# บทที่ 3
# วิธีการวิจัย

**การทดลองที่ 1 การศึกษาค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *TYR* และ *MC1R* กับลักษณะไก่กระดูกดำ**

1. เก็บตัวอย่างเลือดไก่กระดูกดำ ที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ไก่กระดูกดำ (จำนวน 50 ตัว) และลักษณะที่ไม่ตรงตามสายพันธุ์ไก่กระดูกดำ (จำนวน 50 ตัว) รวมจำนวน 100 ตัว เพื่อใช้เป็นสารพันธุกรรมสำหรับเครื่องหมายโมเลกุลของไก่กระดูกดำ

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

1) นำตัวอย่างเลือด (Whole blood) ปริมาณ 10 µl ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม น้ำกลั่นให้ครบ 1.5 ml

2) ทำการเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) ทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอน ทำซ้ำ จำนวน 2 รอบ

3) เติมสารละลาย digestion buffer จำนวน 500 µl เติมสารละลาย proteinse-K จำนวน 2 µl และสารละลาย SDS ที่ความเข้มข้น 10% จำนวน 50 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C ข้ามคืน

4) เติมสารละลาย phenol-chloroform จำนวน 500 µl เขย่าให้สารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลานาน 30 วินาที

5) นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที

6) ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองอันใหม่ ขนาด 1.5 ml เติม chloroform จำนวน 500 µl

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 µl และเติม isopropanol จำนวน 500 µl เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จนกระทั่งเห็นตะกอนดีเอ็นเอตกลงมา

9) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยสารละลายเอธานอล 70% จำนวน 2 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

10) เติมสารละลาย TE buffer จำนวน 50-100 µl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3. 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

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = ค่า $OD_{260}$ × 50 µg/ml × Dilution factor

โดย

ค่า $OD_{260}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 nm

50 µg/ml คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลาย DNA ที่ $OD_{260}$ มีค่าเท่ากับ 1

Dilution factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

4. ออกแบบไพรเมอร์โดยการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ tyrosinase (*TYR*) และ melanocortin 1 receptor (*MC1R*) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

5. ค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมาย โดยใช้ข้อมูลจากการตรวจเอกสารที่รายงานเกี่ยวข้องกับความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย หรือค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมโดยใช้ฐานข้อมูลพันธุกรรมทางคอมพิวเตอร์ (*In silico*) รวมไปถึงการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น เทคนิค SSCP และ DNA-sequence ในการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรม

6. ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่าย โดยการออกแบบไพร์เมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณที่เกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและทำการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP) ในประชากร 100 ตัว

7. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ general linear model

**การทดลองที่ 2 ศึกษาการแสดงออกของยีน *TYR* และ *MC1R* ในกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำ**

1 เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ จำนวนกลุ่มละ 10 ตัว รวมจำนวน 20 ตัวอย่าง

2 สกัดตัวอย่างอาร์เอ็นเอ (RNA) จากตัวอย่างกล้ามเนื้อ

1) นำตัวอย่างกล้ามเนื้อออกมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปใส่ในหลอด 1.5 ml

2) เติม Trizol 600 µl ทำการ homogenized แล้วตั้งไว้บนอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3) เติม cool chloroform 200 µl จากนั้น vortex แล้วตั้งไว้บนอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที

4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

5) เก็บส่วนใสข้างบนลงในหลอด 1.5 ml หลอดใหม่

6) ทำการเติม cool isopropanol ประมาณ 2 เท่าของส่วนใสข้างบน จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันด้วยมือ

7) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

8) เทสารละลายส่วนบนทิ้ง

9) เติม 100% EtOH 1 ml แล้วทำการผสมให้เข้ากันด้วยมือ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

10) เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วทำการตากตะกอนให้แห้ง

11) เติม $dH_2O$ (DEPC) 50 µl แล้วทำการผสมให้เข้ากับตะกอน

12) ตรวจเช็ค RNA ใน Formaldehyde Agarose gel

3 ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย *TYR* และ *MC1R*

4 สังเคราะห์ first strand cDNA จาก mRNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

5 วัดการแสดงออกของยีน *TYR* และ *MC1R* ในกล้ามเนื้อไก่ โดยใช้เครื่อง Real time PCR เทียบกับ house keeping gene (beta actin)

6 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ general linear model

**สถานที่ดำเนินการวิจัย**

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

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)