

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างในภาคสนาม

- 1.1 ทำการสำรวจการกระจายและเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของประชากรตุ๊กแกบ้านในประเทศไทยโดยทำการสุ่มตัวอย่างประชากรตุ๊กแกบ้านดังแสดงในตารางที่ 1
- 1.2 ตัวอย่างตุ๊กแกบ้านที่ได้จากภาคสนามจะถูกเก็บกลั่นเนื้อส่วนหางแล้วปล่อยให้ตัวอย่างบางส่วนจะถูกเก็บเนื้อเยื่อตับและเก็บตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงจากพื้นที่ศึกษา ซึ่งเนื้อเยื่อที่ได้ถูกเก็บในแล้วในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัด DNA ในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาโมเลกุลต่อไป
- 1.3 ตัวอย่างอ้างอิงจากพื้นที่ศึกษาถูกเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์สัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และนำไปใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

2. วิธีการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ

2.1 การศึกษาทางชีวโมเลกุล

2.1.1 การสกัด DNA (DNA extraction)

- ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยใช้วิธี Phenol-Chloroform (Hill *et al.*, 1996) หรือ DNeasy extraction kit (Qiagen, Inc.) หลังจากนั้น นำ DNA ที่ได้จากการสกัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA (Amplification)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนใน mitochondrial DNA คือ ยีน cytochrome-*b* และ นิวเคลียร์ ยีน คือ recombination activating gene 1 (RAG-1) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้เครื่องมือ Thermocycler และตรวจผลด้วยวิธี Gel electrophoresis

ตารางที่ 2 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ยีน		โพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
Cytochrome- <i>b</i>	Mitochondrial DNA	Primer 1	CCAACCCAAAGAAACAAAGCTAGT	Qin <i>et al.</i> (2012)
		Primer 2	AGAATCGGTTTAATGTTGGATTGT	Qin <i>et al.</i> (2012)
		Primer 3	CATGATGAAACTTTGGCTCACTAC	Qin <i>et al.</i> (2012)
		Primer 4	CACTTGTTTTGGGGACAAGTAATG	Qin <i>et al.</i> (2012)
Rag-1	Nuclear	Rag-1F	CCAGAGGAAGTTCAGCAGTGTC	Wang <i>et al.</i> (2013)
	DNA	Rag-1R	GCTTCCAACCTCATCAGCTTGTC	Wang <i>et al.</i> (2013)

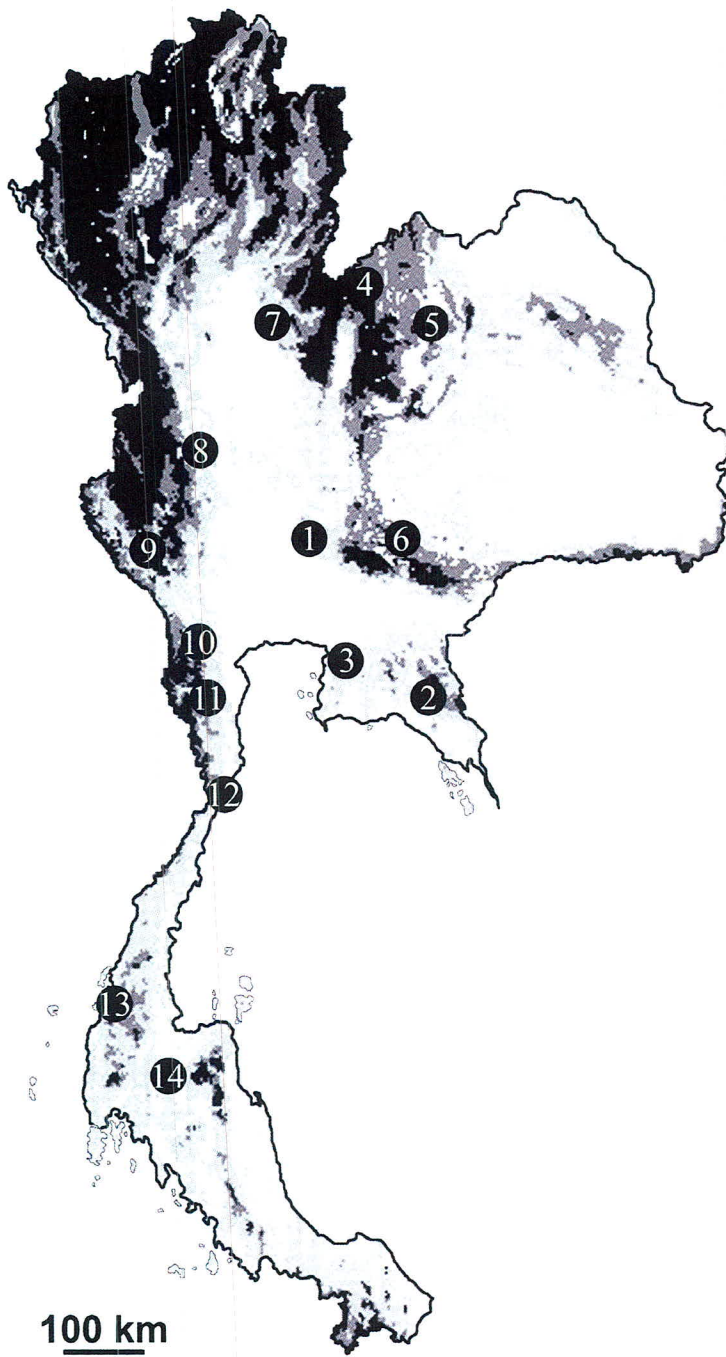
2.1.1 PCR product purification และ Sequencing

นำ PCR product ที่ได้ไปทำให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยใช้ PCR purification kit หลังจากนั้นเตรียม purified PCR product ของแต่ละตัวอย่างเพื่อทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างของตุ๊กแกบ้าน *Gekko gecko*

หมายเลข	จังหวัด	ตัวย่อ	จำนวนตัวอย่าง
1	สระบุรี	SBR	17
2	จันทบุรี	CTR	4
3	ชลบุรี	CBR	1
4	เลย	LOE	10
5	ขอนแก่น	KKN	9
6	นครราชสีมา	NRM	19
7	พิษณุโลก	PNL	2
8	อุทัยธานี	UTN	4
9	กาญจนบุรี	KBR	7
10	ราชบุรี	RCB	14
11	เพชรบุรี	PBR	8
12	ประจวบคีรีขันธ์	PKK	16
13	ระนอง	RNG	1
14	สุราษฎร์ธานี	STN	2

หมายเหตุ : *ใช้อ้างอิงกับแผนที่พื้นที่เก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่าง (รายละเอียดหมายเลขดังแสดงในตารางที่ 1)

2.1.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

- นำผลลำดับเบสที่ได้จาก DNA sequencing ไปตรวจด้วยโปรแกรม Geneious R7 (Biomatter) เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ผลต่อไป
- ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยเลือกใช้ outgroup ที่ลำดับเบสอยู่ใน GenBank คือ *Hemiphyllodactylus yunnanensis* (FJ971010), *Cnemaspis limi* (HQ896026) และ *Gekko vittatus* (NC008772) และในการวิเคราะห์ได้รวมข้อมูลลำดับเบสของตุ๊กแกบ้านจาก ประเทศจีน ลาว เวียดนาม (ตารางที่ 3)
 - ได้ทำการทดสอบโมเดลที่จะใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย Akaike information criterion (AIC) ในโปรแกรม jModelTest v2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012) และรันทั้งหมด 10,000,000 generations หลังจากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์ Bayesian analyses ด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)
 - ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) คือ haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (π) ด้วยโปรแกรม DnaSp 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003)
 - ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแฮพโลไทป์โดยวิธี median-joining network ในโปรแกรม Network (Flexus, Inc.) และคำนวณค่า Pairwise F_{ST} ระหว่างประชากรในโปรแกรม ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) และค่า Uncorrected pair-wise distances ด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

ตารางที่ 3 รายการตัวอย่างจาก GenBank ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ชนิด	พื้นที่	GenBank
<i>Gekko gecko</i>	Fusui county, Guangxi, China	EF640150
<i>Gekko gecko</i>	Wenshan county, Yunnan, China	EF640151
<i>Gekko gecko</i>	Wenshan county, Yunnan, China	EF640152
<i>Gekko gecko</i>	Pingguo county, Guangxi, China	EF640159
<i>Gekko gecko</i>	Duan county, Guangxi, China	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	Pingle county, Guangxi, China	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	zhaoping county, Guangxi, China	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	Guiping county, Guangxi,	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	Xincheng county, Guangxi,China	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	Heshan city, Guangxi, China	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	Qintang county, Guangxi, China	EF640153
<i>Gekko gecko</i>	Fangchenggang city, Guangxi, China	EF640154
<i>Gekko gecko</i>	Ningming county, Guangxi ,China	EF174462
<i>Gekko gecko</i>	Langson, Viet Nam	EF640155
<i>Gekko gecko</i>	Langson, Viet Nam	EF640156
<i>Gekko gecko</i>	Phonsavan, Laos	EF174461
<i>Gekko gecko</i>	Phonsavan, Laos	EF640157