บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมีและสารละลาย

3.1.1.1 สารเคมี

1) 10× multicore buffer (Promega)
2) 10× PCR buffer และ *Taq* polymerase (Fermentas)
3) 37% Formaldehyde
4) Acetic acid
5) Acrylamide
6) Agarose
7) Ammonium persulfate (APS)
8) Bis-Acrylamide, *N, N′*- Methylene-bis-acrylamide
9) Bovine serum albumin (BSA)
10) dNTPs
11) Ethanol (CH_2OH)
12) Ethidium bromide
13) Isopropanol
14) Magnesium chloride ($MgCl_2$)
15) Nitric acid
16) Primers (ตาราง 2)
17) Proteinase K
18) restriction enzyme *Taq*I (Promega)
19) restriction enzyme *Eco*RI (Promega)
20) Silver nitrate ($AgNO_3$)
21) Sodium acetate
22) Sodium bicarbonate (Na_2CO_3)
23) Sodium chloride (NaCl)
24) Sodium dodecyl sulfate (SDS)
25) T4 DNA ligase และ 10x ligase buffer (Promega)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

26) TEMED (*N,N,N′,N′*- tetramethylenediamine)

27) Urea

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ *Eco*R I และ *Taq* I สำหรับวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล AFLP

Restriction enzyme (*Eco*RI)
*Eco*RI adaptor : 5′- gactgcgtaccaattc - 3′
E-ACA : 5′- gactgcgtaccaattcACA - 3′
E-ACC : 5′- gactgcgtaccaattcACC - 3′
E-ACG : 5′- gactgcgtaccaattcACG - 3′
E-ACT : 5′- gactgcgtaccaattcACT - 3′
E-AGA : 5′- gactgcgtaccaattcACA - 3′
E-AGC : 5′- gactgcgtaccaattcAGC - 3′
E-AGG : 5′- gactgcgtaccaattcAGG - 3′
E-AAC : 5′- gactgcgtaccaattcAAC - 3′
Restriction enzyme (*Taq*I *)
*Taq*I adaptor : 5′- gatgagtcctgagcga - 3′
T-CAT : 5′- gatgagtcctgagcgaCAT - 3′
T-CCA : 5′- gatgagtcctgagcgaCCA - 3′

3.1.1.2 สารละลาย (รายละเอียดดังภาคผนวก)

1) 10× TBE buffer
2) 1× TAE
3) Digestion buffer
4) Phosphate-buffered saline (PBS)
5) TE buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) Balances, Model AB204, Mettler-Toledo, Switzerland
2) Electrophoresis Power Supply, Model E833, Consort, Belgium
3) Electrophoresis System, Gel-Mate 2000, Toyobo, Japan

4) Gel Documentation, Model Gene Genius & Gene Tools, USA
5) Gel dryer, Model GD 2000, Amersham Biosciences, USA
6) Hot Air Oven, Model ULE 400, Memmert, Germany
7) Magnetic Stirrer,Model HS115, HL Instrument, Thailand
8) Microcentrifuge tube 1.5 ml, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
9) PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
10) pH Meter, Model CG 842, Schott-Gerate, Germany
11) Pipette, 0.2 µl, CappAero, Denmark
12) Pipette, 20, 200, 1000 µl, Gilson, France
13) Thermal cycler, PTC-100^{TM}, MJ Research, USA
14) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R, Hettich, Germany
15) Sequencer, Hoefer SQ3, Amersham pharmacia biotech, USA
16) Shaking Incubator, Model DK-SI001a, Daiki, Korea
17) Spectrophotometer, UV-VIS Biowave S2100, Germany
18) Vortex mixer, Genie II Model G560E, Scientific Industries, USA
19) Ultra-sound (RENCO PREG – ALERT), Renco Cooperation, USA

3.2 สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สุกรจำนวน 33 ตัว ซึ่งประกอบด้วย สุกรไทยพื้นเมืองจากแหล่งต่างๆ ในเขตภาคเหนือ จาก อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา จำนวน 4 ตัว กิ่งอำเภอดอยหลวง จังหวัดเชียงราย จำนวน 4 ตัว อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 4 ตัว บ้านมูเซอใน อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 4 ตัว และตำบลตะเคียนปม อำเภอทุ่งหัวช้าง จังหวัดลำพูน จำนวน 4 ตัว สุกรพื้นเมืองพันธุ์กระโดนจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดสกลนคร) จำนวน 4 ตัว สุกรป่า จำนวน 4 ตัว และสุกรสายพันธุ์ทางการค้า (ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ และดูรอค) จำนวนพันธุ์ละ 2 ตัว

สุกรไทยพื้นเมืองจากแหล่งต่างๆ ในเขตภาคเหนือ ถูกรวบรวมพันธุ์ และเลี้ยงอยู่ที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ สุกรพื้นเมืองพันธุ์กระโดนจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เลี้ยงที่สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดสกลนคร สุกรป่า จากฟาร์มเอกชน อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ และจากส่วนของงานเลี้ยงสัตว์ป่า ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ในจังหวัดเชียงใหม่ และสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ที่เลี้ยงภายในศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สุกรทั้งหมดถูกเก็บตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อ เพื่อสกัดดีเอ็นเอ สำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP ส่วนข้อมูลของลักษณะปรากฏภายนอก (Phenotype) นั้น เก็บเฉพาะสุกรในเขตภาคเหนือ ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 สุกรจากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

แหล่งที่มา	จำนวน (ตัว)	บันทึกข้อมูล	
		Phenotype	สกัด DNA
สุกรจากจังหวัดพะเยา	4	√	+
สุกรจากจังหวัดเชียงราย	4	√	+
สุกรจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน	4	√	+
สุกรจากจังหวัดเชียงใหม่	4	√	+
สุกรจากจังหวัดลำพูน	4	√	+
สุกรจากจังหวัดสกลนคร (พันธุ์กระโดน)	4		+
สุกรป่า	4		+
สุกรลาร์จไวท์	2		+
สุกรแลนด์เรซ	2		+
สุกรดูรอค	2		+

หมายเหตุ : √ บันทึกข้อมูล, + เก็บเลือดเพื่อสกัด DNA

3.3 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของสุกรไทยพื้นเมืองในเขตภาคเหนือ

บันทึกลักษณะทางฟีโนไทป์ของสุกรไทยพื้นเมืองในเขตภาคเหนือ ดังนี้

3.3.1 บันทึกภาพลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอก

3.3.1.1 ขนาดลำตัว

3.3.1.2 ลักษณะโครงหน้าด้านข้าง และโครงหน้าด้านตรง

3.3.1.3 ลักษณะหลัง

3.3.1.4 ลักษณะรูปท้อง

3.3.1.5 ลักษณะสีขน

3.3.1.6 ลักษณะผิวหนัง

3.3.1.7 ขนาดของใบหู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 บันทึกลักษณะทางการผลิต

สุกรพื้นเมืองที่น้ำหนัก 50 กิโลกรัม ยกเว้นสุกรพื้นเมืองจากจังหวัดพะเยา ถูกวัดลักษณะต่างๆ ประกอบด้วย (ภาพ 5)

3.2.2.1 ความหนาของไขมันสันหลัง โดยวัดความหนาของไขมันสันหลัง 3 จุด คือ ตำแหน่งซี่โครงซี่ที่ 1 ซี่โครงซี่สุดท้าย และตำแหน่งสะโพก แสดงความหนาไขมันสันหลังในรูปค่าเฉลี่ยของทั้ง 3 บริเวณด้วยเครื่อง ultra sound (RENCO PREG-ALERT)

3.2.2.2 พื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน ถูกวัดโดยเครื่อง ultra sound โดยวัดที่ตำแหน่งกึ่งกลางระหว่างกระดูกซี่โครงซี่แรกกับกระดูกซี่โครงซี่สุดท้าย ซึ่งต่ำลงมาด้านข้างลำตัวด้านละ 5 เซนติเมตร ทั้งสองด้าน

3.2.2.3 วัดความยาวของลำตัว โดยวัดจากตำแหน่งโคนหูไปถึงโคนหาง

3.2.2.4 วัดความยาวรอบอก โดยวัดบริเวณซอกขาหน้ามาจนถึงบริเวณกลางลำตัว

3.2.2.5 วัดความสูงโดยวัดบริเวณขาหน้า จากพื้นดินจนถึงระดับหลังของสุกรในขณะยืนในท่าปกติ

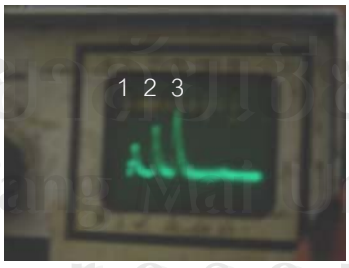
3.2.2.6 จำนวนเต้านม

ก.

ข.

ค.

ง.



จ.

ภาพ 5 วัดลักษณะต่างๆ (ก.) วัดความหนาของไขมันสันหลัง (ข.) วัดความยาวลำตัว (ค.) วัดความยาวรอบอก (ง.) การวัดความหนาของไขมันสันหลัง และพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันด้วยเครื่องมือสะท้อนด้วยคลื่นไฟฟ้า ultra sound (RENCO PREG – ALERT) จ. แสดง curve ในการวัดความหนาของไขมันสันหลัง (curve ที่ 2) วัดความหนาของเนื้อสัน (curve ที่ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

ตัวอย่างเลือดถูกสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก ศิริลักษณ์ และคณะ (2539) โดยมีขั้นตอนรายละเอียด (ภาพ 6) ดังต่อไปนี้

3.4.1 เจาะเลือดมา 5-10 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่มี EDTA จำนวน 500 µl

3.4.2 นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเอาส่วนของเม็ดเลือดขาว

3.4.3 เทส่วนที่เป็นพลาสม่าทิ้ง ดูดส่วนของเม็ดเลือดขาวไปใส่ใน vial ขนาด 1.5 ml

3.4.4 เติมน้ำกลั่น 1 ml เขย่าให้เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนมาแตก และเติมสารละลาย NaCl (9%) จำนวน 100 µl เพื่อปรับสภาพทางกายภาพ เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป เหลือส่วนที่เป็น pellet ไว้

3.4.5 เติมสารละลาย PBS จำนวน 1 ml เขย่า pellet ที่ได้มาให้กระจาย แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายของเหลวทิ้ง

3.4.6 เขย่า pellet ให้กระจายใน Digestion-buffer 800 µl เติมสารละลาย 10 % SDS จำนวน 50 µl และเติมสารละลาย Proteinase K (20 mg/ml) จำนวน 10 µl เขย่าให้เข้ากัน

3.4.7 นำเข้าเครื่อง shaking incubator ที่ความเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิ 55 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.4.8 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม NaCl ความเข้มข้น 6 M จำนวน 500 µl แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาส่วนใส (supernatant of DNA)

3.4.9 เติม Sodium acetate (3M) pH 5.2 ในอัตราส่วน 1 : 10 ของ supernatant of DNA และเติม Isopropanal : supernatant of DNA ในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากัน จนเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ ดูดส่วนใสทิ้ง

3.4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล (80%) จำนวน 500 µl จำนวน 2 ครั้ง และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนเติม TE Buffer จำนวน 50-100 µl ตามปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ เขย่าให้ดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เลือด 5-10 ml + EDTA 500 µl

ปั่นที่ 5,000 rpm 10 นาที 4 °C

น้ำกลั่น 1 ml ปั่น 5,000 rpm + 9% NaCl 100 µl 10 นาที 4 °C

เขย่าที่ ทิ้งไว้ 100 rpm 55 °C ข้ามคืน

เติม Digestion buffer 800 µl, 10% SDS 50 µl, Proteinase K10 µl

PBS 1 ml ปั่นที่ 5,000 rpm นาน 15 นาที 4 °C

เติม 6M NaCl 500 µl, ปั่นที่ 5,000 rpm 10 นาที 4 °C

เติม Na acetate 1:10 และ Isopropanol 1:1 ของปริมาตร

กลับหลอด เกิดตะกอน ทดลองไปมา ดีเอ็นเอ

ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 1× TE buffer

ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง

ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 80% Ethanol 1 ml

ภาพ 6 แสดงวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ

สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer ในอัตราส่วน 1:100 (ดีเอ็นเอ 5 µl : TE buffer 495 µl) และนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ คำนวณได้จาก :

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = ค่า O.D.ที่ 260 nm × 50 µg/ml × 100

โดยที่ ค่า OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ

50 µg/ml คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ OD_{260} เท่ากับ 1

100 คือ dilution factor

สำหรับการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างสามารถคำนวณได้จาก อัตราส่วนของค่า OD_{260} และ OD_{280} โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะต้องมีค่าประมาณ 1.8

3.6 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP

นำสารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 ng/µl มาวิเคราะห์ความหลาก หลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีของ Wimmer *et al.* (2002) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อ ไปนี้

3.6.1. ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอของสุกร จำนวน 500 นาโนกรัม (100 ng/µl) เติมน้ำ กลั่น จำนวน 15 µl ก่อนนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

Template DNA	20.00	µl
10x multicore buffer	2.50	µl
BSA (10 mg/ml)	0.25	µl
*Taq*I (10 Units/µl)	1.00	µl
น้ำกลั่น	1.25	µl
ปริมาตรรวม	25.00	µl

3.6.2 สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6.1 นำมาตัดด้วย restriction enzyme *Eco*RI ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยมีปฏิกิริยาดังนี้

Template DNA จากข้อ 2	25.00	µl
10x multicore buffer	1.50	µl
BSA (10 mg/ml)	0.15	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

*Eco*RI (12 Units/µl)	1.00	µl
น้ำกลั่น	12.35	µl
ปริมาตรรวม	40.00	µl

3.6.3 สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วย restriction enzmyes *Taq*I และ *Eco*RI ถูกนำมาเชื่อมต่อด้วย *Taq*I adaptor และ *Eco*RI adaptor โดยใช้ enzyme ligase และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	40.00	µl
*Taq*I adapter (50 mM)	1.00	µl
*Eco*RI adapter (10 mM)	2.00	µl
10x ligation buffer	2.50	µl
T4 DNA ligation	0.33	µl
น้ำกลั่น	4.17	µl
ปริมาตรรวม	50.00	µl

3.6.4 สารละลายดีเอ็นเอหลังผ่านการเชื่อมกับ adaptor นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 µligation solution จำนวน 10 µl + น้ำกลั่น จำนวน 40 µl เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

3.6.5 สารละลายดีเอ็นเอถูกนำมาคัดเลือกในขั้นตอน preselective amplification (PCR I) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเติมเบสจำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ (primer E-A / primer T-C) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

สารละลายดีเอ็นเอ จากข้อ 3.6.4	5.00	µl
primer E-A (10 pmol/µl)	0.40	µl
primer T-C (10 pmol/µl)	0.40	µl
dNTP mix (10mM)	0.50	µl
10x PCR buffer	2.50	µl
MgCl2 (25 mM)	1.50	µl
Taq polymerase (5 U/µl)	0.10	µl
น้ำกลั่น	14.60	µl
ปริมาตรรวม	25.00	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปฏิกิริยา PCR ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง มีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้

รอบที่ 1	ใช้อุณหภูมิ		94 °C	4 นาที	
รอบที่ 2	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 2 รอบ
	Annealing	:	60 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 3	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 2 รอบ
	Annealing	:	58 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 4	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 20 รอบ
	Annealing	:	56°C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 5	ใช้อุณหภูมิ		72 °C	5 นาที	

3.6.6 สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.5 ถูกนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 (PCR I จำนวน 5 µl + น้ำกลั่น จำนวน 95 µl) และเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ สำหรับการคัดเลือกด้วย selective amplification (PCR II)

3.6.7 สารละลายดีเอ็นเอในข้อ 6 ถูกนำมาคัดเลือกในขั้นตอน selective amplification (PCR II) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเติมเบสจำนวน 2-3 นิวคลีโอไทด์ (primer E-ANN / primer T-CNN รายละเอียดดังตาราง 2) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังต่อนี้

สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6.6	2.50	µl
primer E-ANN (5 pmol/µl)	0.40	µl
primer T-ANN (5 pmol/µl)	0.40	µl
dNTP mix (10mM)	0.50	µl
10x PCR buffer	1.25	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0.72	µl
Taq polymerase (5 U/µl)	0.05	µl
น้ำกลั่น	6.68	µl
ปริมาตรรวม	12.50	µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม touch down

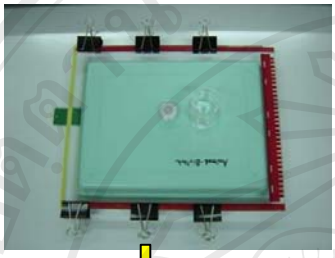
รอบที่ 1	ใช้อุณหภูมิ		94 °C	4 นาที	
รอบที่ 2	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 3 รอบ
	annealing	:	62 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 3	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 3 รอบ
	annealing	:	60 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 4	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 3 รอบ
	annealing	:	58 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 5	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 3 รอบ
	annealing	:	56 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 6	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 3 รอบ
	annealing	:	54 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 7	denaturation	:	94 °C	30 วินาที	จำนวน 20 รอบ
	annealing	:	52 °C	1 นาที	
	extension	:	72 °C	1 นาที	
รอบที่ 8	ใช้อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที				

3.6.8 สารละลายผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ได้ ถูกนำมาเติม loading dye จำนวน 6 µl และนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำ denaturing PCR products ที่ได้ไปแยกขนาด DNA fragments ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (6%) โดยใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 55 วัตต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.6.9 แผ่นเจล ถูกนำไปย้อมสีด้วยวิธี silver staining มีรายละเอียดดังนี้ (ภาพ 7) แช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิตริกที่ความเข้มข้น 10 % จำนวน 300 ml นาน 20 นาที และตามด้วยกรดไนตริก ความเข้มข้น 1 % จำนวน 300 ml นาน 20 นาที แล้วล้างด้วย deionized water จำนวน 3 ครั้ง ก่อนแช่ด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เข้มข้น 0.1 % จำนวน 300 ml ซึ่งถูกผสมด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ (37%) จำนวน 450 µl นานเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ล้างสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ด้วย deionized water จำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (3 % ที่มีสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ 260 µl) ที่เจือจางด้วย deionized water ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นแช่แผ่นเจลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจนกระทั่งแถบดีเอ็นเอปรากฏ หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิตริก (10%) และล้างแผ่นเจลด้วยน้ำ deionized water จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer



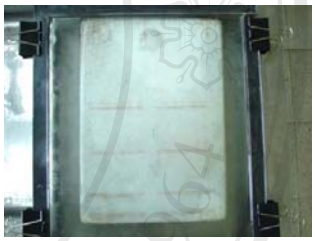
เตรียมเจล 6 % polyacrylamide

เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอ ด้วยกระแส ไฟฟ้า

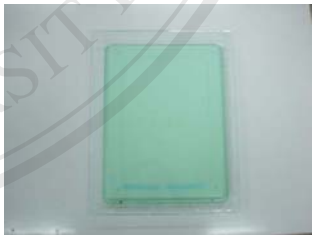
ทำให้สายดีเอ็นเอแยกจาก กันด้วยเครื่อง Thermal cycler

load ผลิตภัณฑ์ของ PCR products

อบเจลให้แห้ง ด้วยเครื่อง Gel Dryer



ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ภายหลังจากย้อมเจล



นำแผ่นเจลมาย้อม ด้วย silver staining

ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 55 W เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ภาพ 7 แสดงขั้นตอนการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเลคโตรโฟรีซิส และการย้อมเจลด้วย (silver staining)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แถบเครื่องหมายโมเลกุล AFLP จากแผ่นเจลถูกแปลงให้อยู่ในรูปข้อมูลตัวเลข โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แทนด้วย “1” และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในแถวเดียวกัน แทนด้วย “0” เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.7.1 การวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือความแตกต่างทางพันธุกรรม สามารถถูกวัดในรูปค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายกัน (similarity coefficients) ตามวิธีการอ้างโดย Duarte *et al*. (1999) และ Meyer *et al*. (2004) ดังสูตร

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

โดยที่ S_{ij} = ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสุกร i และ j
a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทั้งสองตัวอย่าง
b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในสุกร i แต่ไม่ปรากฏในสุกร j
c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในสุกร j แต่ไม่ปรากฏในสุกร i

3.7.2 ระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distances) ด้วยวิธีของ Jaccard coefficient ซึ่งใช้การประเมินค่าความคล้ายกันทางพันธุกรรม (genetic similarity estimates ; S_{ij}) โดยนำค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity coefficients) เปลี่ยนรูปเป็น ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distances) ดังสูตร

$$\text{Genetic distance } (D_{ij}) = 1 - S_{ij}$$

โดยที่ D_{ij} = ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสุกร i และ j
S_{ij} = ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างสุกร i และ j

3.7.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยนำค่า genetic distance matrix ไปสร้างแผนผังความสัมพันธ์ (Phylogenic dendrogram) ตามวิธี Unweighted Pair-Group mean arithmetic Method Analysis (UPGMA) ใช้โปรแกรม NTSYS 2.01d (Rolf, 1997) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต ในรูปของโครงสร้างต้นไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยใช้ข้อมูลในเชิงพันธุศาสตร์ เพื่อพิจารณาว่าสิ่งมีชีวิตมีความใกล้ชิดกันในทางสายวิวัฒนาการอย่างไร (มนต์ชัย, 2545)

3.8 สถานที่ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

3.8.1 ฟาร์มสุกร ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

3.8.2 งานเลี้ยงสัตว์ป่า ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

3.8.3 สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร

3.8.4 ฟาร์มสุกรป่า อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

3.8.5 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved