

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาและค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) ที่บ่งชี้ลักษณะสุกรบนพื้นที่สูง

- 1) เก็บตัวอย่างเลือดสุกรบนพื้นที่สูง จากเส้นเลือดดำบริเวณระหว่างคอและหน้าอกตอนบน (Anterior vena cava) ปริมาณ 1 ml. โดยใช้สารกันเลือดแข็ง Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์สีดำล้วน (จำนวน 50 ตัว) และลักษณะที่ไม่ตรงตามสายพันธุ์ (จำนวน 50 ตัว) รวมจำนวน 100 ตัว
- 2) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดสุกรด้วยวิธี 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 นาทีแล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) ทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอนทำซ้ำจำนวน 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 เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาที
 5. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที
 6. ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ขนาด 1.5 ml เติม chloroform จำนวน 500 μ l
 7. เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาที นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ขนาด 1.5 ml
 8. เติมสารละลาย sodium acetate ที่ความเข้มข้น 3 M, pH 5.2 จำนวน 50 μ l และเติม isopropanol จำนวน 500 μ l เขย่าให้สารละลายเข้ากันจนกระทั่งเห็นตะกอนดีเอ็นเอตกลงมา
 9. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 70% จำนวน 2 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

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

3) ออกแบบไพรเมอร์โดยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ agouti signaling-protein (ASIP), tyrosinase (TYR) และ melanocortin 1 receptor (MC1R) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

4) ค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมาย โดยใช้ข้อมูลจากการตรวจเอกสารที่รายงานเกี่ยวข้องกับความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย หรือค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้ฐานข้อมูลพันธุกรรมทางคอมพิวเตอร์ (*In silico*) รวมไปถึงการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น เทคนิค SSCP และ/หรือ DNA-sequence ในการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรม

5) พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่าย โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่เกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและทำการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) ในประชากร 100 ตัว

6) ทดสอบความแม่นยำของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับลักษณะของสุกร

7) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ general linear model

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย อ.แม่อิง จ.เชียงใหม่ สถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ และศูนย์วิจัยสาริตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

2) ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.4 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

จำนวน 280 วัน (นับแต่วันลงนามในสัญญา)

3.5 งบประมาณในการดำเนินการวิจัย

งบประมาณ 800,000 บาท

