บทที่ 1

บทนำ

ลักษณะทั่วไปของกระบือ

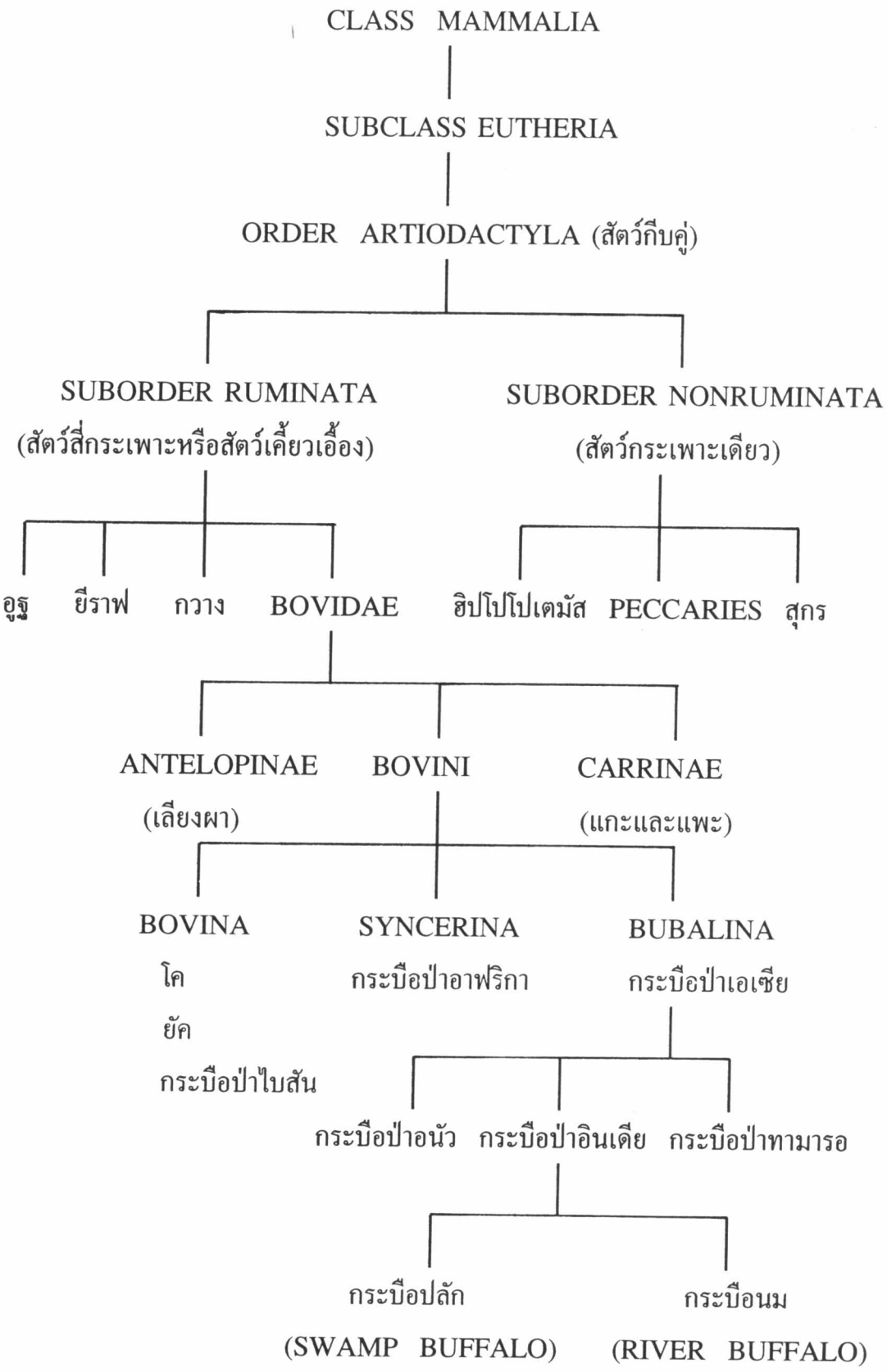
กระบือเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในชั้นย่อย Eutheria และอันดับ Artiodactyla หรือ สัตว์กีบคู่ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 อันดับย่อยคืออันดับย่อยที่ 1 สัตว์กระเพาะเดียว ได้แก่ สุกร และ ฮิปโปโปเตมัส เป็นต้น อันดับย่อยที่ 2 สัตว์สี่กระเพาะ หรือสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 วงศ์ คือ อูฐ ยีราฟ กวางและ Bovidae สำหรับวงศ์ Bovidae สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 เผ่าคือ 1) เลียงผา 2) แกะและแพะ และ 3) Bovini

ซึ่งเผ่า Bovini ประกอบด้วย 3 พวก (Mason, 1977) ดังแสดงในแผนผังที่ 1 ซึ่งได้แก่

1. Bovina (Cattle) ได้แก่ โค ยัค และ กระบือป่าไบสัน
2. Bubalina (Asiatic buffalo) ได้แก่ กระบือเอเชีย
3. Syncerina (African buffalo) ได้แก่ กระบือป่าอาฟริกา

กระบือเอเชีย หรือ Bubalina พบได้ทั่วไปในยุโรปและเอเชียใต้ แต่เมื่อโลกเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ จึงทำให้เหลือพบอยู่เฉพาะในประเทศอินเดีย ประเทศแถบอินโดจีนและตามเกาะต่าง ๆในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กระบือชนิดนี้สามารถแบ่งย่อยออก ได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ

1.กระบือป่าอนัว (*Bubalus depressicornis*) เป็นกระบือป่าที่มีขนาดเล็กที่สุด พบเฉพาะที่เกาะซีลีเบสของประเทศอินโดนีเซียเท่านั้นชอบอยู่ตัวเดียวหรือเป็นคู่ ไม่อยู่รวมกันเป็นฝูง อาศัยตามภูเขาหรือชายป่ามีเขาสั้น มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 45


CLASS MAMMALIA
SUBCLASS EUTHERIA
ORDER ARTIODACTYLA (สัตว์กีบคู่)
SUBORDER RUMINATA
(สัตว์สี่กระเพาะหรือสัตว์เคี้ยวเอื้อง)
SUBORDER NONRUMINATA
(สัตว์กระเพาะเดียว)
อูฐ
ยีราฟ
กวาง
BOVIDAE
ฮิปโปโปเตมัส
PECCARIES
สุกร
ANTELOPINAE
(เลียงผา)
BOVINI
CARRINAE
(แกะและแพะ)
BOVINA
โค
ยัค
กระบือป่าไบสัน
SYNCERINA
กระบือป่าอาฟริกา
BUBALINA
กระบือป่าเอเซีย
กระบือป่าอนัว
กระบือป่าอินเดีย
กระบือป่าทามารอ
กระบือปลัก
(SWAMP BUFFALO)
กระบือนม
(RIVER BUFFALO)

แผนผังที่ 1

2. กระบือป่าทามารอ(*Bubalus mindorensis*) พบเฉพาะที่เกาะมินโดโร ของประเทศฟิลิปปินส์เท่านั้น ในบางครั้งเรียกว่า กระบือมินโดโร มีขนาดใหญ่กว่ากระบือป่าอนัวแต่เล็กกว่ากระบือป่าอินเดียชอบอยู่เป็นฝูงแต่ไม่เกิน 10 ตัว มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 46

3. กระบือป่าอินเดีย (*Bubalus arnee*) เป็นกระบือที่มีขนาดใหญ่พบอาศัย เป็นฝูงอยู่ทั่วไปทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย ประเทศศรีลังกาและประเทศแถบอินโดจีนชอบอยู่เป็นฝูงใหญ่ และอาศัยอยู่ใกล้น้ำ

กระบือที่เลี้ยงกันอยู่ในทวีปต่างๆ ทุกวันนี้สืบเชื้อสายมาจากกระบือป่าอินเดีย แต่ได้มีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงจนกลายเป็นสัตว์เลี้ยง หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า กระบือบ้าน (*Bubalus bubalis* หรือ Water buffalo) ซึ่ง Mac Gregor (1941) ได้แบ่งกระบือบ้านออกเป็นสองประเภทตามรูปร่าง สรีรวิทยา อุปนิสัย และจุดประสงค์การใช้งานที่ต่างกัน ได้แก่

1. กระบือแม่น้ำหรือกระบือนม (river หรือ dairy type) ได้แก่ กระบือพันธุ์มูราห์ กระบือพันธุ์เซอร์ตี เป็นต้น กระบือประเภทนี้ชอบน้ำสะอาดและใส เช่น น้ำแม่น้ำ ไม่ชอบโคลนตม นิยมเลี้ยงไว้รีดนมและใช้เนื้อเป็นอาหารมีมากตั้งแต่ประเทศอินเดีย บังคลาเทศ ศรีลังกา เรื่อยไปทางตะวันตกจนถึง อียิปต์ บัลเกเรีย ยุโรปตอนใต้และอเมริกาใต้ เช่น บราซิล

2. กระบือปลักหรือกระบืองาน (swamp หรือ draught type) กระบือประเภทนี้ชอบลงปลักลงโคลนและแช่ในโคลนเพื่อลดความร้อน และป้องกันแมลงรบกวน เป็นกระบือที่ให้น้ำนมน้อยเพราะไม่ได้คัดเลือกเพื่อรีดนม แต่นิยมเลี้ยงไว้ใช้สำหรับทำงานในท้องนา เพื่อปลูกข้าวใช้ในการลากเข็นทำงานและใช้เนื้อเป็นอาหาร พบมากในเขตตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีนใกล้แม่น้ำแยงซีเกียง และในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่แคว้นอัสสัมของอินเดียมาทางตะวันออก เช่น พม่า ไทย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ซึ่งเป็นเขตที่ฝนตกชุกและพบทางภาคเหนือของประเทศออสเตรเลีย (Cockrill, 1974)

กระบือปลักไทย

เป็นกระบือประเภทกระบืองาน มีลักษณะขนาดและสีโดยทั่วๆไป คล้ายกับกระบือในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และจีน มีลักษณะลำตัวใหญ่ คอใหญ่กว้าง ลักษณะเขาแบน ใหญ่โค้งงอเข้าหากัน บางตัวมีลักษณะเขาโค้งไปข้างหลัง ลักษณะหัวค่อนข้างยาวหน้าผากแบน ใบหน้าแคบ มีขนปกคลุมบางและหยาบ มีหางยาวไปถึงข้อเข่าหลัง ลักษณะเท้าใหญ่ กีบใหญ่แบน (รูปที่ 1) กีบทั้งคู่ชิดกันแข็งแรง จึงทำให้ไม่ลื่นการก้าวเดินเคลื่อนไหวได้ช้า แต่ทำงานทนทำให้มีประโยชน์มากสำหรับทำงานในท้องนาที่มีน้ำแฉะ แต่กระบือปลักมีจุดอ่อนในเรื่อง ระบบควบคุมความร้อน จึงทำงานในเวลาแดดจัดร้อนจัดไม่ได้ ชอบลงไปนอนแช่ในปลักในโคลนเพื่อลดความร้อนและป้องกันแมลง กระบือปลักไทยมี 2 สี คือ

1. สีเทาเข้มเกือบดำ ผิวหนังมีสีเทาแก่เมื่อแรกเกิด และมีสีเข้มขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้น

2. สีเผือก ผิวหนังมีสีชมพู ขนยาว กีบและเขามีสีเหลือง และมักมีรอยตกกระ เป็นจุดดำบนลำตัว แต่ลูกตาเป็นสีดำสนิท มีจำนวนมากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละภาค

รูปที่ 1 กระบือปลักไทย (Swamp buffalo)

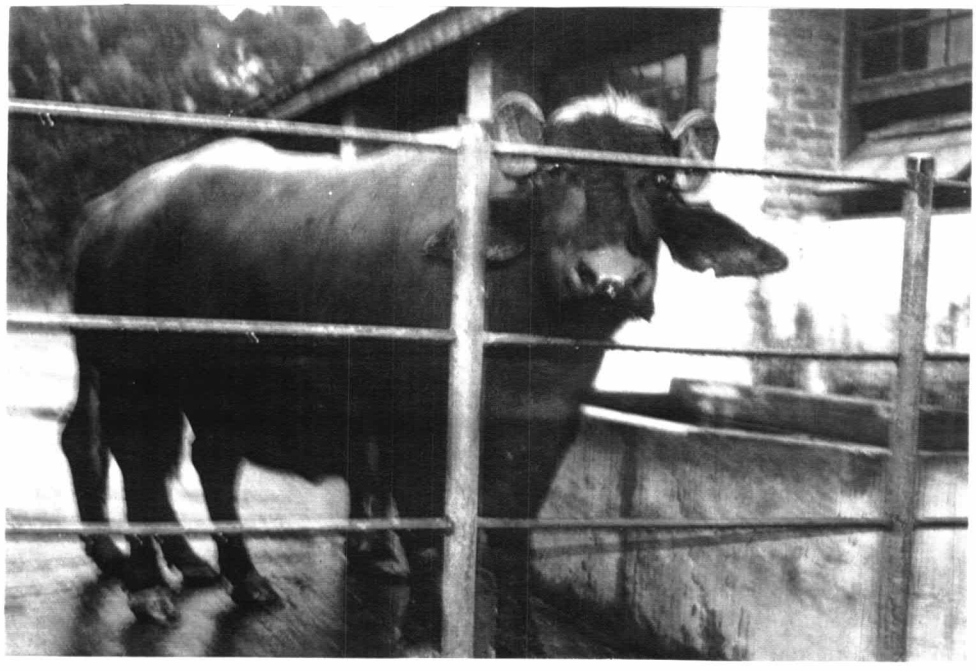
กระบือปลักไทยมีน้ำหนักแรกเกิดโดยเฉลี่ย 28.0 กิโลกรัมสำหรับเพศผู้ และ 28.2 กิโลกรัมสำหรับเพศเมีย (จรัญ จันทลักขณา และคณะ, 1985) แต่เนื่องจากกระบือชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตช้า ดังนั้นเมื่อโตเต็มวัยเมื่ออายุโดยเฉลี่ย 3 ปีขึ้นไป กระบือเพศผู้จะหนักประมาณ 400 - 600 กิโลกรัม (เฉลี่ย 489 กิโลกรัม) และกระบือเพศเมียจะหนักประมาณ 360 - 440 กิโลกรัม (เฉลี่ย 382 กิโลกรัม ; Otsuka and Na Phuket, 1974)

กระบือปลักเป็นสัตว์ที่ผสมพันธุ์ไม่เป็นฤดู และมักไม่แสดงอาการการเป็นสัดให้เห็นเด่นชัด มีระยะวงจรการเป็นสัดนาน 20-24 วัน (เฉลี่ย 22 วัน) และระยะการเป็นสัดนาน 72-120 ชม. จะตกไข่หลังการเป็นสัด 18 ชม. (มณีวรรณ กมลพัฒนะ และคณะ, 1979) ซึ่งแตกต่างกับกระบือปลักในเขตหนาวที่มีระยะวงจรการเป็นสัดไม่สม่ำเสมอ ตั้งแต่ 9-38 วัน และมีระยะการเป็นสัดสั้นกว่าเพียง 9-24 ชม. เท่านั้น (Kanai and Shimizu, 1983)

กระบือมูราห์

เป็นกระบือประเภทกระบือนม มีถิ่นที่อยู่เดิมคือที่รัฐปัญจาบ รัฐเดลี และยุโรปตะวันออก ซึ่งในประเทศอินเดียถือว่ากระบือพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่สำคัญที่สุด และให้น้ำนมมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกระบือนมสายพันธุ์อื่นๆ มีผู้นิยมเลี้ยงกันมากตามโรงงานอุตสาหกรรมผลิตนมในเมือง และในหมู่ประชาชน รัฐบาลอินเดียให้ความสำคัญกับกระบือมูราห์ในการปรับปรุงพันธุ์กระบือทั่วประเทศ และส่งขายเป็นสินค้าออกมากกว่ากระบือพันธุ์อื่นๆ มีผิวหนังสีดำหรือเทาดำ และขนสีดำหางยาว มีสีขาวที่หางและที่หน้าผาก ลักษณะของเขาสั้นบิดเป็นเกลียว ขนาดของหัวใหญ่กว่ากระบือปลักและหน้าผากนูน มีหน้าอกเล็กแต่ขาใหญ่กว่า (รูปที่ 2) กล่าวกันว่า กระบือพันธุ์นมที่ดีจะมีเต้านมใหญ่ หัวนมยาว สามารถให้นมได้มากกว่าวัวพื้นเมือง (Zebu cattle) ถึง 4 เท่า (Sundaresan, 1979) กระบือชนิดนี้ชอบน้ำสะอาดและชอบอาบน้ำ ทุกๆวัน ไม่เหมาะที่จะทำงานในท้องนาซึ่งมีน้ำนอง การเลี้ยงดูจะต้องให้อาหาร

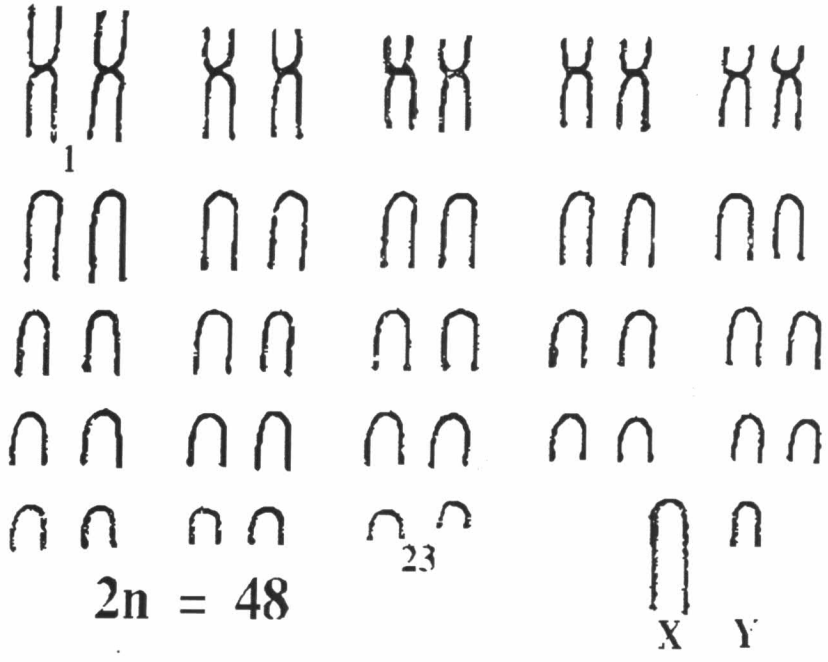
ดีกว่ากระบือปลัก สำหรับในประเทศไทยไม่พบกระบือประเภทนี้ในธรรมชาติแต่ได้มีการนำเข้ากระบือพันธุ์นี้มาจากประเทศอินเดียตั้งแต่ปี ค.ศ. 1978 โดยกรมปศุสัตว์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กระบือ โดยนำมาผสมกับกระบือปลักเพื่อให้ได้ลูกผสมที่สามารถผลิตเนื้อ และน้ำนมได้สูงขึ้นเพื่อประโยชน์ในการบริโภค และก็สามารถใช้ทำงานได้ด้วย (ศักดิ์สงวน กอนันทา, 1985) ในปัจจุบันจะพบลูกผสมระหว่างกระบือทั้งสองสายพันธุ์ได้ทั่วๆไป ในทุกภาคของประเทศแต่เกษตรกรนิยมใช้กระบือลูกผสมชนิดนี้ในการใช้งาน และเป็นอาหารแทนการรีดนม กระบือมูราห์ที่เกิดในประเทศไทยมีน้ำหนักแรกเกิดโดยเฉลี่ย 32.1 กิโลกรัม เมื่อโตเต็มวัยกระบือเพศผู้จะมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 540 กิโลกรัม และกระบือเพศเมียจะหนักประมาณ 450 กิโลกรัม กระบือมูราห์เป็นหนุ่มเป็นสาวเมื่ออายุ 2 ปีครึ่งถึง 3 ปี แต่กระบือปลักจะช้ากว่าคือต้องอายุโดยเฉลี่ย 3 ปีขึ้นไป (ผกาพรรณ บุณยะเวชชีวิน และคณะ, 1989) กระบือทั้งสองชนิดเมื่อได้รับการผสมครั้งแรกมักจะผสมไม่ติดหรือเกิดการแท้ง แต่ทั้งนี้ก็มีส่วนสัมพันธ์กับน้ำหนักของกระบือด้วย พบว่ากระบือมูราห์ มีระยะวงจรการเป็นสัดสั้นกว่ากระบือปลัก คือมีระยะเพียง 18-20 วัน และระยะการเป็นสัด เพียง 24-72 ชม.เท่านั้น (Bhattacharya,1974) ทั้งกระบือปลักและกระบือมูราห์จะมีความแตกต่างกันทั้งในเรื่องของรูปร่าง ลักษณะ อุปนิสัย และลักษณะทางพันธุกรรม



รูปที่ 2 กระบือมูราห์ (Murrah buffalo)

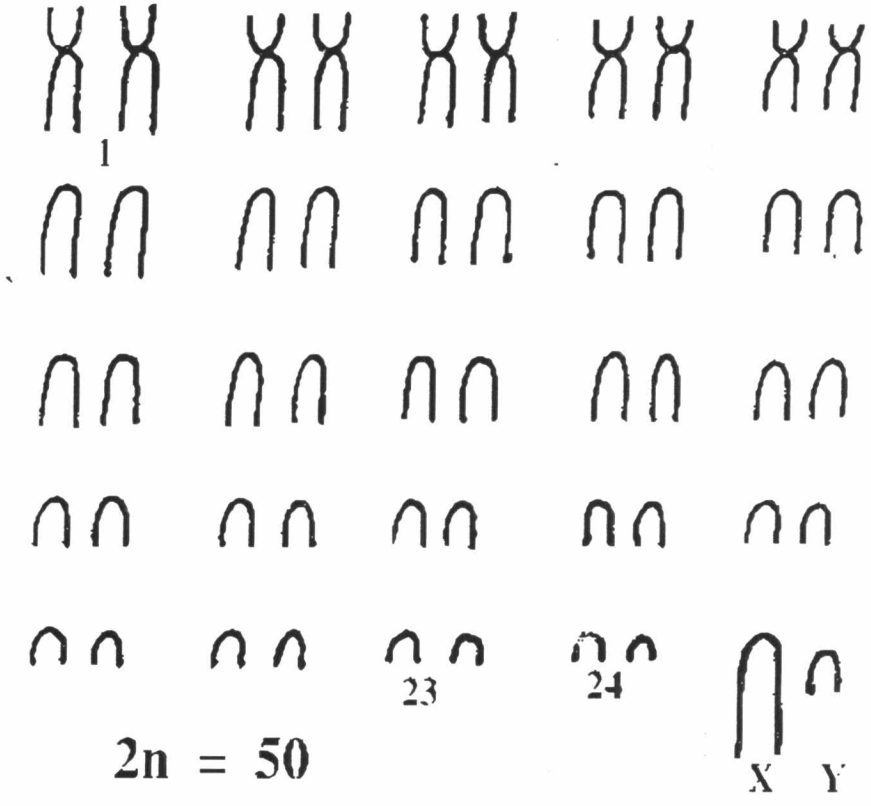
ลักษณะทางพันธุกรรม

จากการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของกระบือทั้งสองชนิด โดยดูจากลักษณะและจำนวนโครโมโซมสามารถสรุปว่า คาริโอไทป์ (Karyotype) ของกระบือทั้งสองชนิดมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน (Manino, 1944 ; Fischer and Ulbrich, 1968 ; Rommelt,1968 ; Fischer, 1971, 1974 ; Bongso and Jainudeen, 1979; เสนีย์ ส่งศรี,1980; วิวัฒน์ ชวนใช้ , 1981; Bongso and Hilmi, 1982) กล่าวคือ กระบือปลักมีจำนวน โครโมโซมทั้งหมด (2n) = 48 โครโมโซม ซึ่งประกอบด้วย ออโตโซม (autosome) แบบติดตอนกลาง (metacentric) ขนาดใหญ่ 1คู่ แบบติดกึ่งตอนกลาง (submetacentric) ขนาดรองลงมา 4 คู่ และโครโมโซมแบบติดตอนปลาย (acrocentric) ขนาดต่างๆอีก 18 คู่ ส่วนโครโมโซมเพศ X เป็นแบบติดตอนปลายขนาดใหญ่ และโครโมโซม Y เป็นแบบติดตอนปลายขนาดเล็ก (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงคาริโอไทป์ของกระบือปลัก (Swamp buffalo)
(จากรายงานของ วิวัฒน์ ชวนะนิกุล , 1986)

ส่วนกระบือมูราห์มีจำนวนโครโมโซม (2n)= 50 โครโมโซมซึ่งมากกว่าของกระบือปลัก 1 คู่ ถึงแม้ว่ากระบือทั้งสองชนิดนี้จะมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน แต่ปรากฏว่าลักษณะโครโมโซมของกระบือทั้งสองชนิดนี้เกือบจะเหมือนกันในทุกลักษณะ จะต่างกันตรงที่กระบือมูราห์จะไม่มีโครโมโซมแบบติดตอนกลางขนาดใหญ่ แต่มีโครโมโซมแบบติดกึ่งตอนกลางจำนวน 5 คู่และแบบติดตอนปลาย 19 คู่ ส่วนโครโมโซมเพศ X และ Y เป็นแบบติดตอนปลายเช่นเดียวกับโครโมโซมของกระบือปลัก (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงคาริโอไทป์ของกระบือมูราห์ (Murrah buffalo)
(จากรายงานของ วิวัฒน์ ชวนะนิกุล , 1986)

จากการศึกษาโครโมโซมโดยใช้เทคนิค G - Banding(Toll and Halman, 1976; Rommelt, 1976; Bongso and Hilmi,1982; Bongso, 1986 ; Cooper, 1991) สันนิษฐานว่ารูปแบบของโครโมโซมที่แตกต่างกันของกระบือทั้งสองชนิดนี้อาจเกิดจากการรวมตัวกัน (tandem fusion) ของโครโมโซมแบบติดตอนปลาย (acrocentric) คู่ที่ 9 กับแขนข้างสั้นของโครโมโซมแบบติดกึ่งตอนกลาง (submetacentric) คู่ที่ 4 ในคาริโอไทป์ของกระบือมูราห์ เกิดเป็นโครโมโซมแบบติดตอนกลาง (metacentric) ขนาดใหญ่คู่ที่ 1 ของ กระบือปลัก เมื่อนำกระบือปลักมาผสมข้ามสายพันธุ์กับกระบือมูราห์ ปรากฏว่าคุณสมบัติทางยีนจะไม่สูญหายไปเนื่องจากรูปร่างลักษณะโครโมโซมส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงสามารถผสมพันธุ์กันได้จะให้ลูกผสมรุ่นที่ 1 (F1) ที่มีจำนวนโครโมโซม (2n) = 49 โครโมโซมโดยที่โครโมโซมจำนวน 24 โครโมโซมมาจากกระบือปลัก และโครโมโซมส่วนที่เหลือมาจากกระบือมูราห์ และกระบือลูกผสมที่ได้มีความสมบูรณ์พันธุ์ สามารถใช้ขยายพันธุ์ต่อไปได้ (Fischer, 1974 ; Bongso and Jainudeen, 1979; เสนีย์ ส่งศรี, 1985; Hilmi, 1991) ซึ่งให้ที่ผลแตกต่างไป จากการผสมข้ามสายพันธุ์สำหรับสัตว์ที่มีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกัน เช่น ม้า (2n=64) กับลา (2n=62) ที่ให้ลูกผสมคือ ล่อ ที่เป็นหมัน

การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของกระบือ

การศึกษาและวิจัยลักษณะพันธุกรรมของกระบือในระยะแรก จะเกี่ยวกับจำนวน และดูลักษณะของโครโมโซม (Manino,1944; Fischer, 1974; Bongso and Hilmi, 1982) ต่อมาได้มีการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีทางชีวเคมีเช่น การตรวจหมู่เลือดโดยวิธีอิมมิวโน การหาความแตกต่างของโปรตีนและเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยวิธีการตรวจทางชีวเคมี (Amano, 1974, 1983;Tan et al.,1980) แต่ในการศึกษาโดยวิธีดังกล่าวนี้ ก็ยังไม่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจเนื่องจากมีข้อจำกัดอยู่หลายประการเช่นการขาดเครื่องหมายในการติดตามลักษณะพันธุกรรม และลักษณะพันธุกรรมที่ เกี่ยวข้องถูกควบคุมโดยยีนหลายๆตัว ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาโดยเริ่มนำเอาเทคนิค และวิธีการทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ศึกษาลักษณะดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ในกระบือ โดยในปี ค.ศ.1990 Bhat และคณะได้ทำการศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของ กระบือ

มูราห์ในประเทศอินเดียพบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 16.4 กิโลเบสและเมื่อทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I จะสามารถแบ่งกระบือมูราห์ออกได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม A ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะถูกเอนไซม์ ตัด 2 ชิ้นส่วนและกลุ่ม B ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะถูกเอนไซม์ตัดได้เป็น 3 ชิ้นส่วนต่อมาในปี ค.ศ. 1991 Gan และคณะได้รายงานว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักในประเทศ มาเลเซียมีขนาด 16.5 กิโลเบส และถ้าทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักด้วยเอนไซม์คัดจำเพาะ *Bam*H I จะสามารถตัดดีเอ็นเอออกได้เป็น 4 ชิ้นส่วน และในปี ค.ศ. 1994 Amano และคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกระบือปลัก และกระบือมูราห์ในประเทศต่าง ๆเช่น ประเทศญี่ปุ่น ประเทศฟิลิปปินส์ ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศไทย โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 10 ชนิดและพบว่าถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I, *Eco*R I และเอนไซม์ *Aat* I ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะได้ดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์เป็น 3 รูปแบบที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระบือปลักและกระบือมูราห์

ดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 ที่ Smith และ Wilcox ได้ค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III จากการศึกษาแบคทีเรีย *Haemophilus influenzae* และพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้ มีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอของฟาจ แต่จะไม่มีผลต่อดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆอีกมากมายหลายชนิด ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอที่จุดจำเพาะของลำดับเบสตำแหน่งต่าง ๆกัน จนถึงปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์ตัดจำเพาะมากกว่า 300 ชนิดและเมื่อนำเอาเอนไซม์ตัดจำเพาะมาประยุกต์ใช้โดยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในสายดีเอ็นเอโดยการนำชิ้นดีเอ็นเอมาแยกผ่านการทำอะกาโรสเจลหรือพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสซึ่งการที่เอนไซม์ตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ จะทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันจำนวนและตำแหน่งที่เอนไซม์ตัดจำเพาะนี้มีความจำเพาะ ในแต่ละจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วเมื่อนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

ชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวจะเคลื่อนที่โดยกระแสไฟฟ้าได้ช้ากว่าดีเอ็นเอชิ้นสั้น ทำให้ได้รูปแบบที่จำเพาะเกิดขึ้น ในลักษณะคล้ายกับลายพิมพ์นิ้วมือของแต่ละคนที่แตกต่างกันออกไป หรือที่เรียกว่า ดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ (DNA fingerprint) ซึ่งจะมีรูปแบบที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงได้มีผู้นำเอารูปแบบของดีเอ็นเอ ฟิงเกอร์พรินท์ไปศึกษาวิเคราะห์ทำแผนที่ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆเช่น ในปี ค.ศ1971 Danna และ Nathans ได้สร้างดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของไวรัส SV 40 ขึ้นเป็นครั้งแรกโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ร่วมกับเอนไซม์ *Eco*R I ซึ่งผลจากการทดลองสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกไวรัสแต่ละชนิดออกจากกัน ต่อมา Mielenz และคณะ (1979) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I ตัดดีเอ็นเอของโครโมโซมเพื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Rhizobium* ดั้งเดิมกับชนิดที่กลายพันธุ์ หรือใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ *Neisseria meningitis* (Kristiansen et al., 1984)

ในปี ค.ศ. 1980 Brown ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 18 ชนิดในการศึกษา ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของ Hela cell และ placenta cell ของคนหลายๆเชื้อชาติเช่น เชื้อชาตินิโกร มองโกลอยด์และคอร์เคเชียน และพบว่าดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ที่ได้มีความแตกต่างระหว่างคนในแต่ละเชื้อชาติ ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 Jeffreys และคณะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I ศึกษาดีเอ็นเอจากเลือด เซลล์อสุจิและเซลล์ transformed lymphoblasttoid ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันพบว่ารูปแบบดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของลูกจะเหมือนกับดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของแม่และพ่อ (Vassart et al., 1987) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบความเกี่ยวข้องทางสายเลือด การศึกษาหาสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง (Thein et al., 1987) และงานพิสูจน์ทางนิติเวชวิทยา เป็นต้น

สำหรับการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของสัตว์โดยเฉพาะโค ซึ่งเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องเผ่าเดียวกันกับกระบือได้มีการนำเอาเอนไซม์ตัดจำเพาะมาช่วยในการวิเคราะห์และสร้างดีเอ็นเอ ฟิงเกอร์พรินท์เช่นเดียวกัน โดยในปี ค.ศ. 1979 Laipis และคณะ ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 14 ชนิดศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ และทำการ วิเคราะห์ดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคพันธุ์โฮลสไตน์

ต่อมาในปี ค.ศ. 1982 Anderson และคณะได้ทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคและหาโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Bam*H I พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของดีเอ็นเอของโคมีจำนวน 16,338 นิวคลีโอไทด์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคมีส่วนที่คล้ายกับของคนและในปีเดียวกันนี้เอง Hauswirth และ Laipis (1982) พบว่าถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ตัด ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของแม่โคพันธุ์โฮลสไตน์ จะพบความแตกต่างของดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ (point mutation) ทำให้เกิดความผิดปกติของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะชนิดของ อะดีนีน กวานีน ที่เปลี่ยนไป ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองของ Laipis และคณะ (1982) นอกจากนี้ยังสามารถนำเอาดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นๆอีกเช่น การหาความแตกต่าง ระหว่างโคสายพันธุ์ต่างๆ (Watanabe et al., 1985a ; Brown et al., 1989) การ ตรวจสอบโคพันธุ์ Israeli Holstein - Friesian เพื่อคัดเลือกทำพ่อพันธุ์ (Beckmann et al.,1986) เป็นต้น

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในสายดีเอ็นเอที่ให้ผลแม่นยำ จะต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องหลายประการดังต่อไปนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญคือการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ **เรสทริกชันเอนไซม์** ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ในสายดีเอ็นเอที่จุดจำเพาะทำให้สายดีเอ็นเอขาดออกจากกัน เอนไซม์ ตัดจำเพาะแบ่งออก เป็น 3 กลุ่มคือ

1.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะประเภทที่ I (Type I) เป็นโปรตีนที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 300,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติทั้งตัดดีเอ็นเอและสามารถเติม methyl group ลงบนเบสของดีเอ็นเอได้การทำงานของเอนไซม์ต้องการ ATP และ

Mg^{2+} จะตัดดีเอ็นเอนอกบริเวณจดจำห่างออกไปประมาณ 100-1000 bp ไม่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม

1.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะประเภทที่ II (Type II) ประกอบด้วยโปรตีนสายเดี่ยวต้องการเพียง Mg^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ในการทำงานตัดดีเอ็นเอตรงจุดที่อยู่บริเวณจดจำเป็นเอนไซม์ที่นิยมและนำมาใช้มากในงานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม

1.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะประเภทที่ III (Type III) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติทั้งตัดดีเอ็นเอและสามารถเติม methyl group คล้ายกับเอนไซม์ตัดจำเพาะประเภทที่ I แต่จะตัดดีเอ็นเอนอกบริเวณจดจำห่างออกไปประมาณ 24-26 bp ต้องการ ATP และ Mg^{2+} ในการทำงาน ไม่นิยมนำมาใช้งานทางด้านพันธุวิศวกรรม

สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นิยมใช้ในการตัดสายดีเอ็นเอคือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ ประเภทที่ II ซึ่งจะเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด ขึ้นกับจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆว่า มีลำดับเบสที่จำเพาะกับเอนไซม์ตัดจำเพาะใด (Nathans and Smith, 1975)

2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสของโมเลกุลขนาดใหญ่(macromolecule) โดยผ่านรูพรุน ของเจลถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของทั้งพอลิเพ็พไทด์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และไรโบโซมโดยอาศัยหลักการที่ว่าเมื่อทำให้โมเลกุลมีประจุบวกหรือลบเหมือนกัน อัตรา การเคลื่อนที่จะเป็นสัดส่วนกับมวลโมเลกุลเพียงอย่างเดียว สำหรับในบัฟเฟอร์ซึ่งมีpH 8 โมเลกุลดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนผ่านเจลจากขั้วลบไปยังขั้วบวกโดยโมเลกุลเล็กจะผ่านรูพรุนของเจลได้ง่ายกว่าโมเลกุลใหญ่(Freifelder,1987)

2.1 ชนิดและความเข้มข้นของเจล

รูพรุนของเจลชนิดต่าง ๆ มีขนาดแตกต่างกันโดยที่รูพรุนของพอลิอะคริลาไมด์เจลจะมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของอะกาโรสเจล ดังนั้นการแยกช่วงโมเลกุลขนาดใหญ่ควรเลือกใช้อะกาโรสเจลและช่วงโมเลกุลเล็กควรเลือกใช้ พอลิอะคริลาไมด์เจล แต่ขนาดของรูพรุนของเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของเจลที่ใช้คือ ขนาดของรูพรุนจะเพิ่มเมื่อความเข้มข้นของเจลลดลง ซึ่งโมเลกุลดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดังในรายงานของ Aaij และ Borst (1972) ได้เปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดผ่านเจลที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0.6 และ 2.5 เปอร์เซนต์พบว่าเมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านอะกาโรสเจลที่ความเข้นข้น 0.6 เปอร์เซนต์ ดีเอ็นเอปลายเปิดจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้การแยกชิ้นส่วนที่เล็กกว่า 10^6 ดาลตัน มักนิยมใช้ 4-5 เปอร์เซนต์ ของ พอลิอะคริลาไมด์เจลส่วนช่วง 2-3 x 10^6 ดาลตัน มักนิยมใช้ 1-2 เปอร์เซนต์ของอะกาโรสเจลหรือใช้ พอลิอะคริลาไมด์เจล 1-2 เปอร์เซนต์ ร่วมกับอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ แต่ถ้าเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอระหว่าง 3 และ 25x10^6 ดาลตันมักนิยมใช้ 0.3-0.7 เปอร์เซนต์ของอะกาโรสเจล

2.2 ขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ

การที่ดีเอ็นเอต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจล ทำให้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นกับขนาดและรูปร่างของดีเอ็นเอ เพราะประจุลบต่อมวลของดีเอ็นเอทั้งโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดโมเลกุลเล็ก ในกรณีที่โมเลกุลดีเอ็นเอมีรูปร่างเหมือนกัน แต่ถ้ารูปร่างต่างกันการเคลื่อนที่จะขึ้นกับรูปร่างของดีเอ็นเอด้วยดังในรายงานของ Aaij และ Borst (1972) ได้เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ปลายปิด และดีเอ็นเอเกลียวคู่ปลายเปิด พบว่าการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ปลายปิดจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้เร็วกว่า และอัตราการเคลื่อนที่จะเป็นสัดส่วนผกผันกับค่าลอการิทึมของมวลโมเลกุลด้วย

2.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า

ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสนั้น ความต่างศักย์ที่ใช้จะขึ้นกับขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีผู้รายงานไว้ว่าการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่ต้องเลือกใช้ความเข้มข้นเจลและความต่างศักย์ต่ำแต่ใช้เวลานานดังในรายงานของ Fangman (1978) ได้ศึกษาและแยกชิ้นส่วน ดีเอ็นเอของ T4 (T4 DNA) เฟจแลมป์ดาดีเอ็นเอและแบคเทอริโอฟาจจีซึ่งดีเอ็นเอที่กล่าวมาข้างต้นเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และจากการทดลองต้องใช้ สภาวะการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสที่เหมาะสมดังนี้คือ ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 0.1 เปอร์เซนต์และความต่างศักย์ 2.5 โวลท์ ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.เป็นเวลานาน 10 ชม. พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ออกจากกันได้ดีดังนั้นจะเห็นว่าการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่ออกจากกันได้ดีต้องใช้ความเข้มข้นเจลต่ำ แต่ในกรณีที่ดีเอ็นเอที่จะวิเคราะห์มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ซึ่งแตกต่างกันมากการทำอิเล็กโทร-โฟรีซีสต้องเลือกใช้ความเข้มข้นของเจลที่ครอบคลุมขนาดต่าง ๆเหล่านั้นเช่น Singer และคณะ (1988) ได้ดัดแปลงการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอของเลือดหนูที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III โดยใช้ความเข้มข้นเจลที่แตกต่างกัน 2 ระดับคือ 0.8 เปอร์เซนต์ และ 1.5 เปอร์เซนต์ในแผ่นเจลเดียวกันใช้ความต่างศักย์ในอัตรา 1 โวลท์ต่อความยาวเจล หนึ่ง ซม. พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนได้ทั้งสองกลุ่มคือ ดีเอ็นเอกลุ่มขนาดเล็กจะสามารถแยกออกจากกันได้ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ ส่วนดีเอ็นเอกลุ่มขนาดใหญ่จะแยกออกจากกันได้ดี ที่ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซนต์

Helling, Goodman และ Boyer (1974) ทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจและไวรัสอื่น ๆ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งในกรณีนี้จะใช้ความต่างศักย์ต่ำในการทดลองเพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่งซม.นาน 5 นาทีจากนั้นใช้ความต่างศักย์ 1.5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. และความเข้มข้นคือ อะกาโรส 0.7 เปอร์เซนต์ จากวิธีการนี้สามารถใช้บ่งบอกมวลโมเลกุลและแผนที่ของดีเอ็นเอจากไวรัสอื่นที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I

Harris- arrick และคณะ (1975) ทำการแยกยีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R I ได้โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ภาวะ

ที่เหมาะสมคือความต่างศักย์ 150 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.นาน 3 นาทีแล้วต่อด้วยความต่างศักย์ 2 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 24 ชม. เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุศาสตร์ต่อไป

ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นอกจากจะใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วยังนิยมใช้ พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส แต่เหมาะสำหรับใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กประมาณ 50-2000 bp เท่านั้นและนอกจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้ว การที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ยังขึ้นกับการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างสมบูรณ์ และการที่จะตัดดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์นั้น หมายถึงทุก ๆ ตำแหน่งจดจำต้องถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างไรก็ตามต้องใช้ปริมาณที่พอเหมาะของดีเอ็นเอกับเอนไซม์ตัดจำเพาะและระยะเวลาที่ใช้ในการตัดด้วย นอกจากนี้ยังรวมถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยที่ดีเอ็นเอต้องมีความบริสุทธิ์สูงไม่มีการขาดของสายดีเอ็นเอในระหว่างการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ (Ley, 1989)

การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของโคและกระบือโดยทั่วๆไป นิยมใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในการศึกษา(Anderson et al.,1982; Hauswirth and Laipis,1982; Watanabe et al., 1985a; Beckmann et al., 1986; Bhat et al., 1990; Gan et al., 1991; Amano et al., 1994) เนื่องจากพบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคและกระบือมี ขนาดโมเลกุลเล็กประมาณ 16.5 กิโลเบสซึ่งเล็กกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอ และมีขนาดใกล้เคียงกับไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นเช่นคน (Anderson et al.,1981),สุกร (Watanabe et al., 1985b), สุนัขและแมว (Jeffereys and Mortan, 1987), แกะและแพะ (Upholt and Dawid, 1977) และหนู (Bibb et al., 1981) เป็นต้นและจากการศึกษาพบว่า ลำดับการเรียงตัวของรหัสพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจะถูกถ่ายทอดไปยังลูกหลานโดยเฉพาะลักษณะพันธุกรรมทางแม่พันธุ์ เนื่องจากภายหลังการปฏิสนธิระหว่างไข่กับสเปริม์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสเปริม์จะถูกทำลายไป เหลืออยู่แต่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของไข่เจริญเติบโตต่อไปในตัวอ่อน (Wolfe, 1993) และนอกจากนี้ยังสามารถใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในการตรวจหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือความแตกต่างภายในสายพันธุ์เดียวกันได้

ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการศึกษา สามารถสกัดแยกได้จากเซลล์หลายๆ ชนิดนิยมใช้เซลล์ที่มีไมโตคอนเดรียจำนวนมากและมีโครมาตินเป็นส่วนประกอบเพียงเล็กน้อยเช่น เซลล์จากรังไข่ เซลล์ไข่อ่อนเป็นต้นส่วนในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังนิยมสกัดแยกไมโตคอนเดรียจากเซลล์ของร่างกายเช่นเซลล์ตับ เซลล์หัวใจหรือเซลล์สมองก็มักนิยมนำมาใช้เช่นเดียวกับการสกัดแยกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว (Giles et al,1980) ซึ่งมีข้อดีหลายประการเช่น วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดทำได้ง่าย และสามารถใช้ได้กับสัตว์ทดลองที่ยังมีชีวิตอยู่

จากรายงานการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของกระบือแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และพบว่าลักษณะดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของกระบือมีความแตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดว่าน่าจะมีการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของกระบือปลักในประเทศไทยเพื่อหาความแตกต่างทางสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์กระบือปลักกับกระบือมูราห์ โดยการสกัดแยกดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือปลักและกระบือมูราห์ และทำการแยกชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆที่เหมาะสมถูกต้องโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส และนำมาวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหาลักษณะการเรียงตัวที่แตกต่างหรือเหมือนกันระหว่างไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักหรือกระบือมูราห์ที่เป็นสายพันธุ์เดียวกัน และเปรียบเทียบกับ ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือต่างสายพันธุ์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดแยกดีเอ็นเอ ของไมโตคอนเดรียจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของ กระบือปลักและกระบือมูราห์
2. เพื่อศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้ง ของกระบือปลัก และกระบือมูราห์ โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส
3. เพื่อศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรม ภายในสายพันธุ์เดียวกันทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ โดยใช้ดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์

4. เพื่อศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระบือต่างสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของกระบือปลักกับดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ ของกระบือมูราห์

เป้าหมายของงานวิจัย

1. เพื่อให้ได้วิธีการที่ดีและมีประสิทธิภาพ ในการสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือปลักและกระบือมูราห์ ให้ได้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ในปริมาณ มากและบริสุทธิ์พอสำหรับการทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2. เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Bgl* I, *Eco*R I และ *Pst* I และในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

3. เพื่อให้ทราบว่า จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด ที่ทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอแล้วได้แถบดีเอ็นเอที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างกระบือปลักจำนวน 8 ตัวหรือสามารถบอกความแตกต่างระหว่างกระบือปลัก (8 ตัว) กับกระบือมูราห์ (6 ตัว)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือดกระบือปลักและกระบือมูราห์ นำมาแยกส่วนเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากส่วนเม็ดเลือด และสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

2. ทำไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยการย่อยทำลายอาร์เอ็นเอและ โปรตีน โดยใช้เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) และย่อยสลายโปรตีนโดยการสกัดด้วยฟีนอล

3. ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

(G/GATCC), *Bgl* I(GCCNNNN/N), *Eco*R I (G/AATTC) และ *Pst* I (CTGCA/G)

4. ตรวจสอบลักษณะการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากข้อ 2 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส และเครื่องวัดค่าความเข้ม (densitometer)

5. เปรียบเทียบรูปแบบการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของกระบือปลักและกระบือมูราห์ เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมในสายพันธุ์เดียวกันของกระบือปลักและกระบือมูราห์

6. เปรียบเทียบรูปแบบการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ของกระบือปลักกับกระบือมูราห์ เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ กระบือปลักและกระบือมูราห์