บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

ตัวอย่างเลือดไก่ทั้งหมดถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยไก่อายุที่ 24 สัปดาห์ ที่มีน้ำหนักตัวมากที่สุดและน้อยที่สุด กลุ่มละ 5 ตัวอย่าง ถูกคัดเลือกนำไปค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอบนยีน *MC2R* และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอบนยีน *MC2R* ที่พบ จะถูกนำไปศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองจำนวนทั้งหมด 220 ตัวอย่าง

3.1.1 การบันทึกลักษณะทางการผลิต

ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำทั้งหมดถูกวัดลักษณะต่างๆ ประกอบด้วย

3.1.1.1 ชั่งน้ำหนักตัว (body weight) ตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 24 สัปดาห์ (ภาพ 8)

3.1.1.2 วัดความกว้างหน้าอก (breast-wide) โดยวัดช่วงความกว้างตั้งแต่โคนขาด้านซ้ายถึงโคนขาด้านขวาที่อายุ 8-24 สัปดาห์ (ภาพ 9)

3.1.1.3 วัดความยาวแข้ง (shank length) ที่อายุ 8-24 สัปดาห์ (ภาพ 10)

ภาพ 8 การชั่งน้ำหนักตัวไก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 9 การวัดความกว้างหน้าอกไก่

ภาพ 10 การวัดความยาวแข้งไก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

10X PCR buffer, *Taq* polymerase (Fermentas, USA)

Acetic acid (Merck, Germany)

Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

Agar-Agar (O.V. chemical, Thailand)

Agarose (Gibco/BRL, USA)

Ammonium persulfate (USB corporation, USA)

Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)

Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

Boric acid (Merck, Germany)

Chloroform (Lab Scan, Ireland)

DH5α *Escherichia coli* competent cell (Invitrogen, USA)

dNTPs (Fermentas, USA)

EDTA (Fisher Scientific,USA)

Ethanol (Merck, Germany)

Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)

Formaldehyde 37% (Merck, Germany)

Glycerol (Merck, Germany)

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (US Biological, USA)

Lambda DNA/AvaII (Fermentas, USA)

LB-Broth (US Biological, USA)

Isopropanol (Merck, Germany)

Magnesium chloride (Merck, Germany)

Nitric acid (Merck, Germany)

N,N'-dimethylformamide (Bio Basic Inc, Canada)

Peptone (Scharlau, Spain)

Phenol (Merck, Germany)

Primers (Bio Basic Inc, Canada)

Proteinase K (Invitrogen, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Silver nitrate (Merck, Germany)

Sodium acetate (Merck, Germany)

Sodium bicarbonate (Merck, Germany)

Sodium chloride (Merck, Germany)

Sodium hydroxide (Merck, Germany)

TEMED (USB corporation, USA)

Tris (USB corporation, USA)

X-Gal (USB corporation, USA)

Yeast extract (Scharlau, Spain)

3.2.2 สารละลาย (รายละเอียดดังภาคผนวก)

0.5M EDTA pH 8.0

10X TBE buffer

50X TAE buffer

Digestion buffer

Phosphate-buffered saline (PBS)

SSCP loading buffer

TE buffer

3.2.3 เอนไซม์

*Alu*I restriction endonuclease (Fermentas, USA)

*Msp*I restriction endonuclease (Fermentas, USA)

T4 DNA ligase, 10X ligase buffer (Promega, USA)

3.2.4 ชุดสารเคมีสำเร็จรูป

1) GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Germany)
2) GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
3) pGEM®-T easy vector System Kit (Promega, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

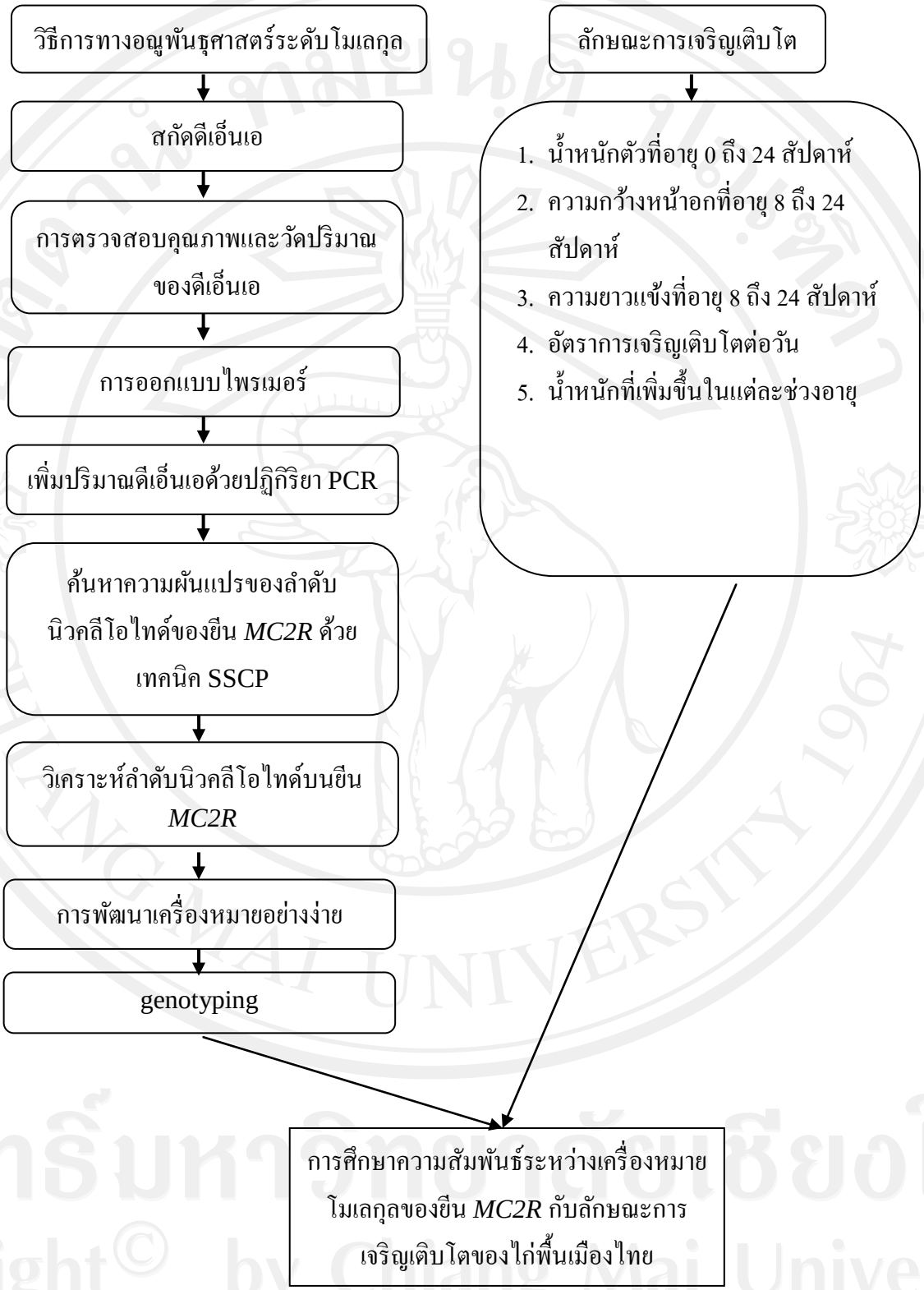
3.2.5 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) Balances, Model AB204 (Mettler-Toledo, Switzerland)
2) CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
3) Electrophoresis (for agarose gel) Gel-Mate 2000, Toyobo, Japan
4) Electrophoresis (vertical apparatus), Hoefer SQ3, Amersham pharmacia biotech, USA
5) Electrophoresis Power Supply, Model E833, Consort, Belgium
6) Gel documentation, Model Gene Genius & Gene Tools, USA
7) Gel dryer, Model GD 2000, Amersham Bioscience, USA
8) Hot Air Oven, Model ULE 400, Memmert, Germany
9) PCR thermocycler, PTC-100™, MJ Research, USA
10) Spectrophotometer, UV-VIS Biowave S2100, Germany
11) Thermo Shaker, Model DKSI001a, Daiki, Korea
12) Magnetic Stirrer, Model HS115, HL Instrument, Thailand
13) Microcentrifuge tube 1.5 ml, Sorenson, Bioscience. Inc. USA
14) PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
15) pH meter, Model CG 842, Inc., USA
16) Pipette, 0.2 µl, CappAero, Denmark
17) Pipette, 20, 200, 1000 µl, Gilson, France
18) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R, Hettich, Germany
19) Vortex mixer, Genie II Model G560E, Scientific Industries, USA

3.3 วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอบนยีน *MC2R* สำหรับบ่งชี้ลักษณะการเจริญเติบโตของไก่พื้นเมืองแสดงดังภาพ 11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 ขั้นตอนการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอบนยีน *MC2R* สำหรับบ่งชี้ลักษณะการเจริญเติบโตของไก่พื้นเมืองไทย

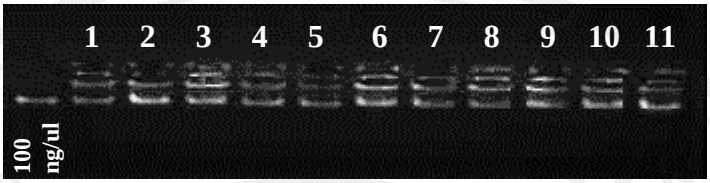
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำจำนวน 220 ตัว ถูกสกัดดีเอ็นเอ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) นำเลือดไก่จำนวน 3 µl เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 ml และสารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 9% จำนวน 100 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำจนได้ตะกอนสีขาว
2) เติม PBS จำนวน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
3) เติมสารละลาย Digestion Buffer จำนวน 800 µl เขย่าจนตะกอนละลาย จากนั้นเติม Proteinase-K จำนวน 30 µl และ SDS ที่มีความเข้มข้น 10% จำนวน 50 µl นำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 55°C ข้ามคืน
4) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
5) เติม Phenol: Chloroform (1:1) จำนวน 500 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
6) เติม Chloroform จำนวน 500 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml
7) เติมสารละลาย Sodium acetate (3M) pH 5.2 ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตรสารละลายที่ได้จากข้อ 6 เขย่าให้เข้ากันเบาๆ
8) เติม Isopropanol ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรสารละลายที่ได้จากข้อ 6 เขย่าจนเห็น ดีเอ็นเอ
9) เทสารละลายใสทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ แล้วเติมเอธานอลที่มีความเข้มข้น 80% จำนวน 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที
10) เทเอธานอลทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 37°C จนแห้ง
11) ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer (1X) จำนวน 20 µl เก็บที่อุณหภูมิ 4°C
12) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ บน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.2% และส่องภายใต้แสง ultraviolet (ภาพ 12) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้บน Agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2%

3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer (1X) ในอัตราส่วน 1:100 (DNA 5 µl : TE buffer (1X) 495 µl) และนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ คำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้

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

โดย ค่า OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm ของสารละลายดีเอ็นเอ

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

dilution factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

สำหรับการประเมินคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถคำนวณได้จาก อัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} และ OD_{280} โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะต้องมีค่าประมาณ 1.8

3.3.3 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC2R* ในไก่จากฐานข้อมูล GenBank (AB009605.1) มีความยาว 3021 bp ไพรเมอร์ถูกออกแบบ 5 คู่บนยีน *MC2R* ให้มีขนาดประมาณ 300-600 bp ทั้งนี้ให้ครอบคลุมส่วนของ start codon (ภาพ 13) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตาราง 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

GAATTCTTCCTTTGAAATAGTACTAAAGGGCATCATGGCATTTAGTAAACCTGACTAGGAACAAATGCCCAAATGC
ATTTCAAGACATATTGGTATGAAAGTGGCAAAGAACTAAAGGCTGTTTTGCATCTAAAACAGGAGAATATTTCAGG
TCTTAAAATAGGGAACATTCCAAATAGTAACTGCATCTGTACTTCACAAATGGAGCTATTAAAATCACAAGAAAAG
GTGTGCCTTATTCTCTATGGGTAGTATCTGAGCCAAATTAATATCACATGCATTTACACCTTAATGAATAGCTTAAA
AAGCCTAATCCTTTGGAAAGATTCCTATAAGCTTTCATGTAATTTGGATCAGGATAATTACAGAGAAAGAAAAAAA
AAACCTTTCAATGCAAAAACAAAACATTTGATCTTTCAGATAGTTGTAAAACATAGCCAACAAAAAGATTTTGCTTT
GGATCTTAAAAATATGTTCAAATCAAAGGAATGTTTCAATTTGCCTGAAAAGGCAGTTTGGTACCAGTATCTAACAT
ACCTCTGAAAAAATCAATACTTACAATGTTCACATCTAAATTAAGAGCATTTTTTTATTTCAGCATCAACGGTGTGG
TGGTAAATATGCTACTGTTCTGGACAACAGCTTGTCTTGGCATTGGTCTCATCCATGTCTAATAACACTATAAATCTT
GTGAGAAATGCCAGACTTTCTCAAAGCAAACAGCTGGGCCAGTAGAGACTGCCAAATTCTTGAAGTCTGTGAAATC
AGTTTCAGTAAACATGGGATATTCATTGGTAAAGAAAACTATTTTTTTTTTAACTTCCCTGAAGCTAACAGAATTTA
CACCTTATTTTCCTCTAAGGCACCGTGGAGCTTGGAGCAGCTCTTATTTTATCCAAAGCAACTTAGCTTCACTCCAAT
AATATATATTCAGTCAATTGCAAAAGGTGATATTTCAAATGTTTGGGGTTTTTTTTGGCATGTGGCAATTTTCTTCTT
GATATTTATGTTTCTATATGTTCTATTGCAGGAGAAATTCAAAACATTTCACTTAAGACTTCAGATTGTTCCAGATGA
AGGAGAAAGCCATCAAGAAAAGGATGGTCTGACTTACAGGTCAGCTTCAGAGTAAAGCCAAGCTTGAGAAACAGC
AATACAGAGGCTTTCCAAGAGCAGAAGAAATGAGCACTGAGAAACCTTTCAACCTAATTTTGTCTGCCCACGCAGG
GCAGACAAGCATTCCATCCCTTGAAAATATAACTGATTTCTCCTTAAATATCACTGACTGCAACCAGGTCGTGGTGC
CAGAGGAAGTTTTTTTCACTGTTGCTGCTGCTGGCATACTGGAAAATCTACTTGTCCTTGTTGCTGTCATCAGAAATA
AGAATTTGCACTTGCCTATGTACTTCTTCATTTGTAGCTTGGCCATTTCAGACATGTTAGGCAGCTTGTACAAAACTC
TGGAGAACATCTTTATTATCTTGTGCAAAATGGGGTACCTGACACGTCGTGGGGACTTTGAGAAAAAGCTGGATGA
TGCCATGGATTCCATGTTCATTCTGTCTTTACTGGGGTCCATTTTCAGCTTGCTCGCTATTGCAGCAGACAGATATAT
CACTATCTTCTACGCTTTGCGGTACCATAATATAATGACGCTACAAAGGGCCTTGGTCATCTTGGCAATCATTTGGA
CATTCTGTGCTGGCAGTAGCATTGCCATTGCCCTCTTCTCCCACGAAGTAGCTACAGTTATTCCCTTCACCATCCTGT
TCCCTTTAATGATGATTTTTATACTGTGCCTCTATATCCATATGTTCCTCCTAGCTCGATCTCATGCTAAAAAGATTG
CCTCACTGCCAACCAGTGCAGTCCATCAGAGAACTAACATGAAAGGAGCCATTACACTGACTATTTTCCTTGGAGTC
TTCCTTTGCTGTTGGGCCCCCTTTGTTCTTCACATCCTTTTAGCAAGGTTTTGCCCACACAACCCTTACTGTGCCTGCT
ACATGTCCATTTTCCATGTGAATGGGACCCTCATAATGTGCAATGCAATCATCGATCCCATGATTTTTGCATTCCGA
AGCCCAGAATTACGGAGTACATTTAAGAAGATGTTCTGCTGTGCCAGGTATAACTGGAACTGGTGGAAACTAAATG
AAGGTGAATATTACAGAAGCACACCCATGCAACATCATTTTGCAGAGTTAAAAATACTAACCCAAAATGATACTAC
ACTTGCAGGAAACTGCCGGTGATTTTCAGAGAGCTGTAAAAGAATGAGCAAAGTATCCAGACAAGTCTTTGCCAGC
CAAACCTCCAGATATATTACTGATTAAGTTAATTCTGCTGATGATTTTCATGCAATAGTCTAAAAATAACTGCATCA
ACTATCTTTTATCATATCAGAAAAACTTAAATGTATATCTTCTGAAGCAAGCTTTGCATTCCCCCAGAGCTGAGTTA
ATGGCAACTCATTTTGTATCAGTAATTTCAATTTAAAATGTATATTACTTTAAAATTCTGTTGTTTAAATCACAAATA
AATGAATAATTATTTTAATACTTCACGTTTATATAAAAGTCTGTGATAAAGCAGAAAATATGAGCACGTGTTTGTAC
TTTGCTGGCAACTCTCACTCATTACTTTGTTCTTCAACATTGGGTCTCCTTAAAATCATGCCATTAGTAATAACTTTT
GGAACATGAGTCCAAGCAAAAGTATTTTGGTTTAAAAGCTATTTTCAGTGACTGAAGAGTTTTTCCCACTATAGAGA

* *MC2R*-1 *MC2R*-2 *MC2R*-3 *MC2R*-4 *MC2R*-5

ภาพ 13 ตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MC2R* (AB009605.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *MC2R* ของไก่พื้นเมือง

Primer	*Nucleotide Sequence*	*size (bp)*
MC2R-1	Forward: 5'-ATG TTC AAA TCA AAG GAAT TG-3'	490
	Reverse: 5'-ATT TGA AAT ATC ACC TTT TG -3'	
MC2R-2	Forward: 5'-CCG TGG AGC TTG GAG CAG-3'	507
	Reverse: 5'-ACA GCA ACA AGG ACA AGT AG-3'	
MC2R-3	Forward: 5'-TTT CAC TGT TGC TGC TGC TG-3'	496
	Reverse: 5'-CAT ATG GAT ATA GAG GCA CAG-3'	
MC2R-4	Forward: 5'-GCT ACA GTT ATT CCC TTC AC-3'	450
	Reverse: 5'-ATG TTG CAT GGG TGT GCT TC-3'	
MC2R-5	Forward: 5'-AGG TAT AAC TGG AAC TGG TG-3'	344
	Reverse: 5'-TTG CCA TTA ACT CAG CTC TG-3'	

3.3.4 ปฏิกิริยาPolymerase Chain Reaction (PCR)

สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/µl) ของไก่พื้นเมือง ถูกใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MC2R* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังตาราง 2 และมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

Template DNA (100 ng/µl)	1.00	µl
10X PCR buffer	2.00	µl
MC2R - forward primer (10 pmol/µl)	0.40	µl
MC2R - reverse primer (10 pmol/µl)	0.40	µl
dNTP (2.5 mM)	0.50	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.20	µl
Taq DNA polymerase (Fermentas 5U/µl)	0.10	µl
dH_2O	14.40	µl
ปริมาตรรวม	**20.00**	**µl**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

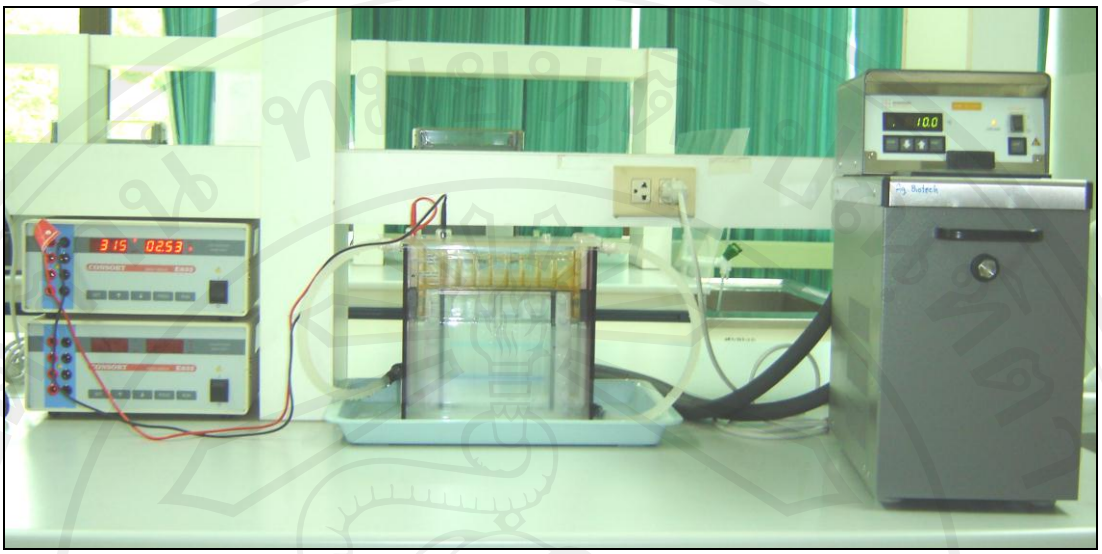
รอบที่ 1	Denaturation:	94 °C	4 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 42 รอบ
	Annealing:	52-58 °C	30 วินาที	
	Extension:	72 °C	2 นาที	
รอบที่ 3	Final extension:	72 °C	5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิต PCR บน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6% และส่องภายใต้แสง ultraviolet

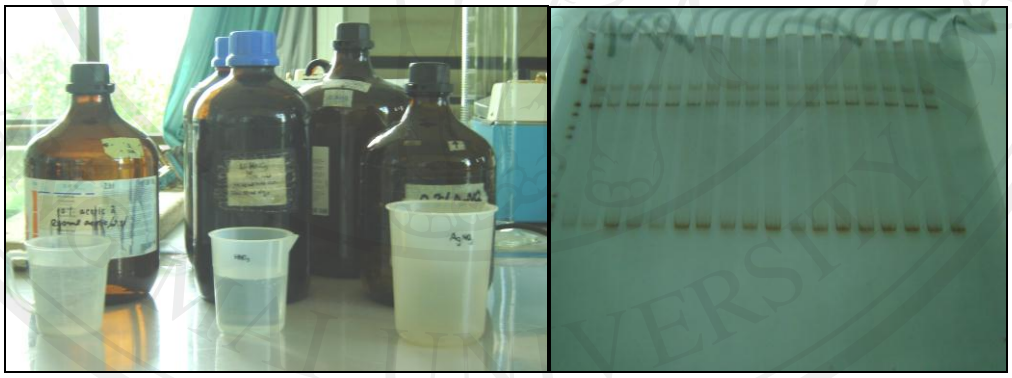
3.3.5 การค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *MC2R* ด้วยเทคนิค single stranded conformation polymorphism (SSCP)

การตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC2R* ด้วยเทคนิค SSCP มีขั้นตอนดังนี้ ผลผลิต PCR ของยีน *MC2R* 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 10%) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 10°C และกระแสไฟฟ้า 120 V และ 400 mA เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง (ภาพ 14) จากนั้นย้อมสีด้วยวิธี silver staining (ภาพ 15) โดยแช่ gel ในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้น 10% จำนวน 300 ml นาน 10 นาที และแช่ในกรดไนตริกที่มีความเข้มข้น 1% จำนวน 300 ml นาน 10 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 30 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 การตรวจสอบรูปแบบ SSCP ของยีน *MC2R* ด้วย non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 ºC กระแสไฟฟ้า 120 V, 400 mA และ 3 hr



ภาพ 15 การย้อมแถบดีเอ็นเอ ด้วยวิธี silver stained

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing analysis)

ผลจากการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอบนยีน *MC2R* ด้วยเทคนิค SSCP แถบดีเอ็นเอของ SSCP ที่แตกต่างถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง CEQ 8000 Automated Sequencer (Beckman Coulter) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.6.1 การโคลน *MC2R* fragments

1) แถบดีเอ็นเอของยีน *MC2R* ที่มีรูปแบบ SSCP แตกต่างกัน ถูกนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T easy vector (Promega) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

PCR product	1.5	µl
2X ligation buffer	2.5	µl
pGEM®-T vector (Promega)	0.5	µl
T4 DNA ligase	0.5	µl
ปริมาตรรวม	**5.0**	**µl**

2) บ่มสารละลายที่ทำการผสมในข้อ 1 ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน
3) ส่วนผสมของ recombinant vector ที่ได้ถูกนำไปทำทรานสฟอร์เมชั่น (transformation) โดยใช้ competent cell (*Escherichia coli*, DH5α) ด้วยวิธี heat shock เริ่มจากการผสมผลผลิตของปฏิกิริยา Ligation จำนวน 5 µl เข้ากับ competent cells จำนวน 50 µl และนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำส่วนผสมดังกล่าวไปแช่ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 90 วินาที และนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที หลังจากนั้นเติม LB-broth จำนวน 500 µl และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 120 นาที นำส่วนผสมแบคทีเรียจำนวน 200 µl ไป spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-Agar ที่ผสม ampicillin, X-Gal และ IPTG จำนวน 20 µl (ความเข้มข้น 10 mg/ml) หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน
4) เลือกโคโลนีที่มีสีขาวจำนวน 3 โคลน และโคโลนีที่มีสีน้ำเงินจำนวน 1 โคลน ลงใน 1X PCR buffer จำนวน 40 µl และ LB-broth จำนวน 500 µl (ที่มี ampicillin 10 mg/ml) โดยที่ส่วนผสมแบคทีเรียใน 1X PCR buffer ถูกนำไปต้มที่ 95°C นาน 15 นาที เพื่อใช้เป็น template สำหรับตรวจหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน *MC2R* ที่เชื่อมต่อกับ vector ส่วนแบคทีเรียใน LB-broth ถูกนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่ -80°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยการเติม Glycerol:LB-broth (1:1) จำนวน 500 µl ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเซลล์ เพื่อรอนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) ต่อไป

5) ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน *MC2R* ซึ่งถูกเชื่อมเข้ากับ vector ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13 (Forward: 5'-TTGTAAAACGACGGCCAGT-3' และ Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3') ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

Bacterial suspension	10.00	µl
10X PCR buffer	1.00	µl
M13 - forward primer (10 pmol/µl)	0.40	µl
M13 - reverse primer (10 pmol/µl)	0.40	µl
dNTP (2.5 mM)	0.50	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.20	µl
Taq DNA polymerase (Fermentas 5U/µl)	0.05	µl
dH_2O	6.45	µl
ปริมาตรรวม	**20.00**	**µl**

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

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

6) ตรวจสอบผลผลิต PCR บน polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ภายใต้แสง ultraviolet

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.6.2 การสกัดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA)

โคลนแบคทีเรียที่มี recombinant vector ถูกนำไปเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากพอเพื่อใช้สำหรับสกัดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) โดยใช้ QIAprep® Miniprep Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) เซลล์แบคทีเรียจำนวน 5 ml ถูกนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที และเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง
2) ละลายตะกอนแบคทีเรียใน resuspension solution จำนวน 200 µl ผสมให้เข้ากัน
3) เติม lysis solution จำนวน 200 µl เพื่อทำให้ผนังเซลล์แตก พลิกหลอดกลับไปมา 8-10 ครั้ง ให้ส่วนผสมใส และเหนียวหนืด
4) บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที และเติม neutralization buffer จำนวน 350 µl ลงไปในส่วนผสมและเขย่าให้เข้ากันอย่างช้าๆ จนกว่าสารละลายกลายเป็นสีขุ่น และตกตะกอนเป็นปุยก้อนสีขาว
5) ปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในชุด QIAprep® Miniprep binding column และปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน column ทิ้ง
6) เติม wash solution จำนวน 700 µl ลงใน column และปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทสารละลายที่ผ่าน column ทิ้ง
7) ปั่นชุด GenElute miniprep binding column เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ column แห้ง
8) ย้าย column ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เติม elution buffer จำนวน 25-30 µl ปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที
9) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยใช้ spectrophotometer และ agarose gel electrophoresis

3.3.6.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence Analysis)

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) ที่ได้จากข้อ 3.3.6.2 ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automate sequencer โดยใช้ GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลาย Plasmid DNA (40 ng/µl)	3.00	µl
DTCS Mix	2.00	µl
M13-forward Primer (1.6 pmol)	1.00	µl
dH_2O	4.00	µl
ปริมาตรรวม	**10.00**	**µl**

โปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

รอบที่ 1	Denaturation:	94 °C	3 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
	Annealing:	58 °C	30 วินาที	
	Extension:	72 °C	4 นาที	

ผลผลิต PCR ถูกนำไปตกตะกอนด้วยเอธานอล ก่อนนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) ผลผลิต PCR ถูกเติม stop solution จำนวน 5 µl ซึ่งประกอบด้วย 3M sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 2 µl, 100mM Na_2-EDTA (pH 8.0) จำนวน 2 µl และ Glycogen จำนวน 1 µl ผสมให้เข้ากัน
2) ล้างผลผลิต PCR ด้วยเอธานอล (95%) 60 µl จำนวน 2 ครั้ง โดยปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 2 นาที
3) ตากตะกอนให้แห้ง และเจือจางด้วย Sample Loading Solution (SLS) จำนวน 40 µl และนำเข้าเครื่องอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์
4) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC2R* ถูกนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาตำแหน่งของ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.7 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเออย่างง่าย

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เลือก Restriction Enzyme ที่จำเพาะต่อ SNPs ของแต่ละ fragment คือเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Msp*I ซึ่งมีจุดตัดจำเพาะต่อ SNPs บน fragment ของยีน *MC2R-5* โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

3.3.7.1 การตรวจสอบความผันแปรของ SNPs ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I (AG▼ACT)

PCR product	10.00	µl
Alu I (10 U/µl)	0.05	µl
10X buffer Tango™ with BSA	2.00	µl
dH_2O	7.95	µl
ปริมาตรรวม	**20.00**	**µl**

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน แยกขนาดของแถบ DNA บน native polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลา 50 นาที และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

3.3.7.2 การตรวจสอบความผันแปรของ SNPs ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I (CC▼GG)

PCR product	10.00	µl
*Lwe*I (10 U/µl)	0.05	µl
10X buffer Tango™ with BSA	2.00	µl
dH_2O	7.95	µl
ปริมาตรรวม	**20.00**	**µl**

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน แยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ บน native polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลา 50 นาที และย้อมแถบ DNA ด้วยวิธี silver staining

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความถี่ของจีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *MC2R*

ความถี่ของจีโนไทป์ = จำนวนสัตว์ที่มีจีโนไทป์นั้น / จำนวนสัตว์ทั้งหมด
ความถี่อัลลีล (A หรือ a) = จำนวนอัลลีล A หรือ a / จำนวนอัลลีลทั้งหมด

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs บนยีน *MC2R* กับลักษณะทางการผลิตในไก่พื้นเมืองประกอบด้วย น้ำหนักตัวตั้งแต่แรกเกิดจนถึงอายุ 24 สัปดาห์ ความกว้างหน้าอก และความยาวแข้งที่อายุ 8-24 สัปดาห์ ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ General Linear Model ด้วย SPSS software package

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i \times B_j + S_k + YS_l + e_{ijkl}$$

โดยที่

Y_{ijkl} คือ ลักษณะสมรรถภาพการผลิต
μ คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่การศึกษา
A_i คือ fixed effect ของเครื่องหมายโมเลกุล *Msp*I
B_j คือ fixed effect ของเครื่องหมายโมเลกุล *Alu*I
S_k คือ fixed effect ของเพศ
YS_l คือ fixed effect ของฤดูกาล
e_{ijkl} คือ error

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved