บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการที่กระบือปลักและกระบือมูราห์ มีความแตกต่างกันทั้งในด้านของรูปร่างอุปนิสัย สรีรวิทยาและจำนวนโครโมโซม ดังนั้นเพื่อเป็นการหาความแตกต่างที่เด่นชัดทางพันธุกรรมงาน วิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ โดยการวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ซึ่งคาดว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จะมีความแตกต่างกัน

ในการศึกษาดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์นี้ เป็นการศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่แยกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งวิธีการที่ใช้สกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้เป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Koehler และคณะ (1988) และวิธีการของ Brown และคณะ (1989) โดยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) ลงในสารละลายของเซลล์เม็ดเลือดขาว อันเป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนที่จะนำไปปั่นแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (วิธีที่ 2) โดยอาศัยหลักการเช่นเดียวกันกับวิธีการแยกดีเอ็นเอของพลาสมิดซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกโครโมโซมเช่นเดียวกัน ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้สารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูง(high salt concentration) มาช่วย ในการตกตะกอนกรดนิวคลีอิคที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ และสารประกอบของโปรตีน (Maniatis et al., 1982) และจากการทดลองพบว่าต้องใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (5 โมลาร์) ในอัตราส่วน 1:10 หรือความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เป็น 0.45 โมลาร์ดังแสดงในตารางที่ 2 จึงจะทำให้สามารถตกตะกอนดีเอ็นเอได้มากที่สุด ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะมีความเข้มข้นน้อยกว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ในการแยก ดีเอ็นเอจากพลาสมิด ที่ใช้ความเข้มข้นสูงถึง 1.0 โมลาร์ (Maniatis,1982) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Wallace (1987) ที่กล่าวว่าสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์จะช่วยในการแยกสารละลาย SDS ออกจากสารละลายของดีเอ็นเอ

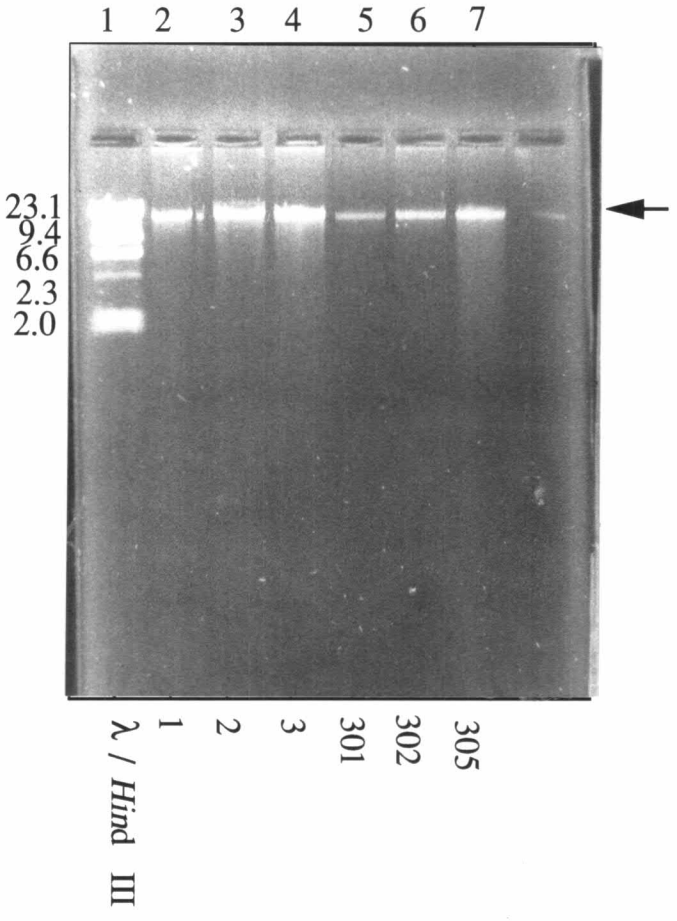
จากการทดลองพบว่า สามารถสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้นจากเดิมโดยเฉลี่ย 2.48 ไมโครกรัมเป็น 3.94 ไมโครกรัม/ 100 มล.ของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 58.87% แต่อย่างไรก็ตามปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาว ก็ยังมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่แยกจากเซลล์ตับของกระบือปลักมาเลเซีย ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 35 ไมโครกรัม/ กรัมของเนื้อตับ (Gan et al.,1994) หรือจากรายงานของ Laipis และ คณะ (1979) ที่ศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่แยกจากเซลล์ตับของโคก็สามารถสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้มากถึง 1,270 ไมโครกรัม / กรัมของเนื้อตับแต่ไม่มีรายงานใดกล่าวว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่สกัดแยกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวมีปริมาณมากน้อยเพียงใด ดังนั้นแหล่งที่มาของไมโตคอนเดรียลจึงเป็นปัจจัยหนึ่งต่อปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้

ในการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ให้ผลแม่นยำนั้น ในขั้นแรกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่จะนำมาทดสอบต้องมีความสมบูรณ์และความบริสุทธิ์สูง ซึ่งจากตารางที่ 4 จะพบว่าค่าอัตราส่วน OD_{260} /OD_{280} ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์มีค่าอยู่ระหว่าง 1.77-1.91 ซึ่งไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีค่าอัตราส่วนมากกว่า 1.85 แสดงว่ายังมีอาร์เอ็นเอปนอยู่จะถูกนำไปย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสและทำการสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอล จนกว่าจะได้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ และจากการวิเคราะห์คุณภาพและความสมบูรณ์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสดังรูปที่ 11ก และ 11ข จะพบว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักมีลักษณะเป็นแถบเดียว ไม่มีลักษณะการขาดของดีเอ็นเอ (รูปที่ 11ก) ซึ่งแสดงว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักมีความสมบูรณ์ แต่ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ไม่มีความสมบูรณ์ เนื่องจากจะปรากฏดีเอ็นเอขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (รูปที่ 11ข) ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการขาดของดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดขึ้นเนื่องจากภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือมูราห์มี ปริมาณเอนไซม์นิวคลีเอสมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระบือปลัก แต่ยังไม่มีรายงานที่เป็นข้อพิสูจน์เกี่ยวกับเรื่องนี้ และจากการรายงานของ Brown และคณะ (1989) พบว่าการแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอโดยการใช้สารละลายไตตรอนเอ็ก-100 จะได้ดีเอ็นเอในรูปต่าง ๆปะปนมาเช่นดีเอ็นเอในรูป supercoiled, relaxed covalently closed, nicked circular และ

ดีเอ็นเอจากนิวเคลียส ดังนั้นถึงแม้ว่าจะทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลแล้วก็ตาม ก็ยังไม่สามารถทำให้ได้ดีเอ็นเอรูปแบบเดียว ถึงแม้ว่าในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสจะสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีรูปร่างต่างๆ กันออกจากกันได้และควรได้แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 23.1 กิโลเบส แต่ในการทดลองนี้จะพบแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเพียงแถบเดียว (รูปที่ 26) และแถบไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอที่พบก็มีขนาดใกล้เคียงกับ 23.1 กิโลเบสซึ่ง แสดงว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่เตรียมได้ในการทดลองนี้ มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอชนิดอื่น สิ่งที่เป็นข้อสังเกตอีกประการหนึ่งก็คือในบางครั้งของการทดลองเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่เป็นแหล่งที่นำมาสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่ได้เตรียมขึ้นใช้ใหม่ๆในทันทีแต่ถูกเก็บแช่แข็งไว้ ซึ่งจะมีผลทำให้การสกัดแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอไม่ได้ผลดี มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอชนิดอื่น (Solignac, 1991) และถึงแม้ว่าวิธีการที่ใช้แยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้จะสามารถตกตะกอนดีเอ็นเอได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น แต่ก็ควรที่จะปรับปรุงวิธีการสกัดแยกให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นอีก อาจจะโดยการลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากนิวเคลียสที่จะมีผลต่อการทดลองและการแปลผล ซึ่งอาจจะทำได้โดยการเติมเอนไซม์ DNase ที่สามารถช่วยย่อยสลายโครมาตินจากนิวเคลียสดังเช่นในการทดลองศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในโคของ Watanabe และ คณะ(1985a) แต่วิธีการที่จะใช้นี้ก็มีข้อที่ควรจะระมัดระวังในการใช้เนื่องจากเอนไซม์ DNase นี้ ก็สามารถที่จะย่อยสลายไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้เหมือนกัน

การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องคือ ชนิด ปริมาณของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ และเวลาในการย่อย ซึ่งการที่จะเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใดย่อมขึ้นกับลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ สำหรับการศึกษาไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักและกระบือมูราห์ ไม่มีรายงานว่าใช้ปริมาณเอนไซม์ตัดจำเพาะมากน้อยเท่าใดแต่จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ตั้งแต่ 4-12 หน่วยต่อดีเอ็นเอของกระบือปลัก 0.5 ไมโครกรัมให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน แต่ Laipis และคณะ (1979) ได้รายงานว่าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1-5 หน่วยในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคจำนวน 1-2 ไมโครกรัมเช่นเดียวกับ Potter และคณะ (1975) ที่รายงานว่าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 50 หน่วยทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคหรือสัตว์ชนิดอื่นจำนวน 10-20 ไมโครกรัม แต่

รูปที่ 26 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซนต์ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. เป็นเวลานาน 1 ชม. 30 นาที โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร



ช่องที่ 1 λ ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III
2 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 1
3 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 2
4 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3
5 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301
6 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302
7 แถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305

Hauswirth และคณะ (1987) ได้รายงานว่าต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 - 5 หน่วยในการ ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจำนวน 20-50 นาโนกรัม

โดยทั่วๆ ไปแล้วบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์จะระบุว่า การย่อยของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะใช้เวลานานเพียง 1 ชั่วโมง แต่ในการปฏิบัติจริงมีหลายรายงานที่พบว่าเวลาดังกล่าวไม่เพียงพอที่จะให้ได้การย่อยที่สมบูรณ์เช่นในรายงานของ Potter และ คณะ (1975) พบว่าต้องใช้เวลาในการย่อยของเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างน้อย 10 ชม. แต่ในรายงานของ Bhat และคณะ(1990) พบว่าต้องใช้เวลาในการย่อยของเอนไซม์ตัดจำเพาะข้ามคืนเช่นเดียวกับการทดลองของ Gan และคณะ(1991) และในการทดลองของงานวิจัยครั้งนี้พบว่า ต้องใช้เวลาในการย่อยของเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างน้อย 15 ชม. เอนไซม์ตัดจำเพาะจึงจะสามารถทำการย่อยไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์

ในการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ให้ผลแม่นยำนั้น การแยกชิ้นส่วนเหล่านั้นออกจากกันอย่างมีประสิทธิภาพโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ก็เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมที่จะทำให้ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสมีประสิทธิภาพสูงสุดในการแยกและสามารถเห็นความแตกต่างของ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้อย่างเด่นชัดที่สุด ดังจะกล่าวถึงรายละเอียดของปัจจัยต่างๆดังต่อไปนี้

ปัจจัยที่สำคัญประการแรกที่มีผลต่อการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส คือ ชนิดหรือสมบัติของอะกาโรสเจลที่ใช้โดยทั่วๆ ไปอะกาโรสเจลที่มีค่า electro endosmosis ($-m_r$) < 2.0 เช่น อะกาโรสเจลของบริษัท Sigma, Chemical Co., Type II ก็สามารถนำมาใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแต่จากการทดลองในครั้งนี้กลับพบว่า อะกาโรสเจลที่มีค่า electroendosmosis ($-m_r$) ระหว่าง 0.10-0.15 เช่น BRL Ultrapure อะกาโรสเจลก็ยังไม่สามารถแยกแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอให้เห็นได้อย่างชัดเจน (รูปที่13ก) จำเป็นต้องใช้อะกาโรสเจลที่มีค่า electroendosmosis ($-m_r$)<0.10 เช่น อะกาโรสเจลชนิด I.D.Na^{TM} ของบริษัท FMC Bioproducts จึงจะสามารถแยกแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอให้เห็นได้อย่าง ชัดเจน (รูปที่ 13ข)

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ ความต่างศักย์ไฟฟ้า ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองหาความต่างศักย์ที่เหมาะสมในการทำ อิเล็กโทรโฟรีซีสแต่เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นการตัดไมโตคอนเดรียล ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างหลอดทดลองกัน ผลของการตัดดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันทำให้มีผลต่อการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสดังนั้นผลการทดลองที่ได้จากการแปรค่าความต่างศักย์จึงมิได้เป็นผลการทดลองที่เกิดขึ้นจากการแปรความต่างศักย์ที่เปลี่ยนแปลงไป แต่ในการทดลองครั้งนี้ก็พบว่าความต่างศักย์ที่สามารถให้ผลการแยกของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอได้ดีคือความต่างศักย์ 5 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. เป็นเวลานาน 3 ชม. 30 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Potter และคณะ (1975) ที่ใช้ความต่างศักย์ 4 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. ในการแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของสัตว์หลายๆชนิดเช่น โค สุกร ลิง เป็นต้น แต่ Laipis และคณะ (1979) ได้รายงานว่าใช้ความต่างศักย์เพียง 1 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม.ในการแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคหรือรายงานของ Watanabe และคณะ (1985a,1985b) ใช้ความต่างศักย์ 6 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. ในการแยกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโค และสุกร

ถ้าเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่าง กระบือปลักและกระบือมูราห์อาจจะทำได้โดยดูจากลักษณะของฟีโนไทป์หรือจำนวนโครโมโซม แต่จะไม่สามารถบอกความแตกต่างภายในกลุ่มกระบือสายพันธุ์เดียวกันได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาช่วยในการตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสมาวิเคราะห์ ชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่แตกต่างกันภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ ความแตกต่างของรูปแบบการเรียงตัวของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ จะทำให้สามารถบอกความแตกต่างทางสายพันธุ์ได้ เช่น การวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคสายพันธุ์โฮลสไตน์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III และพบความแตกต่างในสายพันธุ์ (Hauswirth and Laipis,1982) หรือในการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสายพันธุ์ระหว่างแกะและแพะ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I และ *Hin*d III (Upholt and Dawid, 1977) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาไมโตคอน เดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักในประเทศไทยและกระบือมูราห์ ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I, *Bgl* I, *Eco*R I

และ *Pst* I เพื่อหาความแตกต่างภายในสายพันธุ์เดียวกัน หรือความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์

ผลจากการทดลองพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I, *Eco*R I และ *Bgl* I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือทั้งสองสายพันธุ์ได้ดี ขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ Pst I เป็นเอนไซม์ที่ไม่เหมาะในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือทั้งสองสายพันธุ์

สำหรับไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ตัดด้วย *Bam*H I นั้นเมื่อทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้ I.D.Na^{TM} อะกาโรสเจล (รูปที่ 17ก) จะสามารถเห็นแถบของดีเอ็นเอบางแถบได้ชัดเจน โดยเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส และสามารถเห็นความแตกต่างของรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของกระบือปลักกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันจำนวน 8 ตัว ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 24) แถบดีเอ็นเอที่พบได้ ในกระบือปลักทั้ง 3 กลุ่มได้แก่แถบ ดีเอ็นเอขนาด 1.4, 2.8, 3.0 และ 10.5 กิโลเบส และแถบดีเอ็นเอที่พบแตกต่างกันคือ

กลุ่มที่ 1 จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 4.5 และ 5.3 กิโลเบสแต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3.8 กิโลเบสพบเพียงตัวเดียวคือกระบือปลักเบอร์ 1 (= 12.5 เปอร์เซนต์)

กลุ่มที่ 2 จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 3.8 และ 4.3 และ 5.3 กิโลเบสแต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 4.5 กิโลเบส พบเพียงตัวเดียวเช่นกันคือ กระบือปลักเบอร์ 2 (= 12.5 เปอร์เซนต์)

กลุ่มที่ 3 จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 3.8 และ 4.5 กิโลเบส พบทั้งหมด 6 ตัวคือกระบือปลักเบอร์ 3, 301, 302, 305, 309 และ ด (= 75 เปอร์เซนต์)

ถ้าเปรียบเทียบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักทั้ง 3 กลุ่มจะพบว่าสามารถบอกความแตกต่างระหว่างกระบือทั้ง 3 กลุ่มได้ด้วยแถบดีเอ็นเอขนาด 4.3, 4.5 หรือแถบดีเอ็นเอขนาด 5.3 กิโลเบส สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 3.8 กิโลเบสถึงแม้ว่าจะบอกความแตกต่างระหว่างกระบือปลักกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ได้แต่ไม่สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างกระบือปลักกลุ่มที่ 2 และ กระบือปลักกลุ่มที่ 3 ได้

เมื่อนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้ NuSieve^{R} 3:1 อะกาโรสเจล (รูปที่ 18) จะสามารถพบแถบดีเอ็นเอของกระบือปลัก 2 ชิ้นส่วนคือแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1.4 กิโลเบสและขนาด 0.7 กิโลเบส จากรายงานของ Gan และคณะ (1991) ที่กล่าวว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I สามารถ ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักมาเลเซียออกได้เป็น 4 ชิ้นส่วนคือดีเอ็นเอขนาด 7.4, 5.2,2.9 และ 1.0 กิโลเบสในขณะที่ Amano และคณะ(1994) รายงานว่าไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *Bam*H I จะแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มแรกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอถูกตัดเป็น 3 ชิ้นส่วนได้แก่ดีเอ็นเอขนาด 11.2, 3.9 และ 1.2 กิโลเบสพบประมาณ 91 เปอร์เซนต์ส่วนกลุ่มที่สองไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะถูกตัดเป็น 2 ชิ้นส่วนได้แก่ ดีเอ็นเอขนาด 11.2 และ 5.1 กิโลเบสพบเพียง 9 เปอร์เซนต์ และพบเฉพาะในกระบือปลักที่มาจากประเทศไทยแต่จากการทดลองนี้จะพบว่าขนาดโมเลกุลของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักมีขนาด 26.0-27.5 กิโลเบสซึ่งมากกว่า 16.5 กิโลเบสและแตกต่างไป ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่เตรียมได้ในการทดลองนี้มีการปนเปื้อนของโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อทำการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสจะพบแกบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆกันดังแสดงในรูป 27 และตารางที่ 24 โดยจะพบแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัดขนาด 10.5, 9.4 และ 1.4 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบตัวอย่างไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเออยู่ 2 แถบคือแถบดีเอ็นเอขนาด 10.5 และ 1.4 กิโลเบสจึงคาดว่า ตัวอย่างไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักที่เตรียมได้มีการปนเปื้อนด้วย โครโมโซมอลดีเอ็นเอ

ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์พบว่าสามารถตัดดีเอ็นเอได้ดี แต่ไม่สามารถเห็นรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนนอกจากแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว (รูปที่ 17ข) แต่ถ้าใช้ NuSieve^{R} 3:1 อะกาโรสเจล(รูปที่ 18) ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสก็สามารถพบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนคือแถบดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบสและขนาด 0.6 กิโลเบส ซึ่งผลการทดลองที่ได้ก็แตกต่างจากรายงานของ Bhat และคณะ (1990) ที่กล่าวว่าเอนไซม์

ตัดจำเพาะ *Bam*H I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักในประเทศอินเดียออกได้เป็น 4 ชิ้นส่วนได้แก่ดีเอ็นเอขนาด 8.4, 3.9, 3.6 และ 0.5 กิโลเบสในขณะที่ Amano และคณะ (1994) ได้รายงานว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I นี้จะสามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ออกได้เป็น 4 ชิ้นส่วนได้แก่ดีเอ็นเอขนาด 7.0, 4.2, 3.9 และ 1.2 กิโลเบส

จากงานวิจัยนี้พบว่าถ้าใช้ I.D.Na^{TM} อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสจะยังไม่สามารถเปรียบเทียบหาความแตกต่างของ รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่างกระบือปลักกับกระบือมูราห์ ได้อย่างชัดเจน แต่ถ้าเปรียบเทียบโดยการใช้ NuSieve^{R} 3:1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (รูปที่18)จะพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I ทั้งของกระบือปลักและกระบือมูราห์ จะมีขนาดใกล้เคียงกันซึ่งคล้ายกับรายงานของ Amano และคณะ(1994)ต่างกันที่ขนาดของแถบดีเอ็นเอเนื่องจาก Amano และคณะ(1994) พบว่าแถบดีเอ็นเอของกระบือปลักจะเท่ากับแถบดีเอ็นเอของกระบือมูราห์อยู่ 2 แถบคือ แถบดีเอ็นเอขนาด 3.9 กิโลเบสและขนาด 1.2 กิโลเบส

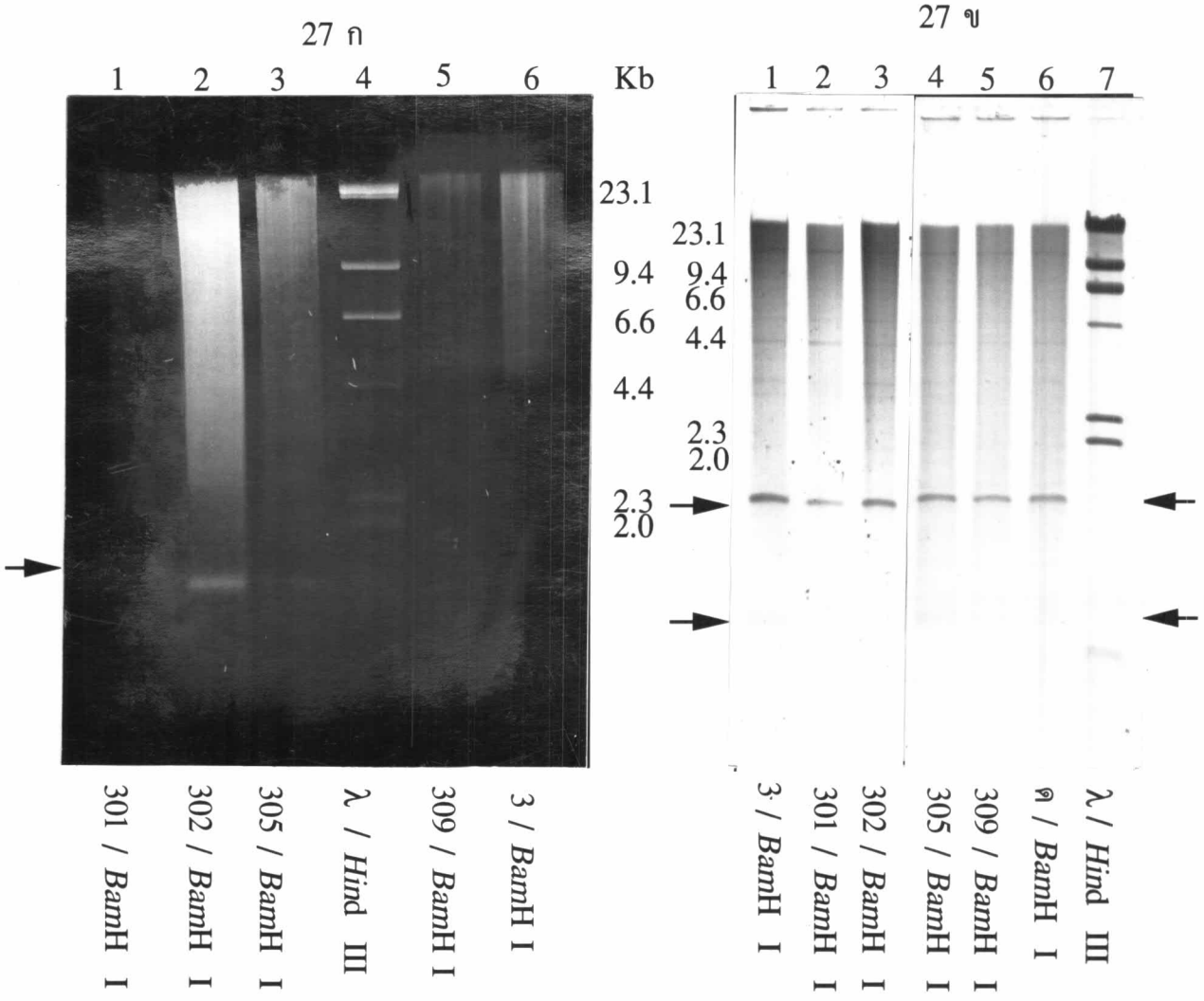
จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R. I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักได้ดีเช่นเดียวกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I (รูปที่ 20) และสามารถพบแถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดเจน 3 ชิ้นส่วนได้แก่แถบดีเอ็นเอขนาด 2.1, 1.3 และ 0.4 กิโลเบส และพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกระบือปลักกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Amano และคณะ(1994) ที่รายงานว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะถูกตัดแบ่งเป็น 4 ชิ้นส่วนได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 4.8, 4.2, 2.1 และ 1.3 กิโลเบส กลุ่มที่สองไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอถูกตัดแบ่งเป็น 4 ชิ้นส่วนเช่นเดียวกันแต่ขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันซึ่งได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาด 5.5, 4.8, 4.2 และ 2.1 กิโลเบส

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ได้ดีเช่นเดียวกันและสามารถพบแถบดีเอ็นเอที่เห็นได้ชัดเจน 2 ชิ้นส่วนคือแถบดีเอ็นเอขนาด 1.3 และ 0.4 กิโลเบสซึ่งแตกต่างไปจากรายงานของ Amano และคณะ(1994) ที่รายงานว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I สามารถตัดไมโต

คอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ออกได้เป็น 4 ชิ้นส่วนคือแถบดีเอ็นเอขนาด 4.8, 4.2, 2.1 และ 1.3 กิโลเบส และยังไม่สามารถหาความแตกต่างภายในกลุ่มกระบือมูราห์ได้แต่ถ้าเปรียบเทียบรูปแบบของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลัก กับกระบือมูราห์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*R I จะพบว่ามีความ แตกต่างโดยเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 2.1 กิโลเบสที่พบเฉพาะในไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเท่านั้น

ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I ทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักพบว่าเอนไซม์สามารถตัดดีเอ็นเอได้ แต่ไม่สามารถพบแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 19ก) ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ การตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ (รูปที่ 19ข) และแตกต่างจากรายงานของ Bhat และคณะ (1990) ที่รายงานว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* I สามารถตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือมูราห์ในประเทศอินเดียออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจะถูกตัดแบ่งเป็น 2 ชิ้นส่วนได้แก่ดีเอ็นเอขนาด 9.7 และ 6.6 กิโลเบส กลุ่มที่สองไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอถูกตัดแบ่งเป็น 3 ชิ้นส่วนได้แก่ ดีเอ็นเอขนาด 8.6, 6.6 และ 1.1 กิโลเบส และถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I ทำการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอทั้งของกระบือปลักในประเทศไทยและกระบือมูราห์พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถตัดดีเอ็นเอได้ แต่ยังพบแถบดีเอ็นเอสมบูรณ์ปรากฏอยู่ (รูปที่ 21) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ไม่เหมาะสมในการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือทั้งสองสายพันธุ์แต่ Bhat และคณะ (1990) และ Amano และคณะ (1994) ได้รายงานว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I จะไม่สามารถตัดไมโตตอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือทั้งสองสายพันธุ์ได้เลย

รูปที่ 27 รูปแบบการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (รูปที่ 27ก) และไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (รูปที่ 27ข) ของกระบือปลักด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I 6 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครกรัมและบ่มที่ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชม.ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์คงที่ 1 โวลท์ต่อความยาวเจลหนึ่ง ซม. นาน 18 ชม. บนแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซนต์โดยที่แต่ละช่องมีปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมและรายละเอียดของตัวอย่าง ในแต่ละช่องระบุไว้หน้า 109



รูปที่ 27ก ช่องที่ 1 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

2 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

3 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III

5 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

6 โครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

รูปที่ 27ข ช่องที่ 1 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

2 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

3 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 302 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

4 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 305 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

5 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ 309 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

6 ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักเบอร์ ด ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I

7 λ ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*d III

ตารางที่ 24 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัด (กิโลเบส) ที่ได้จากการตัดไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอและโครโมโซมอลดีเอ็นเอของกระบือปลักด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I จำนวน 3 กลุ่มจากกระบือทั้งหมด 8 ตัว

ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind* III)	กระบือกลุ่มที่ 1 (1)	กระบือกลุ่มที่ 2 (1)	กระบือกลุ่มที่ 3 (6)	โครโมโซมอลดีเอ็นเอ
23.1				
	10.5	10.5	10.5	10.5
9.4				9.4
6.6				
	5.3	5.3		
	4.5		4.5	
4.4				
		4.3		
		3.8	3.8	
	3.0	3.0	3.0	
	2.8	2.8	2.8	
2.3				
2.0				
	1.4 (12.5 %)	1.4 (12.5%)	1.4 (75.0%)	1.4

หมายเหตุ : ตัวเลขในวงเล็บคือ จำนวนตัวและเปอร์เซนต์ของกระบือที่พบในแต่ละกลุ่ม

การแปลผลรูปแบบเฉพาะตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ผ่านการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยการดูจากเจลด้วยตาเปล่าโดยตรง อาจทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนดังนั้นจึงวิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ ปรากฏบนแผ่นฟิลม์โดยใช้อุปกรณ์ densitometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่มีความไวสูงช่วยทำให้สามารถบอกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอต่าง ๆได้ค่อนข้างแน่นอนกว่าการดูด้วยตาเปล่า และเมื่อนำมาคำนวณเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (S_D) (Sneath andSokal,1973) ตามวิธีคำนวณที่ระบุไว้ในวิธีการทดลองจะ สามารถนำมาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงหรือความแตกต่างของรูปแบบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือทั้งสองสายพันธุ์ โดยในการเปรียบเทียบนี้ ได้กำหนดรูปแบบการเรียงตัวของแถบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจากกระบือแต่ละตัวเป็นตัวเปรียบเทียบประกอบการดูผลจากเจลด้วยตาเปล่า

จากการคำนวณพบว่าค่า S_D สัมพัทธ์ภายในกลุ่มกระบือปลักมีทั้งค่าใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่ารูปแบบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอของกระบือปลักแต่ละตัวมีความแตกต่างกัน เนื่องจากกระบือปลักที่นำมาใช้ทดลองได้มาจากสถานที่ต่าง ๆ กันอาจจะไม่ใช่กระบือปลักพันธุ์แท้ แต่เป็นกระบือลูกผสมที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งไม่สามารถแบ่งแยกได้เพียงการดูจากลักษณะฟีโนไทป์โดยเฉพาะกระบือปลักเบอร์ 1 ที่มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างจากกระบือปลักตัวอื่น ๆ เนื่องจากมีค่า S_D สัมพัทธ์น้อยกว่า 0.50 และมีค่าเฉลี่ย S_D สัมพัทธ์แตกต่างจากกระบือตัวอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$, t-test)

ถ้าทำการเปรียบเทียบภายในกลุ่มของกระบือมูราห์ด้วยกันเอง จะพบว่ามีรูปแบบไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันเนื่องจากมีค่า S_D สัมพัทธ์ใกล้เคียงกันเนื่อง จากกระบือมูราห์ เป็นสัตว์ทดลองที่ได้มาจากแหล่งเดียวกัน

ถ้าเปรียบเทียบระหว่างกระบือปลักและกระบือมูราห์ จะพบว่ามีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เนื่องจากค่า S_D สัมพัทธ์ = 0 หรือน้อยกว่า 0.30

จากผลการวิจัยนี้ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงและความแตกต่างของดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของกระบือปลักกับกระบือมูราห์ได้ แต่ก็ยังไม่สามารถหาความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอฟิงเกอร์พรินท์ของกระบือมูราห์ได้ ถึงแม้ว่าจะอาศัยการอ่านค่า

ความเข้มและค่า SD มาช่วยในการแปลผลให้ชัดเจนขึ้นแต่เนื่องจากไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากนิวเคลียสซึ่งมีผลต่อการทดลองและการแปลผล ดังนั้นวิธีที่จะตรวจสอบตำแหน่งที่แน่นอนของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอก็ควรที่จะใช้วิธีอื่นที่มีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น เช่นการใช้ดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) เป็นต้น