บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการวิจัยนี้ได้เตรียมดีเอ็นเอติดตาม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรงในประเทศไทย โดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) จึงทำการโคลน (cloning) เพื่อคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ (repetitive sequences) จาก genomic DNA เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม เนื่องจากเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากต่อหนึ่งหน่วยของ genomic DNA ดังนั้นจึงทำให้ดีเอ็นเอติดตามที่ได้มีความไวในการตรวจสอบสูง (สกล พันธุ์ยิ้ม, 2530) นอกจากนั้นแล้วจากรายงานของ Hall (1986) สามารถใช้ส่วนของ repetitive sequences ของผึ้งพันธุ์ยุโรปเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งพันธุ์ในอเมริกาได้

ขั้นตอนแรกของงานวิจัยเป็นการเตรียมดีเอ็นเอติดตามจากผึ้งโพรง โดยใช้ตัวอย่างเป็นผึ้งงานในระยะดักแด้อายุประมาณ 11-13 วัน เนื่องจากเป็นระยะที่ทำการบดได้ง่ายและเป็นการเก็บตัวอย่างจากรังโดยตรง ซึ่งถ้าใช้ตัวอย่างที่เป็นตัวเต็มวัย อาจเกิดปัญหาจากเป็นผึ้งที่บินมาจากรังอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้ (Hall, 1991) นอกจากนั้นแล้วการใช้ตัวอย่างผึ้งระยะนี้ยังพบว่าหลังสกัดจะให้ปริมาณของดีเอ็นเอค่อนข้างคงที่ในผึ้งแต่ละตัวด้วย (Severson และคณะ, 1988) สำหรับวิธีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของผึ้งโพรงในการวิจัยใช้ 2 วิธี คือ การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ (ข้อ 2.10.1.ก) และการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้ง (total DNA) (ข้อ 2.10.1.ข) ซึ่งในการสกัดวิธีแรกจะเป็นการสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งโพรงทันทีหลังเก็บตัวอย่างดักแด้ซึ่งเหมาะที่จะใช้ในกรณีที่เป็นตัวอย่างผึ้งที่อยู่ใกล้ห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อได้ทดลองเก็บตัวอย่างผึ้งโพรงในน้ำแข็งเป็นเวลานานประมาณ 2-3 ชั่วโมงขึ้นไป แล้วนำมาสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้บางตัวอย่างเกิดการขาดเป็นชิ้นเล็กๆ ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง

ผึ้งโพรงที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ จึงไม่สามารถใช้วิธีการสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอได้ จึงได้เปลี่ยนเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้ง (total DNA) ซึ่งเป็นวิธีที่สกัดแล้วจะได้ส่วนไมโทคอนเดรียปน แต่จากผลการทดลอง (รูปที่ 4) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก 2 วิธี จะอยู่ในรูป high molecular weight มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส และพบเพียงขนาดเดียวเท่านั้น โดยเฉพาะในการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จะไม่พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 15-19 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของไมโทคอนเดรียในสัตว์เลย (Smith, 1988) แสดงให้เห็นได้ว่าการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์จากดักแด้ผึ้งในระยะที่มีอายุ 11-13 วันนี้ มีไมโทคอนเดรียปนน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับแนวทฤษฎีที่ว่า ระยะดักแด้เป็นระยะที่ไม่มีกิจกรรมการเคลื่อนไหว ดังนั้นทำให้พบไมโทคอนเดรียในเซลล์ค่อนข้างน้อย นอกจากนั้นแล้วในวิธีการสกัดไมโทคอนเดรียของผึ้งจากรายงานของ Smith (1988) ใช้ตัวอย่างของผึ้งในระยะตัวเต็มวัยตัดเฉพาะส่วนอก (thoraces) ซึ่งจะเป็นส่วนที่มีกล้ามเนื้อที่ใช้บังคับการบินอยู่จำนวน 100 ตัว จึงจะพอเพียงในการนำไปศึกษา ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าการสกัดวิธีนี้จะมีดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรียปนน้อยมาก จนไม่มีผลกับการวิเคราะห์ เพราะการวิเคราะห์ด้วย RFLP ในการทดลองนี้ ใช้ดีเอ็นเอจากดักแด้ผึ้งโพรงเพียงครึ่งหรือหนึ่งตัวเท่านั้น สำหรับคุณภาพของโครโมโซมัลดีเอ็นเอและดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้งโพรงที่สกัดได้จาก 2 วิธีนี้จะพบว่า มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ และมีโปรตีนและฟีนอลปนอยู่น้อยมาก ทั้งนี้เพราะค่า $OD_{260/280}$ ที่ได้อยู่ระหว่างค่า 1.65-1.85 หรือมากไปกว่าเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับดีเอ็นเอพาหะที่เลือกใช้คือ พลาสมิด pUC18 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่เหมาะสมในการโคลนเนื่องจาก 1) มีชุดการจำลองตัวสูงถึง 500-700 ชุดต่อเซลล์ 2) มียีนต้านยาแอมพิซิลลินและยีน *lac* Z ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ β-galactosidase ด้านปลายของหมู่อะมิโน (N-terminal) 3) มีส่วนของ multicloning site อยู่บนส่วนยีน *lac* Z 4) การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมทำเพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้น เนื่องจากการเชื่อมต่อที่ส่วน multicloning site จะเป็นการ inactivate ยีน *lac* Z ทำให้ไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ได้ตามปกติ ดังนั้นเมื่อทำการกระจายเชื้อจากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอบนจานอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, X-gal และIPTG จะทำให้ได้ลักษณะโคโลนี 2 แบบคือโคโลนีสีฟ้าและโคโลนีสีขาว โคโลนีสีฟ้าแสดงถึงโคโลนีของ

ดีเอ็นเอพาหะเดิมที่กลับมาเชื่อมต่อกัน จีน *lac* Z จึงยังทำงานได้ตามปกติและให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิด α-complementary ได้กับผลิตภัณฑ์ด้าน c-terminal ของ β-galactosidase จากเซลล์เจ้าเรือน (*E. coli* สายพันธุ์ DH5α) จึงทำให้เกิด β-galactosidase ที่สมบูรณ์ย่อยสารตั้งต้น X-gal เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีฟ้า โดยมี IPTG เป็นตัวชักนำ (inducer) ส่วนโคโลนีสีขาวแสดงถึงเป็นโคโลนีของดีเอ็นเอลูกผสม เพราะได้ผลิตภัณฑ์ β-galactosidase ที่ไม่สมบูรณ์จึงเหลือคุณสมบัติการต้านยาเพียงอย่างเดียว (Maniatis และคณะ, 1982)

ในการเตรียมดีเอ็นเอติดตามโดยการโคลนชุดแรก ได้ใช้โครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงที่เก็บจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาย่อยแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI เหตุที่เลือก *Eco*RI เพราะมีราคาถูกและตำแหน่งของการตัดของ *Eco*RI อยู่บน multicloning site (บนจีน *lac* Z) ของดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ที่จะเลือกใช้ หลังจากตัดพลาสมิด pUC18 ด้วย *Eco*RI แล้วจึงเชื่อมต่อดีเอ็นเอทั้ง 2 ส่วน สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อดีเอ็นเอนั้น มีรายงานว่าอุณภูมิที่เหมาะสมคือ 12-16 °ซ และเวลาที่ใช้ในการบ่มประมาณ 15-20 ชั่วโมง (จรัญญา เงินประเสริฐศิริ, 2528) ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกบ่มที่อุณหภูมิ 15 °ซ นาน 15 ชั่วโมง

ในขั้นตอนการทำทรานสฟอร์ม เซลล์เจ้าเรือนที่เลือกใช้คือ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากการศึกษาประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์ม (โดยการใช้พลาสมิด pBR322 เป็นพลาสมิดในการทรานสฟอร์ม) เมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์มีค่าเท่ากับ $0.64\text{-}2.4\times10^{5}$ ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ และเมื่อใช้รูบิเดียมคลอไรด์มีค่าเท่ากับ $0.85\text{-}2.0\times10^{4}$ ต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ (ตารางที่ 5) ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่าค่าที่ได้เคยมีรายงานไว้ โดยค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มด้วยวิธีการใช้แคลเซียมคลอไรด์เท่ากับ $5\times10^{8}\text{-}2\times10^{7}$ โคโลนีต่อไมโครกรัม supercoil plasmid DNA (Cohen และคณะ, 1972) และ วิธีการใช้รูบิเดียมคลอไรด์มีค่าเท่ากับ 5×10^{8} โคโลนีต่อไมโครกรัม supercoil plasmid DNA (Hanahan, 1983) ซึ่งเหตุที่ได้ค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มต่ำคงจะเนื่องมาจาก พลาสมิดที่ใช้ในการทรานสฟอร์มในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้อยู่ในรูป supercoil DNA ทั้งหมดมีเพียงบางส่วนเท่านั้น จากผลการทดลองที่พบว่าค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มในการใช้แคลเซียมคลอไรด์สูงกว่าการใช้รูบิเดียมคลอไรด์ จึงได้เลือกใช้

แคลเซียมคลอไรด์ในการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ สำหรับการทรานสฟอร์มในงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งผลของการทดลองพบว่า ค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมระหว่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงกับพลาสมิด pUC18 ได้ค่าเพียง $8.6x10^3$ และได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่เป็นดีเอ็นเอลูกผสมเพียง 13.27 เปอร์เซ็นต์ เหตุที่ได้การทรานสฟอร์มต่ำในครั้งนี้คาดว่ามาจาก ขั้นตอนการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอพาหะพลาสมิด pUC18 ซึ่งไม่ได้ทำ dephosphorylation และขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ ที่ไม่สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพของการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ โดยไม่สามารถบอกได้ว่าดีเอ็นเอที่ใช้ในการเชื่อมต่อตอนเริ่มต้นนั้น เกิดการเชื่อมต่อกันจริงๆ เท่าไร ซึ่งถ้าประสิทธิภาพของการเชื่อมต่อดีเอ็นเอต่ำ จะมีผลให้ได้ดีเอ็นเอลูกผสมเกิดขึ้นน้อย

ดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้เมื่อนำมาศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insertโดยการเลือกโคลนแบบสุ่มมา 50 โคลน นำมาเพิ่มปริมาณและสกัดส่วนของพลาสมิดของแต่ละโคลนแล้วย่อยด้วย *Eco*RI หลังวิเคราะห์ขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (รูปที่ 9) พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert พบมากอยู่ในช่วง 2-4 กิโลเบส และจะไม่พบขนาดที่มากกว่า 8 กิโลเบสเลย ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่มีผู้รายงานไว้ว่าเมื่อขนาดของพลาสมิดใหญ่มากกว่า 10 กิโลเบส ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มจะลดลงมาก (Maniatis และคณะ, 1982) จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอลูกผสมของแต่ละทรานสฟอร์แมนท์ที่โคลนได้ มาตรวจสอบหา repetitive sequences โดยวิธี dot blot hybridization ซึ่งทำโดยตรึงดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดได้จากแต่ละโคลนลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยปริมาณที่เท่ากันทุกโคลน และนำมาไฮบริไดซ์กับโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง (ตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ในการโคลน) ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี หลังจากนั้นจึงตรวจความเข้มของสัญญาณการเกิดไฮบริด ดีเอ็นเอลูกผสมที่แสดงสัญญาณเข้ม แสดงถึงว่ามี repetitive sequences ส่วนดีเอ็นเอลูกผสมที่แสดงสัญญาณอ่อนแสดงถึงมีส่วนของ single copy gene หรือ low copy sequences (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2536) และนำดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences นี้มาทดสอบใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม คัดเลือกหาดีเอ็นเอลูกผสมที่สามารถจำแนกความแตกต่างในสายพันธุ์ผึ้งโพรงได้ด้วยการหา RFLP โดยทำ Southern-blot hybridization

ทั้ง dot blot และ Southern-blot hybridization เป็นวิธีการวิเคราะห์ผล

โดยใช้หลักของ nucleic acid hybridization ซึ่งจะติดตามการเกิดไฮบริดระหว่างดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์และดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) เพื่อให้ติดตามการเกิดไฮบริดได้ง่ายจึงใช้การติดฉลากที่ดีเอ็นเอติดตาม ซึ่งมีทั้งการใช้สารรังสี และสารปลอดรังสี โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้สารปลอดรังสี เนื่องจากสะดวกและสามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน ในขณะที่การใช้สารรังสีที่นิยมใช้ในการติดฉลากคือ ^{32}P dNTP จะมีค่าครึ่งชีวิต (half life) สั้นเพียง 14 วันเท่านั้น และให้อนุภาคที่เปล่งออกมามีพลังงานสูง จึงต้องระมัดระวังในการปฏิบัติ (ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร, 2530) สำหรับสารปลอดรังสีนั้นเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ในการติดตามผลมักจะมีความไวต่ำกว่าการใช้สารรังสี แต่การวิจัยครั้งนี้เป็นการไฮบริไดซ์ระหว่าง ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากดีเอ็นเอของผึ้งโพรง กับตัวอย่างที่เป็นดีเอ็นเอของผึ้งโพรง ดังนั้นจึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์ homology สูงจึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้

โดยได้ใช้ digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steroid hapten ในรูป DIG-11-dUTP (Boehringer, 1993) เป็นสารติดฉลากและใช้วิธีการติดฉลากเป็นแบบ random primed labelling ซึ่งหลักการของวิธีนี้คือ การใช้ hexanucleotide primer ซึ่งจะมีการเรียงลำดับแบบสุ่มเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกัน จากนั้นจึงเติมเอนไซม์ Klenow fragment ของ DNA polymerase I เพื่อให้เกิดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ dNTP และ DIG-11-dUTP (Kirby, 1992) และในขั้นตอนของการวิเคราะห์สัญญาณการเกิดไฮบริด จะทำโดยใช้หลักการทางด้านอิมมูโนวิทยาโดยใช้ Anti-DIG-alkaline phosphatase หรือแอนติบอดีของ digoxigenin ซึ่งจะมีด้านปลายเป็นเอนไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติมสารตั้งต้นที่อาจเป็นสารที่มีสี หรือสารเรืองแสงสำหรับเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา จึงสามารถติดตามได้ตามชนิดของสารตั้งต้น (Boehringer, 1993)

ผลการคัดดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ของผึ้งโพรง โดยการทำ dot blot hybridization จากการโคลนชุดแรกที่เตรียมจากโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงภาคกลางนั้น ได้คัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมที่ให้สัญญาณการเกิดไฮบริดเข้มได้แก่ ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #9, #25, #35, #36 และ #49 (รูปที่ 10ก, ส่วนที่ 3) นำมาติดฉลากเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม (ข้อ 2.11.1) โดยไม่ได้ตัดส่วนของดีเอ็นเอพาหะออก เนื่องจากผลการทำ

dot blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ (พลาสมิด pUC18, พลาสมิด pBR322, พลาสมิด pACYC184, ดีเอ็นเอจาก calf thymus และดีเอ็นเอจากแลมบ์ดา) ที่นำมาทดสอบไฮบริไดซ์กับโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง (รูปที่ 10ก, ส่วนที่ 2) จะพบว่าโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรง ไม่สามารถเกิดการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เลย รวมทั้งพลาสมิด pUC18 แต่จากการที่สัญญาณการเกิดไฮบริดที่ได้ไม่ค่อยเข้ม จึงได้พยายามปรับปรุงโดยตัดเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอ insert นำมาติดฉลากด้วยวิธีเดียวกัน ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามแทนดีเอ็นเอลูกผสม ซึ่งพบว่าผลการไฮบริไดซ์ที่ได้ไม่พบสัญญาณที่ชัดเจนขึ้นมากไปกว่าเดิม ซึ่งอาจเป็นเพราะลำดับเบสที่ได้รับการติดฉลาก (ทั้งการติดฉลากดีเอ็นเอลูกผสม และการติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอ insert) ที่สามารถเกิดการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอตัวอย่างได้นั้นมีจำนวนคงที่

สำหรับการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของผึ้งโพรง โดยการวิเคราะห์ RFLP นั้น จะศึกษาจากการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ที่คัดเลือกได้กับ Southern blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์หลัก 2 ชนิด คือ *Eco*RI หรือ *Hae*III ทั้งนี้เนื่องจากรายงานของ Sylvester (1993) ได้ใช้ *Eco*RI วิเคราะห์สายพันธุ์ของผึ้งโพรงโดยใช้ดีเอ็นเอของผึ้งพันธุ์เตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม และ Hall (1980) ได้ใช้ *Hae*III ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของผึ้งพันธุ์ในอเมริกา นอกจากนั้นแล้วยังใช้เอนไซม์ชนิดอื่นๆ ทดลองอีกคือ *Bgl*II, *Alu*I, *Xba*I หรือ *Hind*III

ซึ่งในขั้นตอนก่อนการทำ Southern blot ภายหลังจากย่อยดีเอ็นเอปริมาณ 3.5 ไมโครกรัมของผึ้งโพรงที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศไทยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ แล้ว จึงนำไปแยกโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บันทึกโดยการถ่ายภาพ (ตัวอย่างดังแสดงในภาคผนวกที่ 8) ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดต่ำกว่า 23.1 กิโลเบส ทั้งหมด หลังจากนั้นจึงเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลขึ้นสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน ได้ทดสอบว่ามีการเคลื่อนย้ายแถบดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลได้สมบูรณ์ โดยการตรวจหาดีเอ็นเอที่เหลือค้างบนอะกาโรสเจล โดยการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ผลการทดสอบพบว่าไม่มีดีเอ็นเอเหลือค้างอยู่บนอะกาโรสเจล

ผลการใช้ดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences ที่คัดได้จากการโคลนโครโม

โซมัลดีเอ็นเอของผึ้งโพรงภาคกลาง ซึ่งได้แก่ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #9, #25, #35, #36 และ #49 ในการเป็นดีเอ็นเอติดตาม วิเคราะห์การแปรผันของดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ พบว่าเมื่อย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI หรือ *Hae*III แล้วทำ Southern-blot hybridization กับดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากทุกโคลน (#9, #25, #35, #36 และ #49) ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ได้ โดยทุกตัวอย่างจะให้รูปแบบของการไฮบริไดซ์ (hybridization pattern) เหมือนกันหมด (รูปที่ 11)

จึงได้ทดลองเปลี่ยนชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ โดยใช้ *Bgl*II ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 พบว่าได้รูปแบบของการไฮบริไดซ์ของตัวอย่างผึ้งโพรงที่ใช้ทดสอบ เหมือนกันทั้งหมด และเมื่อทดลองใช้เอนไซม์ *Alu*I, *Xba*I และ *Hind*III พบว่ายังให้รูปแบบของการไฮบริไดซ์ของตัวอย่างผึ้งโพรงที่ใช้ในการทดสอบ เหมือนกันทั้งหมด นั่นคือไม่สามารถใช้ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #9, #25, #35, #36 และ #49 เป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของผึ้งโพรงได้

ดังนั้นจึงได้ทำการโคลนขึ้นใหม่เป็นการโคลนดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) ผึ้งโพรงจากเกาะสมุย สาเหตุที่เลือกใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอนี้เพราะ มีผลจากการวิเคราะห์ทางมอโฟเมตริก แสดงว่าผึ้งโพรงจากเกาะสมุยสามารถแยกเป็นหนึ่งกลุ่ม ออกจากแผ่นดินใหญ่ (Limbipichai, 1990) ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าจีโนไทป์ (genotype)หรือโครโมโซมัลดีเอ็นเอของผึ้งจากเกาะสมุยนี้น่าจะมีความแตกต่างจากผึ้งบนแผ่นดินใหญ่ค่อนข้างมาก จึงทำการโคลนชุดใหม่โดยใช้วิธีเดิม ได้โคลนประมาณ 1000 โคโลนี หลังสกัดดีเอ็นเอลูกผสมจากแต่ละโคลนแล้ว จึงนำมาทำ dot blot hybridization เพื่อคัดเลือกหาดีเอ็นเอลูกผสมที่มี repetitive sequences โดยตรึงดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดได้จากแต่ละโคลน ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยปริมาณที่เท่ากันทุกโคลน และนำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ผึ้ง (ตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ในการโคลน) ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี

ผลการทำ dot blot hybridization (รูปที่ 10ข) ได้คัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมที่มีสัญญาณเข้มนำมาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตามด้วยวิธีเดียวกันกับการโคลนชุดที่ 1โดยดีเอ็นเอลูกผสมที่คัดเลือกได้คือ ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #53, #72, #77, #80 และ #99 และทดสอบหาดีเอ็นเอลูกผสมที่เป็นดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะสม ด้วยวิธี Southern-blot hybridization

โดยนำดีเอ็นเอลูกผสมที่คัดเลือกได้เหล่านี้มาทดสอบเป็นดีเอ็นเอติดตาม ไฮบริไดซ์กับ Southern blot ของดีเอ็นเอผึ้งโพรงจากพื้นที่ต่างๆ ที่ย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hae*III ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 พบว่าดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #53, #72, #77 และ #80 ไม่ให้ความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรงที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ เช่นเดียวกับผลการโคลนในชุดแรกแต่ผลการใช้ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 พบว่าให้สัญญาณการไฮบริไดซ์ที่ชัดเจน ทั้งการย่อยด้วย *Eco*RI และ *Hae*III ซึ่งจากผลของการไฮบริไดซ์ที่ได้ (ตารางที่ 6) จะพบทั้งแถบดีเอ็นเอหลักและแถบดีเอ็นเอย่อย แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert เป็นส่วน repetitive DNA ที่มีจำนวนชุดสูง และสามารถจำแนกกลุ่มผึ้งโพรงในบางพื้นที่ออกจากกันได้ จึงได้คัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 นี้ใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม และใช้ *Hae*III ในการย่อยตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงเนื่องจากสามารถให้ความแตกต่างอย่างชัดเจนจากดีเอ็นเอแถบหลักโดย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง กลุ่มภาคใต้ และกลุ่มเกาะสมุย ซึ่งในการใช้ *Eco*RI จะพบว่าสามารถให้ความแตกต่างของสายพันธุ์ผึ้งโพรงเช่นกัน แต่ต้องวิเคราะห์จากดีเอ็นเอแถบย่อยเพราะในดีเอ็นเอแถบหลักไม่ให้ความแตกต่าง (รูปที่ 13จ) เนื่องจากดีเอ็นเอแถบย่อยจะให้สัญญาณที่ไม่ค่อยชัดเจนในการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นถ้าจะใช้ *Eco*RI ในการวิเคราะห์ RFLP ควรแก้ไขในจุดนี้โดยการเพิ่มความไว (sensitivity) ของการตรวจผลการไฮบริไดซ์โดยการใช้สารรังสีในการติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์มีความชัดเจนมากขึ้น

ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมขึ้นเมื่อนำมาศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert (รูปที่ 14) พบว่ามีขนาดเท่ากับ 2.3 กิโลเบส ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดเดียวกันกับที่ตรวจพบจากการย่อยดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Eco*RI และใช้ดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 นี้เป็นดีเอ็นเอติดตาม (รูปที่ 13จ.) แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่โคลนได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากโครโมโซมดีเอ็นเอของผึ้งโพรงจริง

จากผลการวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรงในเบื้องต้น โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างของผึ้งโพรงที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ พื้นที่ละ 10 รัง ย่อยด้วย *Hae*III อย่างสมบูรณ์แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 ที่คัดเลือกได้นี้ เมื่อวิเคราะห์เฉพาะดีเอ็นเอแถบหลัก (ตารางที่ 7) พบว่าตัวอย่างของผึ้งโพรงจากภาคเหนือ จะพบรูปแบบของการไฮบริไดซ์แบ่งออก

ได้เป็น 3 กลุ่ม โดยตัวอย่างส่วนใหญ่จะพบรูปแบบของการไฮบริไดซ์แบบที่ 1 ส่วนแบบอื่นๆ ที่พบได้บ้างคือ แบบที่ 2 และ แบบที่ 6 และรูปแบบของการไฮบริไดซ์ของตัวอย่างผึ้งโพรงจากจังหวัดเดียวกันพบว่าไม่จำเป็นที่จะต้องได้รูปแบบการไฮบริไดซ์ที่เหมือนกัน โดยพบว่าตัวอย่างผึ้งโพรงที่ได้จากจังหวัดแพร่จะพบรูปแบบการไฮบริไดซ์ทั้งแบบที่ 1 และ แบบที่ 2

ในตัวอย่างผึ้งโพรงจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จะพบรูปแบบของการไฮบริไดซ์แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยเช่นกัน โดยรูปแบบของการไฮบริไดซ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่คือรูปแบบที่ 1 ส่วนรูปแบบอื่นๆ ที่พบได้คือ แบบที่ 2 และ แบบที่ 5 ซึ่งพบเป็นจำนวนน้อยมาก และผลการไฮบริไดซ์ของตัวอย่างผึ้งโพรงในบางจังหวัดยังพบว่าให้ผลการไฮบริไดซ์ที่แตกต่างกันด้วย โดยในจังหวัดกาฬสินธุ์จะพบรูปแบบการไฮบริไดซ์ทั้งแบบที่หนึ่งและแบบที่สอง

สำหรับตัวอย่างผึ้งโพรงจากภาคกลางและภาคใต้ จะได้ผลการไฮบริไดซ์ที่เหมือนกันจากตัวอย่างจำนวน 10 รัง ในแต่ละพื้นที่ จึงจัดได้เป็นกลุ่มเดียวในแต่ละพื้นที่ โดยภาคกลางพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 1 ทั้งหมด ส่วนภาคใต้จะพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 4

ส่วนตัวอย่างของผึ้งโพรงจากเกาะสมุยพบว่าแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่หนึ่งจะพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 3 ส่วนกลุ่มที่สองพบรูปแบบการไฮบริไดซ์เป็นแบบที่ 4

จากผลดังกล่าวเห็นได้ว่ารูปแบบของดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ในเบื้องต้นนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม โดยใช้การวิเคราะห์จากดีเอ็นเอแถบหลักเพียงอย่างเดียว ซึ่งรูปแบบที่ 1 ซึ่งไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 6.6 กิโลเบส จะเป็นแบบที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ในภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง โดยเฉพาะภาคกลางจะพบแบบนี้เพียงแบบเดียวเท่านั้น รูปแบบที่ 2 ไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 1.9 และ 5.2 กิโลเบส จะพบได้เป็นส่วนน้อยเท่านั้นแต่พบได้ทั้งตัวอย่างของผึ้งโพรงจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และรูปแบบที่ 5 และ รูปแบบที่ 6 ซึ่งไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 6.0 และ 7.0 กิโลเบส ตามลำดับจะเป็นกลุ่มที่พบได้น้อยมากโดยพบได้ทั้งภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนรูปแบบที่ 4 ซึ่งจะพบการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 6.0 และ 12.0 กิโลเบส จะเป็นรูปแบบที่พบโดยส่วนใหญ่ในตัวอย่างผึ้งโพรงจากภาคใต้ และในเกาะสมุยบางส่วน และ รูปแบบที่ 3 ซึ่งจะพบการไฮบริไดซ์ที่ดีเอ็นเอขนาด 2.7 และ 6.0 กิโลเบสนั้น จะพบในตัวอย่างผึ้งโพรงเกาะสมุยเท่านั้น

ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมขึ้นนี้ สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ผึ้งโพรงในประเทศไทยได้ จากผลการทดลองเบื้องต้นครั้งนี้พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของผึ้งโพรงได้อย่างน้อย 6 กลุ่ม แต่เนื่องจากจำนวนของตัวอย่างผึ้งซึ่งมีเพียง 10 รัง ในแต่ละพื้นที่จึงยังไม่เพียงพอที่จะใช้บ่งบอกการแปรผันสายพันธุ์ของผึ้งโพรงได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งน่าจะมีการทดลองศึกษาต่อไป โดยเพิ่มจำนวนของตัวอย่างของผึ้งโพรงให้มากขึ้น รวมทั้งปรับปรุงเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ RFLP ให้มีความไวเพิ่มขึ้น โดยการเปลี่ยนเป็นการใช้สารรังสีในการติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม ได้แก่การใช้ ^{32}P dNTP และเปลี่ยนวิธีในการติดฉลากเป็นวิธี Nick translation เนื่องจากการติดฉลากโดยวิธี Random primed labelling นั้นจะขึ้นกับลำดับเบสในชิ้นดีเอ็นเอ template ว่าเป็นลำดับเบสที่ primer สามารถเข้าไปจับคู่ได้หรือไม่ นอกจากนั้นยังขึ้นกับปริมาณของเบส Adenine (A) บนสายดีเอ็นเอ template ซึ่งถ้ามีอยู่น้อยจะทำให้เกิดการติดฉลากได้น้อยด้วย ดังนั้นเมื่อเพิ่มความไวในการวิเคราะห์แล้ว คาดว่าน่าจะทำให้วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอย่อยที่พบในรูปที่ 13-17 ได้ ซึ่งจะทำให้ผลการวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรงได้ผลชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถเตรียมดีเอ็นเอติดตาม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรงในประเทศไทยได้ คือดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน #99 โดยได้จากการโคลนส่วน repetitive sequences ของตัวอย่างผึ้งโพรงจากเกาะสมุย และชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่โคลนได้มีขนาด 2.3 กิโลเบส

2. จากผลการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่า สามารถจำแนกตัวอย่างของผึ้งโพรงออกได้เป็นอย่างน้อย 6 กลุ่มตามรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดการไฮบริไดซ์ โดยใช้การวิเคราะห์เฉพาะดีเอ็นเอแถบหลักเท่านั้น และย่อยตัวอย่างดีเอ็นเอของผึ้งโพรงด้วย *Hae*III