บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

สารเคมี

สารที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด;

เอททิลลีลไดอะมินเตตราอะซิติก แอซิด (Ehtylenediaminetetraacetic acid: EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$, Fluka Chemcie AG03620)

สารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ;

TE buffer

Proteinase K buffer

Proteinase K (Sigma P6556)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCL, Merck 06404)

เอธานอล (Ethanal absolute, C_2H_5OH, Merck 00983)

สารที่ใช้ในการทำพีซีอาร์;

ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate: dNTPs, Promega Bio-Active Co., Ltd. U1330)

taq DNA polymerase ประกอบด้วย 250 unit tag, 10X PCR Buffer และ 5X Q-Solution, QIAGEN 201203

Primer สังเคราะห์ที่ Bioservice unit (BSU)

Mineral oil (Sigma M5904)

สารที่ใช้ใน Gel Electrophoresis;

อกาโรส (Agarose, Bio101, Inc. 2031-204)

Acrylamide PAGE, CH_2:$CHCONH_2$, Plusone Pharmacia UN2074

Bis-Acrylamide, N, N'- Methylene-bis-acrylamide, $C_7H_{10}N_2O_2$, Sigma M7256

TEMED, N,N,N',N'-Tetramethyl – ethylenediamine, $(CH_3)_2NCH_2N(CH_3)_2$, Plusone Phamacia 17-1312-01

แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate $(NH_4)_2S_2O_8$), Sigma A3678

Bromophenol blue – Xylene cyanole, Sigma B3269

25 bp DNA Step ladder, Promega Bio-active Co, Ltd. G4511

TAE buffer

TBE buffer

สารที่ใช้ในการย้อมสีเจล;

Ethidium bromide, $C_{11}H_{20}N_3Br$, Sigma E8751

ซิลเวอร์ ไนเตรท (Silver nitrate, $AgNO_3$, Sigma S1179)

โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3, Riedel-de Haen 13418)

ไนตริก แอซิด (Nitric acid, HNO_3, Merck 00456)

อะซิติก แอซิด (Gracial acetic acid, CH_3COOH, J.T. Baker 9507-03)

ฟอร์มาดีไฮล์ (Formaldehyde, HCHO, H.K. trading)

บอริค แอซิด (Boric acid, H_3BO_3, Merck 00165)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) แบบ UV-Visible โมเดล DU® Series 7000 บริษัท Beckman Instruments, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex mixer) โมเดล Genie2 บริษัท Scientific industries

เครื่องปั่นแยก (Centrifuger) โมเดล 424 ALC® บริษัท A.L.C. International S.R.I. ประเทศอิตาลี,

เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง) โมเดล AB204 บริษัท Mettler-Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องเขย่า (Shaker) โมเดล R02, LS2 บริษัท Gerhardt Bonn

หม้อน้ำร้อน (Waterbath) โมเดล 600 บริษัท memmert ประเทศเยอรมัน

เครื่องเทอร์โมไซเคอร์ (Authorized thermocycle for PCR) โมเดล PCR Sprint Hybaid, บริษัทไบโอแอคทิฟ จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องพาวเวอร์ ซัฟพลาย (Power supply) โมเดล Power pac300 บริษัทไบโอแอคทิฟ จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องทรานซิลูมิเนเตอร์ (Electronic U.V. transilluminator) โมเดล CA90723 บริษัท Ultra-lum, Inc.

เครื่องดรายเจล (gel dryer) โมเดล EC355 บริษัท E-C apparatur corporation

เครื่องรันเจลแนวตั้ง (Vertical gel electrophoresis) โมเดล PROTEIN™II Stab cell บริษัท Bio-Rad

เครื่องรันเจลแนว (Horizontal gel electrophoresis) โมเดล E0638 บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 5,000, 1,000, 200, 20, 10 และ 2.5 มคล. Eppendorf บริษัท Eppendorf Research ประเทศเยอรมัน

หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. และ 0.65 มล. (PCR tube) บริษัท Sorenson, Bioscience. Inc.

กลุ่มประชากรและการเก็บตัวอย่างเลือด

กลุ่มประชากรโคที่ทำการศึกษา:

โคนมพันธุ์โฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยน สายเลือด 100 % เพศเมีย จำนวน 20 ตัว นำเข้าจากประเทศแคนนาดา เมื่อปี พ.ศ. 2533 และทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน

โคนมพันธุ์โฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยน สายเลือด 87.5 % เพศเมีย จำนวน 21 ตัว และ 75 % เพศเมีย จำนวน 22 ตัว เป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์บาร์มัน X พื้นเมือง X ฟรีเชี่ยน คัดเลือกลูกที่ให้ผลผลิตสูง โคนมทั้งหมดจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

โคขาวลำพูน เพศเมีย จำนวน 20 ตัว จากสถานีวิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา จังหวัดพะเยา ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมโคขาวลำพูนแหล่งใหญ่แห่งหนึ่ง เพื่อทำการอนุรักษ์และป้องกันการสูญพันธุ์

การเก็บตัวอย่างเลือด:

การเก็บตัวอย่าง: เก็บจากเส้นเลือดที่คอ (Jugular vein) ปริมาตร 3-5 ml ใส่หลอดทดลองที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (anticoaggulant) EDTA 0.5M จำนวน 50 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ

การเก็บข้อมูล:

เก็บข้อมูล ปริมาณน้ำนมจริง น้ำนมที่ 100 วัน ระยะให้นม และน้ำนมเฉลี่ยต่อตัวต่อวันของกลุ่มโคนม

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำเลือดที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ นำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย นำเลือดจำนวน 300 µl ใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 ml เติม TE buffer (pH 8.4) จำนวน 500 µl นำไปเขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง เติม TE buffer (pH 8.4) ทำซ้ำแบบเดิมจนได้ตะกอนค่อนข้างขาว จึงล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 500 µl เขย่าให้เข้ากัน ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดของเหลวใสทิ้งเติม proteinase K buffer จำนวน 200 µl และ proteinase K (ความเข้มข้น 10 µg/µl) จำนวน 10 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ ข้ามคืน นำมาให้ความร้อนที่ 95 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 6 M NaCl จำนวน 10 µl และเอธานอลบริสุทธิ์จำนวน 500 µl คว่ำและหงายหลอดกลับไปมา 2-3 ครั้ง นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ –20 °ซ เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนของเหลวใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 10 % เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย TE buffer (pH 8.4) จำนวน 50-100 µl

การหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) ใช้ TE buffer (pH 8.4) เป็น blank โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 5 µl และ TE buffer (pH 8.4) จำนวน 995 µl.

คำนวณหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างแต่ละหลอดโดยใช้สูตร:

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm * 50 * dilution factor (= 200)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm /ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm

ดีเอ็นเอตัวอย่างที่จะนำมาเพิ่มขยายชิ้นส่วนด้วย วิธี polymerase chain reaction (PCR) จะต้องมีความบริสุทธิ์ > 1.0 เตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 100 ng/µl โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวทำละลาย

การเพิ่มขยายชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาขยายปริมาณ dinucleotide repeat 5 ตำแหน่ง คือ UWCA9 (Georges *et al.*, 1995), TGLA153 (Arranz *et al.*, 1998), BM203 (Bishop *et al.*, 1994), CSSM065 (Moore *et al.*, 1994), IGF-1 (Fries *et al.*, 1993) ดังตารางที่ 2. ด้วยวิธี PCR ใช้เอนไซม์ tag polymerase

ตารางที่ 2. แสดงลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ที่ทำการศึกษา

Locus	BTA	T_a	size range	primer sequence (5′- 3′)
UWCA9 (Georges *et al.*, 1995)	9	58	83-107	CCTTCTCTGAATTTTTGTTGAAAGC GGACAGAAGTGAGTGACTGAGA
TGLA153 (Arranz *et al.*, 1998)	20	60	119-153	GGAGTGGGAGAAAGGCTCAAA TGCTTTACAGTGTTGTGTTAGTTT
BM203 (Bishop *et al.*, 1994)	27	60	201-233	TTCCTGCTTGGTGAAACTTTGAAC CAACTCAAGCTTCAACAGCAGCC
CSSM065 (Moore *et al.*, 1994)	19	58	154-174	TTCCTGCTTGGTGAAACTTTGAAC CAACTCAAGCTTCAACAGCAGCC
IGF- 1 (Fries *et al.*, 1993)	5	48	225-231	GCTTGGATGGACCATGTTG CACTTGAGGGGCAAATGATT

หมายเหตุ BTA คือ โครโมโซมโคคู่ที่ , T_a คือ annealing temperature

การเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยาในกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR)

ในหลอดทดลองขนาด 0.65 ml ประกอบด้วยสารในปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่

ตารางที่ 3. สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาในกระบวนการ polymerase chain reaction

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
1 mM dNTPs	0.2	2.0
10X PCR buffer	1X	1.0
5X Q-solution	1X	1.0
10 pmol/µl primer (forw)	0.5	0.5
10 pmol/µl primer (rev)	0.5	0.5
100 ng/µl template	8.0	0.8
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	-	2.7
0.5 units taq polymerase	0.025	0.5
รวม	-	10
mineral oil		40

ในการทำ PCR ครั้งนี้จะใช้วิธีการ hot start PCR โดยการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2.7 µl ที่ผสม 0.5 units taq polymerase จำนวน 0.5 µl ในช่วงที่อุณหภูมิ 95 °ซ แล้วเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo cycle)

โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1 อุณหภูมิ 95 °ซ เวลา 3 นาที เพื่อเติม taq polymerase และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

รอบที่ 2-31 อุณหภูมิ 94 °ซ เวลา 1 นาที (denaturation)

อุณหภูมิ 48-60 °ซ เวลา 30 วินาที (annealing) ขึ้นอยู่กับ primer ที่ใช้

อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 45 วินาที (extension)

รอบที่ 32 อุณหภูมิ 72 °ซ เวลา 7 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product) ด้วย อกาโรสเจล อิเล็กโตรฟอรีสีส (agarose gel electrophoresis) เตรียมอกาโรส 1% โดยใช้ผงอกาโรส 1 กรัม ละลายใน 0.5X TBE 100 ml เทลงในแบบพิมพ์ วางหวีแล้วปล่อยให้แข็งตัวดึงหวีออก เตรียม PCR product ที่ได้ โดยผสม loading dye จำนวน 2 µl กับ PCR product จำนวน 2 µl หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น (well) ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ (volts) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย 1 % ehidium bromide 15 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เลือก PCR product ที่ผ่านการเพิ่มขยายแล้วมีแถบดีเอ็นเอไปทำการวิเคราะห์หาขนาดต่อไป

การหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

นำ PCR product ที่ได้มาแยกขนาดความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรฟอรีสีสที่มี polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8 % เป็นตัวกลางค้ำจุน ย้อมสีเจลด้วย silver เทียบกับ DNA molecular weight marker 25 bp step ladder โดยอาศัยหลักการที่ว่า PCR product จากไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าวเป็น dinucleotide repeats ความแตกต่างของขนาดจะเกิดขึ้นครั้งละ 2 คู่เบส

การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 8 %

เจล 1 แผ่นเตรียมจากการผสม น้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 14.7 ml กับ 5X TAE จำนวน 2.1 ml และ 40% polyacrylamide จำนวน 4.2 ml รวม 21 ml เขย่าให้สารละลายผสมเข้ากันดี จากนั้นเติม N,N,N',N' – tetramethyl ethylenediamine (TEMED) จำนวน 12 µl และ 10 % Ammonium persulphate จำนวน 120 µl เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน เทส่วนผสมของเจลลงระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น ที่มีแผ่นกั้นกระจก (spacer) หนา 0.75 mm โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเสียบหวีตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็ง ประมาณ 1 ชั่วโมง จึงดึงหวีออก

การทำอิเล็กโตรฟอรีสีส

ประกอบแผ่นเจลที่แข็งดีแล้วเข้ากับเครื่องอิเล็คโตรฟอรีสีสแนวตั้ง เติม 1XTAE buffer ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 44 โวลต์ เปิดเครื่องก่อนทำการเติม PCR product เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ผสม PCR product 5 µl กับ loading dye 3 µl ผสมให้เข้ากันหยอดลงในช่องหวี พร้อมกันนั้นทำการหยอด 25 bp step ladder ทั้ง 2 ด้าน ของ PCR product แล้วต่อวงจรไฟฟ้าใช้กระแสคงที่ 44 โวลต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเวลาที่ใช้ขึ้นกับขนาดของ PCR product

การย้อมเจลด้วย silver

แยกแผ่นกระจกนำเจลออกมาย้อมโดยวิธีการดังนี้คือ แช่เจลใน 10% ethanol 10 นาที นำมาแช่ใน 1 % Nitric acid 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 วินาที แช่เจลใน 0.012 M silver nitrate 35 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 วินาที ใส่สารละลายผสมระหว่าง 0.28 M Sodium carbonate และ 0.019 % ฟอร์มาดีไฮล์ พอสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำหรือสีน้ำตาล เทสารละลายทิ้งแล้วเติมสารละลายใหม่ลงไปแทน ทำหลายครั้งจนเห็นแถบ DNA ปรากฏชัดเจน แช่เจลใน 10 % gracial acetic acid 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 วินาที ทำให้แห้งบนกระดาษกรองด้วยเครื่อง gel drier หรือเก็บเจลใส่ถุงพลาสติกที่หล่อด้วยน้ำแล้วปิดให้สนิท นำไปวิเคราะห์หาขนาดอัลลีลโดยการวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอเทียบกับ DNA molecular weight marker ขนาด 25 bp step ladder

การคำนวณผลการทดลอง

การหาความถี่อัลลีล

เมื่อได้ข้อมูลขนาดของ PCR product สามารถนำมาหาความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งได้โดยใช้สูตรหาความถี่อัลลีลดังนี้

$P_i = n_i/2N$

P_i = ความถี่อัลลีล i

n_i = จำนวนของอัลลีล i ในประชากร

N = จำนวนประชากรทั้งหมดที่ศึกษา

การเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากร

จะใช้การทดสอบความแปรปรวนแบบไคสแควร์ ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากรโคทั้ง 4 กลุ่ม และเปรียบเทียบระหว่างประชากรโคแต่ละกลุ่ม

จะใช้การทดสอบความแปรปรวนแบบไคสแควร์ ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างประชากรโคนมที่ให้น้ำนมสูงและต่ำ และในอัลลีลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำนม

การคำนวณหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม และระยะห่างระหว่างพันธุกรรม

คำนวณจากไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งโดยใช้โปรแกรม MSAT http://hpgl.Stanford.edu/projects/microsat และสร้าง Phylogenetic tree จากโปรแกรม PHILIP

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

สถานีวิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา จังหวัดพะเยา

ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

มิถุนายน 2543- สิงหาคม 2544 (รวม 15 เดือน)