สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่3

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างสัตว์ที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเลือดชะนีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสัตว์ต่างๆ ในประเทศไทย ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชนิดของชะนี จำนวนตัวอย่าง เพศและแหล่งเก็บตัวอย่างที่ศึกษา

ชนิดของชะนี	จำนวนตัวอย่างและเพศ	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
1. ชะนีมือขาว (*Hylobates lar*)	เพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 2 ตัว เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 1 ตัว	สวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว
2. ชะนีมงกุฎ (*Hylobates pileatus*)	เพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 1 ตัว เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 1 ตัว เพศเมีย 1 ตัว	สวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์เชียงใหม่
3. ชะนีมือดำ (*Hylobates agilis*)	เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 3 ตัว	สวนสัตว์สงขลา
4. ชะนีแก้มขาว (*Nomascus leaucogenys*)	เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 1 ตัว เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 1 ตัว เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 1 ตัว	สวนสัตว์นครราชสีมา สวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์เชียงใหม่
5. ชะนีเซียมังค์ (*Symphalungus syndactylus*)	เพศเมีย 1 ตัว	สวนสัตว์เปิดเขาเขียว

วัสดุอุปกรณ์

1. **วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่าง**
   - กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง
   - เข็มฉีดยาเบอร์ 18 20 และ 21
   - กระบอกฉีดยาขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
   - หลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิดเคลือบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin)
   - หลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิดเคลือบ EDTA

2. **วัสดุอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว**
   - ขวดเลี้ยงเลือด
   - ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
   - ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ชนิดที่มี CO_2
   - หลอดหยด (pasture pipette) พร้อมลูกยาง

3. **วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บเกี่ยวเซลล์**
   - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
   - เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
   - หลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 15 มิลลิลิตร
   - บีกเกอร์
   - กระบอกตวง
   - เครื่องปั๊มดูดอากาศ

4. **วัสดุอุปกรณ์ในการย้อมโครโมโซม**
   - coupled jar
   - สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
   - กระดาษกรอง
   - หลอดหยด (pasture pipette) พร้อมลูกยาง

5. **วัสดุอุปกรณ์ในการวิเคราะห์โครโมโซม**
   - กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ ตรา Olympus รุ่น BX51 และชุดถ่ายภาพแบบดิจิตอล ตราOlympus รุ่น DP70 (Olympus America, Inc., New York, USA)
   - อุปกรณ์ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ตรา Olympus รุ่น P30 (Olympus America, Inc., New York, USA)

6. **วัสดุอุปกรณ์ในการสกัด DNA**
   - ไมโครปิเปต (micropipette)
   - ปิเปตทิป (pipette tip)
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
   - เครื่องไมโครเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge)
   - ถุงมือยางผ่าตัด
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated microcentrifuge)
   - ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
   - ตู้อบไมโครเวฟ
   - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™2000, Bio-Rad, USA)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับ DNA อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. **วัสดุอุปกรณ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR**
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
   - เครื่องไมโครเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge)
   - ไมโครปิเปต (micropipette)
   - ปิเปตทิป (pipette tip)
   - เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรา MJR รุ่น PTC-100™ (MJ Research, Inc., USA)
   - ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
   - ตู้อบไมโครเวฟ
   - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™2000, Bio-Rad, USA)

8. **วัสดุอุปกรณ์ในการสกัด DNA ที่ได้จากปฏิกริยา PCR**
    - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
    - ไมโครปิเปต (micropipette)
    - ปิเปตทิป (pipette tip)
    - ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ
    - ตู้อบไมโครเวฟ
    - เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)
    - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™2000, Bio-Rad, USA)
    - เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV/visible/NIR spectrophotometer, UK)
    - Cuvette
    - ตู้เย็น

<u>สารเคมี</u>

1. **สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง**
    - น้ำแข็ง
    - ยาสลบสัตว์

2. **สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์**
    - สารละลาย RPMI 1640
    - สารละลาย Fetal Calf Serum (FCS)
    - สารกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว Phytohemaglutanin (PHA)
    - ยาปฏิชีวนะ penstrep

3. **สารเคมีที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวเซลล์**
    - สารละลายโคลชิซิน (colchicine)
    - สารละลายไฮโปโทนิค (hypotonic solution)
    - สารละลาย fixative (3 : 1, methanol : glacial acetic acid)
    - เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)

4. **สารเคมีที่ใช้ในการย้อมโครโมโซม**
   - สารละลายสี Geimsa
   - สารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (Sorensen buffer)
   - สารละลายทริปซิน (Typsin)
   - น้ำกลั่น

5. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA**
   - ชุดสกัด DNA QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
   - เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)
   - DNA marker แบบ1Kb DNA ladder (New England Biolabs, MA, USA)
   - DNA loading dye (glycerol, bromophenol blue, xylene cyanol)
   - 10 mg/ml ethidium bromide
   - 5X TAE (Tris-base, glacial acetic acid, EDTA)
   - Agarose gel

6. **สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR**
   - Forward Primer
     (L16007; 5'-CCCAAAGCTAAAATTCTAA-3') (Roos และ Geissmann, 2001)
   - Reverse Primer
     (H00651; 5'-TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACCT-3') (Roos และ Geissmann, 2001)
   - 10 mM dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
   - *Taq* DNA polymerase (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA)
   - sterile distilled water

7. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA ที่ได้จากปฏิกริยา PCR**
   - Ultra Clean DNA purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)
   - DNA marker แบบ1Kb DNA ladder (New England Biolabs, MA, USA)
   - DNA loading dye (glycerol, bromophenol blue, xylene cyanol)

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 10 mg/ml ethidium bromide
- 5X TAE (Tris-base, glacial acetic acid, EDTA)
- Agarose gel

ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

1. **การเก็บตัวอย่างเลือด**
   1.1 เก็บตัวอย่างเลือดชะนีทั้ง 5 ชนิด โดยสัตวแพทย์ประจำสวนสัตว์
   1.2 แบ่งเลือดที่ได้จากชะนีแต่ละชนิดออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกประมาณ 3-4 มิลลิลิตร ถ่ายไว้ในหลอดเก็บเลือดชนิดที่มี heparin เคลือบอยู่ และส่วนที่สอง ประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ถ่ายไว้ในหลอดเก็บเลือดชนิดที่มี EDTA เคลือบอยู่
   1.3 นำหลอดเก็บตัวอย่างทั้งสอง แช่ในน้ำแข็งตลอดการเดินทาง เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวและสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์**
   2.1 การเตรียมโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของอมรา คัมภิรานนท์ (2540) โดยมีขั้นตอนดังนี้
      2.1.1 นำตัวอย่างเลือดจากหลอดเก็บเลือด นำมาตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วใช้ปิเปตดูดเอาเฉพาะชั้นเม็ดเลือดขาวประมาณ 1 มิลลิลิตร ไปเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย RPMI1640 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร, สารละลาย Fetal Calf Serum (FCS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, สารกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว Phytohemaglutanin (PHA) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะ penstrep ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเบาๆ เพื่อให้เลือดได้สัมผัสกับอาหารอย่างทั่วถึง
      2.1.2 นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในบรรยากาศมี 5 เปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นเวลา 68 – 72 ชั่วโมง

2.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvesting)

2.2.1 เติมสารละลายโคลชิชินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวดอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในข้อ 2.1.2 แล้วเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 - 45 นาที

2.2.2 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนบนทิ้ง

2.2.3 เติมสารละลายไฮโปโทนิค (0.075 M. KCL) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 15 นาที

2.2.4 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนบนทิ้ง

2.2.5 เติมสารละลาย fixative ซึ่งประกอบด้วย methanol 3 ส่วนและ glacial acetic acid 1 ส่วนที่เตรียมใหม่และแช่เย็น โดยหยดทีละหยดและเขย่าตลอดเวลาจนครบ 10 มิลลิลิตร

2.2.6 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนบนทิ้ง

2.2.7 ทำซ้ำขั้นที่ 2.2.5 และ 2.2.6 โดยเติมสารละลาย fixative 5 มิลลิลิตร อีก 4 รอบ หรือจนกระทั่งได้ตะกอนสีขาว

2.3 การย้อมโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional stain)

2.3.1 หยดสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.2.7 ลงบนสไลด์ ทิ้งให้แห้งประมาณ 1 วันก่อนย้อมสี

2.3.2 นำสไลด์จากข้อ 2.3.1 มาย้อมด้วยสารละลายสี Giemsa ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.4 การย้อมโครโมโซมแบบแถบสีจี (G-band)

2.4.1 หยดสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.2.7 ลงบนสไลด์ นำไปอบในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 คืน ก่อนนำไปย้อมสีต่อไป

2.4.2 นำสไลด์จากข้อ 2.4.1 มาแช่ในสารละลายทริปซินความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซนต์ที่อุ่นทิ้งไว้ที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วจึงย้อมด้วยสารละลายสี Giemsa ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3. **การวิเคราะห์โครโมโซม**

3.1 ตรวจดูเซลล์ระยะเมทาเฟสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี จำนวน 20 เซลล์ ถ่ายภาพ แล้วนำไปอัดขยายขนาด 8x10 นิ้ว

3.2 จัดคาริโอไทป์ตามวิธีของกันยารัตน์ ไชยสุต (2532) โดยคำนวณค่าต่างๆ ดังนี้

3.2.1 ค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT_i) = ความยาวของโครโมโซมแขนข้างสั้น (LS_i) + ความยาวของโครโมโซมแขนข้างยาว(LT_i)

3.2.2 ค่า relative length (RL_i) = $\frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง } (LT_i)}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งหมด } (\Sigma\ LT_i)}$

การจัดคู่โครโมโซม จะพิจารณาค่า RL_i ที่มีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด จึงถือว่าเป็น homologous chromosome ยกเว้นโครโมโซมเพศ

3.2.3 ค่า centromeric index (CI_i) = $\frac{\text{ความยาวของแขนข้างยาว } (LI_i)}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง } (LT_i)}$

การพิจารณาชนิดของโครโมโซมจะใช้ค่า CI_i ดังเงื่อนไขต่อไปนี้

0.500 – 0.599 จัดเป็น metacentric (m)

0.600 – 0.699 จัดเป็น submetacentric (sm)

0.700 – 0.899 จัดเป็น acrocentric (a)

0.900 – 1.000 จัดเป็น telocentric (t)

3.2.4 การวัดขนาดโครโมโซม

$$A = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุด + ความยาวของโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุด}}{2}$$

$$B = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุด}}{2}$$

การพิจารณาขนาดของโครโมโซม จะใช้เงื่อนไข ดังนี้

ถ้า $LT_i > A$ จัดเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ (L)

ถ้า $A<LT_i<B$ จัดเป็นโครโมโซมขนาดกลาง (M)

ถ้า $LT_i<B$ จัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก (S)

3.3 จัดคาริโอไทป์ที่ได้จากการย้อมสีแบบธรรมดาใช้ตามแบบของ Prouty และคณะ (1983) โดยเรียงลำดับโครโมโซมจากขนาดใหญ่ที่สุดไปยังเล็กที่สุด โดยไม่คำนึงถึงว่าจะเป็นโครโมโซมชนิดใด การจัดเรียงให้ใช้แขนข้างสั้นตั้งขึ้น และเซนโทรเมียต้องอยู่ในแนวเดียวกัน และจัดโครโมโซมเพศให้อยู่มุมล่างขวา

3.4 การจัดคู่ของโครโมโซมที่ได้จากการย้อมสีแบบจีนั้น จะใช้รูปแบบของแถบสีเพื่อช่วยในการจัดคู่ของโครโมโซม ส่วนการเรียงลำดับใช้รูปแบบการจัดคาริโอไทป์ที่ได้จากการย้อมสีแบบธรรมดา

3.5 สรุปสูตรคาริโอไทป์ (karyotype formula) ของชะนีทั้ง 5 ชนิด พร้อมทั้งสร้างอิดิโอแกรม (ideograme)

4. **การศึกษาการแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ D-loop ของยีน mtDNA Phe-tRNA**

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

4.1.1 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ ชุดสกัด DNA QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp® DNA Blood Mini Kit ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ (Qiagen, Hilden, Germany)

4.1.2 ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ โดยนำสารละลายที่ได้มาจาก 4.1.1 มาแยกภายใต้สนามไฟฟ้า 120 โวลต์ที่มีตัวกลางเป็น 1 % agrarose gel ในสารละลาย 1X TAE

4.1.3 ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide และบันทึกภาพด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR

4.2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพเมอร์ L16007 และH00651 ในสารละลายผสม 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

Total DNA	20-50	ng
dNTP mixture	200	μM
1X Themopol Reaction buffer ที่มี [Mg^{2+}]	1.5	mM
Taq DNA polymerase	1	unit
Primer L16007	0.2	μM
Primer H00651	0.2	μM

สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นดังนี้

อุณหภูมิเริ่มต้น (hotstart) ที่ 92 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเข้าสู่วงจรการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยมีสภาวะการทำปฏิกริยาดังนี้ ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที ตามด้วย annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย extension ที่อุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวงจรนี้ 35 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบแล้ว ปล่อยให้ปฏิกริยาดำเนินต่อไปที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาการสร้างสายดีเอ็นเอเสร็จสมบูรณ์ จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2.2 ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 4.2.1 โดยนำมาแยกภายใต้สนามไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที ใน 0.8 % agrarose gel ในสารละลาย 1X TAE และดูผลโดยย้อมเจลด้วย ethidium bromide และบันทึกภาพด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV

4.3 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

4.3.1 แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดย gel electrophoresis แล้วตัดชิ้นส่วนเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ

4.3.2 สกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นส่วนเจลที่ได้ในข้อ 4.3.1 โดยใช้ Ultra Clean DNA purification kit ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ (Qiagen, Hilden, Germany)

4.3.3 ตรวจสอบผลการสกัดชิ้นดีเอ็นเอ โดยนำมาแยกภายใต้สนามไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาทีใน 0.8 % agrarose gel ในสารละลาย 1X TAE และย้อมด้วย ethidium bromide

4.3.4 ประมาณปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

4.3.5 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing ที่ National University of Singapore (NUS) และหน่วยบริการทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ

4.4 การวิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์

4.4.1 ตรวจสอบการอ่านเบสด้วยโปรแกรม Chromas รุ่นที่ 1.45 (McCarty, 1997) และแก้ไขหากมีการอ่านลำดับเบสผิดพลาดหรือเครื่องไม่สามารถอ่านเบสได้

4.4.2 นำลำดับเบสที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้วมาจัดเรียง (alignment) ในโปรแกรม GeneDoc รุ่นที่ 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997)

4.4.3 วิเคราะห์ข้อมูลการแปรผันของโมเลกุลและสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 3.1 (Sudhir, Koichiro and Masatoshi, 2004) โดยใช้อัตราการแทนที่เบสตามแบบจำลองการแทนที่เบสของ Tamura และ Nei (1993)

4.4.4 หาอัตราการแทนที่เบสของยีนที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลระยะเวลาที่สกุลชะนี (*Hylobates*) และสกุลชิมแพนซี (*Pan*) แยกจากกันเมื่อ 16 ล้านปี (Collura and Stewart, 1995) แล้วใช้ค่าอัตราการแทนที่นี้ในการประมาณเวลาที่ชะนีแยกออกจากกัน สำหรับค่าการแทนที่เบสจะใช้แบบการแทนที่เบสของ Tamura และ Nei (1993)