เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔๑ /๒๕๔๙

Technical Paper No. 41 /2006

การแยกชนิดหอยพิม (Angel Wings,Piddocks) ที่พบบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดสุราษฎร์ธานีโดยวิธีอีเล็คโตรโฟเรซีส

Electrophoresis Identification of Angle Wings, Piddocks from the Coastline of Samutsakhon and Suratthani Provinces

สุนันท์ ทวยเจริญ Sunan Tuaycharoen

วลัย คลี่ฉายา Walai Kleechaya

วิสุทธิ์ วีระกุลพิริยะ Visuthi Verakunpiriya

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร Samutsakhon Coastal Fisheries Research and Development Center

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง Coastal Fisheries Research and Development Bureau

กรมประมง Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Ministry of Agriculture and Cooperatives

๒๕๔๙ 2006

รหัสทะเบียนวิจัย 46-03-37-45-088-006

การแยกชนิดหอยพิมที่พบบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสมุทรสาคร และจังหวัดสุราษฎร์ธานีโดยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซีส

สุนันท์ ทวยเจริญ[๑]* วลัย คลี่ฉายา[๒] วิสุทธิ์ วีระกุลพิริยะ[๓]

[๑]สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง

[๒]กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง

[๓]สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง

บทคัดย่อ

การแยกชนิดหอยพิมที่พบบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดสุราษฎร์ธานีโดยวิธีทางอิเล็คโตรโฟเรซีส ได้ทำการเก็บตัวอย่างหอยพิมระหว่างเดือน พฤศจิกายน ถึง ธันวาคม 2545 โดยที่จังหวัดสมุทรสาครพบหอยพิม 2 ชนิด คือ หอยพิมใหญ่ และหอยพิมเล็ก ส่วนจังหวัดสุราษฎร์ธานีพบเฉพาะหอยพิมใหญ่ จากการสกัดเนื้อเยื่อส่วนเท้า (Foot) นำมาทดสอบด้วยเอนไซม์จำนวน 8 ชนิดได้แก่ MPI, GPI, PGM, AAT, IDH, LAP, MDH และ ME พบว่าเอนไซม์ที่สามารถแยกชนิดและเห็นแถบสีโปรตีนหอยพิมชัดเจนมี 3 เอนไซม์คือ GPI และ AAT ใน TC buffer pH 8 และ MDH ใน TC buffer pH 6.3/6.7 จากรูปแบบแถบโปรตีนของหอยพิมใหญ่ที่พบในจังหวัดสุราษฎร์ธานีและจังหวัดสมุทรสาครนั้นบ่งชี้ว่าหอยพิมจากทั้งสองแหล่งไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจัดเป็นสายพันธุ์เดียวกันและเป็นหอยพิมชนิด *Pholas orientalis* Gmelin, 1791 ส่วนหอยพิมเล็กที่พบในจังหวัดสมุทรสาครมีรูปแบบของแถบโปรตีนที่แตกต่างไปจากหอยพิมใหญ่ จัดเป็นชนิด *Martesia striata* Linnaeus, 1758 .

คำสำคัญ: หอยพิม อิเล็คโตรโฟเรซีส สมุทรสาคร สุราษฎร์ธานี

---

* สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง เกษตรกลาง จัตุจักร กรุงเทพฯ 10900. โทร. 02-5798203
e-mail : sunant @ Fisheries.go.th

Electrophoresis Identification of Angle Wings, Piddocks from the Coastline of Samutsakhon and Suratthani Provinces

Sunan Tuaycharoen[1]*, Walai Kleechaya[2], Visuth Verakunpiriya[3]

[1]Inland Fisheries Research and Development Bureau Department of Fisheries

[2]Fishery Technological Development Division Department of Fisheries

[3]Coastal Fisheries Research Institute, Coastal Fisheries Research and Development Bureau

Abstract

The Piddocks, Angle Wings (Bivalvia:Pholadidae) from the coastline of Samutsakhon and Suratthani Provinces were identified species by using electrophoresis technique. The samples were collected from the coastal of Samutsakhon and Suratthani Provinces between November to December 2002. Two species of sample were found on Samutsakhon: Big Piddocks and Small Piddocks and only Big Piddocks for Suratthani Provinces. Foot of Piddocks were extracted and tested by 8 isozymes : PGM, GPI, MPI, AAT, IDH, LAP, ME and MDH. The good resolution were obtained from 3 isozymes as GPI, AAT at TC buffer pH 8 and MDH at TC buffer pH 6.3/6.7. The protein pattern of Big Piddocks from Suratthani and Samutsakhon were indicated that their genetic have no differentiation, thus their species should be *Pholas orientalis* Gmelin, 1791). The Small Piddocks from Samutsakhon had difference band pattern from Big Piddocks, was *Martesia striata* Linnaeus, 1758.

KeywordS : Piddocks or Angle Wings, Electrophoresis, Samutsakhon, Suratthani

---

* Inland Fisheries Research and Development Bureau ,Department of Fisheries, Kasetklang, Jatujuk, Bangkok 10900 . Tel. 02-5798203

e-mail : sunant @ Fisheries.go.th

คำนำ

หอยพิม หอยเล็บมือ หรือหอยพิมกะรัง (Piddocks,Oriental Angel's Wings) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Pholas orientalis* Gmelin, 1791 และ *Martesia striata* Linnaeus, 1758(สมโภชน์, 2547; สุนันท์และทวีชัย, 2548; Carpenter and Niem, 1998) จัดเป็นหอยทะเลประเภทสองฝาชนิดหนึ่ง ที่มีลักษณะเปลือกค่อนข้างยาวรีคล้ายปีก ด้านท้ายแบนเรียวส่วนด้านหน้าจะป้านและพองออก ฝาทั้งสองเมื่อประกบกันแล้วจะปิดไม่สนิทในลักษณะล้ำเหลื่อมกับส่วนปลาย ส่วนบริเวณก้นหอยมีลักษณะคล้ายหอยปากเป็ด ด้านบนของเปลือกเป็นสีดำอมขาว มีสันเล็ก ๆ เป็นซี่ ๆ จากด้านบนยาวมาถึงขอบเปลือก (ventral margin)อีกด้านหนึ่งในลักษณะเฉียงแต่มีเพียงครึ่งหนึ่งตามความยาวของเปลือก ต่อจากส่วนนี้ไปจะเป็นส่วนของเปลือกฝาที่เรียบไปจนสุดปลายเปลือก สีของเปลือกด้านในมีสีขาว ส่วนเนื้อหอยภายในมีสีขาวอ่อนนิ่มและขยายอยู่เต็มฝาทั้งสอง โดยธรรมชาติแล้วหอยพิมจะฝังตัวอยู่ในดินค่อนข้างลึกและจะโผล่เฉพาะส่วนด้านท้าย(posterior end) ซึ่งบางครั้งจะมีส่วนที่ยาวยืดได้ตามความลึกที่อาศัยอยู่ ในส่วนด้านท้ายจะมีท่อน้ำ(siphon) 2 ท่อ ท่อหนึ่งดูดแพลงก์ตอนพร้อมน้ำเข้าไปเป็นอาหาร อีกท่อหนึ่งจะพ่นน้ำที่ไม่มีแพลงก์ตอนออกมา เนื่องจากหอยชนิดนี้ไม่มีส่วนใดยึดติดกับฝาเหมือนหอยอื่นๆ จึงมีอวัยวะสีขาวเรียวแหลมเล็กที่มีลักษณะคล้ายเขี้ยว (apophysis)อยู่ด้านในของฝาทั้งสองข้าง(สมประสงค์, 2525; สุนันท์และอำนวย, 2548) เป็นส่วนที่ยึดติดตัวหอยให้อยู่กับฝาและเนื่องจากหอยชนิดนี้ไม่มีส่วนใดยึดติดกับที่อยู่อาศัย ซึ่งจะพบอาศัยอยู่ใต้พื้นดินโคลนปนทราย ในที่น้ำทะเลขึ้นถึง มีความลึกของระดับน้ำ 5-10 เมตร และอยู่เป็นกลุ่ม ๆ บริเวณปากอ่าวมหาชัย และบริเวณใกล้เคียงเท่านั้น(เชิดชาย, 2502 และจินดา, 2503) จังหวัดสมุทรสาคร จึงให้หอยพิมเป็นสัตว์น้ำประจำจังหวัด เช่นเดียวกับหอยหลอดเป็นสัตว์น้ำประจำจังหวัดสมุทรสงคราม แต่ถึงอย่างไรก็ตามหอยทั้งสองชนิดก็มีปริมาณลดน้อยลงเรื่อย ๆ สาเหตุจากการไม่ช่วยกันอนุรักษ์และทำการประมงจากเครื่องมือประมงเป็นสำคัญ (กรมประมง, 2546)

เดิมการจำแนกชนิดของหอยจะใช้ลักษณะทางกายภาพ (Morphology) คือลักษณะของเนื้อหอยและลักษณะของเปลือกเป็นหลัก ซึ่งพบว่ามีข้อจำกัด เนื่องจากหอยเป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรม สุนันท์และอำนวย (2548) ได้ใช้วิธีการทางอิเล็คโตรโฟเรซีสมาประยุกต์ใช้ในการแยกชนิดหอยหลอด พบว่าเอนไซม์ที่สามารถแยกชนิดได้ชัดเจนคือ GPI และ PGM Isozyme ใช้ยืนยันได้ว่าชนิดสายพันธุ์ของหอยหลอดที่พบบริเวณดอนหอยหลอด จังหวัดสมุทรสงคราม สามารถจำแนกชนิดหอยหลอดได้ถึง 4 ชนิดด้วยกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการใช้วิธีทางอิเล็คโตรโฟเรซีสหารูปแบบไอโซไซม์ที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นมาตรฐานในการจำแนกชนิดตามลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของหอยพิม ที่พบในเขตจังหวัดสมุทรสาคร และจังหวัดสุราษฎร์ธานี

2. เพื่อนำผลจากการจำแนกชนิดตามลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของหอยพิม มาช่วยในการยืนยันการตรวจสอบการจำแนกชนิดของหอยจากลักษณะภายนอกตามหลักอนุกรมวิธาน

วิธีการศึกษาและดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหอยพิมบริเวณชายฝั่ง หมู่บ้านสหกรณ์ ตำบลโคกขาม (ในบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งและบริเวณชายฝั่งทะเลห่างฝั่งประมาณ 500 เมตร) (ภาพที่ 1) และ หมู่บ้านชายทะเล ตำบลกาหลง อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร และ หมู่บ้านพอด หมู่ 1 ตำบลชลคราม อำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี(บริเวณชายฝั่งทะเลห่างฝั่งประมาณ 500 เมตร)(ภาพที่ 2) ระหว่างเดือน พฤศจิกายน ถึง เดือนธันวาคม 2545 โดยทำการเก็บตัวอย่างหอยพิมเล็ก 50 ตัวที่จังหวัดสมุทรสาครและหอยพิมใหญ่จังหวัดละ 50 ตัว โดยเก็บตัวอย่างทุกขนาดแช่น้ำแข็งที่บรรจุในกล่องโฟม จากนั้นรีบนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกขนาด และชั่ง-วัดทุกตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างหอยพิมสำหรับการวิเคราะห์ทางวิธีอิเล็คโตรโฟเรซีส โดยใช้เนื้อเยื่อบริเวณส่วนเท้าและบริเวณท่อน้ำตามวิธีการของสุนันท์และอำนวย, 2548 (ภาคผนวก)

2. การวิเคราะห์อิเลคโตรโฟเรซิส

ทำการทดลองใช้ไอโซไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดต่างๆ รวม 12 ชนิด เพื่อทดสอบโดยวิธี Starch gel electrophoresis แบบ Horizontal (Selander *et al.*, 1971) โดยมีขั้นตอนวิเคราะห์ดังนี้

2.1 การเตรียมวุ้น และการใส่ตัวอย่าง

อ้างตามวิธีการของสุนันท์และอำนวย, 2548 (ภาคผนวก)

2.2 สารเคมีและน้ำยาที่ใช้

2.2.1 Electrode buffer : 0.223 M Tris, 0.086 M Citric acid, pH 6.3

Gel buffer : 0.008 M Tris, 0.003 M Citric acid, pH 6.7

ใช้กระแสไฟฟ้า : 170 V ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

2.2.2 Electrode buffer : 0.678 M Tris, 0.157 M Citric acid, pH 8.0

Gel buffer : 0.02289 M Tris, 0.00522 M Citric acid, pH 8.0

ใช้กระแสไฟฟ้า : 170 V ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง

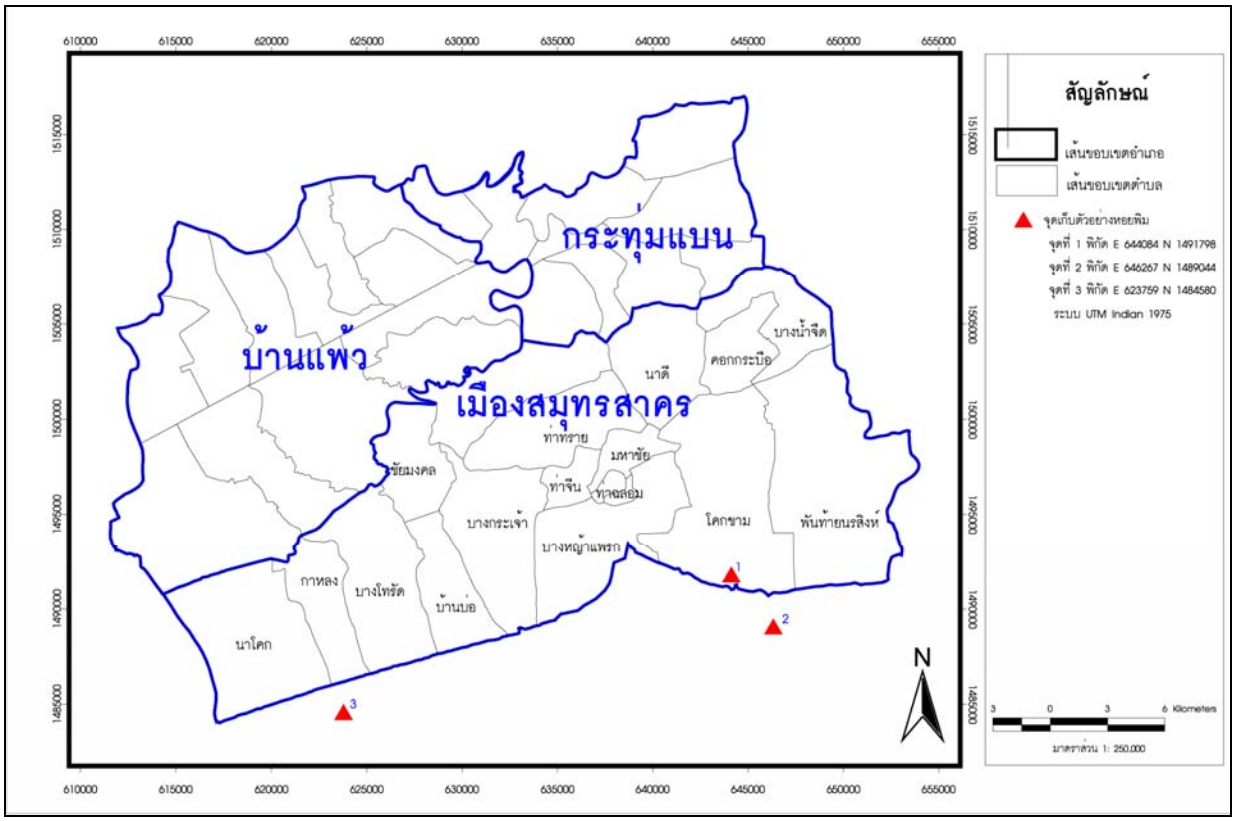
2.3 เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ : Aspartate aminotransferase (AAT, E.C. 2.6.1.1)

: Glucose phosphate isomerase (GPI-E.C. 5.3.1.9.)

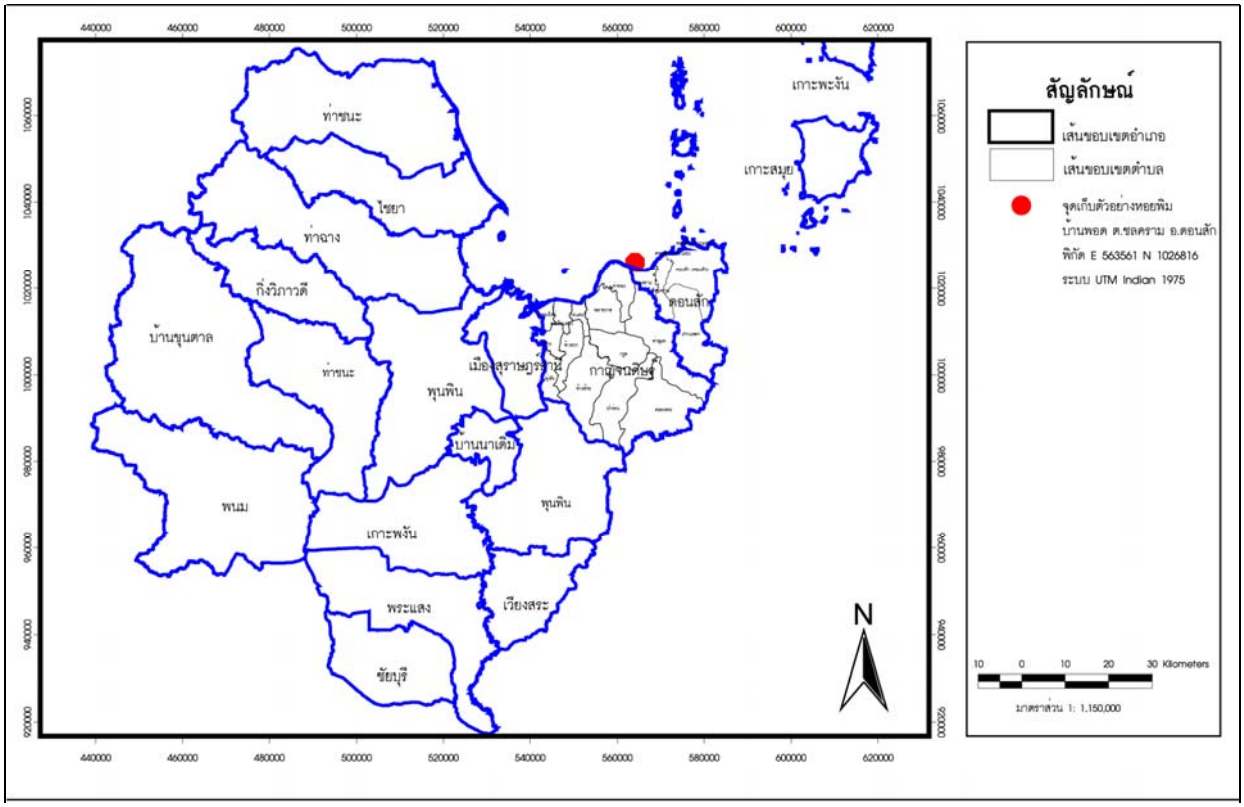
: Isocitrate dehydrogenase (IDH, E.C. 1.1.1.42)

: Leucine aminopeptidase (LAP, E.C. 3.4.11.1)

: Malate dehydrogenase (MDH-E.C. 1.1.1.3.7.)



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างหอยพิมบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดสมุทรสาคร



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างหอยพิมบริเวณชายฝั่งทะเล จังหวัดสุราษฎร์ธานี

: Malic enzyme (ME, E.C. 1.1.1.40)

: Mannose-phosphate isomerase (MPI-E.C. 5.3.1.8.)

: Phosphoglucomutase (PGM-E.C. 5.4.2.2.)

2.4 น้ำยาที่ทำให้เอนไซม์ติดแน่น ใช้ Acetic ผสมกับน้ำกลั่นและMethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:5:5 (หลังจากเติมน้ำยาที่ทำให้สีติดแน่นแล้ว นำตัวอย่างดังกล่าวไปอบในที่มืดที่อุณหภูมิห้องหรือ จนกว่าจะเห็นแถบสีเกิดขึ้น แล้วล้างสีโดยใช้Acetic ผสมกับน้ำกลั่นและMethyl alcoholในอัตราส่วน 1:5:5)

2.5. **การอ่าน**

ส่วนของแถบสีที่เห็นบนแผ่นวุ้นคือ ส่วนของโมเลกุลของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยา ซึ่งจะเห็นแถบสีตั้งแต่ 1 แถบหรือมากกว่า (Pasteur *et al.* 1988 ; รัตนาและคณะ, 2539)

2.6. การแปรผล

การวิเคราะห์ผลการแยกตัวของเอนไซม์บนเจลอิเล็คโตรโฟเรซีสจะดูจากตำแหน่งของแถบย้อมสีที่ ปรากฏ โดย โมเลกุลของโปรตีนจะมีการเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ขึ้นกับขนาดและรูปร่างของมันซึ่งแต่ละตำแหน่งจะถูกเรียกว่า “Alleles” เพื่อแทนความหมายของตำแหน่ง (loci) ที่ปรากฏเฉพาะใน แต่ละสายพันธุ์ โดยที่ Allele จะถูกเรียกเป็น “AA” ถ้าเอนไซม์ทั้งหมดมีเพียง 1 ตำแหน่ง เรียก Homozygote และ “AB” ถ้าเอนไซม์มี 2 ตำแหน่ง เรียก Heterozygote

ผลการศึกษา

การแยกชนิดโดยวิธีอิเลคโตรโฟเรซีส

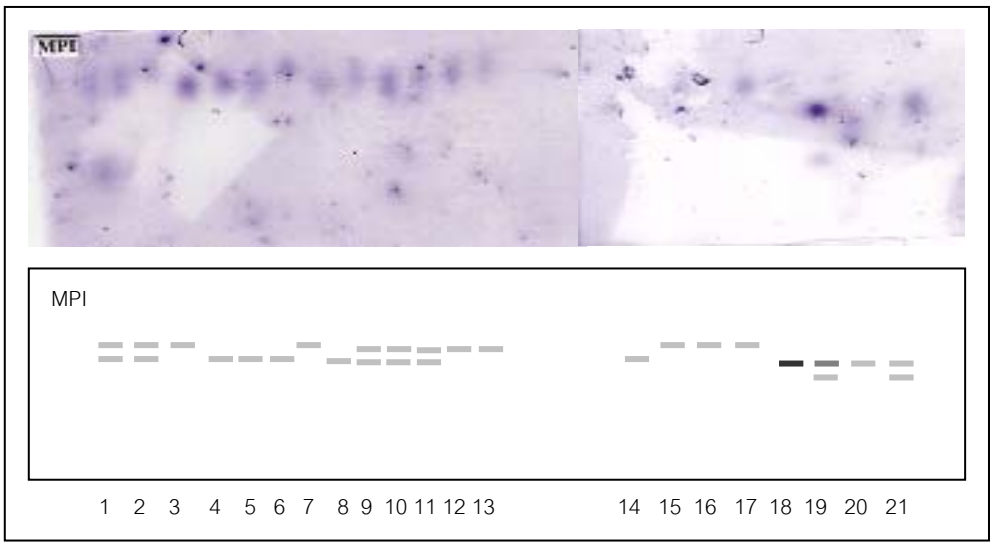
จากการศึกษาเปรียบเทียบหอยพิมใหญ่ และหอยพิมเล็ก ที่พบในจังหวัดสมุทรสาครชนิดละ 50 ตัวอย่าง และหอยพิมที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีจำนวน 50 ตัวอย่าง หลังจากนำมาวิเคราะห์โดยวิธีทางอิเล็คโตรโฟเรซีส และเปรียบเทียบความชัดเจนในการแยกแถบสีด้วยการทดสอบกับเอนไซม์ 8 ชนิด ได้แก่ MPI, GPI, PGM, AAT, IDH, LAP, MDH และ ME กับเนื้อเยื่อบริเวณส่วนเท้าและบริเวณท่อน้ำ ผลปรากฏว่าเนื้อเยื่อบริเวณส่วนเท้าให้ผลที่ดีกว่าเนื้อเยื่อบริเวณท่อน้ำ โดยเนื้อเยื่อบริเวณส่วนเท้าจะแสดงแถบสีที่ชัดเจนกับเอนไซม์บางชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 จะสามารถแบ่งรูปแบบการเกิดแถบสีได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็น Monomorphic ได้แก่ GPI, AAT, IDH, MDH และ ME ส่วนกลุ่ม Polymorphic ได้แก่ MPI, PGM และ LAP

ตารางที่ 1. การจำแนกรูปแบบโปรตีนของเนื้อเยื่อหอยพิมที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ 8 ชนิด

Enzyme	Locus	Buffer	Type	Resolution	Pattern
MPI	*Mpi**	TC pH 8.0	Polymorphic	Weak	AA, AB,BB
GPI	*Gpi**	TC pH 8.0	Monomorphic	Good	AA

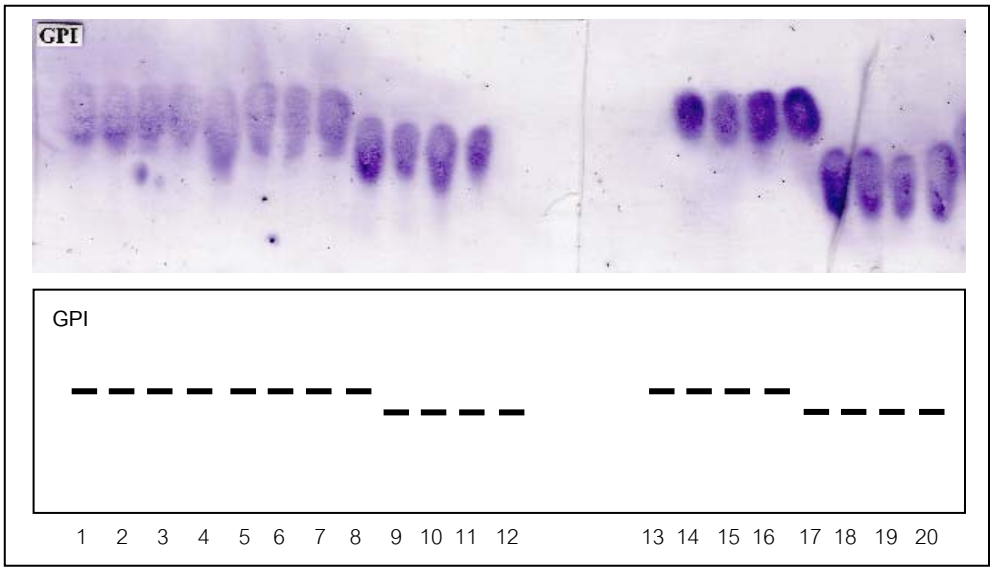
Enzyme	Locus	Buffer	Type	Resolution	Pattern
PGM	Pgm*	TC pH 8.0	Polymorphic	Fair	AA,AB,BB
AAT	*Aat**	TC pH 8.0	Monomorphic	Good	AA
IDH	Idh-1*	TC pH 6.3/6.7	Monomorphic	Fair	AA
	Idh-2*	TC pH 6.3/6.7	Monomorphic	Fair	AA
LAP	Lap*	TC pH 6.3/6.7	Polymorphic	Weak	AB,BB,BC,CC
MDH	Mdh*	TC pH 6.3/6.7	Monomorphic	Good	AA
ME	Me*	TC pH 6.3/6.7	Polymorphic	Fair	AA,AB

จากการนำเนื้อเยื่อบริเวณส่วนเท้า (foot) ของตัวอย่างหอยพิมใหญ่ และหอยพิมเล็กที่จังหวัดสมุทรสาครเปรียบเทียบกับตัวอย่างหอยพิมที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้ Buffer TC pH 8.0 (ภาพที่ 3-6) เปรียบเทียบดูลักษณะแถบสีที่เกิดขึ้นในกลุ่มของเอนไซม์ 4 ชนิดได้แก่ MPI, GPI, PGM และAAT



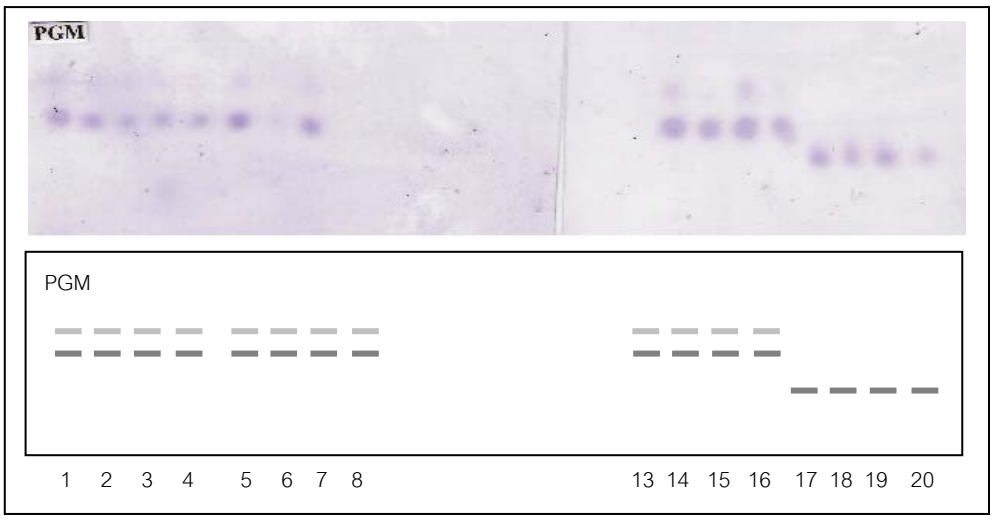
ภาพที่ 3. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด MPI

จากภาพที่ 3 พบ MPI Isozyme [Mannose-6-phosphate isomerase (MPI, E.C.#5.3.1.8)]ที่ TC buffer pH 8.0 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-7, หอยพิมใหญ่สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 8-13 ; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 14-17 และหอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 18-21มีรูปแบบการเกิดแถบโปรตีนของหอยพิมใหญ่และเล็กเป็นแบบ Polymorphic เกิด alleles 3 แบบ คือ AA, AB และBB ซึ่ง BB จะชัดเจนที่สุด แต่เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น MPI Isozyme จึงยังไม่เหมาะสมกับการแยกหอยพิม



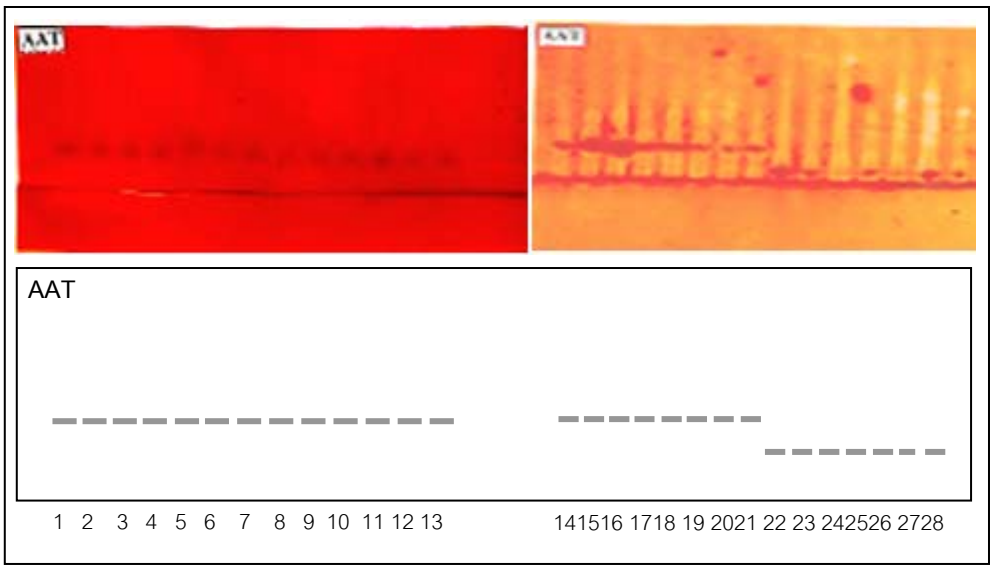
ภาพที่ 4. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด GPI

จากภาพที่ 4 พบGPI Isozyme [Glucose phosphate isomerase (GPI, E.C. 5.3.1.9)] ที่ TC buffer pH 8.0 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-4 ; หอยพิมใหญ่ สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 5-8 ; หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 9-12; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 13-16 และ หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 17-20 มีรูปแบบการเกิดแถบสีของหอยพิมเป็นแบบ Monomorphic คือเกิดแถบสี 1 ตำแหน่งซึ่งมีความชัดเจนทั้งหอยพิมใหญ่และหอยพิมเล็ก จากการเปรียบเทียบเอนไซม์นี้มีความเหมาะสมทั้งหอยพิมใหญ่และหอยพิมเล็ก เมื่อสังเกตแถบสีจะเห็นเป็นแถบหนาและมีสีเข้มเนื่องจากเทคนิคในขั้นตอนการย้อมสีหากเกิดฟองประจุจำนวนมากลักษณะการเกิดแถบสีจะหนาเป็นปื้นได้



ภาพที่ 5. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด PGM

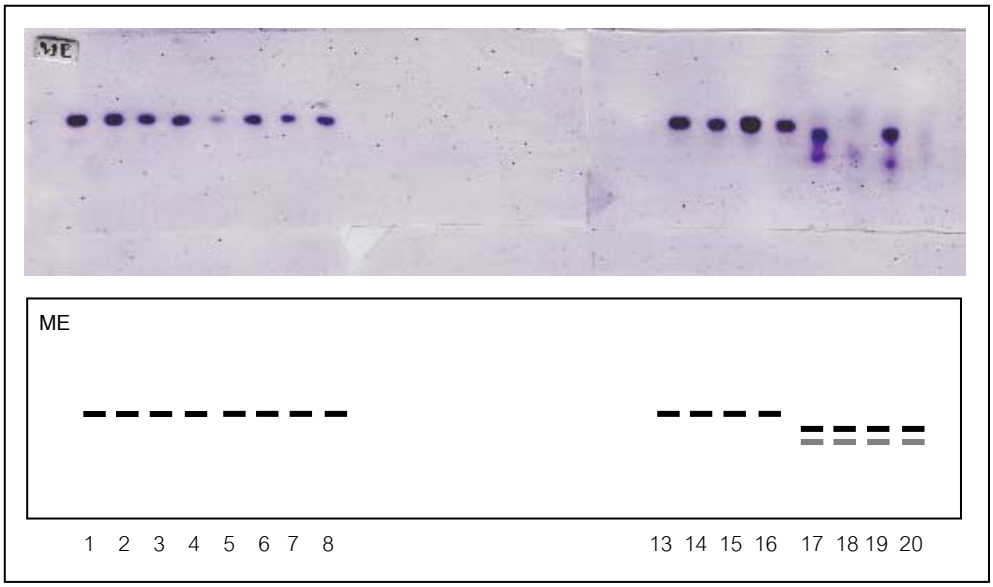
จากภาพที่5 พบ PGM Isozyme [Phosphoglucomutase (PGM, E.C. 5.4.2.2)]ที่ TC buffer pH 8.0 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-4; หอยพิมใหญ่สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 5-8 ;หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 9-12; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 13-16 และหอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 17-20 มีรูปแบบการเกิดแถบสีของหอยพิมเป็นแบบ Polymorphic เกิด alleles 2 แบบ คือ AB และ BB ซึ่งเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น PGM Isozyme เหมาะสมกับการแยกหอยพิมได้และรองจาก GPI Isozyme



ภาพที่ 6. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด AAT

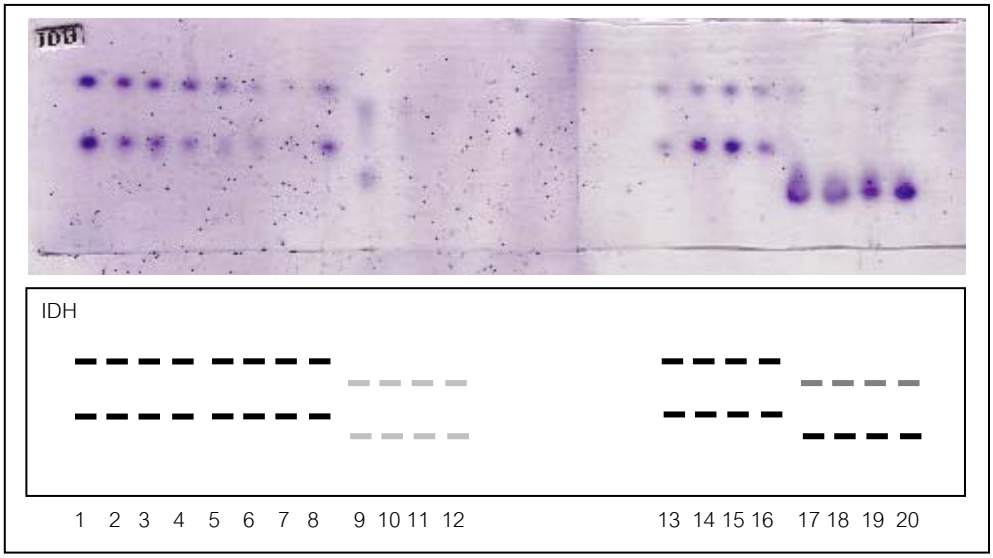
จากภาพที่ 6 พบ AAT Isozyme [Aspartate aminotransferase (AAT, E.C. 2.6.1.1)] ที่ TC buffer pH 8.0 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-7; หอยพิมใหญ่ สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 8-13; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 14-21 และหอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 22-28 มีรูปแบบการเกิดแถบสีของหอยพิมเป็นแบบ Monomorphic คือเกิดแถบ 1 ตำแหน่ง (loci) มี allele 1 รูปแบบ คือ AA เป็นลักษณะเดียวกับ GPI Isozyme แต่การเคลื่อนตัวของโมเลกุลโปรตีนจะเคลื่อนไปไดช้ากว่า และเช่นเดียวกันแถบโปรตีนของหอยพิมเล็กก็จะเคลื่อนที่ไปได้ช้ากว่าหอยพิมใหญ่ ดังนั้นความเหมาะสมของเอนไซม์ชนิดนี้ในการแยกโปรตีนของหอยพิมได้ดีพอๆกับ GPI Isozyme

จากการเปรียบเทียบดูลักษณะของแถบสีที่เกิดขึ้นในกลุ่มของเอนไซม์ 4 ชนิดได้แก่ ME, IDH, MDHและLAPโดยการใช้ Buffer TC pH 6.3/6.7 (ภาพที่ 7-10)



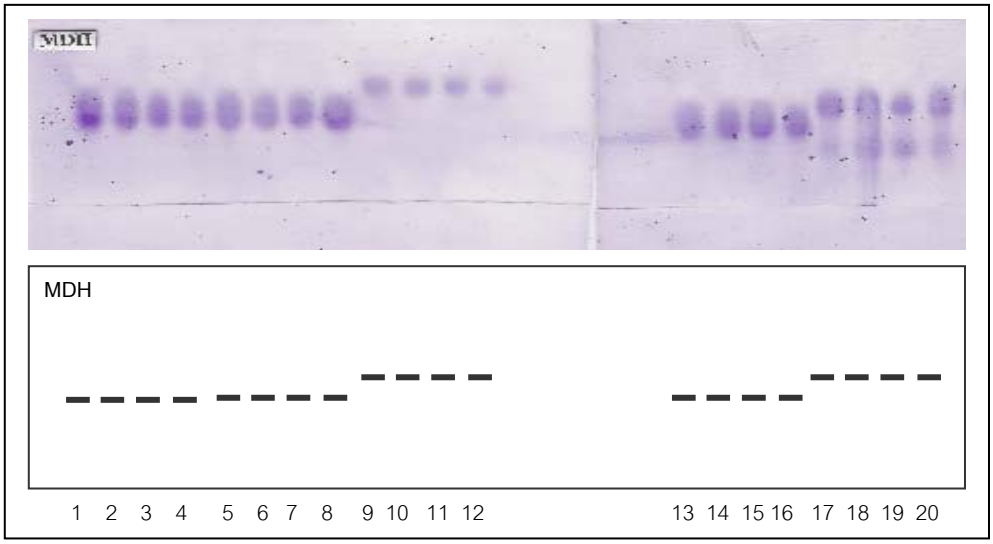
ภาพที่ 7. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด ME

จากภาพที่ 7 พบ ME Isozyme [Malic enzyme (ME, E.C. 1.1.1.40)] ที่ TC buffer pH 6.3/6.7 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-4; หอยพิมใหญ่สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 5-8 ; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 13-16และ หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 17-20 มีรูปแบบการเกิดแถบสีเป็นแบบ Monomorphic สามารถแยกโปรตีนจากหอยพิมพ์ขนาดใหญ่เกิดแถบสีชัดเจนแต่ในหอยพิมเล็กยังให้ผลที่ไม่ชัดเจนจะเป็นแบบPolymorphic



ภาพที่ 8. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด IDH

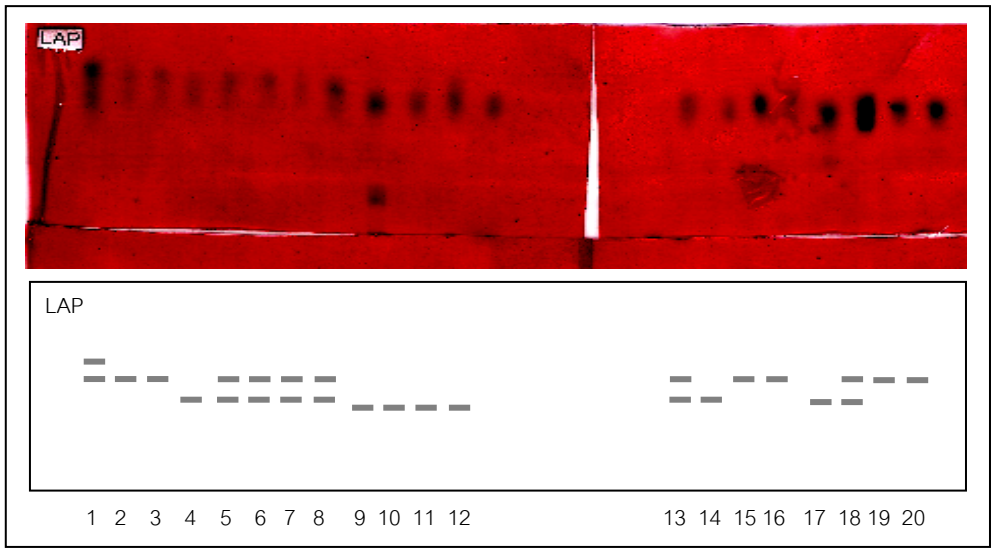
จากภาพที่ 8 พบ IDH Isozyme IDH [Isocitrate dehydrogenase (IDH, E.C. 1.1.1.42)]ที่ TC buffer pH 6.3/6.7 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-4; หอยพิมใหญ่ สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 5-8 และ หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 9-12; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 13-16 และหอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 17-20 คุณลักษณะของเอนไซม์ชนิดนี้มักจะเกิดแถบสีแยกออกเป็นสองส่วนหรือให้แถบสีสอง locus (Philippe and Benzie, 1992) อันได้แก่ *Idh-1** และ *Idh-2** ในแต่ละ loci มีรูปแบบการเกิดแถบสีของหอยพิมเป็นแบบ Monomorphic คือเกิดแถบ 1 ตำแหน่งและมีความชัดเจนทั้งหอยพิมใหญ่และหอยพิมเล็ก จากการเปรียบเทียบเอนไซม์ IDH Isozymeจะมีความเหมาะสมในการแยกหอยพิมซึ่งรองจาก GPI Isozyme



ภาพที่ 9. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด MDH

จากภาพที่ 9 พบ MDH Isozyme[Malate dehydrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37)]ที่TC buffer pH 6.3/6.7 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-4; หอยพิมใหญ่ สุราษฎร์ธานีอันดับที่ 5-8 ; หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 9-12; หอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 13-16 และ หอยพิมเล็กสมุทรสาครอันดับที่ 17-20 โดยคุณลักษณะของเอนไซม์ชนิดนี้มักจะเกิดแถบสีที่ชัดเจนมีรูปแบบการเกิดแถบสีเป็นแบบ Monomorphic ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการแยกหอยพิมใหญ่และหอยพิมเล็กได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าในหอยพิมเล็กเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดอื่นแถบสีจะเคลื่อนที่ไปได้ช้ากว่าหอยพิมใหญ่แต่เอนไซม์ชนิดนี้จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ซึ่งเมื่อเทียบกับ Isozyme ตัวอื่นจะให้ผลที่แตกต่าง เป็นไปได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อของหอยพิมเล็กแล้วจะมีความแรงของประจุเพิ่มขึ้นทำให้เคลื่อนที่ได้เร็ว (Dunham, 2004) อนึ่งปัญหาทางเทคนิคที่อาจพบก็คือแถบสีหลอกหรือเงาของแถบสีซึ่งพบในหอยพิมอันดับ

ที่ 17-20 ซึ่งเกิดจากการที่เอนไซม์ของเนื้อเยื่อที่สกัดได้มากเกินกว่าเอนไซม์ MDH เป็นผลทำให้ปฏิกิริยาขาดสมดุล



ภาพที่ 10. การแยกแถบสีโปรตีนในหอยพิมด้วยเอนไซม์ ชนิด LAP

จากภาพที่ 10 พบ LAP Isozyme[Leucine aminopeptidase (LAP, E.C. 3.4.11.1)] ที่ TC buffer pH 6.3/6.7 โดยตัวอย่างหอยพิมใหญ่สมุทรสาครอันดับที่ 1-4 และอันดับที่ 13-16; หอยพิมใหญ่ สุราษฎร์ธานี อันดับที่ 5-8 และ หอยพิมเล็ก สมุทรสาครอันดับที่ 17-20 มีรูปแบบการเกิดแถบสีของหอยพิมเป็นแบบ Polymorphic เกิด alleles 4 แบบ คือ AB, BB, BC และ CC เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น การอ่านผล LAP Isozymeจะค่อนข้างยากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดPGM Isozyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมกับการแยกหอยพิม

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาหารูปแบบไอโซไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกชนิดตามลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของหอยพิมในเขตจังหวัดสมุทรสาครและจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยสกัดจากเนื้อเยื่อบริเวณส่วนของท่อน้ำ(Siphon) เปรียบเทียบกับเนื้อบริเวณส่วนเท้าของหอยพิม พบว่าเนื้อเยื่อจากส่วนเท้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ให้ผลดีกว่าเนื้อเยื่อจากส่วนของท่อน้ำ และจากการทดสอบกับเอนไซม์ทั้ง 8 ชนิด พบว่า GPI, MDH และ AAT จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความเหมาะสมที่จะใช้จำแนกหอยพิมได้ แต่อย่างไรก็ดีไม่ได้หมายความว่าเอนไซม์ที่เหลือจะไม่สามารถแยกหอยพิมได้ เพียงแต่เกณฑ์การตัดสินจะพิจารณาจากความชัดเจนและสม่ำเสมอในการให้ผลการตรวจสอบทั้งหอยพิมใหญ่และหอยพิมเล็กเป็นสำคัญ ดังนั้นจากการวิเคราะห์แถบสีที่เกิดจึงสามารถสรุปได้ว่าหอยพิมใหญ่ที่พบทั้งในจังหวัดสมุทรสาครและในจังหวัดสุราษฎร์

ธานีนั้นมีรูปแบบของเอ็นไซม์ที่ไม่แตกต่างกันซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม จึงจัดเป็นสายพันธุ์เดียวกันซึ่งก็คือชนิด *Pholas orientalis* Gmelin, 1791 ส่วนหอยพิมเล็กที่พบเฉพาะในจังหวัดสมุทรสาครนั้นมีรูปแบบของเอ็นไซม์ที่แตกต่างไปจากหอยพิมใหญ่ จึงจัดเป็นชนิด *Martesia striata* Linnaeus, 1758 (Carpenter and Niem, 1998; สุนันท์และทวีชัย, 2548) ตามที่ได้แยกชนิดของหอยพิมตามลักษณะทางกายภาพไว้ และผลของการศึกษาในครั้งนี้ ไม่เพียงแต่มีประโยชน์ต่อการวางแผนเพื่อการจัดการทรัพยากรหอยพิมเพื่อคงไว้ซึ่งความสมดุลตามธรรมชาติเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์ในแง่ของการวางแผนจัดการชนิดสายพันธุ์ที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคอีกด้วย เพราะสัตว์น้ำหากต่างสายพันธุ์กันก็มีผลเกี่ยวเนื่องถึงคุณภาพในแง่ของรสชาติ ดังเช่นในปลาจะมีการตรวจสอบชนิดปลาภายหลังการแปรรูป โดยการใช้วิธีการทางอิเล็คโตรโฟเรซีสมาใช้ในการจำแนกชนิดเช่นกัน เนื่องจากอาจมีการปลอมปนวัตถุดิบสัตว์น้ำ ที่มีลักษณะใกล้เคียงเพื่อลดต้นทุนได้(FAO, 1986; สุทธวัฒน์, 2548) และด้วยเหตุที่หอยพิมจัดเป็นสัตว์น้ำประจำจังหวัดสมุทรสาคร หากได้มีการศึกษาวิจัยด้านองค์ประกอบทางเคมี การเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยว ตลอดจนการแปรรูปเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ประจำจังหวัดด้วยแล้วก็จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและกลุ่มแม่บ้านประมงในจังหวัดสมุทรสาครเป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2546. หอยพิม. หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันที่ 20 สิงหาคม 2546.

จินดา เทียมเมฆ. 2503. หอยที่ใช้เป็นอาหารในกรุงเทพ. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 101-102.

เชิดชาย อมาตยกุล. 2502. หอยของประเทศไทย. วารสารการประมง. 12(4) 345-354.

รัตนา ผลธัญญา, มอนิกา นิคลาสสัน และ สมชัย บุศราวิช. 2539. การจำแนกชนิดสัตว์น้ำวัยอ่อนโดยลักษณะพันธุกรรมจากไอโซไซม์.รายงานวิชาการฉบับที่ 3/2539 กลุ่มประเมินสภาวะทรัพยากรและการประมง ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน กองประมงทะเล กรมประมง. 12 หน้า.

สุนันท์ ทวยเจริญ และอำนวย คงระเบียบ. 2548. การแยกชนิดของหอยหลอดในอ่าวไทยตอนบนโดยวิธีอีเล็คโตรโฟเรซีส. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2548. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง สมุทรสาคร. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.

สุนันท์ ทวยเจริญ และทวีชัย สุไพรวันย์, 2548. การแยกชนิดของหอยพิม(Orien Angle Wings, Piddocks)ที่พบในบริเวณอ่าวไทยตอนบน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 55/2548. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 11 หน้า.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์. 344 หน้า.

สมประสงค์ ขันถม. 2525. การศึกษานิเวศน์วิทยาบางประการของหอยพิม. รายงานประจำปี 2525-2528 สถานีประมงน้ำกร่อยจังหวัดสมุทรสาคร. 12 หน้า.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. 2547. คู่มือประชาชน “การจำแนกชนิดสัตว์น้ำที่เป็นอาหารปลอดภัย (Food Safety). กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 15.

Carpenter.K.E. and V.H. Niem. 1998. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific, FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. Food and Agriculture Organization of the United Nations, ROME. 1:354-358.

Dunham, R.A., 2004. Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approaches. CABI Publishing MA. USA. 85– 88 pp.

FAO, 1986. Fish Species Identification. Manuals of food quality control 8. food analysis : quality, adulteration, and tests of identity. Food and Agriculture Organization of the United Nations, ROME. 14/8: 136-138.

Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhome, F., Catalan,J.and Britton-Davidian,J. 1988. Practical isozyme genetics. New York, Halsted Press, 1215 pp.

Philippe Borsa and John A.H. Benzie. 1992. Methods for allozyme electrophoresis of the top snails *Trochus* and *Tectus* (Prosobranchia: Trochidae). Australian Institute of Marine Science Report, No.5. 31 p.

Selander, R.K., Smith, M.H. Yang, S.Y., Johnson, W.E. and Gentry, J.B 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus, Variation in the old-field mouse(Peromyscus polionotus). Stud. Genet. VI, Univ. Texas Publ. 1703:49-90.

ภาคผนวก

การเตรียมตัวอย่างหอยพิมสำหรับการวิเคราะห์ทางวิธีอิเล็คโตรโฟเรซีส

โดยนำตัวอย่างมาตัดเนื้อเยื่อบริเวณเท้าและท่อน้ำไปบดผสมกับ Mercapto-ethanol 0.04 % และเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็วประมาณ 15,000 รอบ/วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 นาที แล้วนำไปแยกเอาส่วนน้ำใสเก็บไว้ทำการวิเคราะห์โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมวุ้น และการใส่ตัวอย่าง

การเตรียมวุ้น

เตรียมวุ้นลงในถาดใช้ความเข้มข้น 10.6 % ประมาณ 400 ml ซึ่งสามารถตัดได้ 4 แผ่น สำหรับทดลองย้อมสี ไอโซไซน์ 4 ชนิด และทดลองตัวอย่างได้ 20 ตัวอย่าง/แผ่น

การใส่ตัวอย่าง

ใช้กระดาษกรอง Whatman 3 mm.(chromatography paper) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาดประมาณ 9X4 มิลลิเมตร ชุบตัวอย่างที่เตรียมไว้ให้ชุ่มพอเหมาะแล้วสอดชิ้นกระดาษลงในรอยตัดระหว่างวุ้น ให้แต่ละตัวอย่างห่างกันพอควร ปิดทับแผ่นวุ้นด้วยพลาสติกบางๆเพื่อป้องกันการระเหยในระหว่างการทดลอง