

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ไก่กระดุกดำ จำนวนรวมทั้งหมด 169 ตัว ถูกรวบรวมจากพื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 116 ตัว พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก ต. แม่วิน อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ จำนวน 23 ตัว และพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยเสี้ยว ต.บ้านปาง อ.หางดง จ. เชียงใหม่ จำนวน 30 ตัว และไก่กลุ่มควบคุม จำนวน 24 ตัว ประกอบด้วยไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า จำนวน 10 ตัว จากฟาร์มสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ไก่ประดู่หางดำ จำนวน 10 ตัว และ ไก่ฟ้า (ไก่ดำพื้นเมืองไทย) 4 ตัว จากศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ ไก่ทั้งหมดถูกบันทึก ข้อมูลลักษณะที่ปรากฏภายนอก (เช่น ใบหน้า หงอน ขน สีผิวหนัง สีแข้ง) และเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณเส้นเลือดใต้ปีก ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่บรรจุ 0.5M EDTA จำนวน 50 μ l แล้วแช่น้ำแข็ง ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ไก่กระดุกดำ จำนวน 60 ตัว ถูกเลือกมาชำแหละซาก เพื่อเก็บตัวอย่างเนื้ออกไก่ ลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ ถูกให้คะแนน 3 ระดับ ตามลักษณะความเข้มจาง (สีชมพู = 1 คะแนน, สีเทา = 2 คะแนน และสีดำ = 3 คะแนน)

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) *Hin1II* (Fermentas, USA)
- 2) *MboI* (Fermentas, USA)
- 3) *RsaI* (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 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดไก่จำนวน 169 ตัวอย่างถูกสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol-chloroform ตามวิธีการของ (Sambrook and Russell, 2006) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- 1) นำตัวอย่างเลือด (Whole blood) ปริมาณ 10 μ l ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 ml
- 2) ทำการเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) ที่เหลือไว้แต่ตะกอน 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 ซ้ำคืน
- 4) เติมสารละลาย phenol-chloroform จำนวน 500 μ l เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง 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 μl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer (1X) ในอัตราส่วน 1:100 (DNA 5 μl : TE buffer 495 μl) 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

3.2.3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน fibromelanosis gene (*FM* gene) และ sex-linked inhibitor of dermal melanin gene (*Id* gene) มีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ของยีนเป้าหมายในไก่กระดุกดำ

Gene	Sequence	Reference
<i>FM1</i>	F: AGAAACAAGGGTCAAGGTGAGC R: TGGATCATTGGAGGAAGTGTTG	Dorshorst <i>et al.</i> (2011)
<i>FM2</i>	R: GGGATGGCTCTCACATAAAAGG R: TGGATCATTGGAGGAAGTGTTG	Dorshorst <i>et al.</i> (2011)
<i>FM3</i>	F: CTTGGCTCAGATATTCGCCTCT R: AGGCACAGTCTGGCACATTAAA	Dorshorst <i>et al.</i> (2011)
<i>FM4</i>	F: GCAGCCTTTATTATTGCGTGTG F: CTTGGCTCAGATATTCGCCTCT	Dorshorst <i>et al.</i> (2011)
<i>Id000</i>	F: TTCCTTAGACTTAATGGTCAG R: GGCATGGAAGTTATTGGTCT	Li <i>et al.</i> (2014)
<i>Id542</i>	F: CTTTGGGAAATGTGAGTCAA R: ATGGAGGCTAGATGTATAAC	Ming <i>et al.</i> (2014)
<i>Id603</i>	F: GGTTCCTAGGATAGTTGCCAA R: AGTAGCTAATCTCACAATAGC	Dorshorst <i>et al.</i> (2010)
<i>Id881</i>	F: GGAAACTAGAGAATTTGTGT R: ATACAGAAAGGAGGCTCCA	Li <i>et al.</i> (2014)

3.2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/ μ l) ของไก่ ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 1 โดยมีส่วนประกอบดังนี้

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
TaqDNA polymerase (Fermentas 5U/ μ l)	0.10	μ l
dH ₂ O	14.40	μ l
ปริมาตรรวม	20.00	μ l

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาพีซีอาร์มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รอบที่ 1	Denaturation:	94°C	4 นาที	จำนวน 35 รอบ
รอบที่ 2	Denaturation:	94°C	30 วินาที	
	Annealing:	56°C	30 วินาที	
	Extension:	72°C	30 วินาที	
รอบที่ 3	Final extention:	72°C	5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิต PCR บน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6 % และส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง gel documentation

3.2.5 การตรวจสอบความความผันแปรของยีนเป้าหมาย

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *FM* และ *Id* โดยยีน *FM* ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด คือ (1) *FM* assay A (*FM*1 และ *FM*2) และ (2) *FM* assay B (*FM*3 และ *FM*4) ตามวิธีการของ Dorshorst *et al.* (2011) ส่วนยีน *Id* ใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ชุด คือ *Id*000, *Id*542, *Id*603 และ *Id*881 และตรวจสอบความผันแปรของแต่ละแถบเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*1II, *Mbo*I, *Rsa*I และ *Hin*1II ตามลำดับโดยมีปฏิกิริยาดังนี้

PCR product	2.50 μ l
enzyme (10U/ μ l)	0.05 μ l
1X buffer	0.50 μ l
dH ₂ O	<u>1.95</u> μ l
ปริมาตรรวม	<u>5.00</u> μl

นำผลผลิต PCR กล้ามาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลานาน 50 นาที และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining โดยมีรายละเอียดดังนี้

- 1) แช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10% จำนวน 50 มล. นาน 10 นาที
- 2) เติมกรดไนตริกความเข้มข้น 1% ปริมาณ 50 มล. นาน 10 นาทีแล้วล้างด้วย deionized water จำนวน 3 ครั้ง
- 3) แช่ด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO₃) เข้มข้น 0.1% จำนวน 100 มล. ซึ่งถูกผสมด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 μ l เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย deionize water จำนวน 2 ครั้ง
- 4) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ความเข้มข้น 3% ที่มีส่วนผสมฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 μ l ที่เจือจางด้วย deionize water ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้งๆละ 50 มล.
- 5) จากนั้นแช่เจลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ความเข้มข้น 3% ที่มีส่วนผสมของฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 μ l ปริมาตร 50 มล.จนกระทั่งปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10% นาน 20 วินาที และล้างแผ่นเจลด้วย deionize water 3 ครั้งก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer

3.2.6 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 homozygous 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

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. พื้นที่โครงการหลวงและโครงการขยายผลโครงการหลวง ได้แก่
 - ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ตำบลแม่เหิยะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
 - พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่
 - พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยเสี้ยว ตำบลบ้านปง อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่
2. ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่