บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

ไก่ไทยพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 4 พันธุ์ ประดู่หางดำ (ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่) ประกอบด้วยไก่เพศผู้ และไก่เพศเมีย เพศละ 50 ตัว รวมจำนวน 100 ตัว ไก่เหลืองหางขาว (ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี) ไก่แดง (ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานี อำเภอพูนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี) และไก่ชี (ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น) พันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง โดยแต่ละพันธุ์ประกอบด้วยไก่เพศผู้ และไก่เพศเมีย จำนวนกลุ่มละ 5 ตัว รวมเป็นจำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

ไก่ทุกตัวถูกเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่ปีก (wing vein) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.5 M EDTA จำนวน 100 µl เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไก่ทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในการจำแนกเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมในไก่ประดู่หางดำ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

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

Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

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

Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)

Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

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

dNTPs (Fermentas, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

EDTA (Fisher Scientific,USA)

Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)

Formaldehyde 37% (Merck, Germany)

Glycerol (Merck, Germany)

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

LB-Broth (US Biological, USA)

Magnesium chloride (Merck, Germany)

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

Primers (Bio Basic Inc, Canada)

Silver nitrate (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

Loading buffer

Phosphate-buffered saline (PBS)

Polyacrylamide gel (6%)

TAE buffer

TBE buffer

Digestion buffer

TE buffer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 เอนไซม์

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

Taq DNA polymerase (Fermentas, USA)

*Eco*RI (Fermentas, USA)

*Taq*I (Fermentas, USA)

*Msp*I (Fermentas, USA)

*Bsu*RI (Fermentas, USA)

*Hsp*92II (Fermentas, USA)

*Rsa*I (Fermentas, USA)

*Mbo*I (Fermentas, USA)

*Hin*6I (Fermentas, USA)

*Alu*I (Fermentas, 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)

3.2.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

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) Gel documentation, Model Gene Genius & Gene Tools, USA

6) Gel dryer, Model GD 2000, Amersham Bioscience, USA

7) Hot Air Oven, Model ULE 400, Memmert, Germany

8) PCR thermocycler, PTC-100TM, MJ Research, USA

9) Spectrophotometer, UV-VIS Biowave S2100, Germany

10) Thermo Shaker, Model DKSI001a, Daiki, Korea

11) pH meter, Model CG 842, Inc., USA

12) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R, Hettich, Germany

13) Pipette, 20, 200, 1000 µl, Gilson, France

14) PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

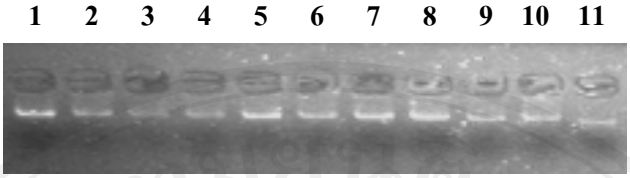
3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัด DNA

ตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ไก่แดง ไก่ชี จำนวนพันธุ์ละ 10 ตัว และไก่ประดู่หางดำจำนวน 100 ตัวถูกสกัด DNA โดยมีรายละเอียด ดังนี้

1. นำเลือดไก่จำนวน 20 µl เติมน้ำกลั่นจำนวน 1,000 µl และสารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 9% จำนวน 100 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำจนได้ตะกอนสีขาว
2. เติม PBS จำนวน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 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 นำไปเขย่า ด้วยเครื่อง 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 DNA
9. เทสารละลายใสทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอน DNA แล้วเติมเอธานอลที่มีความเข้มข้น 80% จำนวน 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที
10. เทเอธานอลทิ้ง แล้วตากตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ 37°C จนแห้ง
11. ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer (1X) จำนวน 20 µl เก็บที่อุณหภูมิ 4°C
12. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA บน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.2% และส่องภายใต้แสง ultraviolet (ภาพ 2) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 ผลการตรวจคุณภาพ DNA ที่สกัดได้บน Agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2%

3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของ DNA

นำสารละลาย DNA ที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer (1X) ในอัตราส่วน 1:100 (DNA 5 µl: TE buffer (1X) 495 µl) และนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลาย DNA คำนวณได้จากสูตร ดังต่อไปนี้

ความเข้มข้นของ DNA = ค่า OD260 × 50 µg/ml × dilution factor

โดย ค่า OD260 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm ของสารละลาย DNA
50 µg/ml คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลาย DNA ที่ OD260 มีค่าเท่ากับ 1 dilution
factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

สำหรับการประเมินคุณภาพของสารละลาย DNA สามารถคำนวณได้จาก อัตราส่วนระหว่างค่า OD260 และ OD280 โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ จะต้องมีค่าประมาณ 1.8

3.4 วิธีการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของไก่ประดู่หางดำ

3.4.1 ขั้นตอนเทคนิค AFLP (ดัดแปลงตามวิธีของ Hara *et al*., 2010**)**

1. นำตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่แต่ละสายพันธุ์รวมเข้าด้วยกัน (pooled) ประกอบด้วยไก่จำนวน 4 สายพันธุ์ แต่ละพันธุ์มีจำนวน 2 pooled โดย pooled แรกเป็นไก่เพศผู้จำนวน 5 ตัว และ pooled ที่สองเป็นไก่เพศเมียจำนวน 5 ตัว รวมทั้งหมด 8 pooled หลังจากนั้นจะถูกนำวิเคราะห์หาเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค AFLP
2. Digestion สารละลายดีเอ็นเอ (Pooled DNA) จำนวน 100 ng/µl ถูกตัดด้วย restriction enzymes *Taq* I (Fast Digest) และ*EcoR* I (Fast Digest) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที และ 65°C นาน 5 นาที โดยมีส่วนผสมของปฏิกริยาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Pooled DNATemplate 1.5 ng(100/ µl)	15.00	µl
Master mix	15.00	µl
10x Fast digest buffer	3.00	µl
dH_2O	9.00	µl
Taq I (Fast Digest)	1.50	µl
EcoR I (Fast Digest)	1.50	µl
ปริมาณรวม	**30.00**	**µl**

3. Adaptor ligation สารประกอบดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วย restriction enzymes *Taq* I (Fast Digest) และ *EcoR* I (Fast Digest) ถูกนำมาเชื่อมต่อด้วย *Taq*I Adaptor (5'-GACGATGAGTCCTGAC-3', 5'-CGGTCAGGACTCAT-3') และ *EcoR*I Adaptor (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-AATTGG TACGCAGTCTAC-3') โดยใช้เอนไซม์ ligase ที่อุณภูมิ 20 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและอุณหภูมิ 4°C ข้ามคืนซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกริยาดังต่อไปนี้

ดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดย restriction enzymes	30.00	µl
Master Mix	15.00	µl
Taq I Adaptor (50 µM)	3.00	µl
EcoR I Adaptor (10 µM)	6.00	µl
10x Fast digest buffer	1.50	µl
T4 ligaste (3 unit/ µl)	1.00	µl
ATP (100 mM)	0.23	µl
dH_2O	3.27	µl
ปริมาณรวม	**45.00**	**µl**

4. Internal Digestion สารประกอบดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อด้วย *Taq* I Adaptor และ *EcoR* I Adaptor จะถูกแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ 1) ไม่เติมเอนไซม์ (original) 2) เติมเอนไซม์ *Msp* I 3) เติมเอนไซม์ *BsuR* I โดยใช้อุณหภูมิที่ 37°C 5 นาทีซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกริยาดังนี้ต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Original	15.00	µl
Msp I	15.00	µl
BsuR I	15.00	µl
Master Mix	5.00	µl
10x Fast Digest buffer	2.00	µl
dH_2O	2.00	µl
Msp I , *BsuR* I	1.00	µl
ปริมาณรวมแต่ละส่วน	**20.00**	**µl**

5. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5 (ดีเอ็นเอ10.00 µl:น้ำกลั่น 40.00 µl) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)
6. สารละลายที่ได้ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองและถูกคัดเลือกขั้นต้น (pre-selective amplification) โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกนิวคลีโอไทด์เพิ่มจากไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก *Taq* I และ *EcoR* I จำนวน 1 ตำแหน่งเรียกไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกนิวคลีโอไทด์เพิ่มจากไพร์เมอร์นี้ว่า primer T+C และ primer E+A ตามลำดับโดยมีรายละเอียดดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอที่ถูกเจือจาง 1:5	5.00	µl
Pre-selective master mix	20.00	µl
dH_2O	14.60	µl
10x PCR buffer	2.50	µl
$MgCL_2$ (25mM)	1.50	µl
dNTP mix(10mM)	0.50	µl
Primer E+A (10 pmol/ µl)	0.40	µl
Primer T+C (10 pmol/ µl)	0.40	µl
Taq polymerase	0.10	µl
ปริมาณรวม	**25.00**	**µl**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ Touch down PCR ในเครื่อง Thermal Cycle โดยใช้โปรแกรม Pre-selamp ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รอบที่ 1	Denatured DNA	94°C	4	นาที
รอบที่ 2-3	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	60°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 4-5	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	58°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 6-25	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	56°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 26	Extension DNA	72°C	5	นาที
	Stored DNA	4°C		

ตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis และทดสอบศักยภาพของ pre-selective amplification แต่ละคู่ไพรเมอร์ ด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผลผลิตที่ได้จาก pre-selective amplification ด้วยปฏิกิริยา PCR จะถูกแยกด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ที่กำลังไฟฟ้าคงที่ 55 วัตต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

7. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 20 (PCR product 10 µl : น้ำกลั่น 190 µl) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR
8. สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR และถูกคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งเรียกว่า selective amplification โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกนิวคลีโอไทด์เพิ่มจากไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบจาก *Taq* I และ *EcoR* I เพิ่มขึ้น 2 ตำแหน่ง เรียกไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกนิวคลีโอไทด์เพิ่มจากไพรเมอร์นี้ว่า primer T+CNN และ primer E+ANN โดยละเอียดปฏิกิริยาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. สารละลายดีเอ็นเอที่ถูกเจือจาง 1:20	2.50	µl
2. Selective master mix	10.00	µl
Primer T+CNN (5 pmol/ µl)	0.40	µl
primer E+ANN (5 pmol/ µl)	0.40	µl
dNTP mix (10 mM)	0.50	µl
10xPCR buffer	1.25	µl
$MgCL_2$ (50 mM)	0.72	µl
dH_2O	6.68	µl
Taq polymerase (5 Units/ µl)	0.05	µl
ปริมาณรวม	**12.50**	**µl**

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีโปรแกรมควบคุมอุณภูมิ (touch down PCR)ในเครื่อง PCR Thermal Cycle โดยใช้โปรแกรม SELAMP ดังนี้

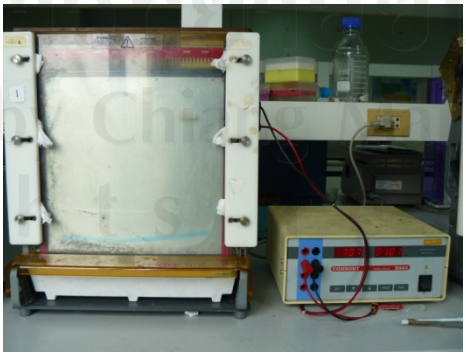
รอบที่ 1	Denatured DNA	94°C	4	นาที
รอบที่ 2-4	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	62°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 5-7	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	60°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 8-10	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	58°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 11-13	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	56°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 14-16	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	54°C	1	นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 17-36	Denaturizing DNA	94°C	30	วินาที
	Annealing DNA	52°C	1	นาที
	Extension DNA	72°C	1	นาที
รอบที่ 37	Extension DNA	72°C	5	นาที
	Stored DNA	4°C		

9. สารละลายผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่ได้ถูกนำมาเติม loading dye จำนวน 6 µl และนำไปเสียสภาพ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้ PCR Thermal cycle, Program : DENATUR แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันทีและแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 55 W เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ภาพ 3)

10. แผ่น denaturing polyacrylamide gel ถูกนำไปย้อมด้วยวิธี silver staining โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ แช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิตริกที่ความเข้มข้น 10% จำนวน 300 ml นาน 20 นาที และตามด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 1% จำนวน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จำนวน 3 ครั้ง ก่อนแช่ด้วยซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 0.1% จำนวน 300 ml ซึ่งถูกผสมด้วย ฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 450 µl เป็นเวลา 30 นาทีหลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง และล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 3% ซึ่งมีส่วนผสมของ ฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 450 µl ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้งๆละ 100 ml หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 3% ที่มีส่วนผสมฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 450 µl ปริมาตร 300 มล. จนกระทั่งปรากฏแถบแบนดีเอ็นเอ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิตริกเข้มข้น 10% และล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer (ภาพ 4)



ภาพ 3 การตรวจสอบรูปแบบ AFLP ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis กำลังไฟฟ้าคงที่ 55 W นาน 3 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 4 การย้อมแถบ DNA ด้วยวิธี silver stained

3.4.2 การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลจาก AFLP สำหรับบ่งชี้ลักษณะของไก่ประดู่หางดำ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบความผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสอง หากไม่พบความผันแปรทางพันธุกรรมบนแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย จะเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่น (*Msp*I, *BsuR*I, *Hsp92*II, *Hin6*I, *Mbo*I) เพื่อหาจุดกลายพันธุ์ (single nucleotide polymorphism; SNP) ที่อยู่ภายในแถบดีเอ็นเอดังกล่าว โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังตาราง 1 ที่มีศักยภาพต่อการบ่งชี้ลักษณะไก่ประดู่หางดำ เหลืองหางขาว แดง และชี

Template DNA (100 ng/ µl)	1.00 µl
1X PCR buffer	2.00 µl
forward primer (10 pmol/ µl)	0.40 µl
reverse primer (10 pmol/ µl)	0.40 µl
dNTP (200 mM)	0.50 µl
MgCl2 (1.5 mM)	1.20 µl
Taq DNA polymerase (Fermentas 0.5U/ µl)	0.10 µl
dH2O	14.40 µl
ปริมาตรรวม	**20.00 µl**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รอบที่ 1	Denaturation:	94°C	3 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation:	94°C	30 วินาที	
	Annealing:	60-62° C	30 วินาที	40 รอบ
	Extension:	72°C	30-60 วินาที	
รอบที่ 3	Final extension:	72°C	5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิต PCR ปริมาตร 5 µl บน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1 % ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TAE และส่องภายใต้แสง ultraviolet

ตาราง 1 ไพรเมอร์สำหรับคัดกรองเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่บ่งชี้ลักษณะไก่ประดู่หางดำ

Primer	Sequence (5′ to 3′)	Primer	Sequence (5′ to 3′)
E1	GACTGCGTACCAATTCACC	T1	GATGAGTCCTGACCGACAC
E2	GACTGCGTACCAATTCACG	T2	GATGAGTCCTGACCGACAG
E3	GACTGCGTACCAATTCAGC	T3	GATGAGTCCTGACCGACAT
E4	GACTGCGTACCAATTCAGG	T4	GATGAGTCCTGACCGACCA
E5	GACTGCGTACCAATTCATC	T5	GATGAGTCCTGACCGACGA
E6	GACTGCGTACCAATTCATG	T6	GATGAGTCCTGACCGACTG
E7	GACTGCGTACCAATTCAAG	T7	GATGAGTCCTGACCGACGT
E8	GACTGCGTACCAATTCAAC	T8	GATGAGTCCTGACCGAGAC

3.4.3 การโคลน AFLP fragmemt

1. นำแถบ DNA ของ AFLP ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากข้อ 3.4.2 ถูกนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T easy vector (Promega) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. บ่มส่วนผสมในข้อ 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 และนำไปแช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที นำส่วนผสมดังกล่าวไปแช่ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 90 วินาที และนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที หลังจากนั้นเติม LB-broth จำนวน 650 µl และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37°C นาน 120 นาที นำส่วนผสมแบคทีเรียจำนวน 300 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 30 µl และ LB-broth จำนวน 700 µl (ที่มี ampicillin 10 mg/ml) โดยที่ส่วนผสมแบคทีเรียใน 1X PCR buffer ถูกนำไปต้มที่ 95°C นาน 15 นาที เพื่อใช้เป็น template สำหรับตรวจหาโคลนที่มีชิ้นส่วนของ AFLP fragmemt ที่เชื่อมต่อกับ vector ส่วนแบคทีเรียใน LB-broth ถูกนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่ -80°C โดยการเติม Glycerol:LB-broth (1:1) จำนวน 450 µl ซึ่งเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเซลล์ เพื่อรอนำไปสกัด plasmid DNA ต่อไป
5. ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนของ AFLP fragmemt ซึ่งถูกเชื่อมเข้ากับ vector ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13 (Forward: 5'-TTGTAAAACGACGGCCAGT-3' และ Reverse: 5'-CAGGAAACA GCTATGACC-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
MgCl2 (25 mM)	1.20	µl
Taq DNA polymerase (Fermentas 5U/ µl)	0.05	µl
dH_2O	6.45	µl
ปริมาตรรวม	**20.00**	**µl**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

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

6. ตรวจสอบผลผลิต PCR บน agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 1.2% ภายใต้แสง ultraviolet

3.4.4 การสกัด Plasmid DNA

โคลนแบคทีเรียที่มี recombinant vector ถูกนำไปเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากพอเพื่อใช้สำหรับสกัด 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. ตรวจสอบคุณภาพ DNA โดยใช้ spectrophotometer และ agarose gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.5 Sequence analysis

Plasmid DNA ที่ได้จากข้อ 3.4.4 ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automate sequencer โดยใช้ GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้

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	30 รอบ
	Annealing:	58° C	30 วินาที	
	Extension:	72°C	4 นาที	

ผลผลิต PCR ถูกนำไปตกตะกอนด้วยเอธานอล ก่อนนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 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 Na2-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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AFLP fragmemt ถูกนำไปเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาตำแหน่งของ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

3.4.6 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล DNA อย่างง่าย

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัดด้วย Restriction Enzyme ที่จำเพาะต่อ SNPs ของแต่ละ fragment เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเออย่างง่าย สำหรับใช้ตรวจสอบข้อมูลจีโนไทป์ของไก่ โดย SNP ที่มีเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ สามารถตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมได้นั้น ถูกออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ดังตาราง 2 ให้ครอบคลุม SNP ดังกล่าว สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR และตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ตาราง 2 ไพรเมอร์ โปรแกรม PCR และเอนไซม์ตัดจำเพาะสำหรับตรวจความผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ในไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ

เครื่องหมายโมเลกุล	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (F = forwards, R= reverse)	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	โปรแกรม PCR
AFLP01	F:5'-TGTATTTCCAACCTACTCTAC-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GCTGTACGTAAGGCTGCAG-3'		
AFLP02	F:5'-GCACCTGGAAGAATAGATAG-3'	*Eco*RI	94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GTCTTTCCTGGTATTCTTATG-3'		
AFLP03	F:5'-CAGGAACAGCATAGAATTAAAG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-CACCAGTGACCAAGGGCAAG-3'		
AFLP04	F:5'-AGCTGCTCTCTTCAGTCAG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-AGATTTCAAAGTGTCATGTGC-3'		
AFLP05	F:5'-TGCAATGCTTATCTAACCTGG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-CGTCTATCTGGAAATTGCTG-3'		
AFLP06	F:5'-CAGATGGATCACAGTAACCTG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GTGGAACTTGTAAGTACAGC-3'		
AFLP07	F:5'-GTTTCAGCAAGGCAGAGTTC-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GTGGAACTTGTAAGTACAGC-3'		
AFLP08	F:5'-TTTGTTTCAGCAAGGCAGAG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-GACCAAACAACGTCACGTTC-3'		
AFLP09	F:5'-AACCATGCAGCCAGAGAATG-3'	*Eco*RI	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-GCAGCCATTCATACATGGTC-3'		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 (ต่อ)

เครื่องหมายโมเลกุล	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ (F = forwards, R= reverse)	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	โปรแกรม PCR
AFLP10	F:5'-GCTCTGATCAAAGACATTCC-3'	*Alu*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×45 cycles
	R:5'-GATCATCTCGGCTACAGAG-3'		
AFLP11	F:5'-CTGCTGCGACCGAAATATC-3'	*Bsu*RI	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GATAGTTCCGAACAGTTTGC-3'		
AFLP12	F:5'-TGACCATGCTTTCTCCATAG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×45 cycles
	R:5'-TTTGGAAATCAATTTTCAGCTC-3'		
AFLP14	F:5'-GCTTCAGCAGGCAGATTTC-3'	*Bsu*RI	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-CTTTACGTGGCCCACCTTC-3'		
AFLP15	F:5'-AAACTCTTTTCCCTTGGCTG-3'	*Eco*RI	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-GTGCAAGACGGACTGTATTG-3'		
AFLP16	F:5'-ACTCGCAGGAGACTTCTTAG-3'	*Eco*RI	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GCAGTCCTGTGACTTaTTTG-3'		
AFLP17	F:5'-GAAATCGTTGCCAAAAGTTGC-3'	*Msp*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-GTTCACGCAGCTCGGATG-3'		
AFLP18	F:5'-GGTTTGATTTCTGGGATCTC-3'	*Eco*RI	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-GCCTTAGGTAACATTCCTTC-3'		
AFLP19	F:5'-CCTCCTACTGATTCTGTAATG-3'	*Hin*6I	94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 30s)×35 cycles
	R:5'-TTTTCTGCTCATCTGTACTGG-3'		
AFLP20	F:5'-AGGATCACAAATAACCAACGA-3'	*Mbo*l	94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s)×38 cycles
	R:5'-GACTACAGTGAGAAGCTCTG-3'		
AFLP21	F:5'-GTCTGCACACCTGGTGTC-3'	*Msp*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×38 cycles
	R:5'-CAGGTTCACACGGAGATC-3'		
AFLP22	F:5'-GGAGGTTCGTGAGAAGCTG-3'	*Hsp*92II	94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-TGTACAACAGCAGCAAGCAAA-3'		
AFLP23	F:5'-CTTTCTCCTTCTCCCCAAGT-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-CTTGGATAGGGTCTGCAGA		
AFLP24	F:5'-GCAGTGCACCTGGATTTTAG-3'	*Taq*I	94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-ATTATCCCTTCCCTCAGCTG-3'		
AFLP25	F:5'-CTGCTAGCAGGTAATGAGAT-3'	*Taq*I	94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-TGGCAGAAAGATTCCGTCAA		
AFLP26	F:5'-TCTCTGCTAGTGTGTGTGGA-3'	*Eco*RI	94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-CACCAGGACTGAAGAACAGA-3'		
AFLP27	F:5'-CTGAGAATAGCCAGGACACA-3'	*Taq*I	94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s)×40 cycles
	R:5'-GTGTTGGGAATTTAGGAAAC-3'		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. ความถี่จีโนไทป์ ถูกคำนวณตามสูตรดังนี้

$f(AA) = AA / N$

$f(Aa) = Aa / N$

$f(aa) = aa / N$

เมื่อ f(AA), f(Aa) และ f(aa) คือ ความถี่จีโนไทป์แบบ homozygous AA, heterozygous Aa และ homozygous aa

AA, Aa และ aa คือ จำนวนไก่ที่มีจีโนไทป์แบบ AA, Aa และ aa

N คือ จำนวนไก่ทั้งหมด

2. ความถี่อัลลีล ถูกคำนวณตามสูตรดังนี้

$f(A) = [2(AA)+AB]/2N$

เมื่อ f(A) คือ ความถี่อัลลีล A โดยที่ AA และ AB คือ จำนวนไก่ที่มีจีโนไทป์แบบ AA และ AB ตามลำดับ และ N คือ จำนวนไก่ทั้งหมด

3. ค่าสมดุล Hardy-Weinberg

$p^2+2pq+q^2 = 1$

เมื่อ p , pq และ q คือ ความถี่จีโนไทป์แบบ AA, Aa และ aa

4. ค่า Polymorphism information content, PIC

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} P_i^2 - \left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2P_i^2 P_j^2 \right]$$

เมื่อ P_i และ P_j คือ ความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ

n คือ จำนวนอัลลีล

5. ค่า probability of identity, PI

$$PI = \prod_{i=1}^{n} (P_{AA}^2 + P_{Aa}^2 + P_{aa}^2)$$

เมื่อ P_{AA}, P_{Aa} และ P_{aa} คือ ความถี่ของจีโนไทป์ AA, Aa และ aa

n คือ จำนวนเครื่องหมายโมเลกุล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved