บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

แม่สุกรระดับ Grand Parents พันธุ์ Large white จำนวน 202 ตัว และ Landrace จำนวน 299 ตัว และระดับ Parent Stocks พันธุ์ลูกผสม Large white x Landrace จำนวน 2,665 ตัว รวมทั้งหมด 3,166 ตัวโดยสุกรจำนวนดังกล่าวถูกเก็บตัวอย่างจากฟาร์มของ บริษัทเบทาโกรภาคเหนือเกษตรอุตสาหกรรมจำกัด จังหวัดลำพูน

3.1.1 ข้อมูลลักษณะปรากฏ

ข้อมูลถูกบันทึกจากแม่สุกร ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์ ลำดับครอก วันเดือนปีที่คลอด จำนวนลูกแรกคลอดทั้งหมด (total number born, TNB) จำนวนลูกแรกคลอดที่มีชีวิต (number of birth alive, NBA) จำนวนลูกที่หย่านม (number of weaning, NWA) จำนวนมัมมี่ (number of mummified at birth, NMM)

3.1.2 การเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดถูกเก็บจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ปริมาณ 5 ml ใส่หลอดทดลองที่บรรจุ 0.5 M EDTA จำนวน 100 µl ปิดผนึกด้วย parafilm™

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 สารเคมี

- 10X PCR buffer, *Taq* polymerase (Fermentas, USA)
- Acetic acid (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
- Agar-Agar (O.V. chemical, Thailand)
- Agarose (Gibco/BRL, USA)
- Ammonium persulfate (USB corporation, USA)
- Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)
- Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
- Boric acid (Merck, Germany)
- dNTPs (Fermentas, USA)
- EDTA (Fisher Scientific,USA)
- Ethanol (Merck, Germany)
- Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)
- Formaldehyde 37% (Merck, Germany)
- Lambda DNA/AvaII (Fermentas, USA)
- Isopropanol (Merck, Germany)
- Magnesium chloride (Merck, Germany)
- Nitric acid (Merck, Germany)
- N,N-dimethylformamide (Bio Basic Inc, Canada)
- Phenol (Merck, Germany)
- Primers (Bio Basic Inc, Canada)
- Proteinase K (Invitrogen, USA)
- Silver nitrate (Merck, Germany)
- Sodium acetate (Merck, Germany)
- Sodium biocarbonate (Merck, Germany)
- Sodium chloride (Merck, Germany)
- Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- TEMED (USB corporation, USA)
- Tris (USB corporation, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 สารละลาย (รายละเอียดดังภาคผนวก)

0.5M EDTA pH 8.0

10X TBE buffer

10X TAE buffer

Digestion buffer

Phosphate-buffered saline (PBS)

TE buffer

3.2.3 เอนไซม์

*Sma*I (Fermentas, USA)

3.2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) Balances, Model AB204 (Mettler-Toledo, Switzerland)
2) Electrophoresis (for agarose gel) Gel-Mate 2000, Toyobo, Japan
3) Electrophoresis (vertical apparatus), Hoefer SQ3, Amersham pharmacia biotech, USA
4) Electrophoresis Power Supply, Model E833, Consort, Belgium
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) Magnetic Stirrer, Model HS115, HL Instrument, Thailand
12) Microcentrifuge tube 1.5 ml, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
13) PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
14) pH meter, Model CG 842, Inc., USA
15) Pipette, 0.2 µl, CappAero, Denmark
16) Pipette, 20, 200, 1000 µl, Gilson, France

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

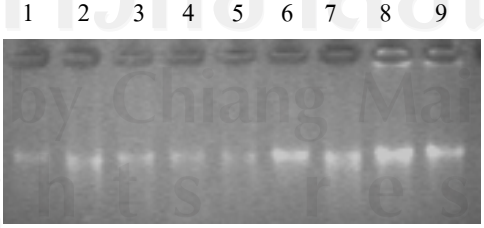
19) Vortex mixer, Genie II Model G560E, Scientific Industries, USA

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดสุกรทั้ง 3 พันธุ์ คือ Large white, Landrace และ Large white x Landrace จำนวน 3,166 ตัว ถูกสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex® extraction (Walsh *et al*., 1991) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือด (Whole blood) ปริมาณ 30 µl ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นเติม น้ำกลั่นให้ครบ 1.5 ml
2. ทำการเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (Supernatant) ทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอน (ทำ 2 รอบ)
3. จากนั้นเติม 20% Chelex® solution ปริมาณ 50 µl แล้วนำมาบ่มที่อุณภูมิ 56 °C ข้ามคืน
4. นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป
5. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอบน Agarose gel electrophoresis ที่ความเข็มข้น 1.2% ส่องภายใต้แสง ultraviolet (UV) ด้วยเครื่อง Gel documentation (ภาพ 10) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm



ภาพ 10 ตัวอย่างผลการตรวจสอบคุณภาพ DNA ที่สกัดได้บน Agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณของ DNA

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

ความเข้มข้นของ DNA ค่า OD_{260} × 50 µg/ml × dilution factor

โดย ค่า OD_{260} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงแสง 260 nm ของสารละลาย DNA

50 µg/ml คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลาย DNA ที่ OD_{260} มีค่าเท่ากับ 1

dilution factor คือ อัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจาง

สำหรับการประเมินคุณภาพของสารละลาย DNA สามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} และ OD_{280} โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ จะต้องมีค่าประมาณ 1.8

3.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/µl) ของแม่สุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ (Large white, Landrace และ Large white x Landrace) จำนวนทั้งหมด 3,166 ตัว ถูกใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน *BF* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3 (ตามวิธีการของ Jiang and Gibson, 1998) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Template DNA (100 ng/µl)	1.00	µl
10X PCR buffer	2.00	µl
BF- forward primer (10 pmol/µl)	0.40	µl
BF- reverse primer (10 pmol/µl)	0.40	µl
dNTP (2.5 mM)	0.50	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.20	µl
Taq DNA polymerase (Fermentas 5U/µl)	0.10	µl
dH_2O	14.40	µl
ปริมาตรรวม	**20.00**	**µl**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รอบที่ 1	Denaturation:	94°C	4 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation:	94°C	30 วินาที	} จำนวน 35 รอบ
	Annealing:	58°C	30 วินาที	
	Extension:	72°C	30 วินาที	
รอบที่ 3	Final extention:	72°C	5 นาที	

จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR บน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.2% และส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง Gel documentation

ตาราง 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *BF* ของสุกร

Primer	Size	Sequence
BF	390	forward primer 5'-ACTGCTATGACGGTTACACTCTCCG-3' reverse primer 5'-TCCAAGAGCCACCTTCCTGG-3'

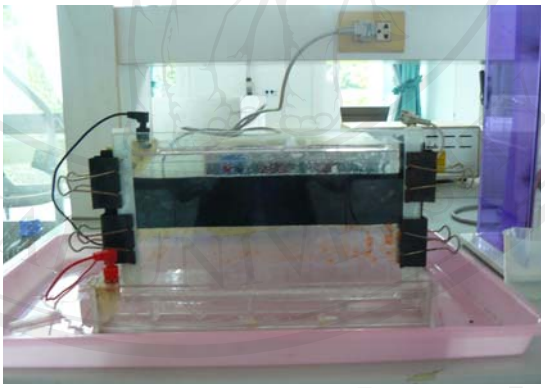
การตรวจสอบความผันแปรของยีน *BF* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma*I (CCC▼GGG) ตามวิธีการของ Jiang and Gibson. (1998) โดยมีรายละเอียดดังนี้

PCR product	2.50 µl
*Sma*I (10U/µl)	0.05 µl
10X buffer Tango	0.50 µl
dH_2O	1.95 µl
ปริมาตรรวม	**5.00 µl**

บ่มที่อุณภูมิ 30 °C ข้ามคืน แล้วทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดย Polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลานาน 40 นาที และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining โดยมีรายละเอียดดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. แช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิตริกที่ความเข็มข้น 10% จำนวน 50 ml นาน 10 นาที
2. เติมกรดไนตริกความเข้มข้น 1% ปริมาณ 50 ml นาน 10 นาทีแล้วล้างด้วย deionized water จำนวน 3 ครั้ง
3. แช่ด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.1% จำนวน 100 ml ซึ่งถูกผสมด้วยเฟอร์มัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 µl เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย deionize water จำนวน 2 ครั้ง
4. ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 3% ที่มีส่วนผสมฟอร์มัลดีไฮด์ ความเข็มข้น 37% จำนวน 150 µl ที่เจือจางด้วย deionize water ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้งๆละ 50 ml
5. จากนั้นแช่เจลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 3% ที่มีส่วนผสมฟอร์มัลดีไฮด์ความเข็มข้น 37% จำนวน 150 µl ปริมาตร 50 ml จนกระทั่งปรากฏแถบดีเอ็นเอแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิตริกเข้มข้น 10% นาน 20 วินาที และล้างแผ่นเจลด้วย deionize water 3 ครั้งก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer



ภาพ 11 การตรวจสอบรูปแบบ RFLP ของยีน *BF* ด้วย non- denaturing polyacrylamide gel Electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V นาน 40 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 12 การย้อมแถบ DNA ด้วยวิธี silver stained

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.4.1 การวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *BF*

ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *BF* ถูกคำนวณดังนี้ โดยความถี่ของแต่ละจีโนไทป์คำนวณได้จากสูตร

$$f(AA) = AA / N$$

$$f(AB) = AB / N$$

$$f(BB) = BB / N$$

เมื่อ f (AA) คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous AA

f (AB) คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous AB

f (BB) คือ ความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous BB

AA AB และ BB คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ AA, AB และ BB ตามลำดับ

และ N คือ จำนวนสุกรทั้งหมด

สำหรับความถี่อัลลีล ถูกคำนวณดังนี้

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

$$f(B) = 1 - f(A)$$

เมื่อ f (A) คือ ความถี่อัลลีล A

f (B) คือ ความถี่อัลลีล B

AA และ AB คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ AA และ AB ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ อิทธิพลของ additive effect (a) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ถูกประมาณจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะใน homozygote ทั้งสอง ดังนี้ a = ½ (BB-AA) สำหรับอิทธิพลของ dominant effect (d) ถูกคำนวณจากความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะในกลุ่ม heterozygote กับค่าเฉลี่ยในกลุ่ม homozygote ทั้งสอง กล่าวคือ d = AB - ½(AA-BB) และค่าความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะจำนวนลูกต่อครอก ถูกแสดงในรูป LSM $\pm$ SE (least-square mean $\pm$ standard error) ในแต่ละกลุ่ม genotype

3.4.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *BF* กับลักษณะจำนวนลูกต่อครอก

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *BF* กับลักษณะจำนวนลูกต่อครอก ถูกวิเคราะห์โดยใช้ General Linear Model ในการวิเคราะห์อิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะจำนวนลูกต่อครอก ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้โมเดล 2 รูปแบบ โดยโมเดลแบบที่ 1 เป็นการวิเคราะห์อิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *BF* ที่มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะจำนวนลูกต่อครอกในสุกรแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

$$y_{ijk} = \mu + \text{parity}_i + \text{year-season}_j + genotype_k + e_{ijk} \quad \text{(Model 1)}$$

เมื่อ y_{ijk} คือ ค่าสังเกตของลักษณะปรากฏ

μ คือ ค่าเฉลี่ยของประชากร

parity_i คือ ปัจจัยเนื่องลำดับครอก i เมื่อi = 1-5

year-season_j คือ ปัจจัยเนื่องฤดูกาล-ปี j เมื่อ j = 1-14

$genotype_k$ คือ ปัจจัยเนื่องจาก genotype k ของยีนเป้าหมาย เมื่อ k = 1-3

e_{ijk} คือ residual error

สำหรับโมเดลแบบที่ 2 เป็นการวิเคราะห์อิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *BF* ที่มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะจำนวนลูกต่อครอกในสุกรรวมสายพันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

$$y_{ijkl} = \mu + \text{breed}_i + \text{parity}_j + \text{year-season}_k + genotype_l + e_{ijkl} \quad \text{(Model 2)}$$

เมื่อ y_{ijkl} คือ ค่าสังเกตของลักษณะปรากฏ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

μ คือ ค่าเฉลี่ยของประชากร

$breed_i$ คือ ปัจจัยเนื่องจากพันธุ์สุกร i = 1-3

$parity_j$ คือ ปัจจัยเนื่องลำดับครอก j เมื่อ j = 1-5

$year\text{-}season_k$ คือ ปัจจัยเนื่องฤดูกาล-ปี k เมื่อ k = 1-14

$genotype_l$ คือ ปัจจัยเนื่องจาก genotype l ของยีนเป้าหมาย เมื่อ l = 1-3

e_{ijkl} คือ residual error

ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายกับลักษณะจำนวนลูกต่อครอกตามโมเดลแบบที่ 1 ถูกแสดงดังตารางที่ 5, 6 และ7 ส่วนผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายกับลักษณะจำนวนลูกต่อครอกตามโมเดลแบบที่ 2 ถูกแสดงรายละเอียดในตารางที่ 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved