บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือด หรือเนื้อเยื่อ หรือน้ำเชื้อ จากสุกรทั้งหมด 363 ตัว ได้แก่ สุกรเพศผู้พันธุ์แท้ จำนวน 80 ตัว แบ่งเป็น สุกรพันธุ์ดูรอค 22 ตัว เพียเทรน 19 ตัว ลาร์จไวท์ 24 ตัว แลนด์เรซ 15 ตัว สุกรเพศเมียพันธุ์แท้ จำนวน 41 ตัว แบ่งเป็น สุกรพันธุ์ดูรอค 3 ตัว เพียเทรน 7 ตัว ลาร์จไวท์ 23 ตัว แลนด์เรซ 8 ตัว สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) สุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค) และสุกรลูกผสม 3 สาย (สายพันธุ์ทางการค้า) ที่เกิดในครอกเดียวกันทั้งหมด (Full sib) และครอกที่เกิดจากพ่อตัวเดียวกันแต่คนละแม่ (Half sib) จำนวน 204 ตัว โดยทั้งหมดเป็นสุกรสายพันธุ์ทางการค้าที่สำคัญจากฟาร์มสุกรขนาดต่างๆในจังหวัดเชียงใหม่และสุกรไทยพื้นเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ แม่ฮ่องสอนและเชียงใหม่ จำนวน 21 ตัว 6 ตัว และ 11 ตัวตามลำดับ

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) Autoclave (HL-341) (Hoxley, USA)
2) Centrifuge & Microcentrifuge (Hettich, Germany)
3) Compact ultrapure water system (EASYpure, USA)
4) Deep freezer (-20°C) (Sanyo, Thailand)
5) Digital Balance 0.01-3100 g (PB-3002-s) (Mettler-Toledo, Switzerland)
6) Electrophoresis system & Power supply (EPS-301) (Amersham Biosciences, USA)
7) Flat Bed Electrophoresis (Amersham Biosciences, USA)
8) Gel documentation system (Thermo Hybaid, UK)
9) Incubator (Memmert, Germany)
10) Magnetic mixer (ME-20) (Aris, Thailand)
11) Microcentrifuge tube 1.5 ml (Eppendorf, Germany)
12) Micropipette 10, 100 µl (Eppendorf, Germany)
13) Micropipette 1,000 µl (Gilson, France)
14) Micropipette tip (Eppendorf, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15) Microwave (Electrolux, Thailand)
16) Minolta Chroma Meter (CR-300) (Minolta Camera, Japan)
17) pH-Meter (WTW 330) (Knick, Germany)
18) Power supply (SZ-Series) (Syndrome, Thailand)
19) Shaking incubator (OM11) (Ratek, Germany)
20) Spectrophotometer UV-Visible light (UV-1601) (Shimadzu, Japan)
21) Syringe (NIPRO, Thailand)
22) Thermal Cycle (PTC -200-96) (MJ Research, USA)
23) UV-Transillumination System (ULTRA-LUM, USA)
24) Vortex Mixer (Genie-II, G560E) (Scientific Industries, USA)

3.3 สารเคมี

1) Absolute ethyl alcohol (Merck, USA)
2) Agarose powder (USB, USA)
3) Boric acid (USB, USA)
4) Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (Amersham Biosciences, UK and Fermentas, USA)
5) DNA ladder (Fermentas, USA)
6) Ethylenediamine-tetraacetic acid (BDH Chemicals Ltd, England)
7) Ethidium bromide (Roth, Germany)
8) Isopropanol (Sigma, USA)
9) Loading dye (Fermentas, USA)
10) Magnesium chloride (Qiagen, Germany)
11) PCR buffer (Qiagen, Germany)
12) Primers (1st BASE, Singapore)
13) Proteinase K (Roth, Germany)
14) Restriction enzyme *Hin* 6I (Fermentas, USA)
15) Sodium acetate (Sigma, USA)
16) Sodium chloride (Merck, Germany)
17) Sodium dodecyl sulphate (BDH Chemicals Ltd, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18) *Taq* DNA Polymerase (Amersham Biosciences, UK)

19) Tris (Scharlau, Spain)

3.4 สารละลาย

สารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เตรียมจากน้ำกลั่น Deionized & Demineralised (ddH_2O หรือ Millipore water) และการปรับ pH ทำโดยใช้ NaOH (conc.) กับ HCl (conc.) (รายละเอียดการเตรียมสารแสดงในภาคผนวก)

1) Digestion buffer
2) 0.5 M Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) pH 0.8
3) Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4
4) 3 M Sodium acetate pH 5.2
5) 6 M Sodium chloride
6) 9% Sodium chloride
7) 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)
8) 1X TBE buffer
9) 10X TBE buffer
10) TE buffer
11) 1 M Tris pH 8.0

3.5 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต่างๆของสุกรสายพันธุ์ทางการค้าจากฟาร์มที่มีการเลี้ยงสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่โดยใช้เลือด ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบหูและกล้ามเนื้อ) หรือน้ำเชื้อ สุกรไทยพื้นเมืองเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใบหูในเขตจังหวัดอุตรดิตถ์ แม่ฮ่องสอน และเชียงใหม่ วิธีการเก็บตัวอย่างของสุกรดังนี้ (Miller *et al*., 1988; รังสรรค์, 2549)

1) การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดจะให้ดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สุดทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ แต่การเก็บตัวอย่างจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ สารเคมีและคนช่วยจำนวนมาก ซึ่งทำได้โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1.2×40 มิลลิเมตร และหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร เจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณลำคอตัวละ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี 0.5 M Ethylenediamine-tetraacetic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

acid (EDTA) จำนวน 500 ไมโครลิตร และตัวอย่างควรแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ถึง -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ

2) การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนใบหู

การเก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนใบหู เหมาะสำหรับสัตว์ที่ไม่สามารถเจาะเลือดได้ หรือทำการเจาะได้ยาก เช่น สัตว์เล็ก หรือสัตว์พื้นเมือง หรือในกรณีที่ไม่มีอุปกรณ์ที่ใช้ในการเจาะเลือด นอกจากนี้ยังเหมาะสำหรับการใช้ประโยชน์จากชิ้นส่วนของสัตว์ที่มีการนำออกมาเป็นปกติอยู่แล้ว เช่น การตัดเบอร์หู การตัดหางหรือการตอน เป็นต้น การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อทำโดยตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ เช่น ใบหูตัดขนาดประมาณ 1-2 ตารางเซนติเมตร ล้างด้วย Absolute ethyl alcohol เก็บในถุงเก็บตัวอย่างที่ปิดสนิท ระหว่างขนย้ายควรแช่ในน้ำแข็งและเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ

3) การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ เหมาะสำหรับสัตว์ที่เป็นพ่อพันธุ์ ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ในขณะที่มีการรีดน้ำเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ในระหว่างขนย้ายควรแช่ในน้ำแข็งและเก็บตัวอย่างเป็นเวลานานควรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ

3.6 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด (สกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว) เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนใบหู (สกัดจากเซลล์ผิวหนังและเซลล์กระดูกอ่อน) และน้ำเชื้อ ด้วยวิธี Salting out โดยดัดแปลงจาก Miller *et al.* (1988) และ Sambrook *et al.* (1989) รายละเอียดของการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละวิธีมีดังต่อไปนี้

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดสุกร

1) นำเลือดทั้งหมดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 วัน) ไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ได้ส่วนที่เป็นชั้นบางๆ สีขาวของเม็ดเลือดขาวซึ่งอยู่บนผิวของชั้นเม็ดเลือดแดง ดูดส่วนนี้ไปใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2) เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex ประมาณ 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) เติมสารละลาย NaCl (9%) จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป เหลือส่วนที่เป็นตะกอนดีเอ็นเอ (Pellet) ไว้ ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2) และ 3) จนกว่า Pellet ที่ได้จะขาว
4) เติมสารละลาย PBS จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่า Pellet ที่ได้ให้กระจาย (สามารถเก็บไว้ในสารละลาย PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการย่อย) ก่อนจะนำไปย่อยให้ปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง
5) เติม Digestion buffer จำนวน 800 ไมโครลิตร เขย่า Pellet ให้กระจายด้วย Vortex เติมสารละลาย Proteinase K (20 mg/ml) จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วย Vortex ให้เข้ากัน เติมสารละลาย 10 % SDS จำนวน 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆแบบกลับไปมาด้วยมือ
6) นำเข้าเครื่อง Shaking incubator ที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน
7) นำออกจากเครื่องตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ค่อยๆหยดสารละลาย NaCl (6M) จำนวน 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
8) ใช้ Pipette ดูดเฉพาะสารละลายเหนียวใสด้านบน (Supernatant) ประมาณ 500 ไมโครลิตร ไปใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่
9) เติมสารละลาย Na-acetate (3M) pH 5.2 ในอัตราส่วน 1:10 (Na-acetate:DNA)
10) เติมสารละลาย Isopropanol ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าเบาๆแบบกลับไปมาด้วยมือ จะเห็นเส้นใยสีขาวของดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง
11) ล้างปั่นตะกอนด้วยสารละลาย 80% Ethanol แช่เย็นจัด จำนวน 1 มิลลิลิตร ประมาณ 2 รอบ (12,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส, 5 นาที) เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอ (Pellet) ให้แห้งบนกระดาษทิชชู (ประมาณ 15-30 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง
12) เติมสารละลาย TE buffer 50-100 ไมโครลิตร ตามปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้แล้วเขย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (ควรเขย่าด้วยมือ ไม่ควร Vortex เป็นเวลานาน) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน หากต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานควรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนใบหูสุกร

1) นำตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ เช่น ใบหูขนาดประมาณ 1-2 ตารางเซนติเมตร ล้างด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 % จากนั้นนำมาล้างแอลกอฮอล์ออกด้วยสารละลาย PBS
2) นำตัวอย่างใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Digestion buffer จำนวน 800 ไมโครลิตร เขย่าด้วย Vortex เติมสารละลาย Proteinase K (20 mg/ml) จำนวน 20 ไมโครลิตร เขย่าด้วย Vortex เติมสารละลาย 10 % SDS จำนวน 80 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆแบบกลับไปมาด้วยมือ
3) นำเข้าเครื่อง Shaking incubator ที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน
4) นำออกจากเครื่องตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ค่อยๆหยดสารละลาย NaCl (6M) จำนวน 500 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
5) ใช้ Pipette ดูดเฉพาะสารละลายเหนียวใสด้านบนไปใส่ใน Microcentrifuge tube อันใหม่
6) เติมสารละลาย Na-acetate (3M) pH 5.2 ในอัตราส่วน 1:10 (Na-acetate:DNA)
7) เติมสารละลาย Isopropanol ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าเบาๆแบบกลับไปมาด้วยมือ จะเห็นเส้นใยสีขาวของดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง
8) ล้างปั่นตะกอนด้วยสารละลาย 80% Ethanol แช่เย็นจัด จำนวน 1 มิลลิลิตร ประมาณ 2 รอบ (12,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส, 5 นาที) เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งบนกระดาษทิชชู (ประมาณ 15-30 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง
9) เติมสารละลาย TE buffer 50-100 ไมโครลิตร ตามปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้แล้วเขย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (ควรเขย่าด้วยมือ ไม่ควร Vortex เป็นเวลานาน) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน หากต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานควรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเชื้อสุกร

1) ล้างดีเอ็นเอในน้ำเชื้อโดยใช้ 1X TE buffer จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2-3 ครั้ง ในการทำซ้ำแต่ละครั้งจะต้องเทส่วนใสด้านบนทิ้ง
2) นำโกร่งไปแช่เย็นในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาใส่ในถังที่มีไนโตรเจนเหลวบรรจุอยู่ นำตะกอนสีขาวที่ได้หลังจากการล้างปั่นน้ำเชื้อด้วย 1X TE buffer มาบดในโกร่งจนละเอียด

3) นำตะกอนที่บดละเอียดแล้วมาใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Digestion buffer จำนวน 800 ไมโครลิตร เขย่าด้วย Vortex จนตะกอนกระจาย เติมสารละลาย Proteinase K (20 mg/ml) จำนวน 10 ไมโครลิตร เขย่าด้วย Vortex เติมสารละลาย 10% SDS จำนวน 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆแบบกลับไปมาด้วยมือ
4) นำเข้าเครื่อง Shaking incubator ที่ความเร็ว 100 rpm อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน
5) นำออกจากเครื่องตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ค่อยๆหยดสารละลาย NaCl (6M) จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
6) ใช้ Pipette ดูดเฉพาะสารละลายเหนียวใสด้านบน (Supernatant) ไปใส่ใน Microcentrifuge tube อันใหม่
7) เติมสารละลาย Na-acetate (3M) pH 5.2 ในอัตราส่วน 1:10 (Na-acetate:DNA)
8) เติมสารละลาย Isopropanol ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าเบาๆแบบกลับไปมาด้วยมือ จะเห็นเส้นใยสีขาวของดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง
9) ล้างปั่นตะกอนด้วยสารละลาย 80% Ethanol แช่เย็นจัด จำนวน 1 มิลลิลิตร ประมาณ 2 รอบ (12,000 rpm, 4 องศาเซลเซียส, 5 นาที) เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งบนกระดาษทิชชู (ประมาณ 15-30 นาที) ที่อุณหภูมิห้อง
10) เติมสารละลาย TE buffer 50-100 ไมโครลิตร ตามปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้แล้วเขย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (ควรเขย่าด้วยมือ ไม่ควร Vortex เป็นเวลานาน) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน หากต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานควรเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7 การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย 1X TE buffer ในอัตราส่วน 1:100 (DNA 5 ไมโครลิตร : TE buffer 495 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; O.D.) ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอคำนวณได้จากสมการ ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = OD_{260} × 50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร × Dilution factor

โดย ค่า OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ของสารละลายดีเอ็นเอ

50 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ OD_{260} มีค่าเท่ากับ 1

Dilution factor คือ อัตราส่วนที่ใช้เจือจาง = 1:100

3.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุกรในส่วนของยีน *RYR1* โดยใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตาราง 9 และใช้สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ในการทำพีซีอาร์ โดยมีองค์ประกอบดังนี้

DNA (100 ng/µl)	1.0	µl
10X PCR buffer	2.5	µl
dNTP (10 mMeach)	1.0	µl
Forward primer (20 pmol/ µl)	1.0	µl
Reverse primer (20 pmol/ µl)	1.0	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2.0	µl
Taq DNA Polymerase (5U/ µl)	0.5	µl
ddH_2O	16.0	µl
ปริมาตรรวม	25.0	µl /reaction

ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเข้าจับของไพรเมอร์ (Annealing temperature; Tm) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *RYR1* โดยใช้ช่วงอุณหภูมิ 62-72°C ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะกระทำภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้

Initial denaturation	ที่ 94°C	เวลา 2 นาที	
Denaturation	ที่ 94°C	เวลา 30 วินาที	Amplication 30 รอบ
Annealing	ที่ 65.1°C	เวลา 30 วินาที	
Extension	ที่ 72°C	เวลา 30 วินาที	
Final extension	ที่ 72°C	เวลา 10 นาที	

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยวิธี 3% Agarose gel electrophoresis และอ่านผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และ Annealing temperature (Tm) ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

Primer Name	Primer Sequence (5′⟶3′)	Fragment (bp)	Tm (°C)
RYR1 for	GTT CCC TGT GTG TGT GCA ATG GTG	74	65.1
RYR1 rev	GCC AGG GAG CAA GTT CTC AGT AAT		

3.9 การตรวจสอบจุดกลายพันธุ์โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction fragment length polymorphism; RFLP)

1) ทำการตรวจสอบจุดกลายพันธุ์โดยใช้วิธี RFLP โดยการตัดด้วย restriction enzyme *Hin* 6I โดยมีปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

PCR product	20.0 µl
restriction enzyme *Hin* 6I	0.75 µl
10X buffer	2.0 µl
ddH_2O	7.25 µl
ปริมาตรรวม	30.0 µl/reaction

2) นำไป Incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง)
3) ตรวจสอบจีโนไทป์ที่ตัดได้ใน 3% Agarose gel electrophoresis

3.10 การแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis

1) เตรียม 3% อะกาโรสเจล โดยชั่งผงอะกาโรส 1 g เติม 1X TBE buffer 100 ml แล้วทำให้ละลายโดยเครื่องไมโครเวฟ (Microwave)
2) ใส่เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) 7 µl/100 ml ของเจล ตั้งทิ้งไว้ให้อุ่นแล้วเทใส่ชุดอิเล็คโตรโฟรีซีส รอจนเจลแข็งตัวจึงดึงหวีออก
3) นำแผ่นเจลที่ได้ไปใส่ใน Buffer tank ของชุดอิเล็คโตรโฟรีซีสที่มี 1X TBE buffer บรรจุอยู่ท่วมแผ่นเจล
4) ทำการผสมดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์กับ Loading dye แล้วดูดตัวอย่างที่ได้ไปใส่ในแต่ละช่องของแผ่นเจลจนครบ โดยใช้ 50 bp Ladder เป็น Marker
5) ปิดฝาและเปิดเครื่องที่ 60 V โดยระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมงที่ให้ชิ้นส่วน DNA แยกจากกันอย่างชัดเจน นำแผ่นเจลไปตรวจสอบความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.11 การวิเคราะห์คุณภาพเนื้อในสุกรลูกผสม

ทำการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อในสุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค) จำนวน 100 ตัว โดยเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) บริเวณตั้งแต่ซี่โครงซี่ที่ 6-14 เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ ประกอบด้วย

1) ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของกล้ามเนื้อ (pH value)

วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างจากกล้ามเนื้อสันนอกและกล้ามเนื้อสะโพก จากซากสุกรหลังฆ่าที่เวลา 45 นาที (pH_1) และ 24 ชั่วโมง (pH_u) ด้วยเครื่อง pH meter (WTW pH 330, Germany) ทำการบันทึกค่าที่ตรวจวัดได้

ภาพ 2 การวัดค่า pH ที่กล้ามเนื้อสันนอก (ซ้าย) และกล้ามเนื้อสะโพก (ขวา)

2) ค่าสีของเนื้อ (meat color)

นำกล้ามเนื้อสันนอกจากซี่โครงซี่ที่ 6 ใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะเปิดเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter (CR-300, Japan) บันทึกค่าความสว่างของสี (lightness, L*) ค่าสีแดง (redness, a*) และค่าสีเหลือง (yellowness, b*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3 การวัดสีของเนื้อด้วยเครื่อง Minolta Chroma Meter

3) ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity; WHC)

ในด้านของค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) (Honikel, 1987; อ้างโดย สัญชัย, 2551) นำกล้ามเนื้อสันนอกมาตัดให้มีความหนาประมาณ 1 นิ้ว ทำการชั่งน้ำหนัก (W_1) ห่อตัวอย่างด้วยผ้าก๊อซเก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็นให้ชิ้นเนื้อลอยเหนือก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นในลักษณะแขวนที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อออกจากถุงมาชั่งน้ำหนัก (W_2) แล้วหาค่าการสูญเสียน้ำจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำ (\% drip loss)} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_1}$$

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทดสอบความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์ของยีน *RYR1* ในสุกรพันธุ์ดูรอค เพียเทรน ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ ลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) ลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค และสายพันธุ์ทางการค้า) และสุกรไทยพื้นเมือง ด้วยวิธีไคสแควร์ และทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลด้วยวิธี Z-test และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านคุณภาพเนื้อด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ในโปรแกรมสำเร็จรูป SAS for windows version 8.2 (SAS, 2001)

วิเคราะห์คุณภาพเนื้อ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรดด่าง (pH value) ค่าสีของเนื้อ (L*, a* และ b*) และค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) เนื่องจากอิทธิพลของจีโนไทป์ (CC, CT และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TT) ด้วยวิธี GLM (General Linear Model) ในโปรแกรม SPSS for windows version 15 (กัลยา, 2542) จากหุ่นสถิติ

$$y_{ij} = \mu + \text{Genotype}_i + \text{Error}_{ij}$$

เมื่อ y_{ij} คือ ลักษณะคุณภาพเนื้อ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรดด่าง (pH value) ค่าสีของเนื้อ (L*, a* และ b*) และค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss)

μ คือ ค่าเฉลี่ย

Genotype_i คือ จีโนไทป์ CC, CT และ TT

e_{ij} คือ ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง

3.13 สถานที่ทำการวิจัย

- จงเจริญฟาร์ม อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
- ทุ่งหลวงฟาร์ม อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
- ผาแดงฟาร์ม อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
- ฟาร์มสุกร ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ฟาร์มสุกรทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- โรงงานแปรรูปสุกรแม่โจ้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้และเครือเบทาโกร
- ห้องปฏิบัติการ GMO certificate Lab สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.14 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ประมาณ 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved