บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างผึ้ง

ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์นั้นได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานในระยะตัวเต็มวัยตามสถานที่ต่างๆในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างผึ้งโพรงจังหวัดละ 5-10 รัง และเก็บผึ้งโพรงจากรังๆละ 10-20 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างในเอทธานอลที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ผึ้งโพรงบางตัวอย่างได้จากห้องปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นการเก็บตัวอย่างผึ้งงานในระยะดักแด้ที่มีอายุประมาณ 11-13 วัน และนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีที่สามารถทำได้ขณะอยู่นอกห้องปฏิบัติการ

ผึ้งที่สามารถพบในประเทศไทยอีก 4 ชนิด ได้แก่ ผึ้งมิ้มเล็ก (*Apis andreniformis*) ผึ้งมิ้ม (*Apis florea*) ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) เป็นการเก็บตัวอย่างผึ้งงานในระยะตัวเต็มวัยในเอทธานอลที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ โดยเก็บผึ้งชนิดละ 2 รังๆละ 5-10 ตัว

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งหนึ่งตัว

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งงานระยะตัวเต็มวัย

ดัดแปลงจากวิธีของ Hall และ Smith (1991)

การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) จากผึ้งหนึ่งตัวทำโดยตัดเฉพาะส่วนหน้าอกของผึ้งงานระยะตัวเต็มวัยมาบดในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีบัฟเฟอร์ STE (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5, NaCl 100 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) จำนวน 500 ไมโครลิตร เมื่อบดเนื้อเยื่อจนละเอียดแล้วจึงเติมสารละลาย SDS ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ จำนวน 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Proteinase K ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร

และสารละลาย Ribonuclease A (Rnase A) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นแยกสารละลายออกจากตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนของสารละลายมาสกัดโปรตีนออกโดยเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงเป็นเวลาประมาณ 30 นาที หรือใช้เครื่องผสมสาร(vortex genic) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันเป็นเวลาประมาณ 5 นาที นำมาปั่นให้แยกชั้นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายชั้นบนมาเติมสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ทำการสกัดจนไม่มีคราบโปรตีนอยู่ระหว่างชั้นสารละลาย ปั่นแยกสารละลายชั้นบนมาเติมสารละลาย cholroform: isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ผสมสารให้เข้ากันแล้วปั่นแยกสารละลายที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายชั้นบนมาเติมสารละลาย sodium acetate ที่ความเข้มข้น 3 โมลาร์ จำนวน 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนโดยการเติมเอทธานอลที่ความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ที่เย็นจำนวน 2 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่แยกได้ ผสมสารให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลง จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 15 นาที หรือทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20°ซ แยกตะกอนดีเอ็นเอโดยการปั่นที่ความเร็ว 1,2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วล้างเกลือออกด้วยเอทธานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำมาทำให้แห้งหมาดๆโดยใช้ลมร้อนซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, Na_2EDTA 1 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.2.2 สกัดดีเอ็นเอจากผึ้งงานระยะดักแด้

ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Davis และคณะ (1986)

ทำการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์โดยนำผึ้งงานในระยะดักแด้หนึ่งตัวมาใส่ในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ Extraction (Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH

9.0, NaCl 100 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 และน้ำตาลซูโครส 200 มิลลิโมลาร์) จำนวน 500 ไมโครลิตร บดผึ้งให้ละเอียดที่อุณหภูมิ 0°ซ จากนั้นเติมสารละลาย SDS ที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 30-60 นาที (สามารถเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องได้ประมาณ 1 สัปดาห์โดยที่ดีเอ็นเอไม่ถูกทำลาย) จากนั้นเติมสารละลาย Proteinase K ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase A ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย potassium acetate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 โมลาร์ บ่มต่อในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30-45 นาที นำมาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายมาสกัดโปรตีนออกด้วยสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) และตกตะกอนดีเอ็นเอในเอทธานอลตามวิธีในข้อ 3.2.1 จากนั้นละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4°ซ

3.3 การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางในบัฟเฟอร์ TE จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) คำนวนหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดย A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ศิริพร สิทธิประณีต, 2532; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536) ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง A_{260} กับ A_{280} ซึ่งควรอยู่ในช่วง 1.80-2.00 ถ้าต่ำกว่า 1.80 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากมีโปรตีนหรือ phenol ปนอยู่ (Maniatis, Sambrook and Fritsch, 1982)

3.3.2 agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรมาตรฐาน โดยวิธี submarine horizontal gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE (Tris base 89 มิลลิโมลาร์, boric acid 89 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์ pH 8.3)

นำสารละลายดีเอ็นเอจำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ สำหรับ loading (ficoll 400 5.00 เปอร์เซนต์, bromophenol blue 0.25 เปอร์เซนต์ และ xylene cyanol 0.25 เปอร์เซนต์) จำนวน 4 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ TE จำนวน 11 ไมโครลิตร ทำ electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมเจลที่ได้ในสารละลาย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลาประมาณ 30 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออกซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator เปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/HindIII โดยเมื่อนำ λ-DNA จำนวน 500 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII จะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันจำนวน 7 ชิ้น คือ 23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03 และ 0.57 กิโลเบส (Rodriguez and Tait, 1983) โดยจะมีปริมาณดีเอ็นเอมีค่าเป็น 240, 98, 67, 45, 24, 20 และ 6 นาโนกรัม ตามลำดับ

3.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

การวิจัยครั้งนี้ได้นำเทคนิค PCR มาใช้เพื่อเพิ่มจำนวน mitochondrial DNA (mtDNA) ตรงบริเวณ noncoding intergenic region ซึ่งอยู่ระหว่างยีน cytochrome oxidase (COI) และ cytochrome oxidase II gene (COII) โดยใช้ primer สำหรับทำ PCR (amplification primer) คือ primer 1 และ primer 2 ดังตารางที่ 3

ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอประกอบด้วยดีเอ็นเอของผึ้งที่ต้องการเพิ่มจำนวน, primer 1 และ primer 2, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), เอนไซม์ Taq DNA polymerase, บัฟเฟอร์สำหรับทำ PCR และ $MgCl_2$ โดยเตรียมสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดสำหรับทำ PCR (reaction tube: thin wall) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริเวณที่ทำ PCR จะแยกออกจากบริเวณที่ทำการวิเคราะห์ผลของ PCR ทำความสะอาดบริเวณที่ทำ PCR ด้วยสารละลายเจือจางของ sodium hypochlorite (clorox 10 เปอร์เซนต์) ส่วนปิเปตอัตโนมัติ (autopipette) เป็นชุดสำหรับทำ PCR โดยเฉพาะ และใช้ pipette tip ชนิด aerosol filtered tip เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจาก amplicon ที่แขวนลอยอยู่ในบรรยากาศของห้องปฏิบัติการ การทดลองแต่ละครั้งจะนำส่วนประกอบต่างๆยกเว้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน มาผสมให้เข้ากันให้อยู่ในรูปของสารผสมเพียงหลอดเดียวที่เรียกว่า master mix แล้วจึงแบ่งใส่หลอด

ตารางที่ 3 แสดง primer ที่ใช้สำหรับทำ PCR และหาลำดับเบสในส่วน noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรง รวมทั้งแสดงตำแหน่งเบสของ primer ใน mtDNA ของผึ้งพันธุ์ ที่ศึกษาโดย Crozier และ Crozier (1993)

ลำดับเบสของ primer (จาก 5′ ไป 3′)	ตำแหน่งด้านปลาย 5′ ใน mtDNA ของผึ้งพันธุ์	Tm (^{0}ซ)
primer สำหรับทำ PCR		
primer 1: TCTATACCACGACGTTATTC	3090 (COI)	56.0
primer 2: GATCAATATCATTGATGACC	3937 (COII)	54.0
primer สำหรับหาลำดับเบส		
primer 3: GGCAGAATAAGTGCATTG	3363 (leucine tRNA)	52.0

หมายเหตุ

primer สำหรับทำ PCR ออกแบบโดย Hall และ Smith (1991)

primer สำหรับหาลำดับเบสออกแบบโดย Cornuet และคณะ (1991)

ค่า Tm ของ primer คำนวนจากสมการ (Kaliszewski, 1992)

Tm = [2 (A+T) + 4 (C+G)] (ดูภาคผนวกที่ 2)

PCR แต่ละหลอด ทั้งนี้เพื่อช่วยลดโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนของสารละลายต่างๆ รวมทั้งช่วยลดความผิดพลาดที่เกิดจากการปิเปตสารปริมาณน้อยๆ และในการทำ PCR ทุกครั้งจะใช้ตัวควบคุมชนิดลบ (negative control) เพื่อทดสอบว่าสารละลายที่ใช้ทำ PCR อยู่ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อน

3.4.1 การทำ PCR เบื้องต้น

ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Hall และ Smith (1991)

ทำการเพิ่มจำนวน mtDNA ตรงบริเวณ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII ใช้ปฏิกิริยา PCR ที่มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอของผึ้งที่ต้องการเพิ่มจำนวนที่มีความเข้มข้นประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร มีบัฟเฟอร์สำหรับทำ PCR (KCl 500 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.3) จำนวน 5 ไมโครลิตร สารละลาย $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จำนวน 8 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP mix ที่มีความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดเท่ากับ 250 ไมโครโมลาร์ จำนวน 4 ไมโครลิตร primer 1 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 0.8 ไมโครลิตร primer 2 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 0.8 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.25 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้มีค่าเท่ากับ 50 ไมโครลิตรด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ ตัวควบคุมชนิดลบใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายของดีเอ็นเอ ผสมสารละลายในแต่ละหลอดให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นขนาดเล็ก (microcentrifuge) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงเริ่มกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง thermal cycler แบบ GeneAmp PCR system ของบริษัท Perkin Elmer Cetus โดยแต่ละรอบของการทำ PCR ประกอบด้วยการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 30 วินาที การทำ annealing ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และการทำ extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 2 นาที ทำทั้งหมดจำนวน 35 รอบ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°ซ เป็นเวลา 5 นาที

3.4.2 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR

3.4.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ nucleotide ทั้ง 4 ชนิด

ทดลองหาความเข้มข้นของ dNTP ที่ใช้ทั้ง 4 ชนิด โดย dNTP แต่ละชนิดมีความเข้มข้นเป็น 0, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่สารละลายอื่นๆ มีความเข้มข้นคงที่ คือ $MgCl_2$ เข้มข้น 4.0 ไมโครโมลาร์ primer แต่ละชนิดมีความเข้มข้น

0.16 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase มีความเข้มข้น 2.5 ยูนิตต่อ 100 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของการทำ PCR ตามข้อ 3.4.1

3.4.2.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer

ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer ในการทำ PCR โดยใช้ primer แต่ละชนิดมีความเข้มข้นเป็น 0, 0.02, 0.04, 0.06, ..., 0.20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่สารอื่นๆมีความเข้มข้นคงที่ คือ $MgCl_2$ เข้มข้น เป็น 4.0 ไมโครโมลาร์ dNTP แต่ละตัวเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase เข้มข้น 2.5 ยูนิตต่อ 100 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิเวลา และจำนวนรอบของการทำ PCR ตามข้อ 3.4.1

3.4.2.3 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ magnesium ion

ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ magnesium ion (Mg^{2+}) ในการทำ PCR โดยใช้ $MgCl_2$ มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, ..., 4.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่สารอื่นๆมีความเข้มข้นคงที่ คือ dNTP แต่ละชนิดเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ primer แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 0.14 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase เข้มข้น 2.5 ยูนิตต่อ 100 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของการทำ PCR ตามข้อ 3.4.1

3.4.3 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับนำไปลำดับเบส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งโพรงที่เก็บจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทยมาทำการเพิ่มปริมาณ mtDNA ตรงบริเวณ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII โดยวิธี PCR ในปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของผึ้งที่ต้องการเพิ่มจำนวนมีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์สำหรับทำ PCR จำนวน 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ จำนวน 5 ไมโครลิตร, dNTP แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลาร์ จำนวน 2 ไมโครลิตร, primer 1 และ primer 2 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.7 ไมโครลิตร และเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.25 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นให้สารละลายที่อยู่ข้างหลอดตกลงสู่ก้นหลอด

จากนั้นนำไปใส่เครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของการทำ PCR ตามข้อ 3.4.1

3.4.4 การทำ PCR ในผึ้งชนิดต่างๆ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งมิ้มเล็ก ผึ้งมิ้ม ผึ้งพันธุ์ และผึ้งหลวงมาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน noncoding intergenic region ใน mtDNA โดยใช้ primer สำหรับทำ PCR (amplification primer) คือ primer 1 และ primer 2 เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้กับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากผึ้งโพรง

3.4.5 การทดสอบ primer ที่ใช้หาลำดับเบส

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอทำโดยใช้ primer สำหรับหาลำดับเบส (internal sequencing primer) คือ primer 3 ซึ่งเข้าจับตรงบริเวณที่อยู่ภายในของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ primer 1 และ primer 2 ทำการทดสอบว่า primer 3 สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ได้หรือไม่ โดยการใช้ primer 3 กับ primer 2 มาเพิ่มปริมาณ mtDNA ของผึ้งโพรง โดยใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆ รวมทั้งอุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของการทำ PCR เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3

3.5 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR

ทำการตรวจสอบ PCR product ว่ามีขนาดและปริมาณเท่าใด รวมทั้งตรวจว่ามี non specific PCR product หรือไม่ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับ loading จำนวน 2 ไมโครลิตร นำมาทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ทำ electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมใน ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่น 30 นาที จึงนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ตรวจดูว่ามีการเรืองแสงเกิดขึ้นในช่อง negative control หรือไม่และในช่องของตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นกี่แถบ รวมทั้งสังเกตว่ามี primer dimer หรือไม่ ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้คือ 100 bp DNA ladder และ 50-100 bp DNA ladder ซึ่งดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder มีดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 11 ชิ้น คือ 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ

100 คู่เบส เมื่อนำ 100 bp DNA ladder จำนวน 5 ไมโครลิตร มาทำ electrophoresis จะได้ดีเอ็นเอขนาดต่างๆมีปริมาณเท่ากับ 50 นาโนกรัม ยกเว้นดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส มีปริมาณเท่ากับ 150 นาโนกรัม ส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน 50-100 bp DNA ladder มีดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 9 ชิ้น คือ 1000, 700, 525, 500, 400, 300, 200, 100 และ 50 คู่เบส เมื่อนำมาทำ electrophoresis 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอทุกขนาดมีปริมาณเท่ากับ 50 นาโนกรัม

3.6 การเตรียมดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR สำหรับการหาลำดับเบส

เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR แล้ว ถ้าดีเอ็นเอที่ได้ไม่มี non specific PCR product เกิดขึ้น สามารถนำดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ได้ทันที แต่ถ้ามี non specific PCR product เกิดขึ้น ต้องนำ PCR product มาแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการทำ agarose gel electrophoresis ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์

3.6.1 การทำดีเอ็นเอให้เข้มข้นขึ้น

ดัดแปลงจาก Gaillard และ Strauss (1990)

ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ polyacrylamide เป็นตัวพา โดยนำ PCR product จำนวน 40 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย potassium chloride ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 5 ไมโครลิตร และสารละลาย polyacrylamide ที่มีความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 1) จำนวน 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำให้ตกตะกอนโดยใช้เอทธานอลที่ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 250 ไมโครลิตร นำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกตะกอนไปทำให้แห้งโดยใช้ลมร้อน แล้วนำไปละลายในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 10 ไมโครลิตร

3.6.2 การแยกดีเอ็นเอที่ต้องการหลังจากทำให้เข้มข้นขึ้น

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณและทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วตามข้อ 3.6.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TAE (Tris-HCl 40 มิลลิโมลาร์ , acetic acid 20 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 2 มิลลิโมลาร์) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง นำเจลมาย้อมใน ethidium bromide และนำเจลไปตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.6.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

3.6.3.1 การใช้คอลัมน์

โดยใช้ชุดสำหรับทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ชนิด Wizard preps DNA purification system ของบริษัท Promega

ก. ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ purification (KCl 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.8, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-1000.1 เปอร์เซนต์) จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร จากนั้นเติมเรซินจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลาประมาณ 3 นาที นำสารทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ (wizard minicolumn) ที่ต่ออยู่กับด้านปลายของหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ใส่กระบอกสูบลงในเข็มฉีดยาแล้วกดกระบอกสูบลงเพื่อไล่ของเหลวออก ดึงคอลัมน์และกระบอกสูบออกจากหลอดฉีดยาตามลำดับ สวมคอลัมน์เข้าที่ปลายหลอดฉีดยาอีกครั้งแล้วเติม isopropanol ที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซนต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่กระบอกสูบลงในเข็มฉีดยาแล้วกดกระบอกสูบลงจนสุดเพื่อชะคอลัมน์ จากนั้นนำคอลัมน์ไปสวมเข้ากับหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ย้ายคอลัมน์ไปสวมกับหลอดปั่นหลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นจำนวน 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 นาที จึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°ซ

ข. ดีเอ็นเอที่แยกได้จากชิ้น agarose

นำ agarose ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการมาใส่ในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเรซิน 1 มิลลิลิตร นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 70°ซ จนกระทั่ง agarose ละลายหมด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับ purification จำนวน 100 ไมโครลิตร และทำตามขั้นตอนในข้อ ก.

3.6.3.2 การใช้ Geneclean

โดยใช้ชุด Geneclean II ของบริษัท Bio 101

นำดีเอ็นเอจาก PCR product หรือดีเอ็นเอที่แยกได้จากชิ้น agarose มาเติม NaI จำนวน 450 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ TBE modifier จำนวน 50 ไมโครลิตร

นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 60°ซ จนกระทั่ง agarose ละลายหมด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที จึงใส่ glassmilk 5 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ระหว่างนี้นำหลอดขึ้นมาเขย่า 1 ครั้ง เพื่อผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นที่ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที แล้วล้างตะกอนด้วยสารละลาย new wash 3 ครั้ง นำไปทำให้แห้งโดยใช้ลมร้อน ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลาประมาณ 10 นาที แล้วปั่นแยกเอา glassmilk ออกจากสารละลายดีเอ็นเอ

3.7 การหาลำดับเบส

3.7.1 ปฏิกิริยาการหาลำดับเบส

ดัดแปลงจาก OmniBase DNA cycle sequencing protocol ของบริษัท Promega (1996) โดยใช้วิธี chain termination sequencing ที่ปรับปรุงจากวิธีดั้งเดิมของ Sanger และคณะ (1977)

3.7.1.1 การติดฉลากที่ primer

ทำการติดฉลากที่ปลายด้าน $5'$ ของ primer สำหรับหาลำดับเบส (internal sequencing primer) คือ primer 3 โดยใช้เอนไซม์ Bacteriophage T4 polynucleotide kinase นำหลอดปั่นขนาด 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ primer 3 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ จำนวน 1 ไมโครลิตร, บัฟเฟอร์ T4 polynucleotide kinase (Tris-HCl 500 มิลลิโมลาร์ pH 7.5; $MgCl_2$ 100 มิลลิโมลาร์ , DTT 50 มิลลิโมลาร์ และ spermidine 1.0 มิลลิโมลาร์) จำนวน 1 ไมโครลิตร และเติม [γ-^{32}P]ATP ความเข้มข้น 10 มิลลิคูรีต่อมิลลิลิตร (specific activity 3000 คูรีต่อมิลลิโมล) จำนวน 3 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ T4 polynucleotide kinase ที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร นำหลอดไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90°ซ เป็นเวลา 2 นาที เก็บ primer ที่ติดฉลากนี้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

3.7.1.2 ปฏิกิริยา extension termination

สำหรับปฏิกิริยาของแต่ละตัวอย่างทำโดยใส่ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 นาโนกรัม ในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สำหรับทำ sequencing (Tris-HCl 250 มิลลิโมลาร์ pH 9.0; $MgCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์) และเติม primer ที่ติดฉลาก

ไว้แล้วจากข้อ 3.7.1.1 จำนวน 1.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 16 ไมโครลิตร นำมาเติมเอนไซม์ OmniBase sequencing ที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร นั้นนำไปปั่นแล้วแบ่งมาครั้งละ 4 ไมโครลิตร ใส่หลอด 4 หลอด โดยในแต่ละหลอดมี d/ddNTP nucleotide mix (A, C, G, T) อยู่จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ mineral oil 1 หยด แล้วนำไปใส่เครื่อง thermal cycler ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 2 นาที ทำให้เกิดปฏิกิริยา 30 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย การทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 90°ซ เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 47°ซ เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบแล้วนำมาหยุดปฏิกิริยาโดยเติม sequencing stop solution (NaOH 10 มิลลิโมลาร์, formamide 95 เปอร์เซนต์, bromophenol blue 0.05 เปอร์เซนต์ และ xylene cyanol 0.05 เปอร์เซนต์) จำนวน 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นและเก็บที่อุณหภูมิ - 20°ซ

3.7.2 การเตรียมเจลสำหรับหาลำดับเบส

ดัดแปลงจาก Maniatis และคณะ (1982)

ในการหาลำดับเบสจะอาศัยการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันโดยใช้เทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีสาร urea ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารรังสีแยกออกจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวนี้จะเคลื่อนที่ไปในเจลโดยระยะทางที่เคลื่อนที่ไปจะเป็นสัดส่วนกับขนาดของโมเลกุล โดยไม่ขึ้นกับชนิดของเบสที่มีในชิ้นดีเอ็นเอนั้นๆ เทคนิคนี้สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 เบสออกจากกันได้

การเตรียมเจลโดยทำความสะอาดกระจกขนาด 30x40 เซนติเมตร ด้วยน้ำยาทำความสะอาด จากนั้นชะด้วยน้ำกลั่นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งสนิท นำ spacer มาวางที่ขอบด้านข้างของกระจกแผ่นยาว แล้วประกบกระจกแผ่นสั้นเข้าด้วยกัน ปิดส่วนล่างและขอบทั้งสองข้างด้วยเทปกาว เตรียม polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซนต์ (acrylamide:bisacrylamide = 19:1) และ urea ที่ความเข้มข้น 7 โมลาร์ ในบัฟเฟอร์ TBE เทเจลใส่บีกเกอร์ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เมื่อพร้อมจะเทเจลจึงเติม ammonium persulfate ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และ TEMED จำนวน 30 ไมโครลิตร บรรจุสารละลายทั้งหมดลงในเข็มฉีดยาและฉีดสารละลายเข้าระหว่างกระจกทั้งสองโดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ เมื่อบรรจุสารละลายจนเต็มช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกแล้ว จึงสอด

ด้านเรียบของ comb ลงในสารละลายเจลให้ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งให้เกิด polymerization ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงดึงเทปกาวและ comb ออก ล้างผิวหน้าเจลด้วยบัฟเฟอร์ TBE เพื่อเอาเจลส่วนเกินและ urea ที่เหลือออก นำเจลไปประกอบเข้ากับเครื่อง sequencing gel electrophoresis เทบัฟเฟอร์ TBE ลงในอ่างบรรจุบัฟเฟอร์ด้านบนและด้านล่างให้ท่วมผิวเจล สอด comb ด้านปลายแหลม (Shark's tooth comb) เข้าที่ด้านบนของเจลให้ปลายแหลมของ comb แตะที่ผิวของเจล เพื่อทำให้เกิดเป็นหลุมระหว่างซี่ของ comb แล้วเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply) โดยปรับกำลังไฟฟ้าเป็น 55 วัตต์ ทำการ per-run เป็นเวลาประมาณ 30-60 นาที นำหลอดที่มีสารละลายของปฏิกิริยา extention termination (จากข้อ 3.7.1.2) มาอุ่นที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 2 นาที แล้วรีบนำหลอดมาแช่ในน้ำแข็ง ทำการชะ urea ที่ผิวเจลด้วยบัฟเฟอร์ TBE ก่อนที่จะหยอดสารลงไประหว่างซี่ของ comb หยอดสาร sequencing reaction ของแต่ละตัวอย่างเป็นปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไประหว่างซี่ของ comb เปิดเครื่งกำเนิดไฟฟ้าโดยปรับกำลังไฟฟ้าเป็น 55 วัตต์ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบมายังขั้วบวก ซึ่งใช้เวลาในการทำ electrophoresis ประมาณ 3 ชั่วโมง โดยสังเกตระยะทางการเคลื่อนที่จาก dye marker จากนั้นนำเจลออกจากเครื่องและแยกแผ่นกระจกทั้งสองออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นยาว วางแผ่นกระดาษกรองที่ตัดให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นเจลเล็กน้อยลงบนแผ่นเจล รีดทับกระดาษเบาๆเพื่อให้เจลติดกับกระดาษกรองตลอดทั้งแผ่น ดึงกระดาษกรองที่มีแผ่นเจลติดอยู่ออกจากแผ่นกระจก แล้วปิดทับแผ่นเจลด้วย syran wrap นำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบเจล (gel dryer) ที่อุณหภูมิ 80^{0}ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง นำเจลที่แห้งไปทำ autoradiography โดยประกบกับฟิล์มเอกซ์เรย์ (Hyperfilm MP) ในกล่องประกบฟิล์ม (film cassette) เป็นเวลาประมาณ 6-12 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับอายุของสารรังสีที่ใช้ นำแผ่นฟิล์มมาล้างในที่มืดโดยจุ่มลงในน้ำยาล้างฟิล์ม (developer) เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที ล้างในน้ำประมาณ 1 นาที ในน้ำยาตรึง (fixer) ประมาณ 3-5 นาที และล้างในน้ำอีกครั้งก่อนนำฟิล์มไปตากให้แห้งสนิท

3.7.3 การอ่านผลจากแผ่นฟิล์ม

การอ่านลำดับเบสบนแผ่นฟิล์มซึ่งมีอยู่ 4 ช่องคือ A, C, G และ T โดยแต่ละแถบสีดำที่ปรากฏอยู่ในแต่ละช่องแสดงถึงตำแหน่งของสายดีเอ็นเอซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ที่สิ้นสุดด้วยเบสนั้นๆ สามารถอ่านลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ ขึ้นใหม่ได้โดยเริ่ม

I17259162

อ่านจากชิ้นดีเอ็นเอที่สั้นที่สุดซึ่งอยู่ที่ปลายล่างสุดของ sequencing gel ไปหาชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวที่สุด โดยชนิดของเบสที่อ่านได้จะอ่านตามการ load ตัวอย่าง ลำดับเบสที่อ่านได้จะเป็นของสายดีเอ็นเอที่เป็น complementary strand กับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเริ่มจากปลายด้าน 5′ ไปยังปลายด้าน 3′

3.7.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส

นำลำดับเบสที่หาได้จากผึ้งโพรงจำนวน 17 ตัวอย่างมาทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL (Higgins and Sharp, 1988) เพื่อหาตำแหน่งเบสที่มีความแปรผันไป โดยใช้ค่าต่างๆดังนี้ K-tuple value เท่ากับ 2, gap penalty เท่ากับ 5, window size เท่ากับ 10, filtering level เท่ากับ 2.5, open gap cost เท่ากับ 10, unit gap cost เท่ากับ 10 และ transitions มีน้ำหนักเป็น 2 เท่าของ transversions จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาทำ phylogenetic analysis โดยวิธี parsimony เพื่อให้ได้ cladogram ที่ดีที่สุดด้วยโปรแกรม PAUP version 3.0L (Swofford, 1990) ใช้วิธี heuristic search โดยใช้ลำดับเบสของผึ้งโพรงจากประเทศอินเดียเป็น outgroup และใช้วิธีทางสถิติ bootstrapping คำนวณค่า bootstrap value โดยใช้ค่า number of replication ในการทำ bootstrap เท่ากับ 100