

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างกบหงอน (*Limnonectes gyldenstolpei*) และกบหัวขาปทุมเหนือ (*Limnonectes taylori*) ในระยะ juvenile จาก 16 แหล่ง ใน 6 จังหวัดด้วยกัน โดยทำการจัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาตามไดโคโตมัสคีจากคู่มือสัตว์สะเทินน้ำ สะเทินบกในเมืองไทย (สัญญา, 2546) จากนั้นนำข้อมูลพิกัดความสูงมาเปรียบเทียบเพื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในแต่ละพื้นที่มาสร้างแผนภูมิแท่ง ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel และ box plot เพื่อแสดงค่ากลางและค่าเฉลี่ยของความสูงในแต่ละพื้นที่ของกบทั้งสองชนิดเปรียบเทียบกัน ด้วยโปรแกรม R แล้วจึงนำพิกัดมาสร้างแผนที่ด้วยโปรแกรม ArcGIS (ตาราง 3.1)

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกบหงอน (*L. gyldenstolpei*) และกบหัวขาปทุมเหนือ (*L. taylori*)

สกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี proteinase K/phenol-chloroform โดยดัดแปลงตามวิธีของ Jiwyam et al., 2005 โดยเริ่มจากตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อกบหงอนและกบหัวขาปทุมเหนือ ประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย TNE buffer (pH8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย SDS ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม proteinase K 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน นำตัวอย่างที่ย่อยมาเติมสารละลายฟีนอลและสารละลายคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13680 g (11200 rpm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที คูดสารละลายใส่ชั้นบนย้ายไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13680 g (11200 rpm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที คูดสารละลายใส่ชั้นบนย้ายไปใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมสารละลาย Sodium

acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเอธานอลที่เย็นจัด ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนไว้ไปปั่นเหวี่ยง 13680 g (11200 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธานอล 70 % ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 13680 g (11200 rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำไปอบหรือเป่าลมให้สารละลายเอธานอลระเหยให้หมด เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างกบหนองและกบหัวขาปมเหนือ

จังหวัด	ประชากร	พิกัดที่เก็บตัวอย่าง		
	อำเภอ	ความสูง(เมตร)	ลองจิจูด	ละติจูด
เชียงใหม่	ปางน้ำฤๅ	968	19.06941	99.35947
เชียงใหม่	ปางบง	888	18.97698	99.32419
เชียงใหม่	ปางกำแพงหิน	1067	18.95202	99.34746
เชียงใหม่	ดอยกลาง	1950	20.099866	99.273391
เชียงใหม่	อุทยานแห่งชาติแม่ว้าง	678	18.657305	98.681831
เชียงใหม่	บ้านป่าสักงาม	402	18.98777	99.11455
เชียงใหม่	อมก๋อย	460	17.47137	98.45785
แม่ฮ่องสอน	ขุนยวม	673	18.80817	97.87125
แม่ฮ่องสอน	บ้านนาป่าแปะ	982	19.611544	98.002624
แม่ฮ่องสอน	อุทยานแห่งชาติน้ำตกแม่สุรินทร์	396	19.24797	97.99542
แม่ฮ่องสอน	ดอยผกุกุด	1423	19.66083	98.3994
เชียงราย	อุทยานแห่งชาติขุนแจ	592	19.152952	99.393196
น่าน	ดอยฟ้า	665	18.980974	101.182594
เลย	อุทยานแห่งชาติภูเรือ	939	17.48193	101.34982
เลย	ภูหลวง	865	17.226398	101.500225
นครราชสีมา	สระแกรราช	865	14.49336	101.87364

3.3 การวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

3.3.1. วิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

เริ่มจากเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 % โดยผสมผงอะกาโรส 0.8 กรัม ในสารละลาย 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนจนผงอะกาโรสละลายหมด จากนั้นเทเจลลงในถาดที่เตรียมไว้ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรกับสารละลาย 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลาย GelRed Nucleic Acid Gel Stain ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลไปตรวจหาแถบดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

3.3.2. การตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง

การตรวจปริมาณสารละลายดีเอ็นเอที่ตรวจการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (รุ่น ยี่ห้อ BioDrop) จากนั้นจะถูกนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR

เริ่มต้นทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้งหมดด้วยเทคนิค touch down ในช่วงอุณหภูมิ 45-64 C เพื่อหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและเมื่อตรวจสอบผลผลิตปรากฏแถบดีเอ็นเอ เมื่อได้พบแถบแบนจะทำให้ทราบช่วงอุณหภูมิ จึงทำการ gradient ตามวิธีของ (Fonseca-Salamanca et al., 2006) อุณหภูมิเพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเมื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมได้แล้วจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทุกตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแสดงไว้ในตาราง 3.3 จำนวน 20 ไพรเมอร์ ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์เลสหรือ PCR (polymerase chain reaction: PCR) ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยารวม 15 ไมโครลิตร ดังตาราง 3.2 และใส่สารละลายดีเอ็นเอที่ปรับแล้วปริมาตร 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอร์เลส เตรียมสารละลาย master mixture ปริมาตร 14 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR tube นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ (Machkour-M'Rabet et al., 2009)

Pre-Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ	} 35 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที	
Annealing	:อุณหภูมิไพรเมอร์ แสดงดังตาราง 3.3	เวลา 1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 1.30 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ	

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมสารละลาย master mixture ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ISSR (Moresco et al., 2013)

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10Xbuffer	1X	1.5
primer	0.8 μM	1.2
dNTP	1 mM	0.3
Taq polymerase	1 unit	0.2
dH ₂ O		9.8
DNA	10 ng/μl	1
รวม		15

3.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เอนไซม์ Tyrosinase (เฉพาะกับหอยชาปุมเหนือ *L.taylori*)

นำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือ PCR (polymerase chain reaction: PCR) ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร ดังตาราง 3.4 และใส่สารละลายดีเอ็นเอที่ปรับแล้วปริมาตร 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เตรียมสารละลาย master mixture ปริมาตร 24 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR tube นำหลอดทดลองเข้าเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

Pre-Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ	} 35 รอบ
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที	
Annealing	52 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 1.30 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ	

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมสารละลาย master mixture ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ยีน Tyrosinase

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (μl)
10Xbuffer	1X	2.5
primer	10 μM	1.0
dNTP	10 mM	0.5
Taq polymerase	1 unit	0.2
dH ₂ O		19.8
DNA	10 ng/μl	1
รวม		25

3.6 การตรวจสอบผลผลิตPCR

การตรวจสอบขนาดของผลผลิต ISSR และผลผลิตของยีน Tyrosinase ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ด้วยวิธีการ electrophoresis gel หลังจากพบผลผลิตPCR จะนำส่วนผสมที่ได้ไปแยกขนาดโดยการนำผลผลิต PCR ที่ได้ ด้วยวิธี 1.5% เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.5% gel electrophoresis) โดยเตรียมผสมผงอะกาโรส 1.5 กรัม ในสารละลาย 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายผลผลิต PCR ตัวอย่างปริมาตร 2 ไมโครลิตรกับสารละลาย 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และสารละลาย GelRed Nucleic Acid Gel Stain ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลไปตรวจหาแถบดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต และผลผลิตของยีน Tyrosinase จะทำการส่ง Sequence เพื่อให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง

ตารางที่ 3.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ISSR

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Reference
801	(AT) ₈ T	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
802	(AT) ₈ G	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
803	(AT) ₈ C	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
805	(TA) ₈ C	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
807	(AG) ₈ T	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
808	(AG) ₈ C	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
809	(AG) ₈ G	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
811	(GA) ₈ C	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
817	(CA) ₈ A	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
818	(CA) ₈ G	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
822	(TC) ₈ A	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
823	(TC) ₈ C	(Fonseca-Salamanca et al., 2006)
824	(TC) ₈ G	(Kojima et al., 1998)
825	(AC) ₈ T	(Huang and Sun, 2000)
826	(AC) ₈ C	(Kojima et al., 1998)
827	(AC) ₈ G	(Kojima et al., 1998)
835	(AG) ₈ YG	(Kojima et al., 1998)
844	(CT) ₈ RC	(Yao et al., 2008)
845	(TC) ₈ RG	(Yao et al., 2008)
847	(CA) ₈ RC	(Tonk et al., 2014)

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.7.1 หาค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม

การจัดเตรียมข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม PHYLIP 3.69 (Yeh et al., 1999) ซึ่งทำการแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นให้เป็นข้อมูลตัวเลข โดยตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอ ปรากฏขึ้นในตำแหน่งเดียวกันที่มีขนาดความยาวมากที่สุดให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 ทำการนับแถบดีเอ็นเอทั้งหมดใน 1 ไพรเมอร์แล้วทำ

การนับในไพรเมอร์ต่อไปแล้วนำจึงนำข้อมูลไพรเมอร์แต่ละตัวอย่างมาเรียงต่อกันบันทึกข้อมูลเป็นไฟล์ .txt เพื่อนำข้อมูลเข้าในโปรแกรม ดังตาราง 3.5 และวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมตามวิธีของ Nei และ Li (1979) โดยโปรแกรม GenAlEx 6.502

ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างการแปลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นข้อมูลตัวเลข

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่โลคัสที่1				ข้อมูลตัวเลขที่โลคัสที่1		
ตัวอย่างที่1	ตัวอย่างที่2	ตัวอย่างที่3	แถบ	ตัวอย่างที่1	ตัวอย่างที่2	ตัวอย่างที่3
■■■■■			1	1	0	0
■■■■■	■■■■■	■■■■■	2	1	1	1
		■■■■■	3	0	0	1
■■■■■	■■■■■	■■■■■	4	1	1	1
	■■■■■		5	0	1	0

3.7.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบหนองและกบหัวขาป้อมเหนือ

วิเคราะห์โครงสร้างประชากรย่อยของกบหนองและกบหัวขาป้อมเหนือ โดยใช้โปรแกรม GenAlex ซึ่งสามารถคำนวณค่าต่างๆ ได้ดังนี้

1.การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม Analysis of molecular variance (AMOVA)

วิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากรย่อยของกบแต่ละชนิดโดยแบ่งออกเป็น กบหนอง 8 กลุ่มและ กบหัวขาป้อมเหนือ 11 กลุ่มตามพื้นที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GenAlEx 6.502 (Peakall et al., 2006) โดยคำนวณจากค่าระยะห่างพันธุกรรม (Huff et al., 1993)

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์การกระจายตัวของกลุ่มประชากร Principal Coordinates Analysis (PCoA)

การวิเคราะห์ Principal Coordinates Analysis (PCoA) เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ระหว่างกบสองชนิดโดยใช้ข้อมูลค่าความแปรปรวน (Fst) ในแต่ละหน่วยศึกษาหาข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (UPGMA)

3.7.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเทียบกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากรใช้ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมเทียบกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ โดยจะแปลงค่าระยะห่างทางพันธุกรรมให้เป็นค่าความแปรปรวน (FST) ในแต่ละกลุ่มประชากรเทียบกับระยะห่างทางภูมิศาสตร์โดยใช้โปรแกรม Isolation By Distance Web Service version 3.23 (IBD)

3.7.4 การสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมของ ISSR ที่ได้จากโปรแกรม Phylip 3.69 (Yeh et al., 1999) และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน Tyrosinase มาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor-joining, maximum likelihood (Nei, 1978) ใช้พารามิเตอร์ Jukes – Cantor model และ Gamma Distributed (G) โดยใช้โปรแกรม MEGA 7 และวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) โดยใช้โปรแกรม POPTREE 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved