

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาและค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) ที่บ่งชี้ลักษณะสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

1. เก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงจากเส้นเลือดดำบริเวณระหว่างคอและหน้าอกตอนบน (Anterior vena cava) ปริมาณ 1 ml. โดยใช้สารกันเลือดแข็ง Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์สีดำของขน และผิวหนัง และลักษณะที่ไม่ตรงตามสายพันธุ์อย่างน้อย 5 ไพรเมอร์ จำนวน 100 ตัวอย่าง

2. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยวิธี phenol-chloroform ตามวิธีการของ (Sambrook and Russell, 2006) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1 นำตัวอย่างเลือด (Whole blood) ปริมาณ 10 μ l ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 ml

2.2 ทำการเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาทีแล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) ทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนทำซ้ำจำนวน 2 รอบ

2.3 เติมสารละลาย digestion buffer จำนวน 500 μ l เติมสารละลาย proteinase-K จำนวน 2 μ l และสารละลาย SDS ที่ความเข้มข้น 10% จำนวน 50 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C ข้ามคืน

2.4. เติมสารละลาย phenol-chloroform จำนวน 500 μ l เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาที

2.5 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที

2.6 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ขนาด 1.5 ml เติม chloroform จำนวน 500 μ l

2.7. เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาทีนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ขนาด 1.5 ml

2.8 เติมสารละลาย sodium acetate ที่ความเข้มข้น 3 M, pH 5.2 จำนวน 50 μ l และเติม isopropanol จำนวน 500 μ l เขย่าให้สารละลายเข้ากันจนกระทั่งเห็นตะกอนดีเอ็นเอตกลงมา

2.9 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 70% จำนวน 2 ครั้งตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

2.10 เติมสารละลาย TE buffer จำนวน 50-100 μ l และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C รวมทั้งตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอบน agarose gel electrophoresis วัดความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop

3. ออกแบบไพรเมอร์โดยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC1R* และยีน *KIT* จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอนรายละเอียดดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอ (100-200 ng/ μ l) ของตัวอย่างสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง ถูกใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Template DNA (100 ng/ μ l)	1.00 μ l
10X PCR buffer	2.00 μ l
Forward primer (10 pmol/ μ l)	0.40 μ l
Reverse primer (10 pmol/ μ l)	0.40 μ l
dNTP (2.5 mM)	0.50 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.20 μ l
Taq DNA polymerase (Fermentas 5U/ μ l)	0.10 μ l
dH ₂ O	14.40 μ l

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1	Denaturation:	94 °C	4 นาที	} จำนวน 35 รอบ
ขั้นตอนที่ 2	Denaturation:	94 °C	30 วินาที	
	Annealing:	58-62 °C	30 วินาที	
	Extension:	72 °C	30 วินาที	
ขั้นตอนที่ 3	Final extension:	72 °C	5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิต PCR บน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6% และส่องภายใต้แสง ultraviolet

4. ค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมาย โดยใช้ข้อมูลจากการตรวจเอกสารที่รายงานเกี่ยวข้องกับความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย หรือ ค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้ฐานข้อมูลพันธุกรรมทางคอมพิวเตอร์ (*In silico*) หรือ การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น เทคนิค SSCP และ/หรือ DNA-sequence ในการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรม

5. พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่าย โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่เกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย และทำการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) ในประชากร 100 ตัว

โดยจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย ทำการเลือก Restriction Enzyme ที่มีจุดตัดจำเพาะต่อ SNPs บนแต่ละ fragment ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

PCR product	3.00 μ l
Restriction Enzyme (10 U/ μ l)	0.05 μ l
10X buffer	0.50 μ l
dH ₂ O	1.95 μ l

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C หรือ 65°C ข้ามคืน แยกขนาดของแถบ DNA บน native polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

6. ทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับลักษณะของสุกร

7. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

7.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะสีของสุกร (ดำและไมดำ) ด้วยวิธีไคสแควร์ (Chi-square test) โดยใช้สมการดังนี้

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \left(\frac{O - E}{E} \right)^2, df = k - 1$$

โดยที่ χ^2 = ค่าสถิติไคสแควร์

O = ความถี่ที่สังเกตได้

E = ความถี่ที่คาดหวังหรือที่กำหนด

K = จำนวนกลุ่มตัวแปร กรณี df = K-1

7.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเป้าหมายกับลักษณะสีดำของสุกร ด้วยวิธีโลจิสติกส์รีเกรสชัน (Logistic regression analysis) โดยใช้ proc logistic descending ของโปรแกรม SAS โดยใช้สมการดังนี้ (Duangjinda et al., 2013)

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + e_{ij}$$

โดยที่ $y = \ln \left(\frac{P_i}{1 - P_i} \right)$

y = ค่าความน่าจะเป็นของการทำนายของลักษณะสีดำของสุกร

P_i = ค่าความน่าจะเป็นของการพบลักษณะสุกรสีดำ

β_0 = จุดตัดแกน y

$\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ = ค่าสัมประสิทธิ์รีเกรสชันของยีนเป้าหมาย

$X_1, X_2, \dots, X_n$ = ค่าสัมประสิทธิ์รีเกรสชันของรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเป้าหมาย

e_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อน

7.3 การวิเคราะห์ค่าความแม่นยำในการทำนายลักษณะสีดำของสุกร (Accuracy test) โดยใช้สมการดังนี้ (Wassertheil-Smoller, 2004)

$$\% \text{ Accuracy} = \frac{a + b}{n} \times 100$$

โดยที่ a = จำนวนสุกรลักษณะสีดำที่เครื่องหมายโมเลกุลทำนายว่าเป็นสีดำ

b = จำนวนสุกรลักษณะสีไม่ดำที่เครื่องหมายโมเลกุลทำนายว่าเป็นสีไม่ดำ

n = จำนวนสุกรทั้งหมด

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ตำบลสบเปิง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่
2. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว ตำบลเมืองนะ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่
3. สถานีเกษตรหลวงปางดะ ตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่
4. โครงการหลวงหนองหอย ตำบลแม่แรม อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่
5. ฟาร์มสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
6. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.3 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการปี 2561

กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินกิจกรรม (วัน)									
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
1. เก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง	←→									
2. เสนอรายงานการศึกษาเบื้องต้น (Inception Report)	●									
3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดสุกร			←→							
4. ออกแบบไพรเมอร์โดยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย			←→							
5. ค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมาย				←→						
6. เสนอรายงานความก้าวหน้า(Progress Report)				●						
7. ศึกษาความสัมพันธ์เครื่องหมายทางพันธุกรรมกับลักษณะสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง						←→				
8. ทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับลักษณะสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง							←→			
9. เสนอร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ (Draft Final Report)							●			
10. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ									←→	
11. เสนอรายงานฉบับสมบูรณ์ (Final Report)									●	

3.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

จำนวน 270 วัน (นับแต่วันลงนามในสัญญา)

3.5 งบประมาณในการดำเนินการวิจัย

งบประมาณ 800,000 บาท (แปดแสนบาทถ้วน)