# บทที่ 3

## วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

### สถานที่ที่ใช้ทำการศึกษาและรวบรวมข้อมูล

- ศูนย์สวนดอกอณูพันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

### วัสดุ และอุปกรณ์ในการทดลอง

1. Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 และ1.5 มิลลิลิตร
2. Micropipette ขนาด 2 - 20, 10 - 100, 20 - 200 และ500 - 1,000 ไมโครลิตร
3. ถุงมือยาง (Examination gloves)
4. คีม (Forceps)
5. บีกเกอร์ (Beaker)
6. นาฬิกาจับเวลา (Timer)
7. เครื่องเขย่าวน (Vortex)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
9. เครื่องชั่งสาร (Balance)
10. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer)
11. เครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการทำ PCR (Thermal cycler)
12. ชุดการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis set)

### สารเคมีในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. sterile water
3. Chelex resin
4. Proteinase K

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. 10X *Taq* buffer
6. 1 mM dNTPs
7. 1:20 *Taq* DNA polymerase
8. 1 μM Primers mix (Gallus gallus cytochrome b)
9. agarose powder
10. 0.5X TBE buffer
11. 100 bp DNA marker
12. 10X Loading dye
13. Ethidium brimide

**วิธีการทดลอง**

**1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง**

1.1 การคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่ต้องการศึกษา

1.1.1 การคำนวณหาขนาดของตัวอย่างไก่

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้สูตรการประมาณค่าแบบสัดส่วนของประชากร ซึ่งจะสามารถยอมให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อน (e %) ได้ ในกรณีที่ไม่ทราบค่า P (เอมอร จังศิริพรปกรณ์, 2545) ดังนี้

$$n = \frac{Z^2}{4e^2}$$

เมื่อ n = ขนาดของตัวอย่างที่ต้องการ

z = 1.96 (ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%)

e = 0.15 (ความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นในรูปของสัดส่วน)

แทนค่าในสูตร ;

$$n = \frac{(1.96)^2}{4 \times (0.15)^2}$$

$$= 42.68 \sim 43 \text{ ตัว}$$

ดังนั้น ขนาดของตัวอย่างที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ควรใช้ไม่น้อยกว่า 43 ตัวอย่าง แต่เพื่อให้ตัวเลขเหมาะสมผู้ทำการศึกษาจึงใช้ตัวอย่างไก่ จำนวน 45 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 การคำนวณหาขนาดของตัวอย่างสัตว์ชนิดอื่นที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบ ได้แก่ มนุษย์ ปลา หมู วัว และเป็ด

ในการศึกษาครั้งนี้ จะใช้สูตรที่มีการพิจารณาจากระดับความเชื่อมั่นในกรณีที่ประชากร (N) มีจำนวนแน่นอนและสามารถยอมให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อน (e %) ได้ (ไชยวัฒน์ รุ่งเรืองศรี, 2550) ดังนี้

$$n = \frac{N}{1 + N(e)^2}$$

เมื่อ n = ขนาดของตัวอย่างที่ต้องการ

N = 45 (จำนวนประชากรที่แน่นอน)

e = 0.15 (ความคลาดเคลื่อนที่ยอมให้เกิดขึ้นในรูปของสัดส่วน)

แทนค่าในสูตร ;

$$n = \frac{45}{1 + 45(0.15)^2}$$

$$= 22.36 \sim 23 \text{ ตัว}$$

ดังนั้น ขนาดของตัวอย่างที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ควรใช้ไม่น้อยกว่า 23 ตัวอย่าง แต่เพื่อให้ตัวเลขเหมาะสมผู้ทำการศึกษาจึงใช้ตัวอย่างสัตว์อื่น จำนวน 25 ตัวอย่าง

1.2 การเก็บตัวอย่าง (วิฑูรย์ ทะสุยะ และคณะ, 2549)

1.2.1 เลือด

เจาะเลือดปริมาตร 0.5-1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA อยู่ ผสมให้เข้ากัน ถ้ายังไม่นำไปทดสอบทันที ให้เก็บไว้ในที่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ˚C แล้วทำการทดสอบภายใน 4 วัน ถ้าจะเก็บไว้นานกว่านั้นให้เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 ˚C

1.2.2 เส้นขน

เก็บตัวอย่างเส้นขนโดยการถอน เพื่อให้มีเยื่อหุ้มรากติดอยู่ด้วยอย่างน้อย 5 เส้น โดยบรรจุในซองกระดาษเพื่อนำไปทำการทดสอบก่อนบรรจุต้องแน่ใจว่าเส้นขนนั้นๆ แห้งสนิทดีแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง** (วิฑูรย์ ทะสุยะ และคณะ, 2549)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เป็นเลือด

- Pipette ตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าวน (Vortex) ประมาณ 10 -15 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-30 นาที
- ปั่นแยก (Centrifuge) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
- ดูดเอาน้ำชั้นบนออกมากที่สุด จะเห็นตะกอนรวมเม็ดเลือดขาวตกอยู่ที่ก้นหลอด (ตะกอนอาจมีสีแดงปนเนื่องจากการตกตะกอนของฮีโมโกลบิน) เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าวน นาน 10 วินาที แล้วปั่นล้างทั้งหมด 2 รอบ
- เติมน้ำแขวนลอยของ Chelex 5 % ลงไปประมาณ 200 ไมโครลิตรสังเกตให้เม็ด Chelex ท่วมตะกอนเม็ดเลือดขาวที่ก้นหลอดหรือไม่หากยังไม่ท่วมให้เติมเฉพาะเม็ด Chelex ลงไปจนท่วมตะกอน
- แช่อบที่อุณหภูมิ 56 ˚C นานประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนถูกย่อยจนหมด จากนั้น นำมาเขย่าวน นาน 5-10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
- นำหลอดทดลองแช่อบต่อที่อุณหภูมิ 80 ˚C นานประมาณ 30 นาที หรือนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที และนำไปปั่นตก
- ใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับกระบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8˚C หรือแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมา ใช้ใหม่ให้นำไปเขย่าวน ประมาณ 5-10 วินาที และนำไปปั่นตกอีกครั้ง

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เป็นเส้นขน

- ตรวจเส้นขนด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูว่ามีเยื่อหุ้มรากขน (Root sheath) หรือไม่
- ล้างเส้นขนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเกลือแร่ (Deionized distilled water) ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- ตัดเอาโคนเส้นขนประมาณ 1 มิลลิเมตร จากปลายรากจำนวน 5 เส้น เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการสกัดดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ใส่โคนเส้นขนลงในหลอดทดลองเติมน้ำแขวนลอยของ Chelex 5% ลงไป 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 2 ไมโครลิตร ของ Proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอดเบาๆ
- ตรวจดูให้แน่ใจว่าโคนเส้นขนนั้นจมอยู่ใต้เม็ด Chelex แล้วแช่อบหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 37 ˚C นานประมาณ 30-60 นาที จากนั้นนำไปเขย่าวนประมาณ 5-10 วินาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที
- นำหลอดทดลองแช่อบต่อที่อุณหภูมิ 80 ˚C นานประมาณ 30 นาที หรือนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 8 นาที
- นำไปเขย่าวน ประมาณ 5 - 10 วินาที และนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว14,000 รอบต่อนาที นาน 10 วินาที จากนั้นใช้น้ำส่วนบนไปเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับกระบวนการ PCR ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่ 2-8 ˚C หรือนำไปแช่แข็งก็ได้ เมื่อต้องการนำมาใช้ใหม่ให้นำไปเขย่าวน นาน 5-10 วินาที และนำไปปั่นตกอีกครั้ง

**3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิค PCR**

3.1 การเตรียมตัวควบคุมผลบวก (positive control) และตัวควบคุมผลลบ (negative control)

3.1.1 ตัวควบคุมผลบวก ได้จากการนำเลือดของตัวอย่างไก่มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ “การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ” (วิฑูรย์ ทะสุยะ และคณะ, 2549)

3.1.2 ตัวควบคุมผลลบ ใช้ sterile water

3.2 การเตรียม PCR mixture (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาตรรวม 10 µl ประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| - sterile water | 5 µl |
| - 10X *Taq* buffer | 1 µl |
| - dNTPs | 1 µl |
| - 1:20 *Taq* DNA polymerase | 1 µl |
| - 1 µM Primers mix (cytochrome b Gallus gallus) | 1 µl |
| - DNA template | 1 µl |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 ลำดับเบสของ Primers mix (cytochrome b Gallus gallus) ที่ได้ทำการออกแบบไว้เพื่อใช้ในเทคนิค PCR มีดังนี้

Primer F : 5'- GCC CCA TCC AAC ATC TCT GC -3'

Primer R : 5'- GGA GAT TCC GGA TGA GTC AG -3'

(ดัดแปลงมาจาก Matsunaga, *et al.* 1999)

3.4 โปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- Denaturation อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที
- Annealing อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 วินาที
- Extension อุณหภูมิ 72 °C นาน 30 วินาที
- ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ

**4. การตรวจสอบผลของสารพันธุกรรมที่ได้**

ทำการตรวจสอบว่ามี amplified PCR products เกิดขึ้นหรือไม่โดยการวิเคราะห์แถบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis (ภาคผนวก ข) ซึ่งในการตรวจสอบผลดังกล่าวจะต้องมีการเทียบกับตัวดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA marker) ด้วยทุกครั้งเพื่อประเมินขนาดของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ปรากฏว่าเป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้และตรงกับแถบผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างควบคุมผลบวกหรือไม่ จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539) ซึ่งถ้าได้ผลบวกก็จะปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 181 bp ส่วนผลลบจะไม่ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์ PCR

**5. การประเมินผลการศึกษา**

ตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ข้อมูลและคำนวณค่าความถูกต้องจากผลการศึกษาที่ได้เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีการในการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอของไก่ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโตโครม บี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved