บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากผึ้งโพรงหนึ่งตัว

การเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ซึ่งประกอบด้วย nuclear DNA และ mitochondrial DNA โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งงานระยะตัวเต็มวัยที่เก็บในเอทธานอลที่เข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ นำเฉพาะส่วนหน้าอกมาสกัดดีเอ็นเอ (ข้อ 3.2.1) และนำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{260} (3.3.1) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณ 1-1.5 ไมโครกรัม เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งงานระยะดักแด้ทั้งตัว (ข้อ 3.2.2) ทั้งที่สกัดเองและที่ได้จากหน่วยวิจัยพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดีเอ็นเอมีปริมาณอยู่ระหว่าง 5-6 ไมโครกรัม เมื่อนำการวิเคราะห์คุณภาพโดยวัดค่า A_{260}/A_{280} ทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 1.80-1.90 และเมื่อนำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์คุณภาพโดยการทำ agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/HindIII (ข้อ 3.3.2) ได้ผลดังรูปที่ 6 พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังคงอยู่ในรูป high molecular weight ซึ่งมีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบสเป็นส่วนใหญ่ และมีดีเอ็นเอส่วนน้อยที่มีขนาดต่ำกว่า 23.1 กิโลเบส ซึ่งในส่วนนี้จะมี mtDNA ที่ต้องการซึ่งมีขนาดประมาณ 16-17 กิโลเบส

4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ทำการเพิ่มจำนวน mtDNA ตรงบริเวณ noncoding intergenic region ซึ่งอยู่ระหว่างยีน COI และ COII โดยอาศัยเทคนิค PCR โดยได้ทำการสังเคราะห์ primer ขึ้นสองสายเพื่อใช้สำหรับทำ PCR ซึ่งสายหนึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับปลายด้าน 3′ ของยีน COI ส่วนอีกสายมีลำดับเบสคู่สมกับปลายด้าน 3′ ของยีน COII เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนนี้โดยใน PCR reaction mixture จะมีดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่ต้องการเพิ่มปริมาณที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัมใน 1 ไมโครลิตร dNTP 4 ชนิด โดยแต่ละชนิดจะใช้ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ primer แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.16 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ และเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 2.5 ยูนิตต่อ 100

ไมโครลิตร ศึกษาผลการทำ PCR โดยนำ PCR product ที่ได้มาทำ agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (รูปที่ 7) พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส โดยไม่มี non specific PCR protuct และ primer dimer เกิดขึ้น

การทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน mtDNA ตรงบริเวณ noncoding intergenic region ที่อยู่ระหว่างยีน COI และ COII โดยปรับความเข้มข้นองค์ประกอบต่างๆ ที่ใช้ทำ PCR เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR ทำให้ได้ผลิตผลที่มีปริมาณมากและมีความจำเพาะ (specific) ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ nucleotide ทั้ง 4 ชนิด

เมื่อใช้ความเข้มข้นของ dNTP ทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ 0, 100 และ 200 ไมโครโมลาร์ (ข้อ 3.4.2.1) ในขณะที่องค์ประกอบอื่นๆมีความเข้มข้นคงที่ แล้วนำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis dNTP (รูปที่ 8) พบว่าที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ให้ PCR product ในปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทำ PCR ครั้งต่อไปจึงเลือกใช้ dNTP ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของของ primer

ทำการทดลองหาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ความเข้มข้นของ primer แต่ละชนิดเท่ากับ 0, 0.02, 0.04, 0.06, ..., 0.20 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ ในขณะที่องค์ประกอบอื่นๆ มีความเข้มข้นคงที่ (ข้อ 3.4.2.2) นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis (รูปที่ 9) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ primer 1 และ primer 2 เท่ากับ 0.02 ไมโครโมลาร์ จะไม่เกิด PCR product ขึ้น (ช่องที่ 3) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ primer เป็น 0.04 ไมโครโมลาร์ จะเกิด PCR product ขึ้นแต่มีปริมาณน้อยมาก (ช่องที่ 4) และเมื่อใช้ความเข้มข้นของ primer ในช่วง 0.10 ถึง 0.12 ไมโครโมลาร์ จะเกิด PCR product ในปริมาณใกล้เคียงกัน (ช่องที่ 7 และ 8) แต่จะน้อยกว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ primer ในช่วง 0.14 ถึง 0.20 ไมโครโมลาร์ (ช่องที่ 9 ถึง 12) ดังนั้นในการทำ PCR ครั้งต่อไป จึงเลือกใช้ primer ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.14 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ magnesium ion

เมื่อทำการทดลองหาปริมาณของ magnesium ion ที่เหมาะสมในการทำ PCR โดยใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆกันคือที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, ... , 4.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

(ข้อ 3.4.2.3) ในขณะที่องค์ประกอบอื่นๆมีความเข้มข้นคงที่ นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis (รูปที่ 10) พบว่าเมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ จะไม่เกิด PCR product ขึ้น (ช่องที่ 3 และ 4) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 1.5 และ 2.0 มิลลิโมลาร์ (ช่องที่ 5 และ 6) จะเกิด PCR product ขึ้นแต่มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (ช่องที่ 7 ถึง 10) ซึ่งจะได้ PCR product ในปริมาณมากที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทำ PCR ครั้งต่อไปจึงเลือกใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำหรับนำมาหาลำดับเบส

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผึ้งโพรงที่เก็บจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทยมาทำ PCR โดยใช้องค์ประกอบต่างๆในการทำ PCR ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทดสอบได้ดังวิธีการทดลองในหัวข้อ 3.4.3 แล้วนำ PCR product จำนวน 5 ไมโครลิตรมาทำ agarose gel electrophoresis (รูปที่ 11) พบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้โดยใช้ผึ้งจากสถานที่ต่างๆ มีขนาดไม่แตกต่างกัน คือมีขนาดประมาณ 750 คู่เบส และไม่มี non specific PCR product หรือ primer dimer เกิดขึ้น

การทำ PCR ในผึ้งชนิดต่างๆ

เมื่อนำผึ้งที่พบในประเทศไทยอีก 4 ชนิดมาทำ PCR (ข้อ 3.4.4) นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตรมาทำ agarose gel electrophoresis (รูปที่ 12) โดยพบว่า PCR product ที่ได้จากผึ้งมิ้มเล็ก ผึ้งมิ้ม และผึ้งหลวงจะมีขนาดใกล้เคียงกัน คือ ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ส่วน PCR product ที่ได้จากผึ้งพันธุ์มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

การทดสอบ primer ที่ใช้สำหรับหาลำดับเบส

เมื่อนำ primer ที่ใช้สำหรับหาลำดับเบส (internal sequencing primer) คือ primer 3 มาทำ PCR คู่กับ primer 2 (ข้อ 3.4.5) นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตรมาทำ agarose gel electrophoresis (รูปที่ 13) โดย PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และไม่มี non specific PCR product ขึ้น ดังนั้น primer 3 จะอยู่ถัดจาก primer สำหรับทำ PCR คือ primer 1 เข้ามาประมาณ 250 คู่เบส

4.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปหาลำดับเบส

PCR product ที่ได้ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปหาลำดับเบส เพื่อป้องกันไม่ให้มีสิ่งที่หลงเหลือจากการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ อาทิเช่น primer, dNTP และเกลือ รวมทั้ง non specific PCR product มารบกวนการทำปฏิกิริยาการหาลำดับเบสที่จะทำในขั้นตอนต่อไป จึงต้องกำจัดสารต่างๆดังกล่าวออกจาก PCR product เสียก่อน โดยในขั้นแรกจะทำการตรวจสอบว่า PCR product ที่ได้มี non specific product เกิดขึ้นหรือไม่ โดยการทำ agarose gel electrophoresis สำหรับ PCR product ที่ไม่มี non specific product เกิดขึ้น จะนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ (wizard minicolumn) (ข้อ 3.6.3.1 ก) จากนั้นละลายดีเอ็นเอที่ได้ในน้ำกลั่น

สำหรับ PCR product ที่มี non specific product เกิดขึ้น ก่อนที่จะนำมาแยกออกจากกันโดย agarose gel electrophoresis ได้นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ polyacrylamide เป็นตัวพา (carrier) ดีเอ็นเอให้ตกตะกอนในเอทธานอล (ข้อ 3.6.1) ทำให้ได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถ load สารสะลายดีเอ็นเอใน 1 ช่องเจลปกติโดยไม่ต้องเพิ่มขนาดช่องเจล หลังจากทำ electrophoresis แล้วจึงตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งมีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ออกมาแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้ Geneclean (ข้อ 3.6.3.2)

ดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วก่อนนำไปหาลำดับเบส จะนำมาหาความเข้มข้นโดยนำมาทำ agarose gel electrophoresis แล้วเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่14) เพื่อทำให้สามารถเตรียมดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นที่พอเหมาะสำหรับนำไปทำปฏิกิริยาของการหาลำดับเบส

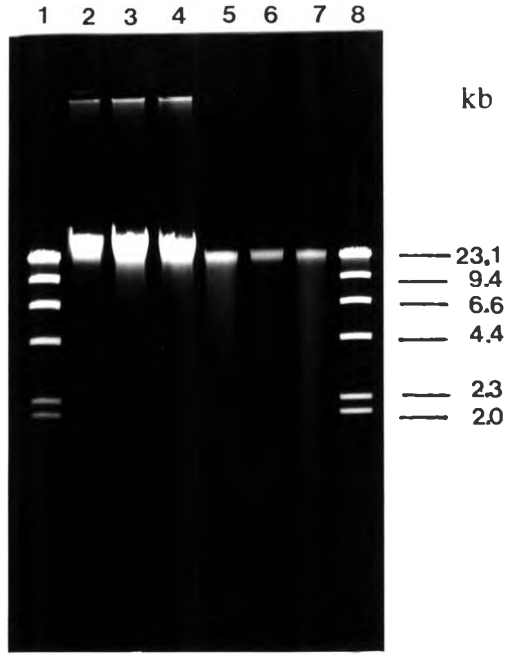
4.4 การหาลำดับเบส

การหาลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ที่เพิ่มจำนวนได้โดยใช้ primer สำหรับหาลำดับเบส (internal sequencing primer) คือ primer 3 ติดฉลากด้วยสารรังสี [γ-^{32}P]ATP แล้วทำปฏิกิริยา cycle sequencing ตามวิธีการหาลำดับเบสในข้อ 3.7 ผลการหาลำดับเบสที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มภายหลังจากทำ autoradiography ดังแสดงในรูปที่ 15 และ 16 การอ่านลำดับเบสจะเริ่มอ่านจากชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ด้านล่างสุดของแผ่นฟิล์ม โดยลำดับเบสที่อ่านได้จะเป็นลำดับเบสของ complementary strand ที่เริ่มจาก

ปลายด้าน 5′ เป็น AAAATTTAATAA และไปสิ้นสุดที่ลำดับเบสเป็น TTATTAAAATTT ทางด้าน 3′ ซึ่งมีความยาวทั้งหมดประมาณ 96-97 เบส ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR บางตัวอย่างได้ส่งไปหาลำดับเบสด้วยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ! ที่สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา (แสดงผลเป็น CCD spectrograph ดังภาคผนวกที่ 8)

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส

ผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทยรวม 17 แห่ง (ตารางที่ 4, รูปที่ 17) นำมาเปรียบเทียบลำดับเบสทั้งหมด 97 เบสของ noncoding intergenic region โดยการทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL (รูปที่ 18) พบว่ามีตำแหน่งของลำดับเบสที่มีความแปรผันอยู่ 9 ตำแหน่งด้วยกัน คือ 16, 17, 30, 32, 34, 43, 49, 56 และ 57 (ตารางที่ 5) และการเปรียบเทียบสายพันธุ์ผึ้งโพรงในประเทศไทยกับผึ้งโพรงประเทศอื่นๆในแถบทวีปเอเชียด้วยกัน ได้แก่ประเทศมาเลย์เซีย อินโดนิเซีย (เกาะบอร์เนียว) ฟิลิปปินส์ (เกาะมินดาเนา) และอินเดีย ซึ่งศึกษาโดย Smith (personal communication) ดังแสดงในรูปที่ 19 เมื่อทำ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม PAUP version 3.0L (Swofford, 1990) โดยใช้ลำดับเบสของผึ้งจากประเทศอินเดียเป็น outgroup จะได้ cladogram ที่สามารถแบ่งกลุ่มผึ้งโพรงในประเทศไทยออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (รูปที่ 20) คือ 1) กลุ่มทางตอนเหนือ ซึ่งเป็นผึ้งที่เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ อุตรดิตถ์ สกลนคร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ และจันทบุรี 2) กลุ่มทางตอนใต้ ซึ่งเป็นผึ้งที่เก็บจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต โดยผึ้งโพรงจากประเทศมาเลย์เซียและอินโดนิเซีย (เกาะมินดาเนา) จะมีความแตกต่างออกไปโดยจะแยกออกเป็นอีก 1 กลุ่ม และจากการทำ bootstrapping โดยใช้ค่า number of replication เท่ากับ 100 ครั้ง จะได้ค่าของ bootstrap value ของกลุ่มทางตอนเหนือเท่ากับ 98 และของกลุ่มทางตอนใต้เท่ากับ 87 ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูงพอที่จะทำให้ cladogram ที่ได้มีความน่าเชื่อถือ



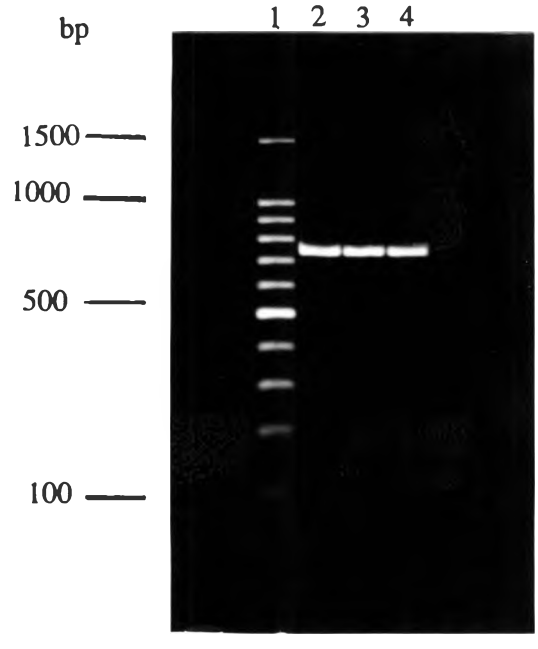
รูปที่ 6 ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งโพรง

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผึ้งโพรงหนึ่งตัวนำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

ช่องที่ 1 และ 8 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/HindIII)

ช่องที่ 2 ถึง 4 ดีเอ็นเอทั้งหมดของผึ้งโพรงในระยะดักแด้ (สกัดจากผึ้งทั้งตัวจำนวนหนึ่งตัว)

ช่องที่ 5 ถึง 7 ดีเอ็นเอทั้งหมดของผึ้งโพรงในระยะตัวเต็มวัย (สกัดจากส่วนหน้าอกของผึ้งหนึ่งตัว)

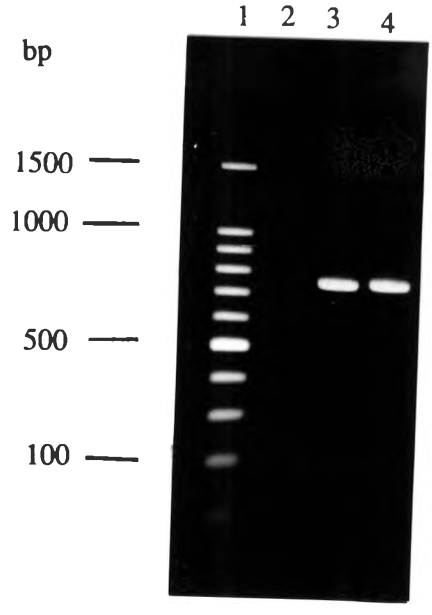


รูปที่ 7 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน mtDNA ของผึ้งโพรงซึ่งมีส่วน noncoding intergenic region ระหว่างยีน COI และ COII อยู่ด้วย

นำ PCR product จำนวน 5 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ช่องที่ 2 ถึง 4 ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้

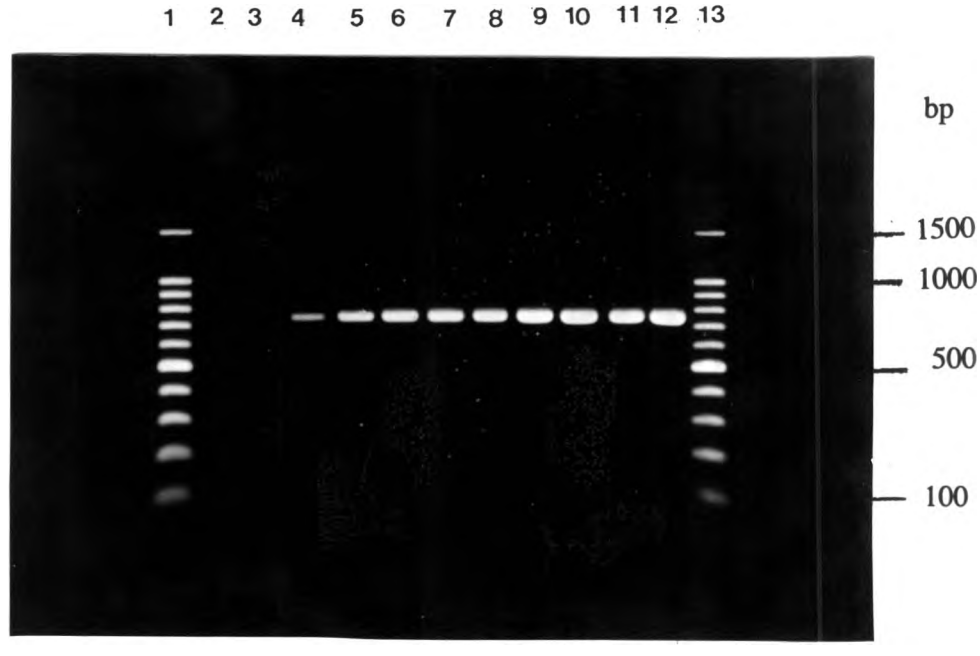


รูปที่ 8 ผลการหาความเข้มข้นของ nucleotide ที่เหมาะสมในการทำ PCR

นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ช่องที่ 2 ถึง 4 ใช้ความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดเป็น 0, 100, 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

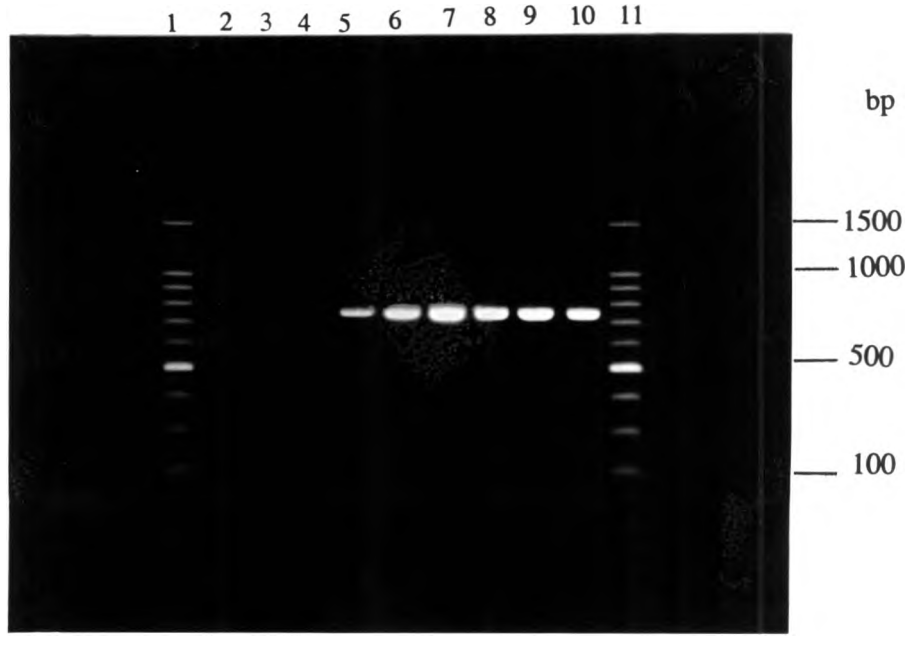


รูปที่ 9 ผลการหาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในการทำ PCR

นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่งโมง 30 นาที

ช่องที่ 1 และ 13 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ช่องที่ 2 ถึง 12 ใช้ primer 1 และ primer 2 ที่ความเข้มข้นชนิดละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 , ... , 0.20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

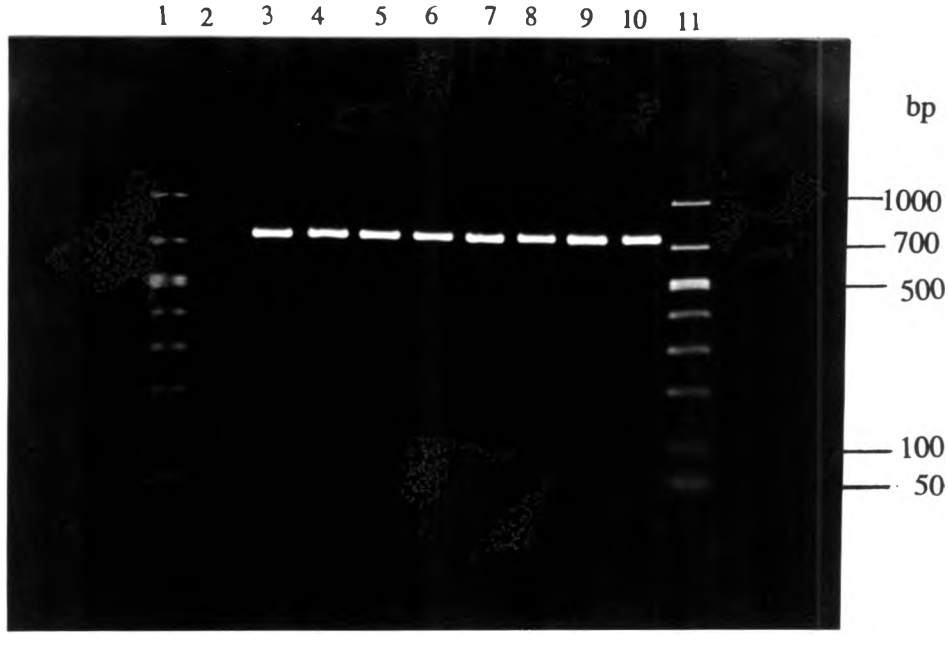


รูปที่ 10 ผลการหาความเข้มข้นของ Mg ion ที่เหมาะสมในการทำ PCR

นำ PCR product จำนวน 10 ไมโครลิตร มาทำ agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่งโมง 30 นาที

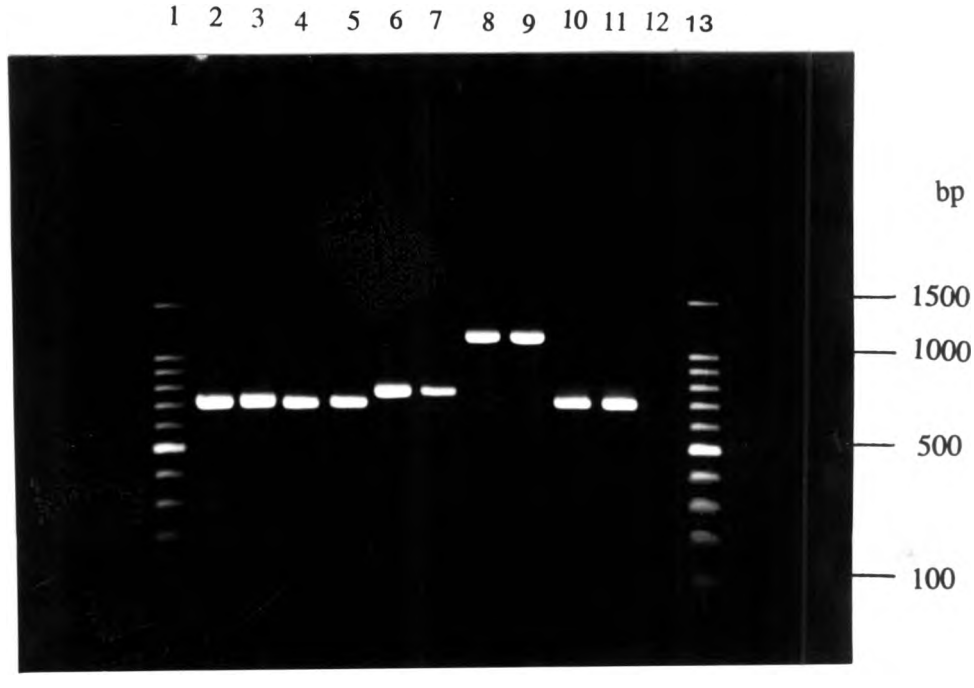
ช่องที่ 1 และ 11 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ช่องที่ 2 ถึง 10 ใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



รูปที่ 11 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย

ช่องที่ 1 และ 11	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (50-100 bp DNA ladder)
ช่องที่ 2	ปฏิกิริยาควบคุม (negative control)
ช่องที่ 3	ผึ้งโพรงจากจังหวัดเชียงใหม่
ช่องที่ 4	ผึ้งโพรงจากจังหวัดอุดรดิตถ์
ช่องที่ 5	ผึ้งโพรงจากจังหวัดอุบลราชธานี
ช่องที่ 6	ผึ้งโพรงจากจังหวัดบุรีรัมย์
ช่องที่ 7	ผึ้งโพรงจากจังหวัดจันทบุรี
ช่องที่ 8	ผึ้งโพรงจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์
ช่องที่ 9	ผึ้งโพรงจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี
ช่องที่ 10	ผึ้งโพรงจากเกาะสมุย



รูปที่ 12 ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นของผึ้งชนิด (species) ต่างๆ

ช่องที่ 1 และ 13 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ช่องที่ 2 และ 3 ผึ้งมิ้มเล็ก (*Apis andreniformis*)

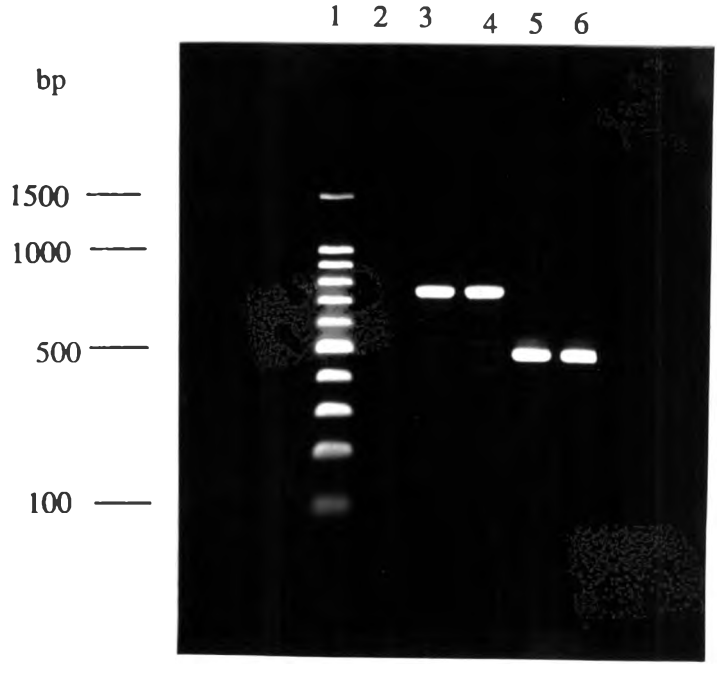
ช่องที่ 4 และ 5 ผึ้งมิ้ม (*Apis florea*)

ช่องที่ 6 และ 7 ผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

ช่องที่ 8 และ 9 ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)

ช่องที่ 10 และ 11 ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*)

ช่องที่ 12 ปฏิกิริยาควบคุมชนิดลบ (negative control)



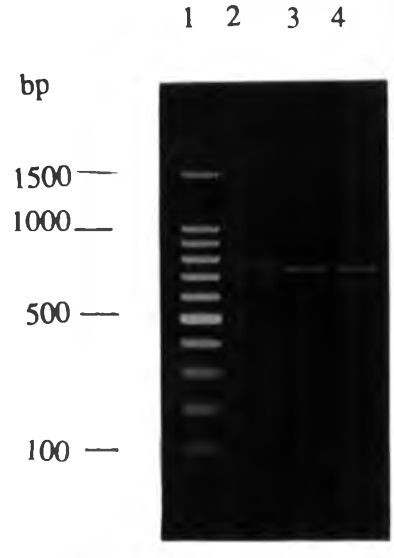
รูปที่ 18 ผลการทำ PCR โดยใช้ internal sequencing primer (primer 3) กับ amplification primer 2 เทียบกับการใช้ amplification primer 1 กับ 2

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

ช่องที่ 2 ปฏิริยาควบคุมชนิดลบ (negative control)

ช่องที่ 3 และ 4 เมื่อใช้ primer 1 กับ primer 2

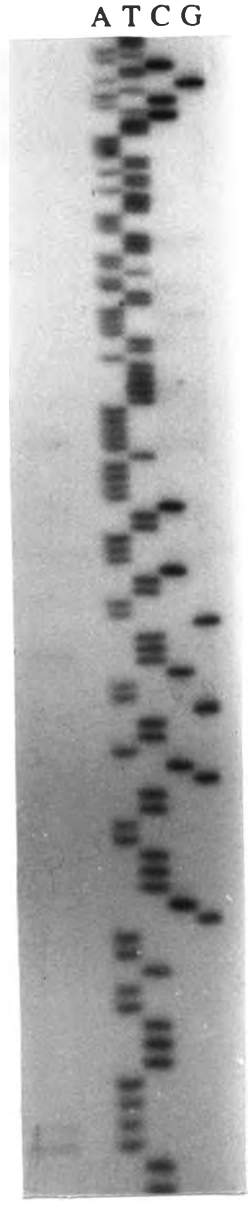
ช่องที่ 5 และ 6 เมื่อใช้ primer 3 กับ primer 2



รูปที่ 14 การหาปริมาณดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วก่อนนำไปหาลำดับเบส โดยเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

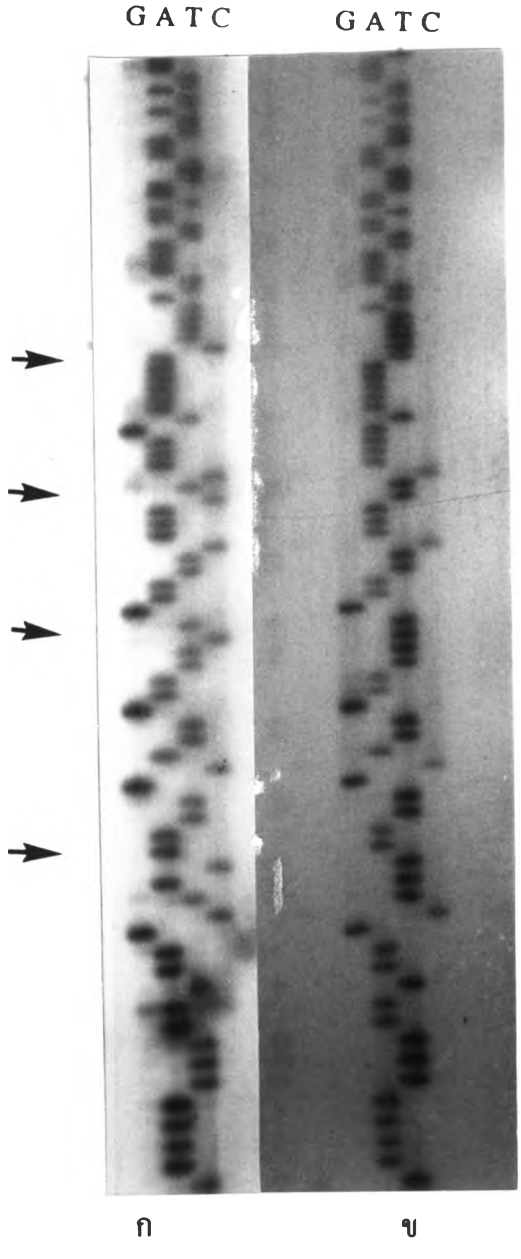
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

ช่องที่ 2 ถึง 4 ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วจำนวน 1 ไมโครลิตร



รูปที่ 15 แสดงผลการหาลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากจังหวัดภูเก็ต

แถบดำเป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มหลังจากทำ autoradiography การอ่านลำดับเบสอ่านจากด้านล่างไปยังด้านบน โดยเริ่มจากปลายด้าน 5′ ไปยังด้าน 3′



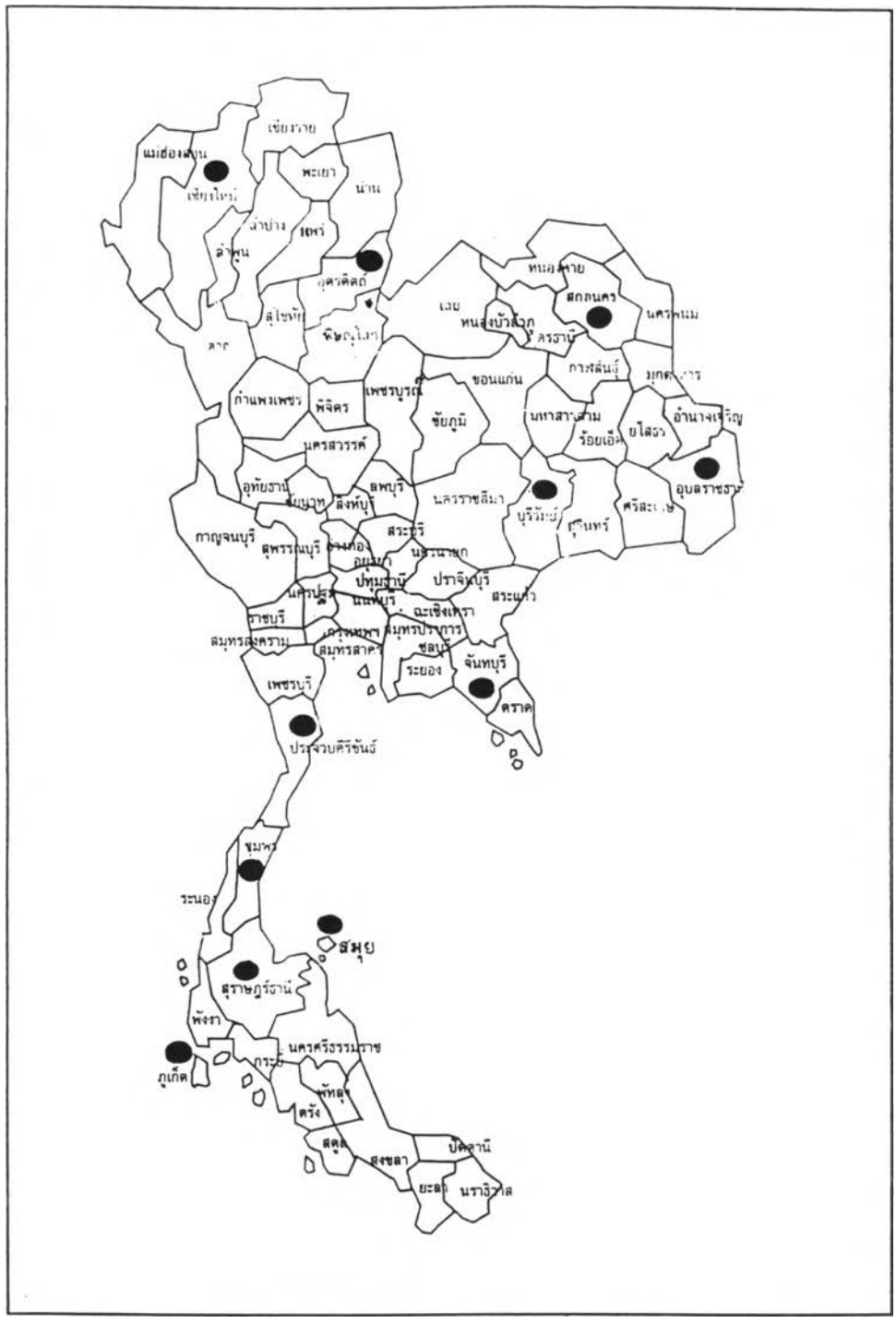
รูปที่ 16 แสดงผลการหาลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากภาคใต้เปรียบเทียบกับผึ้งโพรงจากภาคเหนือ โดยลูกศรแสดงถึงตำแหน่งเบสที่มีความแตกต่างกัน

ก. ผึ้งโพรงจากจังหวัดเชียงใหม่

ข. ผึ้งโพรงจากจังหวัดชุมพร

ตารางที่ 4 รายชื่อสถานที่ต่างๆในประเทศไทยที่ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งโพรงและนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์

จังหวัด	สถานที่เก็บตัวอย่าง
เชียงใหม่	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง
อุตรดิตถ์	ฟาร์มผึ้งบุปผาชาติ ถ.เจริญธรรม อ.เมือง
สกลนคร	ต.อากาศอำนวย อ.อากาศอำนวย
อุบลราชธานี	บ้านพักตำรวจรถไฟ อ.วารินชำราบ
บุรีรัมย์	ถ.ชัยศิริ อ.ประโคนชัย
จันทบุรี	หมู่บ้านพังงอน ต.ทับไทร อ.โป่งน้ำร้อน
ประจวบคีรีขันธ์	ต.ศาลาลัย
ชุมพร 1	ต.ถ้ำสิงห์ อ.เมือง
ชุมพร 2	ศูนย์วิจัยพืชสวน อ.สวี
สุราษฎ์ธานี 1	ต.สมอทอง อ.ท่าชนะ
สุราษฎ์ธานี 2	อ.กาญจนดิษฐ์
	อ.เกาะสมุย 1 ต.อ่างทอง
	อ.เกาะสมุย 2 ต.มะเร็ต
	อ.เกาะสมุย 3 ต.ตลิ่งงาม
	อ.เกาะสมุย 4 ต.ลิปะน้อย
	อ.เกาะสมุย 5 บ้านเฉวง ต.บ่อผุด
ภูเก็ต	ต.วิชิต อ.เมือง



รูปที่ 17 แผนที่แสดงตำแหน่งของจังหวัดที่เก็บตัวอย่างผึ้งโพรงในประเทศไทย

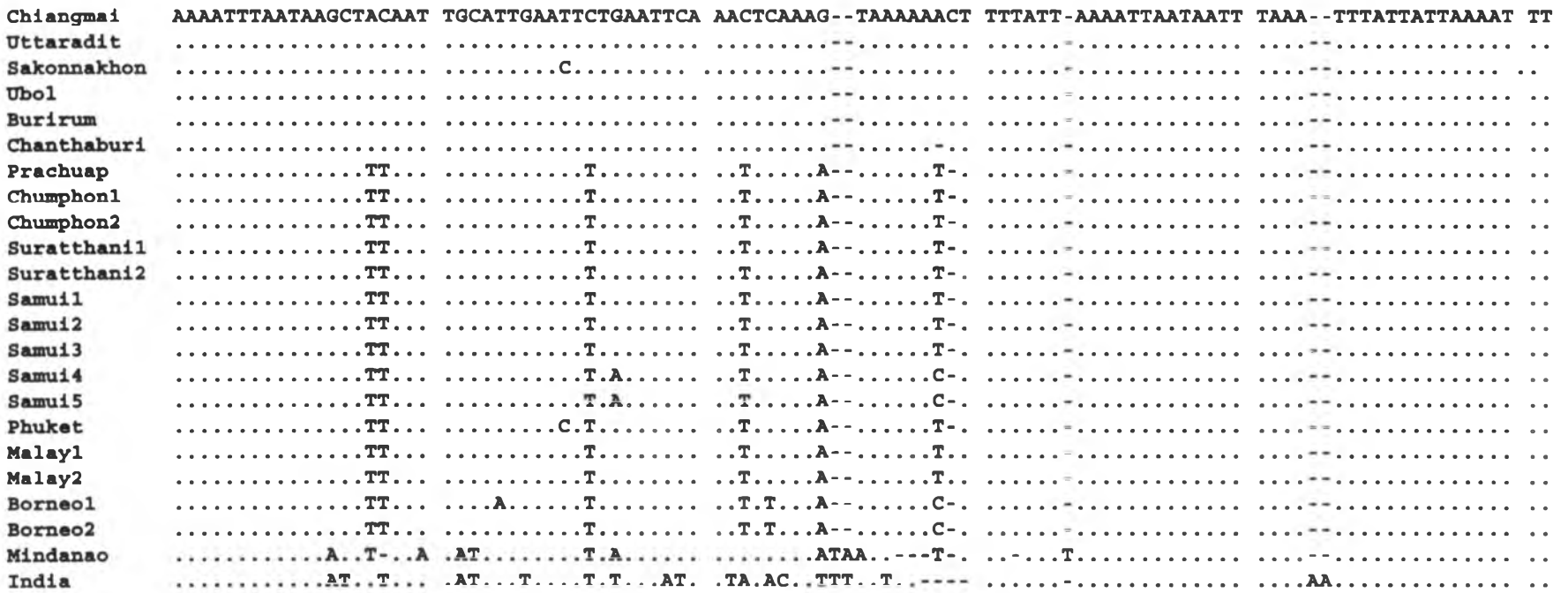
● จังหวัดที่นำผึ้งโพรงมาทดสอบ

```
                          20                  40                  60                  80                  97
Chiangmai     AAAATTTAATAAGCTACAAT TGCATTGAATTCTGAATTCA AACTCAAAGTAAAAAACTTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Uttaradit     AAAATTTAATAAGCTACAAT TGCATTGAATTCTGAATTCA AACTCAAAGTAAAAAACTTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Sakonnakhon   AAAATTTAATAAGCTACAAT TGCATTGAACTCTGAATTCA AACTCAAAGTAAAAAACTTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Ubol          AAAATTTAATAAGCTACAAT TGCATTGAATTCTGAATTCA AACTCAAAGTAAAAAACTTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Burirum       AAAATTTAATAAGCTACAAT TGCATTGAATTCTGAATTCA AACTCAAAGTAAAAAACTTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Chanthaburi   AAAATTTAATAAGCTACAAT TGCATTGAATTCTGAATTCA AACTCAAAGTAAAAA-CTTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Prachuap1     AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Chumphon1     AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Chumphon2     AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Suratthani1   AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Suratthani2   AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Samui1        AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Samui2        AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Samui3        AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Samui4        AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTAAATTCA AATTCAAAATAAAAAC-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Samui5        AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAATTTTAAATTCA AATTCAAAATAAAAAC-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
Phuket        AAAATTTAATAAGCTTTAAT TGCATTGAACTTTGAATTCA AATTCAAAATAAAAAT-TTT TATTAAAATTAATAATTTAA ATTTATTATTAAAATTT
```

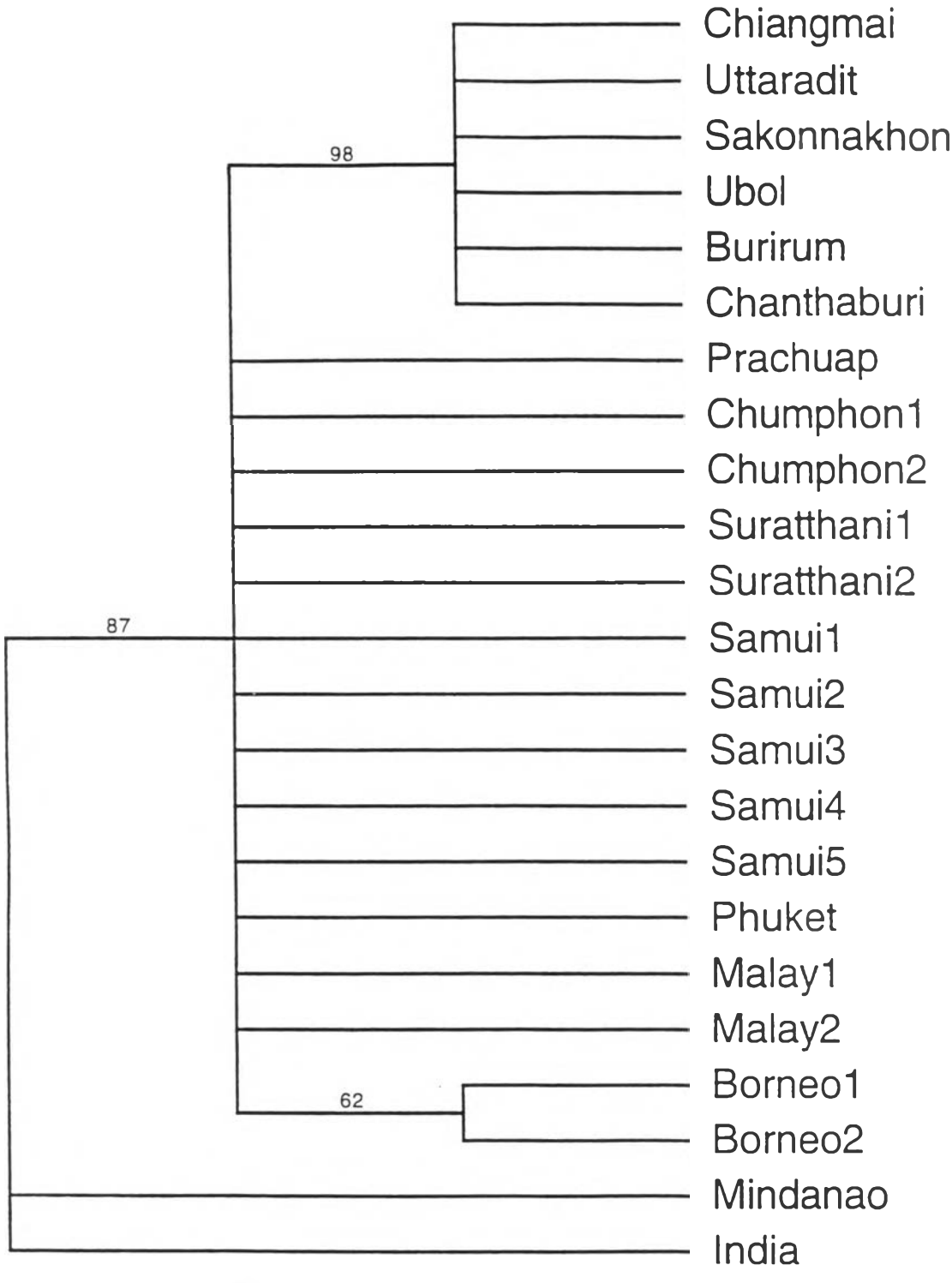
รูปที่ 18 การทำ multiple sequence alignment ของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่างๆใน ประเทศไทย โดยโปรแกรม CLUSTAL (Higgins and Sharp,1988)

ตารางที่ 5 แสดงตำแหน่งของลำดับเบสที่มีความแปรผันของส่วน noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงที่เก็บจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทย

จังหวัด	ลำดับเบสที่ 16 17 30 32 34 43 49 56 57
เชียงใหม่	A C T C G C G A C
อุตรดิตถ์	A C T C G C G A C
สกลนคร	A C C C G C G A C
อุบลราชธานี	A C T C G C G A C
บุรีรัมย์	A C T C G C G A C
จันทบุรี	A C T C G C G - C
ประจวบคีรีขันธ์	T T T T G T A T -
ชุมพร 1	T T T T G T A T -
ชุมพร 2	T T T T G T A T -
สุราษฎร์ธานี 1	T T T T G T A T -
สุราษฎร์ธานี 2	T T T T G T A T -
สมุย 1	T T T T G T A T -
สมุย 2	T T T T G T A T -
สมุย 3	T T T T G T A T -
สมุย 4	T T T T A T A C -
สมุย 5	T T T T A T A C -
ภูเก็ต	T T C T G T A T -



รูปที่ 19 ลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากประเทศไทยเปรียบเทียบกับผึ้งโพรงจากสถานที่อื่น ได้แก่ ประเทศมาเลย์เซีย, อินโดนิเซีย (เกาะบอร์เนียว), ฟิลิปปินส์ (เกะมินดาเนา) และอินเดีย ซึ่งศึกษาโดย Smith (personal communication)



รูปที่ 20 cladogram ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ noncoding intergenic region ใน mtDNA ของผึ้งโพรงจากแหล่งต่างๆ ที่วิเคราะห์โดยโปรแกรม PAUP ใช้วิธี heuristic search โดยมีผึ้งจากประเทศอินเดียเป็น outgroup และทำ bootstrapping โดยใช้ค่า number of replication เท่ากับ 100 ครั้ง ตัวเลขที่ปรากฏใน cladogram เป็นค่า bootstrap value