บทที่ 3

ผลการทดลอง

การสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เมื่อทำการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือปลักและกระบือมูราห์ตามวิธีการในบทที่ 2 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Brown และคณะ (1989) และวิธีของ Koehler และคณะ (1988) ผลปรากฏว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้ตามวิธีที่ 1จะมีปริมาณน้อยโดยเฉลี่ยเพียง 2.4 ไมโครกรัมต่อ 100 มล.ของเซลล์เม็ดเลือดขาวดังแสดงในตารางที่ 3 แต่เมื่อได้ทำการดัดแปลงวิธีการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) ตามวิธีที่ 2 เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเฉพาะดีเอ็นเอหรือสารประกอบอื่นที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ผลปรากฏว่าสามารถสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น ได้ทดลองแปรอัตราส่วนของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อสารละลายที่ใช้แยกดีเอ็นเอทั้งหมดในอัตราส่วนต่าง ๆกันได้แก่ 1:9, 1:10, 1:11, 1:12 และ 1:13 หรือคิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0.50 , 0.45, 0.42, 0.38 และ 0.36 โมลาร์ตามลำดับจากการทดลองพบว่าถ้าใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์(5 โมลาร์) ต่อสารละลายที่ใช้แยกดีเอ็นเอทั้งหมดในอัตราส่วนต่าง ๆกันจะมีผลต่อปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้มากน้อยไม่เท่ากัน ซึ่งผลจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าถ้าใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) ในอัตราส่วน 1:10 จะสามารถสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ดีที่สุดดังแสดงในตารางที่ 2 ผลที่ได้จากการทดลองนี้จึงนำเอาวิธีการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอวิธีที่ 2 มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จากเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าสามารถสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 2.74 $\pm$ 0.33 ไมโครกรัมและ 2.23 $\pm$ 0.36 ไมโครกรัมเป็น 4.09 $\pm$ 0.32 และ 3.80 $\pm$ 0.36 ไมโครกรัมต่อ 100 มล. ของเซลล์

เม็ดเลือดขาวของกระบือปลักและกระบือมูราห์ตามลำดับ หรือโดยเฉลี่ยได้เพิ่มขึ้นเป็น 3.94 $\pm$ 0.36 ไมโครกรัม/ 100 มล. ของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือได้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพิ่มขึ้นคิดเป็น 49.27% และ 70.4% ตามลำดับหรือเฉลี่ยเท่ากับ 58.87% ดังแสดงในตารางที่ 3 และในขั้นตอนต่อไปก็จะนำเอาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้ไปศึกษาเปรียบเทียบหาความแตกต่างทางสายพันธุ์

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้จาก 100 มล. ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือปลักเบอร์ 1,เบอร์ 2 และเบอร์ 3 เมื่อตกตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) ในอัตราส่วนต่าง ๆกัน

อัตราส่วนโซเดียมคลอไรด์(5โมลาร์) :สารละลายทั้งหมด	ความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)	ปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม)			ค่าเฉลี่ย (x$\pm$SD) (ไมโครกรัม)
		#1	#2	#3	
0 : 1	0.00	1.72	2.05	1.76	1.84 $\pm$ 0.18
1 : 9	0.50	1.68	1.90	1.95	1.84 $\pm$ 0.14
1 : 10	0.45	4.73	4.82	3.41	4.32 $\pm$ 0.79
1 : 11	0.42	2.85	3.40	2.15	2.80 $\pm$ 0.63
1 : 12	0.38	2.70	3.37	2.00	2.69 $\pm$ 0.69
1 : 13	0.36	2.50	2.39	1.81	2.23 $\pm$ 0.37

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่สกัดแยกได้จาก 100 มล.ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือปลักและกระบือมูราห์ โดยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2

สายพันธุ์/เบอร์สัตว์	ปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/100 มล.ของเซลล์เม็ดเลือดขาว)	
	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2
กระบือปลัก/ 301	3.03	4.49
302	1.81	3.93
305	2.97	3.79
1	2.67	4.38
2	2.21	3.84
X $\pm$ SD	2.74 $\pm$ 0.33	4.09 $\pm$ 0.32 (49.27%)
กระบือมูราห์/ 5	2.19	3.88
26	1.90	3.82
49	1.95	3.92
50	2.30	3.19
51	2.81	4.17
X $\pm$ SD	2.23 $\pm$ 0.36	3.80 $\pm$ 0.36 (70.40%)
X $\pm$ SD (N=10)	2.48 $\pm$ 0.42	3.94 $\pm$ 0.36 (58.87%)

ในการศึกษาด้านการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอนั้น สามารถทำได้โดยอาศัยสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กัน ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส และจะได้รูปแบบจำเพาะที่แตกต่างกันไป โดยที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ จะแยกออกจากกันได้ชัดเจนต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆคือ ดีเอ็นเอต้องมีความบริสุทธิ์ และมีความสมบูรณ์มากพอด้วย จึงจะทำให้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีประสิทธิภาพสูง เช่นในรายงานของ Klupt และ Komor (1989) ได้รายงานว่าถึงแม้ว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้จะมีแอคติวิตีสูงและใช้ในปริมาณที่พอเหมาะ แต่การย่อยดีเอ็นเอก็ยังเป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์นั่นแสดงถึงว่ามีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในระหว่างการเตรียมดีเอ็นเอ ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่นการมีโปรตีนตัวอื่น ๆ ฟีนอลหรือเกลือเป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึงความพอเหมาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะกับดีเอ็นเอ ดังนั้นในการทดลองต่อไปนี้จึงต้องนำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ ความสมบูรณ์ และความเข้มข้น

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เมื่อทำการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก และกระบือมูราห์ได้แล้ว จะต้องนำไปตรวจสอบถึงความบริสุทธิ์ โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และคำนวณจากอัตราส่วน OD_{260} / OD_{280} ดังแสดงผลในตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าค่าอัตราส่วนที่ได้มีค่าใกล้เคียง 1.8 นั่นแสดงว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้ทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ มีความบริสุทธิ์เพียงพอไม่มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่

การวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของไมโตรคอนเดรียลดีเอ็นเอนั้น คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตรจากตารางที่ 4 โดยเปรียบเทียบว่าค่า OD_{260} เท่ากับ 1เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50ไมโครกรัม/มล. ดังตัวอย่างการคำนวณในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์

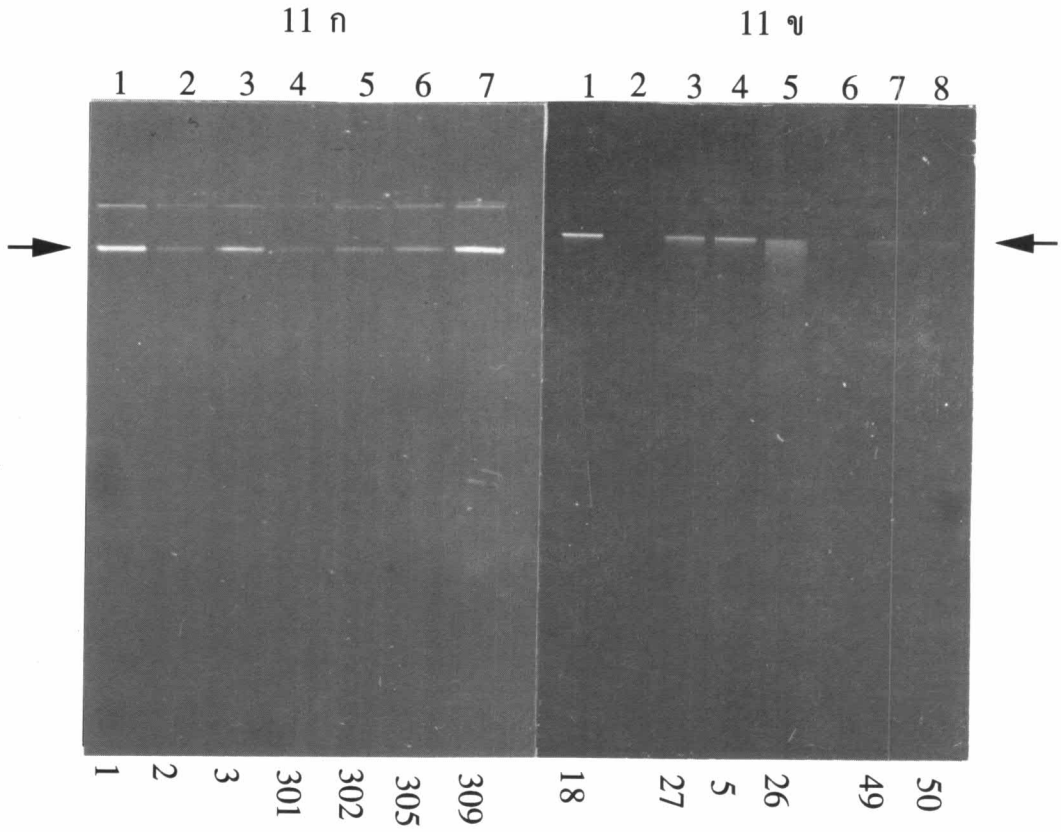
สายพันธุ์/เบอร์สัตว์	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
กระบือปลัก/ 1-9	0.351	0.192	1.82
1-10	0.478	0.255	1.87*
1-11	0.247	0.143	1.73
2-10	0.332	0.175	1.90*
2-11	0.219	0.116	1.89*
2-12	0.296	0.160	1.85
3-9	0.324	0.177	1.83
3-10	0.246	0.135	1.82
3-11	0.305	0.162	1.88*
309	0.308	0.165	1.87*
301	0.228	0.124	1.84
302	0.130	0.068	1.91*
305	0.386	0.218	1.77
ด	0.255	0.136	1.88*
กระบือมูราห์/ 5	0.133	0.071	1.87
18	0.192	0.106	1.81
26	0.140	0.074	1.89
27	0.146	0.083	1.76
49	0.387	0.222	1.74
50	0.164	0.086	1.91

* ค่าอัตราส่วนที่มีค่ามากกว่า 1.85 จะนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส และทำการสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัว/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ จนกว่าจะได้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ความต่างศักย์คงที่ที่ 8 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 1 ชม. 30 นาที ตัวอย่างการวิเคราะห์ดังแสดงใน รูปที่ 11

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 11ก แสดงว่าแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ได้มีความบริสุทธิ์และความสมบูรณ์มากพอ เพราะแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นแถบเดียวที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลสูง และไม่ปรากฏแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่นเดียวกับแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 18 (ช่องที่ 1 รูปที่ 11ข) ยกเว้นแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 27, 5, 26, 49 และเบอร์ 50 (ช่องที่ 3-8 รูปที่ 11ข) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากการขาดของดีเอ็นเอไปในระหว่างขั้นตอนการสกัดแยกดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ก็จะนำไปทำการศึกษารูปแบบเฉพาะของการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

รูปที่ 11 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก (รูปที่ 11ก) และกระบือมูราห์ (รูปที่ 11ข) ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่งซม. เป็นเวลานาน 1 ชม. 30 นาที โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 44



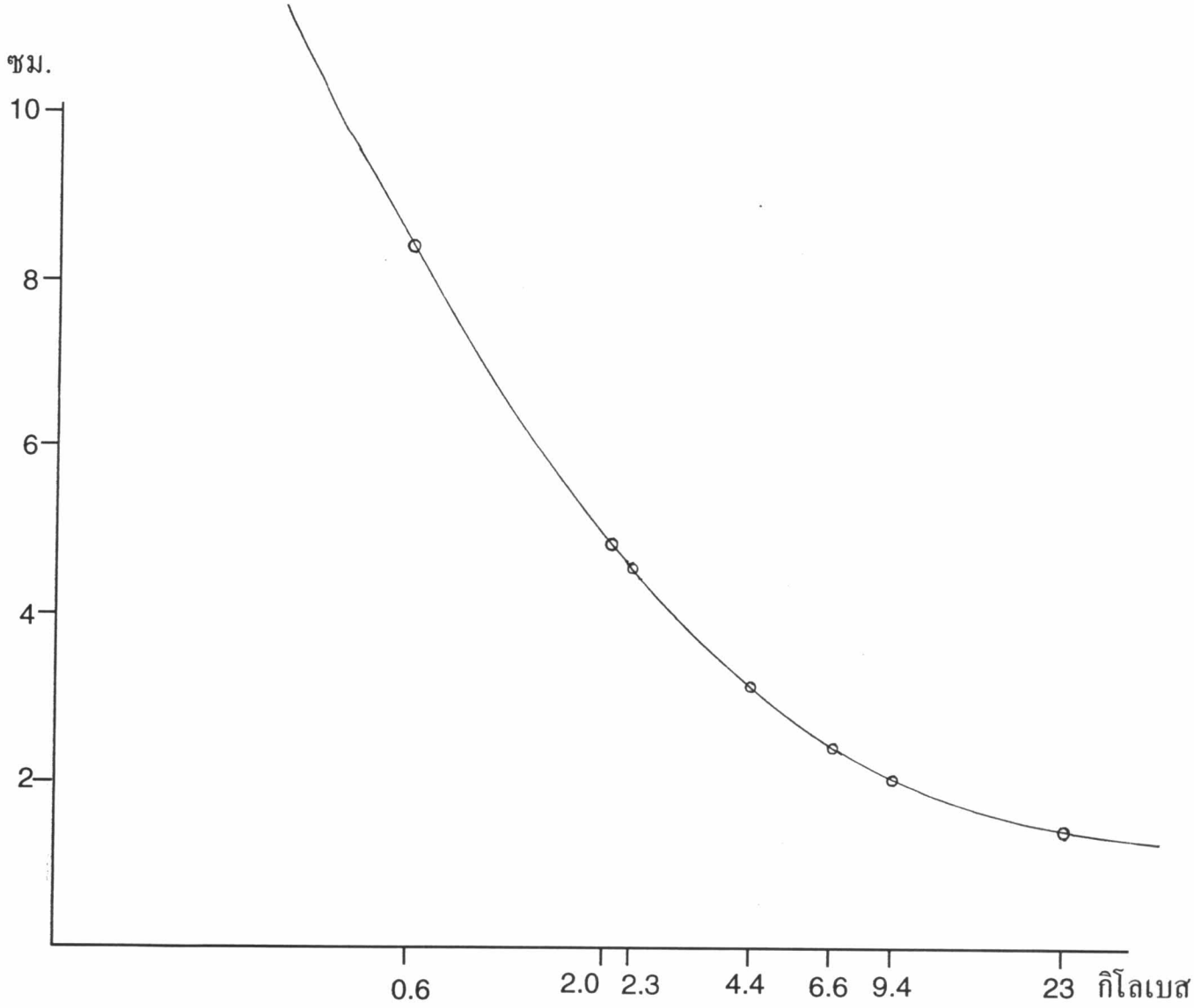
รูปที่ 11 ก ช่องที่ 1 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1
2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2
3 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3
4 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301
5 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302
6 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305
7 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309

รูปที่ 11 ข ช่องที่ 1 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 18
3 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 27
4 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 5
5 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมู่ราห์เบอร์ 26
7 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 49
8 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 50

การหาขนาดโมเลกุลของแถบดีเอ็นเอ

การคำนวณหาขนาดโมเลกุลของแถบดีเอ็นเอ ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐานเฟจแลมป์ดา (λ /*Hin*d III) กับค่าระยะทางการเคลื่อนที่ (ซม.) ดังแสดงในรูปที่ 12

รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐานเฟจแลมป์ดา (λ /*Hin*d III; กิโลเบส) และระยะทางการเคลื่อนที่(ซม.) โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส



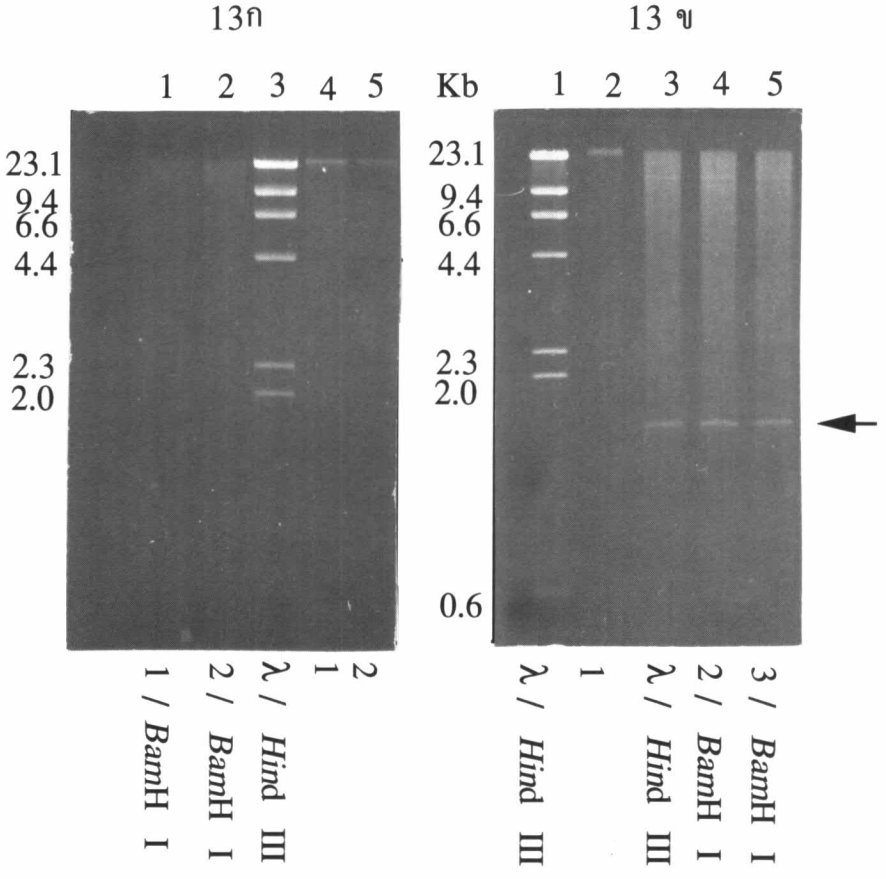
การหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

นำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด 2 อย่างสมบูรณ์ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่แตกต่างกันไป และภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะได้รูปแบบเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน โดยที่การแยกชิ้นส่วนออกจากกันได้อย่างชัดเจนต้องขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่นความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งมีผลต่อความสมบูรณ์ในการตัดดีเอ็นเอ ความต่างศักย์และเวลาในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ดังนั้นการทดลองต่อไปนี้จึงหาภาวะที่เหมาะสมที่จะให้ได้การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอดีที่สุด

1. ชนิดของอะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

อะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสมีมากมายหลายชนิด โดยมีสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณสารอื่น ๆที่ปะปน โดยเฉพาะปริมาณซัลเฟต , ค่าความยืดหยุ่น (gel strength), จุดหลอมเหลว (gel point) และค่า electroendosmosis ($-m_r$) และอะกาโรสเจลที่เหมาะจะต้องมีค่า electroendosmosis ต่ำซึ่งจะไม่ส่งผลกระทบให้การเคลื่อนตัวของชิ้นดีเอ็นเอในเจลช้าลง อีกทั้งยังต้องปราศจากการปนเปื้อนของเอนไซม์เอนโดนิว คลีเอส เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสหรือเอนไซม์โปรตีนเอส ในการทดลองเริ่มแรกได้ใช้อะกาโรส เจลของบริษัท BRL (Ultrapure , Cat No. 5510 UA) ที่มีค่า electroendosmosis ($-m_r$) อยู่ระหว่าง 0.10-0.15 ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งผลปรากฏว่าไม่สามารถแยกชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอออกจากกันได้ชัดเจนดังในรูป 13 ก ต่อมาได้เปลี่ยนแปลงไปใช้อะกาโรสเจล I.D.Na^{TM} อะกาโรสเจลของบริษัท FMC product ซึ่งมีค่า electroendosmosis ($-m_r$) < 0.10 ซึ่งผลปรากฏว่าสามารถแยกแถบชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้นดังที่ปรากฏในรูป 13ข ดังนั้นในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสครั้งต่อ ๆไปจะใช้ I.D.Na^{TM} อะกาโรสเจลในการทดลองทั้งหมด

รูปที่ 13 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วยต่อดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37°ซ ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้ BRL ULTRAPURE อะกาโรสเจล (รูปที่ 13ก) และ I.D.Na^{TM} อะกาโรสเจล (รูปที่ 13ข) ที่ความต่างศักย์ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. เป็นเวลานาน 3 ชม. 30 นาที บนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องของรูปที่ 13ก จะมีปริมาณดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม และรูปที่ 13ข มีปริมาณดีเอ็นเอ 1.0 ไมโครกรัม รายละเอียดของตัวอย่างแต่ละช่องระบุไว้หน้า 48



รูปที่ 13 ก ช่องที่ 1 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

3 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

4 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1

5 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2

รูปที 13 ข ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

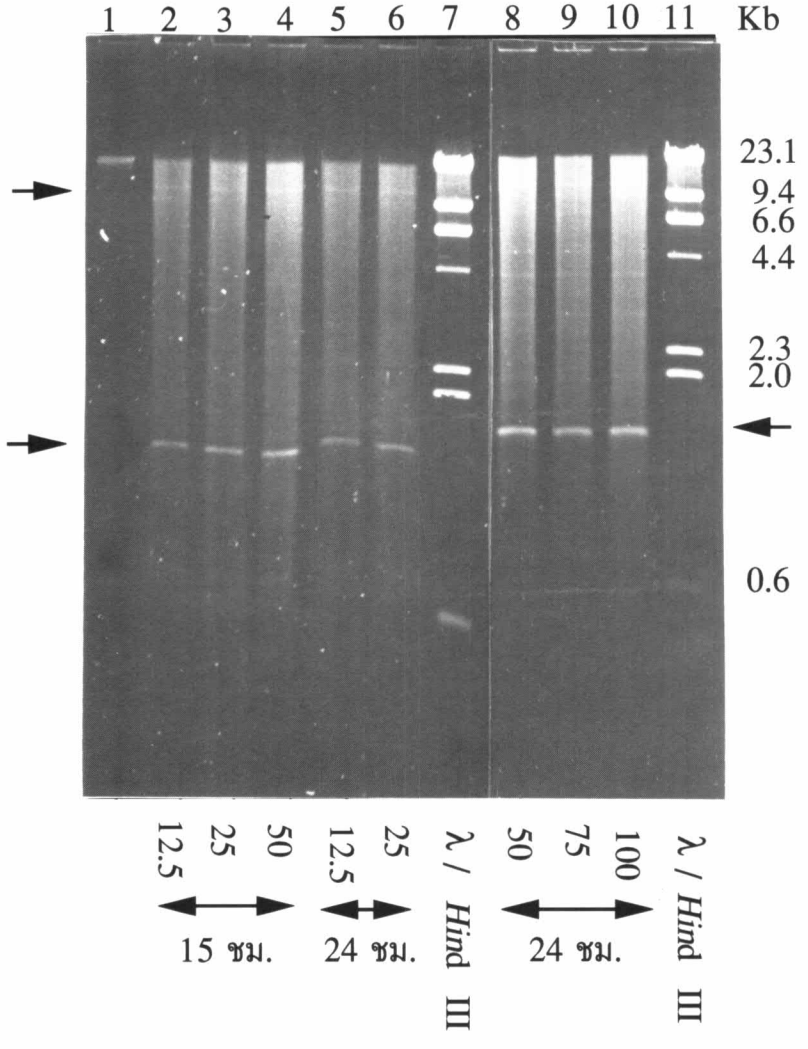
5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

2. การแปรความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและเวลาที่ใช้ในการย่อยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้การแยกชิ้นส่วนต่าง ๆทำได้อย่างชัดเจนดังนั้นจึงทดลองหาความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เหมาะสมโดยแปรความเข้มข้นต่าง ๆกันดังรูปที่ 14 โดยเริ่มจากไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมเป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรหรือเท่ากับ 12.5, 25.0, 50.0, 75.0 และ 100.0 ไมโครกรัมต่อ มล. ตามลำดับและใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วยแล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37^{o} ซ เป็นเวลา 15 ชม. และ 24 ชม. ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าถ้าใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.25 ต่อปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรหรือเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อ มล. และใช้ เวลาในการบ่ม 15 ชม. หรือ 24 ชม. พบว่าการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอให้ผลที่ไม่แตกต่างกันโดยสามารถพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 3 แถบคือขนาด 10.5, 4.5 และ 1.4 กิโลเบส (ช่องที่ 2, 5 รูปที่ 14 และตารางที่ 5) เมื่อเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจนได้ความเข้มข้น 25.0-50.0 ไมโครกรัม ต่อ มล. พบว่าการตัดดีเอ็นเอจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะใช้เวลาในการบ่ม 15 ชม. หรือ 24 ชม. (ช่องที่ 3, 6 และช่องที่ 4,8 รูปที่ 14) โดยสามารถพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 4 แถบคือขนาด 10.5, 4.5, 3.8 และ 1.4 กิโลเบสดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็น 75.0 และ 100.0 ไมโครกรัมต่อ มล. และให้เวลาบ่มปฏิกิริยาเป็น 24 ชม.(ช่องที่ 9-10 รูปที่ 14) ก็พบว่าได้แถบ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด 4 แถบเช่นเดียวกับเมื่อใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอความเข้มข้น 25.0-50.0 ไมโครกรัมต่อ มล.ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น จึงจะเลือกใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ 10หน่วยในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรหรือเท่ากับ 25.0 ไมโครกรัมต่อ มล. และระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o} ซ อย่างน้อย

15 ชม. เพราะเป็นปริมาณที่ให้แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอชัดเจน และปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองก็ไม่สูงมากนัก ทำให้ไม่สิ้นเปลืองไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอซึ่งในการเตรียมแต่ละครั้งจะได้ในปริมาณค่อนข้างต่ำ

รูปที่ 14 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วยต่อดีเอ็นเอความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 12.5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มล. และบ่มที่ 37° ซ ใน ระยะเวลา 15 และ 24 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาทีบนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ โดยรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 52



ช่องที่ 1 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1

2-4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อ มล. ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วย และ บ่มที่ 37° ซ ในระยะเวลา 15 ชม.

5-6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ความเข้มข้น 12.5 และ 25 ไมโครกรัมต่อ มล.ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วย และบ่มที่ 37° ซ ในระยะเวลา 24 ชม.

7 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

8-10 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ความเข้มข้น50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มล.ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วย และบ่มที่ 37° ซ ในระยะเวลา 24 ชม

11 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

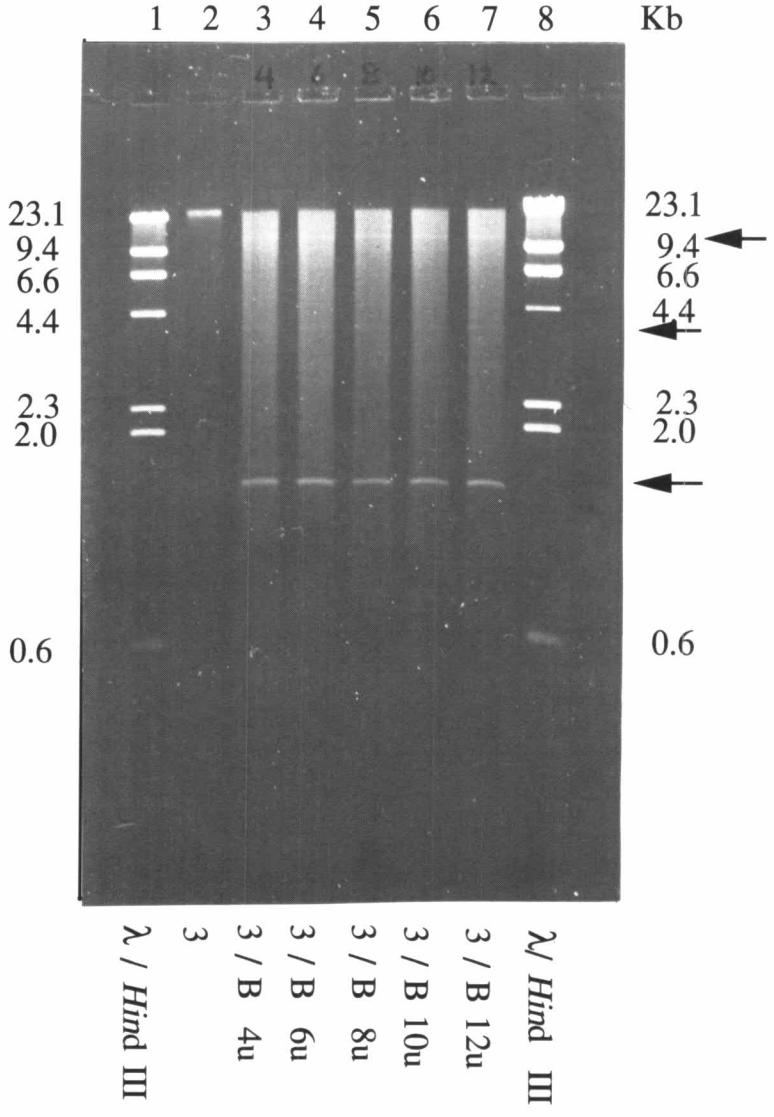
ตารางที่ 5 แสดงขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด (กิโลเบส) ที่ได้จากการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักความเข้มข้น 12.5, 25.0, 50.0, 75.0 และ 100.0 ไมโครกรัมต่อ มล. ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. และ 24 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (กิโลเบส)								
ดีเอ็นเอ มาตรฐาน (λ /*Hin*dIII)	ความเข้มข้นของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/มล.)							
	เวลาในการตัด15 ชม.			เวลาในการตัด 24 ชม.				
	12.5	25.0	50.0	12.5	25.0	50.0	75.0	100.0
23.1	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
9.4								
6.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
4.4	-	3.8	3.8	-	3.8	3.8	3.8	3.8
2.3								
2.0	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4

3. การแปรปริมาณของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ย่อยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ปริมาณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่เหมาะสมกับปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำ ให้การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะสมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้การแยกชิ้นส่วนต่าง ๆได้ชัดเจนยิ่งขึ้นดังนั้น จึงทดลองแปรปริมาณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ตั้งแต่ 4 จนถึง 12 หน่วยต่อไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซีสตามสภาวะที่ดัดแปลงคือความเข้มข้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาทีผลการทดลองในรูปที่ 15 พบว่าการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตั้งแต่ 4-12 หน่วยต่อไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมให้แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันโดยที่ทุกความเข้มข้นของเอนไซม์ ก็ปรากฏแถบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้อย่างชัดเจน ได้แก่แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 10.5, 3.8 และ 1.4 กิโลเบส ดังแสดงในตารางที่ 6 ดังนั้นเพื่อให้มีปริมาณเอนไซม์มากเกินพอเล็กน้อยจึงเลือกใช้ปริมาณของเอนไซม์ตัดจำเพาะในการย่อยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมในการทดลองครั้งต่อ ๆไป

รูปที่ 15 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ที่ความเข้มข้นต่าง ๆกันคือ 4, 6,8,10 และ 12 หน่วยต่อไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม และบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวหนึ่งซม. นาน 3 ชม. 30 นาทีบนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม รายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 56



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 4 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม

4 ไมโตคอนเดรียลเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 8 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 10 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม

7 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 12 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม

8 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

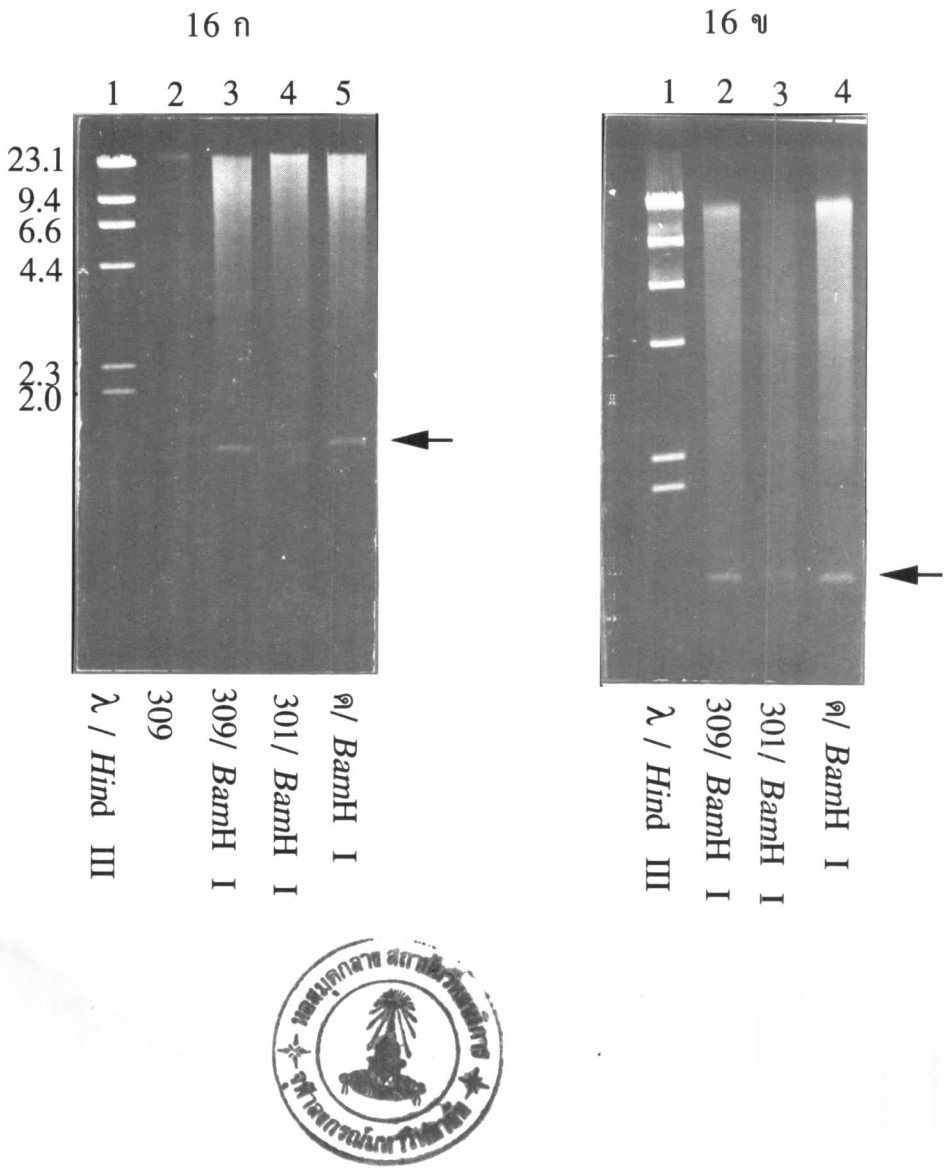
ตารางที่ 6 แสดงขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด (กิโลเบส) ที่ได้จากการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักด้วยปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 4, 6, 8, 10 และ 12 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (กิโลเบส)					
ดีเอ็นเอมาตรฐาน	ปริมาณเอนไซม์ *Bam*H I (หน่วย)				
(λ/*Hin*dIII)	4	6	8	10	12
23.1					
	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
9.4					
6.6					
4.4					
	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
2.3					
2.0					
	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
0.6					

4. การแปรความต่างศักย์ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

เนื่องจากความต่างศักย์คงที่ที่ใช้สำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสนั้น เป็นปัจจัยสำคัญต่อการแยกชิ้นส่วนขนาดต่าง ๆของดีเอ็นเอออกจากกัน Fangman(1978)ได้กล่าวไว้ว่าเมื่อความต่างศักย์ลดลง ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆจะลดลงด้วยและการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์จะมีผลกระทบอย่างมาก ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองแปรความต่างศักย์ต่าง ๆกัน คือ 5,8,10 และ 12 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. ที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 1.0 เปอร์เซนต์ใช้ปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสนาน 3 ชม. 30 นาที (ในกรณีที่มีความต่างศักย์เป็น 5,8 และ 10 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.) หรือจนกระทั่งสีติดตามเคลื่อนไปเกือบถึงปลายแผ่นเจล (ในกรณีที่มีความต่างศักย์เป็น 12 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.) ดังแสดงใน รูปที่ 16ก-16ง ตามลำดับ พบว่าการแยกชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะชัดเจนที่สุดเมื่อใช้ความต่างศักย์ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่งซม. จะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 10.5, 3.8 และ 1.4 กิโลเบส (ตารางที่ 7) และเมื่อค่อย ๆเพิ่มความต่างศักย์ให้สูงขึ้นจาก 5 โวลท์ ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. (รูปที่ 16ก) เป็น 8, 10 และ 12 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. (รูปที่ 16ข-16ง) พบว่าการแยกของชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่ดีขึ้น นอกจากนั้นชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาดเล็กซึ่งปรากฏชัดเจนเมื่อแยกที่ความต่างศักย์ 5 และ 8 โวลท์ต่อ ซม. ก็เคลื่อนหลุดออกจากแผ่นเจลเมื่อใช้ความต่างศักย์มากกว่า 8 โวลท์ต่อ ซม. ทำให้พบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอน้อยลง (ตารางที่ 7) ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงจะเลือกใช้ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. เป็นเวลา 3 ชม.30 นาทีเพราะสามารถเห็นแถบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ชัดเจนกว่า

รูปที่ 16ก และ 16ข รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็น เวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ (รูปที่ 16ก) และ 8 โวลท์ (รูปที่ 16ข) ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 60



รูปที่ 16ก ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ ด ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

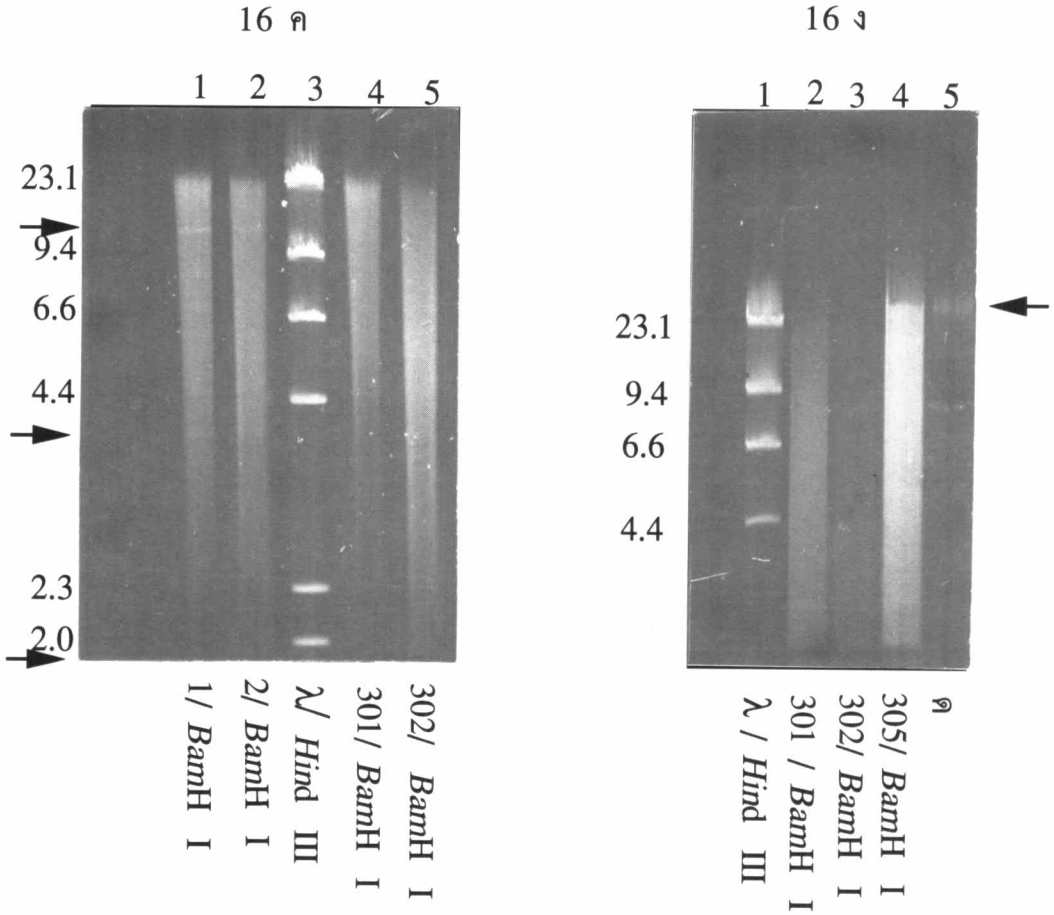
รูปที่ 16ข ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ ด ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

รูปที่ 16ค และ 16ง รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 10 โวลท์ (รูปที่ 16ค) และ 12 โวลท์ (รูปที่ 16ง) ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาที บนแผ่นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมและรายละเอียด ของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 62



รูปที่ 16ค ช่องที่ 1 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

3 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

รูปที่ 16 ง ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

5 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302

ตารางที่ 7 แสดงขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด (กิโลเบส) ของกระบือปลักเบอร์ 1,2, 301, 302, 305, 309 และ ด ที่ได้จากการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วย และทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยแปรความต่างศักย์ต่างๆกันที่ 5, 8, 10 และ 12 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. เป็นเวลา 3 ชม. 30 นาที

ขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
ดีเอ็นเอ มาตรฐาน (λ/*Hin*dIII)	ความต่างศักย์(โวลท์/ความยาวเจลหนึ่ง ซม.)			
	5	8	10	12
23.1	10.5	10.5	10.5	-
9.4				
6.6				
4.4	3.8	-	3.8	-
2.3				
2.0	1.4	1.4	-	-

5. การแปรชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการทดลองของ Bhat และคณะ (1990) พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I เหมาะสมในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ของอินเดียและในปี ค.ศ. 1991 Gan และคณะ ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักในประเทศมาเลเซียส่วน Amano และคณะ (1994) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 10 ชนิดทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ และพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aat* I, *Bam*H I และ *Eco*R I สามารถใช้บอกความแตกต่างของดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของกระบือทั้งสองสายพันธุ์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I, *Bgl* I, *Eco*R I และ *Pst* I ในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักในประเทศไทยและกระบือมูราห์ โดยใช้สภาวะการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสที่เหมาะสมคือความเข้มข้นอะกาโรสเจล(I.D.Na^{TM}) 1 เปอร์เซนต์ ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.นาน 3 ชม. 30 นาทีและปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ ใช้คือ 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัม

จากผลการทดลองในรูปที่ 17-21 พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Bam*H I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก แล้วให้ผลดีกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นที่ทดสอบ(รูปที่ 17ก) โดยได้ชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆกันหลายชิ้นส่วน และสามารถเห็นความแตกต่างระหว่างกระบือปลักกลุ่มเดียวกันได้ ถึงแม้ว่าจะมีบางแถบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่ชัดเจนดังแสดงในตารางที่ 8 แต่ก็สามารถแบ่งออกได้เป็น 3กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่ 1 ได้แก่กระบือปลักเบอร์ 1 (ช่องที่ 3) จะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4, 2.8, 3.0, 4.5, 5.3 และ 10.5 กิโลเบส

กลุ่มที่ 2 ได้แก่กระบือปลักเบอร์ 2 (ช่องที่ 4) จะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4, 2.8, 3.0, 3.8, 4.3 และ 10.5 กิโลเบส

กลุ่มที่ 3 ได้แก่กระบือปลักเบอร์ 3, 301, 302, 305, 309 และเบอร์ ด (ช่องที่ 5-10) ซึ่งจะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4, 2.8, 3.0, 3.8, 4.5 และ 10.5 กิโลเบส

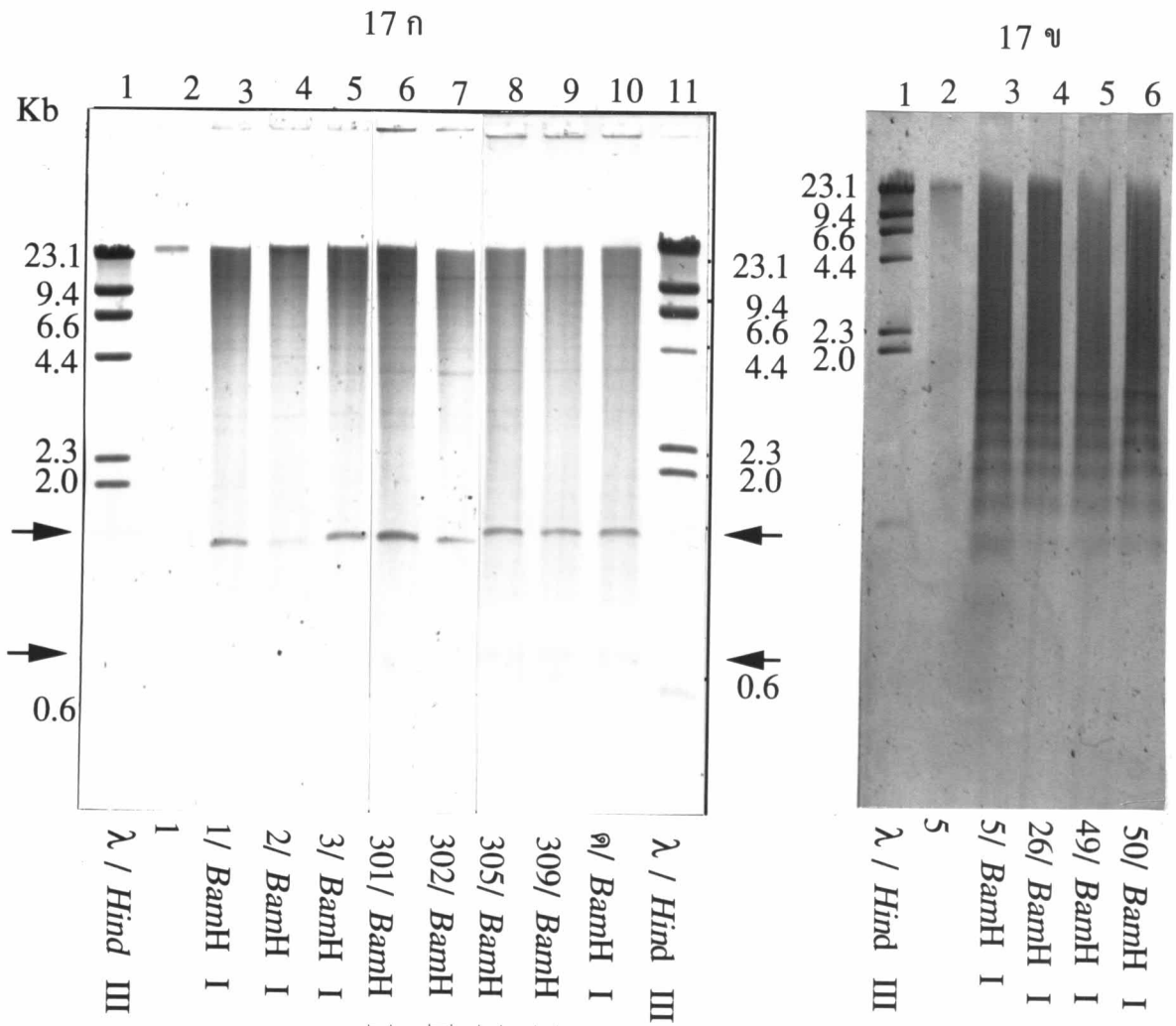
และกระบือปลักทั้งสามกลุ่มจะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นได้เด่นชัดคือแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส และเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ก็พบว่าสามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้หมด แต่ไม่มีลักษณะแถบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอให้เห็นเด่นชัดพบเพียงแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ชัดเจนเพียงแถบเดียวคือขนาด 1.4 กิโลเบส (รูปที่ 17ข) และเนื่องจากพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอชิ้นเล็กๆอีกมากมาย จึงได้ทดลองนำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสอีกครั้ง แต่เปลี่ยนชนิดของอะกาโรสเจลเป็นชนิด NuSieve^{R} 3:1 แทน I.D.Na^{TM} อะกาโรสเจลสำหรับ NuSieve^{R} 3:1 อะกาโรสเจลชนิดนี้ เป็นอะกาโรสเจลที่มีสมบัติสามารถแยกดีเอ็นเอขนาดเล็กได้ดีเช่นเดียวกับพอลิอะคริละไมด์เจล ซึ่งผลปรากฏว่าสามารถพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้นดังแสดงในรูปที่ 18 โดยที่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักจะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบสและ 0.7 กิโลเบส (ช่องที่ 2) และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์จะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบสและ 0.6 กิโลเบส (ช่องที่ 3)

เมื่อทดลองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I ทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอพบว่า สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ไม่สามารถพบการแยกแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอออกจากกันอย่างชัดเจน (รูปที่ 19ก และ 19ข)

เมื่อทดลองเปลี่ยนเป็นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I ในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอพบว่าสามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์โดยพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเด่นชัดของกระบือปลัก 3 แถบซึ่งประกอบด้วยชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 2.1,1.4 และ 0.4 กิโลเบส (ช่องที่ 2-4 รูปที่ 20) และสำหรับกระบือมูราห์จะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอเด่นชัด 2 แถบประกอบด้วยชิ้นไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอขนาด 1.4 และ 0.4 กิโลเบส (ช่องที่ 6-7 รูปที่ 20) เมื่อทดลองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์จะยังพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอสมบูรณ์ปรากฏอยู่อย่างเด่นชัด (รูปที่ 21) และ

ปรากฏแถบที่ถูกตัดอยู่เลือนลางไม่สามารถแยกออกจากกันได้เด่นชัด ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ไม่เหมาะสมในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์

รูปที่ 17 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก(รูปที่ 17ก) และกระบือมูราห์ (รูปที่ 17ข) ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0. 5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาทีบนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 68



รูปที่ 17 ก ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

7 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

8 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

9 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

10 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ ด ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

รูปที่ 17 ข ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูร่าห์เบอร์ 5

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 26 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

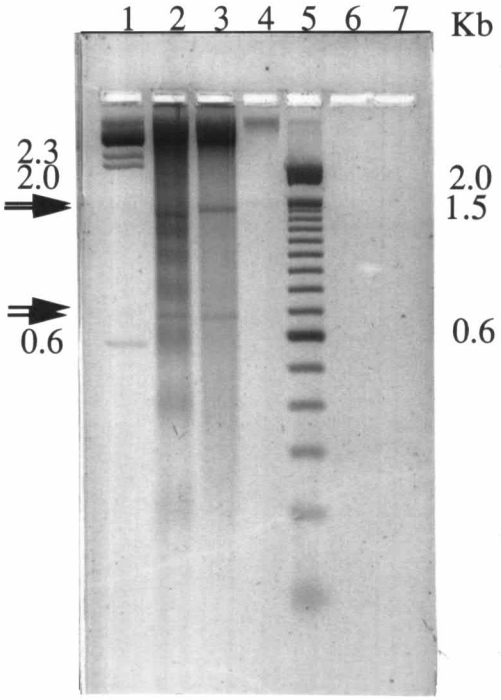
5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 49 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 50 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

ตารางที่ 8 แสดงขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด (กิโลเบส) ที่ได้จากการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของกระบือปลักและกระบือมูราห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (กิโลเบส)												
ดีเอ็นเอ มาตรฐาน	กระบือปลัก/เบอร์สัตว์								กระบือมูราห์/เบอร์สัตว์			
(λ/*Hin*dIII)	1	2	3	301	302	305	309	ด	5	26	49	50
23.1												
	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5				
9.4												
6.6												
	5.3	5.3										
	4.5		4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5				
4.4												
		4.3										
		3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8				
	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0				
	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8				
2.3												
2.0												
	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4

รูปที่ 18 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37^{o} ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 4 ชม. บนแผ่นอะกาโรสเจลชนิด NuSieve^{R} 3:1 ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม



รูปที่ 18 ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

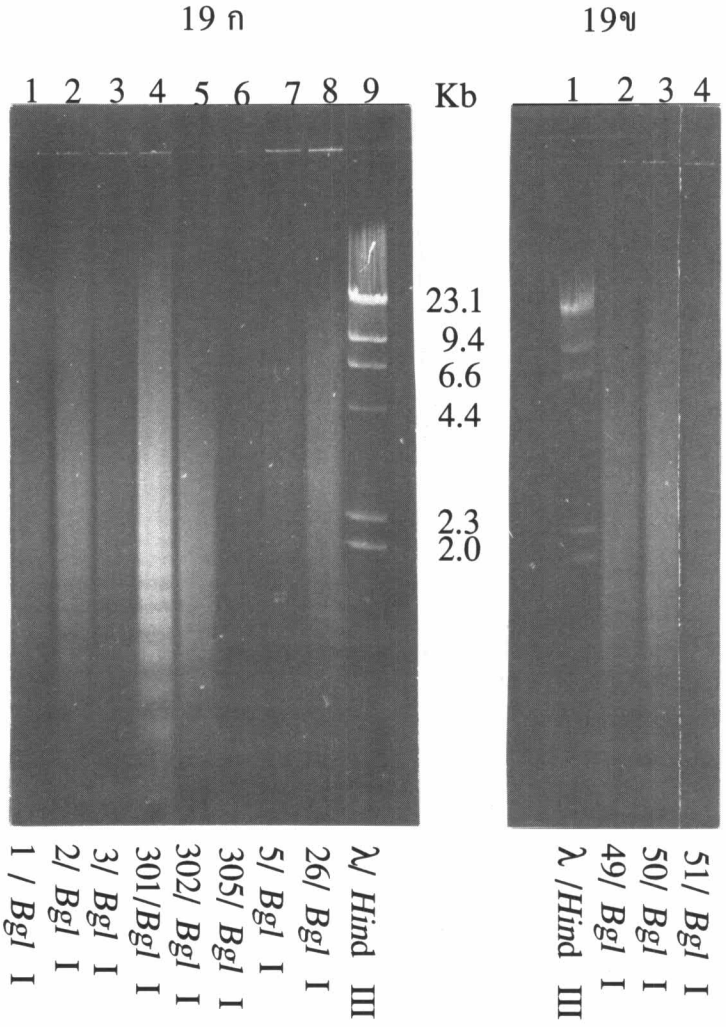
2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*H I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 49 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*H I

4 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309

5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

รูปที่ 19 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก (รูปที่ 19ก) และกระบือมูราห์ (รูปที่ 19ข) ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาทีบนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 72



รูปที่ 19ก ช่องที่ 1 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *Bgl* I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

7 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

8 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 26 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

9 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

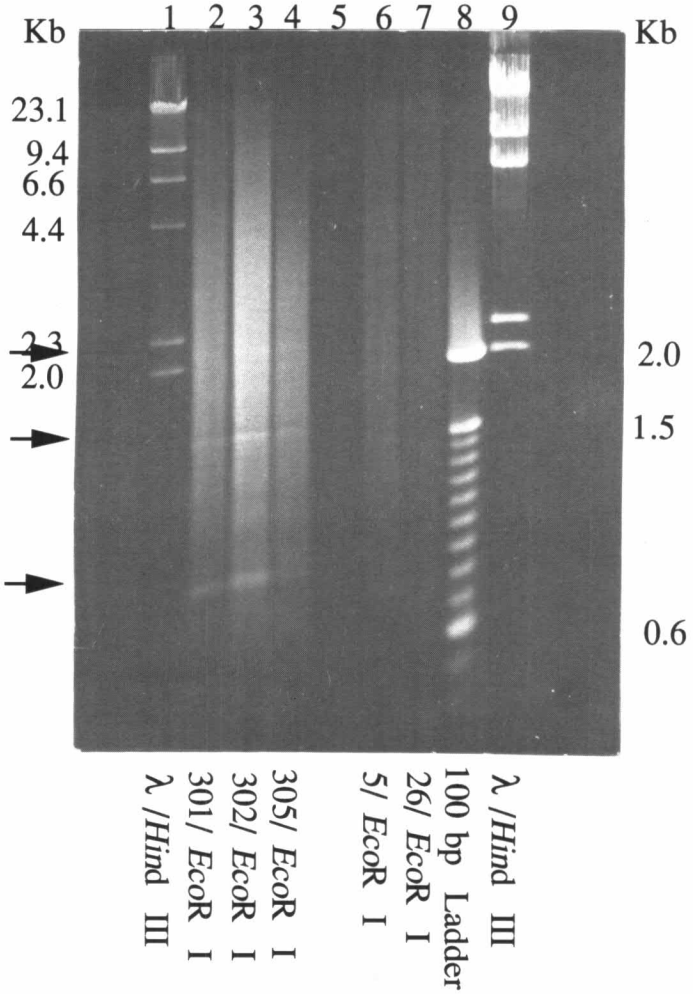
รูปที่ 19ข ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 49 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 50 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bgl I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 51 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*

รูปที่ 20 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของกระบือปลักและกระบือมูราห์ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาที บนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 74



รูปที่ 20 ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูร่าห์เบอร์ 5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

7 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูร่าห์เบอร์ 26 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I

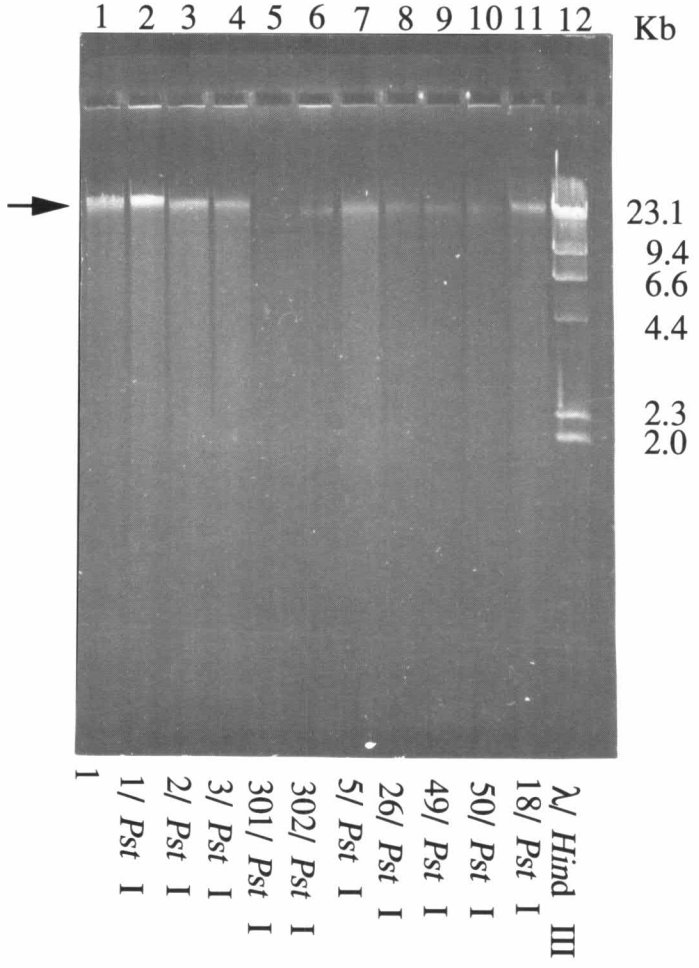
8 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

9 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III

ตารางที่ 9 แสดงขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด (กิโลเบส) ที่ได้จากการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ขนาดของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ(กิโลเบส)					
ดีเอ็นเอมาตรฐาน	กระบือปลัก/เบอร์สัตว์			กระบือมูราห์/เบอร์สัตว์	
(λ/*Hin*dIII)	301	302	305	5	26
23.1					
9.4					
6.6					
4.4					
2.3					
	2.1	2.1	2.1	-	-
2.0					
	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
0.6					
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

รูปที่ 21 รูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก และกระบือมูราห์ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม. ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 3 ชม. 30 นาที บนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมและรายละเอียดของตัวอย่างในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 77



รูปที่ 21 ช่องที่ 1 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

7 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

8 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 26 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

9 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 49 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

10 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 50 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

11 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 18 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I

12 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*d III

การวิเคราะห์ผลของรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ เมื่อดูจากรูปถ่ายโดยตรงด้วยตาอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนไม่แม่นยำ หรือไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ Innocenti และ คณะ (1990) ได้รายงานการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอของสายพันธุ์ต่างๆ ของ Zymomonas โดยการนำแผ่นฟิลม์ที่ได้จากการถ่ายรูปไปอ่านค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากเครื่องอ่านความเข้ม ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและสามารถจำแนกสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ และเนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากรูปถ่ายโดยตรง จะพบว่ามีแถบดีเอ็นเอบางแถบที่แตกต่างกันอย่างไม่เด่นชัด ดังนั้นการวิเคราะห์ผลที่ได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยการอ่านความเข้มของแถบดีเอ็นเอจากเครื่องอ่านความเข้ม จึงจะทำให้ได้ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่แน่นอนขึ้น ดังแสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ในรูปที่ 22-25 และเมื่อนำมาคำนวณเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของความเหมือน S_D (Disc similarity coefficient) ดังสูตร

S_D = สองเท่าของจำนวนแถบที่เหมือน/จำนวนแถบทั้งหมด

ค่า S_D ที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบหาความคล้ายคลึง หรือความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอของกระบือทั้งสองสายพันธุ์ โดยใช้ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกระบือแต่ละตัวประกอบกับการดูผลจากเจลด้วยตาเปล่ามาเป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างภายในสายพันธุ์กระบือปลักหรือกระบือมูราห์ด้วยกัน หรือหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบระหว่างกระบือปลักกับกระบือมูราห์ ดังแสดงในตารางที่ 10-21 ค่า S_D สัมพัทธ์จะคำนวณได้ดังตัวอย่างเช่น

เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่อ่านจากเครื่องอ่านความเข้มของกระบือปลักเบอร์ 305 กับกระบือปลักเบอร์ 309 พบว่า

กระบือปลักเบอร์305	มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ =	8	แถบ
กระบือปลักเบอร์ 309	มีจำนวนแถบดีเอ็นเอ =	7	แถบ
มีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน	=	6	แถบ

และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดรวมกัน = 8+7 = 15 แถบ

ดังนั้นเมื่อใช้สูตร S_D =สองเท่าของจำนวนแถบที่เหมือน/จำนวนแถบทั้งหมด

$$= \frac{2 \times 6}{15} = 0.80$$

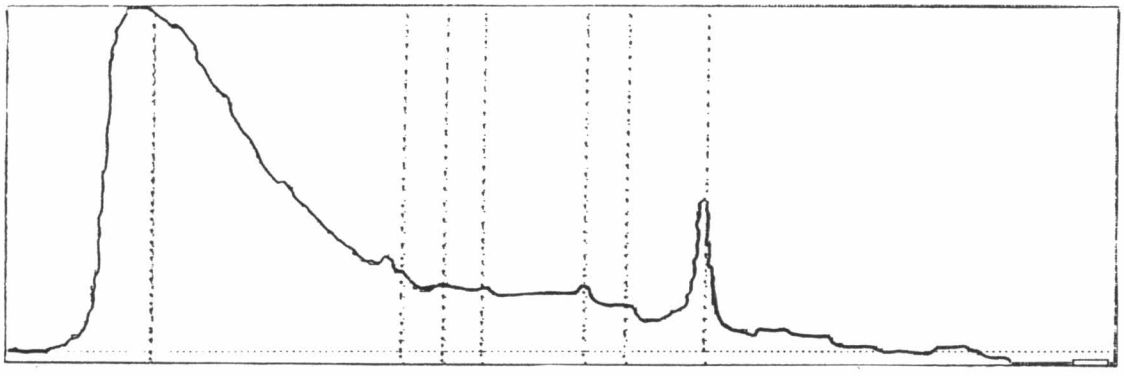
เมื่อเปรียบเทียบค่า S_D สัมพัทธ์ที่ได้ระหว่างกระบือปลักด้วยกัน โดยใช้กระบือปลักแต่ละตัวเป็นตัวเปรียบเทียบพบว่าค่า S_D สัมพัทธ์ที่ได้มีทั้งค่าที่ใกล้เคียงกันและแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 10-17 ซึ่งแสดงว่ารูปแบบดีเอ็นเอของกระบือปลักแต่ละตัวมีความแตกต่างกันโดยเฉพาะกระบือปลักเบอร์ 1 ที่มีค่า S_D สัมพัทธ์น้อยกว่า 0.50 เมื่อเปรียบเทียบกับกระบือปลักตัวอื่น ซึ่งแสดงว่ารูปแบบดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1 มีความแตกต่างกับรูปแบบดีเอ็นเอของกระบือปลักตัวอื่นและเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย S_D สัมพัทธ์ของกระบือปลักเบอร์ 1 กับค่าเฉลี่ย S_D สัมพัทธ์ของกระบือปลักตัวอื่นจะพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, t-test) ดังแสดงในตารางที่ 22

เมื่อทดลองใช้ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอของกระบือมูราห์แต่ละตัวเป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบกับกระบือมูราห์ตัวอื่นจะคำนวณหาค่า S_D สัมพัทธ์ได้ดังแสดงในตารางที่ 18-21 จะพบว่าค่า S_D สัมพัทธ์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันซึ่งแสดงว่ารูปแบบดีเอ็นเอของกระบือมูราห์แต่ละตัวมีลักษณะใกล้เคียงกันและค่าเฉลี่ย S_D สัมพัทธ์ของกระบือมูราห์ก็ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($p > 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 23

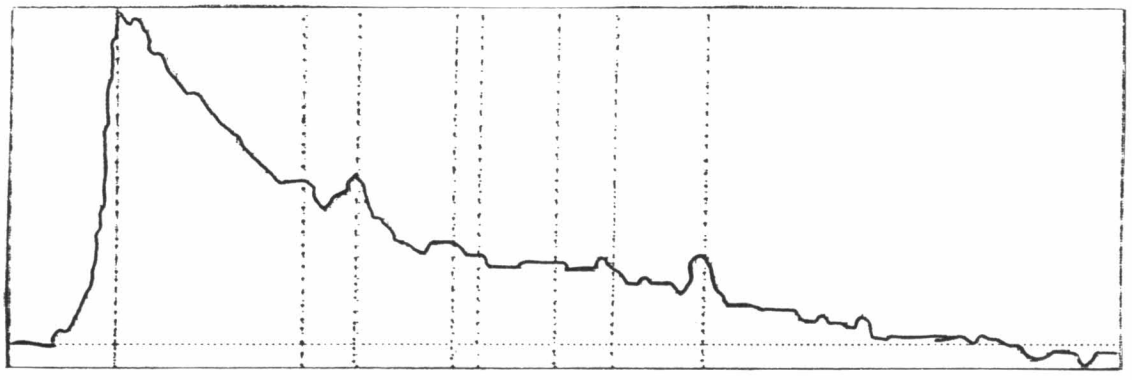
เมื่อเปรียบเทียบค่า S_D สัมพัทธ์ที่ได้ระหว่างกระบือปลักกับกระบือมูราห์จะพบว่าค่า S_D สัมพัทธ์ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.30 หรือเท่ากับ 0.00 ซึ่งแสดงว่ารูปแบบดีเอ็นเอของกระบือปลักมีความแตกต่างกับกระบือมูราห์และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

รูปที่22 ตัวอย่างการวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวจากเครื่องวัดความเข้ม ของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1, 2 และ 3 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

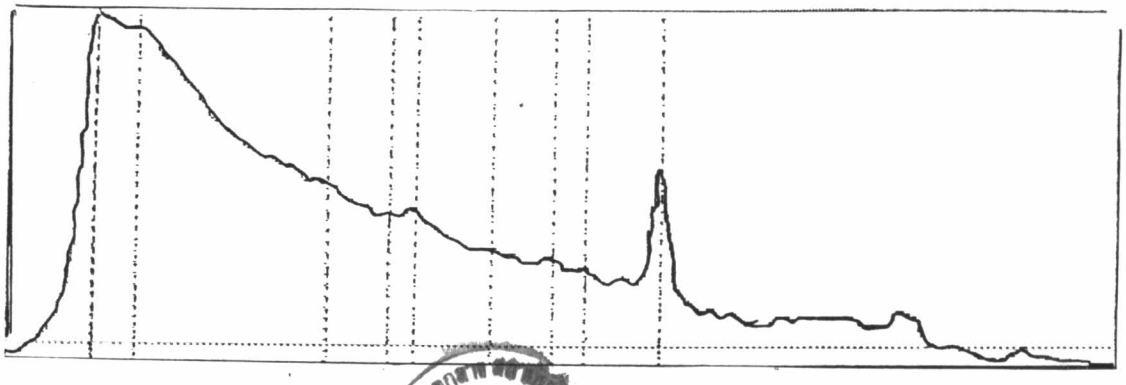
เบอร์ 1



เบอร์ 2



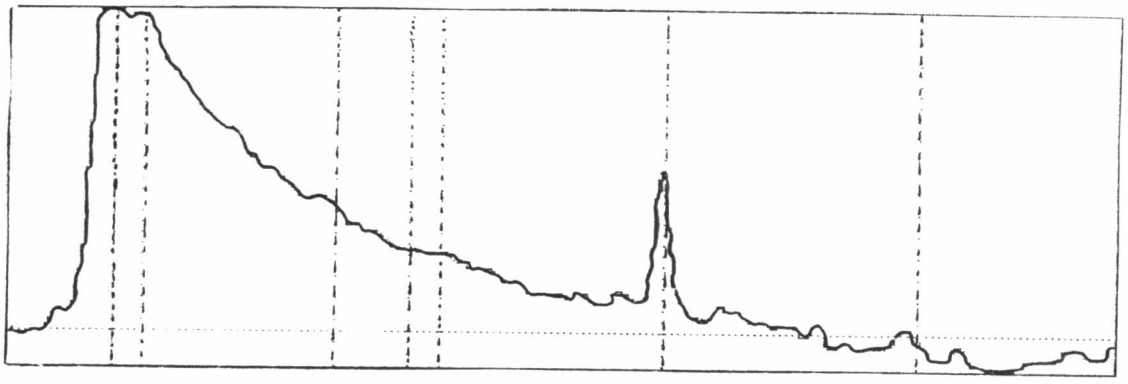
เบอร์ 3



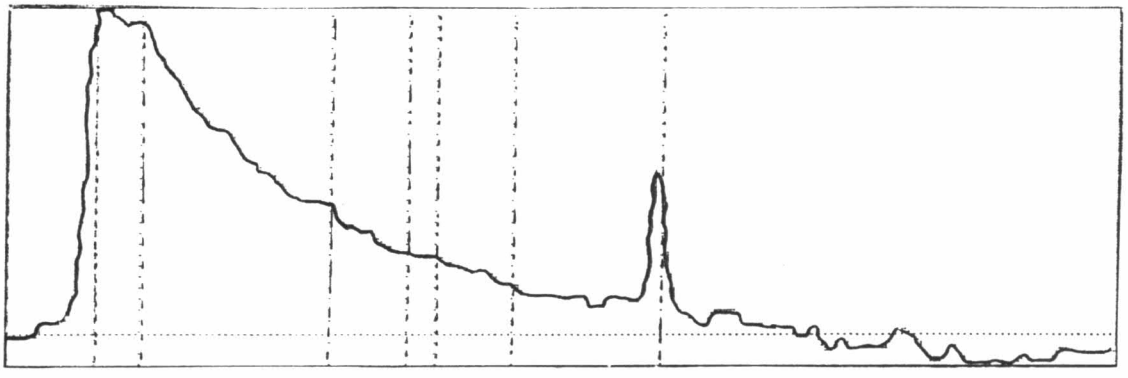
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 ตัวอย่างการวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัว จากเครื่องวัดความเข้มของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของ กระบือปลักเบอร์ 301, 302 และ 305 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

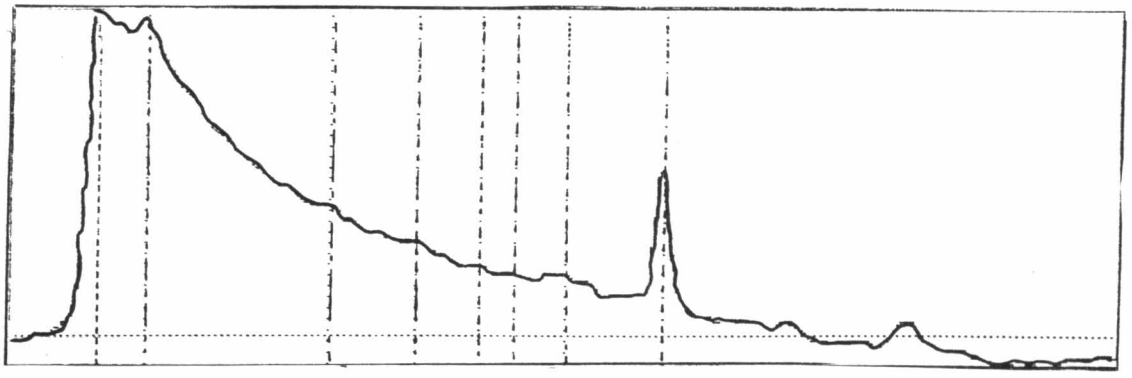
เบอร์ 301



เบอร์ 302

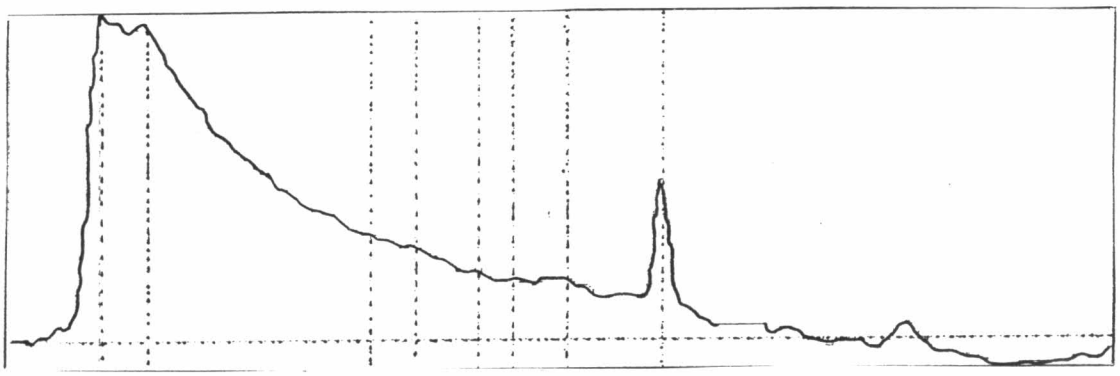


เบอร์ 305

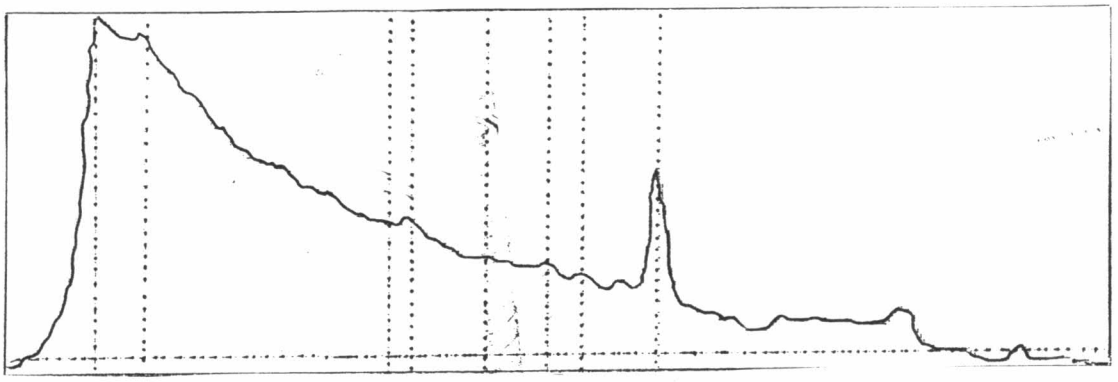


รูปที่ 24 ตัวอย่างการวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัว จากเครื่องวัดความเข้มของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 และ ด และกระบือมูราห์เบอร์ 5 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

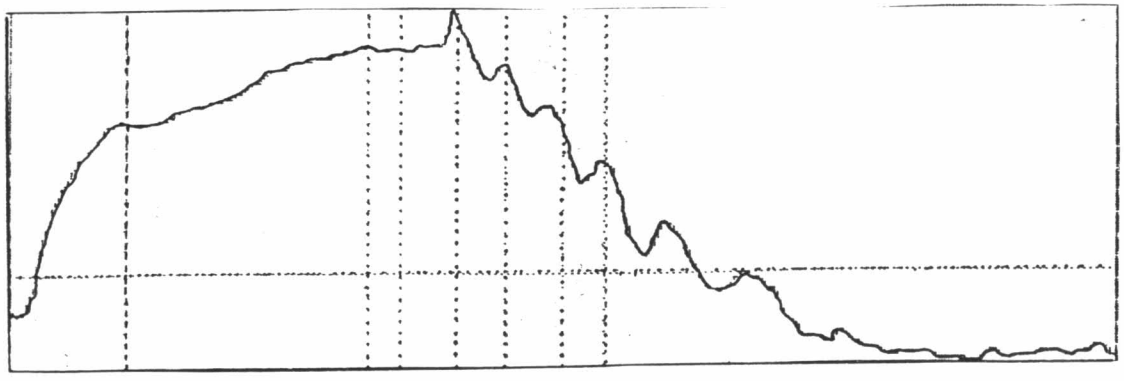
เบอร์ 309



เบอร์ ด

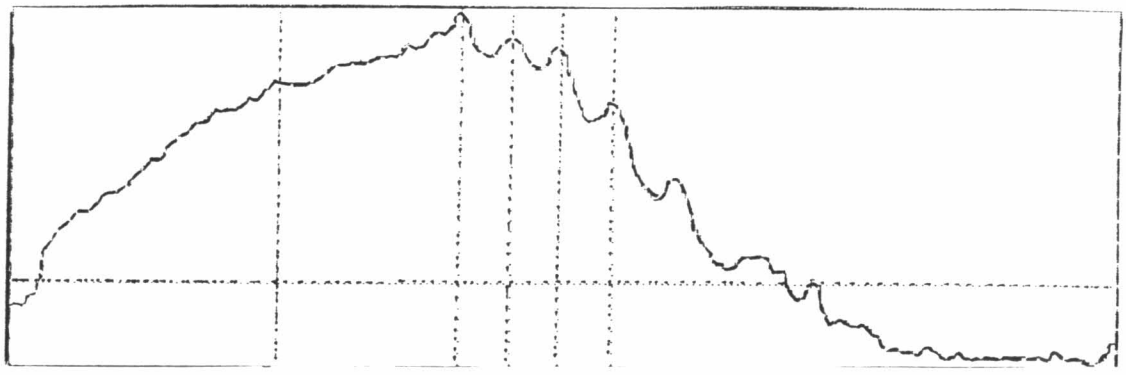


เบอร์ 5

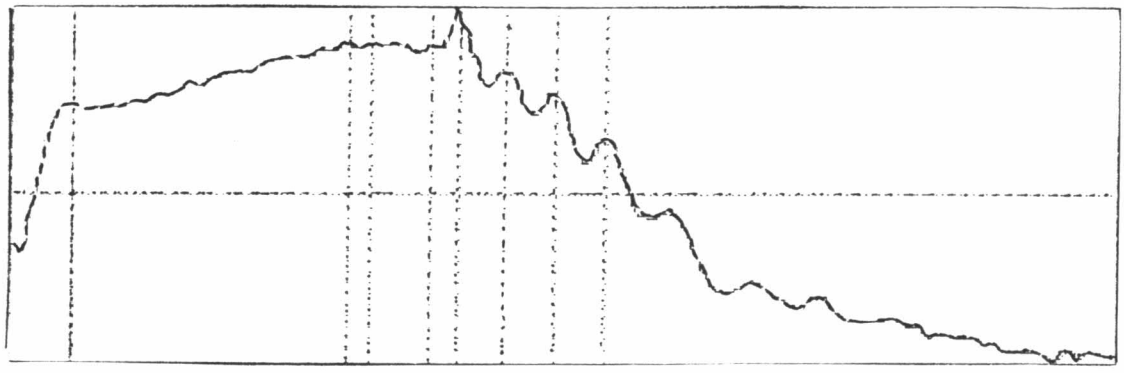


รูปที่ 25 ตัวอย่างการวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัว จากเครื่องวัดความเข้มของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 26, 49 และ 50 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

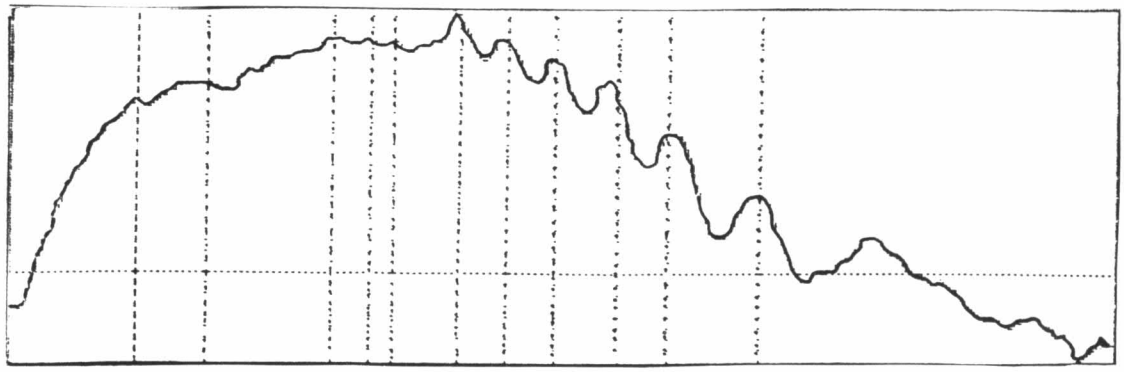
เบอร์ 26



เบอร์ 49



เบอร์ 50



ตารางที่ 10 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 1

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1
กระบือปลัก / 2	0.57
3	0.67
301	0.67
302	0.40
305	0.67
309	0.40
ด	0.40
กระบือมูร่าห์ / 5	0.29
26	0.17
49	0.27
50	0.00

ตารางที่ 11 ค่า S_D ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 2

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า S_D สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2
กระบือปลัก / 1	0.57
3	0.57
301	0.57
302	0.67
305	0.67
309	0.67
ด	0.67
กระบือมูราห์ / 5	0.00
26	0.15
49	0.25
50	0.21

ตารางที่ 12 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 3

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3
กระบือปลัก / 1	0.67
2	0.57
301	0.67
302	0.80
305	1.00
309	0.80
ด	0.80
กระบือมูราห์ / 5	0.25
26	0.14
49	0.24
50	0.20

ตารางที่ 13 ค่า S_D ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 301

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า S_D สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301
กระบือปลัก / 1	0.67
2	0.57
3	0.67
302	0.80
305	0.67
309	0.80
ด	0.80
กระบือมูราห์ / 5	0.14
26	0.33
49	0.27
50	0.33

ตารางที่ 14 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 302

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302
กระบือปลัก/ 1	0.40
2	0.67
3	0.80
301	0.80
305	0.80
309	0.80
ด	0.67
กระบือมูราห์ / 5	0.00
26	0.00
49	0.20
50	0.22

ตารางที่ 15 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 305

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305
กระบือปลัก / 1	0.67
2	0.67
3	0.70
301	0.67
302	0.80
309	0.80
ด	0.80
กระบือมูราห์ / 5	0.00
26	0.00
49	0.00
50	0.21

ตารางที่ 16 ค่า S_D ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ 309

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า S_D สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309
กระบือปลัก / 1	0.40
2	0.67
3	0.80
301	0.80
302	0.80
305	0.80
ด	0.67
กระบือมูราห์ / 5	0.31
26	0.31
49	0.25
50	0.21

ตารางที่ 17 ค่า S_D ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือปลักเบอร์ ด

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า S_D สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ ด
กระบือปลัก / 1	0.40
2	0.67
3	0.80
301	0.80
302	0.67
305	0.80
309	0.67
กระบือมูราห์ / 5	0.20
26	0.15
49	0.30
50	0.32

ตารางที่ 18 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือมูราห์เบอร์ 5

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 5
กระบือปลัก / 1	0.29
2	0.00
3	0.25
301	0.14
302	0.00
305	0.00
309	0.31
ด	0.20
กระบือมูราห์ / 26	0.75
49	0.75
50	0.60

ตารางที่ 19 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือมูราห์เบอร์ 26

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 26
กระบือปลัก / 1	0.17
2	0.15
3	0.14
301	0.33
302	0.00
305	0.00
309	0.31
ด	0.15
กระบือมูราห์ / 5	0.75
49	1.00
50	0.80

ตารางที่ 20 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือมูราห์เบอร์ 49

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 49
กระบือปลัก / 1	0.27
2	0.25
3	0.24
301	0.27
302	0.20
305	0.00
309	0.25
ด	0.30
กระบือมูราห์/ 5	0.75
26	1.00
50	0.60

ตารางที่ 21 ค่า SD ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ของกระบือมูราห์เบอร์ 50

สายพันธุ์ / เบอร์สัตว์	ค่า SD สัมพัทธ์กับไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอของกระบือมูราห์เบอร์ 50
กระบือปลัก / 1	0.00
2	0.21
3	0.20
301	0.33
302	0.22
305	0.21
309	0.21
ด	0.32
กระบือมูราห์ / 5	0.60
26	0.80
49	0.60

ตารางที่ 22 แสดงค่าเฉลี่ยและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า S_D สัมพัทธ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักแต่ละตัวเมื่อเปรียบเทียบกับกระบือปลักตัวอื่น ๆ

เบอร์สัตว์	ค่าเฉลี่ย S_Dสัมพัทธ์ (X±SD)	เบอร์สัตว์							
		1	2	3	301	302	305	309	ด
1	0.54±0.14	-	NS	*	*	*	**	*	NS
2	0.63±0.05	NS	-	*	NS	NS	**	NS	NS
3	0.72±0.09	*	*	-	NS	NS	NS	NS	NS
301	0.71±0.09	*	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS
302	0.71±0.15	*	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS
305	0.73±0.07	**	**	NS	NS	NS	-	NS	NS
309	0.71±0.15	*	NS	NS	NS	NS	NS	-	NS
ด	0.69±0.14	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-

หมายเหตุ : NS = Not significant, $p > 0.01$

* = $p < 0.05$

** = $p < 0.01$

ตารางที่ 23 แสดงค่าเฉลี่ยและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า S_D สัมพัทธ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์แต่ละตัวเมื่อเปรียบเทียบกับกระบือมูราห์ตัวอื่น ๆ

เบอร์สัตว์	ค่าเฉลี่ย S_Dสัมพัทธ์ (X±SD)	เบอร์สัตว์			
		5	26	49	50
5	0.70±0.09	-	NS	NS	NS
26	0.85±0.13	NS	-	NS	NS
49	0.78±0.20	NS	NS	-	NS
50	0.67±0.12	NS	NS	NS	-

หมายเหตุ : NS = Not significant, $p > 0.01$