รายงานการวิจัย

ลักษณะพันธุกรรมจากรูปแบบไอโซไซม์ของหอย ในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง

Genetic Evidence of Isozymes Patterns in Clams at Rajamangala Beach, Sikao Districk, Trang province.

โดย

อุไรวรรณ วัฒนกุล วัฒนา วัฒนกุล

สุรเสน ศรีริกานนท์ จิโรจน์ พีระเกียรติขจร

รอ.
024

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2545
จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

ห้องสมุด วบ.

รายงานการวิจัย

ลักษณะพันธุกรรมจากรูปแบบไอโซไซม์ของหอย ในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง

Genetic Evidence of Isozymes Patterns in Clams at Rajamangala Beach, Sikao Districk, Trang province.

โดย

อุไรวรรณ วัฒนกุล วัฒนา วัฒนกุล
สุรเสน ศรีริกานนท์ จิโรจน์ พีระเกียรติขจร

หมายเลขทะเบียน 24
เลขหมู่ .....
เลขบันทึก .....
วันที่ 4 ก.ย. 2550

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2545
จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

ห้องสมุด
มทร.ศรีวิชัย วบ.ตรัง

ลักษณะพันธุกรรมจากรูปแบบไอโซไซม์ของหอย ในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง

Genetic Evidence of Isozymes Patterns in Clams at Rajamangala Beach, Sikao Districk, Trang province

อุไรวรรณ วัฒนกุล[1] วัฒนา วัฒนกุล[1] สุรเสน ศรีริกานนท์[1] จิโรจน์ พีระเกียรติขจร[1]
Uraiwan Wattanakul[1] Wattana Wattanakul[1] Surasen Sririkanon[1] Jiroj Peerakiatichajorn[1]

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาลักษณะพันธุกรรมจากรูปแบบไอโซไซม์ของหอย 11 ชนิดที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง ดังนี้ หอยตะเภา (*Donax scortum* Linnaeus), หอยแครง (*Anadara granosa* L.), หอยแมลงภู่ (*Perna viridis* Linneaus), หอยลาย (*Paphia undulata*), หอยมุกแกลบ (*Pinctada sp.*), หอยเจดีย์ (*Turritella terebra*), หอยตะกายขาว (*Polinices tumidus*), หอยซองพลู (*Atrina sp.*), หอยตลับ (*Meretrix meretrix*), หอย *Melongena pugilina*, และหอยน้ำพริก (*Nerita undata*) โดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิส เอนไซม์ที่ใช้ศึกษามี 6 ชนิด ผลการศึกษา พบว่ามีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส (Malate dehydrogenase) และเอนไซม์แอลฟา-เอสเทอเรส (α-Esterase) สามารถแยกความแตกต่างของหอยทั้ง 11 ชนิดได้ โดย เนื้อเยื่อหอยที่ย้อมเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของหอยได้ 10 ชนิด คือ หอยตะเภา, หอยแครง, หอยแมลงภู่, หอยมุกแกลบ, หอยเจดีย์, หอยตะกายขาว, หอยซองพลู, หอยตลับ, หอย *Melongena pugilina*, และหอยน้ำพริก ยกเว้นหอย 1 ชนิดที่ไม่สามารถจำแนกได้ คือ หอยลาย แต่เมื่อนำมาย้อมด้วยเอนไซม์แอลฟา-เอสเทอเรส สามารถจำแนกหอยทั้ง 11 ชนิดได้อย่างชัดเจน

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

[1] Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala Institute of Technology.

ABSTRACT

To study on genetic evidence of Isozyme patterns in 11 species of shells at Faculty of Science and Fisheries Technology, Trang Province is Leather Donax (*Donax scortum* Linnaeus), Cockle (*Anadara granosa* L.), Green mussel (*Perna viridis* Linneaus), Undulating Venus (*Paphia undulata*), *Pinctada sp.*, Scrow Turritella (*Turritella terebra*), Pear-Shape Moon (*Polinices tumidus*), Pen shell (*Atrina sp.*), Meretrix Venus (*Meretrix meretrix*), *Melongena pugilina* and Waved Nerite (*Nerita undata*) in tissues by electrophoresis. Six enzymes was used. The result showed that two isozyme, namely Malate dehydrogenase and α-Esterase were used for identification purpose. The result showed that Malate dehydrogenase were able to identify the ten shells species ; Leather Donax, Cockle, Green mussel, *Pinctada sp.*, Scrow Turritella, Pear-Shape Moon, Pen shell, Meretrix Venus, *Melongena pugilina* and Waved Nerite, Except the one shells species were unable to indentify is Undulating Venus, when enzyme strain with α-Esterase could identify these eleven different species separately

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(3)
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	13
ผลและวิจารณ์	17
สรุปและข้อเสนอแนะ	22
กิตติกรรมประกาศ	23
บรรณานุกรม	24
ภาคผนวก	27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของเอนไซม์ หน้าที่ และอวัยวะที่มีปฏิกิริยา	7
2	การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล	15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบาญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงแบบแผนเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส (Malate dehydrogenase) ของหอย 11 ชนิดที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง 18
2. แสดงแบบแผนเอนไซม์ α-Esterase ของหอย 11 ชนิดที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง 19

ภาพผนวกที่

1. หอยตะเภา (Leather Donax) *Donax scortum* Linnaeus 31
2. หอยตลับ (Meretrix Venus) *Meretrix meretrix* 31
3. หอยแครง (Cockle) *Anadara granosa* L. 32
4. หอยแมลงภู่ (Green mussel) *Perna viridis* Linneaus 32
5. หอยลาย (Undulating Venus) *Paphia undulata* 33
6. *Melongena pugilina* 33
7. หอยตะกายขาว (Pear-Shape Moon) *Polinices tumidus* 34
8. หอยน้ำพริก (Waved Nerite) *Nerita undata* 34
9. หอยซองพลู *Atrina sp.* 35
10. หอยเจดีย์ (Scrow Turritella) *Turritella terebra* 35
11. หอยมุกแกลบ *Pinctada sp.* 36

บทนำ

หาดราชมงคล เป็นชายหาดที่มีความสวยงามและมีบริเวณที่ตั้งอยู่ใน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ซึ่งมีความสมบูรณ์ของธรรมชาติ สภาพพื้นที่บริเวณชายหาด ประกอบด้วยระบบนิเวศที่มีความสมบูรณ์และหลากหลาย เช่น ป่าชายเลน บริเวณหาดหิน หาดทราย เป็นต้น สัตว์ทะเลที่พบเห็นในหาดราชมงคล ได้แก่ กุ้งหอยปู ปลา ปลาดาว แมงกะพรุน เป็นต้น แต่ที่พบได้ง่ายและมีมากในบริเวณหาดทราย คือ หอย ซึ่งเป็นสัตว์ที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี แต่ปัจจัยการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิ, แสง, อาหาร ทำให้ลักษณะของหอยที่อาศัยอยู่ตามบริเวณนี้มีลักษณะแตกต่างกัน แม้บางครั้งจะมองดูด้วยตาเปล่าแล้วคาดว่าน่าจะเป็นชนิดเดียวกัน แต่ก็ยังมีความแตกต่างทั้งในด้านสี สรร ขนาด เป็นต้น ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้ในการจัดอนุกรมวิธานไม่มีความชัดเจน แต่ปัจจุบันพบว่า ในการศึกษาการจำแนกหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของหอยนั้นสามารถทำได้ในหอยที่มีคยามต่างพันธุ์กันอย่างชัดเจน แต่ลักษณะบางอย่างที่ใกล้เคียงกันจนไม่สามารถมองได้ด้วยตาเปล่านั้น ต้องใช้คุณสมบัติด้านอื่นๆ ที่ละเอียดกว่ามาช่วยในการพิจารณา การศึกษาลักษณะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมและไม่ถูกควบคุมด้วยสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตนั้นนับว่ามีความสำคัญมากในการจำแนกสิ่งมีชีวิตกลุ่มย่อยๆ ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน

นรากร และนงเยาว์ (2542) ได้ทำการศึกษาหอยทะเลและเปลือกหอยที่พบบริเวณหาดราชมงคล จังหวัดตรัง พบหอยทะเลฝาคู่ (หอยสองฝา) 16 ครอบครัว 27 สกุล 34 ชนิด หอยทะเลฝาเดียว 23 ครอบครัว 28 สกุล 49 ชนิด และหอยทะเลอันดับหอยงาช้าง 1 ครอบครัว 1 สกุล 2 ชนิด

หอยตะเภา (Leather Donax) เป็นชื่อที่เรียกกันทั่วไปในท้องที่ พบมากในท้องที่ของอำเภอสิเกา และ อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง หอยตะเภามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Donax scortum* Linnaeus (Dance, 1982) มีชื่อพ้องว่า *Hecuba sccrtum* Linnaeus (Abbott and Dance, 1983)

หอยตะเภาเป็นหอยที่ฝังตัวอยู่ใต้พื้นทราย บริเวณชายหาดที่มีพื้นที่ลาดชันเล็กน้อย ผิวนอกของเปลือกหอยตะเภาจะมีสีเขียวอมเหลือง บางตัวสีค่อนข้างคล้ำ เปลือกจะมีรูปทรงแบบ triangular shape เปลือกเป็นแบบ inequivale เปลือกด้าน anterior dorsal จะยาวกว่าด้าน posterior dorsal cardinal tooth 1 อัน และ lateral teeth 2 อัน external ligament เห็นชัดเจน ร่อง escutcheon ตื้นอยู่เหนือ umbo ขึ้นไปเล็กน้อย เปลือกด้านนอกเป็นสีขาว มี

concentric line 40 - 49 แถบ และบริเวณด้านบนของ concentric line จะเป็นเส้นแข็งหนา บริเวณใกล้ขอบ ventral margin บริเวณ anterior dorsal margin เป็นแอ่งเว้า มีสันข้างแยกมาจาก umbo มี radial ribs ละเอียดบนผิวเปลือก เปลือกฝาซ้ายและขวาเท่ากัน และฝาทั้งสองข้างประกบกันสนิทเปลือกด้านในจะมีสีม่วงอ่อน ด้าน anterior เป็นปลายแหลม (นรากร และนงเยาว์, 2542) นอกจากนี้หอยตะเภายังมีท่อน้ำ (siphon) ซึ่งอยู่ทางตอนท้ายยื่นยาวขึ้นมาเหนือพื้นทราย การกินอาหารและการหายใจจะผ่านทางท่อน้ำ และบริเวณที่หอยตะเภาอาศัยอยู่มักจะพบหอยเจดีย์ หรือหอยหลักไก่อาศัยรวมอยู่ด้วย (อารมณ์, 2532)

จิโรจน์ (2538) ได้ศึกษาถึงชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตะเภาบริเวณอำเภอสิเกา พบว่าการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของหอยตะเภา มีวงจรการพัฒนาใช้เวลาประมาณ 6 เดือน คือ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนกรกฎาคม และมีการวางไข่สืบพันธุ์ในเดือนมิถุนายน

หอยตลับ (Meretrix Venus) มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นต่างๆ ด้วยกัน คือ หอยหวาน, หอยตลับลาย, หอยขาวหอยกะปุก เป็นต้น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Meretrix meretrix* (Linnaeus, 1758) หอยชนิดนี้เป็นหอยสองฝาที่อยู่ตามชายฝั่งทะเล หรือบริเวณปากน้ำกร่อยที่เป็นหาดทราย เป็นหอยที่มีเปลือกรูปสามเหลี่ยมฐานโค้งมนโป่งพองหนา umbo อยู่เกือบตรงกลางเปลือก ค่อนไปทางด้าน anterior เล็กน้อย ผิวเปลือกเรียบเป็นมันวาว lunule ใหญ่มีสันนูนยกขึ้นตรงกลาง escutcheon ใหญ่ กว้าง ligament เด่นชัด posterior lateral teeth มีลักษณะเป็นฟันเล็กละเอียดยาวตลอด hinge ส่วน anterior lateral teeth ใหญ่ชัดเจน เปลือกสีน้ำตาลอ่อนมีลายซิกแซกซ้อนกันลงมาตามแนววงเปลือก บางครั้งเป็นแถบสีน้ำตาลเข้มพาดตามแนววงเปลือก เปลือกด้านในมีสีขาวครีม บริเวณขอบบนทางด้าน posterior จะมีสีน้ำตาลม่วงเข้ม adductor muscle scar มีขนาดเท่ากัน pallial sinus รูปตัว U ขอบเปลือกด้านในเรียบ (นรากร และนงเยาว์, 2542)

หอยชนิดนี้มีเนื้อหวาน และมีคุณค่าทางอาหาร นิยมบริโภคกันมากโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น ส่วนมากจะนำไปบรรจุกระป๋องแทนเนื้อหอยลาย แล้วจำหน่ายต่างประเทศในช่วงที่หอยลายขาดแคลน หอยชนิดนี้มีช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์ 2 ช่วง คือ ช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงสิงหาคม กับช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน ถึงมกราคม (สุนันท์ และปรานอม, 2529)

หอยแครง (Cockle) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Anadara granosa* L. เป็นหอยสองฝาซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Arcidae มีอวัยวะเพศแยกและกระจายอยู่บริเวณส่วนที่เรียกว่า Veseeral mass เปลือกนอกเป็นรูปสามเหลี่ยม ด้านในโปร่งนูน เปลือกหนา ตอนบนส่วนที่เป็นบานพับมีฟันแข็ง

เรียงกันอยู่เป็นแถว มีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย ด้านนอกของเปลือกมีร่องยาวเรียงกันประมาณ 20 ร่องสีของเปลือกไม่แน่นอน หอยแครงเป็นที่นิยมบริโภคของประชากรในแถบพื้นที่เขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูง ในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงในหลายพื้นที่ตามแถบชายฝั่งของประเทศไทย รวมทั้งมีการศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ของหอยแครงตามที่ต่างๆ โดยศึกษาลักษณะเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ พบว่า หอยแครงที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดสตูล มีฤดูกาลสืบพันธุ์ตรงกับช่วงฤดูฝนของท้องถิ่น คือตั้งแต่เดือนสิงหาคมไปจนถึงมกราคม (จินตมาศ และสุพัตรา, 2534)

หอยแมลงภู่ (Green mussel) เป็นหอยที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ หอยแมลงภู่ที่เลี้ยงในประเทศไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Perna viridis* Linneaus ซึ่งประกอบด้วยเปลือกแข็งที่ห่อหุ้มลำตัวอยู่ภายนอก เปลือกหรือฝาหอยมีลักษณะรียาวคล้ายรูปไข่ มีลักษณะเหมือนกันและมีขนาดเท่ากันทั้งสองฝา ด้านนอกของฝามีสีเขียวเข้มคล้ายปีกแมลงทับ และบ้างก็เป็นสีน้ำตาล ส่วนด้านในมีสีขาวคล้ายมุก ส่วนประกอบของเปลือกหอยแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นนอกสุดจะมีสีเขียวเข้ม มีวงรอยชั้นแสดงการเจริญเติบโตของหอยในแต่ละปี สามารถลอกออกเป็นแผ่นได้ ส่วนชั้นกลางเป็นสีขาวประกอบด้วนแคลเซียมคาร์บอเนต ชั้นในหรือส่วนผิวของฝาด้านในมีสีขาวเรียบมันวาวเหมือนมุก ฝาทั้งสองจะยึดและประกบติดกันโดยเส้นเอ็น (ligament) ที่อยู่ด้านหลังของฝา (dorsal part) ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มหรือดำเป็นทางยาวตลอดแนวด้านหลัง ตั้งแต่ปลายก้นหอย (umbo) โค้งไปถึงหนึ่งในสามของเปลือกด้านหลังของหอย

หอยแมลงภู่มีการแพร่กระจายทั่วไปในเขตอบอุ่นและเขตร้อนทั้งในยุโรป อเมริกา และเอเชีย

ในประเทศไทย มีหอยแมลงภู่แพร่กระจายอยู่ทั่วไปแทบทุกจังหวัดชายฝั่งทะเล ทั้งชายฝั่งทะเลด้านอ่าวไทย และชายฝั่งทะเลอันดามัน (กรมประมง, 2536)

หอยลาย (Undulating Venus) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Paphia undulata* (Born, 1778) เปลือกมีรูปวงรีปลายด้าน posterior แหลมกว่าด้าน anterior เปลือกโป่งพองและเอียงลาดลงมาทางด้านท้อง umbo อยู่ค่อนมาทางปลาย anterior ผิวเปลือกเป็นมันวาวมีเส้น concentric line หลายเส้นเด่นชัด มีร่องระหว่างเส้นชัดเจน ไม่มีเส้น radial line เปลือกด้านนอกมีสีน้ำตาลและมีลายเส้นสีน้ำตาลซิกแซกซ้อนกันเป็นชั้นๆ ตามแนววงเปลือก umbo มีลายซิกแซกซ้อนกันมาก lunule แคบยาวจาก umbo ถึงปลายด้าน anterior และ escutcheon ยาวมีขอบมนไม่ชัดเจน เปลือกด้านในสีขาว ขอบด้านในเรียบ มี anterior adductor muscle scar 2 อันในแต่

ละฝา posterior adductor muscle scar จะใหญ่กว่า anterior pallial sinus รูปตัว V hinge ยาว lateral teeth เกือบจะหายไป (นรากร และนงเยาว์, 2542)

Melongena pugilina (Born, 1778) เปลือกรูปทรงแบบ Club-shape เปลือกหนา apex เป็นยอดสูงเห็นได้ชัดเจน ตั้งแต่ apex ถึง body whorl มี tubercles เป็นวงรอบๆ ส่วนของ spire 6 - 7 วง โดย tubercles มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะวงสุดท้าย aperture เปิดตามความยาว เปลือก ร่อง umbilicus ตื้น columella เรียบ ไม่มี columella fold ช่อง siphonal canal เป็นร่องลึกขนาดใหญ่ outer lips หนาไม่มีซี่ฟัน ด้านใน aperture เรียบเป็นสีเหลืองอ่อน เปลือกด้านนอกชั้น periostracum หนาเห็นชัดเจนเปลือกสีน้ำตาลเข้มมี spiral cords ระหว่างวงของ tubercles และตาม body whorl มี spiral rip เป็นสันเห็นได้ชัดเจน (นรากร และนงเยาว์, 2542)

หอยตะกายขาว (Pear-Shape Moon) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Polinices tumidus* (Linnaeus, 1758) เปลือกมีรูปทรงแบบ ear shape apex นูน รอย suture แยกออกไม่ชัดเจน ผิวเปลือกเรียบเป็นมันสีขาว บริเวณ suture มี sutural wrinkles ผิวเปลือกมี vertical ridges บางมองเห็นไม่ชัดเจน aperture เป็นรูปครึ่งวงกลม outer lip บางและคม ภายในสีขาวนวล ไม่มี umbilicus มี plug เป็นแผ่นหินปูนหนามาก ไม่มีฟันบริเวณ outer lip (นรากร และนงเยาว์, 2542)

หอยน้ำพริก (Waved Nerite) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nerita undata* (Linnaeus, 1758) ลักษณะเปลือกเป็นรูปทรงแบบ ear shape apex เตี้ยและเรียบ รอย suture เรียบไม่แยกออกชัดเจน เปลือกหนา ผิวเปลือกมี spiral cord เรียงเป็นวงตาม body whorl บริเวณ parietal shield เป็นแผ่นหินปูนหนาแข็งและมีซี่ฟันเล็กๆ 2 ซี่ติดกัน aperture เป็นรูปครึ่งวงกลม บริเวณ outer lip เป็นแผ่นหนา และมีฟันบริเวณ outer lip โดยรอบเปลือกสีดำสลับลายสีขาวตาม body whorl (นรากร และนงเยาว์, 2542)

หอยซองพลู (Pen shell) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Atrina sp.* เปลือกค่อนข้างบาง เปราะ เป็นรูปสามเหลี่ยมหรือรูปพัด ปลายหน้าแหลมและแผ่กว้างออกไปทางท้าย ผิวด้านนอกมีสีน้ำตาล เทา หรือดำ ด้านในมีสีมุก มีขนาดค่อนข้างใหญ่ยาวประมาณ 10 นิ้ว อัมโบอยู่ทางหน้าสุด บานพับอยู่ทางด้านข้างและไม่มีฟันบนบานพับ กล้ามเนื้อยึดเปลือกอันหน้าเล็กกว่าอันหลัง อาศัยตามชายฝั่งทะเลที่พื้นเป็นโคลนหรือโคลนปนทราย โดยใช้ปลายด้านหน้าฝังลงไปใต้พื้น มีเส้นใยยึดไว้กับพื้น ยื่นด้านท้ายขึ้นมาเหนือพื้นเล็กน้อย ในน่านน้ำไทยมี 2 สกุล คือ

Atrina ด้านในของเปลือกไม่มีซัลคัส (sulcus) เช่น *Atrina vexillum* (Born)

Pinna ด้านในของเปลือกมีซัลคัส เช่น *Pinna bicolor* Gmelin (วันทนา, 2528)

หอยเจดีย์ (Scrow Turritella) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Turritella terebra* (Linnaeus, 1758) ลักษณะเปลือกรูปทรงแบบ tower shape apex สูงมากบน spire มี suture ตั้งแต่ apex ถึง body whorl 15 - 17 วง โดยแต่ละวงจะมี spiral cord แข็งหนา เปลือกม้วนเป็นเกลียว โดยในแต่ละชั้นของ suture บริเวณเหนือขึ้นไป whorl กว้างเป็นวง aperture กลม outer lip บางและคม columella เป็นสีขาวนวล โดยสีเปลือกเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีฟันบริเวณ outer lip (นรากร และนงเยาว์, 2542)

หอยมุกแกลบ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pinctada sp.* เปลือกส่วนใหญ่เป็นรูปสามเหลี่ยมกลมหรือรี ปลายด้านหน้าและด้านหลังของเปลือกจะยื่นออกไปคล้ายปีก โดยที่ปีกด้านหน้าจะมีขนาดเล็กกว่าปีกด้านหลัง เปลือกซ้ายจะแบนกว่าเปลือกขวา อัมโบค่อนมาทางปลายด้านหน้าของเปลือก กล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหลังมีขนาดใหญ่ ส่วนกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ส่วนหน้ามีขนาดเล็กหรืออาจไม่มี มีเส้นบิสซัสยื่นออกมาทางด้านล่างของเปลือกใต้ปีกด้านหน้า (สุชาติ และคณะ, 2538) ในบางชนิดเมื่อโตเต็มที่จะหลุดจากที่ยึด และอยู่เป็นอิสระตามพื้นท้องทะเลไม่สร้างเส้นใยอีกต่อไป (วันทนา, 2528)

การศึกษาความแปรผันของไอโซไซม์โดยวิธีโปรตีนอิเล็คโตรฟอรีซีส เป็นวิธีการที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีน โดยให้โปรตีนวิ่งในสนามไฟฟ้า จากตำแหน่งของหน่วยย่อยที่ปรากฏจะสามารถกำหนดยีโนไทป์ที่ควรจะเป็น (presumed genotype) ของโปรตีน/เอนไซม์นั้นได้ ข้อมูลเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้ในการประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากร เอนไซม์แต่ละชนิดอาจประกอบด้วยเอนไซม์เพียงรูปแบบเดียวหรือหลายๆ รูปแบบที่ทำหน้าที่คล้ายกัน เรียกเอนไซม์เหล่านั้นซึ่งอาจถูกควบคุมโดยยีนตำแหน่งเดียวกันหรือต่างตำแหน่งกันว่า ไอโซไซม์ (isozyme) ส่วนเอนไซม์ต่างรูปแบบที่ถูกควบคุมโดยยีนตำแหน่งเดียวกัน เรียกว่า อัลโลไซม์ (allozyme)

การศึกษาความผันแปรของไอโซไซม์โดยเทคนิคโปรตีนอิเล็คโตรฟอรีซีส เริ่มใช้ครั้งแรกเพื่อใช้ในการประมาณค่าความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรที่อยู่ตามธรรมชาติ เมื่อปี 1966 โดยมีการศึกษาตัวอย่าง 3 ชนิด คือ มนุษย์และแมลงหวี่ (*Drosophila sp.*) 2 ชนิด (Ayala, 1982; Hedrick, 1985; Hartl, 1990) โดยอาศัยหลักการที่ว่ามีกรดอะมิโนอยู่ 5 ชนิดที่มีประจุสายโพลีเป็ปไทด์ที่ต่างกันจึงมีประจุสุทธิต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของประจุ มีผลต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยทิศทางและความเร็วต่างกัน นอกจากขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิแล้ว อัตราการ

เคลื่อนที่ของโปรตีนยังขึ้นกับขนาดและรูปร่างอีกด้วย (Hedrick, 1985; Utter และคณะ, 1988) โดยทั่วไปเทคนิคอิเล็คโตรฟอรีซีสสามารถใช้แยกโปรตีนที่สกัดมาจากเลือด เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการนำพาด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางชนิดต่างๆ เช่น แป้ง (starch gel) หรือโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide)

แถบโปรตีนเหล่านี้สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้ปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะกับเอนไซม์ดังกล่าว (Morizot และ Schmidt, 1990) จำนวนและลักษณะของแถบขึ้นกับโครงสร้างของเอนไซม์นั้นๆ เช่น เอนไซม์ที่เป็นโมโนเมอร์ (monomer) โฮโมไซโกต (homozygote) จะแสดงแถบ 1 แถบ เฮตเทอโรไซโกต (heterozygote) แสดงแถบ 2 แถบ เอนไซม์ที่เป็นไดเมอร์ (dimer) โฮโมไซโกต จะแสดงแถบ 1 แถบ เฮตเทอโรไซโกต แสดงแถบ 3 แถบ เอนไซม์ที่เป็นเตตราเมอร์ (tetramer) โฮโมไซโกต จะแสดงแถบ 1 แถบ เฮตเทอโรไซโกต แสดงแถบ 5 แถบ

ชนิดของเอนไซม์ที่สำคัญ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม จำเป็นต้องมีการเลือกใช้เอนไซม์ให้เหมาะสม เอนไซม์บางชนิดพบได้ในทุกเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตไอโซเมอเรส (Glucose-6-phosphate isomerase) และมาเลตดีไฮโดรจีเนส (Malate dehydrogenase) แต่บางชนิดพบในบางเนื้อเยื่อเท่านั้น เอนไซม์บางชนิดมียีนควบคุมหลายตำแหน่ง โดยแต่ละตำแหน่งแสดงออกในอวัยวะต่างๆ กัน เช่น เอนไซม์แลคเตตดีไฮโรจีเนส (Lactate dehydrogenase) การเลือกใช้บัฟเฟอร์ในการศึกษาก็ต้องเหมาะสมกับเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ตัวอย่างเอนไซม์ที่สำคัญที่มีการศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิดแสดงไว้ใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของเอนไซม์ หน้าที่ และอวัยวะที่มีปฏิกิริยา

เอนไซม์	หน้าที่	E.C number**	รูปแบบ*	อวัยวะที่พบปฏิกิริยา
Aspartate amino Transferase (sAAT)	ช่วยในการนำ Pyridoxa mine-phosphate เข้าไปในปฏิกิริยาการผลิตกรด อะมิโน	2.6.1.1	Dimer	ตับ กล้ามเนื้อ
Alcohol dehydrogenase (ADH)	ผลิตแอลกอฮอล์ในปฏิกิริยา oxidation	1.1.1.1	Dimer	ตับ
Esterase (EST)	ช่วยในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด เช่น trypsin	3.1.1.1	Monomer	ทุกชนิด
Fumarase (FM)	ช่วยในปฏิกิริยาการเปลี่ยน Fumarate เป็น marate	4.2.1.2	Tetramer	ทุกชนิด
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G 6PDH)	ช่วยในขบวนการ glycolytic ในสัตว์พืช	1.1.1.49	Dimer	ทุกชนิด
Glucosephosphate Isomerase (GPI)	ช่วยในการกำจัดของเสียภายในเซลล์	5.3.1.9	Dimer	ทุกชนิด
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)	ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน D-glyceroldehyde-3-phosphate เป็น 3-phosphate D-glyceroldehyde	1.1.1.8	Dimer	อัณฑะ

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เอนไซม์	หน้าที่	E.C number**	รูปแบบ*	อวัยวะที่พบปฏิกิริยา
Isocitrate dehydrogenase (IDHP)	ช่วยในการเปลี่ยน isocitrate เป็น 2-oxoglutarate	1.1.1.42	Dimer	ตับ
Lactate dehydrogenase (LDH)	ช่วยในการเปลี่ยนกรดแลคติค เป็น pyruvic acid	1.1.1.27	Tetramer	ตับ ตา
Mannosephosphate isomerase (MPI)	ช่วยในปฏิกิริยา lypohylized cell ในอวัยวะต่างๆ	5.3.1.8	Monomer	ทุกชนิด
Malate dehydrogenase (sMDH)	ช่วยในการนำไฮโรเจนออกจาก marste ในการผลิต oxaloacetate	1.1.1.37	Dimer	กล้ามเนื้อ
Malic enzyme (sMEP)	ช่วยในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ Malate dehydrogenase	1.1.1.40	Dimer	กล้ามเนื้อ

หมายเหตุ * รูปแบบในปลา

** E.C number (Enzyme Commission number) เป็นการเรียกชื่อเอนไซม์แบบใช้รหัสตัวเลข 4 ตัว (code number) ซึ่งเป็นการเรียกชื่อแบบสากล โดยตัวเลขจะบอกถึงประเภทของเอนไซม์ อาทิเช่น หมายเลข 1 เป็นเอนไซม์ประเภท peroxidoreductase หรือ dehydrygenase หมายเลข 2 เป็นเอนไซม์ประเภท transferase เป็นต้น

ที่มา : Hillis และ Moritz, 1990 ; Palmer, 1995 ; Whitmore, 1990 (อ้างตาม ธวัชชัย, 2543)

การย้อมสีไอโซไซม์

หลักการในการย้อมเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase เช่น alkaline phosphatase , acid phosphastase และ esterase จะต้องมีสารตั้งต้นของปฏิกิริยา เช่น เอสเทอร์ หรือ เอไมด์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยมีเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวเร่งจะมีผลผลิตของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เช่น ในการศึกษาฟอสฟาเตส จะใช้ Arylphosphate เป็นสารตั้งต้น เมื่อ Arylphosphate ถูกย่อยทำให้เกิด HPO_4 และ Arylacohol การย้อมเอนไซม์ฟอสฟาเตสจะทำได้โดยให้ Arylacohol ทำปฏิกิริยาคู่ควบ (Coupling reaction) กับ diazonium salt ซึ่งเกิดเป็น azo dye ที่มีสีขึ้น

Acid phosphatase **เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา**

Orthosphomonoester + H_2O ------➤ Alcohol + Orthosphosphate

ในการย้อมเอนไซม์นี้ทำได้โดย นำเจลแช่ใน 50 mM Na Acetate pH 5.5 ประมาณ 15 นาที เพื่อปรับ pH ให้เหมาะสมแล้ว จึงมาย้อมในสารที่เกิดจาก Na Acetate 50 mM pH 5.5 ปริมาตร 100 ml $MgCl_2$ 1 M 1 ml และ $MgCl_2$ 1 M 1 ml Fast Blue RR salt 100 mM และα-Naphyl acid phosphate 1 % 3 ml ที่เตรียมใน Acetone 50 % การผสมต้องกระทำในที่มืด ทิ้งไว้ 1-7 ชม. จะเห็นแถบสีแดงและสีม่วงดำ

Alkaline phosphatase **เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา**

Orthosphomonoester + H_2O ------➤ Alcohol + Orthosphosphate

ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ส่วนผสมเช่นเดียวกับ Acid phosphatase แต่ใช้ Tris 50 mM pH 8.5 ปริมาตร 100 ml แทน Na Acetate pH 5.5 และทำการย้อมเช่นเดียวกับ Acid phosphatase

α-Esterase **เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา**

α-Naphyl acid phosphate + H_2O ------➤ α-Naphthol + acetate

ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ Fast blue RR salt 0.05 g ใน 0.1 M Na phosphate buffer pH 6.2 ปริมาตร 100 ml. ผสมกับ α-Naphyl acetate 0.03 g ซึ่งเตรียมใน Acetone ปริมาตร 3 ml. ผสมกันนั้นต้อง เทลงบนแผ่นเจลในที่มืดเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

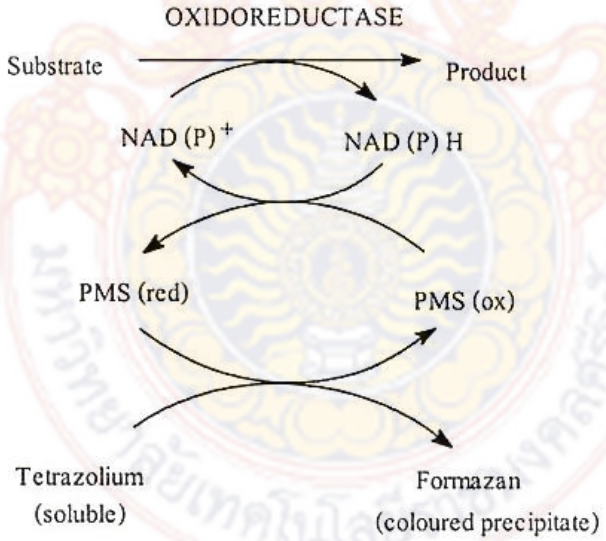
β-Esterase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

β-Naphyl acetone + H_2O ------> β-Naphthol + acetate

ในการย้อม β-Esterase ทำได้โดยใช้สารที่ย้อมเช่นเดียวกับการย้อม α-Eaterase แต่ใช้ β-Naphyl acetate เป็นสารตั้งต้นแทน α-Naphtyl acetate

เอนไซม์ในกลุ่ม ออกซิโดรีดัคเทส ซึ่งได้แก่ glutamate dehydrogenase,malate dehydrogenase และ shikamate dehydrogenase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ส่งถ่ายอิเล็คตรอนจากสารตั้งต้น (substrate) ในสภาวะรีดิวส์ไปยังตัวกลางที่รับอิเล็คตรอนซึ่งมักจะเป็น NAD^+ หรือ $NADP^+$ กลายเป็น NADH หรือ NADPH แล้วไปรีดิวส์เตตราโซเลียม (tetrazolium) ได้เป็นฟอร์มาแซน (formazan) ซึ่งเป็นสารระกอบวงแหวนที่มี C 1 ตัว กับ N 4 ตัวที่มีสี

โดยสีในกลุ่ม formazan ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ สีส้มแดง หรือสีม่วง เป็นต้น และในปฏิกิริยาจะต้องมีตังรับส่ง อิเล็กตรอนซึ่งส่วนใหญ่เป็น NAD (P^+) และ Phenazine metnosulfate (PMS) ทำงานเป็นระบบดังปฏิกิริยา



เตตราโซเลียมที่ใช้ในการติดตามปฏิกิริยา oxidoreductase มีหลายตัว เช่น 3-(4,5-Dimethythiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT),Nitro Blue Tetrazolium (NBT) , Triphenyl Tetrazolium chloride (TTC)

Glutamate dehydrogenase **เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา**

L-Glutamate + H_2O + NAD^+ ------> 2-Oxo-glutarate + NH_3 + NADH

ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ส่วนผสมซึ่งประกอบด้วย 0.2 M. Phosphate pH 9.2 16 ml. ผสมกับ L-Glutamic acid 1.3 g. และน้ำ 11 ml. NAD 1% 3 ml. และNBT 1% 1ml. ผสม PMS 1% 0.25 ml. ลงบนแผ่นเจลในที่มืดเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้จนมีแถบสีฟ้าน้ำเงิน

Malate dehydrogenase **เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา**

L-Malate + H_2O + NAD^+ ------> 2-Oxaloacetate + NADH

ในการย้อมเอนไซม์นี้ทำโดยผสม 0.1 M Tris HCl pH 7.5 100 ml. 1 M DL-Malic acid pH 7.5 3 ml. และ NAD 1% 3 ml. MTT 1% 2ml. และ PMS 1% 0.40 ml. ลงบนแผ่นเจลในที่มืด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงิน

Shikimic dehydrogenase **เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา**

Shikimate+$NADP^+$ --------> 3-dehydroshikimate + NADPH

ในการย้อมเอนไซม์ ผสม 0.1 M Tris HCL pH 7.5 100ml. Shikimic acid 100 mg $NADP^+$ mg MTT 1% 2 ml PMS 1 5 0.40 ml. เทลงบนแผ่นเจลในที่มืดเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงิน

Superoxide dismutase **เอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยา**

O_2 + O_2 + 2H --------> O_2 + H_2O_2

การย้อม Superoxide dismutase บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่เกิดสี (negative stain) โดยแสงไฟส่องผ่านเจลทำให้เกิด superoxide free radicals ไปรีดิวส์เตตราโซเลียมให้เปลี่ยนสีเป็น ฟอร์มาแซน สีน้ำเงิน ยกเว้นที่มี SOD จะไม่มี Superoxide เกิดขึ้น เตตราโซเลียมจึงไม่เปลี่ยนเป็นฟอร์มาแซน บริเวณนั้นจึงใสไม่มีสีในการย้อมเอนไซม์นี้ทำได้โดยแช่เจลในสารผสมซึ่งประกอบด้วย Tris HCl 0.2 M. pH 8 40 ml. $MgCl_2$ 0.5 M.0.2 ml. NBT 1% 1 ml. และ PMS 1% 1 ml. ที่อุณหภูมิห้องใต้แสงนีออน เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จะเกิดแถบสีใสๆ บนแผ่นเจลโดยมีพื้นเป็นสีน้ำเงินฟ้า

Peroxidase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

Donor + H_2O_2 --------➤ oxidized donor + $2H_2O$

การย้อม POX ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ aromatic amides เช่น *O*-Dianisidine เมื่อมี H_2O_2 และ POX อยู่ด้วยทำให้เกิดสีน้ำตาลส้ม ทำได้โดยนำเจลที่ได้แช่ลงในสารละลาย 0.5 % *O*-Dianisidine ใน methanol 10 ml. ผสมกับ 0.05 M. Na acetate buffer pH 5.5 40 ml. เขย่าเบาให้เข้ากัน เติม H_2O_2 0.2 ml. เขย่าอีกเล็กน้อยเก็บในตู้มืด 30 นาที หรือเมื่อเห็นแถบชัดเจน (โองการ, 2545)

เทคนิคการวิเคราะห์ทางอิเล็คโตรโฟรีซีส โดยการย้อมดูเอนไซม์ เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แพร่หลายในงานค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นวิธีในการแยกและเตรียมสารแมคโครโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าให้บริสุทธิ์ และจะใช้ในการศึกษาคุณสมบัติ และพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสารที่ทดสอบ โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลเป็นตัวกลาง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาขั้นพื้นฐานในการสกัดเนื้อเยื่อจากหอยชนิดต่างๆ มาเพื่อใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนเอนไซม์จำนวน 6 ชนิด ของหอยที่พบในหาดราชมงคล โดยใช้วิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสและนำผลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์ความแตกต่างของหอยจากรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏ

วิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์ในการวิจัย

1.1 หอย

1.2 ถังพลาสติก

1.3 เครื่องเซนตริฟิวจ์

1.4 เครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1.5 pH meter

1.6 Vortex mixer

1.7 เครื่อง stir plate & megnetic stirrer

1.8 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

1.9 เครื่องปั่นบดไฟฟ้า

1.10 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรฟอรีซิส

1.11 ไม้บรรทัด

1.12 ไมโครปิเปต

1.13 ปิเปต

1.14 หลอด eppendrop

1.15 ช้อนตักสาร

1.16 วัสดุอุปกรณ์เครื่องแก้ว

1.17 กล่องพลาสติกไว้ย้อมสี

1.18 ถุงมือแพทย์

1.19 สำลี

1.20 สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์เอนไซม์

1.21 สารเคมีสำหรับหาปริมาณโปรตีน

1.22 สารเคมีสำหรับทำอิเล็กโตรฟอรีซีส

2. วิธีการดำเนินการ

การศึกษาลักษณะพันธุกรรมจากรูปแบบไอโซไซม์ของหอยในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง แบ่งวิธีการวิจัยออกเป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

โดยใช้วิธีการเดินสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างหอยทะเลบางชนิด บริเวณหาดราชมงคล อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง

2.2 การจำแนกชนิดของตัวอย่าง

การจำแนกชนิดของตัวอย่างหอยทะเลที่เก็บรวบรวมมาได้ใช้วิธีการจำแนกโดยการเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง เช่น วันทนา อยู่สุข (2538), Abbott,R.T. (1974), Dancc,S.P. (1976) เป็นต้น โดยเปรียบเทียบจากรูปภาพสี และลักษณะรายละเอียดอื่นๆ ที่มีระบุในเอกสารที่ใช้ในการจำแนก

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

นำหอยบางชนิดที่ได้แกะเปลือกออก ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ มาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) แล้วปั่นบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า 2-3 นาที หยุด 1 นาที แช่ในน้ำแข็ง แล้วปั่นต่อ 2-3 ครั้งจนละเอียด เทใส่บีกเกอร์แล้วนำไปปั่นบน เครื่อง sterrer 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งใส่ถุงเก็บไว้ และอีกส่วนหนึ่งนำไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 1 ชั่วโมง แยกเอาแต่ส่วนที่ใสกรองผ่านสำลี และวัดปริมาตรเก็บไว้ 2 หลอดๆ ละ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4 การหาปริมาณโปรตีน (โดยวิธีเลาวรี (Lowry method))

นำสารตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์ (2 เปอร์เซ็นต์Na_2Co_3 ใน 0.1 N NaOH : 1 เปอร์เซ็นต์ Potassium sodium tartrate : 0.5 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4$อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้วเติมสารละลาย ฟอลิน-ฟีนอล (Folin-phenol reagent, Folin : น้ำกลั่น 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน โดยการผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40 เปอร์เซ็นต์ glycerol และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ให้ใช้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะเตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

2.6 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ซึ่งมีส่วนประกอบของเจล ดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel 3% (2 ml.)	Separating gel 5% (4 ml.)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.2 ml.	0.667 ml.
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.252 ml.	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.0 ml.
10% Ammonium persulphate	20 µl.	40 µl.
TEMED	5 µl.	5 µl.
น้ำกลั่น	1.57 ml.	1.3 ml.

2.7 การทำอิเล็คโตรโฟรีซีส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็คโตรโฟรีซีสในบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟคงที่ที่ 18 mA รอจนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟแล้วนำไปย้อมสี

2.8 การย้อมเอนไซม์

การย้อมสีเอนไซม์ มีเอนไซม์ที่ใช้คือ มาเลต ดีไฮโรจิเนส (Malate dehydrogenase), แอลฟา-เอสเทอเรส (α - esterase), แลคเตต ดีไฮโดรจิเนส (Lactate dehydrogenase)

กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส (Glucose –6- phosphate dehydrogenase), ไอโซซิเตรท ดี-ไฮโดรจิเนส (Isocitrate dehydrogenase) และ มาลิก เอนไซม์ (Malic enzyme)

2.9 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ทำการเปรียบเทียบลักษณะความแตกต่างของแบบแผนเอนไซม์ทุกชนิดที่ทำการย้อมสี ในหอยชนิดต่างๆ แล้วนำมาหาความเหมือนกันหรือต่างกัน เพื่อสรุปผลการทดลอง

3. ขอบเขตการวิจัย

ทำการเปรียบเทียบแบบแผนพันธุกรรมจากรูปแบบไอโซไซม์ ที่ได้จากหอยแต่ละชนิดในบริเวณหาดราชมงคล เพื่อจะได้ทราบลักษณะทางพันธุกรรมของหอยแต่ละชนิดในบริเวณนี้ และเปรียบเทียบลักษณะความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์ทรัพยากร และการปรับปรุงพันธุ์ในโอกาสต่อไป

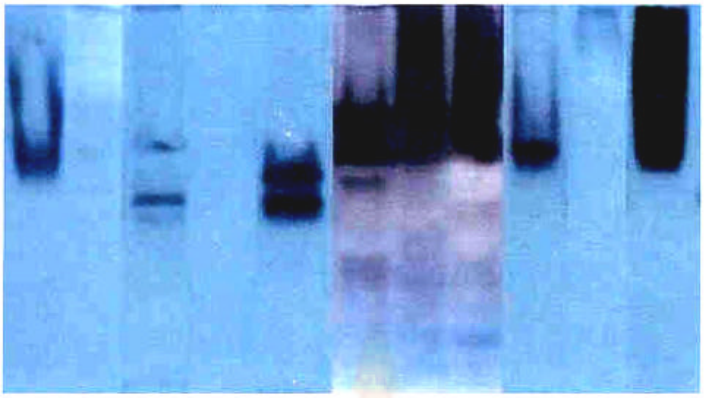
4. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

เก็บตัวอย่างหอยที่พบในหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง และทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง โดยเริ่มต้นตั้งแต่เดือนตุลาคม 2544 – เดือนกันยายน 2546

ผลและวิจารณ์

1. จากการทดลองหาความแตกต่างระหว่างหอยแต่ละชนิดที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง โดยศึกษารูปแบบเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส (Malate dehydrogenase) ได้ผลการทดลองในหอยทั้ง 11 ชนิด (ภาพที่ 1) คือ หอยตะเภา, หอยแครง, หอยแมลงภู่, หอยลาย, หอยมุกแกลบ, หอยเจดีย์, หอยตะกายขาว, หอยซองพลู, หอยตลับ, หอย *Melongena pugilina*, และหอยน้ำพริก พบว่ารูปแบบเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนสที่ปรากฏในหอยทั้ง 11 ชนิดมีแถบที่แตกต่างกัน คือ หอยตะเภา (แถวที่ 1) มีจำนวนแถบเท่ากับ 1 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนกลาง หอยแครง (แถวที่ 2) มีจำนวนแถบ 2 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนกลาง หอยแมลงภู่ (แถวที่ 3) มีจำนวนแถบ 3 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนกลาง หอยมุกแกลบ (แถวที่ 5) มีจำนวนแถบ 2 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนกลาง หอยเจดีย์ (แถวที่ 6) มีจำนวนแถบ 3 แถบ โดยมี 2 แถบอยู่บริเวณส่วนกลางและมี 1 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนล่าง หอยตะกายขาว (แถวที่ 7) มีจำนวนแถบ 1 แถบลักษณะเป็นปื้นอยู่บริเวณเจลส่วนบน หอยซองพลู (แถวที่ 8) มีจำนวนแถบ 2 แถบ โดยมี 1 แถบลักษณะเป็นปื้นอยู่บริเวณเจลส่วนบนและมี 1 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนล่าง หอยตลับ (แถวที่ 9) มีจำนวนแถบ 1 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนกลาง หอย *Melongena pugilina* (แถวที่ 10) มีจำนวนแถบ 1 แถบอยู่บริเวณเจลส่วนบน และหอยน้ำพริก (แถวที่ 11) มีจำนวนแถบ 1 แถบลักษณะเป็นปื้นอยู่บริเวณเจลส่วนบน โดยหอยทั้ง 10 ชนิดนี้จะมีความแตกต่างของแถบเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนสอย่างชัดเจน ยกเว้นหอยลาย (แถวที่ 4) ซึ่งไม่ปรากฏแถบเอนไซม์ ดั้งนั้นจึงควรศึกษาโดยใช้เอนไซม์ชนิดอื่นเป็นตัวจำแนกด้วย

2. เมื่อนำหอยทั้ง 11 ชนิดมาศึกษาแบบแผนเอนไซม์ α-Esterase อีกครั้ง (ภาพที่ 2) จะพบว่ารูปแบบของเอนไซม์ α-Esterase สามารถจำแนกหอยทั้ง 11 ชนิดได้เป็น 11 ชนิดตามชนิดของหอยที่นำมาศึกษา โดยในหอยตะเภา (แถวที่ 1) มีจำนวนแถบเท่ากับ 2 แถบ หอยแครง (แถวที่ 2) มีจำนวนแถบ 2 แถบ หอยแมลงภู่ (แถวที่ 3) มีจำนวนแถบ 4 แถบ หอยลาย (แถวที่ 4) มีจำนวนแถบ 2 แถบ หอยมุกแกลบ (แถวที่ 5) มีจำนวนแถบ 2 แถบ หอยเจดีย์ (แถวที่ 6) มีจำนวนแถบ 4 แถบ หอยตะกายขาว (แถวที่ 7) มีจำนวนแถบ 2 แถบ หอยซองพลู (แถวที่ 8) มีจำนวนแถบ 3 แถบ หอยตลับ (แถวที่ 9) มีจำนวนแถบ 1 แถบ หอย *Melongena pugilina* (แถวที่ 10) มีจำนวนแถบ 5 แถบ และหอยน้ำพริก (แถวที่ 11) มีจำนวนแถบ 2 แถบ ซึ่งหอยทั้ง 11 ชนิดนี้มีความแตกต่างของแถบเอนไซม์ α-Esterase อย่างชัดเจน



แถวที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

ภาพที่ 1 แสดงแบบแผนเอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจิเนส (Malate dehydrogenase) ของหอย 11 ชนิดที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง

แถวที่ 1 หอยตะเภา

แถวที่ 2 หอยแครง

แถวที่ 3 หอยแมลงภู่

แถวที่ 4 หอยลาย

แถวที่ 5 หอยมุกแกลบ

แถวที่ 6 หอยเจดีย์

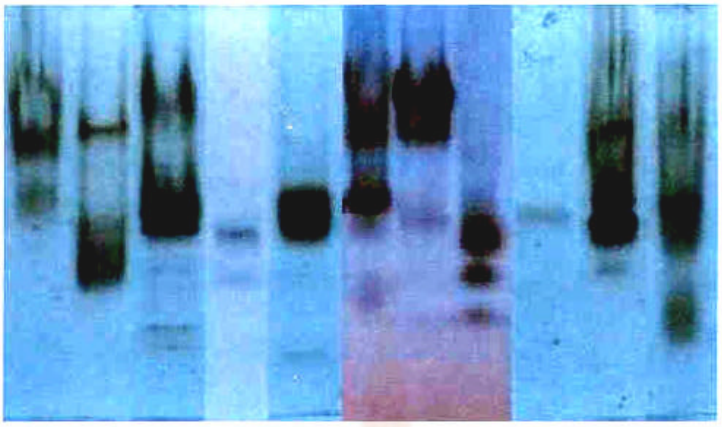
แถวที่ 7 หอยตะกายขาว

แถวที่ 8 หอยซองพลู

แถวที่ 9 หอยตลับ

แถวที่ 10 *Melongena pugilina* (Born, 1778)

แถวที่ 11 หอยน้ำพริก



แถวที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

ภาพที่ 2 แสดงแบบแผนเอนไซม์ α-Esterase ของหอย 11 ชนิดที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง

แถวที่ 1 หอยตะเภา

แถวที่ 2 หอยแครง

แถวที่ 3 หอยแมลงภู่

แถวที่ 4 หอยลาย

แถวที่ 5 หอยมุกแกลบ

แถวที่ 6 หอยเจดีย์

แถวที่ 7 หอยตะกายขาว

แถวที่ 8 หอยซองพลู

แถวที่ 9 หอยตลับ

แถวที่ 10 *Melongena pugilina* (Born, 1778)

แถวที่ 11 หอยน้ำพริก

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการศึกษาแบบแผนเอนไซม์มาเลตดีไฮโดนจิเนส (Malate dehydrogenase) ของหอยที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ.สิเกา จ.ตรัง พบว่าหอยแต่ละชนิดที่นำมาศึกษามีรูปแบบของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกหอยออกเป็นชนิดต่างๆ ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ธวัชชัย (2543) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ในภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิธีวิเคราะห์ไอโซไซม์ (เก็บรวบรวมจาก 7 จังหวัด คือ ชุมพร สุราษฎร์ธานี พัทลุง นครศรีธรรมราช สตูล ตรัง และยะลา) โดยใช้เอนไซม์ 13 ชนิด (รวมทั้งมาเลตดีไฮโดรจิเนส) พบว่าในจำนวนยีนที่ศึกษามีโพลีมอร์ฟิคโลไซ 4 โลไซ ความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรมีค่าค่อนข้างต่ำ ความแตกต่างระหว่างประชากรอยู่ในระดับปานกลาง ค่าความห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) มีค่าเฉลี่ย 0.003 เมื่อนำค่าความห่างทางพันธุกรรมไปจัดแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ตามวิธี UPGMA พบว่าประชากรถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อยๆ คือ กลุ่มนครศรีธรรมราช - พัทลุง - ตรัง กลุ่มยะลา - สตูล กลุ่มสุราษฎร์ธานี และกลุ่มชุมพร และแตกต่างจากการทดลองของ พนม (มปป.) ที่ได้ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับตรวจสอบปลาในกลุ่มปลานิล 4 ชนิด โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซีส พบว่าเอนไซม์ Malate dehydrogenase (MDH) ของปลาที่ศึกษา มี 3 โลไซ คือ MDH-1, MDH-2 และ MDH-3 ถูกตรวจพบที่ขั้วบวกสำหรับเอนไซม์ MDH ความจำเพาะทางเนื้อเยื่อถูกตรวจพบได้ดังนี้ MDH-2 ถูกตรวจพบได้ดีในเนื้อเยื่อตับ ส่วน MDH-1 และ MDH-3 ในกล้ามเนื้อ ใน MDH-1 และ MDH-2 ไม่พบความแตกต่างของอัลลีลในระหว่างชนิดที่ต่างกันทั้ง 4 แต่ MDH-3 สามารถแยก *Oreochromis niloticus* ออกจากชนิดอื่นอีก 3 ชนิด (*O.aureus*, *O.mossambicus* และ *Sarotherodon melanotheron*) ได้ด้วยอัลลีลที่ต่ำกว่า (slower) อัลลีลของชนิดอื่น MDH เป็นเอนไซม์ที่แสดงรูปแบบบนเจลแตกต่างจากเอนไซม์ตัวอื่น และในปัจจุบันการจำแนกสายพันธุ์พืชได้อาศัยรูปแบบของไอโซไซม์มาใช้ในการจำแนกพืชหลายชนิด เช่น ข้าว, ลำไย, กล้วย, มะขาม, กีวี, มะม่วง, องุ่น, ลองกองและลางสาด, และ Spanish Cherimoya เป็นต้น โดยสามารถที่จะแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ ระหว่างสปีชี่ส์ (species) ได้ดีเท่าๆ กับพันธุ์หรือสายพันธุ์ใน สปีชี่ส์เดียวกัน (พงศ์ยุทธ, 2542) และการใช้ esterase isozyme ร่วมกับ malate dehydrogenase จะสามารถจำแนกสายพันธุ์ไดโนแฟลกเลต รวมทั้งตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี (สมสุข และ วรวิทย์, 2534)

ห้องสมุด วร

2. จากการศึกษาแบบแผนเอนไซม์ α-Esterase ของหอยที่พบในบริเวณหาดราชมงคล อ. สิเกา จ.ตรัง พบว่าหอยแต่ละชนิดที่นำมาศึกษามีรูปแบบของเอนไซม์ที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ รัตนา (2532) ที่ศึกษา ISOZYMES ในหอยตะโกรมกรามขาวและกรามดำ โดยการแยกชนิดจากลักษณะทางกรรมพันธุ์ โดยศึกษา Isozymes ชนิด Esterase และ Leucin Aminopeptidase ผลปรากฏว่า Esterase แสดงข้อแตกต่างได้เด่นชัดในหอย 2 ชนิดนี้ ซึ่งแสดงว่า หอยตะโกรมกรามขาวและกรามดำเป็นหอยต่างชนิดกันแท้จริง และยังสอดคล้องกับการทดลองของ สมสุข และ วรวิทย์ (2534) ที่ได้ศึกษาแนวทางการการตรวจแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้เอสเทอเรสไอโซไซม์ โดยการตรวจแยกแถบเอสเทอเรสไอโซไซม์ในสาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็ก ด้วยวิธีโปลีอะคริลาไมค์เจลอิเลคโตรฟลอรีซีส (PAGE) พบว่ารูปแบบของเอสเทอเรสไอโซไซม์ที่ได้จากสาหร่ายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันออกไปทั้งในระดับ Genus, Species และ Strain และการทดลองของ พงศ์ยุทธ (2542) ที่ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ โดยการตรวจสอบสายพันธุ์ถั่วเหลือง 5 พันธุ์ คือ AGS 268 ราชมงคล 1 เชียงใหม่ 60 สจ.4 และสจ.5 โดยใช้ชิ้นส่วนจากต้นอายุ 3, 5 และ 7 วัน เอนไซม์ที่ใช้ศึกษามี 3 ชนิด คือ Acid phosphatase, Esterase และ Peroxidase ผลการศึกษาพบว่าชิ้นส่วนของพืชและอายุต่างกัน ให้รูปแบบของไอโซไซม์ต่างกัน ต้นอ่อนอายุ 3 วันถูกนำใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ พบว่า เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดสามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์ได้ โดยเอนไซม์ Acid phosphatase สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ AGS 268 ราชมงคล 1 เชียงใหม่ 60 และสจ.5 และอีกกลุ่มคือ สจ.4 เอนไซม์ Esterase สามารถแยก AGS 268 ราชมงคล 1 เชียงใหม่ 60 และ สจ.5 ได้เป็น 2 กลุ่มคือ AGS 268 กับราชมงคล 1 และเชียงใหม่ 60 กับสจ.5 และสุดท้ายเอนไซม์ Peroxidase สามารถแยกถึงความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ทั้ง 4 พันธุ์ที่เหลือออกจากกันได้

3. เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์บางชนิดเช่น แลคแตต ดีไฮโดรจีเนส ให้ผลไม่ชัดเจน จนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ส่วน กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส และ ไอโซซิเตรท ดี-ไฮโดรจิเนส ให้ผลบวกปลอม และ มาลิกเอนไซม์ ไม่ได้ผล

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาแบบแผนของเอนไซม์มาเลต ดีไฮโดรจีเนส ของหอยทั้ง 11 ชนิด พบว่าแบบแผนไอโซไซม์ของหอยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงสามารถใช้การย้อมเอนไซม์ชนิดนี้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอยที่พบในหาดราชมงคลได้ ยกเว้น ในหอยลายที่ไม่ปรากฏแถบเมื่อย้อมด้วยเอนไซม์มาเลต ดีไฮโดรจีเนส

2. จากการศึกษาลักษณะแบบแผนของเอนไซม์ แอลฟา-เอสเทอเรส ของหอยทั้ง 11 ชนิด พบว่าหอยแต่ละชนิดมีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน จึงสามารถใช้การย้อมเอนไซม์ชนิดนี้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหอยที่พบในหาดราชมงคลได้

3. สำหรับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ (ไม่แสดงผล) ได้แก่ แลคเตต ดีไฮโดรจิเนส (Lactate dehydrogenase), กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส (Glucose –6- phosphate dehydrogenase) ไอโซซิเตรท ดี-ไฮโดรจิเนส (Isocitrate dehydrogenase) และ มาลิก เอนไซม์ (Malic enzyme) ให้ผลไม่ชัดเจน จึงไม่สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้

ข้อเสนอแนะ

1. หอยบางชนิดไม่สามารถเก็บเกี่ยวมาทำการทดลองได้เพราะพบเจอได้น้อย หรือบางชนิดพบเฉพาะซากที่ตายแล้ว ดังนั้นในระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างหอย จึงทำให้ความหลากหลายของชนิดหอยที่นำมาศึกษามีไม่มากเท่ากับการเจอซาก
3. หอยที่นำมาศึกษาควรอยู่ในสภาพสด และยังมีชีวิตอยู่
4. ขณะปั่นบดและเตรียมควรมีการควบคุมอุณหภูมิ เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์
5. ในการทำการทดลองควรทำด้วยความระมัดระวัง เพราะมีสารเคมีที่ก่อให้เกิดมะเร็ง

บรรณานุกรม

กรมประมง. 2536. การเลี้ยงหอยแมลงภู่. กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กรมประมง. 64 น.

จินตมาศ สุวรรณจรัส และสุพัตรา ปานรงค์. 2534. วงจรการสืบพันธุ์ของหอยแครงที่ ต.เจ๊ะบิลัง จ.สตูล. วารสารสงขลานครินทร์ ปีที่ 12 ฉบับที่ 4 : น. 341-351

จิโรจน์ พีระเกียรติขจร. 2538. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตะเภา บริเวณอำเภอสิเกา จังหวัดตรัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

ธวัชชัย งามศิริ. 2543. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ในภาคใต้ของประเทศไทยโดยวิธีวิเคราะห์ไอโซไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 65 น.

นรากร จรรยาสวัสดิ์ และนงเยาว์ เพชรจำรัส. 2542. หอยทะเลและเปลือกหอยที่พบบริเวณหาดราชมงคล จ. ตรัง. รายงานปัญหาพิเศษ. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. ตรัง. 92 น.

พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง. 2542. การจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. ราชมงคลวิชาการ'42. น. 9 - 15

รัตนา ผลธัญญา. 2532. การศึกษา Isozymes ในหอยตะโกรมกรามขาวและกรามดำ. กองประมงทะเล. รายงานผลงานวิจัยในการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 27. สาขาสัตว์ สัตวแพทย์ ประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 473 - 479

วันทนา อยู่สุข. 2528. หอยทะเล. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 138 น.

สมสุข มัจฉาชีพ และวรวิทย์ ชีวาพร. 2534. แนวทางการตรวจแยกสายพันธุ์สาหร่ายขนาดเล็กโดยใช้เอสเทอเรสไอโซไซม์. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา. ประมวลประชุมวิชาการ เรื่อง ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำ ครั้งที่ 3. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 101 - 110

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตราชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ จันทเดมีย์. 2538. สังขวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาลัยมหิดล. 516 น.

สุนันท์ ทวยเจริญ และปรานอม เบ็ญจมาลย์. 2529. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยตลับบริเวณแหลมกลัด ต.แหลมกลัด อ.เมือง จ.ตราด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 42. กองประมงน้ำกร่อย กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 32 น.

อารมณ์ เตียวสกุล. 2532. หอยตะเภา (*Hecuba scortum*). เอกสารสัมมนาคณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 32 น.

โองการ วณิชาชีวะ. 2545. การหาความสัมพันธุ์ของพืชวงศ์ขิงในสกุลกระชาย และสกุลที่เกี่ยวข้อง โดยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 119 น.

Abbott, R.T. and S.P. Dance. 1983. Compendium of Seashells E.P. Dutton, Inc, New York. 346 p.

Dance, S.P. (ed). 1982. The Collection's Encyclopedia of Shells. McGraw Hill Book Company. New York. 260 p.

Hartl, D. L. 1990. Principles of Population Genetics. Siauer Associates Inc., USA. 486 p.

Hedrick, P. W. 1985. Genetic of Popution. Jones and Barttett Publishers, Inc., USA. 629 p.

Morizot, D. C. and M. E. Schmidt. 1990. Starch gel electrophoresis and histochemical visualization of protein, pp. 23-79. *In* D.H. Whitmore (ed.). Electrophoresis and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management. CRC Press, Inc., USA

Utter, F., P. Aebersold and G. Winans. 1988. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis, pp. 21-46. *In* N. Ryman and F. Utter (eds.). Population Genetic & Fishery Management. Washington Sea Grant Program, Seattle.

ภาคผนวก

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer ; PB)

0.1 M Phosphate, pH 7.5	100	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	2	มิลลิลิตร
14.3 M β-mercaptoethanol	70	ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

การย้อมสีมาเลตดีไฮโดรจิเนส (Malate dehydrogenase)

ย้อมสีมาเลตดีไฮโดรจิเนสโดยแช่เจลในสารละลาย

1 M DL-Malic acid	112	ไมโครลิตร
0.6 M NAD^+	15	ไมโครลิตร
PMS (Phenazine methosulfate)	1	มิลลิกรัม
NBT (Nitrobule tetrazolium)	2	มิลลิกรัม
0.1 M Tris-HCl, pH 8.0	20	มิลลิลิตร

บ่มในที่มืดนานประมาณ 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

การย้อมสีแอลฟา-เอสเทอเรส (α-Esterase)

ย้อมสีแอลฟา-เอสเทอเรสโดยแช่เจลในสารละลาย

Fast blue RR salt	10	มิลลิกรัม
10 mg./ml. α-nephtyl acetate in acetone	0.6	มิลลิลิตร
0.1 M Phosphate buffer, pH 6.2	20	มิลลิลิตร

บ่มในที่มืดนานประมาณ 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

การย้อมสีไอโซซิเตรท ดีไฮโดรจีเนส (Isocitrate dehydrogenase)

ย้อมสีโดยการแช่เจลในสารละลาย

DL-isocitrate acid	6	มิลลิกรัม
NADP	6	มิลลิกรัม

PMS	1	มิลลกิรัม
NBT 0.1%	2	มิลลิลิตร
H_2O	8	มิลลิลิตร
0.2 M tris-HCl pH 8.0	10	มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การย้อมสีเอนไซม์ แลคเตต ดีไฮโดรจิเนส (Lactate dehydrogenase)

ย้อมสีโดยการแช่เจลในสารละลายดังนี้

DL-Lactic acid 50%	0.5	มิลลิลิตร
NAD	6	มิลลิกรัม
PMS	1	มิลลกิรัม
NBT 0.1%	2	มิลลิลิตร
H_2O	8	มิลลิลิตร
0.2 M tris-HCl pH 8.7	10	มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การย้อมสีเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส

(Glucose –6- phosphate dehydrogenase)

ย้อมสีโดยการแช่เจลในสารละลาย ดังนี้

Glucose-6-phosphate (Na2 salt)	100	มิลลิกรัม
NADP	5	มิลลิกรัม
MgCl2	40	มิลลิกรัม
MTT or NBT	5	มิลลิกรัม
PMS	1	มิลลิกรัม
0.2 M tris-HCl pH 8.0	20	มิลลิลิตร

การย้อมสีเอนไซม์มาลิก เอนไซม์ (Malic enzyme)

ย้อมสีโดยการแช่เจลในสารละลาย

DL-malic enzyme	100	มิลลิกรัม
NADP	6	มิลลิกรัม
PMS	1	มิลลกิรัม
NBT 0.1%	2	มิลลิลิตร
H_2O	8	มิลลิลิตร
0.2 M tris-HCl pH 8.0	10	มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ภาพผนวกที่ 1 หอยตะเภา (Leather Donax) *Donax scortum* Linnaeus

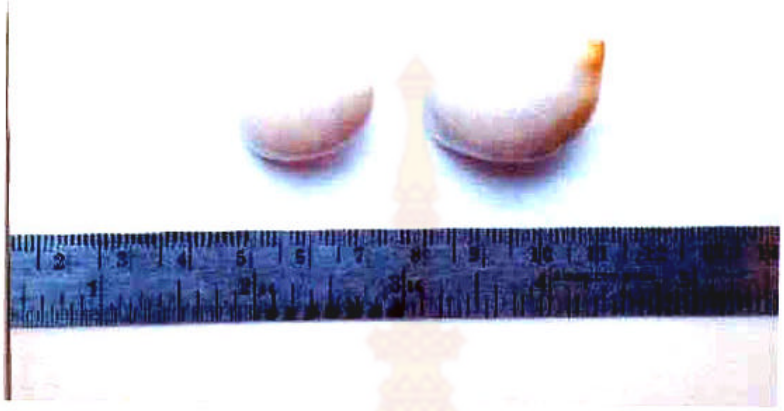
ภาพผนวกที่ 2 หอยตลับ (Meretrix Venus) *Meretrix meretrix*

ภาพผนวกที่ 3 หอยแครง (Cockle) *Anadara granosa* L.

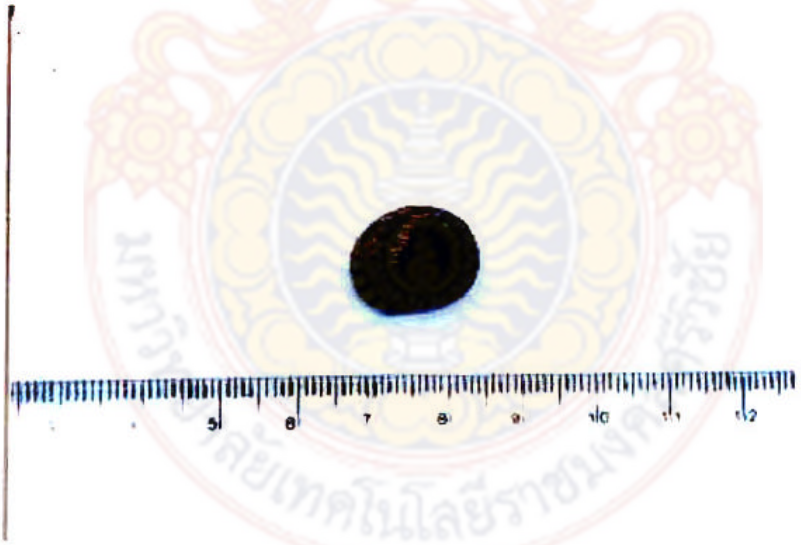
ภาพผนวกที่ 4 หอยแมลงภู่ (Green mussel) *Perna viridis* Linneaus

ภาพผนวกที่ 5 หอยลาย (Undulating Venus) *Paphia undulata*

ภาพผนวกที่ 6 *Melongena pugilina*



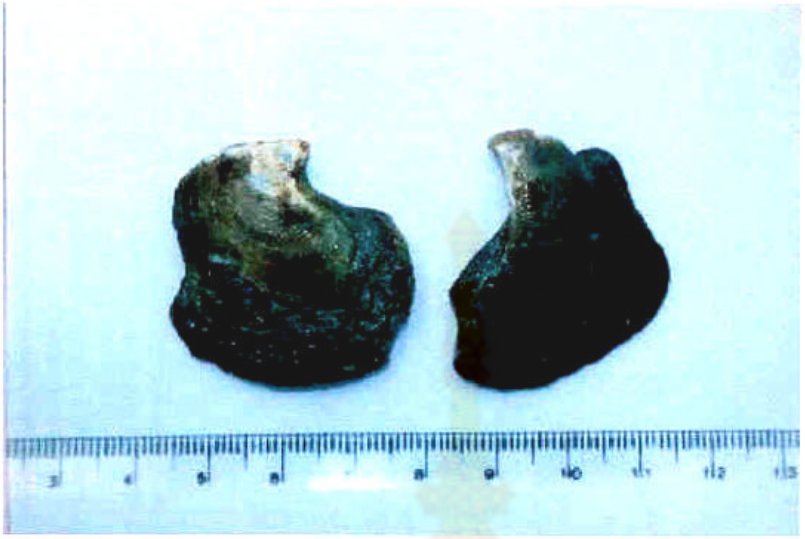
ภาพผนวกที่ 7 หอยตะกายขาว (Pear-Shape Moon) *Polinices tumidus*



ภาพผนวกที่ 8 หอยน้ำพริก (Waved Nerite) *Nerita undata*

ภาพผนวกที่ 9 หอยซองพลู *Atrina sp.*

ภาพผนวกที่ 10 หอยเจดีย์ (Scrow Turritella) *Turritella terebra*



ภาพผนวกที่ 11 หอยมุกแกลบ *Pinctada sp.*