บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

สารเคมี	Cat. number	บริษัท
สารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อน		
เอธานอล (Ethanol, C_2H_2OH)	00983	Merck
Iscove' s Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	12200-028	GIBCOBRL
Glasgow – Minimum Essential Medium (Glasgow-MEM)	KG T051-01	BIOCHROM
Phosphate buffer saline-glucose, PBS-G	-	-
กลูโคส ($D^{\oplus}$- Glucose)	G-5400	Sigma
Trypsin	T-4799	Sigma
เอททิลลีลไดอะมินเตตราอะซิติก แอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA, $C_{10}H_{16}N_20_8$)	AG03620	Fluka Chemcie
Fetal calf serum	S0213	Seromed
สารที่ใช้ในการย้อมติดสี Alkaline phosphatase		
Paraformaldehyde	P6148	Sigma
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)	06404	Merck
Tris-HCl TRIZMA® Hydrochloride (Tris [hydroxymethyl]–aminomethane hydrochloride, $C_4H_{11}NO_3.HCl$)	T-3253	Sigma

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	Cat. number	บริษัท
แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium Chloride, $MgCl_2$)	M8266	Sigma
5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate (BClP)	B-6149	Sigma
Nitroblue Tetrazolium (2,2'-Di-ρ-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-[3,3' -dimethoxy-4,4'-diphenylene] ditetrazolium chloride)	N-6876	Sigma
สารที่ใช้ในการวัด Alkaline phosphatase Activity		
Alkaline phosphatase Set	RA-111	Biotech reagent
สารที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด		
เอททิลลีลไดอะมินเตตราอะซิติก แอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA, $C_{10}H_{16}N_2O_8$)	AG03620	Fluka Chemcie
สารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ		
TE buffer	-	-
Chelating Resin (Iminodiacetic acid)	C-7901	Sigma
สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส		
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs)	U120B-123B	Promega Bio-Active
taq DNA polymerase (250 unit taq, 10X PCR Buffer และ 25 mM $MgCl_2$)	201203	QIAGEN
Primer สังเคราะห์ที่	-	QIAGEN OPERON

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	Cat. number	บริษัท
สารที่ใช้ในการทำ Gel Electrophoresis		
Acrylamide PAGE (CH_2:$CHCONH_2$)	UN2074	Plusone Pharmacia
N, N'-Methylene-bis-acrylamide (Bis-Acrylamide, $C_7H_{10}N_2O_2$)	M7256	Sigma
N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED, $(CH_3)_2NCH_2N(CH_3)_2$)	17-1312-01	Plusone Pharmacia
แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate, $(NH_4)_2S_20_8$)	A3678	Sigma
Bromophenol blue-Xylene cyanol	B3269	Sigma
25 bp DNA Step Ladder	G451A	Promega Bio-Active
TAE buffer	-	-
สารที่ใช้ในการย้อมสีเจล		
Ethidium bromide ($C_{11}H_{20}N_3Br$)	E8751	Sigma

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
เครื่องกรอฟัน (Upower)	Up500	URAWA KOHGYO	ญี่ปุ่น
เครื่องปั่นแยกเล็ก (micro centrifuge)	4214	A.L.C. International S.r.l.	อิตาลี
เครื่องปั่นแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ (KUBOTA)	6930	KUBOTA CROP	ญี่ปุ่น
ตู้เลี้ยงเซลล์ (Infrared CO_2 Incubator)	3194	Forma Scientific, Inc	อเมริกา
ตู้ปลอดเชื้อ (Biohazard Laminar flow)	BLF-120	Dwyer Instruments, Inc.	อเมริกา
กล้องจุลทรรศน์ แบบตัวกลับ (Olympus)	CK2	OLYMPUS OPTICAL	ญี่ปุ่น
Culture Plate 24 well	NUNCLON™ DELTA	Nalge Nunc International	เดนมาร์ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. และ 0.2 มล. (Multi Ultra Tubes-PCR Tube)	-	Sorenson, Bioscience.Inc	อเมริกา
ตู้พักและตู้เกิด ขนาด 72 ฟอง (Incubator and Hatchery)	SI72A	สยามอินคูเบเตอร์ ซีสเต็ม	ไทย
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer UV-Visible)	Du® Series7000	Beckman	อเมริกา
เครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex mixer)	Genie 2	Scientific industries	อเมริกา
เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง)	AB204	Mettler-Toledo	สวิตเซอร์แลนด์
หม้อน้ำร้อน (Waterbath)	600	memmert	เยอรมันนี
เครื่องฉายรังสีโคบอล์ท 60	Theratron 780	Atomic energy of Canada Limitted	แคนาดา
เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycle)	PTC100	MJ Research, Inc	อเมริกา
เครื่องพาวเวอร์ ซัฟพลาย (Power Supply)	PAC 300	Bio-Active	อเมริกา
เครื่องรันเจลแนวตั้ง (Vertical gel electrophoresis)	Mini PROTEAN® 3 cell	Biorad	อเมริกา
เครื่อง UV Transilluminator พร้อมเครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)	-	Syngene	อเมริกา
Hemacytometer	Bright-Line	Hausser Scientific	อเมริกา
ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 2.5, 10, 20, 200, 1,000 ไมโครลิตร	-	Eppendorf Research	เยอรมันนี
ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 20, 200 , 1,000 ไมโครลิตร	Pipetman	Gilson	ฝรั่งเศส
จานเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม.	-	-	ไทย
หลอดฉีดยา ขนาด 5 มล.	Nipro®		ญี่ปุ่น
sterile cover slip	Menzel-glaser	-	เยอรมันนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สัตว์ทดลอง

ไข่ไก่มีเชื้อ พันธุ์พื้นเมือง อายุฟัก 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน วันละ 4 ฟอง จำนวน 32 ฟอง จากฟาร์มทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ไข่นกกระทาญี่ปุ่น มีเชื้อ อายุฟัก 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน วันละ 4 ฟอง จำนวน 32 ฟอง จากฟาร์มเกษตรกร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

ไข่ไก่ฟัก พันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์ จำนวน 500 ฟอง จาก บริษัท กรุงเทพผลิตผลอุตสาหกรรมการเกษตร จำกัด (มหาชน) อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทา

นำไข่ไก่และนกกระทา มีเชื้ออายุฟักแต่ละวันข้างต้น มาเช็ดด้วยสำลีชุบ 70 % (v/v) ethanol alcohol ทั่วทั้งฟอง เคาะไข่ใส่ในจาน petri dish พลิกไข่หาจุดเจริญของตัวอ่อน (germinal disc) หรือตัวอ่อน ใช้หลอดฉีดยาพลาสติก (Nipro®) ขนาด 5 มล. ดูดตรงตำแหน่งจุดเจริญหรือตัวอ่อนนั้น แล้วนำมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. ที่ภายในบรรจุ phosphate buffer saline ที่มีปริมาณ D-glucose 5.6 mM (PBS-G) อยู่ปริมาตร 1 มล. หรือถ้ากรณีเป็นตัวอ่อน นำตัวอ่อนมาสับด้วยใบมีดหรือกรรไกรผ่าตัด ตัดในจาน petri dish ก่อนดูดเซลล์ตัวอ่อนใส่ในหลอดทดลอง ใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงให้เซลล์ตัวอ่อนกับ PBS-G ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 400 Xg ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อล้างเศษเซลล์หรือไข่แดงที่ปะปนมาให้ออกไป ดูดส่วนใสข้างบน (supernatant) ทิ้งไป ทำการล้างด้วย PBS-G อีก 3 - 4 รอบ หรือจนกว่าไข่แดงที่ปนมาจะหมดไป โดยดูจากสีเซลล์ จะมีสีขาวขุ่น นำเซลล์ที่ได้มาทำการย่อยด้วย 0.25 % trypsin ที่ประกอบด้วย 0.04 % (W/V) EDTA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงและล้างด้วย PBS-G อีกรอบ หลังจากนั้นกระจายตะกอนของเซลล์ตัวอ่อนด้วย PBS-G ปริมาตร 1 มล. ดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัว ก่อนใช้ Pasteur pipette ดูดเซลล์ไปนับจำนวนด้วยเครื่องมือ hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นเลี้ยง ใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงอีกรอบให้เซลล์กระจายตัว แล้วใช้ไมโครปิเปต ขนาด 1000 มล. แบ่งเซลล์ใส่ในหลอดทดลอง 2 หลอด ในปริมาตรที่เท่า ๆ กัน นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงอีกรอบ ดูดสารละลายใสข้างบนทิ้งไป ก่อนเติม media 2 ชนิดคือ IMDM และ MEM-Glasgow ที่ประกอบไปด้วย 10 % FCS และ antibiotic ไปอย่างละหลอด ให้ได้ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดไปใส่ใน culture plate 24 หลุม นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่มีความเข้มข้นบรรยากาศคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ 5 % อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอิ่มตัวด้วยไอน้ำ ทุกๆ 2 วันของการเพาะเลี้ยง ทำการดูดตัวอย่างเซลล์ในหลุมดังกล่าวมาเจือจางด้วย Balance Salt Solution (BSS) แล้ว นับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่องมือ

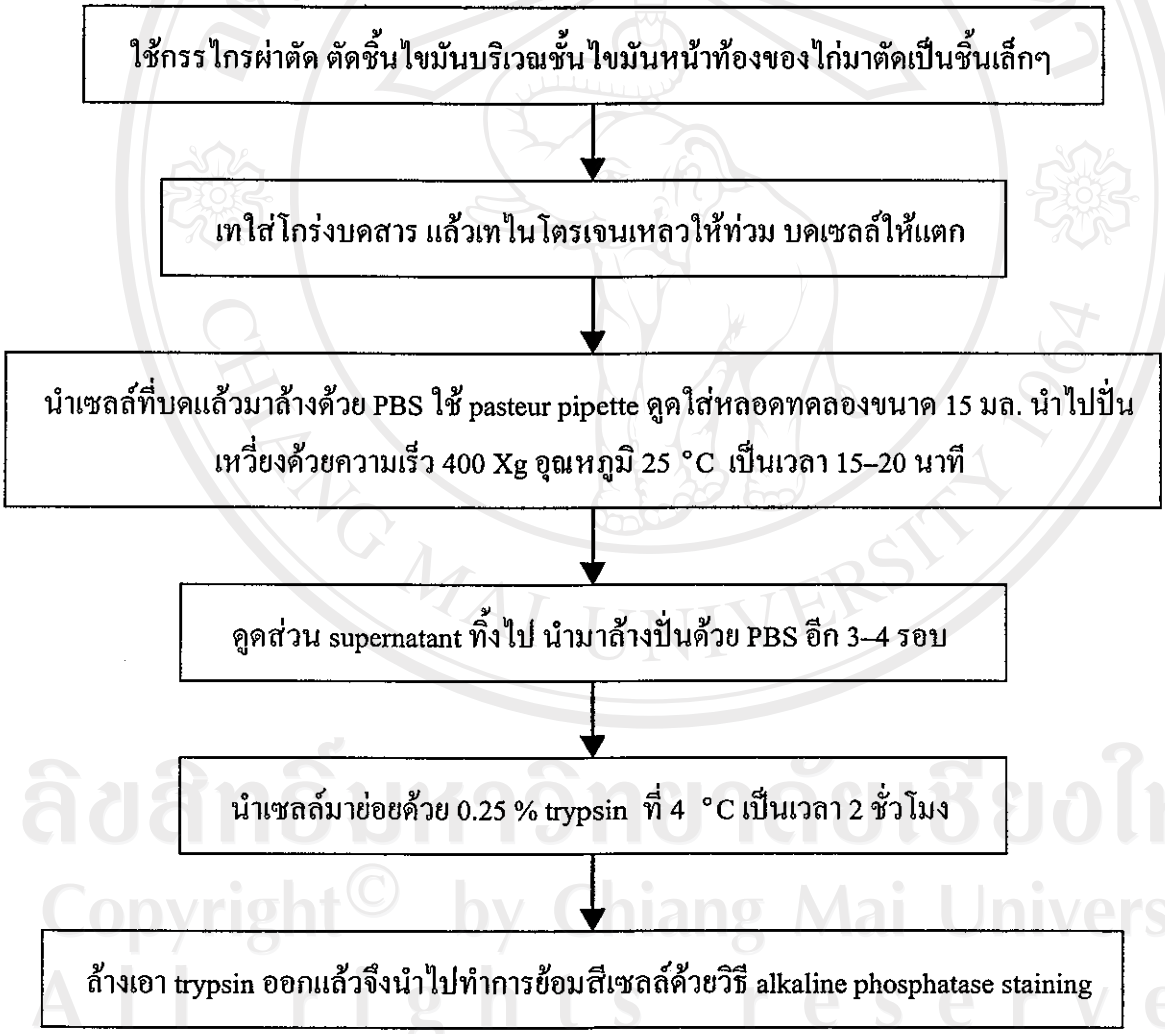
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนครบ 14 วัน โดยทำการเติม media ให้ปริมาตรคงที่ 1 มล. เสมอ

3.4 การตรวจหา Stem cells ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining

ดูดเซลล์ตัวอ่อนที่เลี้ยงได้เป็นเวลา 8 วัน มาทำการย้อมสีเซลล์ โดยมีเซลล์ adipose ของไก่ และ myoepithelial cell จากต่อมน้ำนมหนูเป็นกลุ่มควบคุม

3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ adipose ของไก่แสดงดังภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ adipose ของไก่.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 เซลล์ myoepithelial cell ของต่อมน้ำนมหนูได้รับความอนุเคราะห์จากคุณเกศินี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.4.3 ขั้นตอนการย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining แสดงดังภาพที่ 3-2

3.5 การวัดผล alkaline phosphatase activity

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนที่เลี้ยงได้เป็นเวลา 8 วัน มาทดสอบผล alkaline phosphatase activity ด้วยชุด Biotech reagent kit โดยใช้ตัวอย่าง 0.1 มล. แล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 550 nm แล้วนำค่าตัวอย่างที่วัดได้ไปเทียบกับค่ากราฟมาตรฐาน หน่วยเป็น unit/l

3.6 การฉีดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาเข้าไปในไข่ไก่ฟักพันธุ์อาเบอร์ เอเคอร์ เพื่อศึกษาการเกิด Chimeras

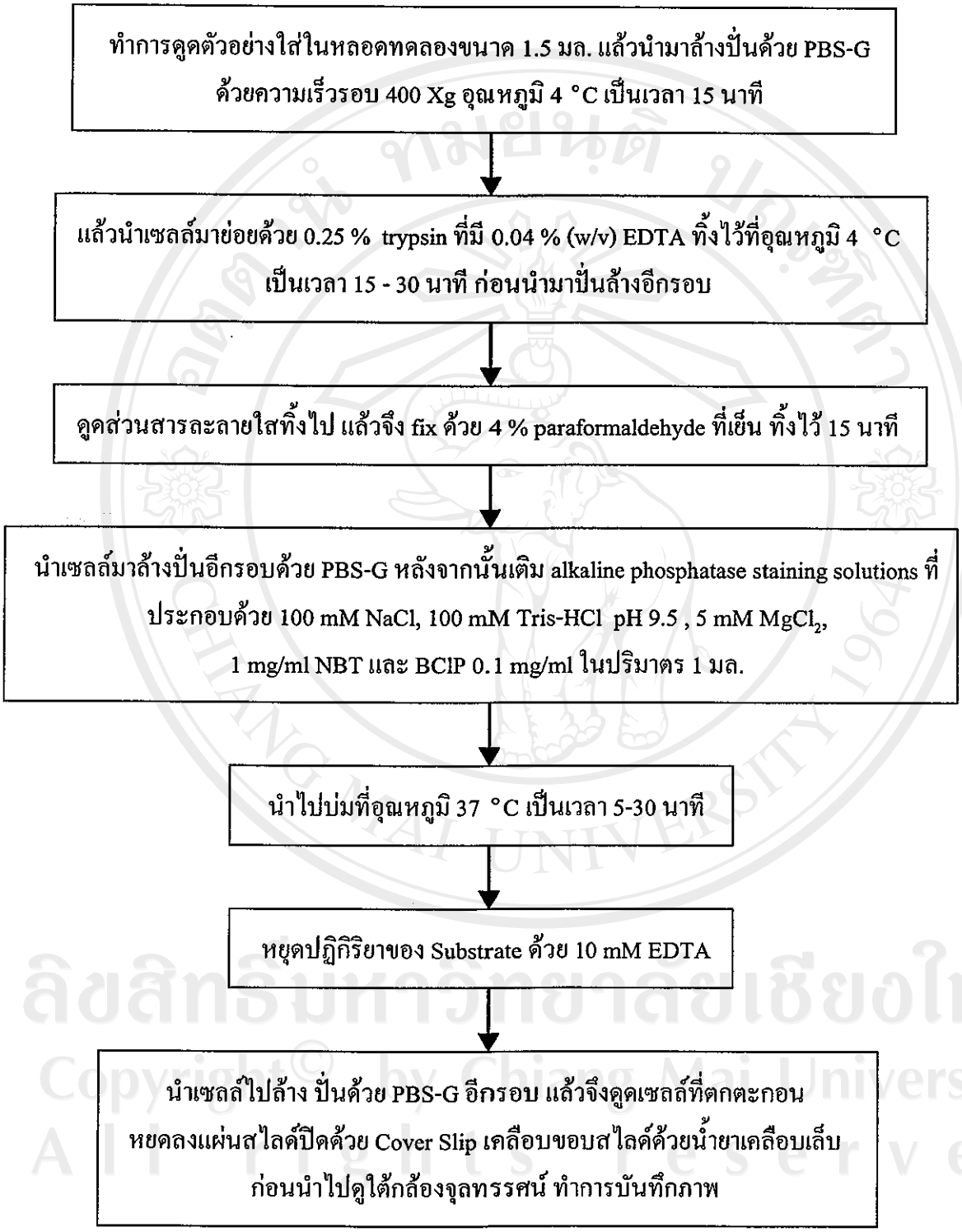
3.6.1 การเตรียมเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา ซึ่งเป็นเซลล์ตัวให้ (Donor cells)

ดูดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาจากไข่ที่มีอายุฟัก 1 วัน มาล้างด้วย serum-free media โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 400 Xg อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนดูดส่วนที่เป็นสารละลายใสทิ้งไป นำมานับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่องมือ hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจะทำการเจือจางจำนวนเซลล์ตัวอ่อนในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนจะทำการฉีดเซลล์จำนวนดังกล่าวเข้าไปในไข่ฟักตัวรับต่อไป

3.6.2 การเตรียมไข่ไก่ฟักตัวรับ (recipient)

นำไข่ไก่ฟัก พันธุ์อาเบอร์ เอเคอร์ มาทำความสะอาดด้วยสำลีชุป 70 % (v/v) ethanol ภายในตู้ปลอดเชื้อ วางไข่ในแนวราบ ใช้วงเวียนที่มีสเกล ทำเครื่องหมาย ณ จุดตัดของจุดกึ่งกลางของด้านยาวและกว้าง (Equatorial plane) ซึ่งเป็นตำแหน่งของจุดเจริญ (germinal disc) ใช้เพลทพลาสติกใสขนาด 7 x 7 มม.^{2} ทำเครื่องหมายด้วยดินสอเป็นรูปหน้าต่างสี่เหลี่ยมที่จะเจาะ ใช้เครื่องกรอฟันหัวขนาดเล็ก เจาะตรงตำแหน่งช่องอากาศ (air sac) ด้านป้านของไข่ โดยพยายามอย่าให้โดนไข่แดง ตั้งไข่ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้อากาศเข้าไปดันตำแหน่งจุดเจริญพลิกขึ้นมาอยู่พอดี ณ ตำแหน่งที่ทำเครื่องหมายไว้ ทำการเจาะหน้าต่างด้วยเครื่องกรอฟัน ตรงตำแหน่งดังกล่าว ใช้คีม (forceps) คีบเปลือกไข่ออก ใช้กรรไกรผ่าตัดตัดเนื้อเยื่อหุ้มไข่ออก เพื่อให้เห็นจุดเจริญของตัวอ่อน แสดงดังภาพที่ 3 - 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-2. ขั้นตอนการย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 – 3. แสดงขั้นตอนการเตรียมไข่ฟักตัวรับ, เช็ดไข่ด้วยแอลกอฮอล์ (ก), ทำเครื่องหมายจุดกึ่งกลางแนวยาวและกว้างด้วยวงเวียน (ข), ทำเครื่องหมายสี่เหลี่ยมขนาด 7 x 7 มม^2 (ค), เจาะบริเวณ air sac (ง), เจาะหน้าต่าง (จ), เปิดหน้าต่างด้วยคีม (ฉ).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.3 การฉีดเซลล์ตัวอ่อนให้เข้าไปในไข่ตัวรับ

พลิกไข่เล็กน้อยเพื่อให้เห็นจุดเจริญได้ชัดเจน ทำการฉีดจำนวนเซลล์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในตำแหน่งจุดเจริญของไข่ไก่ตัวรับ โดยใช้ไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการปิดหน้าต่างด้วย sterile cover slip แบบกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1.5 ซม. ดังแสดงในภาพที่ 3–4 เชื่อมปิดด้วยกาวช้าง พยายามอย่าให้กาวลงไปในฟองไข่ เพราะจะทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ภายในได้ ตั้งทิ้งไว้ให้หน้าต่างปิดสนิท นำไข่ไปเข้าฟักในตู้พักแบบอัตโนมัติขนาด 72 ฟอง โดยตั้งอุณหภูมิฟักที่ 100 องศาฟาเรนไฮน์ จนอายุการฟักได้ 18 วัน จึงย้ายลงถาดเกิดจนครบอายุการฟัก 21 วัน ในงานวิจัยครั้งนี้จะแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

3.6.3.1 การทดลองที่ 1

ใช้ความเข้มข้นจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา 100, 200, 400, 800, 1,600, 3,200, 6,400, 10,000, 20,000 และ 40,000 cells/5 µl serum-free media /egg โดยมีกลุ่มที่เจาะหน้าต่างแล้วไม่ฉีดเซลล์เข้าไปในกลุ่มควบคุม

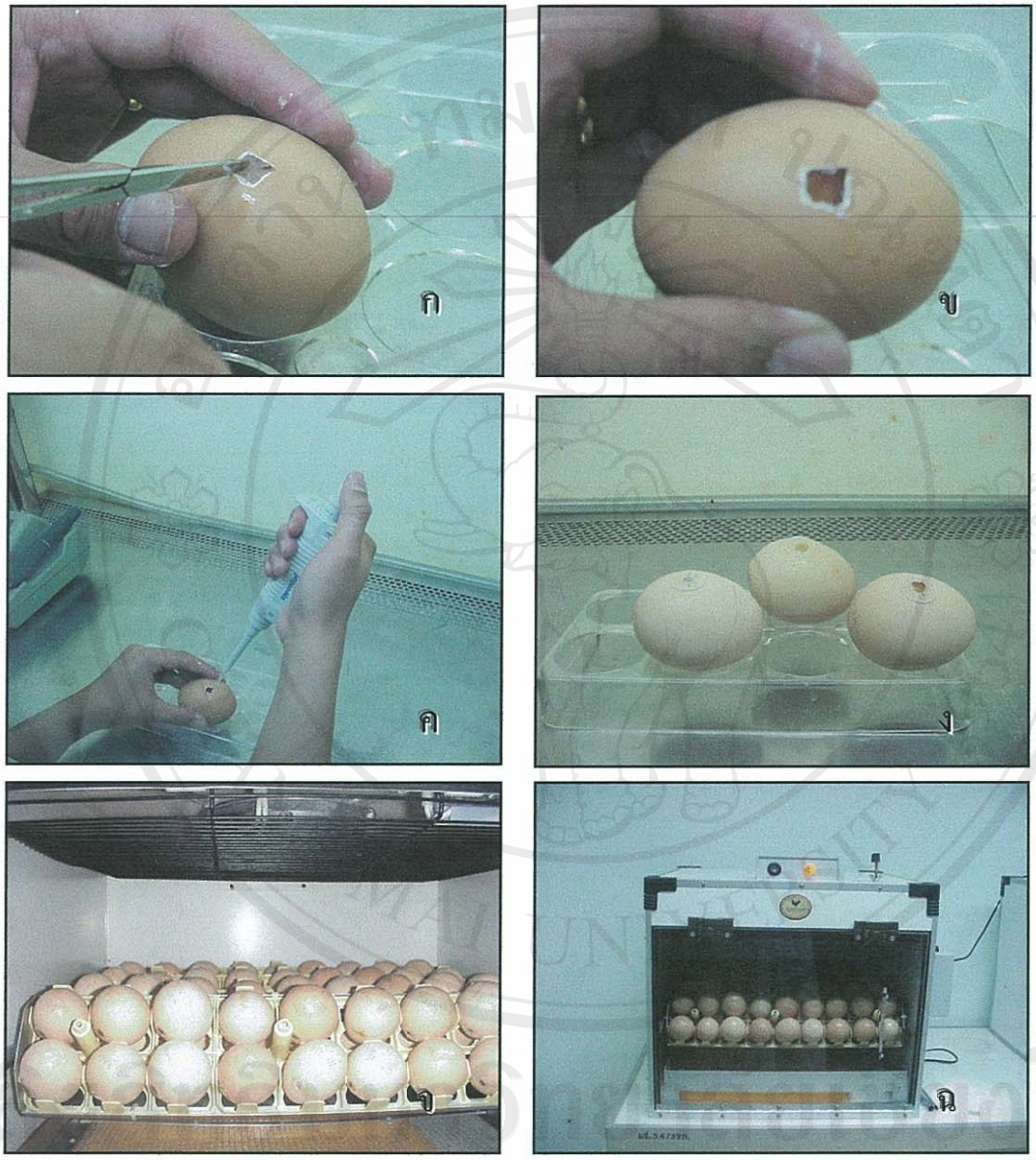
3.6.3.2 การทดลองที่ 2

ใช้ความเข้มข้นจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา 100, 200, 400, 800, 1,600 และ 3,200 cells/5 µl serum-free media/egg โดยมีกลุ่มเจาะหน้าต่างแล้วไม่ฉีดเซลล์ และกลุ่มที่ไม่เจาะหน้าต่าง-ไม่ฉีดจำนวนเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม

3.6.3.3 การทดลองที่ 3

นำไข่ไก่ฟักไปรับการฉายรังสีโคบอลต์ 60 ด้วยเครื่อง Theratron 780 ที่ระดับความเข้มข้นรังสี 300, 500 และ 1,000 rads ก่อนนำไปทำการเจาะหน้าต่าง แล้วจึงฉีดจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาที่ความเข้มข้น 400, 1,600, 6,400, 20,000 และ 40,000 cells/5 µl serum-free media/egg โดยมีกลุ่มเจาะหน้าต่าง ไม่ฉีดจำนวนเซลล์และ กลุ่มที่ไม่เจาะหน้าต่าง-ไม่ฉีดเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 – 4. แสดงขั้นตอนการฉีดเซลล์ตัวอ่อนเข้าไปในไข่ตัวรับ, ตัดเนื้อเยื่อไข่ด้วยกรรไกร (ก), พลิกไข่เพื่อหาจุดเจริญ (ข),ฉีดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา (ค), ปิดหน้าต่างด้วย cover slip (ง), นำเข้าตู้ฟักไข่ ที่ตั้งอุณหภูมิ 100 °ฟ และอิ่มตัวด้วยไอน้ำ (จ – ฉ).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การวัดผลการเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ จากการฉีดเซลล์นกกระทา เพื่อศึกษาการเกิด chimeras

นำไข่ที่ฟักไปแล้ว 7 วันและ 18 วัน มาส่องไข่ก่อนย้ายลงถาดเกิด เพื่อตรวจสอบไข่ลม (Infertile egg) ส่วนการเจริญของตัวอ่อนดูผลจากการฟักออกเป็นตัวลูกไก่ (chick hatched) เมื่อครบระยะเวลาฟัก คือ ประมาณ 21 วัน ส่วนไข่ที่ฟักไม่ออก จะทำการนำมาเคาะในจาน petri dish เทียบขนาดการพัฒนากับแผนภาพการพัฒนาของลูกไก่ระยะวันฟักต่าง ๆ ทำการบันทึกภาพ แล้วจึงนำภาพดังกล่าวไปทำการวัดขนาดพื้นที่ตัว ความกว้าง ความยาวของตัว ด้วยโปรแกรม Autocad เวอร์ชั่น Release 14.0

3.8 การตรวจสอบการเกิดลักษณะ chimeras ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite)

3.8.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดลูกไก่หลังที่ฟักออกเป็นตัวมีอายุได้ 7 วัน โดยเก็บจากเส้นเลือดบริเวณปีก (wing vein) ปริมาตรประมาณ 1 มล. ใส่ในหลอดทดลอง (vial) ขนาด 1.5 มล. ที่ใส่สารป้องกันการแข็งตัว (anticoagulant) 0.5 M EDTA จำนวน 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{0}ซ จนกว่าจะนำมาสกัดดีเอ็นเอ

3.8.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

นำเลือดที่แช่เย็นไว้ที่ –20 ^{0}ซ มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วปิเปตตัวอย่างเลือดมา 3 ไมโครลิตร ค่อยหยดลงไปในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล. ที่บรรจุน้ำกลั่น (deionized water) 1 มล.ไว้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 - 30,000 Xg เป็นเวลา 2-3 นาที ดูดสารละลายใสข้างบนทิ้งไปเหลือตะกอนข้างล่างไว้ แล้วจึงเติมสารละลาย 5 % chelate® 100 ลงไปจนปริมาตรครบ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มหม้อน้ำร้อนอุณหภูมิ 56 ^{0}C เป็นเวลา 15-30 นาที หลังจากนั้นนำมาเขย่าด้วยความเร็วสูง (Vortex) เป็นเวลา 5-10 วินาที นำไปให้ความร้อนในหม้อน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที แล้วนำมาเขย่าด้วยความเร็วสูง 5-10 วินาที ก่อนไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 – 15,000 Xg เป็นเวลา 2-3 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 ^{0}C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8.3 การหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

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

คำนวณหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างแต่ละหลอดโดยใช้สูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = O.D.260 nm * 50* dilution factor (=200)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ = O.D. 260 nm / O.D. 280 nm

3.8.4 การเพิ่มขยายชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาขยายบริเวณ di- , trinucleotide repeat 2 ตำแหน่งด้วยวิธี PCR คือ ADL0024 และ ADL0257 (Pang *et al.*, 1999) ซึ่งมีลักษณะตามตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1. แสดงลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ ที่ทำการศึกษา

Locus	Observed PCR product size in quail template	Allele length report in chicken by NAGRP (bp)	Primer sequence (5'-3')	Temperature annealing (°C)
ADL0024	206	145	TGAAGCAAAAACCCAGC AAG	46
			GTTCCATTACAGAGTGAG GT	
ADL0257	118	187	ATCTTGAAACCTCACAAA GC	40
			TCTTCCAACCTATTTTTA GC	

ดัดแปลงจาก : Pang *et al.* (1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเพื่อใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส ในหลอดทดลองขนาด 0.2 มล. ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ ดังตาราง 3-2

ตารางที่ 3-2. สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl)
10x PCR buffer	1x	2
1 mM dNTP	0.2	4
25 mM $MgCl_2$	1.5	1.2
15 ρmol/ µl (forw)	0.6	0.8
15 ρmol/ µl (rev)	0.6	0.8
0.5 units Taq polymerase	0.025	1
1500 ng/µl template	150	2
น้ำกลั่น	-	8.2
รวม		20

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycle) โดยใช้อุณหภูมิต่าง ๆ ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1 อุณหภูมิ 94 ^{0}ซ เวลา 3 นาที เพื่อกระตุ้นเอนไซม์ Taq polymerase

รอบที่ 2 - 35 อุณหภูมิ 94 ^{0}ซ เวลา 1 นาที (denaturation)

อุณหภูมิ 46, 40 ^{0}ซ เวลา 45 วินาที (annealing)

อุณหภูมิ 72^{0}ซ เวลา 45 วินาที (extension)

รอบที่ 36 อุณหภูมิ 72^{0}ซ เวลา 15 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

3.8.5 การหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว

นำเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว (PCR product) มาแยกขนาดความแตกต่างด้วยอิเล็กโตรฟอรีซิส (electrophoresis) ที่มี polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 % เป็นตัวกลางค้ำจุน ย้อมสีเจลด้วย Ethidium bromide โดยทราบขนาดจากการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส เทียบกับ DNA molecular weight 25 bp step ladder

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8.5.1 การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 %

เตรียมเจล 1 แผ่น มีส่วนผสมดังต่อไปนี้: น้ำกลั่น (deionzed water) 3.75 ml กับ 10x TAE จำนวน 0.5 ml และ 40 % polyacrylamide จำนวน 0.75 ml รวม 5 ml เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายเข้ากันดี จากนั้นเติม N, N, N', N' – tetramethyl ethylenediamine (TEMED) จำนวน 6 µl และ 10 % Ammonium persulphate จำนวน 15 µl เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน เทส่วนผสมลงระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นที่มีแผ่นกั้นกระจก (spacer) หนา 0.75 mm โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเสียบหวีตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง จึงดึงหวีออก

3.8.5.2 การทำอิเล็กโตรฟอรรีลีส

ประกอบแผ่นเจลที่แข็งตัวดี เข้ากับเครื่องอิเล็กโตรฟอรีซิสแนวตั้ง เติม 1X TAE buffer ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 60 โวลต์ เปิดเครื่องก่อนทำการเติม PCR product เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสม PCR product 5 µl กับ loading dye 3 µl ผสมให้เข้ากัน หยอดลงในช่องหวีพร้อมทั้งหยอด 25 bp step ladder ด้านข้างทั้ง 2 ของแผ่นเจล แล้วต่อวงจรไฟฟ้าใช้กระแสคงที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของ PCR product

หลังจากนั้นแยกแผ่นกระจกออก แล้วนำมาย้อมด้วย Ethidium bromide นำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้ด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Syngene) เพื่อนำไปวัดขนาดของดีเอ็นเอด้วย โปรแกรม gene tool โดยเทียบขนาดกับ DNA molecular weight marker ขนาด 25 bp step ladder

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.9.1 วิเคราะห์ความแปรปรวนของอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิดต่อการเจริญของเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาโดยวิธี One-way Analysis of Variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

3.9.2 เปรียบเทียบพัฒนาการของตัวอ่อนเทียบจากแผนภาพการเจริญของตัวอ่อนระยะต่างๆ เชิงพรรณนา (descriptive analysis) ด้วยค่า mean, standard deviation, minimum, maximum และ number

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved