

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดช้าง 11 เชือก (หมายเลข 96-106) จากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย จังหวัดลำปาง ซึ่งเป็นเพศผู้ 7 เชือก (หมายเลข 96, 101-106) และเพศเมีย 4 เชือก (หมายเลข 97-100) โดยเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณหลังหู (Ear vein) ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ด้วย sterile technique จากนั้นเก็บเลือดใส่ในขวดเก็บเลือดที่มี EDTA ประมาณ 1000 μ l ค่อยๆผสมให้ EDTA ละลาย เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด หรือเก็บเลือดใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี D-solution (ภาคผนวก ก) ประมาณ 300 μ l ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น -20°C รอการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี Phenol-chloroform (Sambruge และคณะ, 1989) โดยใช้ตัวอย่างเลือดที่อยู่ในหลอด EDTA 100 μ l รวมกับสารละลาย D-solution 300 μ l เขย่าจนเลือดผสมกับสารละลาย หลังจากนั้นเติม Chloroform 150 μ l และ Phenol DNA (pH 7.9) 150 μ l (อัตราส่วน 1:1) เขย่านานประมาณ 10 นาทีแล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม phenol DNA และ chloroform อีกครั้ง ปั่นตกตะกอนและดูดเอาส่วนใสมาเติม Absolute ethanol 2 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ ผสมซ้ำๆให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้เย็น -80°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งแล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 75% ethanol 700 μ l 2-3 ครั้ง ปั่นตกตะกอนที่ 13,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสด้านบนออกให้หมด ทิ้งตะกอนให้แห้ง หลังจากสกัดจะละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 15 μ l ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) เก็บสารละลายไว้ที่ -20°C องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3. การออกแบบ Primers

การหาลำดับเบสไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างไทยจะใช้ตัวอย่างหมายเลข 96 (No.96) ซึ่ง Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะออกแบบจากลำดับเบสไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างเอเชียที่มีรายงานใน GenBank หมายเลข NC_005129 และประยุกต์จากลำดับเบสไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งหมดของช้างแอฟริกา (Krause *et al.*, 2006) โดยใช้ primer ทั้งหมด 20 คู่ ดังแสดงในภาพที่ 3 และ ตารางที่ 3

ส่วนการจัดกลุ่ม (haplotype) ของช้างทั้ง 11 เชือกนั้นจะทำการศึกษาโดยใช้บริเวณ 5' end cytochrome b ซึ่งใช้ primer Mito-CB1 และ Mito-CB2 (ปรีดา และคณะ, 2546) และบริเวณ 3' end cytochrome b ถึง left domain ของ control region โดยใช้ primer Mito-CB3 และ 22A Re (ตารางที่ 3)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

โดย PCR reaction มีส่วนผสมทั้งหมด 25 μ l ประกอบด้วย deionized water 16 μ l, 10x PCR buffer 2.5 μ l, 50mM $MgCl_2$ 0.75 μ l, forward และ reverse primer (dilute 1:10) อย่างละ 1 μ l, 5mM dNTP 1 μ l, Tag DNA polymerase (Invitrogen®, USA) 0.25 μ l และดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 2.5 μ l (ตารางภาคผนวกที่ 1) ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) ขั้นตอนในปฏิกิริยาประกอบด้วย predenature ที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ เริ่มจาก denature ที่ 94°C เป็นเวลา 20 วินาที annealing (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับ primer แต่ละคู่ ตารางที่ 3) 30 วินาที extension 72°C 45 วินาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที และ final incubation ที่ 4°C ตลอดไป

5. ขั้นตอนการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Electrophoresis

นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) ผสม loading dye 2 μ l กับ PCR product 5 μ l โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 80 โวลต์ 30 นาที แล้วอ่านผลภายใต้เครื่อง Gel documentation หรือ เครื่อง U.V. transilluminator โดยใช้ 100 bp ladder เป็น marker ถ้าพบ primer-dimer หรือ PCR product ขนาดที่ไม่ต้องการให้ตัดเจลในบริเวณที่

ต้องการแล้วทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAGEN® gel purification columns (Fernando *et al.*, 2003b) (ภาคผนวก ข)

6. การหาลำดับเบส (DNA Sequencing)

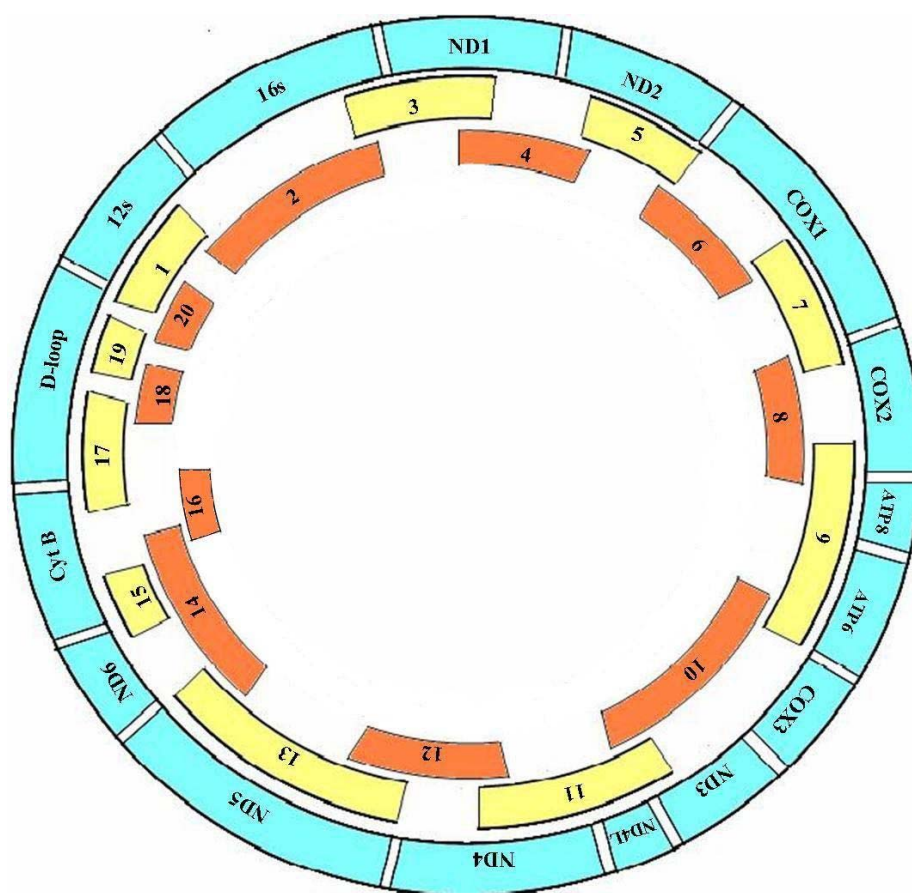
นำ PCR product ที่ได้มาติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ จาก ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems® ; USA) โดยใช้ forward และ reverse primer (dilute 1:10) (ภาคผนวก ข) ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ PTC-200 (Peltier Thermal Cycler machine, USA) ขั้นตอนในปฏิกิริยาประกอบด้วย predenature ที่ 96°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบของการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอ จำนวน 25 รอบ เริ่มจาก denature ที่ 96°C เป็นเวลา 10 วินาที annealing ที่ 50°C เป็นเวลา 20 วินาที extension 60°C 1 นาที และเมื่อครบจำนวนรอบ อุณหภูมิจะเข้าสู่ขั้นตอนของ final extension ที่ 60°C เป็นเวลา 7 นาที และ final incubation ที่ 4°C จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3 M sodium acetate pH 4.6 2 µl แล้วเติม absolute ethanol 50 µl ผสมเบาๆ นำไปวางแช่แข็ง 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 250 µl ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทิ้งตะกอนให้แห้ง แล้วจึงทำการส่งหาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencing ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

7. การเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment)

เมื่อได้ลำดับเบสจะนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ได้นั้นเป็นของช้างเอเชียจริง แล้วจึงจะใช้โปรแกรม Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) และ Multipipmaker (<http://pipmaker.bx.psu.edu/cgi-bin/multipipmaker>) ในการเปรียบเทียบลำดับเบส เพื่อจัดกลุ่ม (haplotype) ของช้าง 11 เชือกจากศูนย์อนุรักษ์ช้างไทย โดยวิเคราะห์ส่วนของ 5' cytochrome b 250 bp (ปรีดา และคณะ, 2546) และส่วน 3' cytochrome b ถึง left domain ของ control region 927 bp

8. การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรช้างแต่ละกลุ่ม (Phylogenetic trees)

ลำดับเบสทั้งหมดที่ได้จะนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของช้างไทย (No.96) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของช้างเอเชีย ช้างแอฟริกาและ ช้างแมมมอথที่มีรายงานใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยใช้พญูเป็นสัตว์นอกกลุ่ม (outgroup) ด้วยโปรแกรม MEGA version 3.1



ภาพที่ 3 แผนภูมิรูปภาพของไมโทคอนเรียลดีเอ็นเอแสดงส่วนของยีนที่แปลรหัสเป็น 2 rRNAs และโปรตีนทั้ง 13 ชนิด (สีฟ้า) และตำแหน่งของ Primer ทั้ง 20 คู่ (สีแดงและสีเหลือง)

