องหมาย MulCB_TT

เครื่องหมายโมเลกุล MulCB_TT เป็นไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา Multiplex PCR ที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าสกุล *Tetraodon* และสามารถจำแนกปลาปักเป้าชนิด *T. nigroviridis* ออกจากชนิด *T. fluviatilis* และ *T. fangi* ได้ เครื่องหมายโมเลกุล MulCB_TT ประกอบด้วย 4 ไพรเมอร์ ดังนี้

KUpfCB_TFVF1 : 5'-TTCTTCATCTGCATTTACTTCC
 KUpfCB_TFVR1 : 5'-GGAAGATGAGGTGGACGATGGT
 KUpfCB_TNspF1 : 5'-TGCCCAGAGAACCACGAATG
 KUpfCB_TNspR1 : 5'-TAGTGTATTAATTATTGGTGGGT

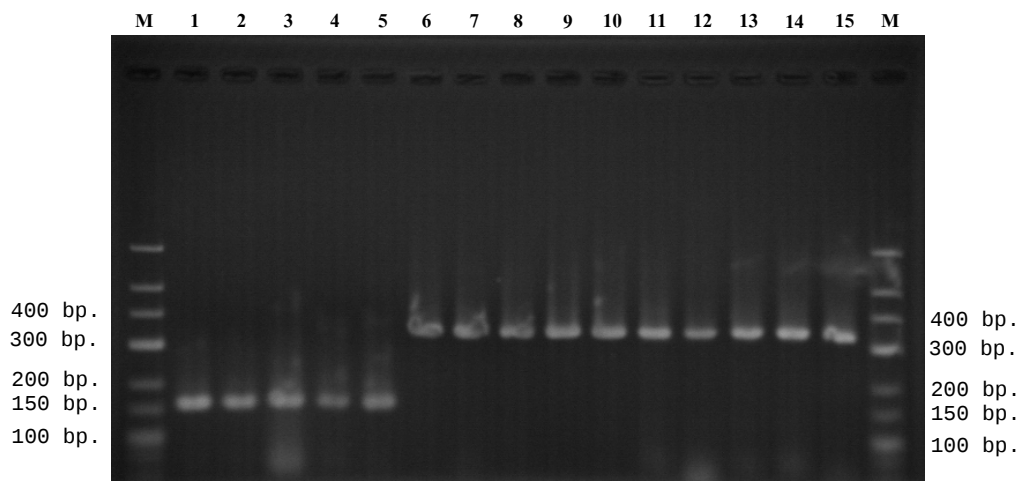
โดยมีองค์ประกอบในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตรเป็นดังนี้

1. Buffer (10X Taq buffer)	2.50	ไมโครลิตร
2. MgCl ₂ (25 mM)	1.00	ไมโครลิตร
3. dNTP (2.0 mM)	2.00	ไมโครลิตร
4. Primer KUpfCB_TFVF1 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
5. Primer KUpfCB_TFVR1 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
6. Primer KUpfCB_TNspF1 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
7. Primer KUpfCB_TNspR1 (10 pmol)	1.00	ไมโครลิตร
10. Taq (DNA polymerase)	0.20	ไมโครลิตร
11. ultrapure H ₂ O	14.30	ไมโครลิตร
12. DNA template	1.00	ไมโครลิตร (10-100 ng)

PCR cycling condition สำหรับกำหนดอุณหภูมิและเวลา

94°C	2 นาที	} 35 รอบ
94°C	30 วินาที	
57°C	30 วินาที	
72°C	30 วินาที	
72°C	1 นาที	
4°C	forever	

ผลการเพิ่มปริมาณเครื่องหมายโมเลกุล MulCB_TT โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก *T. nigroviridis* *T. fluviatilis* และ *T. fangi* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาพที่ 13) แสดงแถบดีเอ็นเอของ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก *T. nigroviridis* (150 คู่เบส) แตกต่างจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก *T. fluviatilis* และ *T. fangi* (350 คู่เบส) อย่างชัดเจน



ภาพที่ 13 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์เครื่องหมายโมเลกุล MulCB_TT มี Total genomic DNA ของปลาปักเป้า *T. nigroviridis* (ช่อง 1-5) *T. fluviatilis* (ช่อง 6-10) และ *T. fangi* (ช่อง 11-15) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M) พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 150 คู่เบสในช่องที่ 1-5 และ 350 คู่เบส ในช่องที่ 6-15

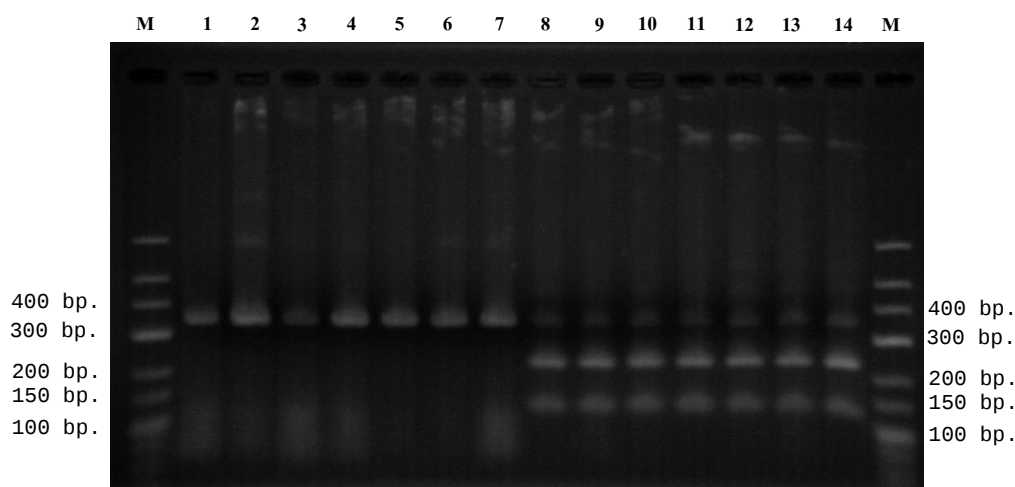
7. เครื่องหมาย TFV_BciVI

เครื่องหมายโมเลกุล TFV_BciVI เป็นเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BciVI* เพื่อจำแนก *T. fluviatilis* และ *T. fangi* ด้วยการตัดชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์จากเครื่องหมาย MulCB_TT ขนาดประมาณ 350 คู่เบส โดยเอนไซม์ *BciVI* จะตัดผลผลิตพีซีอาร์จาก *T. fangi* ออกเป็น 2 ชิ้นขนาด 220 และ 130 คู่เบส แต่ไม่ตัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก *T. fluviatilis*

องค์ประกอบในปฏิกิริยาการตัดชิ้นดีเอ็นเอของเอนไซม์ *BciVI* มีดังนี้

1. NEB4 Buffer	2	ไมโครลิตร
2. <i>BciVI</i>	2	unit
3. DNA template	10	ไมโครลิตร

บ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ผลการตัดตรวจสอบได้ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้นเจล 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงผลการตัดผลผลิตพีซีอาร์แบบ multiplex PCR จากชุดไพรเมอร์ MulCB_TT ด้วยเอนไซม์ *BciVI* โดยช่องที่ 1-7 และ 8-14 เป็นผลการตัดผลผลิตพีซีอาร์ของปลาปักเป้าชนิด *T. fluviatilis* และ *T. fangi* ตามลำดับโดยผลผลิตพีซีอาร์ในช่องที่ 1-7 ไม่ถูกตัดทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาดเดียวคือประมาณ 350 คู่เบส ส่วนช่อง 8-14 เกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลมาจากการตัดซึ่งจะมีขนาด 220 และ 130 คู่เบส

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเนื้อปลาหลายชนิดผสมกัน

ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์อาจมีปลาปักเป้าหรือปลาอื่นๆ ปนเปื้อนอยู่มากกว่า 1 ชนิด ผู้วิเคราะห์จะมีขั้นตอนการปฏิบัติและผลที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นดังตัวอย่างต่อไปนี้

เมื่อทดลองใช้เนื้อปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* *L. lunaris* *L. spadiceus* และ เนื้อปลาฉลาม (*C. melanopterus*) อย่างละ 20 มิลลิกรัม บดผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วสกัดดีเอ็นเอตามปกติ สารละลายดีเอ็นเอผสมที่ได้เรียกว่า LgMIX+OG10 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยวิธีพีซีอาร์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ขณะเดียวกันก็ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบจากปลาปักเป้าแต่ละชนิดไปพร้อมกันด้วย โดยมีเครื่องหมายที่ทดสอบมีดังนี้

1. เครื่องหมายที่จำเพาะกับสกุล *Lagocephalus* (Mul_ILS)
2. เครื่องหมายที่จำเพาะกับ *L. inermis* (pfSR_FLI66 - pfSR_RLI307)
3. เครื่องหมายที่จำเพาะกับ *L. lunaris* (pfSR_FLL678 - pfSR_RLL746)
4. เครื่องหมายที่จำเพาะกับ *L. spadiceus* (pfSR_FLS108 - pfSR_RLg246)

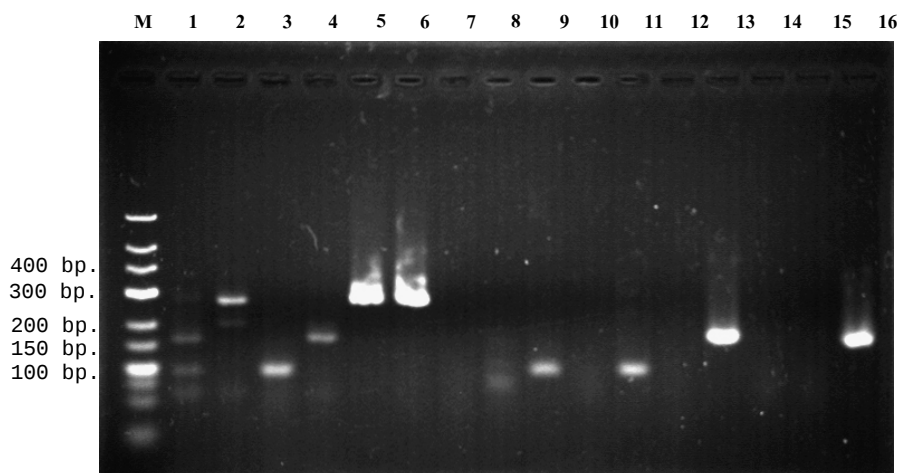
สถานะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นไปตามสถานะที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเครื่องหมาย แล้วตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (ภาพที่ 15) ซึ่งสรุปผลได้ดังนี้

1. เครื่องหมาย Mul_ILS

เมื่อใช้ LgMIX+OG10 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณเครื่องหมาย Mul_ILS จะได้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ (เห็นชัดเจน 2 แถบ) ในขณะที่การเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมายจำเพาะต่อปลาปักเป้าชนิดใดชนิดหนึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าชนิดนั้นๆ เพียงแถบเดียว และให้ผลเช่นเดียวกับใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของปลาปักเป้าแต่ละชนิดเป็นต้นแบบ

2. เครื่องหมายที่จำเพาะต่อ *L. inermis*, *L. lunaris* และ *L. spadiceus*

เมื่อใช้ LgMIX+OG10 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณเครื่องหมายที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าชนิดใดชนิดหนึ่ง พบว่า ให้ผลไม่แตกต่างจากใช้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากปลาแต่ละชนิดเป็นต้นแบบ



ภาพที่ 15 แสดงผลการเพิ่มปริมาณเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 1 5 9 13 มี LgMIX+OG10 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 2 6 10 14 มี *L. inermis* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 3 7 11 15 มี *L. lunaris* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

ช่องที่ 4 8 12 16 มี *L. sapdiceps* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

เครื่องหมายที่ทดสอบ

ช่องที่ 1 – 4 เครื่องหมาย Mul_ILS

ช่องที่ 5 – 8 เครื่องหมายจำเพาะกับ *L. inermis*

ช่องที่ 9 – 12 เครื่องหมายจำเพาะกับ *L. lunaris*

ช่องที่ 13- 16 เครื่องหมายจำเพาะกับ *L. sapdiceps*

สถานะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นไปตามสถานะที่เหมาะสมกับแต่ละเครื่องหมาย ใช้

DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M)

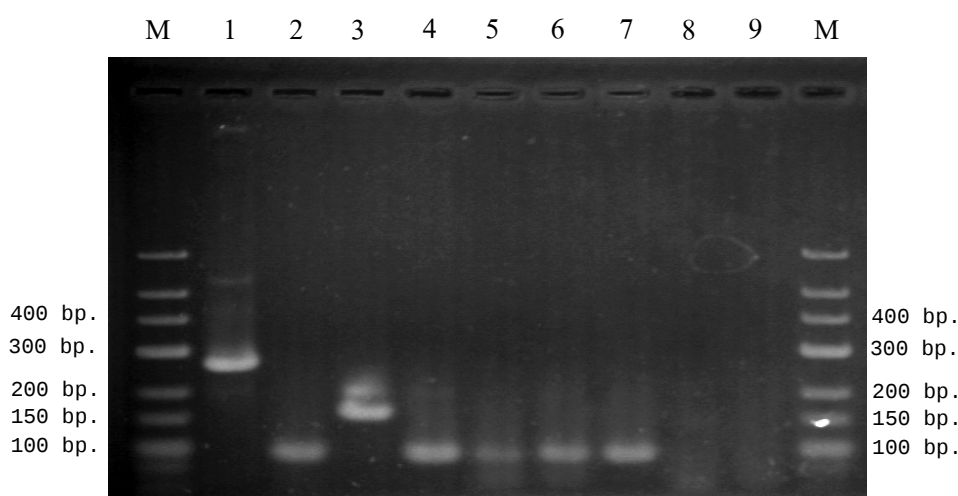
จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่า นอกจากเครื่องหมายโมเลกุล Mul_ILS จะสามารถระบุชนิดปลาปักเป้าจากดีเอ็นเอบริสุทธิ์ของปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* แต่ละชนิดแล้ว เครื่องหมายดังกล่าวยังสามารถให้ผลบวก (แถบดีเอ็นเอ) แม้ว่าตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะมีเนื้อปลาหลายๆ ชนิดผสมกันอยู่ (LgMIX+OG10)

ดังนั้นจากกรณีตัวอย่างดังกล่าวสรุปขั้นตอนการใช้งานเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อทดสอบปลาในสกุล *Lagocephalus* เป็นดังนี้

1. เบื้องต้นควรทดสอบด้วยเครื่องหมาย Mul_ILS ก่อน เนื่องจากสามารถระบุชนิดปลาได้หลายชนิดในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียง 1 ครั้ง
2. กรณีที่ Mul_ILS ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับปลาปักเป้าชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงแถบเดียว สามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างที่ทดสอบมีการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อจากปลาปักเป้าชนิดนั้นๆ
3. กรณีที่ Mul_ILS ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบให้สันนิษฐานว่าในตัวอย่างที่ทดสอบมีเนื้อเยื่อจากปลาปักเป้าสกุล *Lagocephalus* ปนเปื้อนอยู่มากกว่า 1 ชนิด ให้นำตัวอย่างนั้นทดสอบกับเครื่องหมายที่จำเพาะต่อปลาปักเป้าแต่ละชนิด
4. การมีเนื้อปลาปักเป้าผสมกันมากกว่า 1 ชนิด จะไม่มีผลต่อความจำเพาะของเครื่องหมายที่จำเพาะต่อชนิด *L. inermis* *L. lunaris* และ *L. spadiceus* แต่จะมีผลต่อเครื่องหมาย Mul_ILS
5. การมีเนื้อเยื่อปลาอื่นๆ (ในกรณีนี้คือปลาฉลาม) จะไม่มีผลต่อความจำเพาะของเครื่องหมายที่จำเพาะต่อ *L. inermis* *L. lunaris* และ *L. spadiceus*

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลกับดีเอ็นเอต้นแบบจากลูกชิ้นปลา

ลูกชิ้นที่มีเนื้อปลาชนิดต่างๆ ผสมอยู่ 6 รูปแบบ (ได้รับความอนุเคราะห์จากตัวแทนกรมประมง) ถูกนำมาบดจนละเอียดแล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis Technologies Sdn. Bhd, Malaysia) ดำเนินการตามคำแนะนำผู้ผลิต ใช้เนื้อลูกชิ้นหนัก 100 มิลลิกรัม หลักจากได้สารละลายดีเอ็นเอนำไปทดสอบกับเครื่องหมาย Mul_ILS โดยใช้ดีเอ็นเอจากปลาปักเป้าชนิด *L. inermis* *L. lunaris* และ *L. spadiceus* เป็นการทดลองควบคุม ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงผลการระบุชนิดของลูกชิ้นปลาโดยใช้เครื่องหมาย Mul_ILS ช่องที่ 1 2 และ 3 ใช้ดีเอ็นเอของ *L. inermis*, *L. lunaris* และ *L. spadiceus* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบตามลำดับ ช่อง 4 - 9 ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากลูกชิ้นปลาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ DNA Ladder Low Range (fermentas, Lithuania) เพื่อเปรียบเทียบขนาด (ช่อง M)

ผลการเพิ่มปริมาณเครื่องหมายโมเลกุลจากตัวอย่างลูกชิ้นจะเห็นว่าในช่องที่ 4-7 (ดีเอ็นเอสกัดจากลูกชิ้น) ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอในช่องที่ 2 ซึ่งมีดีเอ็นเอจาก *L. lunaris* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในขณะที่ช่องที่ 8 และ 9 (ดีเอ็นเอที่สกัดจากลูกชิ้น) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใดๆ เลย ดังนั้นสรุปได้ว่า ดีเอ็นเอจากลูกชิ้นหมายเลข 1 - 4 มีเนื้อปลาปักเป้าชนิด *L. lunaris*ปนเปื้อนอยู่

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2549. สรุปข่าวที่เกี่ยวข้องกับกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เดือน
กุมภาพันธ์ 2549. แหล่งที่มา: [http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/secretary/dmscnews/
news%202549/FEB06.DOC](http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/secretary/dmscnews/news%202549/FEB06.DOC). 9 กรกฎาคม 2550.
- ประดิษฐ์ แสงทอง และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2553. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการ "การพัฒนา
เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการจำแนกปลาปักเป้าในประเทศไทย". RDG5020081,
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 108 น.
- ประกาศ จาเชิดชูไทย. 2528. อนุกรมวิธานของปลาปักเป้าที่พบในน่านน้ำไทย. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สมาคมการประมงแห่งประเทศไทย. 2549. ปลาปักเป้า. แหล่งที่มา:
<http://www.oae.go.th/statistic/yearbook47>. 9 กรกฎาคม 2550.
- สมิง เก้าเจริญ. 2545. พืชจากปลาปักเป้า. จุลสารพิษวิทยา 10 (4): 39-41.
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2546. อย. เตือนผู้บริโภค ผู้นำอาหาร ระวังปลาปักเป้า
(ปลาเนื้อไก่) เป็นพิษ. แหล่งที่มา: [http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/
pukpao/pukpao1.htm](http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/pukpao/pukpao1.htm). 10 กรกฎาคม 2550.
- Elmerot, C., U. Arnason, T. Gojobori and A. Janke. 2002. The mitochondrial genome of the
pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. **Gene** 295: 163-172.
- Le, T.H., N.V. De, D. Blair, P. Sithithaworn and D.P. McManus. 2006. *Clonorchis sinensis* and
Opisthorchis viverrini: Development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their
identification and discrimination. **Exp. Parasitology** 112: 109-114.
- Song, L., B. Liu, J. Xiang and P.-Y. Qian. 2001. Molecular phylogeny and species identification
of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). **Marine
Biotechnol.** 3: 398-406.
- Yue, G. H., L. C. Lo, Z. Y. Zhu, G. L and F. Feng. 2006. The complete nucleotide sequence of
the mitochondrial genome of *Tetraodon nigroviridis*. **DNA Seq.** 17: 115-121.