

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ไก่กระดูกดำที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ไก่กระดูกดำ จำนวน 166 ตัว และลักษณะที่ไม่ตรงตามสายพันธุ์ไก่กระดูกดำ จำนวน 54 ตัว รวมทั้งหมดจำนวน 220 ตัว

3.1.1 ถูกเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณเส้นเลือดใต้ปีก ประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย 0.5M EDTA 50 μ l จากนั้นทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.1.2 ลักษณะที่ปรากฏ ไก่กระดูกดำได้ถูกบันทึก ลักษณะภายนอก เช่น สีขน หงอน ข้าง หน้า เป็นต้น และ สีของกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

- 1) 10X PCR buffer, *Taq* polymerase (Fermentas, USA)
- 2) Acetic acid (Merck, Germany)
- 3) Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
- 4) Agar-Agar (O.V. chemical, Thailand)
- 5) Agarose (Gibco/BRL, USA)
- 6) Ammonium persulfate (USB corporation, USA)
- 7) Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)
- 8) Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
- 9) Boric acid (Merck, Germany)
- 10) dNTPs (Fermentas, USA)
- 11) EDTA (Fisher Scientific, USA)
- 12) Ethanol (Merck, Germany)
- 13) Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)
- 14) Formaldehyde 37% (Merck, Germany)
- 15) Lambda DNA/Avall (Fermentas, USA)
- 16) Isopropanol (Merck, Germany)
- 17) Magnesium chloride (Merck, Germany)
- 18) Nitric acid (Merck, Germany)
- 19) N,N-dimethylformamide (Bio Basic Inc, Canada)
- 20) Phenol (Merck, Germany)

- 21) Primers (Bio Basic Inc, Canada)
- 22) Proteinase K (Invitrogen, USA)
- 23) Silver nitrate (Merck, Germany)
- 24) Sodium acetate (Merck, Germany)
- 25) Sodium biocarbonate (Merck, Germany)
- 26) Sodium chloride (Merck, Germany)
- 27) Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- 28) TEMED (USB corporation, USA)
- 29) Tris (USB corporation, USA)

3.2.2 สารละลาย

- 1) 0.5M EDTA pH 8.0
- 2) 10X TBE buffer
- 3) 10X TAE buffer
- 4) Digestion buffer
- 5) Phosphate-buffered saline (PBS)
- 6) TE buffer

3.2.3 เอนไซม์

- 1) *MscI* (Fermentas, USA)

3.2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) Balances, Model AB204 (Mettler-Toledo, Switzerland)
- 2) Electrophoresis (for agarose gel) Gel-Mate 2000, Toyobo, Japan
- 3) Electrophoresis (vertical apparatus), Hoefer SQ3, Amersham pharmacia biotech, USA
- 4) Electrophoresis Power Supply, Model E833, Consort, Belgium
- 5) Gel documentation, Model Gene Genius & Gene Tools, USA
- 6) Gel dryer, Model GD 2000, Amersham Bioscience, USA
- 7) Hot Air Oven, Model ULE 400, Memmert, Germany
- 8) PCR thermocycler, PTC-100TM, MJ Research, USA
- 9) Spectrophotometer, UV-VIS Biowave S2100, Germany
- 10) Thermo Shaker, Model DKSI001a, Daiki, Korea
- 11) Magnetic Stirrer, Model HS115, HL Instrument, Thailand
- 12) Microcentrifuge tube 1.5 ml, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
- 13) PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA

- 14) pH meter, Model CG 842, Inc., USA
- 15) Pipette, 0.2 μ l, CappAero, Denmark
- 16) Pipette, 20, 200, 1000 μ l, Gilson, France
- 17) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R, Hettich, Germany
- 19) Vortex mixer, Genie II Model G560E, Scientific Industries, USA

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดไก่ ด้วยวิธี phenol-chloroform ตามวิธีการของ (Sambrook and Russell, 2006) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- 1) นำตัวอย่างเลือด (Whole blood) ปริมาณ 5 μ l ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 ml
- 2) ทำการเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) ทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอน ทำซ้ำ จำนวน 2 รอบ
- 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 ซ้ำมคืน
- 4) เติมสารละลาย phenol-chloroform จำนวน 500 μ l เขย่าให้สารละลายให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาที
- 5) นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที
- 6) ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ ขนาด 1.5 ml เติม chloroform จำนวน 500 μ l
- 7) เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาที นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ ขนาด 1.5 ml
- 8) เติมสารละลาย sodium acetate ที่ความเข้มข้น 3 M, pH 5.2 จำนวน 50 μ l และเติม isopropanol จำนวน 500 μ l เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จนกระทั่งเห็นตะกอนดีเอ็นเอตกลงมา
- 9) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยสารละลายเอธานอล 70% จำนวน 2 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง
- 10) เติมสารละลาย TE buffer จำนวน 50-100 μ l และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer (1X) ในอัตราส่วน 1:100 (DNA 5 μ l : TE buffer 495 μ l) และนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ} = \text{ค่า OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Dilution factor}$$

โดย

ค่า OD_{260} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 nm

50 $\mu\text{g/ml}$ คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลาย DNA ที่ OD_{260} มีค่าเท่ากับ 1

Dilution factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

3.3.3 ออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ melanocortin 1 receptor (*MC1R*) และ promelanin 17 (*PMEL17*) และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/ μ l) ของไก่กระดูกดำ จำนวนทั้งหมด 166 ตัว ถูกใช้เป็น template ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน *MC1R* และ ยีน *PMEL17* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 2 มีส่วนประกอบดังนี้

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
ปริมาตรรวม	20.00 μ l

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รอบที่ 1	Denaturation:	94°C	4 นาที	} จำนวน 35 รอบ
รอบที่ 2	Denaturation:	94°C	30 วินาที	
	Annealing:	58°C	30 วินาที	
	Extension:	72°C	30 วินาที	
รอบที่ 3	Final extention:	72°C	5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ บน Polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6 % และส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง gel documentatio

3.3.4 การค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *MC1R* ด้วยเทคนิค single stranded conformation polymorphism (SSCP)

การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ด้วยเทคนิค SSCP มีขั้นตอนดังนี้ ผลผลิต PCR ของยีน *MC1R* ทั้ง 5 คู่ไพรเมอร์ จำนวน 2 μl ถูกผสมกับ SSCP loading buffer จำนวน 8 μl และนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยว (single-stranded DNA) จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวจำนวน 8 μl load บน non-denaturing gel electrophoresis (ความเข้มข้น 8%) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 10°C และกระแสไฟฟ้า 120 V และ 400 mA เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีด้วยวิธี silver staining (ภาพ 6) โดยแช่ gel ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกที่มีความเข้มข้น 1% จำนวน 300 ml นาน 5 นาที ล้างแผ่น gel ด้วย deionized water 3 ครั้ง ก่อนแช่ด้วยสารละลาย silver nitrate ที่ความเข้มข้น 0.1% จำนวน 300 ml (ซึ่งถูกผสมด้วย formaldehyde เข้มข้น 37% จำนวน 450 μl) นาน 5 นาที หลังจากนั้นล้างสารละลาย silver nitrate ด้วย deionized water (DI-water) 2 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย sodium bicarbonate เข้มข้น 3% (ซึ่งถูกผสมด้วย formaldehyde เข้มข้น 37% จำนวน 260 μl) ที่เจือจางด้วย DI-water ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ในสารละลาย sodium bicarbonate เข้มข้น 3% จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏ หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 10% และล้างด้วย DI-water 3 ครั้งก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer

3.3.5 ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่าย โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่เกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและทำการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) ในประชากร 220 ตัว

3.3.6 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีนเป้าหมายจากไก่แต่ละสายพันธุ์ สามารถคำนวณได้ดังนี้

ความถี่จีโนไทป์

$$f(AA) = AA / N$$

$$f(AB) = AB / N$$

$$f(BB) = BB / N$$

เมื่อ $f(AB)$

คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous AA

$f(AB)$

คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ heterozygous AB

$f(BB)$

คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous BB

AA, AB และ BB

คือ จำนวนไก่ที่มีจีโนไทป์แบบ AA, AB และ BB ตามลำดับ

และ N

คือ จำนวนไก่ทั้งหมด

ความถี่อัลลีล	$f(A) = [2(AA) + AB] / 2N$
	$f(B) = [2(BB) + AB] / 2N$
เมื่อ $f(A)$	คือ ความถี่อัลลีล A
$f(B)$	คือ ความถี่อัลลีล B
AA, AB และ BB	คือ จำนวนไก่ที่มีจีโนไทป์แบบ AA, AB และ BB ตามลำดับ
และ N	คือ จำนวนไก่ทั้งหมด

2) ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะสายพันธุ์ไก่กระดูกดำ ถูกทดสอบด้วยค่า Chi-square test (χ^2) และ Principal component analysis (PCA) สำหรับการทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในการทำนายพันธุ์ไก่กระดูกดำ ใช้การทดสอบแบบ Logistic regression ของโปรแกรม SAS version 6.0

3) การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ ใช้โมเดลของ general linear model ของโปรแกรม SAS version 6.0

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

- พื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต. แม่เหียะ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
- พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก ต. แม่วิน อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่
- ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่