การเตรียมดีเอ็นเอติดตามเพื่อวิเคราะห์การแปรผันสายพันธุ์ผึ้งโพรง *Apis cerana*

นางสาววัลยา อุทัยสาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-631-049-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16844579

PREPARATION OF DNA PROBE FOR THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN *Apis cerana*

Miss Wanlaya Uthaisang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-049-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมดีเอ็นเอติดตามเพื่อวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรง *Apis cerana*
โดย	นางสาววัลยา อุทัยสาง
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชรา วีระกะลัส

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชรา วีระกะลัส)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วัลยา อุทัยล่าง : การเตรียมดีเอ็นเอติดตามเพื่อวิเคราะห์การแปรผันของล่ายพันธุ์ผึ้งโพรง *Apis cerana* (PREPARATION OF DNA PROBE FOR THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN *Apis cerana*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริพร ลิทธิประณีต, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.พัชรา วีระกะสัล, 87 หน้า. ISBN 974-631-049-6

ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) เป็นพื้นเมืองชนิดหนึ่งที่พบในประเทศไทยและหลาย ๆ ประเทศในทวีปเอเชีย จากการศึกษาทางด้านสันฐานวิทยาพบว่ามีความหลากหลายของล่ายพันธุ์แต่ยังไม่ล่ามารถจ่าแนกเป็นล่ายพันธุ์ย่อยได้อย่างชัดเจน ในการวิจัยครั้งนี้ได้น่าเทคนิคทางพันธุวิค่วกรรมเข้ามาช่วยในการจัดจ่าแนกกลุ่มต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในประเทศไทย โดยใช้เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอจากผึ้งโพรงที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทยโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามจากล่วน repetitive sequences ของผึ้งโพรง ซึ่งเตรียมโดยการโคลนชิ้นล่วนดีเอ็นเอจากโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากภาคกลาง และจากดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้งโพรงจากเกาะล่มุย ลงในพลาล่มิด pUC18 ที่ต่าแหน่งของเอนไซม์ *Eco*RI ผลการทดลองพบว่าได้ดีเอ็นเอลูกผล่มจ่านวนประมาณ 1,000 โคโลนี ในการโคลนแต่ละชุด จากนั้นคัดเลือกแบบลุ่มจ่านวน 50 โคโลนีของแต่ละชุด ท่า dot-blot hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอจากผึ้งโพรงที่ใช้ในการโคลนแต่ละชุดเป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อคัดเลือกโคลนที่มีล่วน repetitive sequences จากโคลนที่ให้สัญญาณการไฮบริไดซ์เข้มน่ามาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม และทดล่อบหาดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะล่มด้วยวิธี Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่าง ๆ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Hae*III, *Bgl*II, *Alu*I, *Xba*I หรือ*Hind*III และดีเอ็นเอติดตามต่าง ๆ ที่น่ามาทดล่อบ จากผลการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอติดตามจากโคลน #99 จะล่ามารถแยกดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Hae*III จากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยได้เป็นอย่างน้อย 6 กลุ่ม ดังนั้นดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมได้นี้จึงล่ามารถน่ามาใช้ในการวิเคราะห์การแปรผันของล่ายพันธุ์ผึ้งโพรงได้ แต่จ่าเป็นต้องเพิ่มจ่านวนของตัวอย่างของผึ้งโพรงในการวิเคราะห์ให้มากขึ้นเพื่อล่ามารถบ่งบอกการแปรผันในล่ายพันธุ์ได้อย่างมีนัยล่าคัญ

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C425842 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: *Apis cerana* / DNA PROBE / GENETIC VARIATION
WANLAYA UTHAISANG : PREPARATION OF DNA PROBE FOR THE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN *Apis cerana*. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. PATCHARA VERAKALASA, Ph.D. 87 pp. ISBN 974-631-049-6

The Asian hive bee or Eastern honey bee, *Apis cerana*, is native to Thailand and many countries in Asia. There are geographic variations in morphology and correlations among populations of *A. cerana* and these variations have been used as criteria for dividing *A. cerana* into several subspecies. However, it is still uncertain how many distinct populations or subspecies of *A. cerana* exist in Asia and how these populations are related to one another. In this research, the technique called Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis is used to detect sequence polymorphisms in chromosomal DNA of *A. cerana* collected from different areas in Thailand. DNA probes, containing repetitive sequences, are prepared by cloning *Eco*RI fragments of honey bee DNA into the *Eco*RI site of the pUC18 plasmid. The honey bee DNA used was from chromosomal DNA of Central region and total DNA of Samui Island honey bees. Fifty out of one thousand transformants of each cloning experiment were tested for the presence of repetitive DNA elements by dot blot hybridization using the same honey bee DNA as the probe. The recombinant plasmids containing repetitive sequences as shown by strong hybridization signals, were selected and used as hybridization probes. The DNA samples were digested with several restriction enzymes: *Eco*RI, *Hae*III, *Bgl*II, *Alu*I, *Xba*I and *Hind*III. Southern blot analyses of *Hae*III digested chromosomal DNA from *A. cerana* collected from 5 areas of Thailand showed 6 types of polymorphic banding pattern on hybridization to a DNA fragment prepared from clone #99.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความเข้าใจอันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียน ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรา วีระกะลัส ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีและหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะต่างๆ ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม และภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอบคุณสมาชิกในหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมทุกคน รวมทั้งนิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ และชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือต่างๆ และกำลังใจต่อผู้เขียน

ขอบคุณเจ้าหน้าที่และนิสิตปริญญาโท ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยชีววิทยาของผึ้ง (Bee Biology Research Unit) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างผึ้งโพรง

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่วไประหว่างการทำงานวิจัย

ท้ายสุดนี้ ผู้เขียนขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญรูป..... ฎ

คำย่อ..... ท

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. เครื่องมือวัสดุ-เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ..... 14

2.2 วัสดุภัณฑ์..... 16

2.3 เคมีภัณฑ์..... 16

2.4 ดีเอ็นเอพาหะ..... 17

2.5 ดีเอ็นเอมาตราฐาน..... 17

2.6 จุลินทรีย์..... 18

2.7 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์..... 18

2.8 ตัวอย่างผึ้งโพรง..... 18

2.9 เครื่องแก้วและสารละลาย..... 19

2.10 เทคนิคทาง Molecular cloning

2.10.1 การสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งโพรง (*Apis cerena*)..... 19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2.10.2 การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะ..... 21

2.10.3 การวิเคราะห์ขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ..... 23

2.10.4 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..... 24

2.10.5 การสร้างดีเอ็นเอลูกผสม..... 24

2.10.6 การทรานสฟอร์ม

2.10.6.1 การเตรียมคอมพลีเทนต์เซลล์..... 25

2.10.6.2 การเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน.... 26

2.10.7 การคัดเลือกและการทดสอบดีเอ็นเอลูกผสม..... 27

2.11 เทคนิคทาง Nucleic acid hybridization

2.11.1 การติดฉลากดีเอ็นเอ..... 28

2.11.2 Dot blot hybridization..... 29

2.11.3 Southren blot hybridization..... 29

2.11.4 การตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนลอนเมมเบรน..... 30

2.11.5 Prehybridization และ Hybridization..... 30

2.11.6 การวิเคราะห์สัญญาณการไฮบริด..... 31

3. ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจากผึ้งโพรง..... 33

3.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอพาหะ..... 36

3.3 ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ..... 36

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.4 การทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสม..... 39

3.5 การคัดดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive DNAโดย Dotblot hybridization 42

3.6 การคัดพลาสมิดลูกผสมที่มี repetitive DNA ที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการติดตามสำหรับ RFLP analysis..... 42

3.7 การวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรงด้วยดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมได้... 50

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 59

เอกสารอ้างอิง..... 70

ภาคผนวก..... 76

ประวัติผู้เขียน..... 87

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะพันธุ์ผึ้งพื้นเมืองในประเทศไทย 4 ชนิด	6
2.	แสดงลักษณะของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)	7
3.	จำนวนรังผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และรังผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี ค.ศ. 1975-1985	8
4.	ผลการสกัดดีเอ็นเอของผึ้งโพรง	34
5.	ผลการหาปริมาณ *Eco*RI ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรง	35
6.	การตรวจสอบขนาดของพลาสมิด pUC18 ตามแผนที่เรสทริกชัน	37
7.	ผลการหาปริมาณ *Eco*RI ที่เหมาะสมในการย่อยพลาสมิด pUC18	38
8.	ผลการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของผึ้งโพรงและพลาสมิด pUC18 ที่ย่อยด้วย *Eco*RI	40
9.	การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ของดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 50 โคลน	43
10.	ผลการวิเคราะห์หา repetitive sequences โดย dot blot hybridization	44
11.	Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III และดีเอ็นเอติดตามจากการโคลนชุดที่ 1	46
12.	Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Bgl*II และดีเอ็นเอลูกผสมจากการโคลนชุดที่ 1	48
13.	Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงที่ย่อยด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากการโคลนชุดที่ 2	49
14.	ผลการศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ในดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99	53
15.	Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากรังเดียวกันที่ย่อยด้วย *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99	54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

16. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากตัวเดียวกัน ที่ย่อยด้วย *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99..... 55

17. Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากต่างรังกัน ในแต่ละพื้นที่ ที่ย่อยด้วย *Hae*III และดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99..... 56

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงองค์ประกอบพื้นฐานของน้ำผึ้ง..... 2
2. แสดงปริมาณวิตามินต่างๆในน้ำผึ้ง..... 3
3. แสดงมูลค่าการนำเข้าและการส่งออกของน้ำผึ้งระหว่างปี พ.ศ. 2533-2536..... 4
4. จำนวนผู้เลี้ยงผึ้งและจำนวนรังผึ้งในประเทศไทยปี พ.ศ. 2529..... 9
5. แสดงการตรวจสอบประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α. 41
6. แสดงขนาดดีเอ็นเอที่ตรวจพบ จากการไฮบริไดซ์ดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hae*III โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากดีเอ็นเอลูกผสมโคลน #99..... 51
7. ผลการวิเคราะห์การแปรผันของผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ เฉพาะดีเอ็นเอแถบหลัก โดยใช้พลาสมิดลูกผสมจากโคลน #99 เป็นดีเอ็นเอติดตาม..... 57

คำย่อ

ATP	=	Adenosine 5' triphosphate
$CHCl_3$	=	Chloroform
IPTG	=	Isopropylthio-β-galactoside
kb	=	kilobase pair (10^3 base pair)
LB	=	Luria-Bertani medium
Na_2EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt Dihydrate
OD	=	Optical Density
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
Tris	=	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside