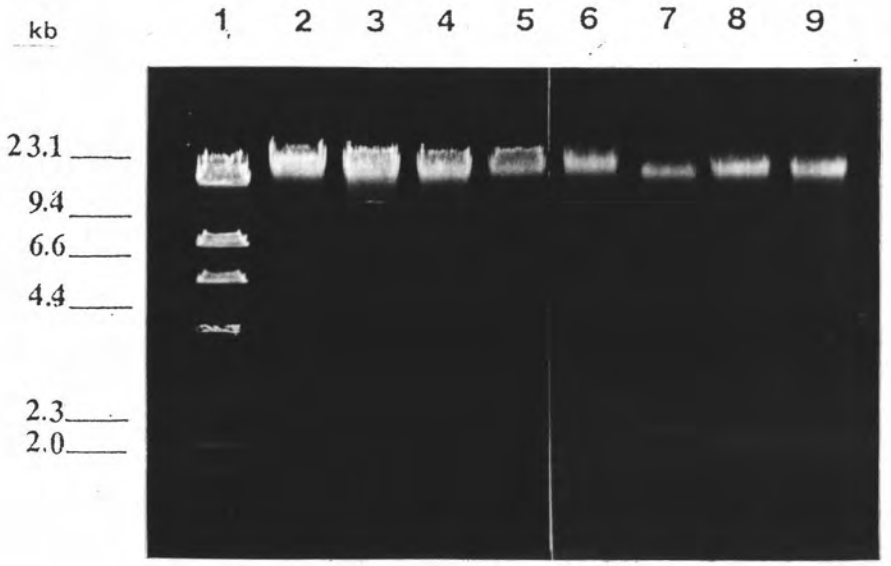
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจากผึ้งโพรง

ในการวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของผึ้งโพรง 2 วิธีคือ วิธีสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ (ข้อ 2.10.1.ก) และวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) (ข้อ 2.10.1.ข) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้นอกห้องปฏิบัติการในการเก็บตัวอย่างของผึ้งโพรง ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก 2 วิธีนี้ เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (*Hind*III) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในรูป high molecular weight มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 4) เมื่อนำดีเอ็นเอมาหาปริมาณโดยการวัด OD_{260} พบว่าโครโมโซมัลดีเอ็นเอและดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากตัดแด้ผึ้งโพรง 1 ตัว มีค่าอยู่ระหว่าง 4-6 ไมโครกรัม และ 3-4 ไมโครกรัม ตามลำดับ และเมื่อวัด $OD_{260/280}$ พบว่าได้ค่าเท่ากับ 1.95 และ 1.70 ตามลำดับ

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาย่อยให้เป็นชิ้นเพื่อนำไปโคลน โดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI ซึ่งในขั้นแรกได้ทดลองหาปริมาณของ *Eco*RI ที่เหมาะสมที่จะย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์จึงได้ทดลองตัดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมด้วย *Eco*RI 5, 10 และ 15 หน่วย โดยบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ภายหลังการย่อยเสร็จสิ้น จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 5 ผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ย่อยด้วยปริมาณเอนไซม์ 5, 10 และ 15 หน่วย (รูปที่ 5, ช่องที่ 3, 4 และ 5) จะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ปริมาณ 10 หน่วย โดยจะให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ต่ำกว่า 23.1 กิโลเบสถึงต่ำกว่า 2 กิโลเบส ดังนั้นในการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของผึ้งโพรง จึงเลือกใช้ปริมาณ 10 หน่วยต่อดีเอ็นเอผึ้งโพรง 1 ไมโครกรัม ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI จะนำไปใช้ในการโคลนโดยเชื่อมกันกับ



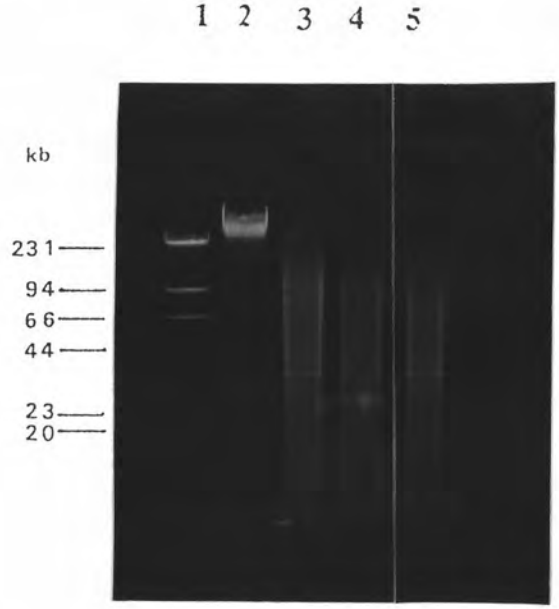
รูปที่ 4 ผลการสกัดดีเอ็นเอของผึ้งโพรง

หลังสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอและดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) แล้วนำมาปริมาณ 1 ไมโครลิตร จากสารละลายดีเอ็นเอผึ้งทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ทั้ง 2 วิธี ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์, นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2-5 ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงสกัดด้วยวิธีการสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

ช่องที่ 6-9 ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงสกัดด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์



รูปที่ 5 ผลการหาปริมาณ *Eco*RI ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรง

ย่อยดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ด้วย *Eco*RI 5, 10 และ 15 หน่วย บ่มที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ไม่ถูกย่อย

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอผึ้งโพรงย่อยด้วย *Eco*RI 5 หน่วย

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอผึ้งโพรงย่อยด้วย *Eco*RI 10 หน่วย

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอผึ้งโพรงย่อยด้วย *Eco*RI 15 หน่วย

I16844579

ดีเอ็นเอพาหะที่ตัดด้วย *Eco*RI ต่อไป

เนื่องจากการโคลนชุดแรกดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมขึ้น ไม่สามารถให้ความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรงในประเทศไทยได้ จึงได้ทำการโคลนชุดที่สองขึ้นโดยใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากตัวอย่างผึ้งโพรงเกาะสมุย ส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ในการโคลนชุดแรกคือ โครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงภาคกลางซึ่งเลี้ยงอยู่ในหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง (Bee Biology Research Unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

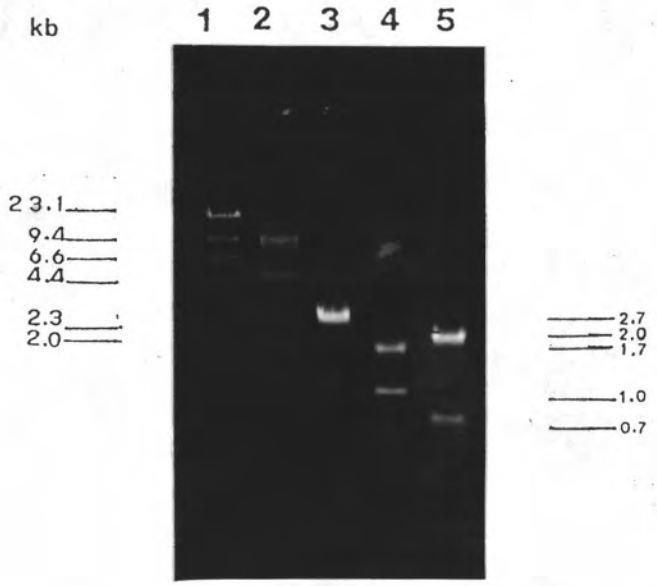
3.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้คือ พลาสมิด pUC18 ซึ่งหลังจากสกัดโดยวิธี rapid alkaline extraction (ข้อ 2.10.2) และวิเคราะห์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทร-โฟรีซิส (รูปที่ 7, ช่องที่ 2) พบว่าได้ดีเอ็นเอคมชัด 2 แถบ ซึ่งพลาสมิดที่เตรียมได้นี้ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็น pUC18 จริงโดยนำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์แต่ละชนิดคือ *Eco*RI, *Sca*I *Nde*I และ *Pvu*II ซึ่งผลการตัดพบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอตรงกับที่แสดงไว้ ในแผนที่เรสทริกชันของ pUC18 (ภาคผนวกที่ 2) ผลการตัดพบว่าเมื่อตัดด้วย *Eco*RI จะได้แถบดีเอ็นเอ 1 ชิ้น มีขนาด 2.7 กิโลเบส, เมื่อตัดด้วย *Eco*RI และ *Sca*I ได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น มีขนาด 1 และ 1.7 กิโลเบส และ เมื่อตัดด้วย *Sca*I และ *Nde*I ได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น มีขนาด 0.7 และ 2 กิโลเบส (รูปที่ 6)

จากนั้นได้ศึกษาหาปริมาณของ *Eco*RI ที่เหมาะสม ที่สามารถย่อยพลาสมิด pUC18 1 ไมโครกรัมได้สมบูรณ์ในเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 °ซ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ *Eco*RI 5, 10 และ 15 หน่วย (รูปที่ 7, ช่องที่ 3, 4 และ 5) ให้ผลการย่อยเหมือนกันทั้งหมด โดยจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเดียวที่ 2.7 กิโลเบส ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณของเอนไซม์ 5 หน่วยต่อพลาสมิด pUC18 1 ไมโครกรัม เตรียมให้เป็นชิ้นดีเอ็นเอพาหะเพื่อใช้ในการโคลนต่อไป

3.3 ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอจากผึ้งโพรงและพลาสมิด pUC18 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI อย่างสมบูรณ์มา



รูปที่ 6 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิด pUC18 ตามแผนที่เรสทริกชัน

ย่อยพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ด้วย *Eco*RI, *Sca*I, *Nde*I และ *Pvu*II ที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการย่อยโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นานประมาณ 2 ชั่วโมง

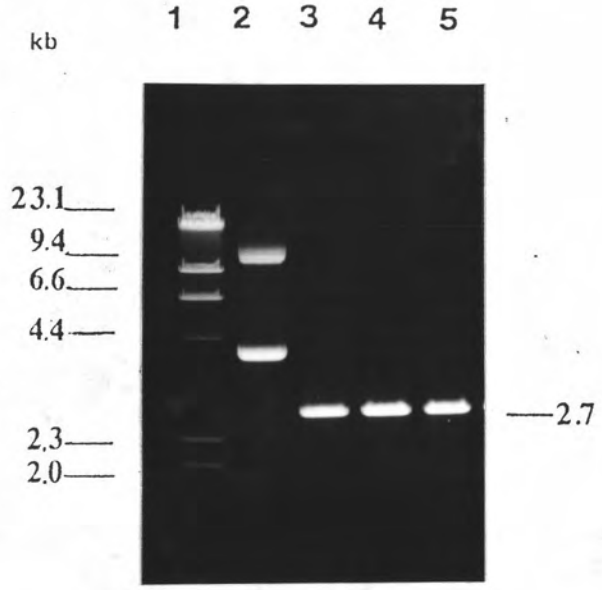
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUc18

ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 4 " ———— " *Eco*RI และ *Sca*I

ช่องที่ 5 " ———— " *Sca*I และ *Nde*I



รูปที่ 7 ผลการหาปริมาณ *Eco*RI ที่เหมาะสมในการย่อยพลาสมิด pUC18

ย่อย pUC18 1 ไมโครกรัม ด้วย *Eco*RI 5, 10 และ 15 หน่วย บ่มที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ที่ไม่ถูกย่อย

ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI 5 หน่วย

ช่องที่ 4 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI 10 หน่วย

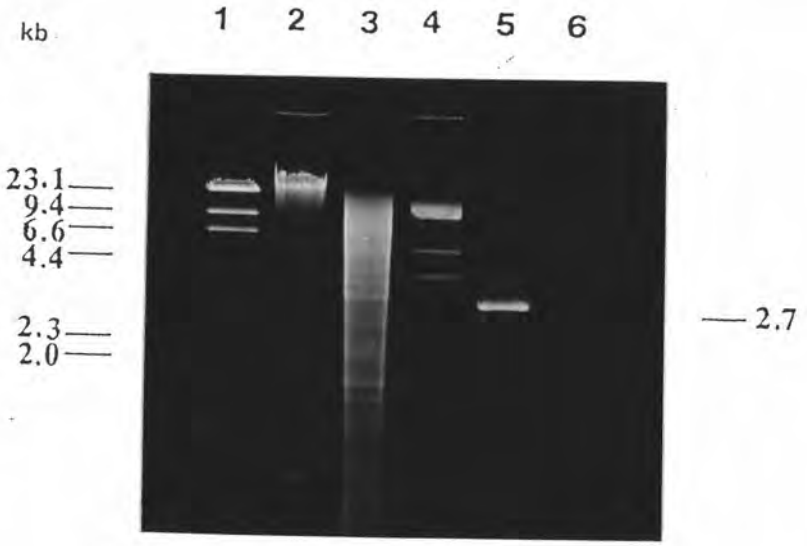
ช่องที่ 5 พลาสมิด pUC18 ย่อยด้วย *Eco*RI 15 หน่วย

เชื่อมต่อกันแบบสุ่ม (ข้อ 2.10.5) ใน Ligation mixture 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 15 °ซ นาน 15 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ว่าดีเอ็นเอถูกเชื่อมต่อหรือไม่ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ของ Ligation mixture 10 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากผึ้งโพรงและพลาสมิด pUC18 ที่ไม่ถูกย่อยและถูกย่อยด้วย *Eco*RI ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 8 จะเห็นว่าดีเอ็นเอใน Ligation mixture จะมีขนาด 2.7 กิโลเบส ขึ้นไปแสดงถึงมีการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่ตัดด้วย *Eco*RI กับดีเอ็นเอของผึ้งโพรงเกิดขึ้นจริง จึงนำส่วน Ligation mixture ที่เหลือทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนต่อไป

3.4 การทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสม

ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมขึ้น เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีในข้อ 2.10.6 ผลเปรียบเทียบการทรานสฟอร์มพบว่า เมื่อเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ (ข้อ 2.10.6.1.ก.) และการใช้รูบิเดียมคลอไรด์ (ข้อ 2.10.6.1.ข.) จะได้ค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเท่ากับ 0.64-2.4 $x10^5$ โคโลนีต่อไมโครกรัม และ 0.85-2.5 $x10^4$ โคโลนีต่อไมโครกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 5) จากผลดังกล่าวจึงเลือกใช้คอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ หลังทำการทรานสฟอร์ม (ข้อ 2.10.6.2) เสร็จสิ้นแล้วจึงคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ด้วยอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-gal และ IPTG (ข้อ 2.10.7) ผลการทดลองพบว่า ได้โคโลนีสีขาวจำนวน 1014 โคโลนี และ โคโลนีสีฟ้าจำนวน 7644 โคโลนี ซึ่งเมื่อคำนวณค่าประสิทธิภาพ ของการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมของผึ้งโพรงมีค่าเท่ากับ 13.27 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับจำนวนของทรานสฟอร์แมนท์ทั้งหมด

จากนั้นได้ศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ของทรานสฟอร์แมนท์ซึ่งทำโดยสุ่มเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ทั้งหมดมาจำนวน 50 โคลน นำมาเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิด แล้วย่อยด้วย *Eco*RI จากนั้นวิเคราะห์ขนาดโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาคผนวกที่ 7) ผลการทดลองพบว่า ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert มีขนาดต่างๆ กัน โดยพบที่ขนาด 1-2 กิโลเบส 20 เปอร์เซ็นต์, ขนาด 2-3 กิโลเบส 28 เปอร์เซ็นต์, ขนาด 3-4 กิโลเบส 24 เปอร์เซ็นต์, ขนาด 4-5 กิโลเบส 16 เปอร์เซ็นต์ และ ขนาด 5-6 กิโลเบส 4 เปอร์เซ็นต์ แสดงกราฟดัง



รูปที่ 8 ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของผึ้งโพรงและพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI

ผสมชิ้นดีเอ็นเอของผึ้งโพรงและpUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI ในอัตราส่วน 5:1, ปริมาณ T_4 DNA ligase 5 หน่วย, บ่มที่ 15 °ซ นาน15 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเชื่อมด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 โครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง

ช่องที่ 3 ชิ้นดีเอ็นเอจากการย่อยโครโมโซมัลดีเอ็นเอผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 4 พลาสมิด pUC18

ช่องที่ 5 พลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของผึ้งโพรงและ พลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วย *Eco*RI

ตารางที่ 5 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากการเตรียมให้เป็นคอมพีเทนต์เซลล์ด้วยการใช้แคลเซียมคลอไรด์ และการใช้รูบิเดียมคลอไรด์ โดยใช้พลาสมิด pBR322 ปริมาณ 1, 5, 20 และ 100 นาโนกรัมเป็นดีเอ็นเอทดสอบ ทรานสฟอร์มคอมพีเทนต์เซลล์ที่เตรียม จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:10 แล้วจึงบันทึกผลจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

	pBR322 (นาโนกรัม)	จำนวนทรานสฟอร์แมนท์ที่เจือจาง1:10 (โคโลนี)	ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์ม (จำนวนทรานสฟอร์แมนท์ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ)
วิธีการใช้แคลเซียม-คลอไรด์	1	24	2.40×10^5
	5	63	1.26×10^5
	20	189	0.95×10^5
	100	640	0.64×10^5
วิธีการใช้รูบิเดียม-คลอไรด์	1	2	2.00×10^4
	5	12	2.46×10^4
	20	43	2.20×10^4
	100	85	0.85×10^4

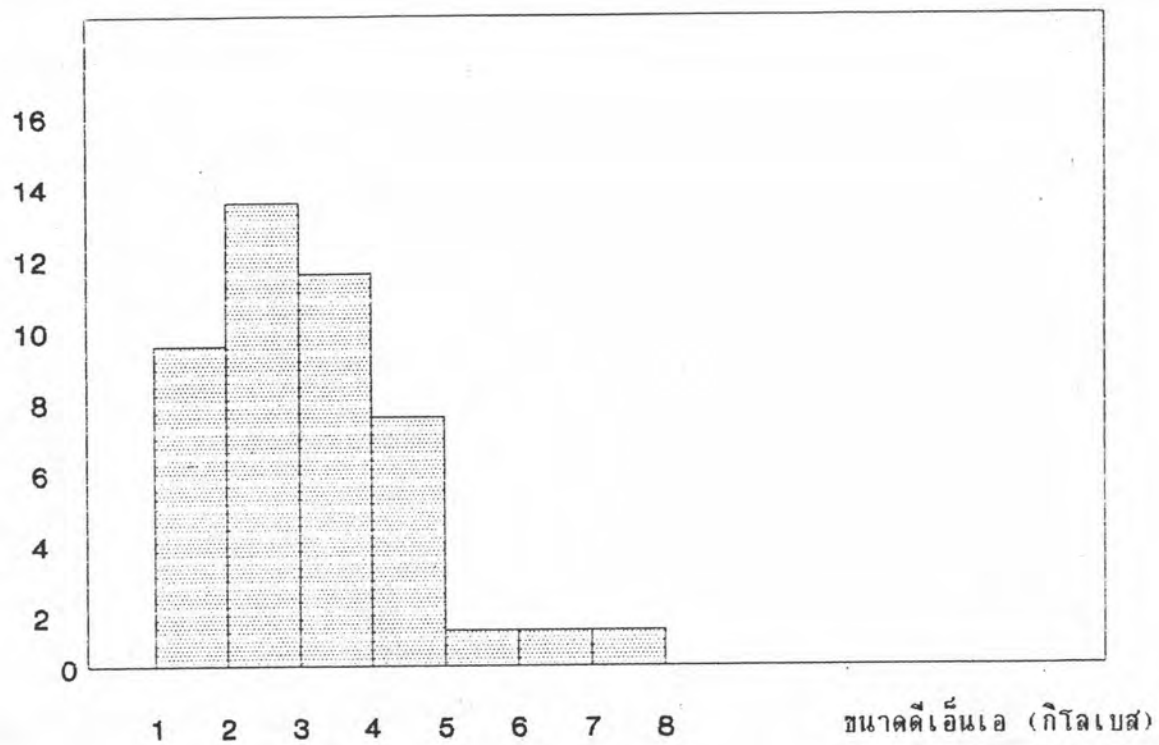
รูปที่ 9

3.5 การคัดดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive DNA โดย dot-blot hybridization

ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากการโคลนทั้ง 2 ชุด (ชุดที่หนึ่งเป็นการโคลนโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากภาคกลาง และ ชุดที่สองเป็นการโคลนดีเอ็นเอทั้งหมดจากเกาะสมุย) นำมาสุ่มเลือกจำนวนชุดละ 50 โคลน รวมทั้งหมด 100 โคลน นำมาตรวจสอบหาโคลนที่มีส่วน repetitive sequences โดยการทำ dot-blot hybridization (ข้อ 2.11.2) ระหว่างพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจาก 100 โคลนๆ ละ 1 ไมโครกรัม ที่ตรึงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนกับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากดีเอ็นเอของผึ้งโพรง (ชุดที่หนึ่งใช้โครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงภาคกลางและ ชุดที่สองใช้ดีเอ็นเอทั้งหมดของผึ้งโพรงจากเกาะสมุย) โดยใช้ดีเอ็นเอชนิดต่างๆ (พลาสมิด pUC18, พลาสมิด pBR322, พลาสมิด pACYC184, ดีเอ็นเอของ calf thymus และดีเอ็นเอของแลมบ์ดา) เป็นดีเอ็นเอควบคุม ผลการทดลองพบว่าในการโคลนโครโมโซมัลดีเอ็นเอของภาคกลางโคลนที่ให้สัญญาณการไฮบริดเข้มคือ โคลน #9, #16, #21, #25, #35, #43 และ #49, โคลนที่ให้สัญญาณปานกลางคือ โคลน #11, #19 และ #36 ส่วนโคลนอื่นๆ จะให้สัญญาณที่ค่อนข้างอ่อน (รูปที่ 10ก) สำหรับการโคลนดีเอ็นเอทั้งหมดจากเกาะสมุย พบว่าโคลนที่ให้สัญญาณการไฮบริดเข้มคือ โคลน #60, #72, #77, #80 และ #99, โคลนที่ให้สัญญาณปานกลางคือโคลน #53, #56, #62, #68, #69, #71, #79, #87, #91, #92 และ #98, ส่วนโคลนอื่นๆ ที่เหลือจะให้สัญญาณที่ค่อนข้างอ่อน (รูปที่ 10ข) และผลการไฮบริดกับดีเอ็นเอควบคุมพบว่าไม่มีการไฮบริดเกิดขึ้นในดีเอ็นเอที่ใช้ทดสอบทุกชนิด

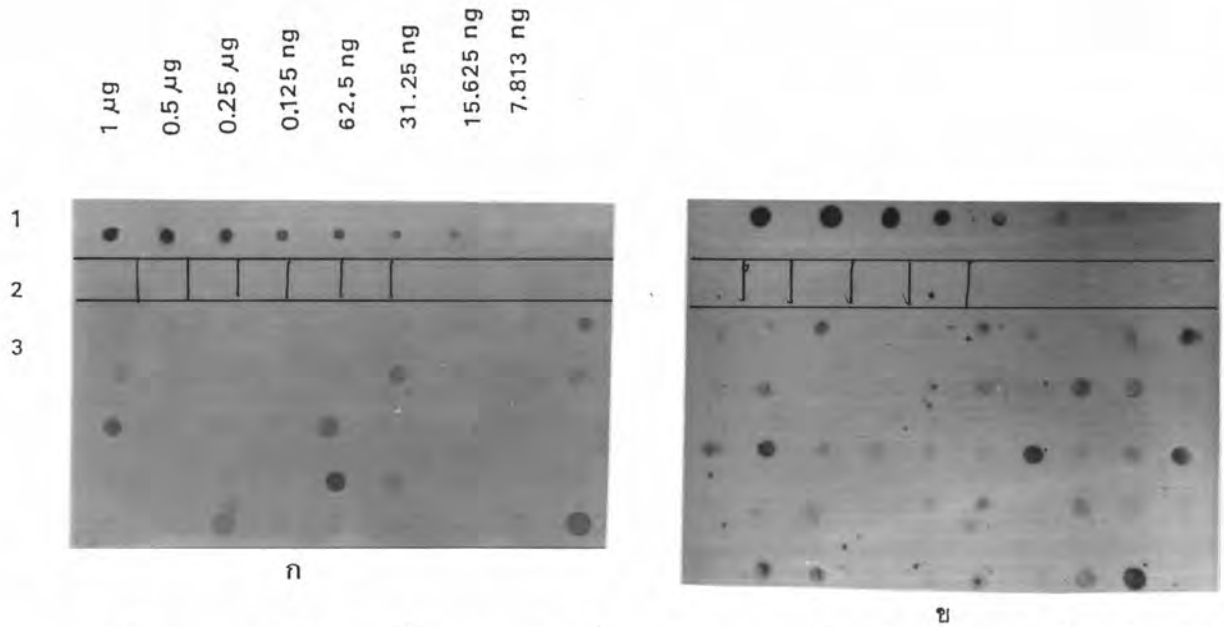
จากผลที่กล่าวมาจึงคัดเลือกโคลนที่ให้สัญญาณการไฮบริดเข้ม มาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตามรวมทั้งบางโคลนที่ให้สัญญาณการไฮบริดปานกลางด้วย โดยคัดเลือกโคลน #9, #25, #35 #36, #49, #53, #72, #77, #80 และ #99 ทดสอบเพื่อหาดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะสมต่อไป

3.6 การคัดพลาสมิดลูกผสมที่มี repetitive sequences ที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม สำหรับ RFLP analysis



รูปที่ 9 การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ของดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 50 โคลนจากการโคลนโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากภาคกลาง

ย่อยดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้จำนวน 50 โคลน ด้วย *Eco*RI บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการย่อยด้วย ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกด้วยการถ่ายภาพแล้ว นำมาวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่ได้



รูปที่ 10 ผลการวิเคราะห์หา repetitive sequences โดย Dot blot hybridization

ตริงดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้จากโคลนต่างๆ ในปริมาณ 1 ไมโครกรัม ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน จากนั้นไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ใช้ในการโคลน ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี วิเคราะห์ความเข้มของสัญญาณการเกิดไฮบริดที่ได้ ก) เป็นการโคลนโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงภาคกลาง ข) เป็นการโคลนดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) จากผึ้งโพรงเกาะสมุย

ส่วนที่ 1 ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ใช้ในการโคลนปริมาณ 1,0.5, 0.25,0.125 ไมโครกรัม 62.5 และ 31.25 นาโนกรัม ตามลำดับ

ส่วนที่ 2 ดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ ปริมาณชนิดละ 1 ไมโครกรัม ได้แก่ พลาสมิด pUC18, พลาสมิด pBR322, พลาสมิด pACYC184, ดีเอ็นเอจาก calf thymus และ ดีเอ็นเอจากแลมบ์ดา

ส่วนที่ 3 ดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดจากแต่ละโคลนจำนวนชุดละ 50 โคลน ปริมาณ 1 ไมโครกรัม

ได้คัดเลือกดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะสมจากโคลนต่างๆ ที่มี repetitive sequences ที่เลือกได้จากข้อ 3.5 โดยการนำโคลนเหล่านี้มาทดสอบใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม ไฮบริไดซ์กับ blot บนแผ่นไนลอนเมมเบรน ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้งโพรง (total DNA) จากพื้นที่ต่างๆ (ภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคกลาง, ภาคใต้ และ เกาะสมุย) พื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง ปริมาณ 3.5 ไมโครกรัม ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI, *Hae*I, *Bgl*II, *Alu*I, *Xba*I หรือ *Hind*III และทำการวิเคราะห์ผลการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้นตามวิธีในข้อ 2.11.6

ซึ่งในขั้นตอนแรกได้นำแผ่นไนลอนเมมเบรน ที่มีดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ อย่างสมบูรณ์ด้วย *Eco*RI และ *Hae*III ตรึงอยู่ (ได้ตรวจสอบผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ก่อนการทำ Southern bolt แล้วว่ามีการย่อยอย่างสมบูรณ์ตัวอย่างแสดงดังภาคผนวกที่ 8) ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามจากพลาสมิดลูกผสมโคลน #9, #25, #35, #36 และ #49 ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี DIG-11-dUTP ตามวิธีในข้อ 2.11.1 ผลการทดลองพบว่าการใช้ดีเอ็นเอติดตามจากโคลน #9 ให้ผลการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 1.8 และ 1.85 กิโลเบส เหมือนกันในตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจาก 5 พื้นที่ (รูปที่ 11ก), เมื่อใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน #25 เป็นดีเอ็นเอติดตาม จะไฮบริไดซ์เฉพาะเมื่อย่อยดีเอ็นเอผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI เท่านั้น โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 3.0 กิโลเบสเหมือนกันทุกพื้นที่ (รูปที่ 11ข) เมื่อใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน #35 เป็นดีเอ็นเอติดตามไม่พบสัญญาณการไฮบริดเกิดขึ้น, ส่วนการใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน #36 เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบการไฮบริไดซ์ทั้งการย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI และ *Hae*III โดยในการย่อยด้วย *Eco*RI พบแถบดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์ที่ขนาด 5.4 กิโลเบส ส่วนการย่อยด้วย *Hae*III พบที่ขนาด 3.5 กิโลเบส ซึ่งพบเหมือนกันในทุกพื้นที่ (รูปที่ 11ค) และ เมื่อใช้ดีเอ็นเอติดตามจากโคลน #49 เป็นดีเอ็นเอติดตามจะพบการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 4.0 กิโลเบส เหมือนกันในทุกพื้นที่เมื่อย่อยดีเอ็นเอผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI แต่ถ้าย่อยด้วย *Hae*III จะพบการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 2.8 กิโลเบส เฉพาะในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางเท่านั้น (รูปที่ 11ง)

ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่า ยังไม่สามารถให้ความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรง

รูปที่ 11 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III และดีเอ็นเอติดตามจากการโคลนชุดที่ 1

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ที่คัดได้จากการโคลนโครโมโซมัลดีเอ็นเอผึ้งโพรงภาคกลาง ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีแล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III อย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ผลการเกิดไฮบริดที่ได้ โดยดีเอ็นเอลูกผสมที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ดีเอ็นเอลูกผสมโคลน #9 (ก), #25 (ข), #36 (ค) และ #49 (ง)

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_5) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_7) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_1) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอจากภาคใต้ (S_1) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย (I_1) ย่อยด้วย *Eco*RI

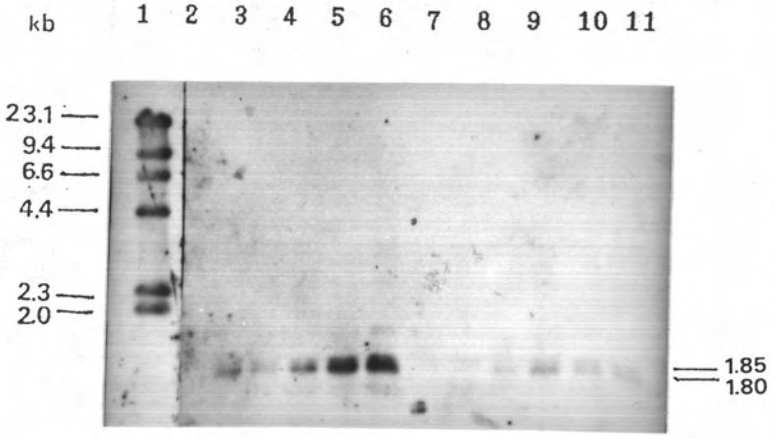
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_9) ย่อยด้วย *Hae*III

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_8) ย่อยด้วย *Hae*III

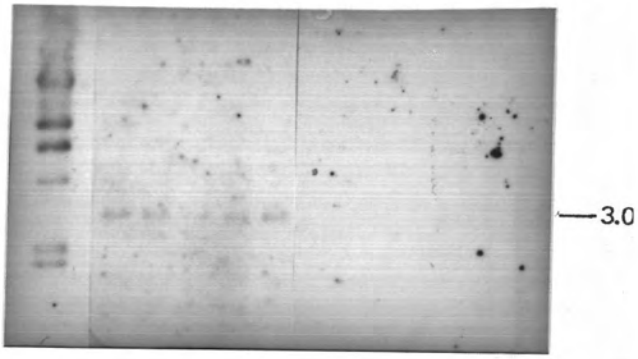
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_2) ย่อยด้วย *Hae*III

ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอจากภาคใต้ (S_2) ย่อยด้วย *Hae*III

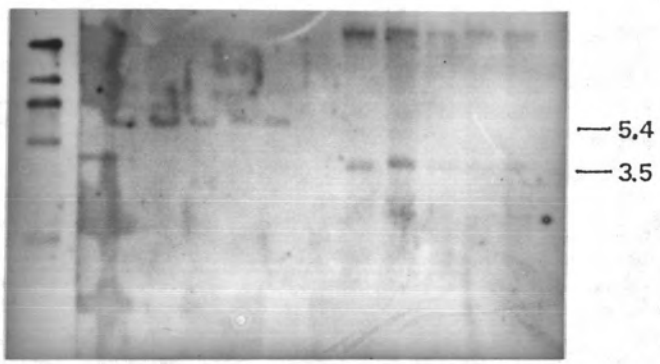
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย (I_2) ย่อยด้วย *Hae*III



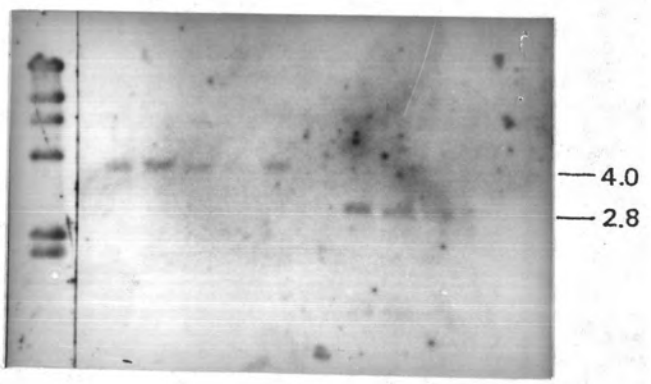
ก.



ข.



ค.



ง.

อย่างชัดเจน จึงได้ทดลองใช้ *Bgl*II ในการย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรง และทดลองไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมขึ้นจากพลาสมิดลูกผสมทั้ง 5 โคลนคือ โคลน #9, #25, #35, #36 และ #49 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 ซึ่งพบว่าไม่ให้ความแตกต่างของตัวอย่างผึ้งโพรงในแต่ละพื้นที่เช่นกัน หลังจากนั้นได้ทดลองใช้เรสทริกชันเอนไซม์ชนิดอื่นได้แก่ *Alu*I, *Xba*I หรือ *Hind*III ย่อยดีเอ็นเอของผึ้งจากพื้นที่ต่างๆ จากผลการทดลองพบว่าไม่ให้ผลความแตกต่างของผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ได้ดังเดิม

จากเหตุที่วิเคราะห์ RFLP ด้วยการใช้พลาสมิดลูกผสมที่มี repetitive sequences จากโคลน #9, #25, #35, #36 และ #49 ซึ่งเป็นการโคลนในชุดที่หนึ่ง ไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI, *Hae*III, *Bgl*II, *Alu*I, *Xba*I และ *Hind*III แล้วพบว่ายังไม่เห็นความแตกต่างจาก RFLP ของตัวอย่างผึ้งจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย จึงได้ทำการโคลนชุดที่สองขึ้น จากดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้งโพรง (total DNA) จากเกาะสมุย และคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ด้วยวิธีเดียวกัน (ข้อ 2.11.2) จากผลการทดลองโคลนที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์เข้ม ที่เลือกนำมาทดสอบใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามคือโคลน #53, #72, #77, #80 และ#99 ซึ่งผลการทดสอบดีเอ็นเอติดตามพบว่าการไฮบริไดซ์ด้วยโคลน #53, #72, #77 และ #80 ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ค่อนข้างอ่อน โดยโคลน #53 พบสัญญาณการไฮบริไดซ์ จากการย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Hae*III เท่านั้น ที่ดีเอ็นเอขนาด 2.8, 4.0, 6.0 และ 11.0 กิโลเบส ในทุกพื้นที่ (รูปที่ 13ก)

เมื่อใช้โคลน #72 เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI จะพบการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 5.8 กิโลเบส ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่เก็บจากทุกพื้นที่ ส่วนเมื่อใช้ *Hae*III ย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรง จะพบการไฮบริไดซ์ของดีเอ็นเอที่ขนาด 2.05 และ 2.4 กิโลเบส ทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างเช่นกัน (รูปที่ 13ข)

เมื่อใช้โคลน #77 เป็นดีเอ็นเอติดตาม จะพบการไฮบริไดซ์เมื่อย่อยดีเอ็นเอผึ้งโพรงด้วย *Hae*III เท่านั้น โดยดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์มีขนาด 2.55 กิโลเบส ในตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากทุกพื้นที่ (รูปที่ 13ค)

ส่วนโคลน #80 เมื่อใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม พบว่าจากการย่อยดีเอ็นเอผึ้งโพรงด้วย

รูปที่ 12 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Bgl*II และดีเอ็นเอลูกผสมจากการโคลนชุดที่ 1

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ที่คัดได้จากการโคลนโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงภาคกลางที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี ไฮบริไดซ์กับ blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรงปริมาณ 3.5 ไมโครกรัม จากพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วย *Bgl*II อย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ผลการเกิดไฮบริดที่ได้ โดยดีเอ็นเอลูกผสมที่นำมาไฮบริไดซ์คือดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #9 (ก), #25 (ข), #35 (ค), #36 (ง) และ #49 (จ)

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_8)

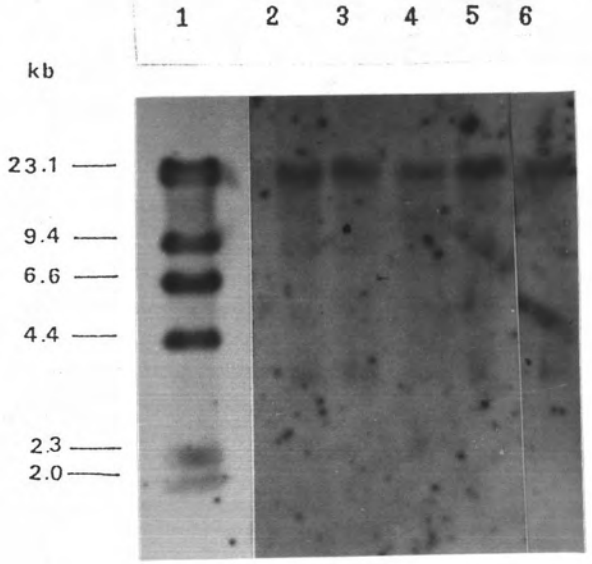
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_{12})

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_9)

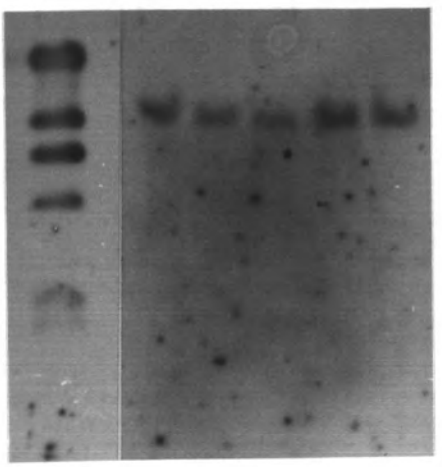
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอจากภาคใต้ (S_9)

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย (I_{11})

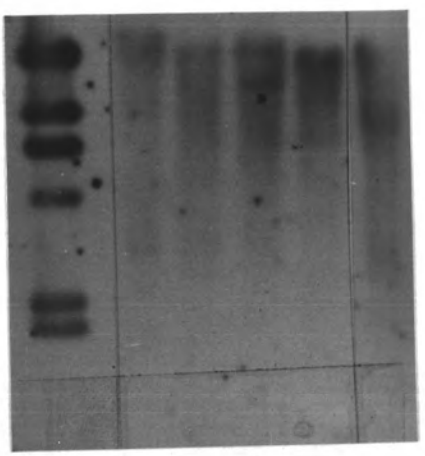
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



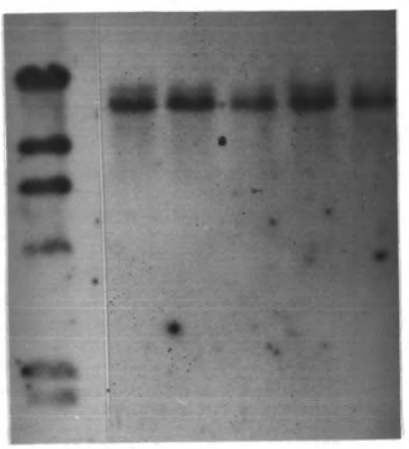
ก.



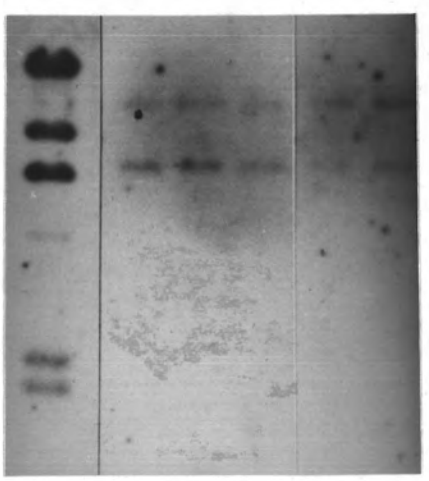
ข.



ค.



ง.



จ.

รูปที่ 13 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากการโคลนชุดที่ 2

นำดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ที่คัดได้จากการโคลนดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้ง (total DNA) จากเกาะสมุย ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ blotของดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III อย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ผลการเกิดไฮบริดที่ได้ โดยดีเอ็นเอลูกผสมที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #53 (ก), #72 (ข), #77 (ค), #80 (ง) และ #99 (จ)

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_5) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_1) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_1) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอจากภาคใต้ (S_7) ย่อยด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย (I_1) ย่อยด้วย *Eco*RI

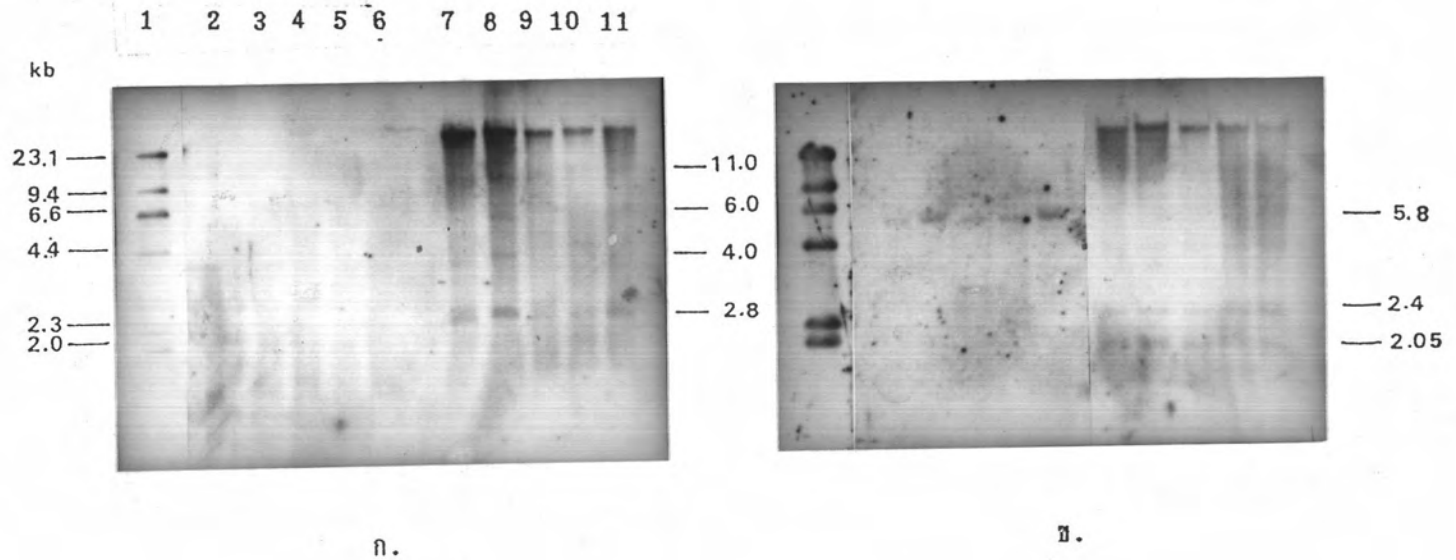
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_6) ย่อยด้วย *Hae*III

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_{12}) ย่อยด้วย *Hae*III

ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_2) ย่อยด้วย *Hae*III

ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอจากภาคใต้ (S_6) ย่อยด้วย *Hae*III

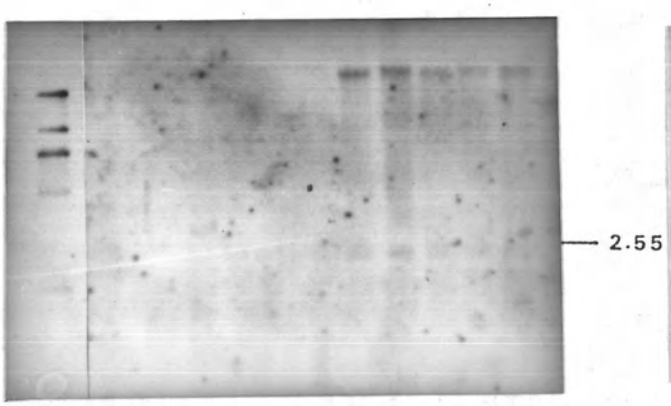
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย (I_2) ย่อยด้วย *Hae*III


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
kb
23.1
9.4
6.6
4.4
2.3
2.0
11.0
6.0
4.0
2.8

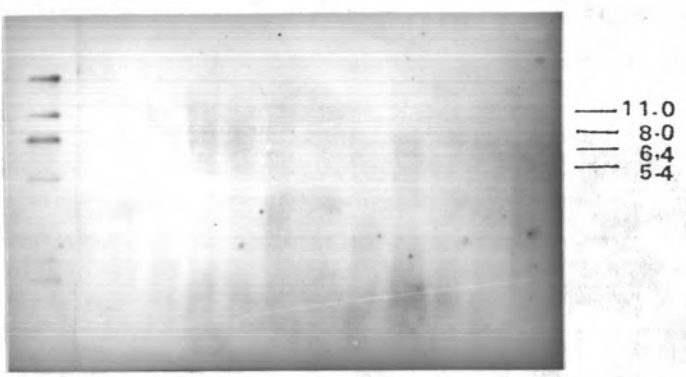
ก.

5.8
2.4
2.05

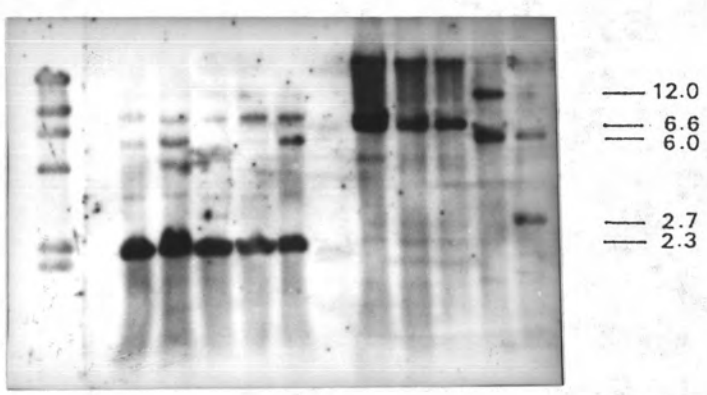
ข.


2.55

ค.


11.0
8.0
6.4
5.4

ง.


12.0
6.6
6.0
2.7
2.3

จ.

*Eco*RI จะพบแถบดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์ที่ขนาด 8.0 และ 10.0 กิโลเบส ในตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากทุกพื้นที่ และเมื่อย่อยด้วย *Hae*III พบการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 5.4 และ 6.4 กิโลเบส จากตัวอย่างผึ้งโพรงทุกพื้นที่เช่นกัน (รูปที่ 13ง)

สำหรับการใช้โคลน #99 พบว่าสัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ได้ ค่อนข้างเข้มและชัดเจน (รูปที่ 13จ) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการไฮบริไดซ์มี 2 ลักษณะ คือเป็นแถบดีเอ็นเอหลัก (major band) ที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์เข้ม และแถบดีเอ็นเอย่อย (minor band) ที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์อ่อนกว่า ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอที่ตรวจพบสรุปดังตารางที่ 6 นอกจากนั้นพบว่าเมื่อย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI ดีเอ็นเอแถบหลักจะพบเหมือนกันในทุกพื้นที่ แต่เมื่อนำดีเอ็นเอแถบย่อยมาวิเคราะห์ร่วมด้วย จะพบความแตกต่างในทุกพื้นที่ยกเว้น ภาคใต้และเกาะสมุยที่ให้ผลเหมือนกัน ส่วนการใช้ *Hae*III จะพบความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรงอย่างชัดเจน ด้วยการวิเคราะห์จากดีเอ็นเอแถบหลัก โดยแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือกลุ่มแรกเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง, กลุ่มที่สองเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงจากภาคใต้และกลุ่มที่สามเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงเกาะสมุย และเมื่อรวมดีเอ็นเอแถบย่อยในการวิเคราะห์ด้วยจะพบว่า สามารถแยกภาคเหนือออกจากกลุ่มแรกเพิ่มขึ้นด้วย

จากผลการทดสอบพลาสมิดลูกผสมที่นำมาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตามทั้ง 10 โคลนพบว่าพลาสมิดจากโคลน #99 จะให้ผลในการจำแนกผึ้งบางพื้นที่ออกจากกันอย่างค่อนข้างชัดเจน จึงได้เลือกพลาสมิดลูกผสมจากโคลน #99 นี้เป็นดีเอ็นเอติดตาม และเพื่อยืนยันผลว่าจะเป็นดีเอ็นเอติดตามที่จำแนกสายพันธุ์ได้หรือไม่ จึงได้ใช้ตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ เพิ่มขึ้น โดยใช้ตัวอย่างจากแต่ละพื้นที่จำนวน 10 รัง เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่พบมีทั้งแถบดีเอ็นเอหลัก และแถบดีเอ็นเอย่อย ซึ่งผลของแถบดีเอ็นเอย่อยจะให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ค่อนข้างอ่อน ดังนั้นในการเลือกชนิดเรสทริกชันเอนไซม์จึงเลือกใช้ *Hae*III เนื่องจากให้ผลการวิเคราะห์ที่สามารถจำแนกกลุ่มผึ้งโพรงบางพื้นที่ออกจากกันอย่างชัดเจนในแถบดีเอ็นเอหลัก

3.7 <u>การวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรงด้วยดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมได้</u>

เมื่อคัดเลือกได้ดีเอ็นเอติดตามและเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ในขั้นแรกได้ศึกษา

ตารางที่ 6 แสดงขนาดดีเอ็นเอที่ตรวจพบ จากการไฮบริไดซ์ของดีเอ็นเอจากผึ้งโพรงพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hae*III กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากดีเอ็นเอลูกผสมโดลน #99

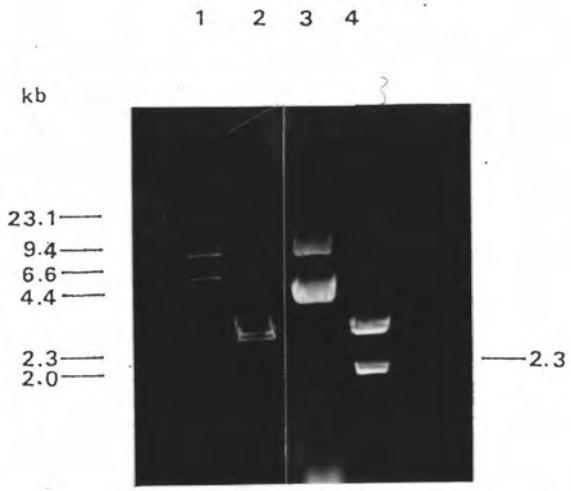
พื้นที่	ย่อยด้วย *Eco*RI		ย่อยด้วย *Hae*III	
	แถบดีเอ็นเอหลัก (กิโลเบส)	แถบดีเอ็นเอย่อย (กิโลเบส)	แถบดีเอ็นเอหลัก (กิโลเบส)	แถบดีเอ็นเอย่อย (กิโลเบส)
N	2.3	2.8, 3.3, 5.6 8.2, 12.0	6.6	2.3, 2.6, 4.6
NE	2.3	3.3, 4.5, 5.6 8.2, 12.0	6.6	2.1, 2.3, 2.6, 4.2, 4.5
C	2.3	2.8, 3.3, 8.2 12.0	6.6	2.1, 2.3, 2.6 4.2, 4.5
S	2.3	3.3, 5.6, 8.2 12.0	6.0, 12.0	2.0, 2.3, 3.0, 3.8
I	2.3	3.3, 5.6, 8.2 12.0	2.7, 6.0	2.05, 2.15, 2.3

ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert โดยย่อยด้วย *Eco*RI วิเคราะห์ผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 14 พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาด 2.3 กิโลเบส จากนั้นจึงศึกษาว่าดักแด้ผึ้งโพรงจากรังเดียวกันจะให้ผลการไฮบริไดซ์เหมือนกันหรือไม่ ซึ่งทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจำนวน 10 ตัวอย่างจากรังเดียวกัน ย่อยด้วย *Hae*III และไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอติดตามจากโคลน #99 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 15 พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากรังเดียวกันจะให้รูปแบบของการไฮบริไดซ์เหมือนกัน ดังนั้นจึงใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจำนวน 1 ตัวอย่าง เป็นตัวแทนของดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจาก 1 รังในการทดสอบต่อไป

และได้ทดสอบผลการไฮบริไดซ์ว่าคงที่หรือไม่ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผึ้งตัวเดียวกันนำมาทำ Southern blot สองชุด ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ประมาณ 1.5-2.0 ไมโครกรัมต่อช่อง จากนั้นนำ blot แต่ละชุดมาทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามจากโคลน #99 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16 พบว่าจะให้ผลการไฮบริไดซ์เหมือนกันทุกประการ แต่สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ได้ค่อนข้างอ่อนจึงได้เลือกใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่ 3.5 ไมโครกรัมในการวิเคราะห์ต่อไป

ซึ่งเมื่อนำดีเอ็นเอติดตามจากโคลน #99 นี้ มาทดสอบหาการแปรผันของผึ้งโพรงจากต่างรังกันจำนวน 10 รัง ในแต่ละพื้นที่ โดยย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Hae*III ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17 พบว่าจะได้รูปแบบของการไฮบริไดซ์ทั้งหมด 6 แบบด้วยกันดังสรุปไว้ในตารางที่ 7 โดยตัวอย่างดีเอ็นเอของภาคเหนือ จะแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มแรกพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 1 (ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 6.6 กิโลเบส) จำนวน 7 รัง ซึ่งเป็นตัวอย่างของผึ้งโพรงจากจังหวัดตาก, เชียงใหม่, อุตรดิตถ์ และ แพร่, กลุ่มที่สองพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 2 (ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 1.9 และ 5.2 กิโลเบส) จำนวน 2 รัง เป็นตัวอย่างของผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดแพร่ทั้ง 2 รัง และกลุ่มที่สามพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 6 (ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 7.0 กิโลเบส) จำนวน 1 รัง เป็นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดลำพูน (รูปที่ 17ก)

ตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 1 จำนวน 8 รัง ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดนครราชสีมา, กาฬสินธุ์, ร้อยเอ็ด, ขอนแก่น, อุบลราชธานี, สุรินทร์ และสกลนคร,



รูปที่ 14 ผลการศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ในดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99

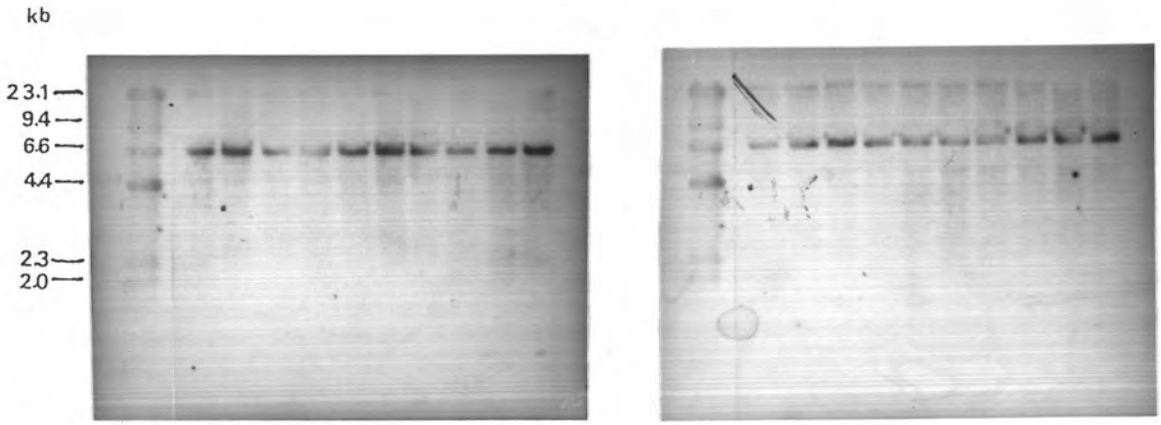
ย่อยดีเอ็นเอลูกผสมด้วย *Eco*RI ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC18 ตัดด้วย *Eco*RI

ช่องที่ 3 พลาสมิดลูกผสมจากโคลน #99

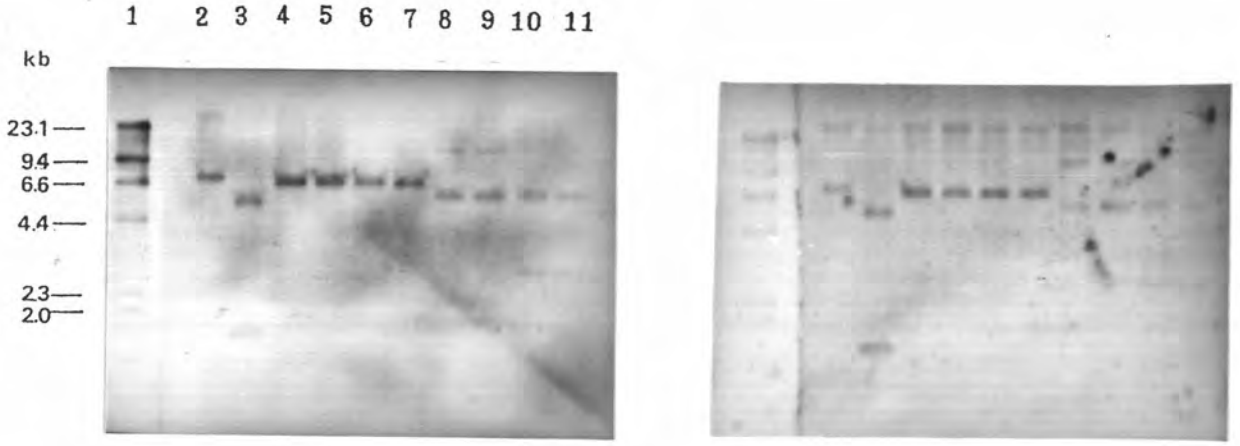
ช่องที่ 4 พลาสมิดลูกผสมจากโคลน #99 ตัดด้วย *Eco*RI



ก. ข.

<u>รูปที่ 15</u> Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงรังเดียวกันที่ย่อยด้วย *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99

ภายหลังการตรึงดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Southern blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรง ปริมาณ 3.5 ไมโครกรัม ที่ย่อยด้วย *Hae*III อย่างสมบูรณ์ บนแผ่นเมมเบรนแล้ว นำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลการเกิดไฮบริดที่ได้ ดีเอ็นเอที่นำมาทดสอบคือ ก) ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_7) และ ข) ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_1)



ก. ข.

รูปที่ 16 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากตัวเดียวกันที่ย่อยด้วย *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99

ภายหลังจากตรึงดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Southern blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ปริมาณ 1.5-2 ไมโครกรัม ที่ย่อยด้วย *Hae*III อย่างสมบูรณ์บนแผ่นเมมเบรนแล้ว นำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลการเกิดไฮบริดที่ได้ โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ชุด จากผึ้งตัวเดียวกัน (รูป ก และ ข)

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2, 3 ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ (N_5, N_{10})

ช่องที่ 4, 5 ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_7, NE_{12})

ช่องที่ 6, 7 ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_1, C_2)

ช่องที่ 8, 9 ดีเอ็นเอจากภาคใต้ (S_1, S_5)

ช่องที่ 10,11 ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย (I_1, I_2)

รูปที่ 17 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงต่างรังกันในแต่ละพื้นที่ ที่ย่อยด้วย *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99

ภายหลังการตรึงดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Southern blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ปริมาณ 3.5 ไมโครกรัม ที่ย่อยด้วย *Hae*III อย่างสมบูรณ์ บนแผ่นเมมเบรนแล้ว นำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลการเกิดไฮบริดที่ได้ (ดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ในแต่ละพื้นที่ใช้จำนวน 10 รัง)

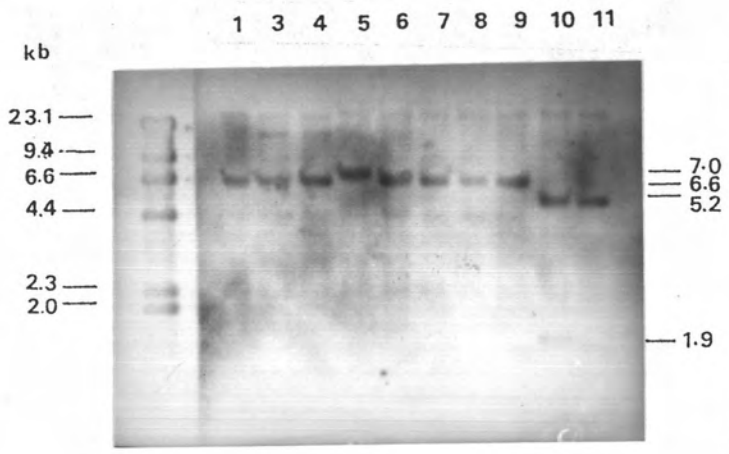
ก) ดีเอ็นเอจากภาคเหนือ ($N_{1,3-11}$)

ข) ดีเอ็นเอจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE_{1-10})

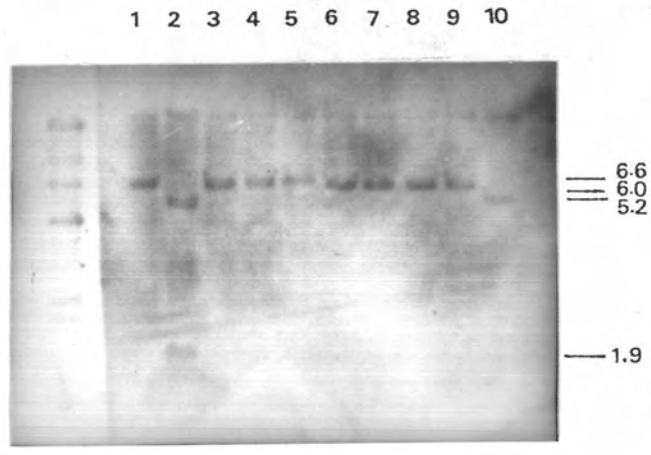
ค) ดีเอ็นเอจากภาคกลาง (C_{1-10})

ง) ดีเอ็นเอจากภาคใต้ ($S_{1,3-10,12,13}$)

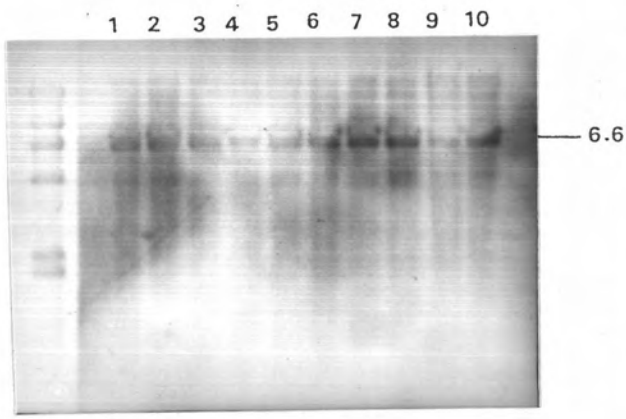
จ) ดีเอ็นเอจากเกาะสมุย ($I_{1-3,7,9-14}$)


1 3 4 5 6 7 8 9 10 11
kb
23.1
9.4
6.6
4.4
2.3
2.0
7.0
6.6
5.2
1.9

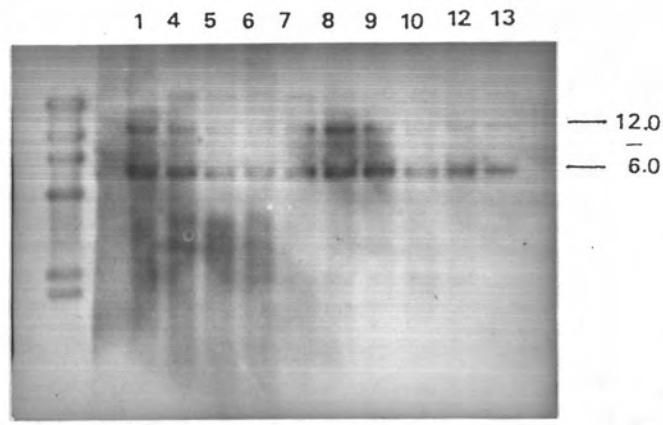
ก.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
6.6
6.0
5.2
1.9

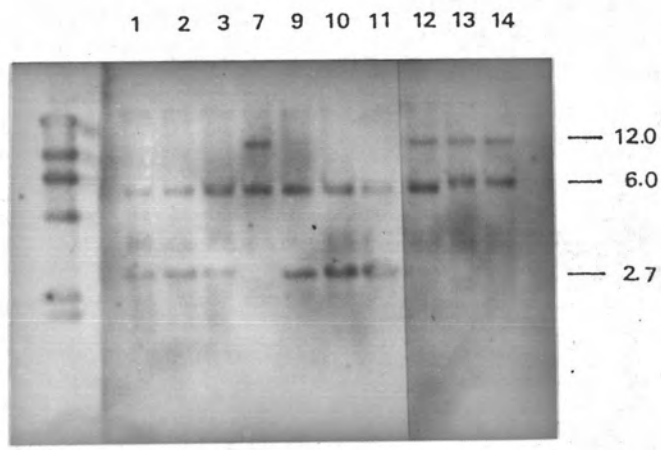
ข.


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
6.6

ค.


1 4 5 6 7 8 9 10 12 13
12.0
6.0

ง.


1 2 3 7 9 10 11 12 13 14
12.0
6.0
2.7

จ.

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์การแปรผันของผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ เฉพาะดีเอ็นเอแถบหลัก โดยใช้พลาสมิดลูกผสมจากโคลน #99 เป็นดีเอ็นเอติดตาม ไฮบริไดซ์กับตัวอย่างของผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ พื้นที่ละ 10 รัง ที่ย่อยด้วย *Hae*III ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17

พื้นที่	จำนวนรังที่ตรวจพบรูปแบบการไฮบริไดซ์แบบต่างๆ					
	แบบที่ 1 (6.6 กิโลเบส)	แบบที่ 2 (1.9,5.2 กิโลเบส)	แบบที่ 3 (2.7,6.0 กิโลเบส)	แบบที่ 4 (6.0,12.0 กิโลเบส)	แบบที่ 5 (6.0 กิโลเบส)	แบบที่ 6 (7.0 กิโลเบส)
เหนือ	7[a]	2[b]	-	-	-	1[c]
ตะวันออก-เฉียงเหนือ	8[d]	1[e]	-	-	1[f]	-
กลาง	10[g]	-	-	-	-	-
ใต้	-	-	-	10[h]	-	-
เกาะสมุย	-	-	6[i]	4[j]	-	-

หมายเหตุ:
(a) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดตาก, จังหวัดแพร่, จังหวัดเชียงใหม่ (2 รัง) และจังหวัดอุตรดิตถ์ (3 รัง)
(b) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดแพร่ (2 รัง)
(c) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดลำพูน
(d) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดนครราชสีมา, จังหวัดร้อยเอ็ด, จังหวัดอุบลราชธานี, จังหวัดกาฬสินธุ์, จังหวัดสุรินทร์ (2 รัง) และจังหวัดขอนแก่น (2 รัง)
(e) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดกาฬสินธุ์
(f) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดยโสธร
(g) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดนครปฐม, จังหวัดชลบุรี, จังหวัดปทุมธานี, จังหวัดสุพรรณบุรี (2 รัง), จังหวัดจันทบุรี (2 รัง) และจังหวัดสมุทรสงคราม (2 รัง)
(h) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี, จังหวัดตรัง, จังหวัดสตูล จังหวัดชุมพร (4 รัง) และจังหวัดสงขลา (4 รัง)
(i) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากอำเภอเกาะสมุย ตำบลอ่างทอง (3 รัง) ตำบลลิปะน้อย และตำบลตลิ่งงาม (2 รัง)
(j) ตัวอย่างผึ้งโพรงจากอำเภอเกาะสมุย ตำบลตลิ่งงาม (4 รัง)

กลุ่มที่สองพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 2 พบจำนวน 1 รัง เป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดกาฬสินธุ์ และกลุ่มที่สามพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 5 (ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 6.0 กิโลเบส) จำนวน 1 รัง เป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดยโสธร (รูปที่ 17ข)

ตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากภาคกลางพบว่า ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงทั้ง 10 รัง ให้ผลการไฮบริไดซ์ที่เหมือนกันทุกรัง โดยพบการรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 1 ซึ่งตัวอย่างของผึ้งโพรงเก็บจากจังหวัดนครปฐม, ปทุมธานี, สุพรรณบุรี, สมุทรสงคราม, จันทบุรี และชลบุรี (รูปที่ 17ค)

ตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากภาคใต้พบว่า ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงทั้ง 10 รัง ให้ผลการไฮบริไดซ์ที่เหมือนกันทุกรัง โดยพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 4 (ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 6.0 และ 12.0 กิโลเบส) ซึ่งตัวอย่างของผึ้งโพรงเก็บจากจังหวัดชุมพร, สตูล, สงขลา สุราษฎร์ธานี และ ตรัง (รูปที่ 17ง)

และตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากเกาะสมุย จะพบว่าแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 3 (ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 2.7 และ 6.0 กิโลเบส) จำนวน 6 รัง เป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากตำบลอ่างทอง, ลิบปะน้อย และตลิ่งงาม ส่วนกลุ่มที่สองพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 4 จำนวน 4 รัง ซึ่งเป็นตัวอย่างผึ้งโพรงที่เก็บจากตำบลตลิ่งงาม (รูปที่ 17จ)