การศึกษาการใช้เทคนิค พีซีอาร์-อาร์เอพดีในเบื้องต้นในกุ้งก้ามกราม

Preliminary Study on Implementation of RCR-RAPD Technique in Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man

บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล (Bundit Tengjaroenkul)[*] *คมกริช พิมพ์ภักดี (Komkrich Pimpukdee)*[**]
อุไร เต็งเจริญกุล (Urai Tengjaroenkul)[***]

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้เทคนิค พีซีอาร์-อาร์เอพีดีในเบื้องต้นในกุ้งก้ามกรามด้วยการสกัด การเพิ่มจำนวน และการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอพบว่า ดีเอ็นเอสกัดจากกุ้งที่โตเต็มวัยมีปริมาณ 61.13±1.74 ไมโครกรัมต่อกรัมกล้ามเนื้อ และมีความบริสุทธิ์ที่ 1.85±0.08 และยังพบว่าไพรเมอร์ 11 ชนิด จาก 23 ชนิดที่สุ่มมา สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ และเมื่อนำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดโดยใช้โปรแกรม Photo-Cap พบว่า แถบดีเอ็นเอทั้ง 32 แถบ มีขนาดในช่วง 362-1,122 คู่เบส

Abstract

A preliminary study on implementation of PCR-RAPD technique in *Macrobrachium rosenbergii* by extraction, amplification, and analysis of DNA indicated that the amount of extracted DNA was 61.13±1.74 microgram per gram of flesh, and the purity of the DNA was 1.85±0.08. Furthermore, using PCR technique, eleven of twenty-three randomed primers enabled to amplify the DNA. An analysis of size of thirty-two DNA bands indicated that the sizes were ranged from 362-1,122 base pairs.

คำสำคัญ : พีซีอาร์ อาร์เอพีดี กุ้งก้ามกราม
Keywords : PCR, RAPD, Giant Freshwater Prawn

* *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
** *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** *อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของไทยได้พัฒนาไปในเชิงพาณิชย์มากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการในการบริโภคกุ้งก้ามกรามภายในประเทศที่สูงขึ้น ดังในปี 2540 ที่มีมูลค่าผลผลิตเกือบ 3,000 ล้านบาท (สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, 2541) อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่ผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในปัจจุบันประสบคือ ขนาด น้ำหนักและความแข็งแรงของกุ้งที่ลดต่ำลง ปัญหานี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการผสมพันธุ์เลือดชิดในพ่อแม่กุ้ง

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) และ อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) เป็นเทคนิคที่ง่าย ทำได้รวดเร็ว และให้ผลดีในการตรวจสอบความใกล้ชิดของสายพันธุ์กุ้งโดยไม่ต้องทราบรายละเอียดของจีโนมของกุ้งที่ศึกษา (Williams et al., 1990; Benzie et al., 1993; Tassanakajon et al., 1998; Klinbunga, 2001) เทคนิคนี้ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งขาว (*Penaues vannamei*) (Garcia et al., 1994) ใช้ตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมของพ่อแม่กุ้งกุลาดำ (*Penaues monodon*) ในเขตทะเลไทย (Tassanakajon et al., 1997 และ Klinbunga et al., 2001) สามารถตรวจความใกล้ชิดของสายพันธุ์กุ้งสีน้ำเงิน (*Penaues stylirostris*) ในอ่าวเม็กซิโก (Aubert and Lightner, 2000) และใช้ตรวจสอบพันธุกรรมของกุ้งกุลาดำในฟิลิปปินส์ (Xu et al., 2001) อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการรายงานเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดีในกุ้งก้ามกราม ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเทคนิคนี้ตั้งแต่วิธีการสกัด การเพิ่มจำนวน และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ผลที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความใกล้ชิดของสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อไป

วิธีการศึกษา

การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อลำตัวบริเวณปล้องที่ 1-3 ของกุ้งก้ามกรามโตเต็มวัย จากแหล่งเดียวกันจำนวน 6 ตัวมาแช่ที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Merante et al. (1996) และ Boiteux et al. (1999) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้คือ นำเนื้อตัวอย่างที่บดแล้ว มาบดต่อกับสารสกัดดีเอ็นเอที่ประกอบด้วย Tris pH 8.0 500 mM, NaCl 1.4 M, CTAB 2%, EDTA 20 mM และ b-mercaptoethanol 0.2% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ก่อนเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายชั้นบนมาเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติมสารละลายชั้นบนด้วย isopropanol ที่เย็นจัด เขย่าเบา ๆ ปั่นต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ ammonium acetate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หลังจากนั้นตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เติม Rnase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปอบที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณและประเมินคุณภาพดีเอ็นเอ

การหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดแล้วที่อยู่ใน TE buffer มา 5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ก่อนนำมาคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิค และหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี

ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 23 ชนิด (Operon Technologies, Germany) (ตารางที่ 1) และชุดทดสอบสำเร็จ (QIAGEN, USA) นำมาใช้ตรวจสอบ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยปริมาตรสุทธิของสารอยู่ที่ 25 ไมโครลิตรต่อปฏิกริยา จำนวน 22 ปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 1) PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า 2) Q buffer ความเข้มข้น 1 เท่า 3) dNTP ความเข้มข้น 0.2 mM 4) $MgCl_2$ 2 mM 5) Primer 0.2 mM 6) DNA template 25 ng 7) Taq DNA polymerase 2 unit เครื่อง PCR ได้ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและจำนวนรอบ อ้างอิงตาม Garcia and Benzie (1995) ดังนี้ 1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 91.5 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 ทั้งหมด 40 รอบ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเครื่องอิเล็คโตรโฟริซิส และถ่ายรูปด้วยกล้องโพลารอยด์ แล้วนำดีเอ็นเอมาวัดขนาด โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (BioLabs, USA) ด้วยโปรแกรม Photo-Cap (Vilber Laurmat, Fr)

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

เทคนิคอัลโลไซม์อิเลคโตรโฟริซิสได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่ผ่านมาผลสำเร็จของการใช้เทคนิคนี้ในกุ้งยังต่ำ เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกสายพันธุ์น้อย (Hedgecock et al., 1982; Daud, 1995; Tassanakajon et al., 1998) ปัจจุบันความรู้จากการศึกษาพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี พบว่าให้ประโยชน์มากกว่า มีความเหมาะสมกว่าต่อกุ้งกุลาดำ กุ้งขาว และกุ้งสีน้ำเงิน (Garcia et al., 1995; Tassanakajon et al., 1997; Aubert and Lightner, 2000) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานหรือตีพิมพ์ถึงเทคนิคนี้ในกุ้งก้ามกราม

การสกัด การวัดปริมาณ และการประเมินคุณภาพดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Marante et al. (1996) และ Boiteux et al. (1999) พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอ 61.13±1.74 ไมโครกรัมต่อกรัมกล้ามเนื้อ และมีความบริสุทธิ์ 1.85±0.08 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าเหมาะสม ทั้งนี้คงเพราะมีการใช้สารต่าง ๆ เพื่อทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีขึ้น (Welsh and McClelland, 1990; Garcia, 1994; Merante et al., 1996; Benzie, 1998; Tassanakajon et al., 1998 และ Boiteux et al., 1999) สารเหล่านี้ประกอบด้วย 1) CTAB ที่ช่วยกำจัดสารพวกโพลีแซ็คคาไรด์และทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอน 2) b-mercaptoethanol ช่วยทำให้โปรตีนเสียสภาพ 3) chloroform ช่วยกำจัดสารพวกคาร์โบไฮเดรต และ 4) RNAse A ช่วยกำจัดอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้ขั้นตอนและเวลาในการสกัดที่ไม่มาก น่าจะช่วยทำให้ดีเอ็นเอมีคุณภาพเหมาะในการทำพีซีอาร์

เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี

จากการศึกษาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 11 ชนิดจาก 23 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คือ MR-5, MR-12, MR-14, MR-15, MR-16, MR-17, MR-19, MR-20, MR-21, MR-22 และ MR-23 (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลที่ได้แสดงว่าไพรเมอร์ทั้ง 11 ชนิดมีลำดับของเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแบบ inverted sequence ที่อยู่ในช่วง 100-3,000 คู่เบส ในการทดลองนี้ได้ใช้ไพร์เมอร์ 12 ชนิด (MR1-MR12) ที่มีรายงานว่าให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนในกุ้งกุลาดำ(Garcia and Benzie, 1995) แต่ผลการศึกษาในกุ้งก้ามกรามปรากฏว่ามีเพียงไพร์เมอร์ 2 ชนิด (MR5 และ MR12) ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) ผลที่แตกต่างนี้อาจเป็นเพราะรายละเอียดในเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดีที่ใช้ไม่เหมือนกัน หรือลำดับเบสในดีเอ็นเอของกุ้งทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน

จากการนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ลายพิมพ์ ปรากฏว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เห็นชัดเจนมีทั้งหมด 32 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 362-1,122 คู่เบส (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) แถบดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกันมี 28 แถบ แถบของดีเอ็นเอที่มากที่สุดมี 5 แถบ เกิดจาก

ไพรเมอร์ MR-20 และ MR-22 และแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดคู่เบสเท่ากันมี 3 แถบคือ 1) แถบ 490 คู่เบส จากไพรเมอร์ MR-19 และ MR-22 2) แถบ 644 คู่เบส จากไพรเมอร์ MR-15 และ MR-23 และ 3) แถบ 916 คู่เบส จากไพรเมอร์ MR-17 และ MR-19 (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) โดยทั่วไปจำนวนแถบของดีเอ็นเอจากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดีที่มากพอจะทำให้การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความความแม่นยำสูงขึ้นและใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น ในปี คศ.1998 Tassanakajon et al. ได้ใช้ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากกว่า 8 แถบ ขณะที่ Klinbunga et al. (2001) ใช้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 13 แถบขึ้นไปในการตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมกุ้ง แต่ในการทดลองศึกษานี้แถบดีเอ็นเอที่มากที่สุดมีเพียง 5 แถบ ดังนั้นเพื่อความแม่นยำในการตรวจสอบความแตกต่างสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามในโอกาสต่อไป จึงควรเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากกว่านี้

โดยทั่วไปไพรเมอร์ในเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอพีดี มักมีส่วนประกอบของเบส GC 50-80 เปอร์เซ็นต์ (Williams et al., 1990) จากการศึกษานี้พบว่าสัดส่วนเบส GC ของไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน (ตารางที่ 1, รูปที่ 1) มีค่า 57.33฿0.059 เปอร์เซ็นต์ แต่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถให้ดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนพบว่ามีสัดส่วน GC 53.967฿0.063 เปอร์เซ็นต์ ข้อมูลที่ได้นี้อาจบ่งถึงปริมาณg[l GC ของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในเทคนิคพีซีอาร์ของกุ้งก้ามกราม

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาเทคนิค พีซีอาร์-อาร์เอพีดี ตั้งแต่การสกัด การเพิ่มปริมาณ และการวิเคราะห์ดีเอ็นเอนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาด้านพันธุกรรมและชีวโมเลกุลในกุ้งก้ามกรามต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด. 2541. กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง. **กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.** เอกสารฉบับที่ 9/2541.

Aubert, H. and Lightner, D.V. 2000. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. **Mar. Biol.** 137: 875-885.

Benzie, J.A.H., Ballment, E. and Frusher, S. 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: Concordant results from mt DNA and allozyme. **Aquaculture** 111: 89-93.

Benzie, J.A.H. 1998. Penaeid genetics and biotechnology. **Aquaculture** 164: 23-47.

Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N. and Simon, P.W. 1999. Effects of plant tissue and DNA purification method on random amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 124: 32-38.

Daud, S.K. 1995. Population genetics of *Penaeus monodon* Fabricus and *Penaeus meguiensis* de Man in Malaysia. Ph.D. thesis, **University of Stirling,** UK. 327 pp.

Garcia, D.K., Faggart, M.A., Rhoades, L., Alcivar-Warren, A.A. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimps using three molecular genetic techniques. **Mol. Mar. Biol** 3: 270-280.

Garcia, D.K. and Benzie, J.A.H. 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. **Aquaculture** 130: 137-144.

Hedgecock, D., Tracey, M.L. and Nelson, K. 1982. Genetics. In: Abele, L.G. (eds) **Embryology, morphology, genetics.** Academic Press, New York, pp. 283-355.

Klinbunga, S., Siludjai, D., Wudthijinda, W., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P. and Menasveta, P. 2001. Genetic heterogeneity of the Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand revealed by RAPD and Mitochondrial DNA RFLP analyses. **Mar. Biotechnol.** 3: 428-438.

Merante, F., Raha, S., Reed, J.K. and Proteau, G. 1996. The Simultaneous isolation of RNA and DNA from Tissues and Cultured Cells. In: **Basic DNA and RNA Protocols.** A.J. Harwood (Ed.). Humana Press, New Jersey, USA. pp. 3-10.

Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rhimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P. and Boonsaeng, V. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **Mol. Mar. Biol. Biotech.** 6: 110-115.

Tassanakajon, A., Pongsomboon, S., Rhimphanitchayakit, V., Jarayabhand, P.., Klinbunga, S. and Boonsaeng, V. 1998. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using random amplified polymorphic DNA analysis. **J. Mar Biotechnol.** 6: 249-254.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18: 7213-7218.

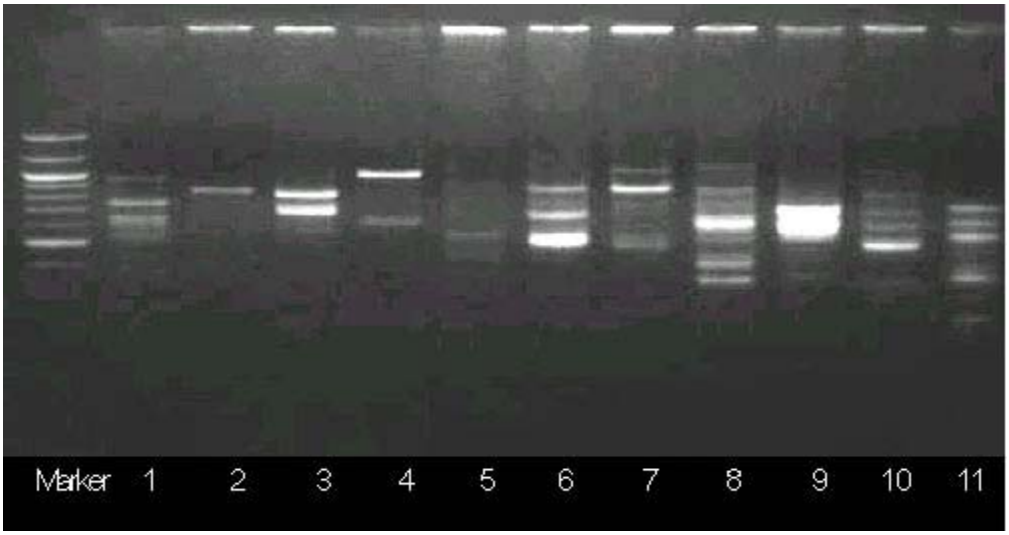
Williams, G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.L., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 18: 6531-6535.

Xu, Z., Primavera, J.H., De La Pena, L.D., Pettit, P., Belak, J. and Alcivar-Warren. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Phillippines using microsatellites. **Aquaculture** 199: 13-40.

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์	ลำดับ $5' \rightarrow 3'$	มวลโมเลกุล	เปอร์เซ็นต์ G+C	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)
MR-1	TCACGATGC	2699	0.56	-
MR-2	TGCTCACTG	2690	0.56	-
MR-3	ACGGTACACT	3012	0.5	-
MR-4	TCGTAGCCAA	3012	0.5	-
MR-5	TCACGATGCA	3012	0.5	552, 654, 774, 973
MR-6	CTGTTGCTAC	2994	0.5	-
MR-7	CCTGATGCT	2690	0.56	-
MR-8	GCAAGTAGCT	3052	0.5	-
MR-9	CGCAAGTAG	2748	0.56	-
MR-10	TGGACACTG	2739	0.56	-
MR-11	GGAAGTAGT	2803	0.5	-
MR-12	ACCTCGAGC	2684	0.67	883
MR-13	CGAGCACTG	2724	0.67	-
MR-14	ATTGCGTCCA	3993	0.5	735, 848
MR-15	TCTCCGCTTG	2961	0.6	644, 1049
MR-16	TGTAGCAGGG	3099	0.6	560
MR-17	TGGTCGCAGA	3059	0.6	551, 691, 916
MR-18	CTCAGTGTCC	2970	0.6	-
MR-19	ACCCCGCCAA	2933	0.7	490, 916, 1085
MR-20	GGCGGATAAG	3108	0.6	368, 414, 634, 900, 1122
MR-21	GACTGCCTCT	2970	0.6	634, 723
MR-22	TCGCATCCCT	2930	0.6	362, 490, 623, 711, 865
MR-23	TGGGCAGAAG	3108	0.6	373, 547, 644, 748

- หมายถึง แถบดีเอ็นเอไม่ปรากฏชัดเจน



รูปที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามจากไพรเมอร์ 11 แบบ (เลนที่ 1-11) จาก 23 แบบ ที่เพิ่มปริมาณได้. Marker เป็นเลนของดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp Ladder, เลนที่ 1 ไพรเมอร์ MR-5, เลนที่ 2 ไพรเมอร์ MR-12, เลนที่ 3 ไพรเมอร์ MR-14, เลนที่ 4 ไพรเมอร์ MR-15, เลนที่ 5 ไพรเมอร์ MR-16, เลนที่ 6 ไพรเมอร์ MR-17, เลนที่ 7 ไพรเมอร์ MR-19, เลนที่ 8 ไพรเมอร์ MR- 20, เลนที่ 9 ไพรเมอร์ MR-21, เลนที่ 10 ไพรเมอร์ MR-22, เลนที่ 11 ไพรเมอร์ MR-23