

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีน 70

ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาอุกผสม

(*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)

EFFECT OF RFID TAG IMPLANTATION ON HEAT SHOCK PROTEIN 70

GENE EXPRESSION IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) AND

HYBRID CATFISH (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)



ศพ.

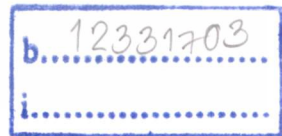
จน 431๗

๒๕๕๔

เลขท...

เลขทะเบียน... 117030

วันเดือนปี... 21 ส.ค. 2554



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2011-AG-M-101-088

**EFFECT OF RFID TAG IMPLANTATION ON HEAT SHOCK PROTEIN 70
GENE EXPRESSION IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) AND
HYBRID CATFISH (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2011

KMITL-2011-AG-M-101-088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2011

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน
ฮีสซ็อกโปรตีน 70 ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และ
ปลาอุกอุกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)

นักศึกษา นางสาวณิชนันท์ ทินปราณี

รหัสประจำตัว 50065851

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

พ.ศ. 2554

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ. ดร. ปวีณา ทวีกิจการ

ดร. ชัยชนะ มิตรพันธ์

บทคัดย่อ

การฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (RFID Tag) ในปลา มีประโยชน์ในการศึกษาคุณสมบัติของปลา
รายตัวเพื่อการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงสายพันธุ์ และการตรวจสอบย้อนกลับ โดยแท็กที่นำมาฝังใน
ปลานิลและปลาอุกอุกผสมนั้น ทำการผลิตในประเทศไทยเพื่อช่วยลดการนำเข้าแท็กจาก
ต่างประเทศที่มีราคาแพง การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กมีผลทำให้ปลาเกิดความเครียดทางสรีรวิทยา อัน
เนื่องมาจากการจับปลาและการฝังแท็ก ปลาจะเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนฮีสซ็อกโปรตีนเพื่อ
ตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการฝัง
อาร์เอฟไอดีแท็กต่อความเครียดของปลานิลและปลาอุกอุกผสม โดยการวัดการแสดงออกของยีน
ฮีสซ็อกโปรตีน 70 (*hsp70*) เพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสมในการฝังแท็ก โดยทำการศึกษาผลที่เกิดจาก
ตำแหน่งของการฝังแท็กในปลา การใช้ยาสลบกับปลาก่อนการฝัง การให้ออกซิเจนหรือโอโซนใน
น้ำ และอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาหลังการฝังแท็ก และใช้เทคนิค RT-PCR ในการศึกษาการ
แสดงออกของยีน *hsp70* จากการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* บางส่วนของปลานิลและปลาอุกอุกผสม
ด้วยเทคนิค PCR เชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR เข้ากับเวกเตอร์สำหรับการโคลนผลิตภัณฑ์ PCR และนำมา
ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีน *hsp70* ของปลานิลมีความ
คล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลานิลสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รายงานไว้ในธนาคาร
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปเผยแพร่โดยไม่ขออนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยื่นถึง 98-99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับกรดอะมิโนที่ได้ของปลาอุกอุกผสมมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลาสายพันธุ์อื่นๆ 96-97 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าจำนวนรอบที่มีความเหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR คือ 30 รอบ เนื่องจากระดับของการแสดงออกของยีน *hsp70* มีค่าปานกลาง จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษาในปลานิล ในขณะที่พบการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไตของปลาอุกอุกผสม เมื่อพิจารณาในด้านของจริยธรรม จึงเลือกเนื้อเยื่อเหงือกสำหรับนำมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ของปลาทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นหลังจากการจับปลาและการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเป็นเวลา 30 นาที แต่ระดับการแสดงออกจะลดลงหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงการตอบสนองต่อความเครียดในระยะสั้นในปลาทั้ง 2 ชนิด จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง พบว่า มีการแสดงออกของยีน *hsp70* เพิ่มขึ้นในปลาทั้ง 2 ชนิดหลังจากฝังแท็ก 30 นาที และลดลงจนอยู่ในระดับปกติหลังจากฝังแท็ก 24 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาผลของการใช้ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรกับปลาก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก พบว่าการแสดงออกของยีน *hsp70* มีระดับเท่ากันในปลาที่ฝังแท็กหลังการใช้และไม่ใช้ยาสลบ ดังนั้น ควรจะให้ยาสลบกับปลาก่อนทำการฝังแท็ก ซึ่งจะลดความตื่นตระหนกในปลา จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และเลี้ยงในน้ำที่มีการให้ออกซิเจนหรือโอโซน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ของระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในทั้ง 2 สถานะ ดังนั้น ควรเลี้ยงปลาหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยให้ออกซิเจนเนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาไม่แพง และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงปลาที่ทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก พบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35 องศาเซลเซียส) มีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ (28-30 องศาเซลเซียส) หลังการฝังแท็กที่เวลา 30 นาที 12 และ 24 ชั่วโมง และพบว่าปลาอุกอุกผสมทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยกว่าปลานิล เนื่องจากตายหลังเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น ควรเลี้ยงปลาหลังจากการฝังแท็กที่อุณหภูมิปกติ เนื่องจากที่อุณหภูมิปกติ ปลาที่ฝังแท็กจะสามารถปรับตัวต่อความเครียดได้ง่ายกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง

Thesis Title Effect of RFID Tag Implantation on Heat Shock Protein 70 Gene Expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)

Student Miss Nichanan Tinpranee

Student ID 50065851

Program Agricultural Biotechnology

Year 2011

Thesis Advisor Assist. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

Thesis Coadvisor Assist. Prof. Dr. Praveena Taveekijakarn
Dr. Chaichana Mitrpant

ABSTRACT

RFID Tag implantation in fish is useful for studying individual characteristic for the propagation, strain improvement and traceability. To minimize the import of expensive Tag, the RFID Tag manufactured in Thailand was used for implantation in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*). Implantation of RFID Tag affects the physiological stress from handling and implantation process. The stress response was expressed by increasing the pattern of heat shock transcriptional level. This thesis aims to study the effect of RFID Tag implantation on fish stress by monitoring the expression level of heat shock protein 70 (*hsp70*) gene in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) in order to find a suitable technique for RFID Tag implantation. The effects of position for implantation, of using an anesthesia, of adding either oxygen or ozone in water and of temperature for feeding were investigated in this study. RT-PCR was used in order to determine the expression of the *hsp70*. First, the partial *hsp70* genes of Nile tilapia and Hybrid Catfish were amplified by PCR, ligated to the TA-cloning vector and submitted for DNA sequencing. Results revealed that the partial amino acid sequence of

Nile tilapia Hsp70 showed 98-99% similarity to other Nile tilapia species reported in the Genbank and for the Hybrid Catfish Hsp70 it showed 96-97% similarity to several genera of fish. The RT-PCR reaction was optimized and revealed that the optimal number of cycles for PCR was 30 cycles due to the presence of moderate *hsp70* cDNA. Expression of Nile tilapia *hsp70* was detected in all tissues studied whereas that of Hybrid Catfish was found only in gill, liver and kidney tissues. Because of the ethics perspective, gill tissue was chosen for monitoring the *hsp70* expression in all further experiments. In addition, the *hsp70* gene expression of both fishes was increased after 30 minutes of fish handling and RFID Tag implantation, but decreased after 24 hours of implantation, representing the short-term stress response in both fishes. The expression of *hsp70* after RFID Tag implantation at abdomen and muscle under the dorsal fin position was increased in both fishes after 30 minutes of implantation and decreased to a normal level after 24 hours compared with the control group. Using 100 mg/L of anesthesia MS222 before implantation gave the same *hsp70* expression level as implantation without using MS222. Thus, using an anesthesia could be used for the RFID Tag implantation to reduce animal frightening. Similar *hsp70* expression level was demonstrated from both implanted RFID Tag proceeded by cultivation in water adding either oxygen or ozone. Since no significant difference ($p > 0.05$) in expression level of both fishes was found between adding oxygen and ozone, oxygen was preferably used because it is more affordable and accessible. Finally, the effect of temperature for feeding RFID Tag implanted fish was studied and results showed that higher *hsp70* expression level was found in both fishes fed at high temperature (35°C) than fed at a normal temperature ($28-30^{\circ}\text{C}$) after 0.5, 12 and 24 hours of implantation. Hybrid Catfish showed less tolerance to high temperature than Nile tilapia because it died after feeding at high temperature for 24 hours. It was, therefore, suggested that feeding of the implanted fishes should be done at a normal temperature probably due to that in a normal temperature the implanted fish can more easily adapt to the stress than fed at high temperature.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พุกฤษ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา ทวีกิจการ และดร.ชัยชนะ มิตรพันธ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และอาจารย์ดุสิต เอื้ออำนวย ที่คอยให้คำปรึกษา และจัดเตรียมระบบทดลองให้ลุล่วงไปด้วยดี

กราบขอบพระคุณ กรรมการสอบ โครงร่างและรูปเล่มวิทยานิพนธ์ และคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรทุกท่านที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์พร้อมแนะนำเทคนิควิธีค้นคว้าในการทดลองที่เป็นประโยชน์อย่างมาก

ขอขอบพระคุณ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ สำหรับคำแนะนำ และความอนุเคราะห์ไพโรเมอร์สำหรับการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง และสาขาวิชาชีววิทยา ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกและคำแนะนำต่างๆ ในการใช้อุปกรณ์ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอขอบคุณพี่ชาย พี่สาว และหลานๆ ที่ให้คำปรึกษา ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจที่สำคัญแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ TG-44-22-51-083M โปรแกรมเทคโนโลยีระดับทักษะด้วยคลื่นวิทยุ ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (NT-B-22-FR-23-50-07) ทุนศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2553 จากบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ณิชนันทน์ ทินปราณี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XV
สารบัญภาพ.....	XVI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ในการศึกษา.....	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษา.....	3
1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ความสำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	5
2.1.1 ปลานิล.....	7
2.1.2 ปลาดุก.....	7
2.2 การใช้เครื่องหมายติดตามตัวในสัตว์น้ำ.....	8
2.2.1 แท็กที่ติดภายใน.....	8
2.2.2 แท็กที่ติดภายนอก.....	9
2.2.3 อิเล็กทรอนิกส์แท็ก.....	9
2.3 เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีแท็ก.....	10
2.3.1 องค์ประกอบของระบบอาร์เอฟไอดี.....	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.1.1 แท็ก (tag) หรือ ทรานสปอนเดอร์ (transponder).....	10
2.3.1.1 พาสซีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก.....	11
2.3.1.2 แอ็กทีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก.....	11
2.3.2.2 เครื่องอ่าน.....	11
2.3.2.3 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (software).....	12
2.3.2 หลักการทำงานเบื้องต้นของระบบอาร์เอฟไอดี.....	13
2.4 การนำอาร์เอฟไอดีแท็กมาใช้ในสัตว์น้ำ.....	13
2.5 การตอบสนองต่อความเครียดในสัตว์น้ำ.....	14
2.5.1 ปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียด.....	15
2.5.2 การตอบสนองต่อความเครียดของระบบสรีรวิทยา.....	15
2.5.2.1 การตอบสนองต่อความเครียดเบื้องต้น.....	15
2.5.2.2 การตอบสนองต่อความเครียดขั้นที่สอง.....	16
2.5.2.3 การตอบสนองต่อความเครียดขั้นที่สาม.....	17
2.5.3 การตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์.....	17
2.5.3.1 หน้าที่ของ heat shock proteins.....	17
2.5.3.2 ชนิดของ heat shock proteins.....	18
2.5.3.3 การตอบสนองต่อความเครียดของ heat shock proteins.....	19
2.6 ผลของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด (stressor) ต่อการแสดงออกของยีน ฮีตช็อกโปรตีน 70 ในปลา.....	20
2.7 เทคนิคทางโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
2.7.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction).....	22
2.7.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบย้อนกลับ (reverse transcription- polymerase chain reaction; RT-PCR).....	23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.3	เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis).....	24
2.7.4	DNA cloning.....	25
2.7.5	การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation).....	26
2.7.6	DNA sequencing.....	27
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1	สัตว์ทดลอง.....	29
3.2	เชื้อจุลินทรีย์.....	29
3.3	สารเคมี.....	29
3.3.1	อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.3.2	ยาปฏิชีวนะ.....	29
3.3.3	เอนไซม์.....	30
3.3.4	ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	30
3.3.5	เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ.....	30
3.3.6	ชุดทดสอบ.....	31
3.4	อุปกรณ์.....	31
3.5	สถานที่ทำการวิจัย.....	32
3.6	วิธีการศึกษา.....	32
3.6.1	การเพาะเลี้ยงปลา.....	32
3.6.2	การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ใน ปลานิลและปลาดุกกลมผสม.....	33
3.6.2.1	การออกแบบไพรเมอร์.....	33
3.6.2.2	การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ.....	34
3.6.2.3	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ด้วย ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR).....	35
3.6.2.5 การสกัด total RNA.....	36
3.6.2.6 การเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).....	37
3.6.2.7 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i>	39
3.6.2.7.1 การทำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ให้ บริสุทธิ์.....	39
3.6.2.7.2 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR เข้ากับ เวกเตอร์ (ligation).....	39
3.6.2.7.3 การเตรียม Competent Cell และการ ทรานสฟอร์มเมชัน.....	39
3.6.2.7.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	40
3.6.2.7.5 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	41
3.6.2.7.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR.....	41
3.6.2.8 การศึกษาสถานะที่เหมาะสม (จำนวนรอบ) ของ การเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR.....	42
3.6.2.9 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในเนื้อเยื่อที่ แตกต่างกัน.....	42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.3 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของ ยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาอุกผสมที่ระยะเวลาต่างๆ.....	43
3.6.4 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ทที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาอุกผสม.....	44
3.6.5 การศึกษาผลของการใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาอุกผสม	45
3.6.6 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของ ยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาอุกผสมโดยการเลี้ยงปลาที่ฝัง อาร์เอฟไอดีเท็ทในบ่อที่ให้ออกซิเจน หรือโอโซนตลอดเวลา	45
3.6.7 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออก ของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาอุกผสม โดยการเลี้ยงปลา ที่ฝังอาร์เอฟไอดีเท็ทที่อุณหภูมิต่างกัน.....	46
3.6.8 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	47
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	48
4.1 ผลการศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและ ปลาอุกผสม.....	48
4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาอุกผสม.....	48
4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ของปลานิลและ ปลาอุกผสมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)...	50
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA.....	50
4.1.4 ผลการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR.....	51
4.1.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาอุกผสม.....	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.5.1 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i> เข้ากับพลาสมิด pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย <i>E. coli</i> DH5α.....	53
4.1.5.2 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	54
4.1.5.3 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	55
4.1.5.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i>	57
4.1.6 ผลการศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR.....	62
4.1.7 ผลการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน.....	64
4.1.7.1 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันของปลานิล.....	64
4.1.7.2 ผลการแสดงผลแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันของปลาดุกลูกผสม.....	65
4.2 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	67
4.2.1 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ที่ระยะเวลาต่างๆ ในปลานิล.....	67
4.2.2 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ที่ระยะเวลาต่างๆ ในปลาดุกลูกผสม.....	69
4.3 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i>	71

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.1 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิล.....	71
4.3.2 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลาตุ๊กตาส้ม.....	74
4.4 ผลของการใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i>	76
4.4.1 ผลของการใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิล.....	76
4.4.2 ผลของการใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลาตุ๊กตาส้ม.....	79
4.5 ผลของฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่สภาวะต่างกัน.....	82
4.5.1 ผลของอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่สภาวะต่างกันในปลานิล....	82
4.5.2 ผลการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่สภาวะต่างกัน ในปลาตุ๊กตาส้ม.....	84
4.6 ผลการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่างกัน.....	87
4.6.1 ผลของอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่อุณหภูมิต่างกัน ในปลานิล.....	87
4.6.2 ผลการศึกษาผลของอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน ในปลาตุ๊กตาส้ม.....	90

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจัยผลลัพธ์การทดลอง.....	93
5.1 การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและ ปลาดุกลูกผสม.....	93
5.1.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i> ของปลานิลและปลาดุกลูกผสม.....	93
5.1.2 การศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการทำ RT-PCR ในการ แสดงออกของยีน <i>hsp70</i>	94
5.1.3 ผลศึกษาการแสดงออกของยีนเบื้องต้นในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน	95
5.2 การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิล ปลาดุกที่เวลาต่างๆ.....	96
5.3 การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาดุกลูกผสม.....	98
5.4 การใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิลและปลาดุกลูกผสม.....	100
5.5 ผลของฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการ เลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่สภาวะต่างกัน ในปลานิลและ ปลาดุกลูกผสม.....	102
5.6 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน <i>hsp70</i> โดยการ เลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน ในปลานิลและปลาดุกลูกผสม.....	104
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	106
บรรณานุกรม.....	108
ภาคผนวก	115
ภาคผนวก ก.....	116
ภาคผนวก ข.....	118

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค.....	119
ภาคผนวก ง.....	121
ประวัติผู้เขียน.....	131



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	น้ำหนักโมเลกุลและหน้าที่ของ heat shock proteins (HSPs)..... 18
3.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และ β -actin..... 34
3.2	ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และยีน β -actin ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR..... 36
3.3	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และยีน β -actin ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR..... 36
3.4	ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR..... 38
3.5	สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>hsp70</i> และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR 38
3.6	ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> 41
4.1	ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>hsp70</i> จากผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิด pG.nile และ pRT.nile เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastX..... 61
4.2	ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>hsp70</i> จากผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิด pG.catfish และ pRT.catfish เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastX..... 61

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ปริมาณสัตว์น้ำจืดจากการเพาะเลี้ยง จำแนกตามชนิดสัตว์น้ำระหว่าง ปี พ.ศ. 2530-2549.....	6
2.2	มูลค่าการซื้อ-ขายสัตว์น้ำจืด (หน่วย : ล้านบาท) พ.ศ. 2550-2554 เป็นค่าการทำนาย.....	6
2.3	ตำแหน่งและรูปแบบการติดภายนอกตัวสัตว์น้ำ.....	9
2.4	โครงสร้างภายในของแท่งประกอบด้วยสายอากาศและไมโครชิป.....	11
2.5	ลักษณะของพาสซีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก (ก) และแอ็คทีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก (ข)...	11
2.6	เครื่องอ่านอาร์เอฟไอดีแท็ก.....	12
2.7	โปรแกรมบริหารจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบอาร์เอฟไอดีแท็ก.....	12
2.8	หลักการทางานของอาร์เอฟไอดีแท็ก.....	13
2.9	ระบบพืชเทคโนโลยี.....	14
2.10	การตอบสนองต่อความเครียดของปลาในระบบนิเวศน์โคครายน์และเอ็นโคครายน์.....	16
2.11	การถอดรหัสของยีน <i>hsp70</i> ที่ถูกชักนำจากสิ่งทีกระตุ้นให้เกิดความเครียด.....	19
2.12	หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction).....	23
2.13	หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ.....	24
2.14	หลักการ cloning.....	26
2.15	เทคนิคของ Sanger ในการตรวจลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ.....	28
3.1	ปลานิล (ก) และปลาดุกลูกผสม (ข) ที่ใช้ในการทดลอง.....	29
3.2	ตำแหน่งการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลานิล (ก) และปลาดุกลูกผสม (ข).....	44
4.1	จีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาดุกลูกผสมจากการวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	49
4.2	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> และ β -actin เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาดุกลูกผสมเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.3	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i> และ β -actin เมื่อใช้ total RNA ของปลานิล และปลาดุกลูกผสมเป็นแม่แบบในการทำ RT-PCR.....	52
4.4	พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม.....	55
4.5	การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	56
4.6	การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	57
4.7	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิด pG.nile และ pRT-nile กรอบสี่เหลี่ยมสีเทาแสดงถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ HSP70F และ HSP70R.....	59
4.8	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิด pG.catfish และ pRT-catfish กรอบสี่เหลี่ยมสีเทาแสดงถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ HSP70F และ HSP70R.....	60
4.9	ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>hsp70</i> ในปลานิล (ก) และ ปลาดุกลูกผสม (ข).....	62
4.10	ค่า log จากการเพิ่มปริมาณของยีน <i>hsp70</i> ของปฏิกิริยา RT-PCR ในปลานิล และปลาดุกลูกผสม ที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ.....	63
4.11	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อของปลานิล	64
4.12	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อของ ปลานิล โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	65
4.13	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ ของปลาดุก ลูกผสม.....	66
4.14	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อของ ปลาดุกลูกผสม โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.15	ผลิตรหัส PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในปลานิลกลุ่มควบคุมและปลานิลหลังการฝัง อาร์เอฟไอดีแท็ก..... 68
4.16	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลกลุ่มควบคุมและหลังจากฝัง อาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)..... 69
4.17	ผลิตรหัส PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในปลาอุกกลุ่มควบคุมและหลังการฝัง อาร์เอฟไอดีแท็ก..... 70
4.18	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาอุกกลุ่มควบคุมและหลังจาก ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดง ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)..... 71
4.19	ผลิตรหัส PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ไม่ได้ฝัง และฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ตำแหน่งต่างๆ..... 72
4.20	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและ ปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง และกล้ามเนื้อใต้โคนครีบ หลัง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดง ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)..... 73
4.21	ผลิตรหัส PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาอุกกลุ่มที่ไม่ได้ฝัง และฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ที่ตำแหน่งต่างๆ..... 75

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.22	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาอุกอุกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้กับปลาอุกอุกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังเป็นเวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง และที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังหลังจากการฝัง ที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	76
4.23	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ และปลานิลที่ใส่และไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท้.....	78
4.24	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้กับปลานิลที่ใส่ยาสลบและไม่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท้ หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	79
4.25	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วย เทคนิค RT-PCR ในปลาอุกอุกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ และปลานิลที่ใส่และไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท้.....	80
4.26	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาอุกอุกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้กับปลาอุกอุกผสมที่ใส่ยาสลบและไม่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท้ หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	81
4.27	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วย เทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ และปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้โอโซน.....	83
4.28	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ที่เลี้ยงในบ่อโดยให้ออกซิเจนและ โอโซน หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.29	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและ ปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้โอโซน	86
4.30	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเลี้ยง ในบ่อ โดยให้ออกซิเจนและ โอโซน หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	87
4.31	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ ปกติ และอุณหภูมิสูง.....	88
4.32	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เลี้ยงใน อุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) และปลานิลที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35 °C) หลังจาก การฝังที่เวลา 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	89
4.33	ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>hsp70</i> (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่ อุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิสูง.....	91
4.34	อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) และปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35 °C) หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมงโดยตัวอักษรที่แสดง ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$).....	92
5.1	ตำแหน่งการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้องในปลานิล.....	99
5.2	ตำแหน่งที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้องในปลาดุกลูกผสม.....	99

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำถือว่าเป็นธุรกิจหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจกันอย่างแพร่หลาย และมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง โดยมีปัจจัยสนับสนุนหลายประการ ได้แก่ สภาพแวดล้อม และการถูกทำลายของแหล่งน้ำทำให้การจับสัตว์น้ำตามธรรมชาติมีความไม่แน่นอนและมีแนวโน้มลดลง ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีที่ทันสมัยมายกระดับกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่างๆ และเกิดองค์ความรู้ใหม่ในการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สัตว์น้ำให้มีความหลากหลายมากขึ้น นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใหม่ที่สามารรถใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะประเทศในกลุ่มแอฟริกา ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการขยายตัวและมีการแข่งขันกันมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาไนล์ จากข้อมูลของ FAO ได้รายงานไว้ว่า ในปี ค.ศ. 2003 ประเทศไทยติดอันดับ 1 ใน 5 ของประเทศที่มีการผลิตปลาไนล์มากที่สุดในโลก โดยมีปริมาณการผลิตถึง 97,000 ตันต่อปี รองลงมาคือปลาดุก ซึ่งมีปริมาณการผลิต 86,475 ตันต่อปี ปัจจุบันหน่วยงานภาครัฐได้มียุทธศาสตร์ส่งเสริมการผลิตเพื่อให้มีผลผลิตสนับสนุนการส่งออก อย่างไรก็ตามตลาดส่งออกของไทยต้องเผชิญกับการแข่งขันอย่างรุนแรงเพื่อแย่งชิงส่วนแบ่งการตลาด ซึ่งมีประเทศจีนเป็นผู้ครอบครองตลาดส่วนใหญ่ เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำที่ต่ำกว่า สำหรับตลาดนำเข้าสินค้าสัตว์น้ำที่สำคัญของโลก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และสหภาพยุโรป ซึ่งประเทศต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีมาตรฐานการคุ้มครองผู้บริโภคสูงทำให้ประเทศไทยจำเป็นต้องมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงให้ได้สัตว์น้ำคุณภาพและมีคุณสมบัติตรงตามเงื่อนไขของประเทศผู้นำเข้า ภายใต้การผลิตที่มีต้นทุนต่ำ

การจัดการพ่อแม่พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ เพื่อการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ให้สูงขึ้น และเพียงพอต่อความต้องการของตลาดโลก รวมทั้งมีมาตรฐานการผลิตที่สามารถสอบย้อนได้ทุกขั้นตอนการผลิต การปรับปรุงพันธุ์ในสัตว์น้ำและการวิจัยทางเกี่ยวกับปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำนั้น จำเป็นต้องได้ข้อมูลการเติบโตแบบรายตัว ในขณะที่การดำเนินกิจกรรมดังกล่าวจำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการแยกเลี้ยงจำนวน

มากทำให้เป็นอุปสรรคในการดูแลจัดการ ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจต่อการแก้ปัญหาดังกล่าวคือการทำเครื่องหมายหรือเรียกว่าการฝังแท็กในสัตว์น้ำ (tagging)

แท็กที่ติดกับสัตว์น้ำสามารถแบ่งเป็น 3 ชนิดคือ แท็กภายนอก (external tag) เป็นแท็กที่ฝังภายนอกตัวสัตว์น้ำ สามารถมองเห็นได้ชัดเจน ตรวจสอบได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะในการตรวจสอบ มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์และชนิดสัตว์ที่ฝังแท็ก แต่มีข้อเสียคือหลุดหายง่ายและบริเวณที่ฝังแท็กจะมีแผลติดเชื้อและหายใจ (Davenport *et al.*, 1999) ชนิดที่สอง แท็กภายใน (internal tag) เป็นแท็กที่ฝังเข้าไปภายในร่างกายของสัตว์น้ำ อาจเป็นพลาสติกขนาดเล็กที่มีรหัส สามารถฝังบริเวณด้านหลังของตา หรือเป็นสีที่ฉีดเข้าไปภายในตัวสัตว์น้ำ แท็กชนิดนี้ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะในการตรวจสอบเช่นกัน และชนิดที่สามอิเล็กทรอนิกส์แท็ก (electronics tag) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแท็กที่ฝังภายในตัวสัตว์น้ำโดยการผ่าแล้วฝังเข้าไป หรือการฉีดเข้าไปในร่างกาย ซึ่งต้องมีเครื่องอ่านเฉพาะในการตรวจสอบ โดยเฉพาะอิเล็กทรอนิกส์แท็กที่ใช้ติดตามรายตัวในสัตว์น้ำนิยมใช้สัญญาณคลื่นวิทยุความถี่ต่ำ เนื่องจากมีขนาดเล็กและราคาไม่แพงมาก

สำหรับการติดเครื่องหมายแบบอาร์เอฟไอดี (radio frequency identification; RFID) ซึ่งเป็นอิเล็กทรอนิกส์แท็ก เป็นเทคโนโลยีระบุวัตถุและส่งผ่านข้อมูลด้วยคลื่นความถี่วิทยุ ตัวแท็กมีขนาดเล็ก ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ ประเทศไทยสามารถผลิตอาร์เอฟไอดีแท็กได้เองและมีราคาต่ำกว่าแท็กที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ติดตามสัตว์น้ำรายตัวเพื่อการปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างยิ่ง หากแต่ยังขาดข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับผลกระทบต่อสัตว์น้ำในด้านต่างๆ ดังนั้นเพื่อสนับสนุนให้มีการใช้เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีที่ผลิตในประเทศไทยอย่างแพร่หลาย จึงจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลเบื้องต้นต่างๆ ที่สำคัญนั่นคือ ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อความเครียดในสัตว์น้ำ

การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กอาจส่งผลให้ปลาเกิดความเครียดทางด้านสรีรวิทยา (physiological stress) การจับปลาและการฝังแท็กเข้าที่ตำแหน่งต่างๆ น่าจะเป็นตัวชักนำให้ปลาเกิดความเครียดและมีการตอบสนองต่อความเครียดเกิดขึ้น การตอบสนองต่อความเครียดของปลานั้นสามารถแสดงออกได้หลายวิธี เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับคอร์ติซอล ระดับน้ำตาลในเลือด และการแสดงออกของฮีตช็อกโปรตีน (heat shock proteins; HSPs) HSPs เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่คงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำงานได้ตามปกติ เมื่อสัตว์น้ำเกิดความเครียดจะทำให้เซลล์สังเคราะห์

HSPs ในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อคงสภาพเซลล์และปกป้องเซลล์จากการทำลายของความเครียด และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HSPs มีหลายชนิด เช่น Hsp100-110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 และ small Hsp เป็นต้น ซึ่ง Hsp70 เป็นโปรตีนที่ช่วยในการม้วนพับโมเลกุลของโปรตีน ช่วยปรับสมดุลที่เกิดจากความร้อน และช่วยรักษาสภาพโปรตีนที่เคลื่อนไปยังไม่โตคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ หลังจากกระบวนการถอดรหัส (post-transcriptional process) และเป็นโปรตีนชนิดที่นิยมใช้ในการศึกษาสถานะความเครียดในสัตว์ หลายชนิด รวมทั้งสัตว์น้ำด้วย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีต่อการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีน 70 (*hsp70*) ในปลานิลและปลาดุกลูกผสม ซึ่งเป็นตัวแทนของปลาที่มีเกลือปกคลุมและไม่มีเกลือปกคลุม ตามลำดับ โดยปลาทั้งสองชนิดล้วนมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเข้าที่ตำแหน่งต่างๆ กันอาจส่งผลให้ปลาเกิดความเครียดทางด้านสรีรวิทยา เมื่อปลาเกิดความเครียดจะทำให้มีการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีนเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าของฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีนจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ซึ่งเทคนิคที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด อันจะเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการฟาร์มพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำ รวมทั้งประโยชน์ในการตรวจสอบย้อนกลับต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลานิลและปลาดุกลูกผสม โดยการติดตามระดับการแสดงออกของยีนฮีตช็อกโปรตีน

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

ปลานิลจากเคเอ็มไอทีแอลฟิชเทคฟาร์ม (KMITL'S FISH TECH FARM) และปลาดุกลูกผสมจากศูนย์ปรับปรุงพันธุกรรมน้ำจืด บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) นำมาแยกเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร ที่เคเอ็มไอทีแอลฟิชเทคฟาร์ม ทำการศึกษารอบต้นของการแสดงออกของยีน *hsp70* ได้แก่ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการทำ RT-PCR และศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน จากนั้นนำปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาฝังอาร์เอฟไอดีแท็กภายใต้การปรับสภาวะและการเลี้ยงปลาที่ต่างกัน ได้แก่ ตำแหน่งการฝัง การใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฝัง การเลี้ยงด้วยออกซิเจนและโอโซน และการเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติและอุณหภูมิสูง ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยทำการสกัด total RNA ออกมา แล้วทำการเปลี่ยน total RNA เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

reverse transcriptase แล้วนำ cDNA ไปทำปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติของปริมาณการแสดงออกของยีน *hsp70* ของแต่ละสภาวะ เพื่อให้ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและเทคนิคการเลี้ยงปลาหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลานิลและปลาดุกลูกผสม

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน

ใช้ระยะเวลารวมทั้งสิ้น 1 ปี 6 เดือน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ทราบถึงการแสดงออกเบื้องต้นของยีน *hsp70* ของปลานิลและปลาดุกลูกผสม
- 1.5.2 ทราบถึงเทคนิคที่เหมาะสมในการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กของปลานิลและปลาดุกลูกผสม
- 1.5.3 ทราบถึงเทคนิคการเลี้ยงหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กของปลานิลและปลาดุกลูกผสม

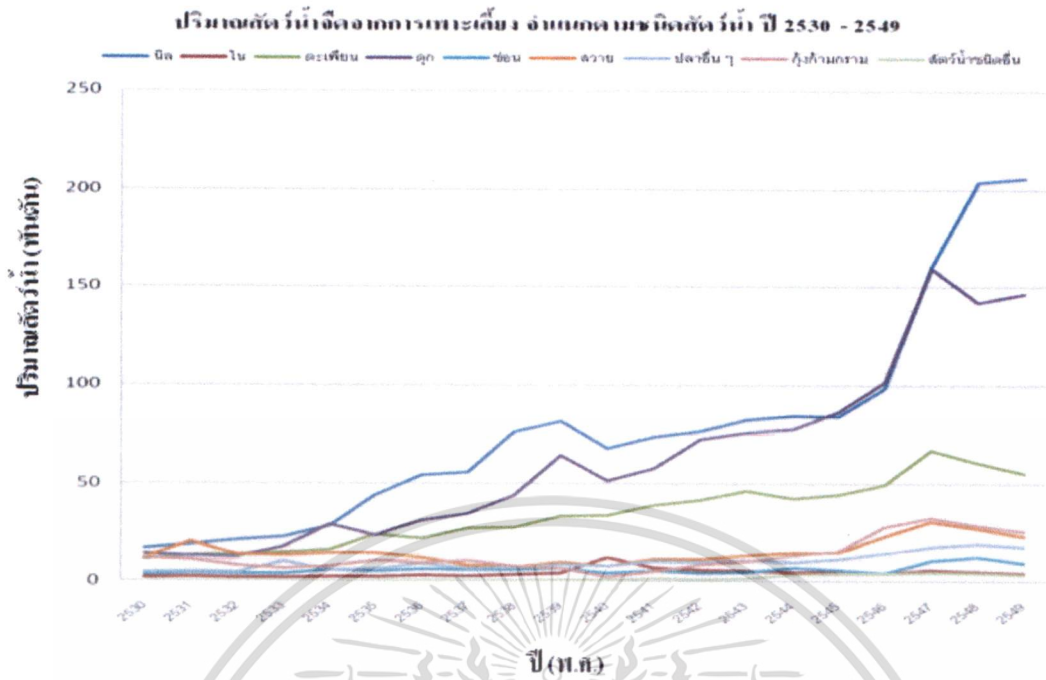
บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

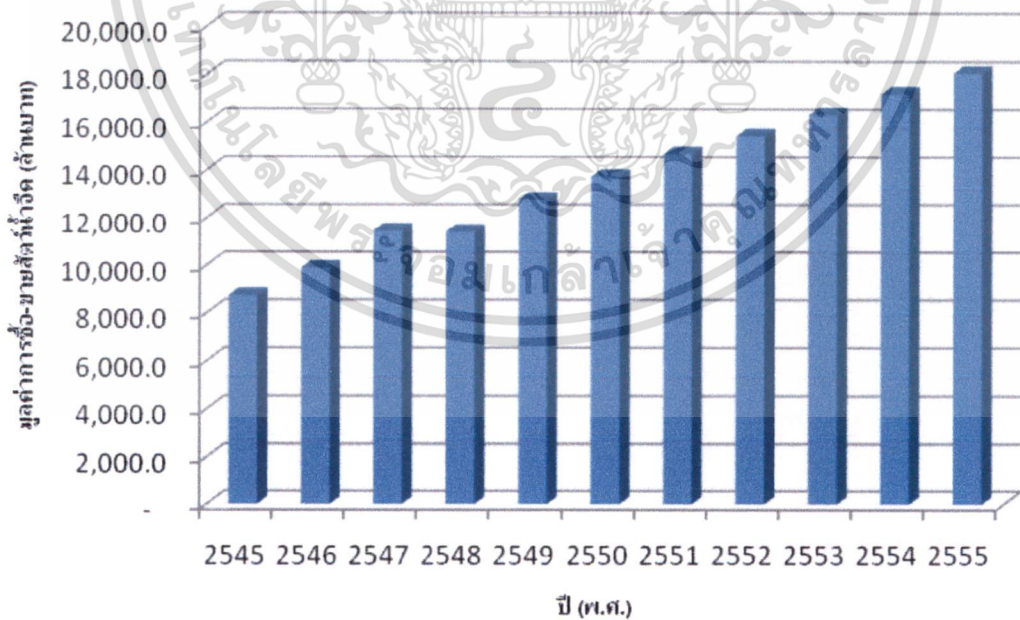
ปัจจุบันพบว่าผลผลิตสัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดและสัตว์ทะเลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ผลผลิตการประมงหรือที่จับจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและทะเลมีทิศทางที่ไม่แน่นอน ผลผลิตจากการประมงจะได้รับผลกระทบจากการเพิ่มขึ้นของประชากร การบุกรุกพื้นที่ธรรมชาติ การปล่อยน้ำเสียลงสู่แหล่งน้ำลำคลองและได้ไหลลงสู่ทะเลในที่สุด รวมถึงการทำประมงเกินศักยภาพการผลิตของแหล่งน้ำ (over fishing) เมื่อพิจารณาจากพื้นที่ผิวโลกที่ประกอบด้วยส่วนพื้นดินประมาณ 29.2 เปอร์เซ็นต์ พื้นน้ำอีกประมาณ 70.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สัดส่วนพื้นน้ำที่เป็นน้ำเค็มต่อน้ำจืดเท่ากับ 97.2 ต่อ 2.9 และพบว่าส่วนน้ำจืดนั้นมีธารน้ำแข็งมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำที่ใช้การเกษตรและในชีวิตประจำวัน รวมทั้งจากห้วยหนองคลองบึงต่างๆ มีประมาณ 0.04 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ทำให้ต้องใช้น้ำและพื้นที่เพื่อกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อสนับสนุนการบริโภคของประชากรโลกที่นับวันเพิ่มสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาผลผลิตสัตว์น้ำในประเทศไทย พบว่าปริมาณสัตว์น้ำจืดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะหลังจากปี พ.ศ. 2546 พบว่าปลานิลและปลาดุกมีผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากปลาทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวแล้ว พบว่ากุ้งก้ามกรามก็เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2.1) โดยว่ามีประชากรกว่าสองล้านคนที่มีหน้าที่และบทบาทสำคัญในการผลิตสัตว์น้ำให้แก่คนทั้งประเทศรวมทั้งส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศภายใต้มีมูลค่าการซื้อ-ขายกว่า 14,000 ล้านบาท (ภาพที่ 2.2) (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2549)



ภาพที่ 2.1 ปริมาณสัตว์น้ำจืดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยจำแนกตามชนิดสัตว์น้ำระหว่าง ปี พ.ศ. 2530-2549

ที่มา : กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง (2549)



ภาพที่ 2.2 มูลค่าการค้าซื้อ-ขายสัตว์น้ำจืด (หน่วย: ล้านบาท) พ.ศ. 2550-2554 เป็นค่าการทำนาย

ที่มา : กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ปลานิล

ปลานิล (Nile Tilapia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus* เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งของไทยที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 เป็นต้นมาจนกระทั่งถึงปัจจุบัน ปลานิลถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะ เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทรงจัดส่งเข้ามาทอดเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว ครั้งนั้นได้โปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงปลานิลในบ่อสวนจิตรลดา ซึ่งเป็นหนึ่งในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา ผลการทดลองปรากฏว่าปลานิลที่ทรงโปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงได้เติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี จากคุณสมบัติของปลานิล ซึ่งเลี้ยงง่าย โตเร็ว และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ทำให้เกษตรกรหันมานิยมเลี้ยงปลานิลอย่างกว้างขวาง จากข้อมูลของ FAO รายงานว่าในปี ค.ศ. 2003 ไทยอยู่ในอันดับ 4 ของประเทศที่มีการผลิตปลานิลมากที่สุดในโลก โดยประเทศที่มีการผลิตปลานิลมากที่สุดประกอบด้วยจีน อียิปต์ ฟิลิปปินส์ ไทย และอินโดนีเซีย ซึ่งมีปริมาณผลิตดังนี้ 806,000, 200,000, 111,000, 97,000 และ 72,000 ตันต่อปี ตามลำดับ พบว่าปริมาณการผลิตของปลานิลทั่วโลกได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

อย่างไรก็ตาม การเจาะขยายตลาดส่งออกปลานิลนั้นต้องเผชิญกับการแข่งขันอย่างรุนแรงเพื่อแย่งชิงส่วนแบ่งการตลาด เนื่องจากตลาดนำเข้าสินค้าปลาสำคัญของโลกไม่ว่าจะเป็นสหรัฐอเมริกาหรือสหภาพยุโรปนั้นจีนเข้าไปครอบครองตลาดส่วนใหญ่ไว้ได้ รวมทั้งในอนาคตผู้ส่งออกปลานิลของไทยยังต้องเผชิญกับคู่แข่งที่มาแรง โดยเฉพาะประเทศต่างๆ ในทวีปอเมริกาและอเมริกาใต้ ซึ่งมีการลงทุนขยายการเลี้ยงปลานิลมากขึ้น โดยมีเป้าหมายที่จะส่งออกไปยังสหรัฐฯและสหภาพยุโรปเช่นเดียวกัน (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2550)

2.1.2 ปลาดุก

ปลาดุก (Walking catfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Clarias* sp. พบการแพร่กระจายพันธุ์ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อยตามแหล่งน้ำของทวีปเอเชียและแอฟริกา ปลาดุกเป็นปลาไม่มีเกล็ด ลำตัวยาว มีหัวที่แบนและแข็ง มีหนวดยาวแปดเส้น มีครีบหลังและครีบกันยาวเกินครึ่งของความยาวลำตัว จุดเริ่มต้นของครีบหลังอยู่ลำหน้าจุดเริ่มต้นของครีบท้อง ครีบหลังไม่มีเงี่ยงแข็ง ไม่มีครีบไขมัน ครีบหางมนกลม ครีบทั้งหมดเป็นอิสระจากกัน สามารถหายใจและสืบคลานบนบกได้เมื่อถึงฤดูแล้ง เป็นปลาวางไข่ เป็นปลากินเนื้อ โดยเฉพาะเมื่อตัวโตเต็มที่ ชอบกินปลาอื่นที่ตัวเล็กกว่าเป็นอาหาร

รวมถึงกินซากพืชและซากสัตว์อีกด้วย และเป็นปลาที่รู้จักกันดีในแง่ของการเป็นปลาเศรษฐกิจ ที่นิยมบริโภคกัน โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย

สำหรับปลากลุ่ม Catfish นั้นมีประเทศไทยมีปริมาณการผลิตประมาณ 86,475 ตัน หรือ คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตทั้งหมดในประเทศไทย โดยเฉพาะปลาดุกอุกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ซึ่งนิยมเลี้ยงเพราะ โตเร็ว แต่เนื่องจากผลผลิตต่อหน่วยในปัจจุบันลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากคุณภาพของพ่อแม่พันธุ์ปลา African catfish ซึ่งเข้ามาในไทยมาเป็นเวลานานแล้ว (FAO, 2005)

ปัจจุบันพบว่าสายพันธุ์ปลาดุกที่เลี้ยงด้วยคุณภาพไปจากเดิมมาก เพราะยังขาดการพัฒนาสายพันธุ์และมีการใช้ปลาพ่อแม่พันธุ์ที่มาจากครอบครัวเดียวกันหรือในฟาร์มเดียว เพื่อการผลิตลูกพันธุ์ ปรากฏการดังกล่าวพบในกึ่งก้ามกรามด้วยเช่นกัน ซึ่งเพาะพันธุ์ดังกล่าวในหลายๆ รุ่นแล้วจะส่งผลกระทบต่ออัตราการเติบโตที่ช้า (นิตยสารธุรกิจสัตว์น้ำ, 2551)

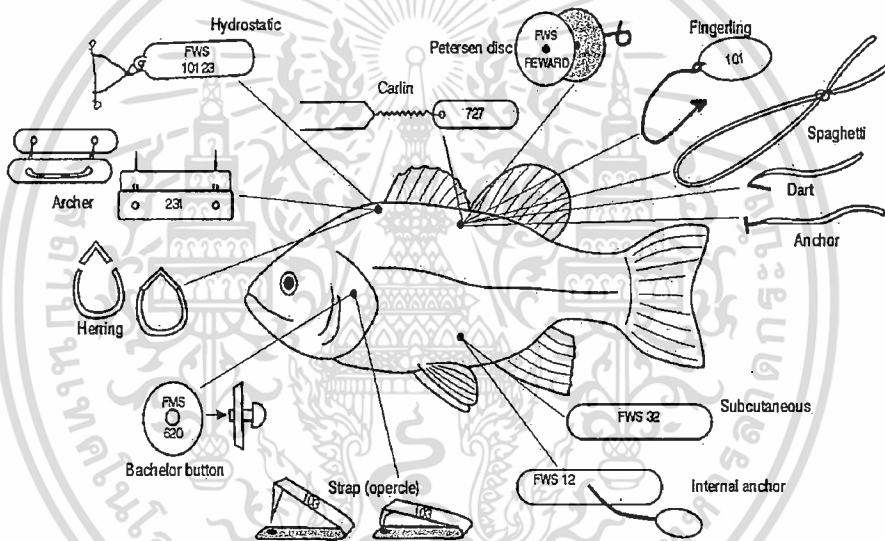
2.2 การใช้เครื่องหมายติดตามตัวในสัตว์น้ำ

การใช้เครื่องหมายติดตามตัวหรือการติดแท็กในสัตว์น้ำ มีหลายชนิดและหลายวิธี ทั้งการติดเบอร์ การติดแท็กภายนอกสัตว์น้ำ การติดแท็กภายในตัวสัตว์น้ำ ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำและวัตถุประสงค์ของนักวิจัยเป็นหลัก โดยชนิดของแท็กที่ใช้ติดตามรายตัวในสัตว์น้ำ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.2.1 แท็กที่ติดภายใน (internal tag) เป็นแท็กที่ติดเข้าไปภายในร่างกายของสัตว์น้ำ ขนาดของแท็กที่ใช้จะมีขนาดเล็ก และส่งผลกระทบต่อตัวสัตว์น้ำค่อนข้างน้อยไม่ว่าจะเป็นในด้านพฤติกรรม การเติบโต หรืออัตราการรอดตาย แท็กชนิดนี้มีลักษณะการใช้งานที่กว้างขวาง สามารถใช้กับสัตว์น้ำได้หลากหลาย ทั้งในด้านชนิดและขนาดของตัวสัตว์น้ำ มีอายุการใช้งานที่ยาวนาน และมีความแม่นยำสูงมากในการระบุรายตัว ส่วนข้อจำกัดของการใช้แท็กชนิดนี้ก็คือ อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องส่วนใหญ่มีราคาสูง ต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทางในการติดแท็ก บางครั้งพบว่าแท็กที่ฝังอยู่ในตัวสัตว์น้ำมีการเคลื่อนที่เปลี่ยนตำแหน่งทำให้การอ่านรหัสทำได้ยากขึ้น ส่วนใหญ่แท็กขนาดเล็กที่ฝังนี้จะเรียกว่าเป็นแท็กถาวรที่จะติดตัวสัตว์น้ำไปตลอดชีวิต มีรายงานการติดแท็กชนิดนี้ยกตัวอย่าง เช่น coded wire tags (CWTs), magnetic body cavity tags (MCTs), visible implant tags (VIT) หรือ

visible implant alphanumeric (vialpha) ในสัตว์น้ำที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง (Hagen, 1996; Caceci *et al.*, 1999; Jerry *et al.*, 2001; Arce *et al.*, 2003; Sakaris and Jesien, 2005; Woods, 2005)

2.2.2 แท็กที่ติดภายนอก (external tag) เป็นแท็กที่ใช้ติดภายนอกตัวสัตว์น้ำ สามารถมองเห็นได้ชัดเจน ตรวจสอบได้ง่าย โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่เฉพาะในการตรวจสอบ แท็กชนิดนี้มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์และชนิดของสัตว์น้ำที่จะใช้ติดแท็ก การติดแท็กแบบนี้สามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวาง โดยนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ เช่น การศึกษาพฤติกรรมและการประเมินกลุ่มประชากรสัตว์น้ำ เป็นต้น ตำแหน่งและรูปแบบของแท็กที่ติดภายนอกตัวสัตว์น้ำ เช่น petersen disc, carlin, fingerling, spaghetti, dart, anchor, herring, archer, hydrostatic, strap และ bachelor button (ภาพที่ 2.3) (Thorsteinsson, 2002)



ภาพที่ 2.3 ตำแหน่งและรูปแบบการติดภายนอกตัวสัตว์น้ำ

ที่มา : Thorsteinsson (2002)

2.2.3 อิเล็กทรอนิกส์แท็ก (electronics tag) ส่วนใหญ่จะเป็นแท็กที่ฝังภายในตัวสัตว์ อาจจะใช้การผ่าแล้วฝังเข้าไป หรือการฉีดเข้าไปในร่างกาย เช่น ทางช่องท้อง กล้ามเนื้อบริเวณต่างๆ บนร่างกายเพื่อใช้ในการระบุตัวสัตว์น้ำที่ศึกษา (รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ, 2551) อิเล็กทรอนิกส์แท็กได้พัฒนาให้มีประโยชน์หลายด้าน โดยเน้นการศึกษาทางพฤติกรรม และแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Davenport *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถอ่านแท็กและเขียนข้อมูลได้ด้วยเครื่องอ่าน หรือสามารถเชื่อมต่อกับระบบของคอมพิวเตอร์ จึงทำให้สะดวกในการเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ อย่างไรก็ตามการอ่านรหัสจากตัวแท็กนั้น ต้องมีเครื่อง

อ่านที่เฉพาะ โดยการรับสัญญาณ ที่ส่งมา (Hastein *et al.*, 2001) อิเล็กทรอนิกส์แท็กมีอยู่หลายประเภทเช่น transmitter tag, transponder tag, data storage tag (DST tag), satellite tag, popup tag, chat tag, passive integrated transponder (PIT) tag และอาร์เอฟไอดีแท็ก เป็นต้น

2.3 เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีแท็ก

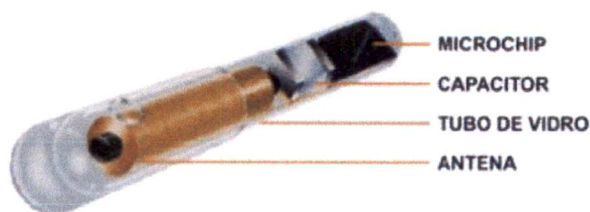
อาร์เอฟไอดี (radio frequency identification; RFID) เป็นระบบระบุลักษณะของวัตถุด้วยคลื่นความถี่วิทยุ ที่ได้ถูกพัฒนามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เพื่อวัตถุประสงค์หลักในการนำไปใช้งานแทนระบบบาร์โค้ด (barcode) จุดเด่นของอาร์เอฟไอดีอยู่ที่การอ่านข้อมูลจากแท็กได้หลายแท็กแบบไร้สัมผัส แม้ในทัศนวิสัยไม่ดี ทนต่อความเปียกชื้น แรงสั่นสะเทือน การกระทบกระแทก และสามารถจะอ่านข้อมูลได้ด้วยความเร็วสูง โดยข้อมูลจะถูกเก็บไว้ในไมโครชิปที่อยู่ในแท็ก (ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ, 2549)

ปัจจุบันได้มีการนำอาร์เอฟไอดีมาประยุกต์ใช้งานในด้านอื่นๆ นอกเหนือจากนำมาใช้แทนระบบบาร์โค้ดแบบเดิม เช่น นำมาทำบัตรสำหรับผ่านเข้าออกห้องพัก และแท็กสินค้าซึ่งมีขนาดเล็กหรือฝังในตัวสัตว์เพื่อบันทึกประวัติและข้อมูลต่างๆ เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีมีบทบาทสำคัญในการช่วยอำนวยความสะดวก และช่วยในการจัดการฟาร์มได้เป็นอย่างดี อุปกรณ์อาร์เอฟไอดีสามารถปลอมแปลงได้ยาก อ่านได้โดยสะดวก และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของสัตว์

2.3.1 องค์ประกอบของระบบอาร์เอฟไอดี

ระบบอาร์เอฟไอดีมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ

2.3.1.1 แท็ก (tag) หรือ ทรานสปอนเดอร์ (transponder) โครงสร้างภายในของแท็กประกอบด้วย 2 ส่วนคือ สายอากาศ (antenna) และไมโครชิป (microchip) (ภาพที่ 2.4) โดยสายอากาศเป็นขดลวดขนาดเล็ก ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณคลื่นความถี่วิทยุและสร้างพลังงานป้อนให้ส่วนของไมโครชิป ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลของวัตถุ ในปัจจุบันระบบอาร์เอฟไอดีแท็กที่มีการใช้งานอยู่นั้นแบ่งเป็น 2 ชนิด ดังนี้



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างภายในของแท็กประกอบด้วยสายอากาศและไมโครชิป

ที่มา : วิวัฒน์ ชวนะนิกุล และคณะ (2551)

2.3.1.1.1 พาสซีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก (passive RFID Tag) (ภาพที่ 2.5ก) แท็กชนิดนี้ไม่ต้องอาศัยแหล่งจ่ายไฟภายนอก เนื่องจากภายในแท็กจะมีวงจรกำเนิดไฟฟ้าเหนี่ยวนำขนาดเล็ก เป็นแหล่งจ่ายไฟในตัวอยู่ทำให้การอ่านข้อมูลทำได้ไม่ไกลมากนัก ระยะอ่านสูงสุดประมาณ 1 เมตร ขึ้นอยู่กับความแรงของเครื่องส่งและคลื่นความถี่วิทยุที่ใช้ โดยปกติแท็กชนิดนี้มักมีหน่วยความจำขนาดเล็กประมาณ 16-1,024 ไบต์ มีขนาดเล็กและน้ำหนักเบา ราคาต่อหน่วยต่ำ



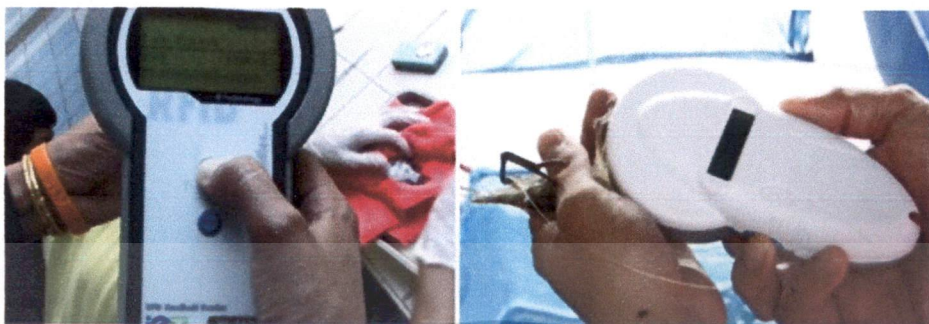
ภาพที่ 2.5 ลักษณะของพาสซีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก (ก) และแอ็กทีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก (ข)

2.3.1.1.2 แอ็กทีฟอาร์เอฟไอดีแท็ก (active RFID Tag) (ภาพที่ 2.5ข) แท็กชนิดนี้จะต้องอาศัยแหล่งจ่ายไฟจากแบตเตอรี่ภายนอก เพื่อจ่ายพลังงานให้กับการทำงานวงจรภายใน แท็กแบบนี้สามารถมีหน่วยความจำภายในขนาดใหญ่ได้ถึง 1 เมกะไบต์ และสามารถอ่านได้ในระยะไกลสูงสุดประมาณ 10 เมตร แม้ว่าแท็กชนิดนี้จะมีข้อดีอยู่หลายประการ แต่ก็มีข้อเสียเหมือนกัน เช่น มีราคาต่อหน่วยสูง มีขนาดค่อนข้างใหญ่ และมีระยะเวลาในการทำงานที่จำกัด

2.3.1.2 เครื่องอ่าน (reader; interrogat; transceiver; transmitter; receiver) (ภาพที่ 2.6) ทำหน้าที่เขียนหรืออ่านข้อมูลลงในแท็กด้วยคลื่นสัญญาณวิทยุ ภายในเครื่องอ่านประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสาอากาศที่ทำจากขดลวดทองแดง เพื่อใช้รับส่งสัญญาณภาครับและภาคส่งสัญญาณวิทยุ และวงจรควบคุมการอ่าน-เขียนข้อมูลจำพวกไมโครคอนโทรลเลอร์และส่วนของการติดต่อกับคอมพิวเตอร์



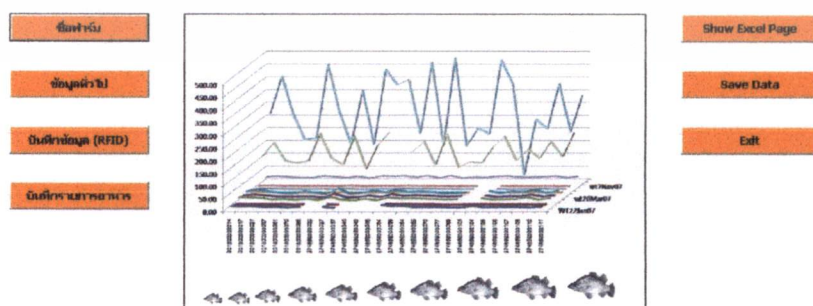
ภาพที่ 2.6 เครื่องอ่านอาร์เอฟไอดีแท็ก

ที่มา : รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551)

2.3.1.3 โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (software) ที่จะเชื่อมต่อกับไมโครชิปและเครื่องอ่านเพื่อนำไปใช้ในงานต่างๆ โปรแกรมคอมพิวเตอร์นี้นับเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่จะทำให้ระบบอาร์เอฟไอดี สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่า และมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่นำมาใช้ร่วมกับไมโครชิป ได้แก่ โปรแกรมการจัดการฟาร์มโคนม โปรแกรมการจัดการฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์ (วิวัฒน์ ชวนะนิกุล และคณะ, 2551) และ โปรแกรมบริหารจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำด้วยระบบอาร์เอฟไอดี (ภาพที่ 2.7) เป็นต้น

NECTEC
a member of NSTDA

FISH TECH FARM



ภาพที่ 2.7 โปรแกรมบริหารจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระบบอาร์เอฟไอดี

ที่มา : รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 หลักการทำงานเบื้องต้นของระบบอาร์เอฟไอดี

การทำงานเบื้องต้นของระบบอาร์เอฟไอดีนั้น ตัวอ่านข้อมูลจะปล่อยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าออกมาตลอดเวลา และคอยตรวจจับสัญญาณของแท็กที่เข้ามาอยู่ในบริเวณสนามแม่เหล็กไฟฟ้า เมื่อมีแท็กเข้ามาอยู่ในบริเวณสนามแม่เหล็กไฟฟ้า แท็กจะได้รับพลังงานไฟฟ้าที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเพื่อให้แท็กเริ่มทำงาน และจะส่งข้อมูลในหน่วยความจำที่ผ่านคลื่นสัญญาณกับคลื่นพาหะแล้วออกมาทางสายอากาศที่อยู่ภายในแท็ก คลื่นพาหะที่ถูกส่งออกมาจากแท็กจะเกิดการเปลี่ยนแปลงแอมพลิจูด ความถี่ หรือเฟส ขึ้นอยู่กับสัญญาณของตัวอ่านข้อมูล ตัวอ่านข้อมูลจะตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของคลื่นพาหะแปลงออกมาเป็นข้อมูลแล้วทำการถอดรหัสเพื่อนำข้อมูลไปใช้งานต่อไป (ภาพที่ 2.8)



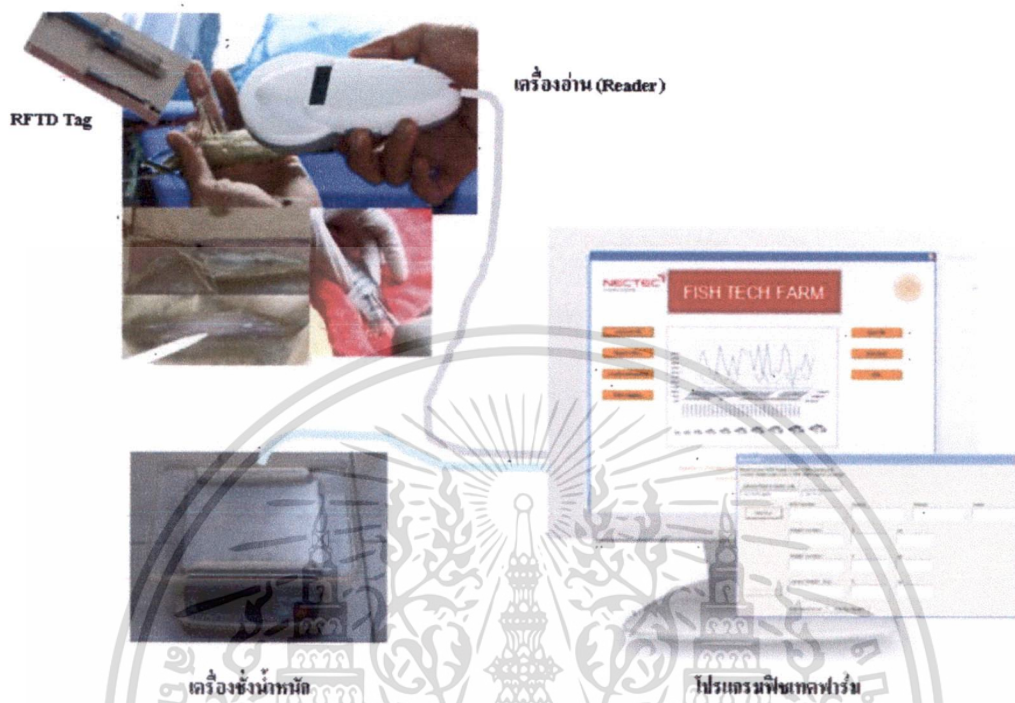
ภาพที่ 2.8 หลักการทำงานของอาร์เอฟไอดีแท็ก
ที่มา : Roberts (2006)

2.4 การนำอาร์เอฟไอดีแท็กมาใช้ในสัตว์น้ำ

มีรายงานการวิจัยของรุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551) ได้นำเทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีมาใช้ในการบริหารจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาแบบรายตัว และการจัดการสายพันธุ์หรือแยกสายพันธุ์สัตว์น้ำ เทคโนโลยีอาร์เอฟไอดีที่นำมาศึกษาในสัตว์น้ำ (ภาพที่ 2.9) ประกอบด้วย (1) เครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมฟิชเทคฟาร์ม (2) อาร์เอฟไอดีแท็ก หรือ ทรานสปอนเดอร์ หรือ ไบโอดีป ที่บรรจุอยู่ในแคปซูลแก้ว (ยาว 10-13 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) ซึ่งภายในสามารถบันทึกข้อมูลและรหัสประจำตัวของสัตว์น้ำ (3) เครื่องอ่าน สำหรับอ่านรหัสประจำตัวสัตว์น้ำ และเป็นอุปกรณ์ที่สำคัญในการเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ และ (4) เครื่องชั่งน้ำหนัก สำหรับชั่งน้ำหนัก และผู้ใช้จะบันทึกข้อมูลน้ำหนักไปยังโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ระบบที่มีองค์ประกอบเหล่านี้รวมเรียกว่าระบบฟิชเทคฟาร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยระบบฟิชเทคฟาร์มได้ก่อให้เกิดความสะดวกสบายต่อผู้ใช้งาน ลดขั้นตอนในการจัดเก็บข้อมูล และการตรวจสอบข้อมูลย้อนกลับ และช่วยลดพื้นที่ในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำ เป็นต้น



ภาพที่ 2.9 ระบบฟิชเทคฟาร์ม

ที่มา : รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551)

2.5 การตอบสนองต่อความเครียดในสัตว์น้ำ

ความเครียดเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ โดยการหลั่งสารบางอย่าง เช่น คอร์ติซอล (cortisol) และแคทีโคลามีน (catecholamine) เป็นต้น เพื่อรักษาสภาพและปรับตัวให้กระบวนการเมตาบอลิซึมเป็นไปตามปกติ (Bridges, 2005) ความเครียดในสัตว์น้ำเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงกว้าง ด้านโภชนาการ และสารพิษที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งที่ไม่มชีวิิตที่ปนเปื้อนในน้ำ ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการดำรงชีวิตในช่วงกว้าง โดยการรอดชีวิตของสัตว์น้ำที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับ การปรับตัวต่อการตอบสนองความเครียดได้อย่างรวดเร็ว จากการหลั่งสารบางอย่างเพื่อปรับสภาพให้มีชีวิตรอด (กาญจนา ค้วงปันทา, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 ปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียด (stressors)

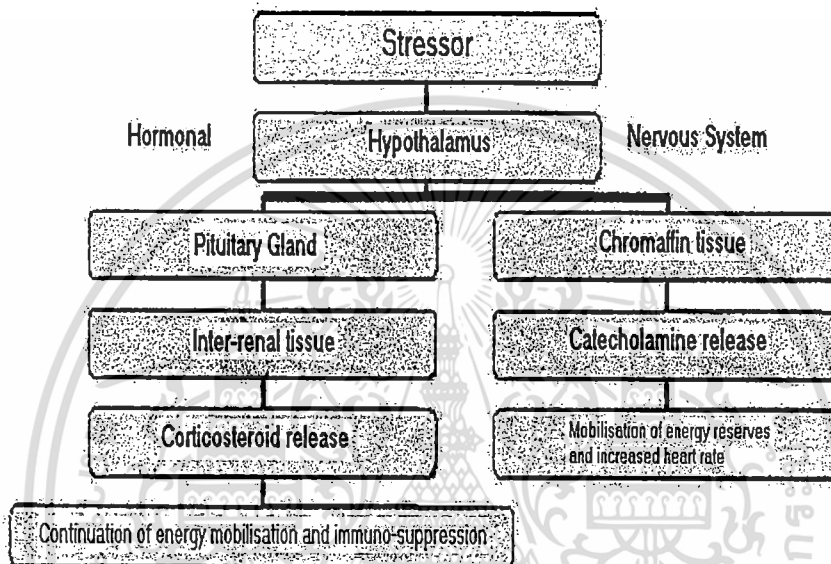
Iwana *et al.* (1999) รายงานว่าปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดในปลา ได้แก่ (1) ปัจจัยแวดล้อมภายนอก (environmental stressor) ทั้งด้านกายภาพและเคมี หรือการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ปริมาณแอมโมเนีย ความกระด้าง ความเป็นกรด-ด่าง ความคุ่นในน้ำและอุณหภูมิของน้ำ โลหะหนัก เช่น ทองแดง แคดเมียม สังกะสีและเหล็ก หรือสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ เช่น อาร์เซนิก คลอรีน ไซยาไนต์ และโพลีคลอรีเนตไบฟีนิล ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าเชื้อรา และสิ่งปนเปื้อนจากกิจกรรมภาคอุตสาหกรรม คริวเรือนและเกษตรกรรม (2) ปัจจัยที่เกิดขึ้นในระบบสรีรวิทยา (physiological stressor) เกิดเนื่องจากมีสิ่งรบกวนปลา เช่น การจับ การเบียดเสียด การกักขัง การขนส่ง หรือการกระทำอื่นที่รบกวนต่อระบบสรีรวิทยาของปลา และ (3) ปัจจัยด้านพยาธิวิทยา (pathogenic stressor) เกิดเนื่องจากการมีเชื้อโรคหรือปรสิตรบกวน ทำให้ปลาเกิดโรคและตายได้

2.5.2 การตอบสนองต่อความเครียดของระบบสรีรวิทยา (physiological stress response)

ในการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งกระตุ้นให้เกิดความเครียด ปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงของระบบชีวเคมีและสรีรวิทยา เพื่อรักษาสภาพและปรับตัวต่อความเครียดที่เกิดขึ้น โดยการตอบสนองต่อความเครียดแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้

2.5.2.1 การตอบสนองต่อความเครียดเบื้องต้น (primary response) เป็นการตอบสนองต่อความเครียดโดยอาศัยระบบนิวโรเอ็นโดครายน์ (neuroendocrine system) และระบบเอ็นโดครายน์ (endocrine system) ซึ่งเป็นการตอบสนองในการหลั่งฮอร์โมนความเครียด เช่น แคทีโคลามีน (catecholamine) อะดรีนาลีน (adrenaline) และคอร์ติซอล (cortisol) (Iwana *et al.*, 1999; Gornati *et al.*, 2004) เมื่อปลาได้รับความเครียดจากสิ่งกระตุ้นต่างๆ (stressor) จะเริ่มมีการตอบสนองต่อความเครียดทางด้านสรีรวิทยา (ภาพที่ 2.10) โดยเริ่มที่ระบบรับรู้ความรู้สึก (sensory system) ส่งสัญญาณไปที่ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ซึ่งเป็นส่วนหลักของสมอง จากนั้นไฮโปทาลามัสจะส่งสัญญาณไปที่ chromaffin tissue บริเวณไตส่วนหน้า ส่งผลให้มีการหลั่งฮอร์โมนแคทีโคลามีน (catecholamine) ซึ่งมีการหลั่งออกมาภายใน 1 นาที หรืออาจจะมากกว่าหรือน้อยกว่าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ ฮอร์โมนชนิดนี้เป็นผลมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของการใช้พลังงานในการผลิตกลูโคสในเลือด และทำให้อัตราการบีบเลือดออกจากหัวใจเร็วขึ้นอย่างมาก ในขณะเดียวกันจะมีการตอบสนองต่อความเครียดของระบบเอ็นโดครายน์เกิดขึ้นพร้อมกัน โดยไฮโปทาลามัสจะหลั่ง corticotrophin releasing factor เพื่อไปกระตุ้นต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland)

ให้หลั่ง adrenocorticotrophic hormone (ACTH) ซึ่ง ACTH อยู่ในระบบหมุนเวียนใน inter-renal tissue บริเวณไต เมื่อผ่านการกระตุ้นจากความเครียดจะผลิตฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอยด์ (corticosteroid) เช่น คอร์ติซอล (cortisol) และคอร์ติซิซัน (cortisone) ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้จะช่วยในการรักษาสมดุลของกระบวนการ เมตาบอลิซึม และช่วยให้เหงือกมีการขยายตัวให้เม็ดเลือดแดง จับกับออกซิเจนได้มากขึ้น เพื่อให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด (Bridges, 2005)



ภาพที่ 2.10 การตอบสนองต่อความเครียดของปลาในระบบนิวโรเอ็นโดครายน์และเอ็นโดครายน์
ที่มา : Bridges (2005)

2.5.2.2 การตอบสนองต่อความเครียดขั้นที่สอง (secondary response) เป็นการตอบสนองต่อความเครียดโดยอาศัยกระบวนการทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมในกลไกการทำงานของอะดรีนาลีนและคอร์ติซอล ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของเลือด เช่น ระดับกลูโคส มีรายงานวิจัยศึกษาการวัดความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดในการเป็นดัชนีบ่งชี้ระดับความเครียด และการตอบสนองต่อความเครียดในขั้นที่สองของปลา (Barton, 2002) กระบวนการตอบสนองต่อความเครียดเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานมาก ดังนั้นเซลล์จึงต้องผลิตกลูโคสมากขึ้นเพื่อให้เพียงพอกับกระบวนการเมตาบอลิซึมในการตอบสนองต่อความเครียด และให้พลังงานกับเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น สมอง เหงือก และกล้ามเนื้อ ซึ่งการผลิตกลูโคสจะผลิตจากตับโดยกระบวนการไกลโคไลซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(glycogenolysis) และกลูโคเนโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ทำให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงขึ้นด้วย และพบว่าอะครีนาตินและคอร์ติซอลมีผลทำให้ระดับกลูโคสสูงขึ้นเช่นกัน ถึงแม้ว่า อะครีนาตินจะผลิตและหายไปอย่างรวดเร็วจากระบบหมุนเวียนก็ตาม (Iwana *et al.*, 2004)

2.5.2.3 การตอบสนองต่อความเครียดขั้นที่สาม (tertiary response) เป็นการตอบสนองต่อความเครียด อันเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อความเครียดเบื้องต้น และการตอบสนองต่อความเครียดขั้นที่สอง ซึ่งจะส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลา กระบวนการตอบสนองต่อความเครียดเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานมาก ดังนั้นพลังงานที่ได้จึงใช้ไปกับการปรับตัวต่อสภาวะความเครียด จึงมีผลทำให้การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์และความต้านทานต่อโรคลดลง (Iwana *et al.*, 1999; Gornati *et al.*, 2004; Bridges., 2005)

2.5.3 การตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์ (cellular stress response)

ส่วนใหญ่การศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดในระดับเซลล์ จะกล่าวถึงโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่มีชื่อว่า heat shock proteins (HSPs) หรือ โปรตีนความเครียด (stress proteins) (Iwana *et al.* 2004) ซึ่ง HSPs เป็นโปรตีนในกลุ่มแชเปโรน (chaperone) ซึ่งมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และพบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Basu *et al.*, 2002)

2.5.3.1 หน้าที่ของ heat shock proteins

หน้าที่ของ HSPs คือการคงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำหน้าที่ได้ตามปกติ โดยจะช่วยในการม้วนหรือพับโมเลกุลของโปรตีน รวมถึงการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปสู่ส่วนต่างๆ ของเซลล์ เพื่อให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (หน้าที่ในการคงสภาพโปรตีน) ช่วยในการย่อยโปรตีนที่เสื่อมสภาพ (หน้าที่ในการเป็น protease) ควบคุมกระบวนการยึด และหดตัวโครงร่างของแอกติน (actin cytoskeleton) และ กระบวนการรับและส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) (Fairfield, 2004) เมื่อสิ่งมีชีวิตเกิดความเครียดจากผลของการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมอย่างกะทันหัน เช่น อุณหภูมิ สภาวะการขาดออกซิเจน โลหะหนัก เป็นต้น ทำให้เซลล์สังเคราะห์ HSPs ในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อคงสภาพเซลล์และปกป้องเซลล์จากการทำลายของความเครียด ดังนั้น จึงมีรายงานการศึกษาวิจัยเป็นจำนวนมากที่แสดงความเป็นไปได้ในการใช้ HSPs เป็นดัชนีบ่งชี้สภาวะความเครียดทางชีวภาพ (biomarker) ในสัตว์หลายชนิด (กาญจนา ค้วงปันทา, 2547)

2.5.3.2 ชนิดของ heat shock proteins

De Pomerai (1996) รายงานว่า heat shock proteins สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะเรียกตามน้ำหนักโมเลกุล คือ Hsp100-110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, small Hsp (16-28 kDa) และ ubiquitin (8-10 kDa) ซึ่ง HSP แต่ละชนิดจะมีหน้าที่แตกต่างกันไป (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุลและหน้าที่ของ heat shock proteins (HSPs)

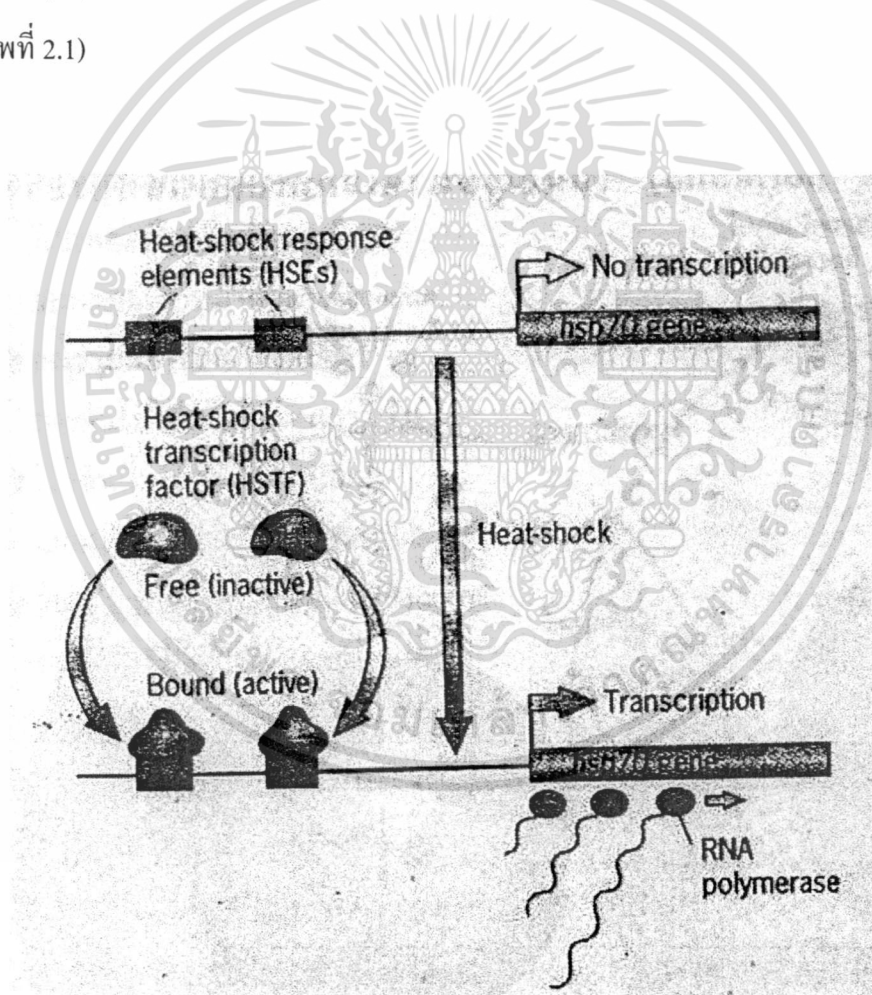
น้ำหนักโมเลกุล (Kda)	ชนิดของ HSPs	หน้าที่
8-10	Ubi4, Hsp10	ช่วยในการย่อยโปรตีนที่เสื่อมสภาพ และทำหน้าที่ร่วมกับ Hsp60
20-30	Hsp27, HspB1	ช่วยในการคงสภาพของโปรตีน ควบคุมการเกิด polymerization ของแอคติน และยับยั้งการตายของเซลล์ (apoptosis)
40	Hsp40	ทำหน้าที่ร่วมกับ Hsp70
60	Hsp60	ช่วยมีวนพับของโปรตีนที่เคลื่อนไปยังไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ หลังจากกระบวนการหลังการถอดรหัส (post-transcriptional)
70	Hsp70, Hsc70	ช่วยมีวนพับของโปรตีนที่เคลื่อนไปยังไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ หลังจากกระบวนการหลังการถอดรหัส ช่วยปรับสมดุลที่เกิดจากความจากความร้อน และช่วยรักษาสภาพโปรตีน
90	Hsp90, Grp94	ช่วยคงสภาพของตัวรับสัญญาณฮอร์โมนสเตอรอยด์ (steroid receptor) และองค์ประกอบต่างๆ ในการถอดรหัส (transcription factors)
100	Hsp104, Hsp110	ช่วยรักษาสมดุลของร่างกายที่อุณหภูมิสูง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Fairfield (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.3 การตอบสนองต่อความเครียดของ heat shock proteins

หัตยา กาวิวงศ์ (2548) รายงานว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตพบกับสภาวะความเครียด จะมีการสร้างโปรตีนกลุ่มหนึ่งขึ้นมาช่วยปรับสภาพในเซลล์ที่เรียกว่า heat shock proteins โดยเซลล์จะกระตุ้นให้มีการถอดรหัสให้เป็น mRNA ของยีน *hsp70* และแปลรหัสเป็นโปรตีน Hsp70 ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนขึ้นอยู่กับแฟกเตอร์ HSTF (heat-shock transcription factor) ที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ กระบวนการถอดรหัสของยีน *hsp70* เกิดขึ้นโดย HSTF จะมีกลุ่มฟอสเฟตเข้าไปเกาะบริเวณ HSEs (heat-shock response element) ทำให้ HSTF สามารถจับกับลำดับเฉพาะบนดีเอ็นเอบริเวณ phosphorylated HSTF ส่งผลให้บริเวณนี้มีสภาพพร้อมที่จะถอดรหัส ทำให้ RNA polymerase II เข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนได้ง่ายขึ้น จึงเกิดการถอดรหัสของยีน *hsp70* (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.11 การถอดรหัสของยีน *hsp70* ที่ถูกชักนำจากสิ่งกระตุ้นให้เกิดความเครียด
ที่มา: หัตยา กาวิวงศ์ (2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ผลของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด (stressor) ต่อการแสดงออกของยีนฮีทช็อกโปรตีน 70 ในปลา

งานส่วนใหญ่ทำการศึกษาในระดับโปรตีน ลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างของยีน heat shock proteins ระดับความเครียดที่มีความสัมพันธ์กับ mRNA และศึกษากลไกการแสดงออกของยีน ตัวอย่างของงานวิจัยที่ได้รายงานไว้ เช่น

Dunlap and Matsumura (1997) ศึกษาสภาวะความเครียดของลูกปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*) โดยใช้โปรตีน Hsp70 เป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ จากการเพาะเลี้ยงลูกปลาแซลมอนที่อุณหภูมิสูงคือ 24 องศาเซลเซียส อุณหภูมิปานกลางคือ 18 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำคือ 12-14 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) พบว่าลูกปลาแซลมอนมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในระดับสูงในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในระดับกลางเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในระดับต่ำเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 12-14 องศาเซลเซียส

Airaksinen *et al.* (1998) ศึกษาการแสดงออกของยีน heat shock proteins ในปลา Rainbow trout เมื่อมีการชักนำให้เกิดความเครียดด้วยสภาวะออกซิเจนต่ำ (hypoxia) โดยพบว่า HSTF (heat-shock transcription factor) มาจับกับดีเอ็นเอบริเวณ HSEs (heat-shock response element) ทำให้เกิดการถ่ายทอดรหัสและแปลรหัสเป็นโปรตีน Hsp70

Rabergh *et al.* (2000) ศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลา Zebrafish (*Danio rerio*) ที่ชักนำให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิสูง พบว่าปลา Zebrafish มีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* มากขึ้นที่อุณหภูมิสูง ซึ่งการแสดงออกของยีน *hsp70* เกิดจาก HSTF1 (heat-shock transcription factor 1) มาจับกับดีเอ็นเอทำให้เกิดการถ่ายทอดรหัสยีน *hsp70*

Delaney and Klesius (2004) ศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่ถูกชักนำให้เกิดความเครียดด้วยสภาวะออกซิเจนต่ำ (hypoxia) ในลูกปลานิล *Oreochromis niloticus* (L.) โดยมีค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen; DO) ระหว่าง 0.1-0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลูกปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำมีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงกว่าลูกปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนในระดับปกติที่ความเข้มข้น 4.66-4.91 มิลลิกรัมต่อลิตร

Gornati *et al.* (2004) รายงานว่าในการเลี้ยงปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) ปลาจะเกิดความเครียดเมื่อได้รับผลกระทบจากการเลี้ยงปลาที่ความหนาแน่นสูงคือ 80 และ 100 กิโลกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกบาศก์เมตร จากการทดลองพบระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* เพิ่มขึ้นในปลากลุ่มที่มีความหนาแน่นสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยง 10 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

Feldhaus (2006) รายงานว่าปลา Redband steelhead trout (*Oncorhynchus mykissgairdneri*) ในแม่น้ำ South Fork John Day (SFJD) มีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* มากขึ้น เมื่อเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงเท่ากับ 22-23 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่อมีการฉีด passive integrated transponder (PIT) tag บริเวณช่องว่างลำตัวในลูกปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด หลังจากที่มีการติดแท็ก 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ติด PIT tag แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างปลาที่ติดและไม่ติด PIT tag หลังจากการติด 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการใช้ PIT tag เพื่อระบุลักษณะของปลาแต่ละตัวนั้น ไม่ส่งผลกระทบต่อความเครียดหลังจาก 24 ชั่วโมง

Fulladosa *et al.* (2006) ศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่ถูกชักนำให้เกิดความเครียดด้วยโลหะหนักแคดเมียม ตะกั่ว และโครเมียม ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 50 และ 150 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ในปลา sea bream (*Sparus sarba*) โดยทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือด พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลา sea bream จากโลหะหนักทุกชนิดและทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และพบว่าปลา sea bream มีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ เป็นต้นไป และมีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงที่สุดในปลาที่สัมผัสกับแคดเมียมในช่วงความเข้มข้น 10-50 ไมโครโมลาร์ กับตะกั่วและโครเมียมในช่วงความเข้มข้น 1-10 ไมโครโมลาร์ และการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลา sea bream ไม่มีความแตกต่างกันในปลาที่สัมผัสกับโลหะหนักทั้งสามชนิดเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง

Sinha *et al.* (2010) ศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่ถูกชักนำให้เกิดความเครียดด้วยไตรคลอฟอน (trichlorfon; TRC) ในปลา Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) เมื่อใช้ความเข้มข้นของ TRC เท่ากับ 0.01, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 6, 24, 96 ชั่วโมง 7, 14, 28 และ 56 วัน พบว่าปลา Tra catfish มีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่เพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นของ TRC และทุกเวลาที่ทำการศึกษา และยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง 7 วัน และ 14 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.7 เทคนิคทางโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัย

2.7.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction)

polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการของ DNA replication ที่เป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอสายต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะจากบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาไม่นานถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้าน จนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (*in vitro* mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

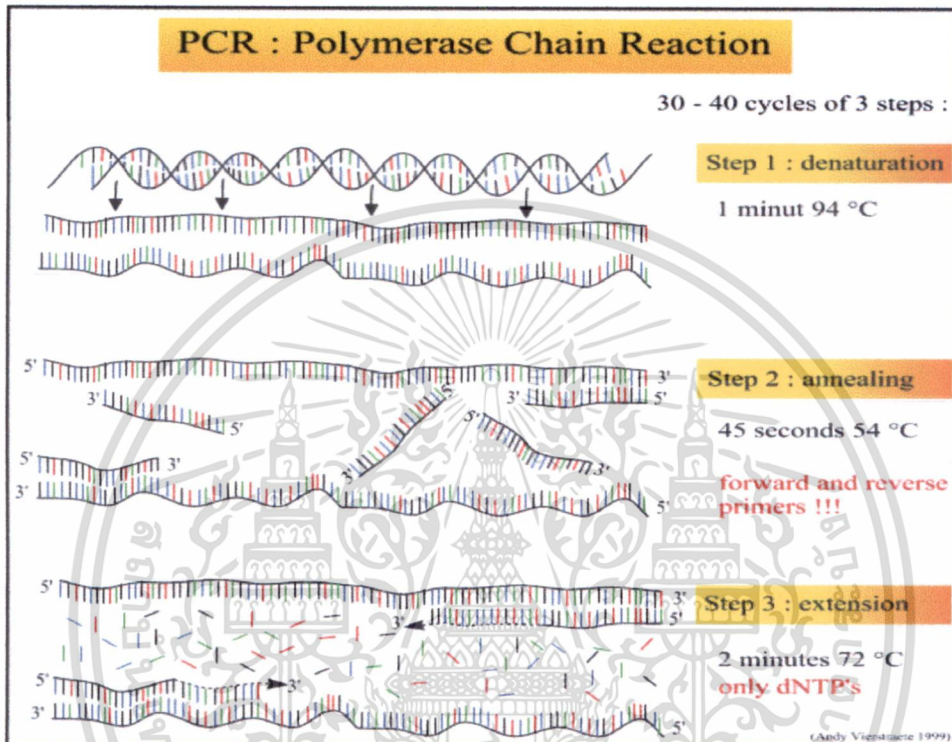
หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้กันทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 2.12) และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ที่เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-20 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน โดยนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์ส (DNA polymerase) เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สที่ใช้ควรจะถูกควบคุมอย่างดีภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 นับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาถูกซ้ำจากขั้นที่ 1-3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบสามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า



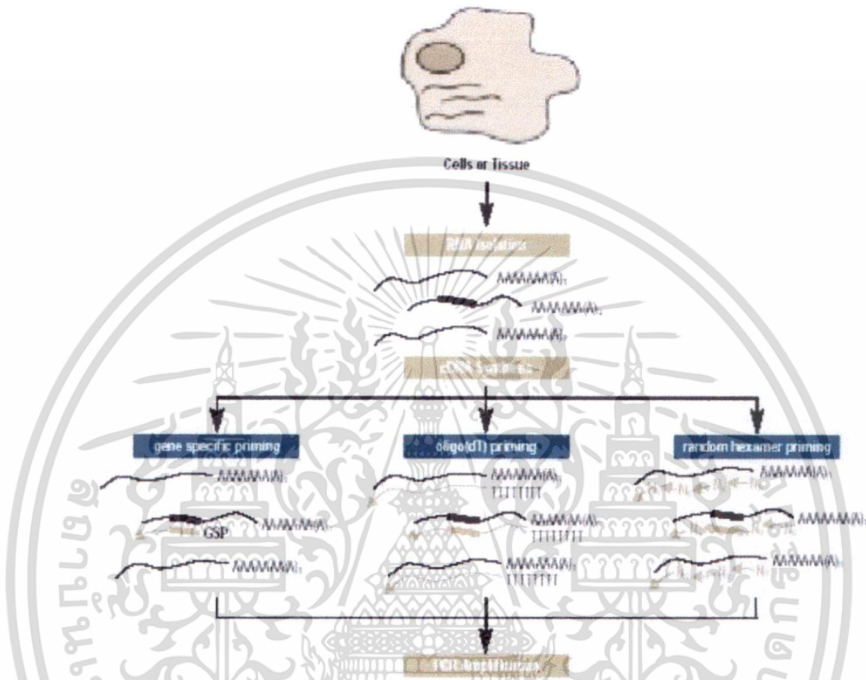
ภาพที่ 2.12 หลักการของปฏิกิริยาถูกซ้ำพอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain reaction)

ที่มา : <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>

2.7.2 ปฏิกิริยาถูกซ้ำพอลิเมอร์เรสแบบย้อนกลับ (reverse transcription- polymerase chain reaction; RT-CPR)

เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายยีนที่สนใจโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นแม่แบบ หลักการ คือ ทำการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) เอนไซม์นี้สามารถสร้างสายดีเอ็นเอได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไป RT ที่ใช้ในงาน cDNA เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจาก retroviruses สองตัวคือ avian myeloblastosis (AMV) และ moloney murine leukemia virus (MMIV) ซึ่ง RT จากไวรัสทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการสร้าง cDNA ไม่แตกต่างกัน ซึ่งขั้นตอนนี้อาจใช้ primer ที่เป็น gene specific primer (GSP) ซึ่งเป็น primer ที่สามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุด หรือจะใช้ oligo (Dt) Primer การใช้ primer ประเภทนี้จะมีอาร์เอ็นเอเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะที่เป็น Poly(A)⁺ RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายมากที่สุด จากนั้น เข้าสู่ขั้นตอนสุดท้ายในการทำ PCR โดยอาศัยแม่แบบจาก cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแล้ว โดยสร้างสายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่มีลักษณะรูปแบบการทำเหมือน PCR ธรรมดาในท้ายที่สุดจะได้สายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสายอาร์เอ็นเอตั้งต้น (ภาพที่ 2.13)



ภาพที่ 2.13 หลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ

ที่มา : <http://handphonebaru.info/review/www-rt-pcr-com.html>

2.7.3 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

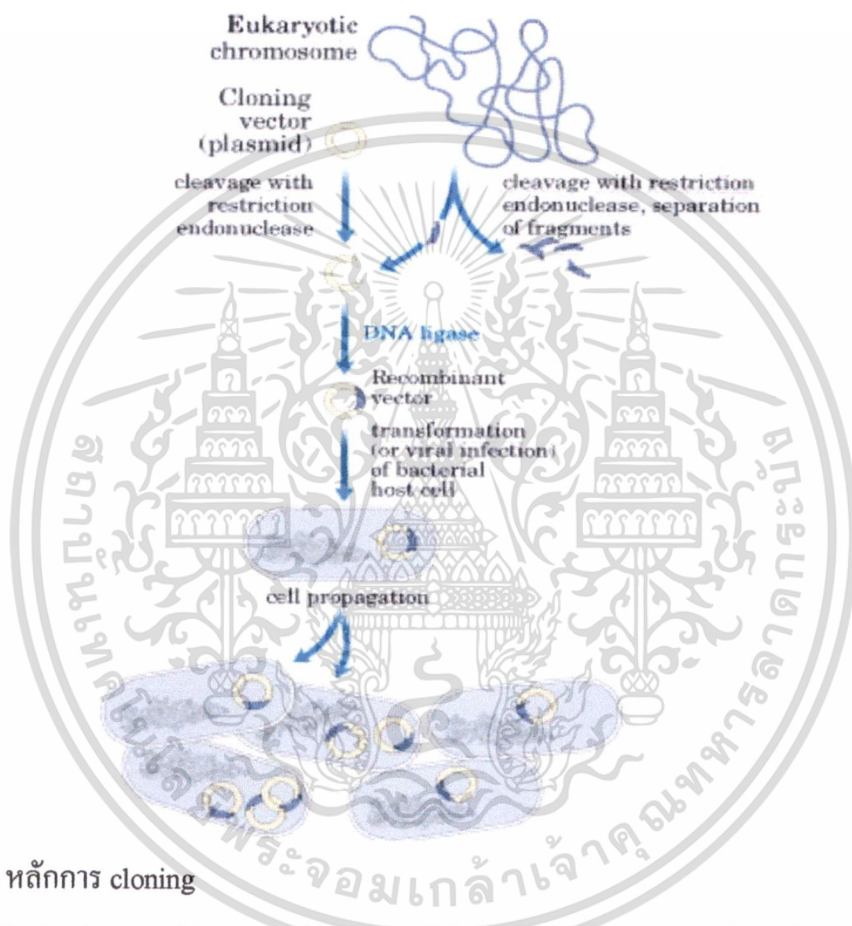
หลักการของอิเล็กโตรโฟเรซิส คือ การแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามขนาดและรูปร่าง โดยใช้กระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตทำให้มีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะมีแรงเคลื่อนไฟฟ้าผลักให้เคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก แผ่นเจลที่ใช้ในการแยกดีเอ็นเอมี 2 ชนิด คือ อะกาโรส (agarose) และพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) การเลือกใช้เจลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการแยก การตรวจสอบสายดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 คู่เบสถึง 30 กิโลเบส หรือมวลโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตันขึ้นไป ควรใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน เช่น อะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ใช้แยกกรดนิวคลีอิกที่มีมวลโมเลกุลสูงจนถึง 50,000 กิโลดาลตัน สำหรับพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 500 คู่เบส ดีเอ็นเอที่ใช้วิเคราะห์ควรมีปริมาณ 0.1-1 ไมโครกรัม การใช้อะกาโรสเจลมักทำในแนวราบ (horizontal gel electrophoresis) ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลจะต้องทำในแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis) ในขณะที่ยังมีกระแสไฟฟ้าหรือการเขย่าเพื่อป้องกันการกักเก็บ เมื่อผู้ดูแลเห็นภาพของผลการดำเนินงานใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

electrophoresis) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระยะเวลาการเคลื่อนที่ของจีนติเอ็นเอคือ ขนาดรูปร่างของดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของเจลที่ใช้ กล่าวคือ ถ้าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่จะผ่านตัวกลางหรือเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก เป็นผลให้ดีเอ็นเอขนาดเล็กเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า ดีเอ็นเอรูปร่างขดเป็นวง เคลียวมักจะเคลื่อนที่ในเจลได้เร็วกว่าดีเอ็นเอรูปร่างอื่นๆ รองลงมาคือดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นเส้น และดีเอ็นเอคลายเกลียวเป็นวง โดยเจลที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีช่องว่างภายในเนื้อเจลด้อยทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำๆ หลังจากที่แยกดีเอ็นเอออกมาเป็นแถบบนอะกาโรสโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้วดีเอ็นเอสายคู่จะถูกย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โครงสร้างของเอทิเดียมโบรไมด์เป็นอะโรมาติกแคทไอออนที่สามารถจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ โดยเข้าไปแทรกตัวระหว่างคู่เบสที่ซ้อนกัน แล้วจะให้ฟลูออเรสเซนต์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต การย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้ สำหรับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามารถให้ฟลูออเรสเซนต์เมื่อย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์เช่นกัน แต่จะมีความไวน้อยกว่าดีเอ็นเอเกลียวคู่ นอกจากนี้ยังมีสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เช่น อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) หรือโปรฟลาวิน (proflavin) ในปัจจุบันได้มีการใช้สีย้อมที่มีความเป็นอันตรายน้อยกว่าสีย้อมในอดีต เช่น เจลสตาร์ เป็นต้น

2.7.4 DNA cloning

DNA cloning เป็นการอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณยีนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีพลาสมิดเป็นพาหะหรือตัวพาหะ (vector) และให้มีการเพิ่มปริมาณยีนในเซลล์แบคทีเรีย พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอชนิดวงกลม (circular DNA) ขนาดเล็กๆ อยู่ในไซโทพลาสซึมของแบคทีเรียบางชนิด มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวได้มากมายและเป็นอิสระต่อการแบ่งตัวของดีเอ็นเอของเจ้าบ้านและดีเอ็นเอของพลาสมิดมียีนบางตัวที่สามารถผลิตโปรตีนได้เองด้วย ได้มีการคัดเลือกชนิดของพลาสมิดที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการถอดแบบจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA replication) ได้มากมายในตัวแบคทีเรียเจ้าบ้าน การนำยีนที่ต้องการสอดใส่ในพลาสมิดกระทำได้โดยการตัดดีเอ็นเอวงแหวนของพลาสมิดให้ขาดออกที่ตำแหน่งหนึ่ง การตัดจะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นเชื่อมช่วงการขาดด้วยชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีน (ที่ต้องการจะโคลนที่ตัดออกจากจีโนมด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน) การเชื่อมต่อกันใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase enzyme) จึงได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรืออาจเรียกว่า foreign DNA ติดอยู่กับพลาสมิดเป็นดีเอ็นเอวงแหวนวงเดียวกัน ใส่พลาสมิดที่มี foreign DNA นี้สู่แบคทีเรียเพื่อปล่อยให้มีการเพิ่มปริมาณพลาสมิดในตัวแบคทีเรียเจ้าบ้าน เมื่อพลาสมิดมีการแบ่งตัวจะทำให้ foreign DNA แบ่งตัวตามไปด้วย ถ้า foreign DNA มีส่วนของยีนที่ทำงานก็อาจมีผลทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติที่จะทำการทดสอบยีนดังกล่าวได้ (ภาพที่ 2.14)

การเพาะเลี้ยงประชากรของแบคทีเรียชนิดที่มีพลาสมิดและ foreign DNA เรียกว่าการทำ genomic library แต่ละชิ้นส่วนของ foreign DNA จะทำการเลี้ยงในแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน โดยการแยกเชื้อแบคทีเรียในระดับเซลล์เดี่ยว (single cell) แล้วเลี้ยงให้เจริญจนเป็นโคโลนี (colony) แต่ละโคโลนีที่เริ่มต้นมาจากเซลล์เดี่ยวนั้นเรียกว่าโคลน (clone) โคลนที่มียีนที่ต้องการอยู่ในพลาสมิดของโคลนนั้น เรียกโคลนชนิดนี้ว่า positive clone จึงเลี้ยงขยาย positive clone ออกไปอีกมากมายให้เพียงพอกับความต้องการผลิตยีนดังกล่าว



ภาพที่ 2.14 หลักการ cloning

ที่มา : <http://opbs.okstate.edu/~petracek/CHAPTER%2029%20FIGS/Fig%2029-01.JPG>

2.7.5 การทรานสฟอร์มเมชัน (transformation)

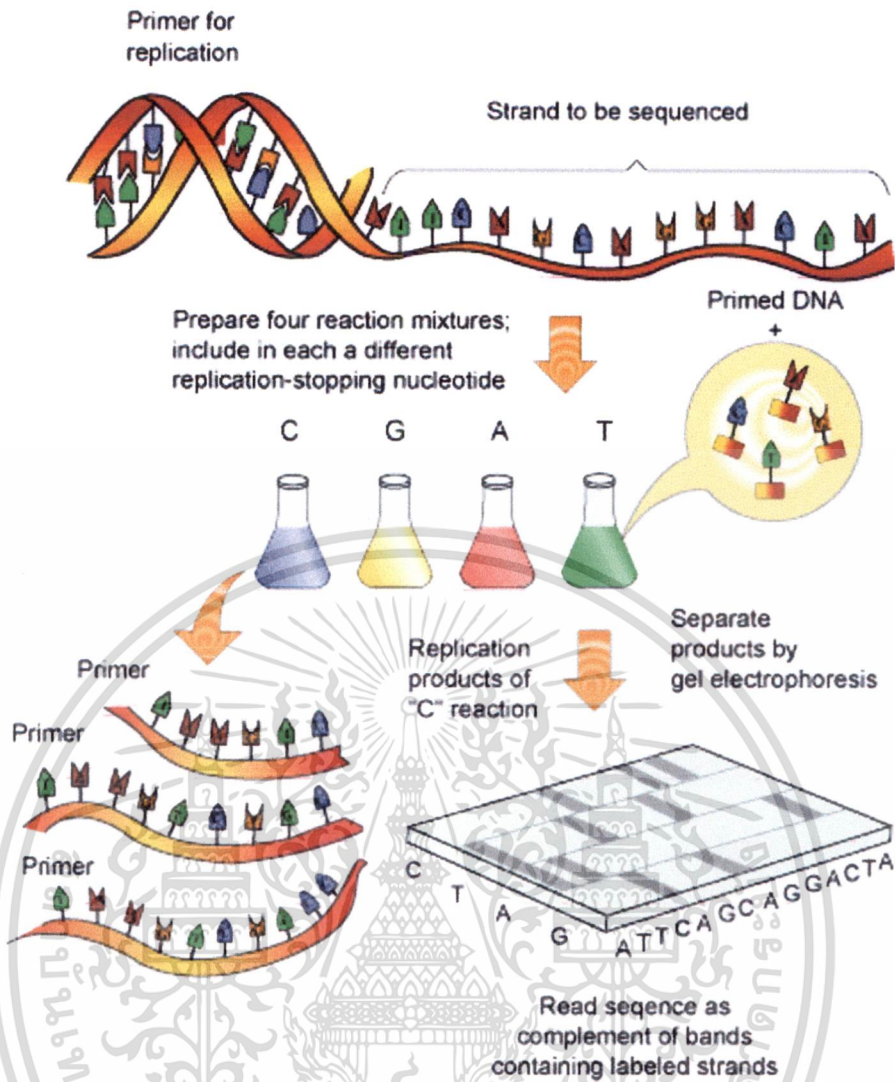
การทรานสฟอร์มเมชัน เป็นการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าไปสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่เป็น competent cell (เซลล์ที่สามารถรองรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) และเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับใช้งานคว้นพันธุวิศวกรรม เช่นการโคลนยีน การสร้างพลาสมิดใหม่ เป็นต้น การเตรียม competent cell ด้วยพลาสมิดนั้นจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือ ใช้แคลเซียมคลอไรด์ทำให้เซลล์แบคทีเรียมีช่องว่างและใช้ความร้อน กระตุ้นให้พลาสมิดเข้าสู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนส่วนใหญ่มักประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะและยีนที่สร้างแอลฟาเปปไทด์ของเอกซารีนเป็นเอกซารีนที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพื่อใช้ในการแยกทรานสฟอร์มแมนท์ (transformant) ที่มีดีเอ็นเอสายผสมออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้รับเฉพาะเวกเตอร์

2.7.6 DNA sequencing

การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เป็นการตรวจหาการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ของซิงดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา เป็นเทคนิคพัฒนาขึ้นโดย Walter Gilbert และ Frederick Sanger และได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1980 วิธีการคือ นำซิงดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับเบสที่อาจนำมาจากการ cloning หรือจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่สังเคราะห์เพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR ใช้เทคนิคคล้ายการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายให้เป็นสายเดี่ยว แล้วใส่สารเคมียับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในขณะที่มีการสังเคราะห์สายใหม่ที่เป็นเบสคู่สมกับสายต้นแบบ ถ้าต้องการหาตำแหน่งของ G (เบส guanine) ต้องใส่สารยับยั้ง G เข้าไปในปฏิกิริยา เมื่อมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไปเรื่อยๆ จะเกิดการหยุดสังเคราะห์ที่ตำแหน่ง G ของทุกๆ แฟงในสายดีเอ็นเอ ในแต่ละปฏิกิริยาการสังเคราะห์บางสายหยุดที่ G ตำแหน่งแรกคือ G ตำแหน่งที่ 2 หรือตำแหน่งอื่นๆ เช่นนี้จะทำให้ได้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นยาวผิดกันแล้วแต่ว่าจะหยุดที่ตำแหน่งใดของ G จึงตรวจดูตำแหน่งของ G จากเทคนิคการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและทำการยับยั้งปฏิกิริยากับเบสตัวอื่นๆ (A, T และ C) ด้วย อ่านผลของปฏิกิริยา 4 ชนิด (ของ A, T, G และ C) โดยวิธีการอ่านแบบลำดับขั้นบันไดเป็นการบอกลำดับของเบสหรือนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (ภาพที่ 2.15)

ปัจจุบันมีการใช้เครื่องมืออัตโนมัติ เพื่อตรวจหาลำดับเบสของซิงส่วนดีเอ็นเอที่เป็นประโยชน์มากเนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่าแบบเดิม มีความถูกต้องมากกว่าและสามารถอ่านลำดับเบสได้ครบถ้วนทั้งหมด



ภาพที่ 2.15 เทคนิคของ Sanger ในการตรวจลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ที่มา : <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/sequencing2.gif>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

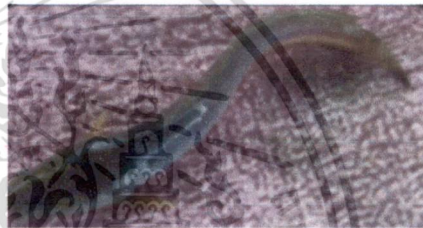
3.1 สัตว์ทดลอง

ปลานิลจากเคเอ็ม ไอทีแอลฟิชเทคฟาร์ม (KMITL'S FISH TECH FARM) มีน้ำหนักประมาณ 55 กรัม (ภาพที่ 3.1ก) และปลาดุกลูกผสมจากศูนย์ปรับปรุงพันธุกรรมน้ำจืด บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 18 กรัม (ภาพที่ 3.1ข)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 3.1 ปลานิล (ก) และปลาดุกลูกผสม (ข) ที่ใช้ในการทดลอง

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

Escherichia coli สายพันธุ์ DH5 α (*supE44* Δ *lac* U169 (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.3.1.1 Luria-Bertani medium (LB)

3.3.1.2 SOB medium

3.3.2 ยาปฏิชีวนะ

3.3.2.1 กานามัยซิน (kanamycin) (Sigma, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 เอนไซม์

3.3.3.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Promega, USA)

3.3.3.2 เอนไซม์ RNaseA (Promega, USA)

3.3.3.3 เอนไซม์ Proteinase K (Promega, USA)

3.3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3.4.1 ฝาแฝดแบคทีเรีย (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

3.3.4.2 100 bp Ladder (ขนาด 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 และ 1,500 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

3.3.5 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

3.3.5.1 อะกาโรส (agarose) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.3.5.2 เจลสตาร์ (gelstar) (BioWhittaker Molecular Applications, USA)

3.3.5.3 สีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) (ซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์, โบร โมฟีนอลบลู 0.25 เปอร์เซ็นต์, บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 1 เท่า)

3.3.5.4 น้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอ (QIAzol[®] Lysis Reagent) (Qiagen, Germany)

3.3.5.5 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์) (pH 7.4)

3.3.5.6 บัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA 10 เท่า (Tris-HCl 0.89 โมลาร์, boric acid 0.89 โมลาร์, EDTA 0.02 โมลาร์) (pH 8.0)

3.3.5.7 X-gal (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- β -D-Galactoside) (Promega, USA)

3.3.5.8 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Promega, USA)

3.3.5.9 คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (Sigma, USA)

3.3.5.10 ไอโซโพรพานอล (Sigma, USA)

3.3.5.11 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

3.3.5.12 สารละลาย RF1 (ภาคผนวก ก)

3.3.5.13 สารละลาย RF2 (ภาคผนวก ก)

3.3.5.14 3-aminobenzoic acid ethylester (MS222) (Sigma, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 ชุดทดสอบ (Kit)

- 3.3.6.1 ชุดสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (Wizard® SV Genomic DNA Purification System)
(Promega, USA)
- 3.3.6.2 ชุดเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR (2x PCR Enzyme Mastermix solution)
(Intron biotechnology, Korea)
- 3.3.6.3 ชุดปฏิกิริยา RT-PCR (QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit) (Qiagen, Germany)
- 3.3.6.4 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (PCR Cloning Kit) (Qiagen, Germany)
- 3.3.6.5 ชุดทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ (Gel/PCR fragments extraction Kit)
(Geneaid, Taiwan)
- 3.3.6.6 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (DNA High-Speed Plasmid Mini Kit)
(Geneaid, Taiwan)

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) Hirayama, Hiclave HV-50, Japan
- 3.4.2 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) Hermle Labortechnik Z383K, Germany
- 3.4.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (microcentrifuge) Spectrafuge Labnet, 16M, USA
- 3.4.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) ISSCO, HS123, Thailand
- 3.4.5 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (incubator shaker) Gallenkamp, T490188, UK
- 3.4.6 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator) Scientific promotion, Binder control, Japan
- 3.4.7 เครื่องผสมสาร (vortex) Genies 2, USA
- 3.4.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu, UV-1601, Japan
- 3.4.9 คิวเวต (semimicro rectangular 10 mm) Hellma, USA
- 3.4.10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) Perkin Elmer, DNA thermal cycler 480, USA
- 3.4.11 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis system) Advance, Mupid-exu, Japan

เอกสารที่ 3.4.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) Cyberscan, 2000, Singapore ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.13 ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปลงกระดาษเจล (gel documentation analysis) Syngene, BTS-20-M, Germany
- 3.4.14 เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ (Accublock digital dry bath) Labnet, USA
- 3.4.15 ไมโครปิเปต (micropipette)
- 3.4.16 เครื่องแก้วต่างๆ (glasswares)
- 3.4.17 อาร์เอฟไอดีแท็ก (RFID Tag) Silicon Craft Technology Co., Ltd., Thailand
- 3.4.18 เครื่องอ่าน (Reader) Silicon Craft Technology Co., Ltd., Thailand
- 3.4.19 ถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

3.5.1 ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.2 เเคเอ็มไอทีแอลฟิชเทคฟาร์ม (KMITL'S FISH TECH FARM) สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.3 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.4 ห้องปฏิบัติการชีววิทยาระดับโมเลกุล สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีการศึกษา

3.6.1 การเลี้ยงปลา

นำปลานิลน้ำหนักประมาณ 55 กรัม และปลาคุกผสมน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 18 กรัม มาแยกเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร ที่ให้ออกซิเจนตลอดเวลา และให้อาหาร 2 เวลา คือ เช้า และเย็น จากนั้น พักปลาเป็นเวลาอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ เพื่อปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง

3.6.2 การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิลและปลาดุก ลูกผสม

3.6.2.1 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ของปลานิลที่ใช้ในการศึกษาการเพิ่มปริมาณยีนได้รับการอนุเคราะห์จากดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะกุนี ซึ่งมีชื่อไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ส่วนไพรเมอร์ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาดุกลูกผสมนั้นยังไม่ค่อยมีการศึกษามากนัก และจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าไพรเมอร์ของยีนทั้งสองของปลานิลไม่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของปลาดุกลูกผสม จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ จากการค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาดุกลูกผสมจากปลา Channel catfish ปลาซีกเด็ยว ปลานิล และปลาทองจากธนาคารยีน (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) มาแปลเป็นกรดอะมิโน แล้วทำการเปรียบเทียบกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Multiple sequence alignment หรือ <http://www.multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> และหาดำแหน่ง motif ไว้ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ของกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ScanProsite หรือ <http://www.genome.jp/tools/motif/> จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาดุกลูกผสมดังแสดงในตารางที่ 3.1 และซึ่งเรียกการออกแบบไพรเมอร์ตามหลักการนี้ว่า degenerate primer จากการนำไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบมาคำนวณ ค่า Tm และ % GC ด้วยโปรแกรม Oligocalc หรือ <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> พบว่าไพรเมอร์ HSP70F มีค่า Tm เท่ากับ 61 องศาเซลเซียส และ % GC เท่ากับ 61 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ HSP70R มีค่า Tm เท่ากับ 59 องศาเซลเซียส และ % GC เท่ากับ 57 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ β -actinF มีค่า Tm เท่ากับ 54 องศาเซลเซียส และ % GC เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ β -actinR มีค่า Tm เท่ากับ 52 องศาเซลเซียส และ % GC เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น *hsp70* และ β -actin ใน ปลานิลและปลาดุกลูกผสม

Primers	Primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)
Nile Tilapia (Srisapoomee <i>et al.</i> direct submission, Accession number FF28049155139527)		
HSP70F	GAGTCCTACGCCTTCAACATGA	306
HSP70R	ATCTTCAGGGCCTCTTTAGTCC	
β -actinF	GGTCATCACCATTGGCAATG	529
β -actinR	ACTGAAGCCATGCCAATGAG	
Catfish (degenerate primer)		
HSP70F	GGCAC(C/T) TTCGA(C/T)GTGTCCATCCT	415
HSP70R	AT(T/C)TTGGG(G/A)AT(T/G)CGGGT(G/A)GAGCC	
β -actinF	CCTGAACCC(C/T)AA(C/T)AA(A/G)GCCAACA	744
β -actinR	TACTCCTGCTTGCT(G/A)ATCCA	

3.6.2.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำปลานิลและปลาดุกลูกผสมจำนวน 2 ตัวมาตัดเนื้อเยื่อเหงือกทางด้านซีกขวา โดยตัดเหงือกให้มีน้ำหนัก 0.02 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ด้วยชุด Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA) โดยการเปิด digestion solution (ประกอบด้วย Nucleic lysis solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 0.5M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร Proteinase K 20 mg/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ RNase A solution 4 mg/ml ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) ปริมาตร 275 ไมโครลิตร ใส่ลงไปหลอดที่มีเนื้อเยื่อ แล้วบ่มด้วยเครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น ใส่สารละลาย Wizard SV lysis buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ย้าย lysate ใส่ใน Wizard[®] SV minicolumn ที่อยู่ในหลอด collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง แล้วเติม Wizard SV wash solution ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น ทิ้งส่วนใสด้านล่างและล้างคอลัมน์ด้วย Wizard SV wash solution อีก 4 ครั้ง แล้วนำหลอดเปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที และย้าย Wizard® SV minicolumns ใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ หลอดใหม่ เติม nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้น นำสารละลายจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ปริมาณ และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.6.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัมใน ฟลาสก์ที่มีบัฟเฟอร์ Tris-boric-EDTA (TBE) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้อะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกันในตู้ไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้ได้อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเจลดสตาร์ในอัตราส่วนเจลดสตาร์ 1 ส่วนต่ออะกาโรส 10,000 ส่วน เทใส่แม่พิมพ์ทิ้งไว้ให้แข็งแล้วนำเจลมาวางบนอ่าง (chamber) เทบัฟเฟอร์ TBE ลงไปในอ่างจนท่วมเจลดสตาร์ดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาที่ผสมสีย้อมลง ไปให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.6.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *hsp70* และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาตุ๊กตูกผสมมาทำการเพิ่มปริมาณของยีน *hsp70* และยีน β -actin โดยใช้ชุด Kit สำเร็จรูป 2x PCR Enzyme Mastermix solution ของบริษัท Intron biotechnology (Korea) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *hsp70* และ β -actin ของปลานิลและปลาตุ๊กตูกผสม ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีน 50 ไมโครลิตรแสดงดังตารางที่ 3.2 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) (Perkin Elmer, USA) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการข้อ 3.6.2.3 นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap (Syngene BTS-20-M, Germany)

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
2x PCR Enzyme Master Mix	25
ไพรเมอร์ forward (5 มิลลิโมลาร์)	5
ไพรเมอร์ reverse (5 มิลลิโมลาร์)	5
จีโนมิกดีเอ็นเอ (150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	14
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.3 สภาพที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
initial denaturation	95	5 นาที
denaturation	95	30 วินาที
annealing	55	30 วินาที
primer extension	72	1 นาที
final extension	72	10 นาที

3.6.2.5 การสกัด total RNA

นำปลาจำนวน 2 ตัวมาตัดเนื้อเยื่อเหงือกทางด้านซีกขวา โดยตัดเหงือกซี่ที่ 1-2 น้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในไมโครเซ็นทรีฟิวจขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วทำการบดเนื้อเยื่อด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ละเอียด จากนั้นทำการสกัด total RNA ด้วย QIAzol[®] Lysis Reagent (Qiagen, Germany) โดยการเติมสารละลาย QIAzol[®] Lysis Reagent ในหลอดเนื้อเยื่อ แล้วทำการบดซ้ำด้วยน้ำยาอีกรอบ เพื่อให้เนื้อเยื่อที่บดละเอียดผสมกับสารละลาย นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจหลอดใหม่ เติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลาย 3 ชั้น ชั้นล่างสีชมพูเป็นส่วนของเซลล์หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนที่ถูกย่อย ชั้นกลางสีขาวขุ่นเป็นส่วนของดีเอ็นเอ และชั้นบนใส ไม่มีสี เป็นส่วนของ total RNA คุณส่วนใสชั้นบนปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใสในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน RNA นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น คุณไอโซโพรพานอล ออกให้หมด เติมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที คุณแอลกอฮอล์ออกให้หมด แล้วทิ้งให้ RNA แห้ง ละลาย total RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำสารละลาย RNA ไปวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย total RNA ตามวิธี Sambrook and Russel (2001)

3.6.2.6 การเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำ total RNA ที่สกัดได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุมในการทดลองด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) กับไพรเมอร์ที่แสดงในตารางที่ 3.1 ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 3.4 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งตั้งโปรแกรมไว้ 4 ขั้นตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.5 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap (Syngene BTS-20-M, Germany)

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณชิ้น *hsp70* และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ PCR 5 เท่า	10
dNTP mix (10 มิลลิโมลาร์)	2
ไพรเมอร์ forward (5 มิลลิโมลาร์)	5
ไพรเมอร์ reverse (5 มิลลิโมลาร์)	5
Qiagen RT-PCR enzyme mix	2
total RNA (120 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นปราศจาก RNase	25
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.5 สภาพที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น *hsp70* และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
RT reaction	50	30 นาที
initial denaturation	95	15 นาที
denaturation	95	30 วินาที
annealing	55	30 วินาที
primer extension	72	1 นาที
final extension	72	10 นาที

} 30 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2.7 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70*

3.6.2.7.1 การทำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ให้บริสุทธิ์

หลังจากวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ขั้นแรกจะทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR มีความบริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR fragments extraction Kit (Geneaid, Taiwan) ก่อนนำไปทำการเชื่อมกับเวกเตอร์ pDrive โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ DF (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง จากนั้น นำ DF column ใส่ลงใน collection tube ปิดเตาสารละลายดีเอ็นเอที่เดิมบัฟเฟอร์ DF ลงใน DF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที เดิมบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย DF column ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เดิมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที

3.6.2.7.2 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR เข้ากับเวกเตอร์ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนในข้อที่ 3.6.2.7.1 มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive (ภาคผนวก ข) โดยปฏิกิริยา ligation mixture ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 1 เท่า ที่มีเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต pDrive 50 นาโนกรัม ผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR 40 นาโนกรัม และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลาย ligation mixture บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง

3.6.2.7.3 การเตรียม Competent Cell และการทรานสฟอร์มเมชัน

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α 1 โคลนีนีในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน ดูดเซลล์แขวนลอย 0.4 มิลลิลิตร ลงในอาหาร SOB (ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง เติสารละลายเซลล์ใส่ลงในหลอดเซ็นทริฟิวจ์ 100 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กระจายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย RF1 ปริมาตร 33.3 มิลลิลิตร (1 ใน 3 ของปริมาตร SOB) แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น

เอกร
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส กระจายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย RF2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (1 ใน 25 ของปริมาตร SOB) แบ่ง competent cell ที่ได้ใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ligation mixture 10 ไมโครลิตรที่ได้จากข้อ 3.6.2.7.2 ใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มี competent cell วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อมากระจายบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X-Gal ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ นำงานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pDrive ซึ่งมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR จากคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและการทำปฏิกิริยากับ X-Gal และ IPTG โดยเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเกิดจากพลาสมิด pDrive หลังจากที่ได้รับผลิตภัณฑ์ PCR จะสูญเสียคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสเพื่อย่อย X-Gal ให้ได้ผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินจึงทำให้ได้โคโลนีสีขาว

3.6.2.7.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.6.2.7.3 มาเพาะเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุด DNA High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) โดยการถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PD1 (ที่เติม RNaseA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้น เติบบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 10 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที นำ PD column ใส่ลงใน collection tube ปิดฝา สารละลายใสด้านบนใสในหลอด PD column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งสารละลายในหลอด collection tube จากนั้น เติบบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 3 นาที ทิ้งสารละลายในหลอด collection tube และปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สูดถ่ายย้าย PD column ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์ Elution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3.6.2.7.5 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ทำการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากข้อ 3.6.2.7.4 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR โดยใช้ ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดดังแสดงในตารางที่ 3.6 จากนั้น นำหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ถึง 16 ชั่วโมง และตรวจสอบผลการตัดด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการข้อ 3.6.2.3

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	2
พลาสมิดดีเอ็นเอ (200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
BSA (10 เท่า)	2
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	5
ปริมาตรสุทธิ	20

3.6.2.7.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR

ส่งพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์สากล T7 โดยส่งพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็นกรดอะมิโน และนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับโปรตีนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastX

3.6.2.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (จำนวนรอบ) ของการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70*

นำเหงือกปลาจำนวน 2 ตัว มาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสภาวะตามวิธีการข้อที่ 3.6.2.6 และแปรผันจำนวนรอบของการเพิ่มปริมาณยีนเป็น 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

3.6.2.9 การศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน

3.6.2.9.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete random design: CRD) กลุ่มทดลองเป็นเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันเพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีน โดยมี 4 กลุ่ม คือ เหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ แต่ละกลุ่มทดลองใช้จำนวน 4 ซ้ำ

3.6.2.9.2 เนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ ของปลานิลและปลาดุกลูกผสม น้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม มาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสภาวะตามวิธีการข้อที่ 3.6.2.6 และเลือกจำนวนรอบที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อที่ 3.6.2.8 โดยพิจารณาจากค่าที่สามารถเพิ่มขึ้นตามสภาวะการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *hsp70* ได้

3.6.2.9.3 นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

3.6.3 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาอุกกลุ่มผสมที่ระยะเวลาต่างๆ

3.6.3.1 วางแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial experiment

ปัจจัยที่ 1 คือ ระยะเวลาที่ต่างกัน มี 2 ระดับ คือ 30 นาที และ 24 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 2 คือ รูปแบบของผลกระทบต่อความเครียด มี 2 รูปแบบ คือ กลุ่มควบคุม (จับปลาขึ้นมา 30 วินาที แล้วปล่อยเลี้ยงปกติ) และกลุ่มที่ได้รับการฝังแท็ก โดยใช้จำนวน 4 ซ้ำต่อกลุ่มทดลอง

3.6.3.2 นำปลานิลและปลาอุกกลุ่มผสมมาแยกเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร เป็นเวลาอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ เพื่อปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง จากนั้นเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ในการฝัง ได้แก่ แท็ก เครื่องอ่าน แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปากคีบ สำลี โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อแล้วใช้ผ้าชิ้นขนาดเล็กๆ ปิดที่บริเวณส่วนหัว และใช้นิ้วกดบริเวณส่วนหางฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้ครีบหลัง หลังจากฝังแล้ว นำมาพักไว้ในถังน้ำที่สะอาด ให้ออกซิเจนตลอดเวลา แล้วเติมเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการเก็บตัวอย่างเหงือก น้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN[®] Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสถานะตามวิธีการข้อ 3.6.2.6 ในการทดลองนี้จะใช้ปลาที่จับขึ้นมาประมาณ 30 วินาทีแล้วปล่อยกลับไปเลี้ยงตามปกติ โดยไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเป็นกลุ่มควบคุม

3.6.3.3 นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

จากการทดลองในขั้นตอนนี้ เบื้องต้นทราบได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของความเครียดเกิดในระยะเวลาสั้น ในขณะที่ภาพรวมของรูปแบบของการได้รับผลกระทบทั้งจากการฝังแท็กและการจับปลาส่งผลไม่แตกต่างกัน รวมทั้งในส่วนของระยะเวลาและรูปแบบไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ทำให้ในการทดลองต่อไปจะทำการแยกวิเคราะห์ด้วยแผนการทดลองแบบ CRD ในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกันของการได้รับผลกระทบความเครียดต่างกัน

3.6.4 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุกอุกผสม

3.6.4.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในแต่ละระดับการแสดงออกที่ 30 นาทีและ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยกลุ่มทดลองเป็นรูปแบบของผลกระทบต่อความเครียด มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่มการจับปลา และกลุ่มที่ได้รับการฝังแท็กเข้าช่องท้อง และกล้ามเนื้อ ตามลำดับ โดยใช้จำนวน 4 ซ้ำต่อกลุ่มทดลอง

3.6.4.2 นำปลานิลและปลาดุกอุกผสมมาแยกเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร เป็นเวลาอย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ เพื่อปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง นำปลานิลและปลาดุกอุกผสมมาทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยใช้ผ้าผืนเล็กๆ ปิดที่บริเวณส่วนหัวและฝังที่ตำแหน่งช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้ครีบหลัง (ภาพที่ 3.2) แล้วทำการเก็บตัวอย่างเหงือกทางด้านซีกขวา โดยตัดเหงือกซี่ที่ 1-2 น้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นปลาที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก จากนั้น นำเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 นำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสถานะตามวิธีการข้อ 3.6.2.6

3.6.4.3 นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap



ภาพที่ 3.2 ตำแหน่งการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลานิล (ก) และปลาดุกอุกผสม (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.5 การศึกษาผลของการใช้ยาสลับก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท้ต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาอุกผสม

3.6.5.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในแต่ละระดับของการแสดงออกที่ 30 นาที และ 24 ชั่วโมง และกลุ่มทดลองเป็นรูปแบบของผลกระทบต่อความเครียด มี 3 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม วางยาสลับ และไม่ได้วางยาสลับ ตามลำดับ โดยใช้จำนวน 4 ซ้ำต่อกลุ่มทดลอง

3.6.5.2 นำปลานิลและปลาอุกผสมที่เตรียมไว้มาทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท้ โดยเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ ในการฝัง และวิธีการฝังอาร์เอฟไอดีแท้และเลือกตำแหน่งการฝังที่เหมาะสม จากการทดลองในข้อ 3.6.4 โดยก่อนทำการฝังจะใส่ยาสลับ 3-aminobenzoic acid ethylester (MS222) ความเข้มข้น 100 ppm ลงไปในน้ำในถังขนาด 25 ลิตร แล้วใส่ปลาไปในน้ำที่ผสมยาสลับ เมื่อปลาไม่มีอาการตอบสนอง คือปลามีอัตราการหายใจแผ่วปิดเหงือกช้า และไม่สม่ำเสมอ จะทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท้เพื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ที่ไม่ใส่ยาสลับก่อนฝัง และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกทางด้านซีกขวา โดยตัดเหงือกซี่ที่ 1-2 น้ำหนัก 0.1 กรัม หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท้ที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นปลาที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท้ นำเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 นำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสภาวะตามวิธีการข้อ 3.6.2.6

3.6.5.3 นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

3.6.6 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท้ต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาอุกผสมโดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีในบ่อที่ให้ออกซิเจน หรือโอโซน ตลอดเวลา

3.6.6.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในแต่ละระดับของระดับการแสดงออกที่ 30 นาทีและ 24 ชั่วโมง และกลุ่มทดลองเป็นรูปแบบของผลกระทบต่อความเครียด มี 3 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม ได้รับออกซิเจน และได้รับโอโซน ตามลำดับ โดยใช้จำนวน 4 ซ้ำต่อกลุ่มทดลอง

3.6.6.2 นำปลานิลและปลาดุกผสมที่เตรียมไว้มาทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลือกตำแหน่งการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.6.5 หลังจากการฝังจะทำการเลี้ยงในถังที่ให้ออกซิเจน หรือโอโซนตลอดเวลา จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกทางด้านซีกขวา โดยตัดเหงือกซี่ที่ 1-2 นำหนักประมาณ 0.1 กรัม หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นปลาที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก แล้วนำเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสภาวะตามวิธีการข้อ 3.6.2.6

3.6.6.3 นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

3.6.7 การศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุกผสมโดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่อุณหภูมิต่างกัน

3.6.7.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในแต่ละของระดับการแสดงออกที่ 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มี 4 กลุ่มทดลอง คือ ควบคุม กลุ่มที่ได้รับความร้อนนาน 30 นาที กลุ่มที่ได้รับความร้อนนาน 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยใช้จำนวน 4 ซ้ำต่อกลุ่มทดลอง

3.6.7.2 นำปลานิลและปลาดุกผสมที่เตรียมไว้มาทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลาจากการทดลองในข้อ 3.6.5 หลังจากการฝังจะทำการเลี้ยงปลาในถังที่อุณหภูมิปกติ คือ 28-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง คือ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกทางด้านซีกขวา โดยตัดเหงือกซี่ที่ 1-2 นำหนักประมาณ 0.1 กรัม หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นปลาที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก แล้วนำเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA ตามวิธีในข้อ 3.6.2.5 จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit โดยใช้ปริมาณสารและสภาวะตามวิธีการข้อ 3.6.2.6

3.6.7.3 นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการในข้อ 3.6.2.3 และนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพด้วยโปรแกรม GeneSnap

3.6.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.6.8.1 การวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR

วิเคราะห์ความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ด้วยโปรแกรม Genetools (Syngene BTS-20-M, Germany) โดยเปรียบเทียบกับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (Invitrogen, USA) โดยมีหน่วยเป็นนาโนกรัม (ตามหน่วยของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ทำการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเทียบอัตราส่วนระหว่างยีน *hsp70* ต่อยีน β -actin หรือเรียกว่าการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70*

3.6.8.1 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีน *hsp70*

วิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี one way anova ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver.5.02 (Systat, 1990) ยกเว้นการทดลองในข้อ 3.6.3 วิเคราะห์วิธี two way anova เมื่อพบว่ากลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันจึงจะทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี BONFERRONI ADJUSTMENT ด้วยโปรแกรมดังกล่าว

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการนำปลานิลจากเคเอ็มไอทีแอลฟิชเทคฟาร์ม (KMITL'S FISH TECH FARM) และปลาดุกลูกผสมจากศูนย์ปรับปรุงพันธุกรรมน้ำจืด บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) มาแยกเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร แล้วทำการศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน *hsp70* ได้แก่ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการทำ RT-PCR และศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน เพื่อทดสอบไพรมอร์ที่ออกแบบ การเลือกเนื้อเยื่อ และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ในการทดลองขั้นต่อไป จากนั้นนำปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยการปรับสภาวะการฝังและการเลี้ยงปลาหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่างๆ ได้แก่ การฝังที่เวลาต่างๆ ตำแหน่งการฝัง การใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฝัง การเลี้ยงด้วยออกซิเจนและโอโซน และการเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติและอุณหภูมิสูงด้วยเทคนิค RT-PCR โดยทำการสกัด total RNA แล้วทำการเปลี่ยน total RNA เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วนำ cDNA ไปทำปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติของปริมาณการแสดงออกของยีน *hsp70* ของแต่ละสภาวะ เพื่อให้ได้เทคนิคที่เหมาะสมในการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและเทคนิคการเลี้ยงปลาหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลานิลและปลาดุกลูกผสม

4.1 ผลการศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุก ลูกผสม

4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาดุกลูกผสม

จากการนำปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาเพาะเลี้ยงในถังขนาด 300 ลิตร และนำมาตัดเนื้อเยื่อเหงือก 0.02 กรัม ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเหงือก แล้วตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 45 นาที นำเจลมาส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และ

เปรียบเทียบขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิล และปลาอุกถูกผสมมีขนาดประมาณ 23,130 คู่เบส และจากการคำนวณพบว่าดีเอ็นเอของปลานิลและปลาอุกถูกผสมมีความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาอุกถูกผสมที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากปรากฏแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ไม่มีรอยปื้นของแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่ถูกละลาย และไม่ปรากฏแถบของอาร์เอ็นเอที่อยู่ด้านล่างของแผ่นเจล จากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และ β -actin ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันต่อไป



ภาพที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาอุกถูกผสมจากการวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

1 จีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิล

2 จีโนมิกดีเอ็นเอของปลาอุกถูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และ β -actin ของปลานิลและปลาดุกลูกผสมด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และ β -actin ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังวิธีการในข้อ 3.6.2.4 ใช้คู่ไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.1 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) ที่ 55 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิล มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส และ 700 คู่เบส และผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาดุกลูกผสม มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และ 1,000 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder ซึ่งจากการออกแบบไพรเมอร์ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ควรที่จะมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส และ 500 คู่เบส ในปลานิล และมีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และ 700 คู่เบส ในปลาดุกลูกผสม

จากภาพที่ 4.2 จะเห็นว่าแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุกลูกผสมมีขนาดที่ตรงกับขนาดของยีนที่คาดว่าจะได้จากการออกแบบไพรเมอร์ ส่วนแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน β -actin ทั้งในปลานิลและปลาดุกลูกผสมมีขนาดที่สูงกว่าขนาดของยีนที่คาดว่าจะได้จากการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบจะมีในส่วนของ intron เข้าแทรกอยู่ได้

4.1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA

จากการนำปลานิล และปลาดุกลูกผสม มาตัดเนื้อเยื่อเหงือกและนำเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA แล้วตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ total RNA ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร พบว่า total RNA ของปลานิลมีความเข้มข้น 120 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่าความบริสุทธิ์จากการหาค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.95 และพบว่า total RNA ของปลาดุกลูกผสมมีความเข้มข้น 180 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 2.01 แสดงให้เห็นว่า total RNA ที่สกัดได้จากปลานิลและปลาดุกลูกผสมมีความบริสุทธิ์

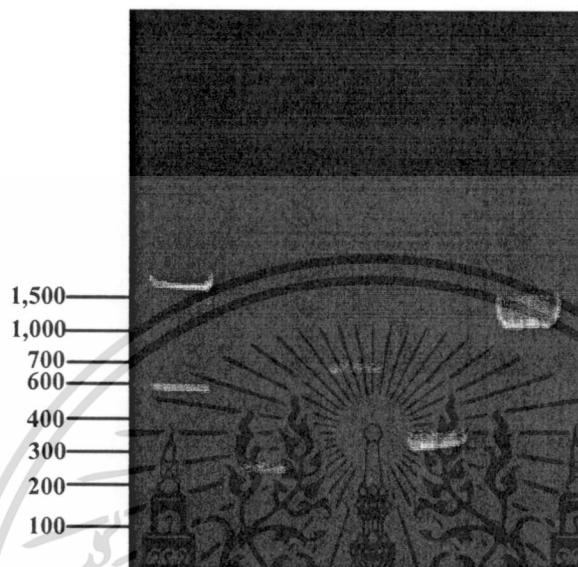
เนื่องจากมีค่าใกล้เคียง 1.8-2.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sambrook and Russel (2001) และ Kalp (2002) พบว่าสารพันธุกรรมที่มีความบริสุทธิ์ เมื่อมีค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสง 260

เอกลำนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้า เสนอญาติเห็นาใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.8-2.0 จากนั้น นำ total RNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และ β -actin ด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

ขนาด (คู่เบส) M 1 2 3 4



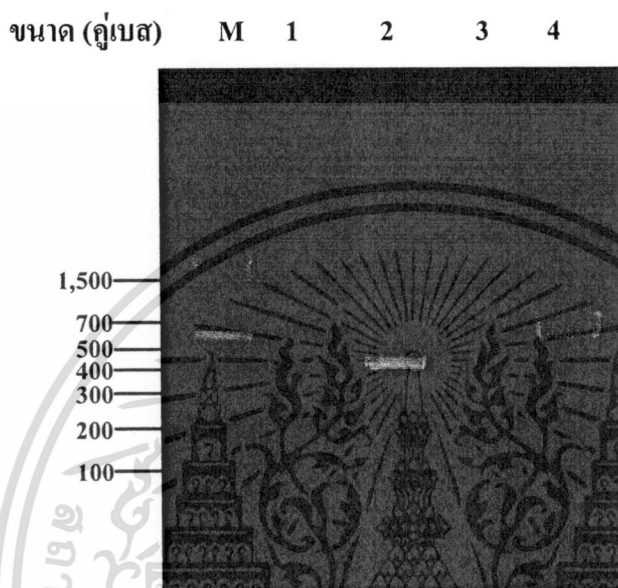
ภาพที่ 4.2 ผลผลิต PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin เมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของปลานิลและปลาตุ๊กตาสวมเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder
- 1 แถบผลผลิต PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิล
 - 2 แถบผลผลิต PCR ของยีน β -actin ของปลานิล
 - 3 แถบผลผลิต PCR ของยีน *hsp70* ของปลาตุ๊กตาสวม
 - 4 แถบผลผลิต PCR ของยีน β -actin ของปลาตุ๊กตาสวม

4.1.4 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และ β -actin ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

จากการนำ total RNA ที่สกัดจากปลานิลและปลาตุ๊กตาสวมมาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit (Qiagen, Germany) โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังวิธีการในข้อ 3.6.2.6 กับคู่ไพรเมอร์ตามตารางที่ 3.1 และใช้อุณหภูมิในการจับตัว (annealing temperature) ที่ 55 องศาเซลเซียส นำผลผลิต RT-PCR ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder พบว่า ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิล มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส และ 500 คู่เบส ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาอุกถูกผสม มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และ 700 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin เมื่อใช้ total RNA ของปลานิลและปลาอุกถูกผสมเป็นแม่แบบในการทำ RT-PCR

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิล

2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน β -actin ของปลานิล

3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ของปลาอุกถูกผสม

4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน β -actin ของปลาอุกถูกผสม

จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ที่ได้คือยีน *hsp70* ของปลานิลและปลาอุกถูกผสมและสามารถนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาอุกถูกผสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาอุกอุกผสม

นำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ที่ได้จากข้อ 4.1.3 และ 4.1.4 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย ชุด Gel/PCR fragments extraction Kit (Geneaid, Taiwan) จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน, X-gal และ IPTG จากนั้น สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastX

4.1.5.1 ผลการเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* เข้ากับพลาสมิด pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α

จากการนำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของยีน *hsp70* ซึ่งมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส ในปลานิล และ 400 คู่เบส ในปลาอุกอุกผสม ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส โดยใช้เอนไซม์ T4 ligase และทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้รับการทรานสฟอร์มจากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทำปฏิกิริยากับ X-gal และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เวกเตอร์ pDrive มียีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินและมีบริเวณ multiple cloning site อยู่ในยีนที่สร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ซึ่งเอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยากับ X-gal เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน เมื่อเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ลงไปที่ตำแหน่ง multiple cloning site จึงทำให้ยีนดังกล่าวไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ ส่งผลทำให้ไม่สามารถย่อย X-gal ทำให้โคโลนีที่ได้เป็นสีขาว

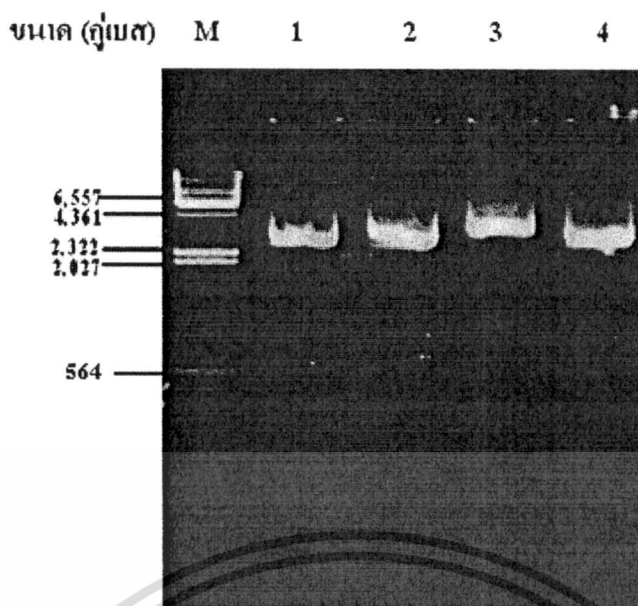
จากการทรานสฟอร์มเมชันพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR มีจำนวนโคโลนีสีขาวเท่ากับ 234 และ 746 โคโลนี ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชันเท่ากับ 1.26×10^6 CFU/ μ g DNA ตามลำดับ จากนั้น คัดเลือกโคโลนีสีขาวอย่างละ 1 โคโลนี มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

4.1.5.2 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

จากการนำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการทรานสฟอร์มเมชันมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ DNA High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR ของปลานิลและปลาฉลามผสมว่า pG.nile และ pG.catfish ตามลำดับ และตั้งชื่อพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของปลานิลและปลาฉลามผสมว่า pRT.nile และ pRT.catfish ตามลำดับ นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร พบว่าขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลและปลาฉลามผสมมีขนาดใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 300 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อเชื่อมผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR เข้ากับพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส จึงทำให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

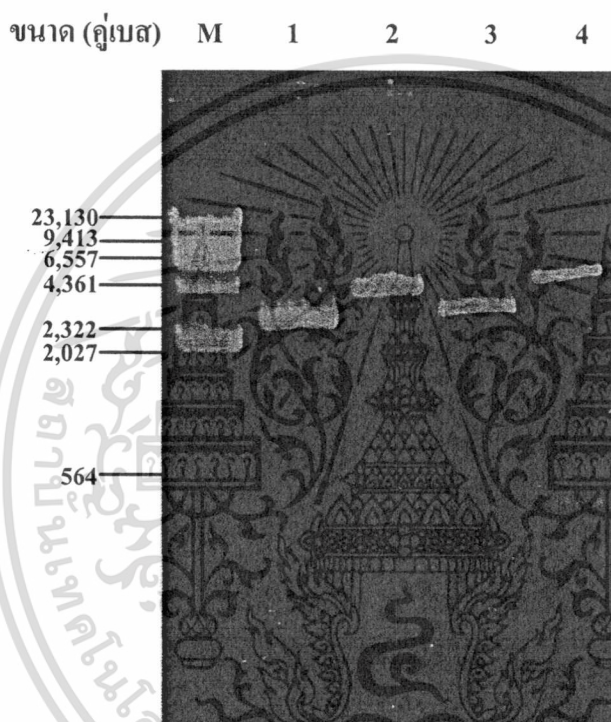
- 1 พลาสมิด pG.nile
- 2 พลาสมิด pG.catfish
- 3 พลาสมิด pRT.nile
- 4 พลาสมิด pRT.catfish

4.1.5.3 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำ

จำเพาะ *Eco*RI

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการตัดไปวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมกับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pG.nile และ pRT-nile ที่มีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิล เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 3,800 และ 300 กุ่มเบส (ภาพที่ 4.5 และ 4.6 เลนที่ 2) และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pG.catfish และ pRT-catfish ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของ

ยีน *hsp70* ของปลา เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่มีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส และ 400 คู่เบส (ภาพที่ 4.5 และ 4.6 เลนที่ 4) โดยแถบแรกแถบของพลาสมิด pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ส่วนแถบที่สองเป็นแถบของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ที่มีขนาด 300-400 คู่เบส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตัดพลาสมิดทั้งสี่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์และพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสี่มีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ที่ต้องการ จึงนำพลาสมิดทั้งสี่มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

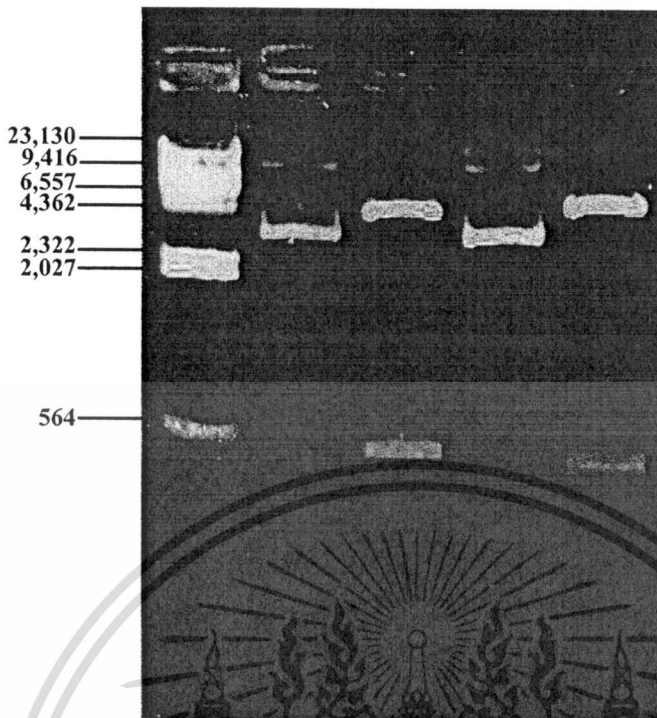


ภาพที่ 4.5 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
- 1 พลาสมิด pG.nile
- 2 พลาสมิด pG.nile ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- 3 พลาสมิด pG.catfish
- 4 พลาสมิด pG.catfish ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด (คู่เบส) M 1 2 3 4



ภาพที่ 4.6 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

- M ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
- 1 พลาสมิด pRT.nile
- 2 พลาสมิด pRT.nile ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
- 3 พลาสมิด pRT.cattfish
- 4 พลาสมิด pRT.cattfish ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

4.1.5.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70*

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลและปลาอุกผสม มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer ใช้ไพรเมอร์ T7 ซึ่งเป็นไพรเมอร์สากลในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โครมาโทแกรมที่ได้แสดงในภาคผนวก ค พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pG.nile และ pRT.nile ที่มีขนาดเท่ากันคือ 306 คู่เบส (ภาพที่ 4.7) และขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pG.catfish และ pRT.catfish ที่มีขนาดเท่ากันคือ 415 คู่เบส (ภาพที่ 4.8) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR และ RT-PCR เหมือนกันในยีน *hsp70* ของปลาชนิดเดียวกัน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาคูกลูกผสมมาแปลเป็นกรดอะมิโนจะได้กรดอะมิโนทั้งสิ้น 102 และ 138 อะมิโน ตามลำดับ จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BlastX พบว่าลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของพลาสมิด pG.nile และ pRT.nile มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของสปีชีส์ปลานิล *Oreochromis* sp. ถึงร้อยละ 98-99 และมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ในปลา *Seriola quinqueradiata*, *Lutjanus sanguineus*, *Sciaenops ocellatus*, *Oryzias latipes* และ *Danio rerio* ถึงร้อยละ 80-86 (ตารางที่ 4.1) และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของพลาสมิด pG.catfish และ pRT.catfish มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลาสายพันธุ์ *Ctenopharyngodon idella*, *Megalobrama amblycephala*, *Gobiocypris rarus*, *Tanichthys albonubes*, *Danio rerio*, *Sciaenops ocellatus* และ *Dentex dentex* ร้อยละ 96-97 (ตารางที่ 4.2) แต่ไม่พบความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลาในตระกูลเดียวกันกับปลาคูกลูกผสม

HSP70F

1	GAG TCC TAC GCC TTC AAC ATG AAG	AGC	AGC	30
	E S Y A F N M K	S	S	
31	GTG CAG GAC GAC AAC CTG AAG GGC AAA ATC	60		
	V Q D D N L K G K I			
61	AGC GAG GAG GAC AAG AAG AAG GTG GTG GAG	90		
	S E E D K K K V V E			
91	AAA TGT GAC GAG GCC ATC GCC TGG CTG GAG	120		
	K C D E A I A W L E			
121	AAC AAC CAG CTG GCT GAT AAA GAG GAG TAC	150		
	N N Q L A D K E E Y			
151	CAA CAC AAG CAG AAA GAG CTG GAG AAA GTG	180		
	Q H K Q K E L E K V			
181	TGC AAC CCC ATC ATC AGC AAG CTG TAT CAG	210		
	C N P I I S K L Y Q			
211	GGA GGG AAG CCC ACT GGT GCT ACC TGT GGA	240		
	G G K P T G A T C G			
241	GAG CAG GCA CGA GCC GGC TCC CAG GGG CCC	270		
	E Q A R A G S Q G P			
	HSP70R			
271	ACT ATT GAG GAG GTG GAC TAA AGA GGC CCA	300		
	T I E E V D STOP R G L			
301	GAA GAT	306		
	E D			

ภาพที่ 4.7 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิด pG.nile และ pRT-nile กรอบสี่เหลี่ยมสีเทาแสดงถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ HSP70F และ HSP70R

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HSP70F											
1	ACT	TTC	GAT	GTG	TCC	ATC	CTG	ACC	ATT	GAA	30
	T	F	D	V	S	I	L	T	I	E	
31	GAT	GGC	ATC	TTT	GAA	GTG	AAA	GCC	ACA	GCA	60
	D	G	I	F	E	V	K	A	T	A	
61	GGA	GAC	ACT	CAC	CTG	GGT	GGA	GAA	GAT	TTT	90
	G	D	T	H	L	G	G	E	D	F	
91	GAC	AAT	CGC	ATG	GTC	AAC	CAC	TTT	GTG	GAG	120
	D	N	R	M	V	N	H	F	V	E	
121	GAA	TTC	AAA	AGG	AAG	CAC	AAG	AAA	GAC	ATC	150
	E	F	K	R	K	H	K	K	D	I	
151	AGC	CAG	AAC	AAG	CGA	GCC	CTG	AGG	AGG	CTG	180
	S	Q	N	K	R	A	L	R	R	L	
181	CGT	ACA	GCA	TGT	GAG	AGA	GCC	AAG	AGA	ACA	210
	R	T	A	C	E	R	A	K	R	T	
211	CTG	TCT	TCC	AGC	TCT	CAA	GCC	AGC	ATT	GAA	240
	L	S	S	S	S	Q	A	S	I	E	
241	ATT	GAC	TCT	CTT	TAC	GAA	GGG	ACC	GAC	TTT	270
	I	D	S	L	Y	E	G	T	D	F	
271	TAC	ACC	TCC	ATC	ACC	AGA	GCA	CGC	TTT	GAG	300
	Y	T	S	I	T	R	A	R	F	E	
301	GAG	TTG	TGT	TCA	GAC	CTG	TTC	AGA	GGA	ACA	330
	E	L	C	S	D	L	F	R	G	T	
301	CTA	GAG	CCG	GTG	GAG	AAA	GCC	CTG	AGA	GAT	360
	L	E	P	V	E	K	A	L	R	D	
361	GCC	AAG	ATG	GAC	AAA	TCC	CAG	ATC	CAT	GAA	390
	A	K	M	D	K	S	Q	I	H	E	
HSP70R											
391	ATT	GTC	CTG	GTT	GGA	GGC	TCC	AAA	T		415
	I	V	L	V	G	G	S	K			

ภาพที่ 4.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในพลาสมิด pG.catfish และ pRT-catfish กรอบสี่เหลี่ยมสีเทาแสดงถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ HSP70F และ HSP70R

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* จากผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในปลาสมิค pG.nile และ pRT.nile เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastX

ลำดับ	สายพันธุ์	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
1	<i>Oreochromis niloticus</i>	99
2	<i>Oreochromis niloticus</i>	99
3	<i>Oreochromis mossambicus</i>	99
4	<i>Oreochromis aureus</i>	98
5	<i>Oreochromis niloticus</i>	98
6	<i>Seriola quinqueradiata</i>	86
7	<i>Lutjanus sanguineus</i>	82
8	<i>Sciaenops ocellatus</i>	82
9	<i>Oryzias latipes</i>	82
10	<i>Danio rerio</i>	80

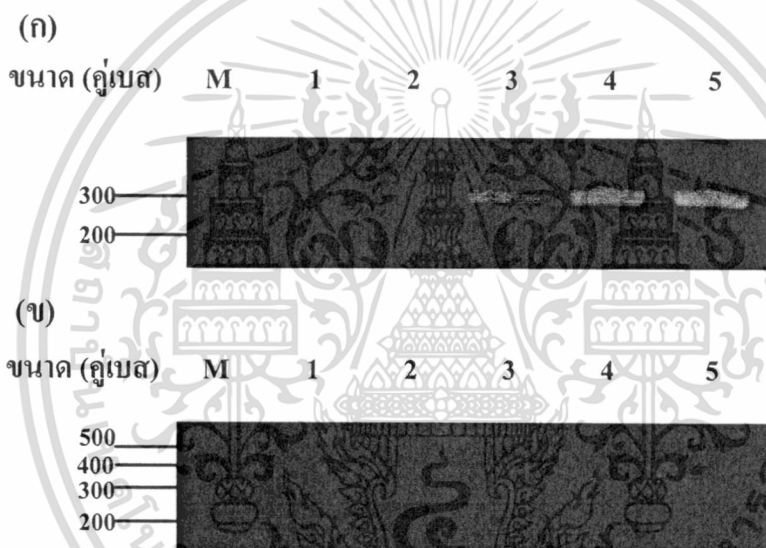
ตารางที่ 4.2 ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* จากผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ในปลาสมิค pG.catfish และ pRT.catfish เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastX

ลำดับ	สายพันธุ์	ความคล้ายคลึง (เปอร์เซ็นต์)
1	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	97
2	<i>Megalobrama amblycephala</i>	97
3	<i>Sciaenops ocellatus</i>	97
4	<i>Dentex dentex</i>	97
5	<i>Gobiocypris rarus</i>	96
6	<i>Tanichthys albonubes</i>	96
7	<i>Danio rerio</i>	96
8	<i>Danio rerio</i>	96
9	<i>Danio rerio</i>	96
10	<i>Danio reio</i>	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 ผลการศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการนำปลานิลน้ำหนักประมาณ 55 กรัม และปลาดุกลูกผสมน้ำหนักประมาณ 18 กรัม มาเพาะเลี้ยงและปรับสภาพให้พร้อมก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการตัดเนื้อเยื่อเหงือกมาสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit ที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ทุกจำนวนรอบที่ทำการศึกษา โดยความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เข้มน้อยที่สุดที่จำนวน 20 รอบ และเข้มมากขึ้นตามจำนวนรอบที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ในปลานิล (ก) และ ปลาดุกลูกผสม (ข)

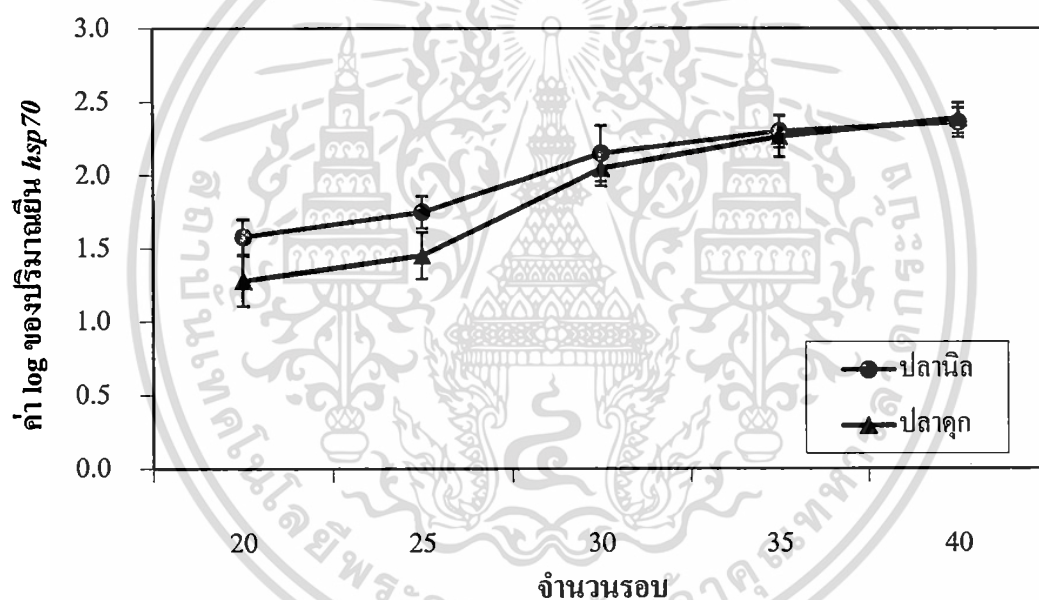
M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ที่จำนวนรอบ 20 รอบ
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ที่จำนวนรอบ 25 รอบ
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ที่จำนวนรอบ 30 รอบ
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ที่จำนวนรอบ 35 รอบ
- 5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* ที่จำนวนรอบ 40 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Genetools และนำค่าที่ได้มาใส่ค่า log เพื่อหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR พบปริมาณค่า log ของยีน *hsp70* ที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ ในปลานิลมีค่าเท่ากับ 1.58 ± 0.120 , 1.75 ± 0.113 , 2.15 ± 0.191 , 2.30 ± 0.113 และ 2.36 ± 0.099 ตามลำดับ และค่า log ของยีน *hsp70* ที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ ในปลาคูกลูกผสมมีค่าเท่ากับ 1.28 ± 0.173 , 1.45 ± 0.159 , 2.05 ± 0.119 , 2.27 ± 0.141 และ 2.39 ± 0.106 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10)

จากภาพที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าจำนวนรอบที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR คือ 30 รอบ เนื่องจากมีค่าการแสดงออกของยีน *hsp70* ปานกลางระหว่างค่าต่ำสุด (20 รอบ) และค่าสูงสุด (40 รอบ) โดยค่านี้สามารถเพิ่มขึ้นตามสภาวะการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *hsp70* ได้ ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกจำนวนรอบที่ 30 ในการทำ RT-PCR

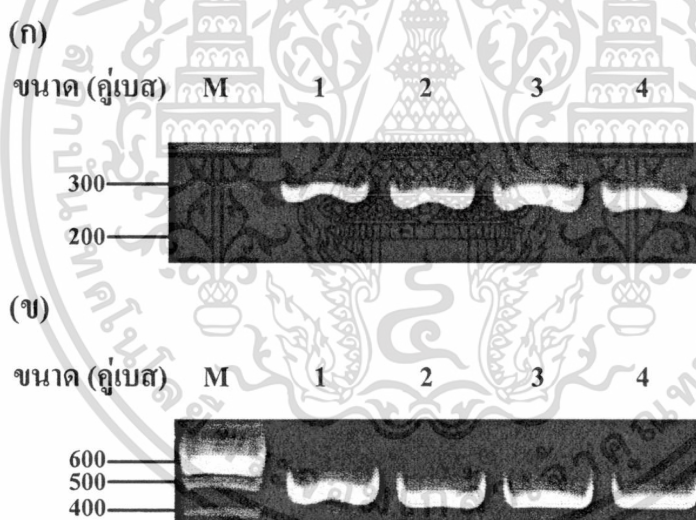


ภาพที่ 4.10 ค่า log จากการเพิ่มปริมาณของยีน *hsp70* ของปฏิกิริยา RT-PCR ในปลานิล และปลาคูกลูกผสม ที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ

4.1.7 ผลการแสดงผลของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน

4.1.7.1 ผลการศึกษาการแสดงผลของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันของปลาไนล

จากการนำปลาไนลที่เพาะเลี้ยงและปรับสภาพให้พร้อมก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มาทำการตัดเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ และสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร นำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุมที่ใช้ในการทดลองด้วยชุด QIAGEN[®] Onestep RT-PCR Kit ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ของทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา โดยแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของเนื้อเยื่อไตมีความเข้มมากที่สุด รองลงมาคือกล้ามเนื้อ ตับ และเหงือกตามลำดับ (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อของปลาไนล

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อเหงือก

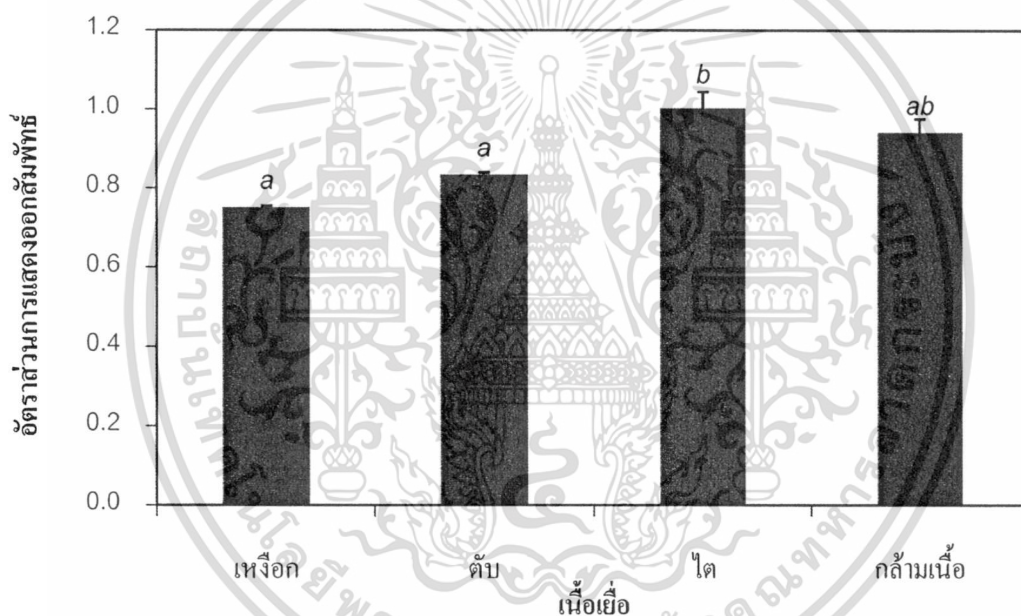
2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อตับ

3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อไต

4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.11 เมื่อวัดความแตกต่างระหว่างการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดโดยการเทียบอัตราส่วนระหว่างยีน *hsp70* ต่อยีน β -actin (อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70*) พบว่ามีอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70* เท่ากับ 0.75 ± 0.004 , 0.84 ± 0.005 , 1.00 ± 0.041 และ 0.94 ± 0.034 ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไตและกล้ามเนื้อตามลำดับ (ภาพที่ 4.12) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver.5.02 พบว่าเนื้อเยื่อไตมีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือกและตับ (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อของปลาชนิด โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

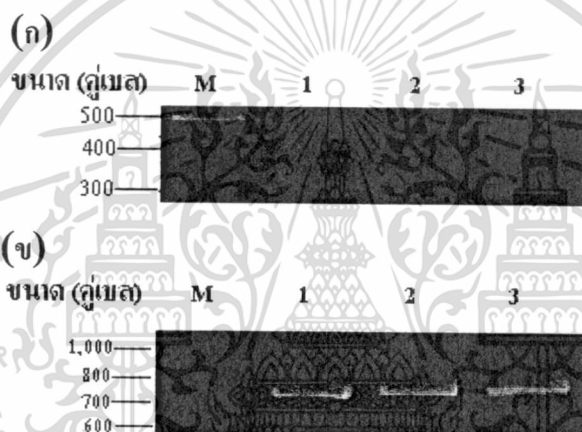
4.1.7.2 ผลการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันของปลาดุกลูกผสม

จากการนำปลาดุกลูกผสมมาเพาะเลี้ยงและปรับสภาพให้พร้อมก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำมาทำการตัดเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไตและกล้ามเนื้อ นำเนื้อเยื่อมาสกัด total RNA และตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำ total

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุมในการทดลอง ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือก ดับและไต แต่ไม่ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของเนื้อเยื่อทั้งสามมีความเข้มของแถบที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.13)

จากภาพที่ 4.13 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 0.47 ± 0.034 , 0.48 ± 0.031 และ 0.28 ± 0.034 ในเนื้อเยื่อเหงือก ดับ และไต ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีนโดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือก ดับ และไต ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.13 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในเนื้อเยื่อเหงือก ดับ ไต และกล้ามเนื้อ ของปลาดุกลูกผสม

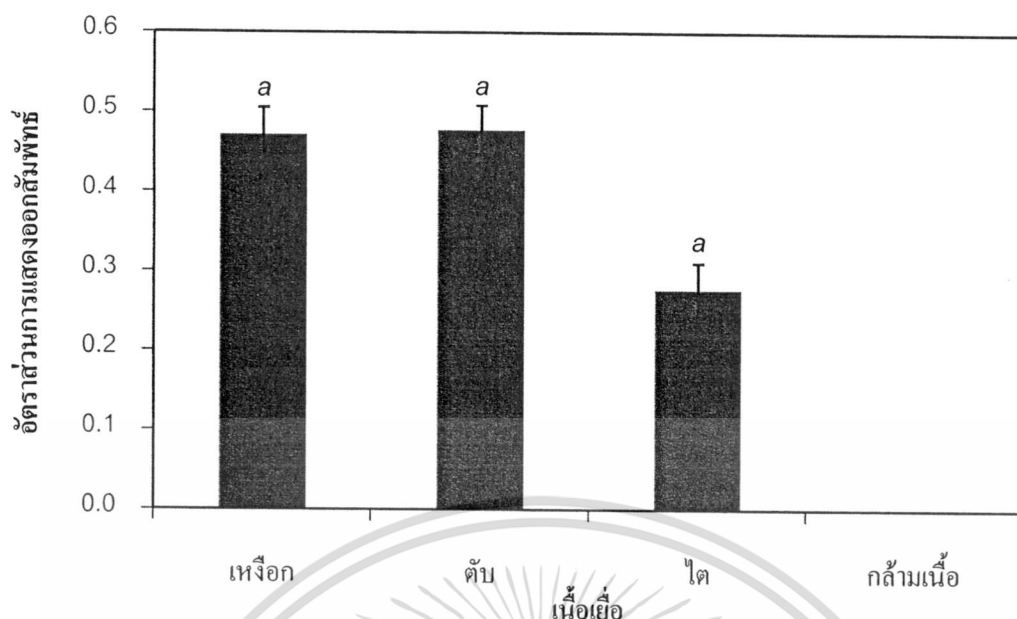
M คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อเหงือก

2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อดับ

3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อไต

4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ



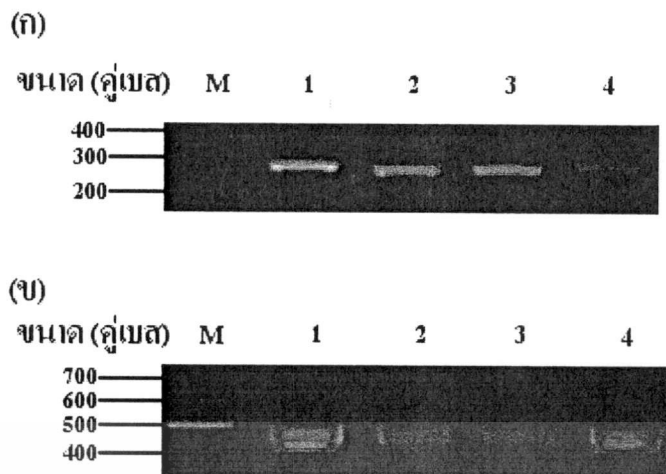
ภาพที่ 4.14 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อหัวใจ ตับ ใจ และกล้ามเนื้อของปลาคุณ
ลูกผสม โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($p \leq 0.05$)

4.2 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่ระยะเวลาต่างๆ

4.2.1 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่ระยะเวลาต่างๆ ในปลาชนิด

จากการนำปลานิลมาปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง ทำการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กบริเวณช่องท้อง แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหัวใจ หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มควบคุม ทำการจับปลาขึ้นมาเช่นกัน แต่ไม่ทำการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ก หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหัวใจ หลังจากปล่อยที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาสกัด total RNA และนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิลทั้งในกลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ก โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลกลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กเวลา 30 นาที มีความเข้มแถบมากที่สุด และแถบเริ่มจางลงในกลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

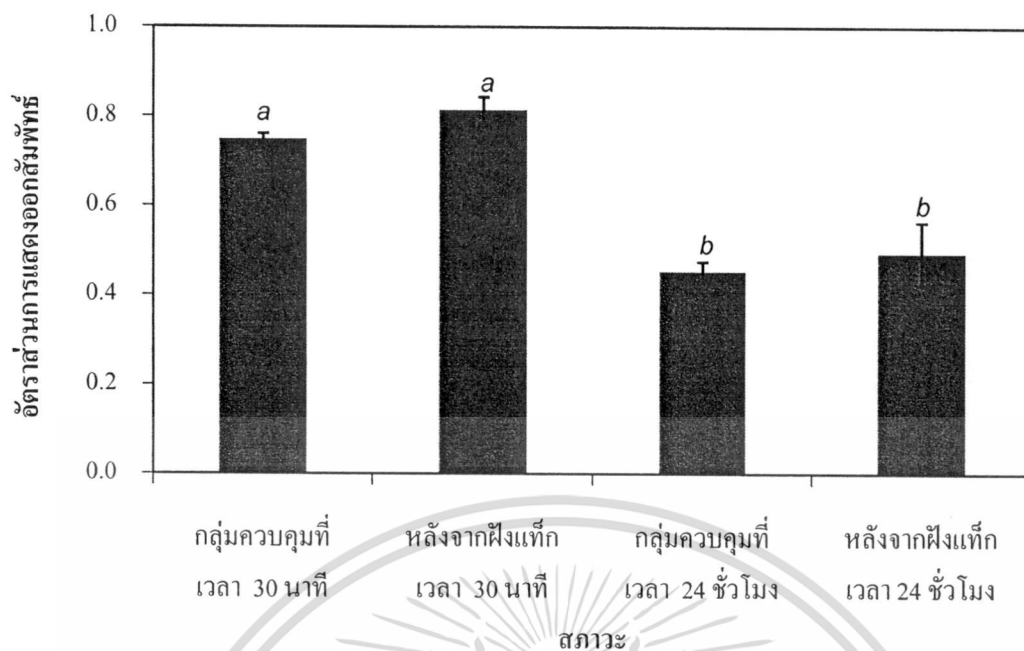


ภาพที่ 4.15 ผลผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในปลานิลกลุ่มควบคุมและปลานิลหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก M คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลกลุ่มควบคุมที่เวลา 30 นาที
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิล หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิล หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.15 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพันธ์พบว่าอัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพันธ์เท่ากับ 0.75 ± 0.021 , 0.82 ± 0.028 , 0.45 ± 0.022 และ 0.49 ± 0.070 ในปลานิลกลุ่มควบคุมที่เวลา 30 นาที ปลานิลหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที ปลานิลกลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง และปลานิลหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงผลออกของยีน *hsp70* พบว่าปลานิลกลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที มีการแสดงผลออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลกลุ่มควบคุมและหลังการฝังแท็กที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

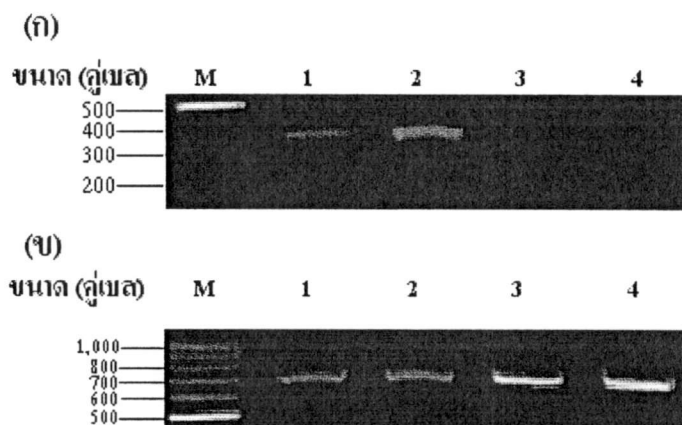


ภาพที่ 4.16 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลกลุ่มควบคุมและหลังจากฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.2.2 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่ระยะเวลาต่างๆ ในปลาอุกอุกผสม

จากการนำปลาอุกอุกผสมมาปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง ทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้อง แล้วทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มควบคุม ทำการจับปลาขึ้นมาเช่นกัน แต่ไม่ทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังจากปล่อยที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาสกัด total RNA นำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit พบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาอุกอุกผสมทั้งในกลุ่มควบคุมและปลาอุกอุกผสมหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาอุกอุกผสมในกลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเวลา 30 นาทีมีความเข้มแถบมากที่สุด และแถบเริ่มจางลงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



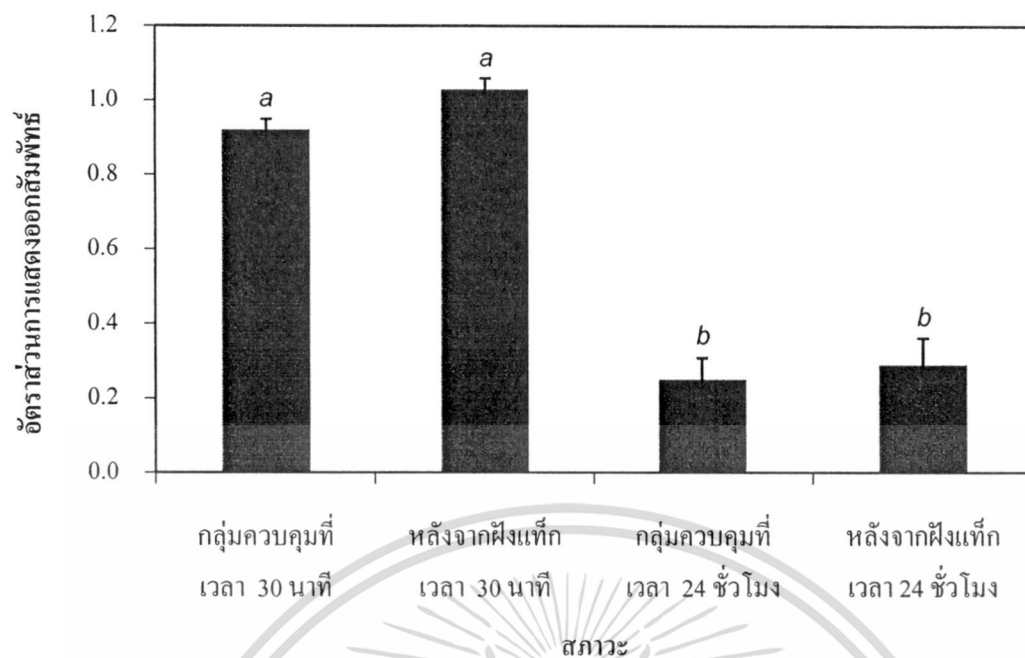
ภาพที่ 4.17 ผลผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ *B-actin* (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ในปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก

M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน *B-actin* ในปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมที่เวลา 30 นาที
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน *B-actin* ในปลาตุ๊กตากลุ่ม หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน *B-actin* ในปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน *B-actin* ในปลาตุ๊กตากลุ่ม หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 24 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.17 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 0.92 ± 0.028 , 1.03 ± 0.028 , 0.25 ± 0.057 และ 0.29 ± 0.071 ในปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมที่เวลา 30 นาที ปลาตุ๊กตากลุ่มหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ที่เวลา 30 นาที ปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมที่เวลา 24 ชั่วโมง และปลาตุ๊กตากลุ่ม หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีน *hsp70* พบว่าปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมและหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเวลา 30 นาที มีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมและหลังการฝังแท็กเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาตุ๊กตากลุ่มควบคุมและหลังจากฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3 ผลของการฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70*

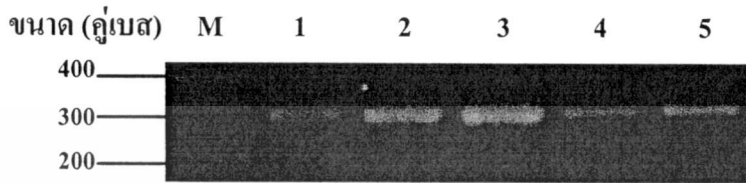
4.3.1 ผลของการฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิล

จากการนำปลานิลที่มีน้ำหนักประมาณ 55 กรัม มาพักในบ่ออย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ แล้วฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งช่องท้อง และกล้ามเนื้อได้โคนครีบหลัง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังจากการฝังกึ่งที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัด total RNA และตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit เพื่อดูการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลที่ฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งการฝังกึ่งที่ต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งช่องท้อง และกลุ่มที่ฝังกึ่งอาร์เอฟไอดีที่ตำแหน่งช่องท้อง และกล้ามเนื้อได้โคนครีบหลัง หลังจากการฝังกึ่งที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลหลังการฝังกึ่ง

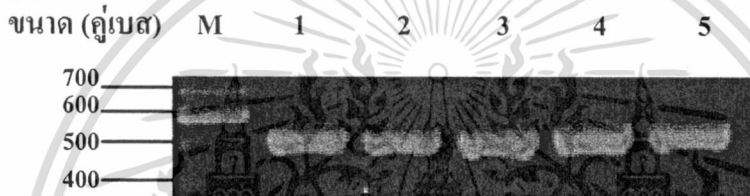
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งห้องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนกริบหลังเวลา 30 นาที มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุด และมีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จางลง หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งห้องท้องและตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนกริบหลัง หลังจากเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.19)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.19 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ไม่ได้ฝัง และฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างๆ

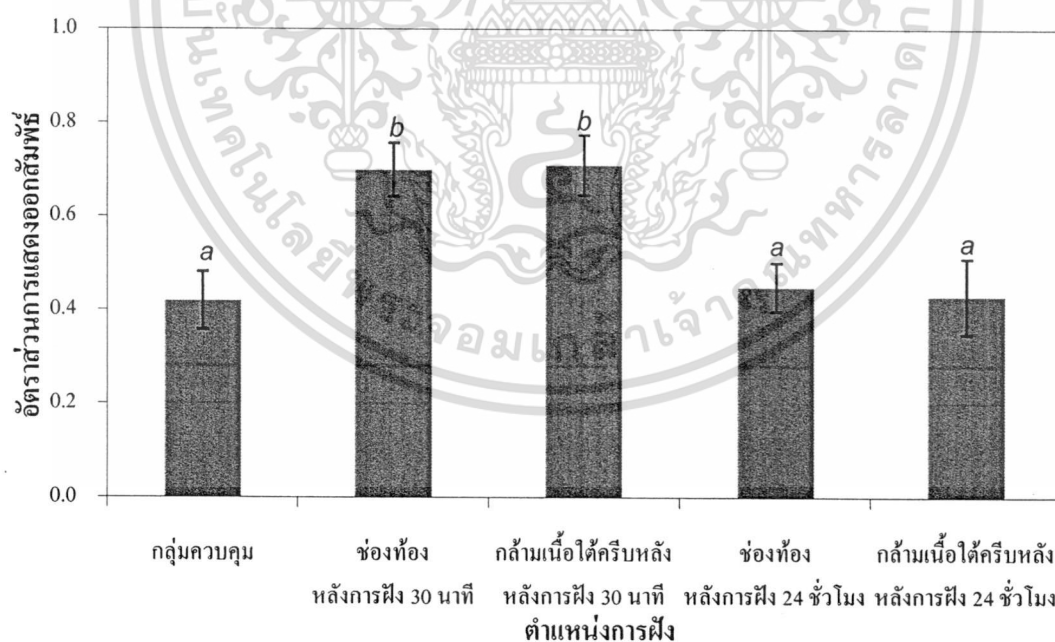
M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม)
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งห้องท้อง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนกริบหลัง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งห้องท้อง หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนกริบหลัง หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.19 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพัทธ์ พบว่าอัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพัทธ์เท่ากับ 0.42 ± 0.062 , 0.70 ± 0.057 , 0.71 ± 0.064 , 0.45 ± 0.052 และ 0.43 ± 0.081 ในปลานิลที่ไม่ได้ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้ก ปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝึงเวลา 30 นาที ปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝึงเวลา 30 นาที ปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝึงเวลา 24 ชั่วโมง และปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝึงเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงผลออกของยีน *hsp70* โดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver. 5.02 พบว่ามีการแสดงผลออกของยีน *hsp70* มากที่สุดในปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝึงเวลา 30 นาที ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการแสดงผลออกของยีน *hsp70* ปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝึงเวลา 30 นาที และมีความแตกต่างของการแสดงผลออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลกลุ่มควบคุม ปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝึงเวลา 24 ชั่วโมง และปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝึงเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.20 อัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ไม่ได้ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กและปลานิลที่ฝึงอาร์เอฟไอดีแท้กที่ตำแหน่งช่องท้อง และกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝึงที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

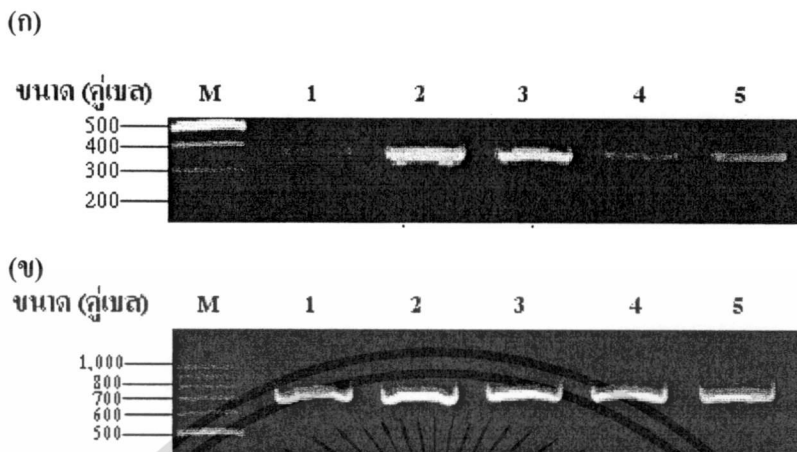
4.3.2 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาตุ๊กตุ๊กผสม

จากการนำปลาตุ๊กตุ๊กผสมน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 18 กรัม มาพักในบ่ออย่างน้อยหนึ่งสัปดาห์ แล้วฝังอาร์เอฟไอดีแท็กไปยังตำแหน่งช่องท้อง และกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหือก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง นำมาสกัด total RNA จากนั้นนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาตุ๊กตุ๊กผสมกลุ่มที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และกลุ่มที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ตำแหน่งช่องท้อง และกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาตุ๊กตุ๊กผสม หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ที่ตำแหน่งช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลังเวลา 30 นาที มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุด และมีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จางลง หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้องและตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.21)

จากภาพที่ 4.21 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงผลของยีน พบว่าอัตราส่วนการแสดงผลของยีนเท่ากับ 0.25 ± 0.064 , 0.53 ± 0.015 , 0.56 ± 0.053 , 0.24 ± 0.051 และ 0.36 ± 0.031 ในปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังเวลา 30 นาที ปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝังเวลา 30 นาที ปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง และปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีน โดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver. 5.02 พบการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุดในปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง หลังจากการฝังเวลา 30 นาที ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังเวลา 30 นาที และมีความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลกลุ่มควบคุม ปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคน

ครีบล้าง หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง และปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบล้าง หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.22)

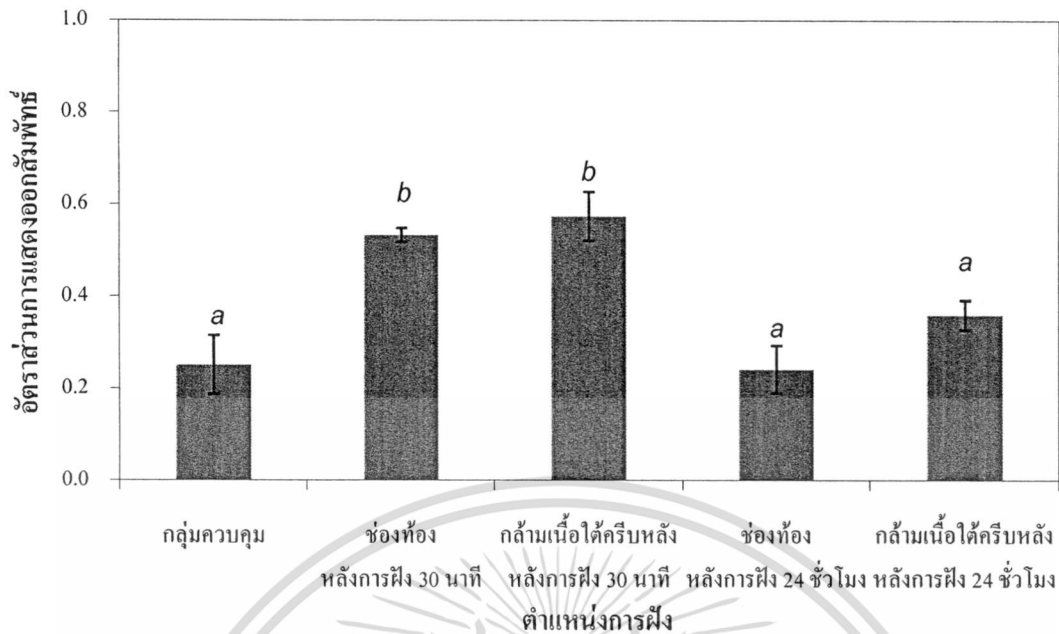


ภาพที่ 4.21 ผลผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้ฝัง และฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างๆ

M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม)
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบล้าง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบล้าง หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 อัตราส่วนการแสดงออกของสัณพัตร์ในปลาควกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ปลาควกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง และที่ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้ครีบหลังหลังจากการฝัง ที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.4 ผลของการใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70*

4.4.1 ผลของการใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิล

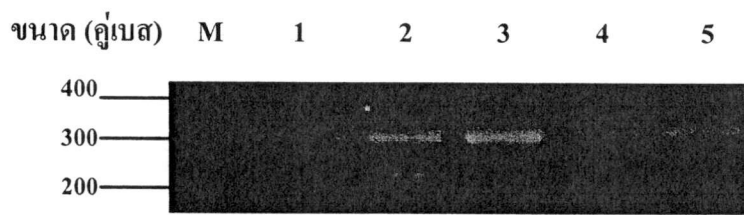
จากการนำปลานิลน้ำหนักประมาณ 55 กรัม มาปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง และทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้อง ซึ่งก่อนทำการฝังจะทำการทดลองแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลกลุ่มที่ไม่ได้ฝัง ปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝัง และไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม) ปลานิลที่ใส่ยาสลบ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุด รองลงมาคือปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและมีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จางลงในปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กหลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.23)

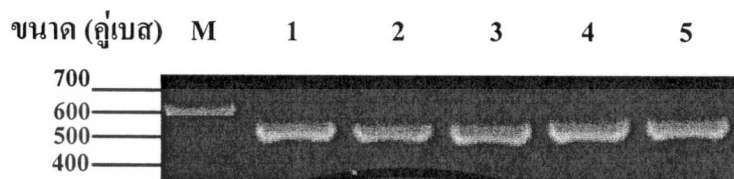
จากภาพที่ 4.23 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 0.48 ± 0.099 , 0.80 ± 0.042 , 0.92 ± 0.035 , 0.46 ± 0.028 และ 0.56 ± 0.031 ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที ปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที ปลานิลใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง และ ปลานิลไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีนโดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver. 5.02 พบว่ามีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุดในปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และไม่แตกต่างกับปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที แต่มีความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.24)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.23 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และปลานิลที่ใส่และไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

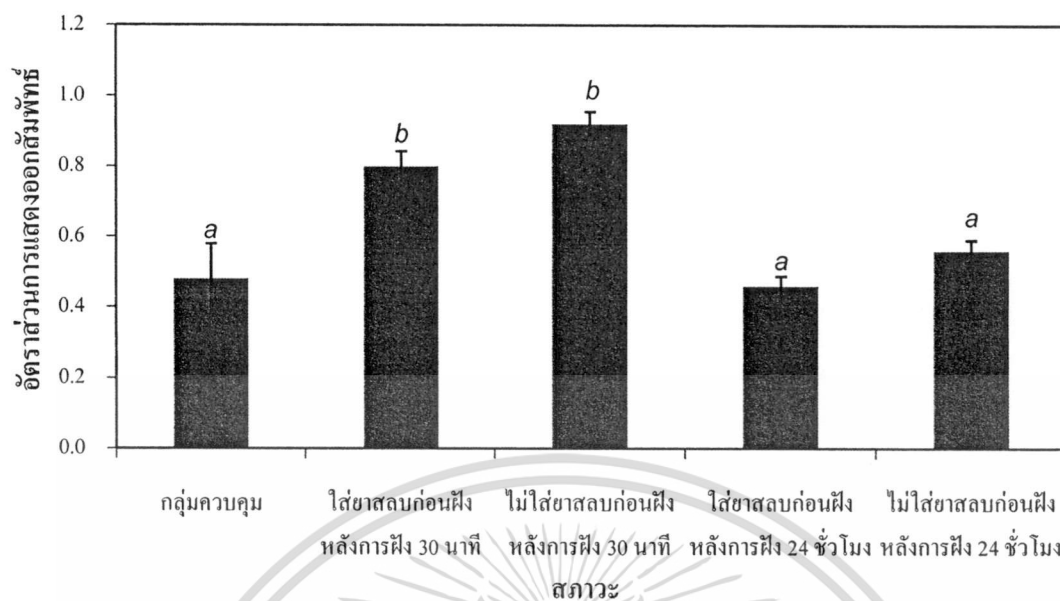
1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม)

2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที

3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที

4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง

5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง



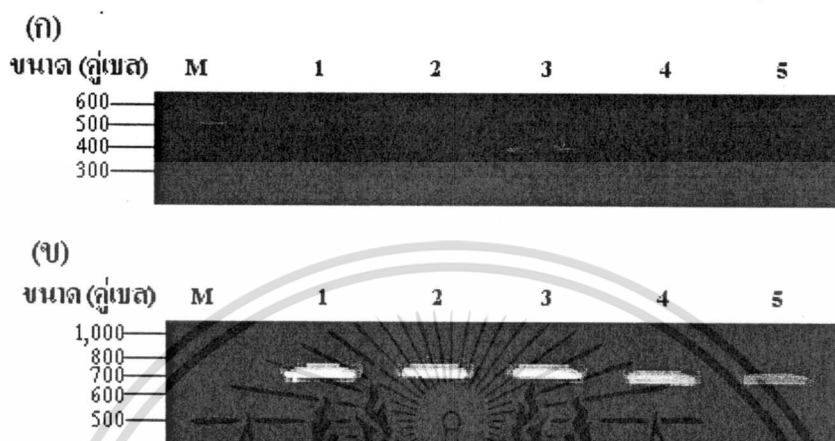
ภาพที่ 4.24 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาชนิดที่ไม่ได้ฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก ปลาชนิดที่ใส่ยาสลบและไม่ใส่ยาสลบก่อนการฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังการฟ้งที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.4.2 ผลของการใส่ยาสลบก่อนการฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาตุ๊กตาส้ม

จากการนำปลาตุ๊กตาส้มมาทำการฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง ซึ่งก่อนทำการฟ้งจะแบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 ppm และกลุ่มที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังจากการฟ้งที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาตุ๊กตาส้มที่ไม่ได้ฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม) ปลาตุ๊กตาส้มที่ใส่ยาสลบก่อนฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก และไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฟ้งที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาตุ๊กตาส้มที่ใส่ยาสลบก่อนฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฟ้งที่เวลา 30 นาที มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุด ที่ความเข้มใกล้เคียงกับปลาตุ๊กตาส้มที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฟ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก และมีความเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จากลงในปลาดุกลูกผสมที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กหลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.25)



ภาพที่ 4.25 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและปลานิลที่ใส่และไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก

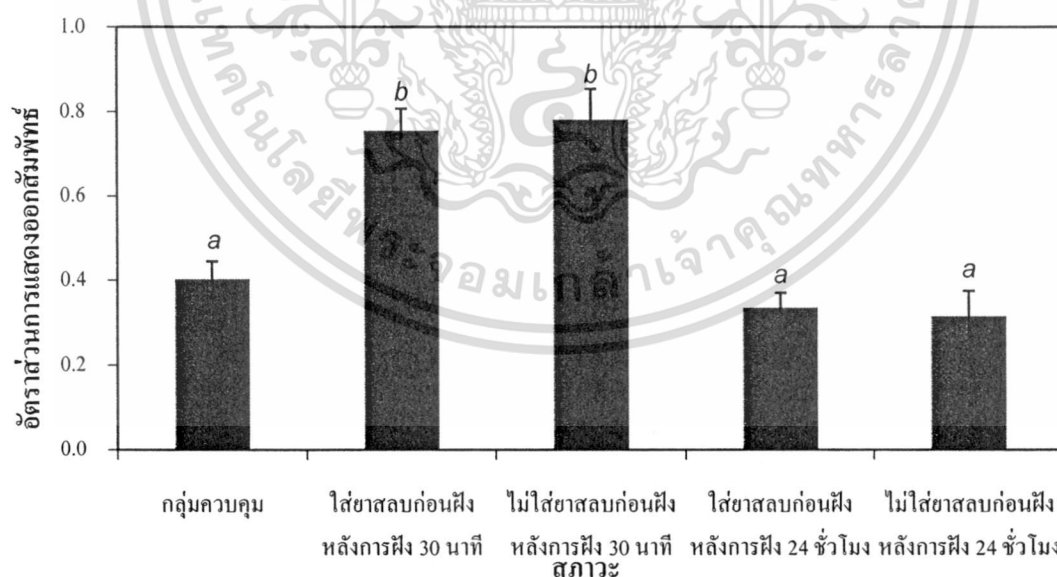
M คือเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม)
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง
- 5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.25 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70* เท่ากับ 0.40 ± 0.041 , 0.76 ± 0.052 , 0.78 ± 0.072 , 0.34 ± 0.035 และ 0.32 ± 0.060 ในปลาอุกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ปลาอุกผสมที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที ปลาอุกผสมที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็กหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที ปลาอุกผสมใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็กหลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง และ ปลาอุกผสมไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็กหลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีนโดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver. 5.02 พบการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุดในปลาอุกผสมที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และจะมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ใกล้เคียงกันกับปลาอุกผสมที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และมีความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการอาร์เอฟไอดีแท็ก หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.26)



ภาพที่ 4.26 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาอุกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กปลาอุกผสมที่ใส่ยาสลบและไม่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กหลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมี

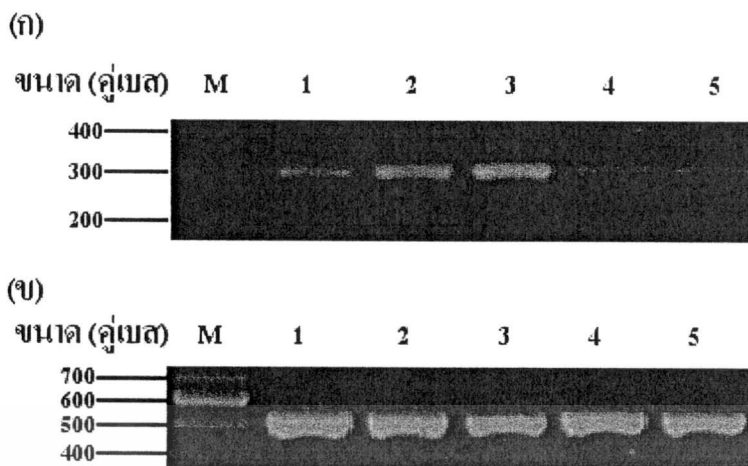
เอกสารนี้เป็นเอกสารนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของฝัองอาร์เอฟไอดีแท้กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้กที่สภาวะต่างกััน

4.5.1 ผลของอาร์เอฟไอดีแท้ก ต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้กที่สภาวะต่างกัันในปลาชนิด

จากการนำปลาชนิดมาทำการฝัองอาร์เอฟไอดีแท้กบริเวณช่องท้อง โดยใส่ยาสลบ MS222 กับปลาก่อนทำการฝัอง จากนั้นทำการเลี้ยงปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้กในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้อิโชน แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการฝัองที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาชนิดที่ไม่ได้ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก (กลุ่มควบคุม) ปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจนและปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก เลี้ยงในบ่อที่ให้อิโชน หลังจากการฝัองที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก เลี้ยงในบ่อที่ให้อิโชน หลังจากการฝัองที่เวลา 30 นาที มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุด และมีความเข้มที่ใกล้เคียงกับแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน และมีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จางลงในปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้กในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้อิโชน หลังจากการฝัองเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.27)

จากภาพที่ 4.27 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์เท่ากับ 0.50 ± 0.110 , 0.78 ± 0.065 , 0.85 ± 0.063 , 0.43 ± 0.106 และ 0.48 ± 0.132 ในปลาชนิดที่ไม่ได้ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก ปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก โดยเลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังการฝัองที่เวลา 30 นาที ปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก โดยเลี้ยงในบ่อที่ให้อิโชน หลังการฝัองที่เวลา 30 นาที ปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก โดยเลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังการฝัองที่เวลา 24 ชั่วโมง และปลาชนิดที่ฝัองอาร์เอฟไอดีแท้ก โดยเลี้ยงในบ่อที่ให้อิโชนหลังการฝัองที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 4.28)



ภาพที่ 4.27 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้โอโซน

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม)

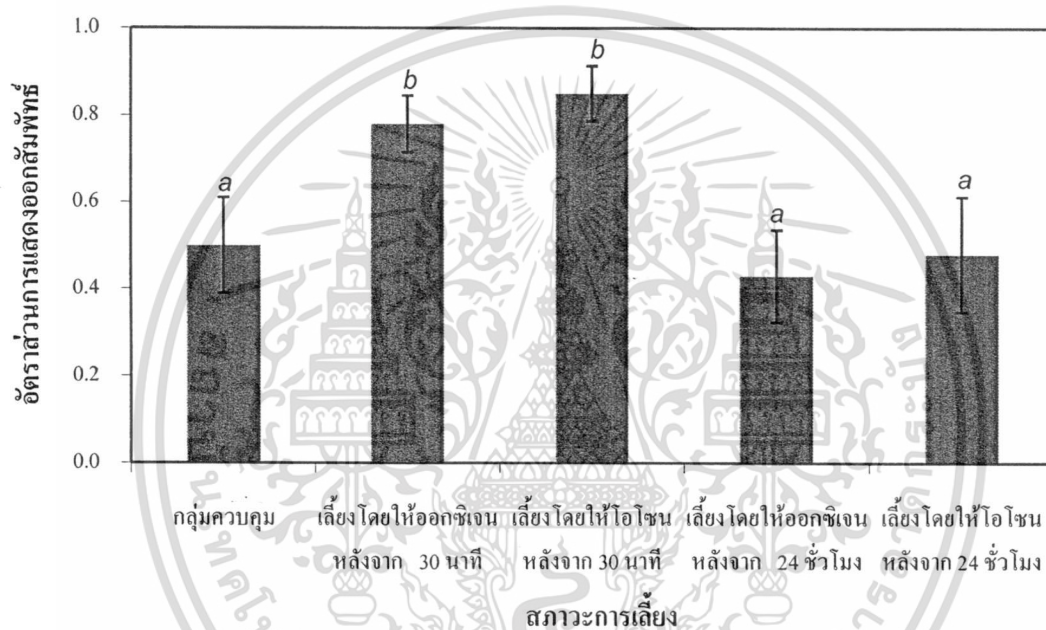
2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังจากการฝังเป็นเวลา 30 นาที

3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซนหลังจากการฝังเป็นเวลา 30 นาที

4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังจากการฝังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีน โดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver. 5.02 พบการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุดในปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และไม่แตกต่างกับการแสดงออกของยีน *hsp70* กับปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที แต่มีความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.28)



ภาพที่ 4.28 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเลี้ยงในบ่อโดยให้ออกซิเจนและโอโซน หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.5.2 ผลการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่สถานะต่างกันในปลาดุกกลมผสม

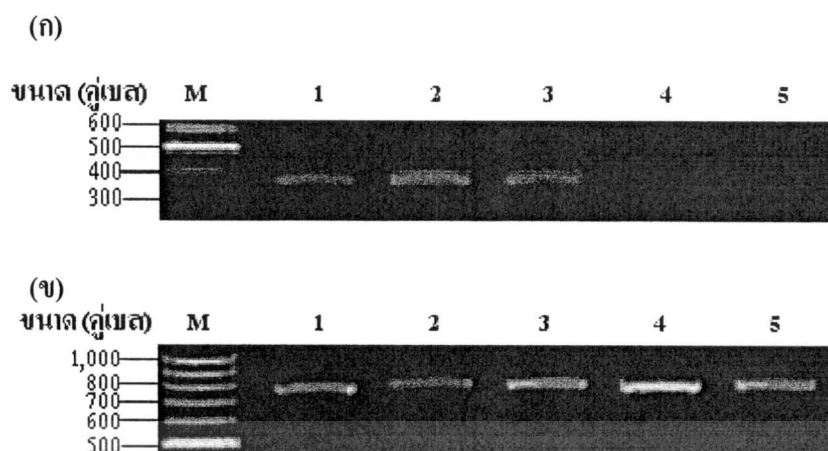
จากการนำปลาดุกกลมผสมน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 18 กรัม มาปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง และทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้อง ซึ่งจะใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 ppm ก่อนทำการฝัง จากนั้นทำการเลี้ยงปลาดุกกลมผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้โอโซน แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิลที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม) ปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน และปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและเลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที มีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใกล้เคียงกับแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและเลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน และมีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จางลงในปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.29)

จากภาพที่ 4.29 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพันธ์ พบว่าอัตราส่วนการแสดงผลออกสัมพันธ์เท่ากับ 0.33 ± 0.097 , 0.91 ± 0.068 , 0.83 ± 0.091 , 0.28 ± 0.019 และ 0.23 ± 0.094 ในปลาดุกกลุ่มผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังการฝังที่เวลา 30 นาที ปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังการฝังที่เวลา 30 นาที ปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง และปลาดุกกลุ่มผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซนหลังการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงผลออกของยีน โดยยอมรับที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SYSTAT Ver. 5.02 พบการแสดงผลออกของยีน *hsp70* มากที่สุดในปลาดุกกลุ่มผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และไม่แตกต่างกับการแสดงผลออกของยีน *hsp70* กับปลาดุกกลุ่มผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที แต่มีความแตกต่างของการแสดงผลออกของยีน *hsp70* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาดุกกลุ่มผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจนและปลาดุกกลุ่มผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.30)



ภาพที่ 4.29 ผลผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาคูกลูกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กและปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจนและบ่อที่ให้โอโซน

M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

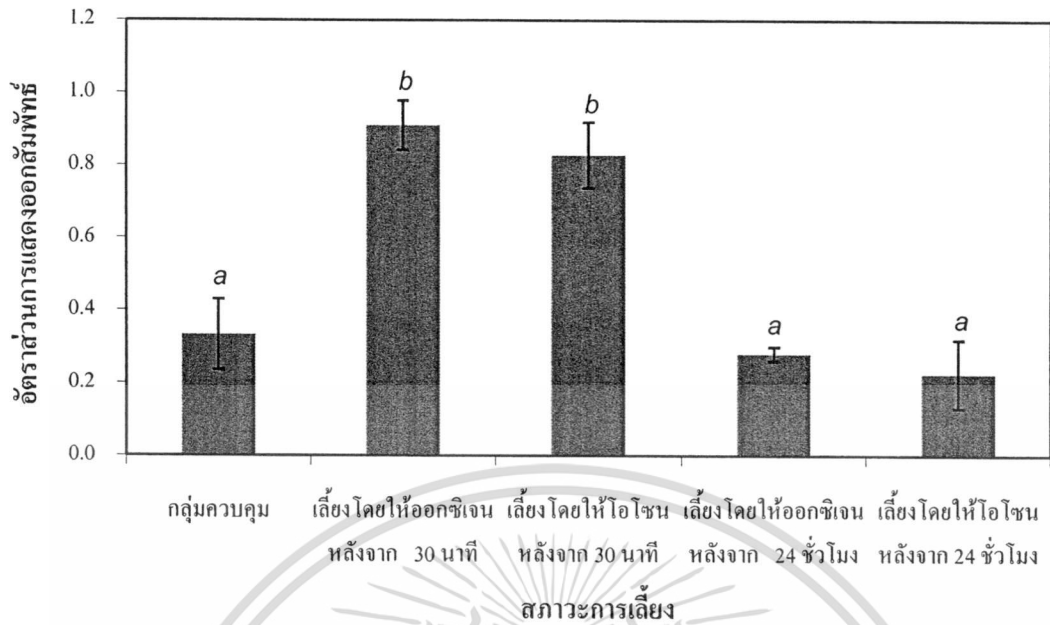
1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลาคูกลูกผสมที่ไม่ได้ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (กลุ่มควบคุม)

2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาคูกลูกผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที

3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาคูกลูกผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซนหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที

4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาคูกลูกผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้ออกซิเจน หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง

5 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาคูกลูกผสมที่เลี้ยงในบ่อที่ให้โอโซน หลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง



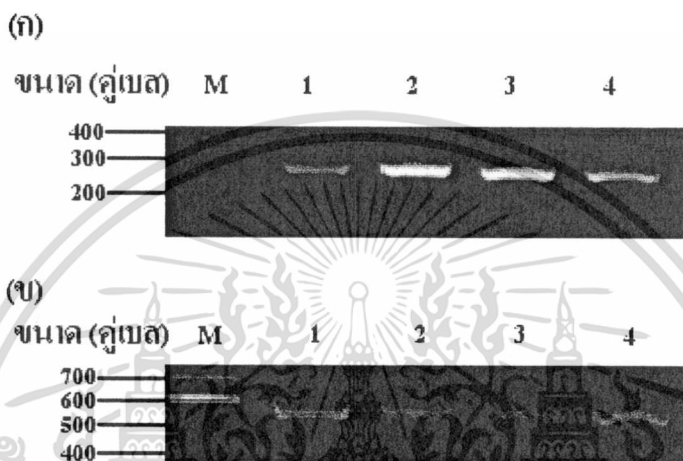
ภาพที่ 4.30 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเลี้ยงในบ่อโดยให้ออกซิเจนและไอโคโนน หลังการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.6 ผลการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่างกัน

4.6.1 ผลของอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่อุณหภูมิต่างกันในปลานิล

จากการนำปลานิลน้ำหนักประมาณ 55 กรัม มาปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง ซึ่งจะใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 ppm ทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้อง จากนั้น ทำการเลี้ยงปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในบ่อที่ให้ออกซิเจนที่อุณหภูมิปกติคือ 28-30 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) และอุณหภูมิสูง คือ 35 องศาเซลเซียส จากนั้น ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิสูงที่เวลา 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลกลุ่มที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) และปลานิลกลุ่มที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง ผลการทดลองพบว่า ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ และ

ปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฟุ้งเป็นเวลา 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฟุ้งเป็นเวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง มีแถบผลิตภัณฑ์ PCR เข้มมากที่สุด และมีความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR จางลงในปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฟุ้งเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความใกล้เคียงกับความเข้มของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.31)



ภาพที่ 4.31 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลานิลที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ และอุณหภูมิสูง

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลานิลที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) หลังการฟุ้ง 24 ชั่วโมง
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง หลังจากการฟุ้งเป็นเวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง หลังจากการฟุ้งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- 4 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลานิลที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง หลังจากการฟุ้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากภาพที่ 4.31 เมื่อวัดอัตราส่วนการแสดงออก พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกเท่ากับ 0.99 ± 0.081 , 1.42 ± 0.070 , 1.46 ± 0.078 และ 1.27 ± 0.036 ในปลานิลกลุ่มที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ ปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที ปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงหลังจากการฝังที่เวลา 12 ชั่วโมง และปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงหลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีนพบว่าการแสดงออกของยีน *hsp70* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) พบว่าปลานิลที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลานิลที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหลังจากการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.32)

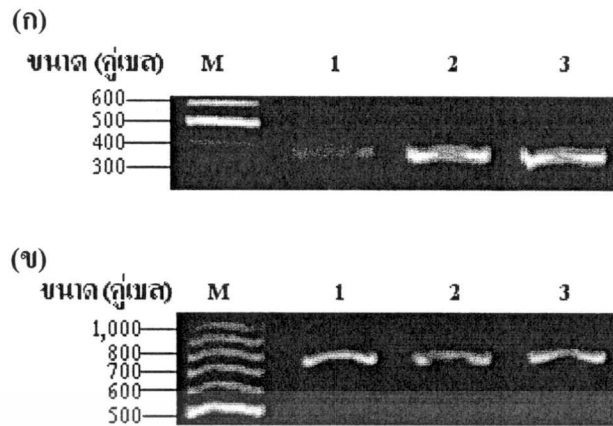


ภาพที่ 4.32 อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ในปลานิลที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) และปลานิลที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35 °C) หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.6.2 ผลการศึกษาผลของอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกันในปลาอุกอุกผสม

จากการนำปลาอุกอุกผสมน้ำหนักประมาณ 18 กรัม มาปรับสภาพให้พร้อมก่อนทำการทดลอง ใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 ppm ก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บบริเวณช่องท้อง จากนั้นทำการเลี้ยงปลาอุกอุกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บในบ่อที่ให้ออกซิเจนที่อุณหภูมิปกติ คือ 28-30 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิสูง คือ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บ ที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง (ที่เวลา 24 ชั่วโมงไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้เนื่องจากปลาตาย) มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มา เปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาอุกอุกผสมกลุ่มที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) และปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง ผลการทดลองพบว่าปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* และ β -actin ในปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ และปลาอุกอุกที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง โดยแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที มีแถบผลิตภัณฑ์ PCR เข้มมาก และเข้มเพิ่มขึ้นในปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฝังเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.33)

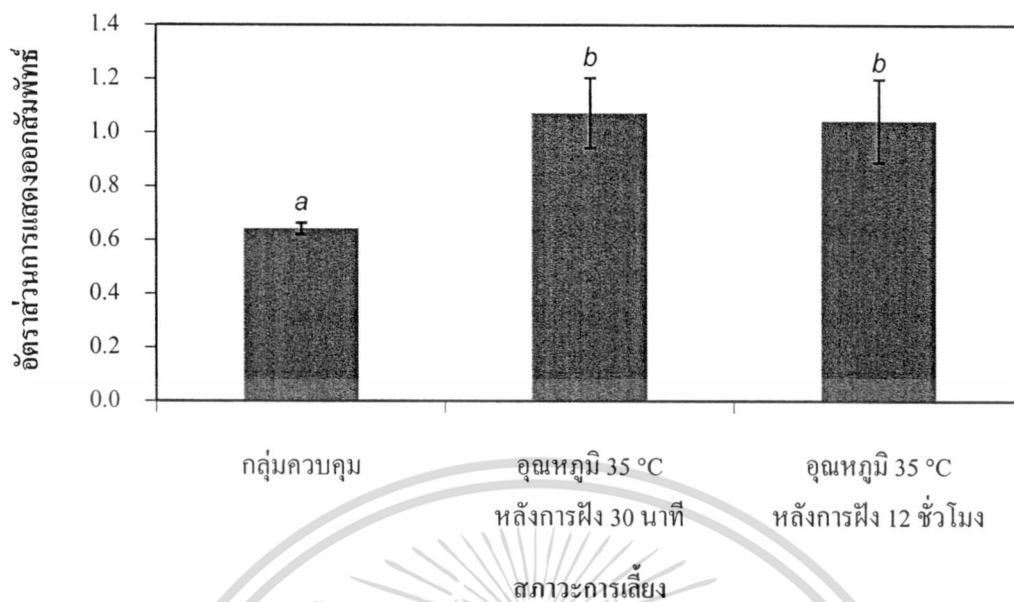
จากภาพที่ 4.33 เมื่อวัดอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ เท่ากับ 0.64 ± 0.021 , 1.07 ± 0.131 และ 1.04 ± 0.155 ในปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ ปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูง หลังจากการฝังที่เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการแสดงออกของยีน *hsp70* พบว่าการแสดงออกของยีน *hsp70* พบว่าปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.34)



ภาพที่ 4.33 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* (ก) และ β -actin (ข) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติและอุณหภูมิสูง

M คีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

- 1 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม)
- 2 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง หลังจากการฝังเป็นเวลา 30 นาที
- 3 แถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *hsp70* และ ยีน β -actin ในปลาดุกลูกผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง หลังจากการฝังเป็นเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.34 อัตราส่วนการแสดงออกสัณพันธ์ในปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ (กลุ่มควบคุม) และปลาตุ๊กตุ๊กผสมที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35 °C) หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง โดยตัวอักษรที่แสดงต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุกลูกผสม

5.1.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ของปลานิลและปลาดุกลูกผสม

จากการนำเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และ total RNA นำจีโนมิกดีเอ็นเอและ total RNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR มาทำให้บริสุทธิ์ จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมกับพลาสมิด pDrive นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน จากนั้น สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทดสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR ในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จาก BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer แล้วเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastX

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาแปลเป็นกรดอะมิโนจะได้กรดอะมิโนของ pG.nile และ pRT.nile ทั้งสิ้น 102 อะมิโน และกรดอะมิโนของ pG.catfish และ pRT.catfish มีทั้งสิ้น 138 อะมิโน ซึ่งเป็นเพียงบางส่วนของยีน *hsp70* โดยปกติ Hsp70 ในปลา มีกรดอะมิโนประมาณ 641 อะมิโน จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของปลานิลและปลาดุกลูกผสมกับลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนพบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ในปลานิลมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลานิลสปีชีส์ต่างๆ คือ *Oreochromis niloticus*, *O. Mosambicus* และ *O. aureus* ถึงร้อยละ 98-99 ซึ่งปลานิลทั้ง 3 ชนิดจะมีไฟลัม Vertebrata ออเคอร์ Actinopterygii ออเคอร์ Cichlidae African cichlids ครอบครั้ว Tilapiini และวงศ์ Oreochromis เหมือนกัน แต่ต่างกันเพียงสปีชีส์เท่านั้น และมีความคล้ายคลึงกับปลา *Seriola quinqueradiata*, *Lutjanus sanguineus*, *Sciaenops ocellatus*, *Oryzias latipes* และ *Danio rerio* ร้อยละ 80-86 ส่วนลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ในปลาดุกลูกผสมมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลาสายพันธุ์ *Ctenopharyngodon idella*, *Megalobrama amblycephala*, *Gobiocypris rarus*, *Tanichthys albonubes*, *Danio rerio*, *Sciaenops ocellatus* และ *Dentex dentex* สูงถึงร้อยละ 96-97 ที่ไม่พบความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลาในตระกูลเดียวกันกับปลาดุกลูกผสม แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาดุกลูกผสมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่รายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม BlastN พบว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ของปลาดุกลูกผสมมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลา *Ictalurus furcatus*, *Cyprinus carpio*, *Dentex dentex*, *Tanichthys albonubes*, *Gobiocypris rarus*, *Ctenopharyngodon idella*, *Acanthopagrus schlegelii*, *Epinephelus coioides* และ *Sparus aurata* ร้อยละ 87-93 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับปลา Channel catfish (*Ictalurus furcatus*) สูงถึงร้อยละ 93 และพบว่าอนุกรมวิธานของปลาดุกทั้งสองชนิดจะอยู่ในไฟลัม Chordata คลาส Actinopterygii ออเดอร์ Siluridae และครอบครัว Siluriformes มีความเหมือนกัน แต่วงศ์และชนิดของปลาดุกทั้งสองชนิดที่ต่างกัน คือปลาดุกลูกผสมจะอยู่ในวงศ์ Clariidae และสปีชีส์ *Clarias macrocephalus* และ *Clarias gariepinus* ส่วนปลา Channel catfish ในวงศ์ Ictaluridae และสปีชีส์ *Ictalurus furcatus*

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของปลานิลและปลาดุกลูกผสม เพื่อการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กได้

5.1.2 การศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการทำ RT-PCR ในการแสดงออกของยีน *hsp70*

จากการนำปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาทำการตัดเนื้อเยื่อเหงือก นำเนื้อเยื่อที่ได้มาสกัด total RNA แล้ว นำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit ที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ แล้วนำแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแถบด้วยโปรแกรม Genetools และนำค่าที่ได้มาใส่ค่า log เพื่อดูช่วงที่เหมาะสมสำหรับจำนวนรอบที่เหมาะสมกับปฏิกิริยา RT-PCR จำนวนรอบที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR คือ 30 รอบ เนื่องจากมีค่าปานกลางระหว่างค่า log ของการแสดงออกของยีน *hsp70* ต่ำสุด (20 รอบ) และค่า log ของการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงสุด (40 รอบ) โดยค่า log ของการแสดงออกของยีน *hsp70* นี้สามารถเพิ่มขึ้นตามสภาวะการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *hsp70* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง Jonson และคณะ(2000) พบว่าจำนวนรอบที่เหมาะสมกับปฏิกิริยา RT-PCR ใน cDNA สำหรับการศึกษากการแสดงออกของยีนและการถอดรหัสของยีน *SMAD4* คือ 30 รอบ จากการศึกษาจำนวนรอบที่จำนวน 20, 25, 30, 35 และ 40 รอบ นอกจากนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้เช่าเห็นใบเขียวระบุชื่อหน้าการคัดลอก ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anon (2010) รายงานว่าการศึกษาการแปรผันของการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิขึ้นลงในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของสารเคมีหรือบัฟเฟอร์ อุณหภูมิในช่วง annealing ระยะเวลา และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา จากการทดลองเลือกจำนวนรอบของการทำ RT-PCR 30 รอบ เนื่องจากใช้ชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit ซึ่งมีการกำหนดปริมาณและความเข้มข้นของส่วนประกอบของสารในการทำปฏิกิริยาที่แน่นอน อย่างไรก็ตามการเลือกที่จำนวน 30 รอบถือได้ว่าเป็นความเสี่ยงเช่นเดียวกัน เนื่องจากอาจเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า amplification plateau เป็นปรากฏการณ์ที่ PCR เกิดได้ไม่สิ้นสุดภายหลังจากปฏิกิริยาผ่านไปหลายๆ รอบ ปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่สังเคราะห์ได้จะไม่เพิ่มเหมือนรอบแรกๆ ซึ่งเป็นอัตราเพิ่มแบบ exponential แต่การเพิ่มจะลดลงเป็นแบบ liner หรือเข้าสู่ stationary phase (วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ, 2536) ดังนั้นหากทำการเลือกจำนวน 25 รอบในการศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมของการทำ RT-PCR เพื่อการแสดงออกของยีน *hsp70* อาจจะทำให้เห็นความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *hsp70* ก็เป็นไปได้

5.1.3 ผลศึกษาการแสดงออกของยีนเบื้องต้นในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน

จากการนำปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาเพาะเลี้ยงและปรับสภาพให้พร้อมก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์มาทำการตัดเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ แล้วทำการสกัด total RNA เพื่อนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit พบว่าในปลานิลพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ แสดงว่าทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา มีการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นโดย HSTF จะมีกลุ่มฟอสเฟตเข้าไปเกาะบริเวณ HSEs (heat-shock response element) ทำให้ HSTF สามารถจับกับลำดับเฉพาะบนดีเอ็นเอบริเวณ phosphorylated HSTF ส่งผลให้บริเวณนี้มีสภาพพร้อมที่จะถอดรหัส ทำให้ RNA polymerase II เข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนได้ง่ายขึ้น จึงเกิดการถอดรหัสของยีน *hsp70* (หัตยา กาวิวงศ์, 2548) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าอัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70* ของแต่ละเนื้อเยื่อ พบว่าที่ไตมีการแสดงออกมากที่สุด (ภาพที่ 4.21) อาจเนื่องมาจาก *hsp70* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด และเมตาบอลิซึมส่วนใหญ่ของกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดของปลาในระบบ neuroendocrine และ endocrine เกิดขึ้นที่เนื้อเยื่อ interrenal และเนื้อเยื่อ chromaffin บริเวณไตส่วนหน้า และมีการหลั่งฮอร์โมน catecholamine และผลิตภัณฑ์ฮอร์โมน corticosteroid เช่น cortisol และ cortisone ซึ่งฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดจะช่วยในการรักษาสมดุลของกระบวนการเมตาบอลิซึม และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยให้เหงือกมีการขยายตัวให้เม็ดเลือดแดงจับกับออกซิเจนได้มากขึ้น เพื่อให้มีออกซิเจนเพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด (Bridges, 2005) จึงเป็นไปได้ว่ามีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากขึ้นบริเวณไต แต่ในงานวิจัยนี้ได้เลือกเนื้อเยื่อเหงือกในการทดลองครั้งต่อไปแทนการใช้เนื้อเยื่อไต เนื่องจากการใช้เนื้อเยื่อไตจำเป็นต้องฆ่าสัตว์ทดลอง ในขณะที่การเลือกเนื้อเยื่อเหงือกไม่จำเป็นต้องฆ่าสัตว์ทดลองและเนื้อเยื่อเหงือกเป็นส่วนที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกและไวต่อปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดได้เร็ว จึงน่าจะเหมาะสมในการเลือกศึกษาขึ้นต่อไป

ส่วนการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาตุ๊กถูกผสมพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต แต่ไม่พบในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ อาจเนื่องมาจากในช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ อาจมีปัจจัยบางอย่างที่ไม่ส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของยีน *hsp70* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sukumaran และคณะ (2008) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ของเนื้อเยื่อเหงือก สมอง ตับ และกล้ามเนื้อ ที่ถูกชักนำให้เกิดความเครียดโดยให้สารอาหารที่ขาดฟอสฟอรัสในปลา *Catla catla* (Hamilton) พบการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือกและสมอง และไม่พบการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อ การแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันนั้นขึ้นกับการใช้งาน การบาดเจ็บ ถ้ามีมากเนื้อเยื่อนั้นจะมีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากตามไปด้วย และเลือกเนื้อเยื่อเหงือกสำหรับใช้ในการทดลองเช่นกัน (Sanders *et al.*, 1994)

5.2 การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาทู

ลูกผสมที่เวลาต่างๆ

จากการนำปลานิลและปลาทูกลุผสมจับปลาและฝังอาร์เอฟไอดีแท็กบริเวณช่องท้องแล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการจับและการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 30 นาที หลังการจับและการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กของปลาทั้งสองชนิดต่างก็มีการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีการแสดงออกของยีน *hsp70* หลังการจับและการฝังที่ 24 ชั่วโมง ลดลง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการแสดงออกจากการจับและการฝังที่เวลา 30 นาที แสดงให้เห็นว่าการจับและการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กส่งผลทำให้ปลาเกิดความเครียดในช่วงแรกคือเวลา 30 นาที และไม่เกิน 24 ชั่วโมง หลังการจับปลาและฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก ซึ่งการฝังแท็กทำให้เกิดความเครียดแบบเฉียบพลัน Iwana *et al.* (1999) รายงานว่าความเครียดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปลาช่วงการตอบสนองขั้นปฐมภูมิ (primary response) จะมีการตอบสนองของฮอร์โมนเรียกว่า adrenergic response ซึ่งมีผลทำให้ฮอร์โมนคอร์ติซอลในเลือดเพิ่มขึ้น ฮอร์โมนดังกล่าวมีความสำคัญต่อการตอบสนองความเครียด โดยทำให้น้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเนื่องจากการสลายไกลโคเจนในตับ โดยกระบวนการ glyconeogenesis ทำให้เซลล์สามารถสร้างพลังงานมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ ในยามฉุกเฉิน การตอบสนองดังกล่าวนี้เกิดจากกระบวนการตอบสนองแบบ hypothalamo-pituitary-interrenal (HPI) response โดยเมื่อปลาได้รับความเครียดปลาจะผลิตฮอร์โมน corticotrophin-releasing hormone หรือ CRH ที่หลั่งออกมากระตุ้นต่อมใต้สมอง (pituitary) ส่งผลให้เกิดการหลั่ง adrenocorticotrophic hormone (ACTH) และ ACTH ไปกระตุ้นไอบริเวณ interrenal tissue และหลั่ง corticosteroid ออกมา ในขณะเดียวกันยังมีการตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์ (cellular stress response) หรือการตอบสนองต่อความเครียดของยีน *hsp70* เพื่อคงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำหน้าที่ได้ตามปกติ โดยจะช่วยในการม้วนหรือพับโมเลกุลของโปรตีน รวมถึงการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปสู่ส่วนต่างๆ ของเซลล์ เพื่อให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพจากเซลล์ที่ถูกทำลายอันเนื่องมาจากสภาวะความเครียดควบคู่กันไป (Fairfield, 2004)

อย่างไรก็ตาม ทั้งการจับปลา และวิธีการฝังแท็ก ทำให้ปลาเกิดบาดแผล เป็นการรบกวนปลา กระบวนการเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดทางสรีรวิทยา และมีการตอบสนองต่อความเครียดเกิดขึ้น (Iwana *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Vijayan *et al.* (1997) รายงานว่าจากการจับปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ที่เวลา 3 นาที 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าหลังการจับที่เวลา 3 นาทีปลามีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังการจับขึ้นมาเหนือน้ำที่เวลา 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งกลับเข้าสู่ภาวะปกติที่เวลา 1 ชั่วโมง และสอดคล้องกับการทดลองของ Washborn และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาผลของการจับปลาขึ้นมาเหนือน้ำต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าหลังการจับปลาขึ้นมาเหนือน้ำที่เวลา 1 ชั่วโมงไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* จากการกระตุ้นให้เกิดความเครียดที่อุณหภูมิสูง) และมีรายงานของ Feldhaus (2006) ที่ทดลองฝัง PIT tag (ขนาด 11.5 x 2.1 มิลลิเมตร) ในปลา Redband Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss gairdneri*) พบว่าการฝังแท็กส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *hsp70* เพิ่มขึ้นสูงที่สุดหลังการฝังเสร็จทันที และมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุม หลังจากการติดแท็กที่เวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24 ชั่วโมง แสดงว่าการฝัง PIT tag ไม่มีผลต่อความเครียดในระยะยาว (≥ 24 ชั่วโมง) ในปลา rainbow trout

ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงพบว่าสามารถประยุกต์ใช้ RFID Tag ในกิจกรรมการทดลองหรือการพัฒนาปรับปรุงพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำต่อไปได้ เพราะส่งผลต่อความเครียดแบบเฉียบพลันเท่านั้น ซึ่งไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลาในระยะยาว

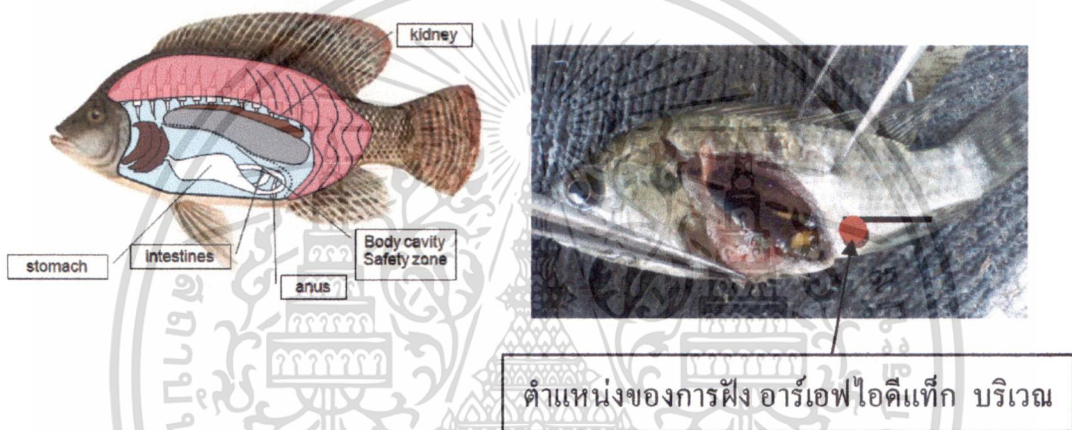
5.3 การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ใน ปลานิลและปลาคูกลูกผสม

จากการนำปลานิลและปลาคูกลูกผสมมาเพาะเลี้ยง แล้วฝังอาร์เอฟไอดีแท็กไปยังตำแหน่งช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบหลัง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก หลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA เพื่อนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN[®] Onestep RT-PCR Kit และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ห้อตราส่วนการแสดงออกของยีน *hsp70* พบว่าหลังการฝังที่ตำแหน่งช่องท้องและกล้ามเนื้อใต้โคนครีบ หลังที่เวลา 30 นาที ปลานิลและปลาคูกลูกผสมมีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ลดลงหลังการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า การฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งใดก็ตามส่งผลให้เกิดความเครียดกับปลา เช่นเดียวกัน โดยจะมีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* เพิ่มขึ้นภายใน 30 นาทีแรกหลังการฝัง และลดลงเข้าสู่ระดับปกติหลังจาก 24 ชั่วโมง ซึ่งจะไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลา อย่างไรก็ตาม ชลลดา มีอนันต์ (2553) รายงานว่าจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลาคูกลูกผสมและปลานิลที่ฝังในตำแหน่งที่แตกต่างกัน พบว่าแผลภายนอกของปลาทั้งสองชนิดนั้นหายภายในสัปดาห์แรก และการสัมนแผลภายในสมานเสร็จสมบูรณ์ภายใน 21 วัน ซึ่งตำแหน่งการฝังที่เหมาะสมที่สุดคือ กล้ามเนื้อบริเวณกลางโคนครีบหลัง เนื่องจากเป็นส่วนที่มีกล้ามเนื้อมาก และมีข้อควรระวังในการฝังแท็ก คือ ควรฝังให้เลเยอร์ dermis เข้าไปถึงกล้ามเนื้อในแนวขนานกับมัดกล้ามเนื้อ และควรระวังมัดกระบังไม่ฝังแท็กชิดกระดูก เพราะจะทำให้แผลหายช้า แต่จากรายงานของ CBFWA (1999) แนะนำว่าตำแหน่งการฝังพีไอทีแท็กควรฝังที่ตำแหน่งช่องท้องบริเวณที่อยู่ระหว่าง pyloric ceca และ pelvic girdle ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีช่องว่างลำตัวของปลา และรุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ (2551) รายงานว่าตำแหน่งที่เหมาะสมในการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลานิลควรฝังที่ตำแหน่งช่องท้อง เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่มีช่องท้องขนาดใหญ่ จึงเหมาะสมที่จะฝังตำแหน่งนี้ (ภาพที่ 5.1) สำหรับการฝังเข้าบริเวณช่องท้องในปลาอุกอุกผสมนั้น ควรจะเยื้องมาทางด้านครีบกัน เนื่องจากช่องว่างภายในลำตัวของปลาอุกอุกผสมจะมีขนาดเล็กกว่าปลานิลมาก (ภาพที่ 5.2)

ดังนั้นจากผลการทดลองเลือกตำแหน่งการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้อง เพราะอาร์เอฟไอดีแท็กจะอยู่ในช่องว่างในร่างกาย จึงไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลาในระยะยาว แต่เวลาฝังควรระมัดระวังไม่ให้โคนอวัยวะภายในของปลา



ภาพที่ 5.1 ตำแหน่งการฝัง อาร์เอฟไอดีแท็ก บริเวณช่องท้องในปลานิล

ที่มา : รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551)



ภาพที่ 5.2 ตำแหน่งที่ฝัง อาร์เอฟไอดีแท็ก บริเวณช่องท้องในปลาอุกอุกผสม

ที่มา : รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 การใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาชนิดและปลาดุกลูกผสม

จากการนำปลานิลและปลาดุกลูกผสมมาทำการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บบริเวณช่องท้อง ก่อนทำการฝังจะทำการทดลองแบ่งปลาเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อช่วยลดอาการบาดเจ็บและลดความเครียดจากการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บ และกลุ่มที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70* พบว่าการใส่ยาสลบและไม่ใส่ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บในปลานิลและปลาดุกลูกผสม มีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุดหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที และมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ลดลงจนอยู่ในระดับปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังการฝังที่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าทั้งการใส่ยาสลบและไม่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บทำให้ปลาเกิดความเครียดเช่นเดียวกัน โดยความเครียดนี้จะแสดงออกพบภายหลังจากการฝังที่เก็บภายใน 30 นาทีแรก และปรับเข้าสู่สภาวะที่ปราศจากความเครียดหลังการฝังที่เก็บเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลาในระยะยาว

จากผลการทดลองปลานิลที่ไม่ใส่ยาสลบมีการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงกว่าเล็กน้อย (ไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ) เมื่อเทียบกับปลานิลที่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บ ซึ่งการใช้ยาสลบทำให้ปลาเกิดอาการสูญเสียความรู้สึกบางส่วนหรือทั้งหมดโดยยาสลบจะแพร่เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทในส่วนของการส่งถ่ายข้อมูลไปสู่เซลล์ประสาทอื่นๆ ทำให้สูญเสียการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากภายนอก (ฉวีวรรณ หนูหนู, 2553) Anon (2001) รายงานว่าการศึกษาสรีรวิทยาของปลาควรรู้ใช้ยาสลบทำให้ปลาอยู่ในระยะที่ไม่มีการตอบสนอง (Loss of reflex) โดยระยะ Loss of reflex นี้ปลามีอัตราการขยับแผ่นปิดเหงือกช้า ไม่สม่ำเสมอ และมีอัตราการเต้นของหัวใจต่ำ (Brower, 2001) ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงสวัสดิภาพของสัตว์น้ำ จึงควรใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บเพื่อลดความเครียดก่อนการฝัง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ CBFWA (1999) แนะนำควรรู้ใช้ยาสลบ MS222 ก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีที่เก็บในปลาซึ่งความเข้มข้นที่ใช้จะขึ้นกับชนิดและขนาดของปลา และเมื่อละลายยาสลบในน้ำแล้วจะมีฤทธิ์เป็นกรด จึงควรใช้ NaHCO_3 หรือ Tris buffer ช่วยปรับค่าพีเอช ซึ่งความเข้มข้นที่แนะนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ใช้คือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 40 ppm Glenn และ Cooke(2005) รายงานการใช้ยาสลบก่อนการติดแท็กชนิด telemetry transmitters tag ในปลา พบว่าก่อนทำการฝังแท็กควรใช้ยาสลบชนิด MS222 ก่อนการติดแท็ก เพื่อลดความเครียดจากการติดแท็ก การเก็บตัวอย่างและการขนส่ง และการศึกษาของ Feldhaus (2006) ที่ใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 50 ppm ก่อนการฝัง PIT tag ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) เพื่อลดความเครียดของปลา rainbow trout จากการฝัง PIT tag

อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายาสลบจะสามารถช่วยลดการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นจากภายนอกได้ แต่ยังคงมีรายงานถึงการใส่ยาสลบส่งผลให้ปลาเกิดความเครียด Small (2003) พบว่าจากการใส่ยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 100 ppm ในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) หลังได้รับยาสลบ 30 นาที ปลาที่มีปริมาณ plasma cortisol สูงถึง 8 เท่าจากระดับปกติของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับยาสลบ และสอดคล้องกับการทดลองของ Cho และ Healt (2000) พบว่าปริมาณ plasma cortisol ในเลือดของปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) เพิ่มขึ้นเป็น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากที่ได้รับยาสลบ MS222 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 50 ppm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งก่อนการได้รับยาสลบ ปลา Chinook salmon มีปริมาณ plasma cortisol เพียง 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นจากผลการทดลอง จึงเลือกใช้ยาสลบ MS222 กับปลานิลและปลาคูกลูกผสมก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก เพราะการใช้ยาสลบทำให้ปลาเกิดอาการสูญเสียความรู้สึก โดยไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทในส่วนของการส่งถ่ายข้อมูล ไปสู่เซลล์ประสาทอื่นๆ ทำให้สูญเสียการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากภายนอก ทำให้ปลาลดความเครียดและการบาดเจ็บจากการจับและการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก และเกิดความสะดวกในการปฏิบัติงาน

5.5 ผลของฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่สภาวะต่างกันในปลานิลและปลาดุกผสม

จากการนำปลานิลและปลาดุกผสมมาก่อนทำการฟุ้ง ทำการฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่เก็บบริเวณช่องท้อง จากนั้นทำการเลี้ยงปลาที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่เก็บในบ่อที่ให้ออกซิเจนและโอโซน แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการฟุ้งที่เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN[®] Onestep RT-PCR Kit และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70* พบว่าจากการเลี้ยงปลาที่ฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่เก็บ โดยให้ออกซิเจนและโอโซน หลังจากการฟุ้งที่เวลา 30 นาทีของปลาทั้ง 2 ชนิดมีการแสดงออกของยีน *hsp70* มากที่สุด และมีการแสดงออกของยีน *hsp70* ลดลงอยู่ในระดับปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังการฟุ้งที่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงปลานิลและปลาดุกผสมในบ่อที่ให้ออกซิเจนและโอโซน หลังการฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่เก็บส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ไม่แตกต่างกัน โดยมีผลต่อปลาในระยะแรก หลังจาก 24 ชั่วโมงของการฟุ้งที่เก็บปลาจะลดระดับความเครียดเข้าสู่ระดับปกติและสามารถดำรงชีวิตต่อไปได้

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาจเลือกใช้ให้ออกซิเจนหรือโอโซนสำหรับการพักฟื้นปลาหลังการฟุ้งอาร์เอฟไอดีที่เก็บก็ได้ ซึ่งโอโซนที่นำมาใช้กับสัตว์น้ำนั้นมีจุดประสงค์เพื่อนำเชื้อโรค ทำให้น้ำใส ปลอดภัย ปลาเจริญ และเติบโตได้ดี (พล พลเสน, 2553) แต่การใช้โอโซนมีข้อเสียคือ ถ้าปริมาณโอโซนที่หลงเหลือในน้ำเพียงเล็กน้อยก็สามารถฆ่าปลาได้ และ โอโซนที่เหลืออยู่ในอากาศก็จะเป็นพิษกับคนได้ ในน้ำทะเล การสลายตัวของโอโซนจะช้ากว่าในน้ำจืด และสิ่งที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของโอโซนกับน้ำทะเลจะตกค้างและเป็นพิษกับปลาเช่น จะไปทำลายสมองและไขสันหลัง แม้ว่ายังไม่มีการรายงานออกมาอย่างชัดเจนก็ตาม และปลาบางชนิดอาจจะไวต่อผลกระทบของสารตกค้างจากการใช้โอโซนมากกว่าชนิดอื่น (กฤษณา อองอาจ, 2554)

อย่างไรก็ตาม การใช้ออกซิเจนเป็นที่นิยมแพร่หลายกว่าการใช้โอโซน เพราะหาง่าย และราคาไม่แพง ซึ่งค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved Oxygen, DO) ระดับที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาควรมีค่ามากกว่า 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่มักมีออกซิเจนละลายอยู่ในช่วง 5–7 มิลลิกรัมต่อลิตรหรืออย่างต่ำ 90 เปอร์เซ็นต์ของจุดอิ่มตัวจะทำให้การเลี้ยงสัตว์น้ำเติบโตได้ดี (Lawson, 1995) แต่ถ้าออกซิเจนอยู่ในช่วง 0–3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ปลาเกิดความเครียด ส่งผล

ให้การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์และความต้านทานต่อโรคของปลาลดลง (Iwana *et al.*, 1999;

Gornati *et al.*, 2004; Bridges, 2005) ผลการทดลองสอดคล้องกับของ Delaney and Klesius (2004) พบว่าจากการเลี้ยงปลานิล *Oreochromis niloticus* (L.) โดยให้ออกซิเจนที่ความเข้มข้น 0.1-0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลามีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเลือด สมอ ดับ กล้ามเนื้อ และไต ส่วนหน้า ที่สูงกว่าระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ของกลุ่มปลานิลที่เลี้ยงให้ออกซิเจนที่ความเข้มข้น 4.66-4.91 มิลลิกรัมต่อลิตร Lückstädt *et al.* (2004) ศึกษาการตอบสนองของยีน *hsp70* ของปลา Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*) ที่ถูกชักนำให้เกิดความเครียดจากการเลี้ยงในสภาวะการขาดออกซิเจน โดยเปรียบเทียบกลุ่มปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะการขาดออกซิเจนที่มีความเข้มข้น 0.85 มิลลิกรัมต่อลิตรกับกลุ่มปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะปกติที่ออกซิเจนมีความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากลุ่มปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะการขาดออกซิเจนปลามีการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงกว่ากลุ่มปลานิลที่เลี้ยงในสภาวะปกติ จากนั้นเมื่อนำปลานิลกลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่ขาดออกซิเจนไปฟื้นฟูโดยการเลี้ยงที่สภาวะปกติ พบว่าปลานิลมีการฟื้นตัว โดยการแสดงออกของยีนเริ่มลดลงตั้งแต่เวลา 45 นาที และอยู่ในระดับปกติที่เวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาของ Koeypuksa (2006) ซึ่งทดสอบผลของการขาดออกซิเจนแบบเฉียบพลันต่อความเครียดในปลาอุกอุกผสม (*Clarias gariepinus* Burchell x *C. macrocephalus* Gunther) พบว่าปลาอุกอุกผสมที่เลี้ยงด้วยค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที มีระดับความเครียดสูงกว่ากลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 5.8-6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อนำปลากลุ่มที่เลี้ยงในสภาวะที่ขาดออกซิเจนไปฟื้นฟู โดยการเลี้ยงที่สภาวะปกติ พบว่าปลาอุกอุกผสมมีระดับความเครียดเริ่มลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่เวลา 30 นาที และอยู่ในระดับปกติที่เวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การเลี้ยงปลาหลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก โดยให้ออกซิเจน อาจทำให้ปลาเกิดการติดเชื้อเนื่องจากออกซิเจนไม่มีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้ รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ และคณะ (2551) รายงานว่าการดูแลรักษาปลาหลังการฝัง ควรนำปลามาพักไว้ในถังน้ำที่สะอาดให้ออกซิเจนตลอดเวลา เปลี่ยนน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 2 วัน รวมทั้งเติมเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และล้างทับทิมความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สลับกันไปในแต่ละวัน ในช่วง 3 วันแรก เพื่อป้องกันการติดเชื้อ

5.6 ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแก่ต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกันในปลานิลและปลาคูกผสม

จากการนำปลานิลและปลาคูกผสมมาใส่ยาสลบ MS222 ทำการฝังอาร์เอฟไอดีแก่บริเวณช่องท้อง จากนั้นทำการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแก่ในบ่อที่ให้ออกซิเจนและเลี้ยงในถังที่อุณหภูมิปกติ คือ 28-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง คือ 35 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกหลังจากการฝังที่เวลา 30 นาที 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มาทำการสกัด total RNA เพื่อนำ total RNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *hsp70* และยีน β -actin ด้วยชุด QIAGEN® Onestep RT-PCR Kit และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์อัตราส่วนการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *hsp70* พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอุณหภูมิสูงมีการแสดงออกของยีน *hsp70* หลังจากการฝังอาร์เอฟไอดีแก่ที่เวลา 30 นาที และ 12 ชั่วโมง ในระดับสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอุณหภูมิปกติ ส่วนที่ 24 ชั่วโมง หลังจากการฝังในปลานิล พบว่ามีการแสดงออกลดลงโดยที่ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ในปลาคูกผสม ปลามีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากปลาคูกผสมเป็นปลาในกลุ่ม stenothermal ที่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิได้ในช่วงสั้น ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงคือ 25-32 องศาเซลเซียส ทำให้มีปลาการเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (ไมตรีดวงสวัสดิ์ และจารุวรรณ สมศิริ, 2528; Hernandez *et al.*, 2007) นอกจากนี้มีรายงานพบว่าปลาคูกผสมไม่ชอบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกะทันหัน เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ อาจส่งผลให้ปลาตายได้ ส่วนปลานิลยังสามารถรอดชีวิต เนื่องจากเป็นปลากลุ่ม eurythermal ที่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง มีรายงานพบว่าปลานิลสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ดี ทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลาชนิดนี้อยู่ในเขตร้อน (กรมประมง, 2554)

มีรายงานจำนวนมากพบว่าการเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิสูงส่งผลให้ปลา มีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่สูงขึ้น เช่น Dunlap and Matsumura (1997) ศึกษาสภาวะความเครียดของลูกปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*) โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงคือ 24 องศาเซลเซียส อุณหภูมิปานกลางคือ 18 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำคือ 12-14 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) พบว่าลูกปลาแซลมอนที่เพาะเลี้ยงด้วยอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในระดับสูงกว่ากลุ่มปลาที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 12-14 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) และการทดลองของพรพรรณ พุ่มพวง และคณะ (2552) ศึกษาผลของการแสดงออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของยีน *hsp70* ที่เกิดจากอุณหภูมิการเลี้ยงต่างกันในแม่พันธุ์ปลาอุก โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิน้ำ 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเลี้ยงปลาในระยะเวลาสั้นขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีระดับการแสดงออกของยีนที่สูงในระยะเวลา 2 สัปดาห์ แต่การแสดงออกลดลงเมื่อเลี้ยงผ่านไป 6 สัปดาห์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

6.1 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุก พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hsp70* ในปลานิลและปลาดุกจำนวน 306 คู่เบส และ 415 คู่เบส ตามลำดับ หลังจากนั้นเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของพลาสมิด pG.nile และ pRT.nile มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลานิลชนิดต่างๆ ถึงร้อยละ 98-99 และปลาชนิดอื่นร้อยละ 80-86 และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ PCR และ RT-PCR ของพลาสมิด pG.catfish และ pRT.catfish มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *hsp70* ของปลาสายพันธุ์อื่นๆ สูงถึงร้อยละ 96-97

6.2 จำนวนรอบที่เหมาะสมของการทำ RT-PCR ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* คือ 30 รอบ เนื่องจากมีค่า log ของการแสดงออกของยีน *hsp70* มีค่าปานกลางระหว่างค่าต่ำสุด (20 รอบ) และค่าสูงสุด (40 รอบ) โดยค่านี้สามารถเพิ่มขึ้นตามสภาวะการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *hsp70* ได้

6.3 จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ไต และกล้ามเนื้อ ส่วนปลาดุกมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต แต่ไม่พบในกล้ามเนื้อ ดังนั้นทำการเลือกเนื้อเยื่อเหงือกในการทดลองต่อไป เพราะไม่จำเป็นต้องฆ่าสัตว์ทดลอง และเป็นเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกและไวต่อปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดได้เร็ว จึงน่าจะเหมาะสมในการเลือกศึกษาขั้นต่อไป

6.4 จากการศึกษาผลของการจับและการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* พบว่าทั้งการจับและการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กในปลาตัวอ่อนส่งผลให้ปลาเกิดความเครียด แต่เป็นเพียงความเครียดแบบเฉียบพลันเท่านั้น ซึ่งไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลา ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงพบว่าสามารถประยุกต์ใช้อาร์เอฟไอดีแท็ก ในกิจกรรมการทดลองหรือการพัฒนาปรับปรุงพ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำต่อไปได้

6.5 จากการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* พบว่าการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งช่องท้องและกล้ามเนื้อได้โคนครบหลัง มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้เห็นใบเขียวระบบออนไลน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงออกของยีน *hsp70* ไม่แตกต่างกันหลังการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกตำแหน่งช่องท้องในการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กดังนั้นจาก เพราะ อาร์เอฟไอดีแท็กจะอยู่ในช่องว่างในร่างกาย จึงไม่ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของปลาในระยะยาว แต่เวลาฝังควรระมัดระวังไม่ให้โดนอวัยวะภายในของปลา

6.6 จากการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* หลังจากการใช้ยาสลบและไม่ใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก พบว่าควรใช้ยาสลบก่อนทำการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก เพื่อเป็นการไม่ทรมานสัตว์ทดลอง เนื่องจากยาสลบทำให้ปลาเกิดอาการสูญเสียความรู้สึกบางส่วนหรือทั้งหมด โดยยาสลบจะแพร่เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ประสาทในส่วนของการส่งถ่ายข้อมูลไปสู่เซลล์ประสาทอื่นๆ ทำให้สูญเสียการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากภายนอก

6.7 จากการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงปลาที่ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่สภาวะต่างกัน พบว่าเลี้ยงในสภาวะที่ให้ออกซิเจนจะดีกว่าเนื่องจากหาง่าย และราคาไม่แพง แต่การให้ออกซิเจน ไม่มีระบบการฆ่าเชื้อ จึงควรดูแลรักษาหลังการฝังควรนำปลามาพักไว้ในถังน้ำที่สะอาดให้ออกซิเจนตลอดเวลา เปลี่ยนน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 2 วัน รวมทั้งเติมเกลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และด่างทับทิมความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สลับกันไปในแต่ละวัน ในช่วง 3 วันแรก เพื่อป้องกันการติดเชื้อ

6.8 จากการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงที่อุณหภูมิสูงมีระดับการแสดงออกของยีน *hsp70* สูงกว่าปลาที่เลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ หลังการฝังแท็กที่เวลา 30 นาที 12 และ 24 ชั่วโมง และพบว่าปลาที่ถูกผสมทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยกว่าปลานิล เนื่องจากปลาตายหลังเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น ควรเลี้ยงปลาหลังจากการฝังแท็กที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ ปลาที่ฝังแท็กจะสามารถปรับตัวต่อความเครียดได้ง่ายกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง

บรรณานุกรม

- กรมประมง. 2554. การเพาะเลี้ยงปลานิล. [Online]. Available: <http://www.fisheries.go.th/it-network/knowledge/type%20of%20fish/typeoffish.htm>. 12 มีนาคม 2554
- กฤษฎา งามอาจ. 2554. ข้อควรพิจารณาในการจัดการสุขภาพปลาในการเลี้ยงโดยระบบน้ำหมุนเวียน. [Online]. Available: <http://www.nicaonline.com/webboard/index.php?topic=7749.0;wap2>. 12 มีนาคม 2554
- กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง . 2549. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย. [Online]. Available: http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2549. 12 มีนาคม 2554
- กาญจนา ดั่งปันตา. 2547. การตรวจสอบการตอบสนองต่อความเครียดในกึ่งกุลาดำโดยใช้การตรวจวัด Heat shock proteins และระดับน้ำตาลในเลือด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฉวีวรรณ หนู่นุ่น. 2553. ยาเสพติดในปลา. [Online]. Available: http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=118. 12 มีนาคม 2554
- ชลลดา มือนันต์. 2553. ผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็ก (Radio Frequency Identification Tag) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ การเติบโต และความเครียด ในปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และกึ่งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นรินาม. 2551. จากบีกอูยสู่รัสเซีย การปรับตัวที่สอดคล้องกับสถานการณ์. นิตยสารธุรกิจสัตว์น้ำ ฉบับเดือนกันยายน. [Online]. Available: <http://www.siammarine.com/aquabiz.html>. 12 มีนาคม 2554
- พรพรรณ พุ่มพวง สุภาวดี พุ่มพวง อุทัยรัตน์ ณ นคร และวงศ์ปฐม กมลรัตน์. 2552. การแสดงออกของโปรตีน Heat shock และผลต่อพัฒนาของรังไข่ในแม่พันธุ์ปลาดุกอูย. การประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ วันที่ 10-11 กันยายน 2552.

พล พลแสน. 2553. เลี้ยงปลานิลแบบผสมผสานใช้ไอที+ไอโซนอยกระดับผลผลิตเกษตรกร.
[Online]. Available: <http://www.ozone-chitosan.com/>. 12 มีนาคม 2554 .

รุ่งตะวัน พนากุลชัยวิทย์ คุสิต เอื้ออำนวย ปวีณา ทวีกิจการ สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ และศูนย์
เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ. 2551. การใช้เทคโนโลยี RFID ในสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. ปทุมธานี :
สำนักพิมพ์งานประชาสัมพันธ์นิตยสารและสิ่งพิมพ์.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์ และ จารุวรรณ สมศิริ. 2528. คุณสมบัติของน้ำและวิธีวิเคราะห์สำหรับการวิจัย
ทางการประมง. กรุงเทพฯ : สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง.

วัชร อรรถทิพพหลคุณ และมนตรี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์
PCR Technology. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

วิวัฒน์ ชวนะนิกุล อรรถนพ สุริยสมบุรณ์ มนกันต์ อินทรกำแหง วุฒิชัย กลมเกลียว และศูนย์
เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ. 2551. รูปแบบการจัดการฟาร์มอัตโนมัติด้วยเทคโนโลยี RFID.
พิมพ์ครั้งที่ 1. ปทุมธานี : สำนักพิมพ์งานประชาสัมพันธ์นิตยสารและสิ่งพิมพ์.

ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2549. รู้จักกับเทคโนโลยีอาร์
เอฟไอดี. พิมพ์ครั้งที่ 1. ปทุมธานี : สำนักพิมพ์งานประชาสัมพันธ์ นิตยสารและสิ่งพิมพ์.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2550. วารสารมองเศรษฐกิจ. ฉบับที่ 2039.

หัตยา กาวิวงศ์. 2548. อนุพันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัด
บุญไชยการพิมพ์.

Airaksinen, S., Rabergh, S., Sistonen, C.M. and Nikinmaa, M. 1998. "Effects of heat shock and
hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells". *J. Exp.
Biol.* 201: 2543– 2551.

Anon. 2001. MS-222 is our leading product we are the exclusive, original primary, (Non-
generic) USFDA licensed MS-222 manufacturer in the U.S. [Online]. Available:
<http://www.argent-labs.com/argentwebsite/ms-222.htm>. 12/03/2011.

Anon. 2010. PCR optimization. [Online]. Available: <http://www.pcr-blog.com/files/tag-pcr-optimization.html>. 12/03/2011.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Arce, S.M., Argue, B.J., Thompson, D.A. and Moss, S.M. 2003. "Evaluation of aflourescent, alphanumeric tagging system for penaeid shrimp and its application inselective breeding programs". *Aquaculture*. 228: 267-278.
- Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M. and Iwama, G.K. 2002. "Heat shock protein genes and their functional significance in Fish". *Gene*. 295 : 173–183.
- Barton, B.A. 2002. "Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids". *Integ. Comp. Biol.* 42 : 517-525.
- Bridges, R. 2005. **Federation of British Aquitic Societies**. [Online]. Available : <http://www.fbas.co.uk/STRESS.html>. 12/03/2011
- Brower, P.R. 2001. Anesthetic option for fish. [Online]. Available : http://www.ivis.org/advances/Anesthesia_Gleed/brower/Chapter_frm.asp?LA=1. 12/03/2011
- Caceci, T., Smith, S.A., Toth, T.E., Duncan, R.B. and Walker, S.C. 1999. "Identification of individual prawns with implanted microchiptransponders". *Aquaculture*. 180 : 41-51.
- Cho, G. K., Healt, D. D. 2000. "Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile Chinook salmon *oncorhynchus tshawytscha* (Walbbaum). *Aquaculture*". 31 : 537-546.
- Columbia Basin Fish and Wildlife Authority PIT Tag Steering Committee (CBFWA). 1999. **PIT Tag Marking Procedures Manual**. Version 2.0. 12/03/2011
- Davenport, J., Baras, E., Fabi, G. and Jonsson, G. 1999. "Improvements of Tagging Methods for Stock Assessment and Research in Fisheries". *Final Report Fair*. CT.96.1394 CATAG.
- Dunlap, D.Y. and Matsumura, F. 1997. "Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70S as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors". *Ecotoxicol. Environ. Safe*. 37 : 238–244.
- Delaney, M. A. and Klesius, P.H. 2004. "Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)". *Aquaculture*. 236 : 633–644.

- De Pomerai, D. 1996. "Heat shock proteins as biomarkers of pollution". **Hum Exp. Toxicol.** 15 : 279-285.
- Fairfield, D.A. 2004. Heat shock transcription factor1 (HSF1) and the stress response in the auditory system. Ph.D. Thesis, Michigan University. USA.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations(FAO). 2005. Fisheries and aquaculture department. [Online]. Available : <http://www.fao.org/fishery/topic/4350/en>. 12/03/2011.
- Feldhaus, J.W. 2006. Heat shock proteins and physiological stress in redband rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss gairdneri*) in the south fork john day river, Oregon. Master of Science Thesis, Oregon State University. USA.
- Fulladosa, E., Deane, E., Ng, A. H.Y., Woo, N.Y. S., Murat, J.C. and Villaescusa, I. 2006. "Stress proteins induced by exposure to sublethal levels of heavy metals in sea bream (*Sparus sarba*) blood cells". **Toxicol. in Vitro.** 20 : 96-100.
- Glenn, N.W. and Cooke, S.J. 2005. "Methodological approaches and opinions of researchers involved in the surgical implantation of telemetry transmitters in fish". **J. Aquat. Anim. Healt.** 17:160-169.
- Gornati, R., Papis, E., Rimoldi, S., Terova, G., Saroglia, M. and Bernardini, G. 2004. "Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.)". **Gene.** 34 : 111-118.
- Hagen, N.T. 1996. "Tagging sea urchins : a new technique for individual identification". **Aquaculture.** 139 : 271-284.
- Hastein, T., Hill, B.J., Berthe, F. and Lightner, O. V. 2001. "Traceability of aquatic animals". **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics).** 20 : 564-583.
- Hernandez, J.M., Santana, M. L. and Leon, C.J. 2007. "The role of the water temperature in the optimal management of marine aquaculture". **Eur. J. Oper. Res.** 181 : 872 - 886.
- Iwana, G.K., Mathilakath, M.V., Rob, B.F. and Paige, A.A. 1999. "Heat shock proteins and physiological stress in fish". **Amer. Zool.** 39 : 901-909.

- Iwana, G.K., Afonso, L.O.B. and Vijayan, M.M. 2004. **Stress in fish**. Aquanet workshop on fish welfare, Campbell River, Canada, 27 September 2004.
- Jerry, D.R., Stewart, T., Purvis, I.V., and Piper, L.R. 2001. "Evaluation of visual implant elastomer and alphanumeric internal tags as a method to identify juveniles of the freshwater crayfish, *Cherax destructor*". **Aquaculture**. 193 : 149-154.
- Jonson, T., Mahlamak, E.H., Karhu, R., Gorunova, L., Johansson, B. and Ho" glund,M. 2000. "Characterization of genomically amplified segments using PCR: optimizing relative-PCR for reliable and simple gene expression and gene copy analyses". **Genes Chromosome & Cancer**. 29 : 192-199.
- Kalp, G.C. 2002. **Cell and Molecular Biology Concept and Experiments**. New York : John.
- Koeypudsa. 2006. "Impact of acute anoxia on stress in hybrid catfish (*Clarias gariepinus* Burchell x *C. macrocephalus* Gunther)". **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 31 : 127-132.
- Lawson, T.B. 1995. **Fundamentals of Aquacultural Engineering**. Chapman & Hall. New York.
- Lückstädt, C., Schill, R.O., Focken, R., Köhler, H. R. and Becker, K. 2004. "Stress protein Hsp70 response of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to induced hypoxia and recovery". **Verhandlungen der Gesellschaft für Ichthyologie Band. 4:** 137-141.
- Rabergh, C.M. I., Airaksinen, S., Soitamo, A., Bjorklund, H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M. and Sistonen, L. 2000. "Tissue-specific expression of Zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress". **J. Exp. Biol.** 203 : 1817-1824.
- Roberts, C.M. 2006. "Radio frequency identification (RFID)". **Comput. SC.** 25 : 18 – 26.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. "The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees". **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.
- Sakaris, P. C. and Jesien, R.V. 2005. "Retention of surgically implanted ultrasonic transmitters in the brown bullhead catfish". **N. Am. J. Fish. Manage.** 25 : 822-826.
- Sambrook, J. and Russel ,D.2001. **Molecular cloning a laboratory manual**. Volume 3 : Third Edition.

- Sanders, B. M., Martin L.S., Howe S.R., Nelson W.G., Hegre E.S. and Phelps D.K. 1994. Tissue-specific differences in accumulation of stress proteins in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. **Toxicol. App. Pharmacol.** 125:206-213.
- Sinha, A. K., Vanparys, C., Boeck, G. D., Kestemont, P., Wang, N., Phuong, N. T., Scippo, M. L., Coen, W. D., and Robbens, J. 2010. "Expression characteristics of potential biomarker genes in Tra catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, exposed to trichlorfon". **Comp. Biochem. Physiol.** 3 : 207–216.
- Small, B. C. 2003. "Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol response to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetize channel catfish *Ictalurus punctatus*". **Aquaculture.** 218 : 177-185.
- Sukumaran, K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Dalvi, R.S. and Debnath, D. 2008. "Haemato-biochemical responses and induction of HSP70 to dietary phosphorus in Catla catla (Hamilton) fingerlings". **Fish Physiol. Biochem.** 34 : 299–306.
- Systat 5.02 for Windows. Copyright 1990-1993. Systat, Inc. Evanston. IL USA.
- Thorsteinsson, V. 2002. **Tagging methods for stock assessment and research in fishes.** Report of concerted action fair CT.96.1394 (CATAG). Marine research institute technical report (79), pp 179.
- Vijayan, M.M., Pereiral, C., Forsyth, R.B., Kennedy, C. A. and Iwama, J. K. 1997. "Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with β -naphthoflavone". **Environ.Toxicol.Chem.** 61 : 117-127.
- Washborn, B. S., Moreland, J. J., Slaughter, A. M., Werner, I. Hinton, E. D. and Sanders, B. M. 2002. "Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". **Environ. Toxicol. Chem.** 21: 557–560.
- Woods, C.M.C. 2005. "Evaluation of VI-alpha and PIT-tagging of the seahorse *Hippocampus andominalis*". **Aquaculture.** 13 : 175-186.
- [Online]. Available : <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>. 24/05/2011.

[Online]. Available : <http://handphonebaru.info/review/www-rt-pcr-com.html>. 24/05/2011.

[Online]. Available : <http://opbs.okstate.edu/~petracek/CHAPTER%2029%20FIGS/Fig%2029-01.JPG>. 24/05/2011.

[Online]. Available : <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/sequencing2.gif>. 24/05/2011.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	20	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast-extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลาย RF1

ส่วนประกอบ

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	30	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

ปรับพีเอชเป็น 5.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

สารละลาย RF2

ส่วนประกอบ

MOPs	10	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	10	มิลลิโมลาร์
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂)	10	มิลลิโมลาร์
กลีเซอรอล	15	เปอร์เซ็นต์

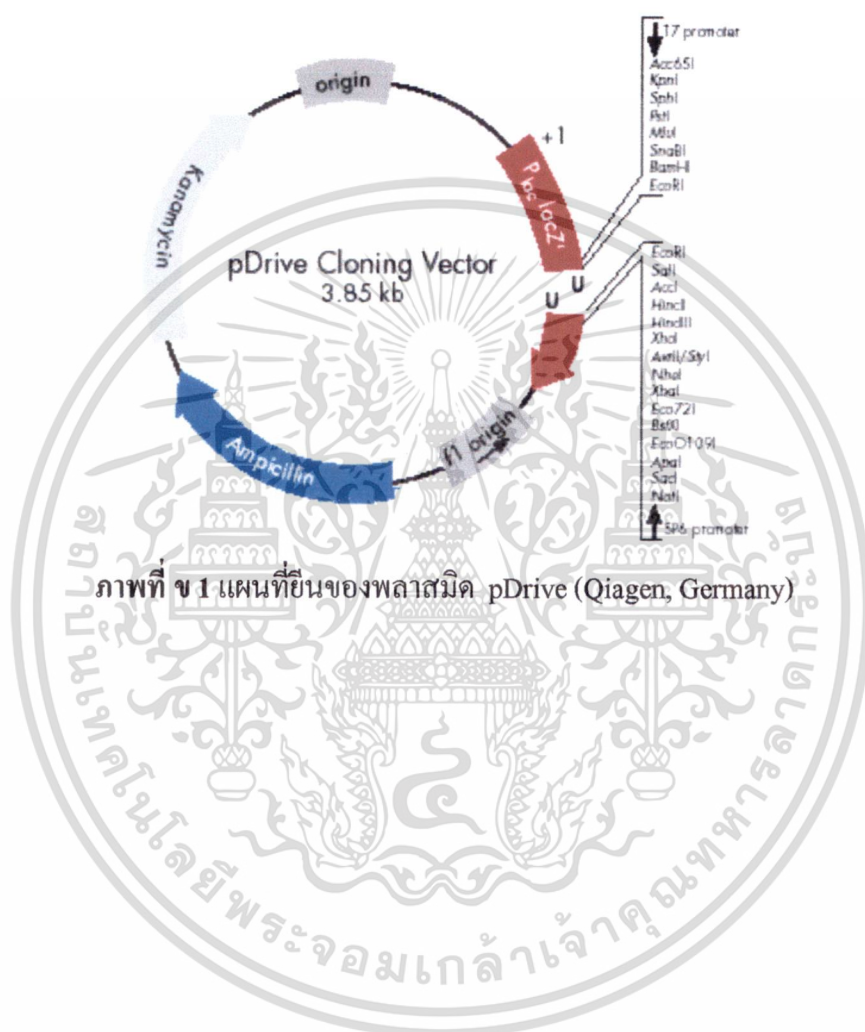
ปรับพีเอชเป็น 6.8 ด้วยกรดอะซิติก แล้วกรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย



ภาพที่ ข 1 แผนที่ยีนของพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany)

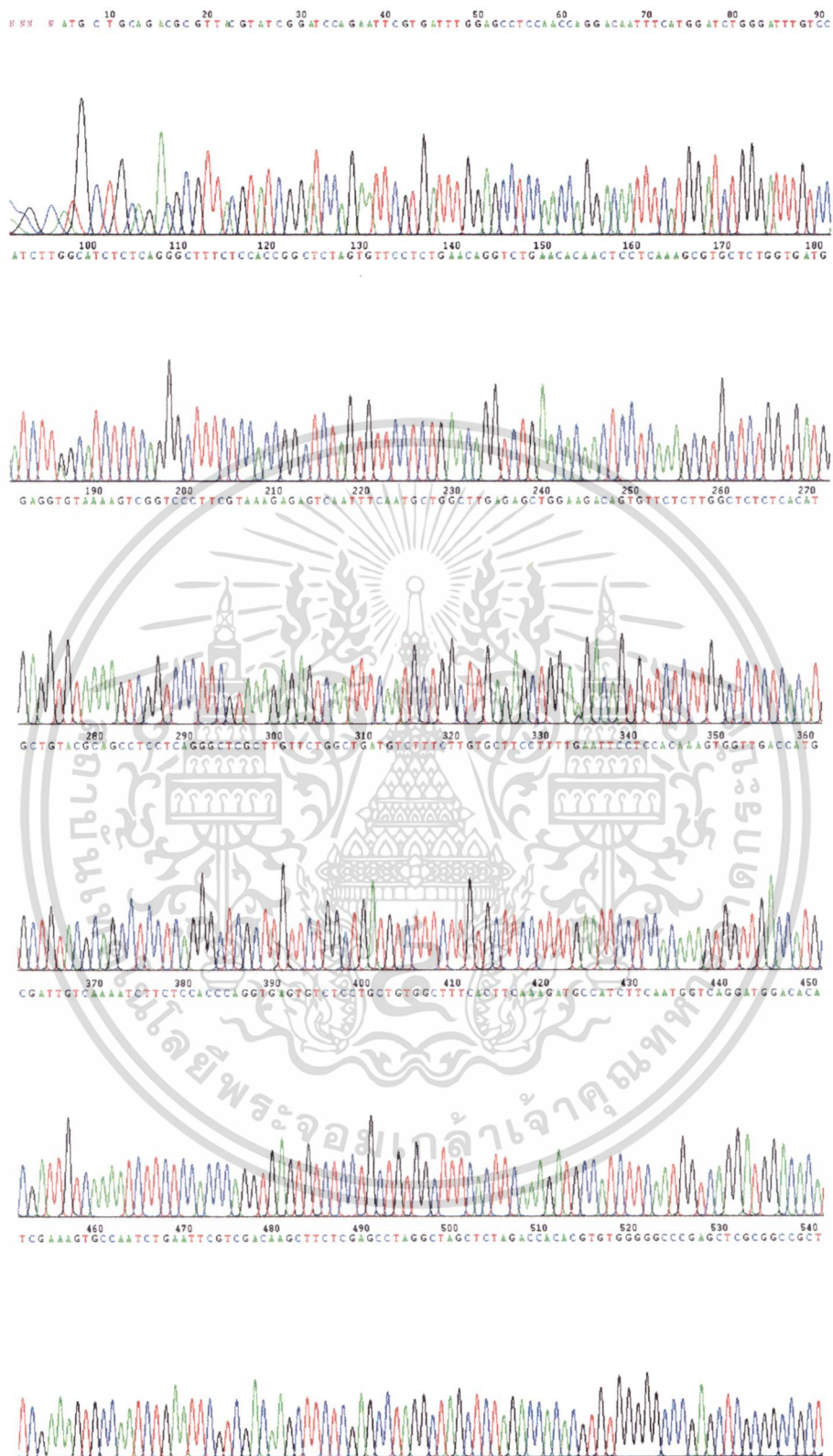
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค



ภาพที่ ค 1 โครมาโทแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในปลานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค 2 โครมาโทแกรมลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ในปลาตุ๊กตาส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางที่ ง 1 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาการ
แสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันในปลานิล

ANALYSIS OF VARIANCE					
SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRTS	0.075	3	0.025	34.611	0.003
ERROR	0.003	4	0.001		

ตารางที่ ง 2 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาการ
แสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันในปลานิล

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES:				
	1	2	3	4
1	1.000			
2	0.014	1.000		
3	0.216	0.290	1.000	
4	0.019	1.000	0.535	1.000

- 1 เนื้อเยื่อเหงือก
- 2 เนื้อเยื่อไต
- 3 เนื้อเยื่อตับ
- 4 เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ

ตารางที่ 3 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาการ
แสดงออกของยีน *hsp70* ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันในปลาอุกอุกผสม

ANALYSIS OF VARIANCE					
SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.055	2	0.027	0.108	0.009
ERROR	1.012	4	0.253		

ตารางที่ 4 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการ
ฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่เวลาต่างๆ ในปลานิล

ANALYSIS OF VARIANCE					
SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
FAC1\$	0.191	1	0.191	121.342	0.000
FAC2\$	0.006	1	0.006	3.570	0.132
FAC1\$*FAC2\$	0.000	1	0.000	0.199	0.679
ERROR	0.006	4	0.002		

ตารางที่ 5 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการ
ฝังอาร์เอฟไอดีที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *hsp70* ที่เวลาต่างๆ ในปลาอุกอุกผสม

ANALYSIS OF VARIANCE					
SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
FAC1\$	0.994	1	0.994	434.320	0.000
FAC2\$	0.011	1	0.011	4.760	0.081
ERROR	0.011	5	0.002		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง 6 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิล

ANALYSIS OF VARIANCE					
SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.229	2	0.115	20.281	0.000
ERROR	0.051	9	0.006		

ตารางที่ ง 7 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลานิล

BONFERRONI ADJUSTMENT.			
MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES:			
	1	2	3
1	1.000		
2	0.001	1.000	
3	1.000	0.002	1.000

- 1 ตำแหน่งช่องท้อง
- 2 กลุ่มควบคุม
- 3 ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนกรีบหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๘ ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาถูกถูกผสม

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.118	2	0.059	24.851	0.014
ERROR	0.007	3	0.002		

ตารางที่ ๙ ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กที่ตำแหน่งต่างกันต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* ในปลาคูกผสม

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIR WISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3
1	1.000		
2	0.031	1.000	
3	1.000	0.023	1.000

- 1 ตำแหน่งช่องท้อง
- 2 กลุ่มควบคุม
- 3 ตำแหน่งกล้ามเนื้อใต้โคนครีบท้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กในปลานิล

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.290	2	0.145	25.427	0.000
ERROR	0.051	9	0.006		

ตารางที่ 11 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กในปลานิล

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3
1	1.000		
2	0.002	1.000	
3	0.000	0.505	1.000

- 1 กลุ่มควบคุม
- 2 กลุ่มที่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ก
- 3 กลุ่มที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนการฝังอาร์เอฟไอดีเท็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฟิงอาร์เอฟไอดีแท้ต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฟิงอาร์เอฟไอดีแท้ในปลาคุณลูกผสม

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.178	2	0.089	27.306	0.012
ERROR	0.010	3	0.003		

ตารางที่ 13 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฟิงอาร์เอฟไอดีแท้ต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยการใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฟิงอาร์เอฟไอดีแท้ไปปลาคุณลูกผสม

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3
1	1.000		
2	0.026	1.000	
3	0.021	1.000	1.000

- 1 กลุ่มควบคุม
- 2 กลุ่มที่ใส่ยาสลบก่อนการฟิงอาร์เอฟไอดีแท้
- 3 กลุ่มที่ไม่ใส่ยาสลบก่อนการฟิงอาร์เอฟไอดีแท้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการ
ฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่สภาวะต่างกันใน
ปลานิล

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRTS	0.270	2	0.135	19.975	0.000
ERROR	0.061	9	0.007		

ตารางที่ 15 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผล
ของการฝังอาร์เอฟไอดีแท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่สภาวะ
ต่างกันในปลานิล

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3
1	1.000		
2	0.003	1.000	
3	0.001	0.778	1.000

- 1 กลุ่มควบคุม
- 2 เลี้ยงโดยให้ออกซิเจน
- 3 เลี้ยงโดยให้ไอโซน

ตารางที่ 16 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่สภาวะต่างกันในปลาอุกอุกผสม

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.038	2	0.194	25.886	0.0013
ERROR	0.022	3	0.007		

ตารางที่ 17 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฝังอาร์เอฟไอดีเท็กต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่สภาวะต่างกัน ปลาอุกอุกผสม

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIR WISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3
1	1.000		
2	0.021	1.000	
3	0.032	1.000	1.000

- 1 กลุ่มควบคุม
- 2 เลี้ยงโดยให้ออกซิเจน
- 3 เลี้ยงโดยให้อิโชน

ตารางที่ 18 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฟังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่างกัน
ในปลาไนล

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRT\$	0.276	3	0.092	25.886	0.008
ERROR	0.019	4	0.005		

ตารางที่ 19 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฟังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่างกัน
ต่างกันในปลาไนล

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIR WISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3	4
1	1.000			
2	0.014	1.000		
3	0.091	0.290	1.000	
4	0.019	1.000	0.535	1.000

- 1 กลุ่มควบคุม
- 2 เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 12 ชั่วโมง
- 3 เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 24 ชั่วโมง
- 4 เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 30 นาที

ตารางที่ 20 ตารางการวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฟังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่างกัน ในปลาอุกทุกผสม

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
TRTS	0.232	2	0.116	8.362	0.059
ERROR	0.042	3	0.014		

ตารางที่ 21 ตารางการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองในการศึกษาผลของการฟังอาร์เอฟไอดีเท็ทต่อการแสดงออกของยีน *hsp70* โดยเลี้ยงปลาที่อุณหภูมิต่างกัน ในปลาอุกทุกผสม

BONFERRONI ADJUSTMENT.

MATRIX OF PAIRWISE COMPARISON PROBABILITIES:

	1	2	3
1	1.000		
2	0.126	1.000	
3	0.106	1.000	1.000

- 1 กลุ่มควบคุม
- 2 เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 12 ชั่วโมง
- 3 เลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 30 นาที

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวณิชนันท์ ทินปราณี
วัน เดือน ปีเกิด	12 เมษายน พ.ศ.2527 ที่จังหวัดบุรีรัมย์
ที่อยู่	264 หมู่ 7 ตำบลโคกเหล็ก อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ 31000
ประวัติการศึกษา	2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตรกรรมการประมง) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปัญหาพิเศษเรื่อง “ชนิดของกรดไขมันในไรแดงที่เลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน”
ผลงานวิจัย	ตีพิมพ์เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาคบรรยาย 17-20 มีนาคม 2552 เรื่อง “การศึกษาเบื้องต้นของการแสดงออกของยีนฮีตช็อคโปรตีนในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันในปลาไนล์”



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้