บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้เพื่อหารูปแบบความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ชนิดเตตร้านิวคลีโอไทด์ และประเมินค่าความแปรผันทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ซี จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น และ ไก่แดง จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานี อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 เจาะบริเวณเส้นเลือดปีก (wing vien venipuncture) ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตรต่อตัว ใส่หลอดสุญญากาศที่เคลือบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เก็บไว้ในตู้ -20 °C เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการศึกษาในไก่พื้นเมืองชั่วรุ่นที่ 3 ไก่ซี จำนวน100 ตัว โดยแบ่งเก็บเลือดไก่ซีเพศผู้จำนวน 50 ตัว ไก่ซีเพศเมีย 50 ตัว ไก่แดง จำนวน 99 ตัว แบ่งเก็บเลือดไก่แดงเพศผู้ 50 ตัว ไก่แดงเพศเมีย 49 ตัว

โดยทางกรมปศุสัตว์และศูนย์วิจัยทั้งสองแห่งมีการดำเนินการผสมพันธุ์เพื่อสร้างฝูงพันธุ์แท้ไก่พื้นเมืองไทยของทั้งสองสายพันธุ์ โดยทำการรวบรวมไก่พื้นเมืองที่มีลักษณะสีขนตรงตามสายพันธุ์จากทั่วประเทศเพศผู้ 50 ตัว เพศเมีย 350 ตัว ทำการผสมพันธุ์แบบสุ่มโดยใช้พ่อพันธุ์ 1 ตัวต่อแม่พันธุ์ 5 ตัว ให้เกิดเลือดชิดน้อยที่สุด ในแต่ละชั่วรุ่นจะทำการคัดเลือกไก่ที่มีลักษณะสีขนที่ตรงตามสายพันธุ์ขึ้นเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป ปัจจุบันได้ดำเนินการถึงชั่วรุ่นที่ 5 โดยเป้าหมายของกรมปศุสัตว์และศูนย์วิจัย คือ สร้างฝูงพันธุ์แท้ไก่พื้นเมืองไทยเพื่อทำการจดทะเบียนรับรองพันธุ์แท้ไก่พื้นเมืองไทย

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

อุ่นเลือดที่เก็บไว้ให้ละลายในอุณหภูมิห้อง ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (QIAmp® DNA Blood MiniKit) โดยใส่เลือด 50-100 µl ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย QIAGEN Protease และ Buffer AL เพื่อเริ่มจากการทำลายผนังเซลล์และย่อยโปรตีนต่างๆ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 19-20

ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการล้างด้วย ETOH เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สะอาดขึ้น ในขั้นตอนนี้ทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) โดยใช้ spin column จะทำให้ดีเอ็นเอถูกดูดซับไว้ที่ silica-gel membrane แต่โปรตีนและสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกชะล้างออกไปด้วย wash buffers AW1/AW2 แล้วจึงทำการชะล้างดีเอ็นเอออกจาก membrane ด้วย buffer AE จากนั้นจึงเก็บดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่สกัดได้ใน buffer AE ไว้ในตู้ -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ 2 วิธีคือ วิธีการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โดยใช้ 2% agarose gel และวิธีวัดค่าการดูดแสงอัลตร้าไวโอเลตโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทำการสุ่ม 15 µl และน้ำ 50 µl ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 µl ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

3.2.2 การเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยกระบวนการพีซีอาร์ (PCR)

การศึกษานี้เลือกใช้ Microsatellite primer จำนวน 5 คู่ ซึ่งเป็น Microsatellite DNA ชนิดเตตร้านิวคลีโอไทด์ ที่มีตำแหน่ง (location) ต่างๆกัน มีขนาดอยู่ระหว่าง 200-300 bp และมีอุณหภูมิเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 53-58°C รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ primer sequence ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่งแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียด Microsatellite primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

Locus name	Motif	Location	T_A (°C)	Size(bp)
LEI0192	$(CTTT)_{11}$	Chromosome 21	54	265
LEI0228	$(CTTT)_9 (A)_4 (CTTT)_6$	Chromosome 2	56	202
LEI0229	$(TTTC)_2$	Chromosome 2	56	279
LEI0248	$(TTTC)_{25}$	Chromosome X	54	248
LEI0234	$(TTTC)_{18}$	Chromosome 2	56	289

ที่มา: McConnell *et al.* (1999)

ในการเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากไก่พื้นเมืองแต่ละตัวอย่างจำนวน 2 µl และสารประกอบต่างๆใน ปฏิกิริยาประกอบด้วย 10xPCR buffer 2.5 µl , dNTP's (1.25 mM) 4 µl ,โดยใช้ไพรเมอร์ทีละคู่ (20mM) 0.5 µl ,Taq polymerase (2.5 unit/100 µl) 1 µl และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 25 µl จากนั้นเข้าสู่กระบวนการพีซีอาร์ โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาแรกของกระบวนการพีซีอาร์ (initial denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ โดย 1 รอบ ปฏิกิริยามีรายละเอียดดังนี้ ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที primer anealing ที่อุณหภูมิ T_A °C ของไพรเมอร์แต่ละคู่ เป็นเวลา 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบจำนวนรอบที่ต้องการแล้วจึงเริ่ม ขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยา สิ้นสุดแล้วเก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -20 °C จนกว่าจะใช้งานต่อไป

ตารางที่ 3.2 Primer sequences (5' – 3') ของไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง

Locus name	Primer sequences (5' – 3')
LEI0192	(F) TGCCAGAGCTTCAGTCTGT
	(R) GTCATTACTGTTATGTTTATTGC
LEI0228	(F) GCTGGGTTATTTCAATATGTGG
	(R) AGCGTACCTGATAATGATGAGC
LEI0229	(F) CAGTTTCCAAAGGCAAGTCAGG
	(R) CGGTAGGTTTGAAGTGCATGG
LEI0248	(F) TTTGAAAGTGACCATGATTCTG
	(R) AAGCAGTTTCCAAGCTAAGAAC
LEI0234	(F) ATGCATCAGATTGGTATTCAA
	(R) CGTGGCTGTGAACAAATATG

3.2.3 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel Electrophoresis

การเตรียมแผ่นเจล (agarose gel)

ในการทำ gel electrophoresis โดย agarose gel เพื่อตรวจสอบ PCR product ว่าเมื่อผ่านกระบวนการพีซีอาร์แล้วสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้หรือไม่ หรือสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้มากน้อยเพียงใด โดยดูจากแถบดีเอ็นเอที่สว่างชัดภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต โดยชั่งผง agarose 1 กรัม ใส่ในขวดชมพู่ (flask) เติม 0.5XTBE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ 2% agarose gel ทำให้ร้อนโดยนำเข้าตู้อบไมโครเวฟเป็นเวลา 2 นาที สังเกตว่าผง agarose ละลายหมดแล้ว วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลเย็นตัวลง (สังเกตจากการใช้มือจับที่ขวดได้) แล้วจึงใส่ ethidium bromide (10 mg/ml) ปริมาณ 0.5 µl เขย่าให้เข้ากันเบาๆเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศหรือเกิดน้อยที่สุด จากนั้นเทใส่ในถาด (tray) ที่เตรียมไว้โดยมีหวี (comb) เป็นตัวทำให้เกิดช่องหรือหลุม (well) สำหรับหยอดตัวอย่าง ระวังอย่าให้หลุมทะลุ เพราะจะทำให้ตัวอย่างหลุดออกจากแผ่นเจล หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25-30 นาที นำ PCR product ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ10 µl ผสมกับ Blue/Orange 6Xloading dye ปริมาณ 2 µl (อัตราส่วน 5 ต่อ 1) ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมของแผ่น agarose gel และใส่ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการแยก โดยในการวิจัยนี้ใช้ 100 bp ladder หลังจากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ (volt) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) ทำการถ่ายรูปและบันทึกผลลงบนแผ่นบันทึกข้อมูล จากนั้นนำ PCR product ที่เหลืออีก 15 µl มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลที่มีความละเอียดมากขึ้นคือ 6% polyacrylamide gel

การเตรียม 6% polyacrylamide gel

ทำความสะอาดกระจกด้วย 95% ETOH เช็ดให้สะอาดด้วยกระดาษทิชชู่ โดยเช็ดไปในทิศทางเดียวกัน จากนั้นประกอบชุดอุปกรณ์กระจกทั้งหมดให้เข้าชุด ติดกระดาษกาวโดยรอบด้านข้างและด้านล่างของกระจกเพื่อไม่ให้เจลไหลออกจากกระจก วางชุดกระจกในแนวนอนตั้งฉากกับพื้นประมาณ 45 องศา แล้วนำส่วนผสมของ 6% polyacrylamide gel ซึ่งมีส่วนประกอบของสารละลายต่างๆดังแสดงในตารางที่ 3.2 ค่อยๆเทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ และใส่หวีเพื่อทำให้เกิดหลุม (well) เช่นเดียวกับ agarose gel และเพื่อให้ง่ายต่อการถอดหวีควรดึงหลังจากที่ปล่อยให้เจลแข็งตัว 15 นาที จากนั้นปล่อยให้เจลแข็งตัวอีกประมาณ 25-30 นาที

ตารางที่ 3.3 แสดงส่วนประกอบของ 6% Polyacrylamide Gel

สารเคมี	ปริมาตร*
40 % Acrylamide gel	6 ml
50xTAE	800 µl
25% APS (Ammoniumpersulfate)	1,280 µl
TEMED	32 µl
Sterile H_2O	Up to 40 ml

* ใช้กับแผ่นกระจกขนาด 20 x 20 นิ้ว

นำ PCR product ที่ให้ผลดีจากการตรวจสอบด้วย agarose gel ปริมาณ15 µl ผสมด้วย blue-orange loading dye for PAGE ปริมาณ 3 µl หยอดลงในหลุมของแผ่นเจลที่ที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ ประมาณ 16 ชั่วโมง นำ Polyacrylamide Gel ที่ได้ย้อมด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 5 mg/ml เป็นเวลา 45-50 นาที จากนั้นนำไปตรวจดูตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต ทำการถ่ายรูปและบันทึกลงแผ่นบันทึกข้อมูลเพื่อนำไปใช้ในการอ่านผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.3 การอ่านผล

การอ่านผลชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากรูปถ่ายของ 6% Polyacrylamide Gel โดยพิจารณาจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของตัวอย่างไก่พื้นเมืองทั้ง 2 สายพันธุ์ใน microsatellite marker แต่ละตัว โดยเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตั้งแต่สั้นที่สุดไปจนถึงยาวที่สุดของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตัว ใช้แทนด้วยสัญลักษณ์ a ,b ,c ,d ,e ,f ,g ,h ,I ,j และ k ตามลำดับ หมายถึง อัลลีลแต่ละตัวของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นั้นๆ

ใช้โปรแกรม Photo-capt ในการประมาณขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยเทียบจากดีเอ็นเอมาตรฐานโดยทำการระบุขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อไว้เป็นตัวเปรียบเทียบจากนั้นจึงระบุแถบดีเอ็นเอที่ต้องการจะอ่านขนาด โปรแกรมจะทำการอ่านขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยเทียบจากดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผ่าน gel electophoresis แผ่นเดียวกับดีเอ็นเอที่ต้องการอ่านผล

จากนั้นนำข้อมูลต่างๆมาทำการวิเคราะห์ผลเพื่อหาค่าความถี่อัลลีล (allele frequency), ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) ค่า PIC (Polymorphism Information Content) และตรวจรูปแบบอัลลีล ค่าความถี่อัลลีล จีโนไทป์ (genotype) ความถี่ของจีโนไทป์ของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ โดยตรวจหาแบบแยกเพศ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. จำนวนอัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง

2. คำนวณค่าความถี่อัลลีล (Allelic frequency) microsatellite marker ในแต่ละตำแหน่งของไก่ชีและไก่แดงโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความถี่อัลลีล (allelic frequency ; AF)} = \frac{2n^{homozygote} + n^{heterozygote}}{2n^{total}}$$

โดยที่ $n^{homozygote}$ คือ จำนวนไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์แบบ homozygote

$n^{heterozygote}$ คือ จำนวนไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygote

n^{total} คือ จำนวนไก่พื้นเมืองทั้งหมด

3. ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต (Observed heterozygosity; H_o) เพื่อวัดความหลากหลายของการกระจายของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง สำหรับแต่ละประชากรของไก่ชีและไก่แดง คำนวณได้จากสูตรดังนี้ (Nei et al., 1978)

$$H_o = 1 - \sum_{i=1}^{k} x_i^2$$

โดยที่ H_o = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต

X_i = ความถี่อัลลีลที่ i

k = จำนวนของอัลลีล

4. คำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้จากทฤษฎี (Expected heterozygosity; H_e) เพื่อวัดความหลากหลายของการกระจายของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง สำหรับแต่ละประชากรของไก่ชีและไก่แดง คำนวณได้จากสูตรดังนี้ (Nei et al., 1978)

$$H_e = [2n/2n-1]\left[1-\sum_{i=1}^{k} X_i^2\right]$$

โดยที่ H_e = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎี

X = ความถี่อัลลีล

n = จำนวนตัวสัตว์ต่อสายพันธุ์

k = จำนวนของอัลลีล

และทำการคำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้เฉลี่ยที่ได้จากทฤษฎี $(\overline{H_e})$ สำหรับแต่ละประชากร เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์ ตามสูตร

$$\overline{H_e} = \frac{\sum H_e}{number\,of\ locus}$$

5. คำนวณค่า Polymorphism Information Content (PIC) เพื่อประเมินค่าประสิทธิภาพการนำไปใช้ประโยชน์ของ marker และประเมินความหลากหลายของชิ้นส่วนอัลลีล ในแต่ละตำแหน่ง สำหรับแต่ละประชากรของไก่ชีและไก่แดง คำนวณได้จากสูตร ดังนี้ (Botstein et al.,1980)

$$PIC = 1-\left[\sum_{i=1}^{k} X_i^2\right]-\sum_{i=1}^{k-1}\sum_{j=i+1}^{k} 2X_i^2X_j^2$$

โดยที่ X_i = ความถี่อัลลีลของอัลลีลที่ i

X_j = ความถี่อัลลีลของอัลลีลที่ j

k = จำนวนของอัลลีล