บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้โคพันธุ์แท้เป็นสัตว์ทดลอง 2 สายพันธุ์ ได้แก่

1.1 พันธุ์พื้นเมืองไทย เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 70 ตัว โดยได้รับความอนุเคราะห์จากหมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคุณนัทธมน ตั้งจิตวัฒนาชัย ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างโคพื้นเมืองไทยจากหน่วยบำรุงพันธุ์สัตว์บุณฑริก อำเภอบุณฑริก จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งทั้ง 2 แห่งเป็นสถานที่รวบรวมโคพื้นเมืองไทยภาคอีสาน

1.2 พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพศผู้และเพศเมีย จำนวน 52 ตัว โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ที่ได้รวบรวมตัวอย่างโคโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนระดับเลือด 100 จากฟาร์มโชคชัย และฟาร์มจากจังหวัดเชียงใหม่

2. การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างจากสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 แบบ คือ ตัวอย่างเลือด หรือตัวอย่างชิ้นเนื้อ ทั้งนี้ตัวอย่างจากสัตว์ทดลองที่ได้รับความอนุเคราะห์นั้นจากงานวิจัยด้านอนูพันธุศาสตร์จะเป็นตัวอย่างเลือด และตัวอย่างจากงานวิจัยด้านโภชนศาสตร์สัตว์จะเป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อ โดยมีรายละเอียดของวิธีการเก็บตัวอย่างดังต่อไปนี้

2.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากโคซึ่งมี 2 สายพันธุ์ คือ โคพันธุ์พื้นเมืองไทยจากหมวดโคเนื้อ และโคโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนจากฟาร์มโชคชัย ปริมาตร 10 ml/ตัว/หลอด โดยเจาะเก็บตัวอย่างเลือดใส่หลอดทดลอง ขนาด 15 ml ที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (0.5M EDTA) จำนวน 1 ml/หลอด กลับหลอดไปมาประมาณ 1 นาที เก็บใส่กระติกน้ำแข็งแล้วนำมายังห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาว และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 C° เพื่อรอการสกัด DNA ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากโคพื้นเมืองไทยที่มาจากงานวิจัยของคุณนัทธมน โดยตัดบริเวณส่วนเนื้อแดงประมาณ 1 mm^3 แช่ใน Absolute ethanol เก็บที่อุณหภูมิห้อง นำชิ้นเนื้อที่ต้องการสกัด DNA มาหั่น หรือเติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) แล้วบดให้ละเอียด เติมสารละลาย cell lysis

(PUREGENE®, USA) ประมาณ 300 µl หรือให้ท่วมชิ้นเนื้อ และเติม 1 mg proteinase K 10 µl vortex ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65°C ข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่เพื่อนำไปสกัด DNA

3. การสกัด DNA

สกัด genomic DNA ตามวิธีการของมนต์ชัยและคณะ (2551) ดังนี้ นำตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือของเหลวที่ได้จากการบ่มชิ้นเนื้อปริมาตร 60 µl ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม Solution I (4%Silica gel in GuHCl, 1M Tri-HCl (pH = 8.0), 0.5M EDTA (pH = 8.0)) 640 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที (เขย่าหลอดทดลองทุก 5 นาที) vortex ประมาณ 5–10 วินาที จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง (ส่วนที่ไม่ใช่ สีขาวขุ่นที่ติดอยู่ก้นหลอด) เติม Solution II (70%EtOH, 10 mM NaCl) 1,000 µl แล้วนำไป vortex ประมาณ 5–10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (หากสารละลายยังไม่ใส อาจต้องล้างด้วย Solution II ซ้ำ แต่ล้างไม่เกิน 3 รอบ) เติม Solution III (95% Ethanol) 1,000 µl vortex ประมาณ 5–10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย TE buffer (Tri-HCl (pH = 8.0), 0.5M EDTA (pH = 8.0)) ประมาณ 15–50 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C นาน 4-6 ชั่วโมง vortex ประมาณ 5–10 วินาที ปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอดใหม่ แล้วจึงตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis เก็บตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ในอุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป ซึ่ง DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวอย่างเลือดหรือตัวอย่างชิ้นเนื้อสามารถใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้โดยให้ผลไม่แตกต่างกัน

4. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยนำ DNA ที่สกัดได้ปริมาตร 1 µl ผสมกับ 1X loading dye 3 µl หยอดลงในหลุมบน 0.8% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 0.5X TAE แยกขนาดของ DNA โดยใช้ความต่างศักย์ ไฟฟ้าที่ 100 โวลล์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นย้อมด้วย gel star (Gelstar INC. NY) เพื่อดูการเคลื่อนที่ของแถบ DNA ภายใต้แสง UV โดยแถบ DNA ที่มีความเข้มแสงคมชัด แสดงถึง DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นสูง มีความบริสุทธิ์ และไม่มีโปรตีนปนเปื้อน ส่วนแถบ DNA ที่มีความเข้มแสงไม่ชัดเจน แสดงถึง DNA ที่สกัดได้มีโปรตีนปนเปื้อน มีปริมาณน้อย และเมื่อนำผลจากแถบ DNA ที่ปรากฏมาประมาณความเข้มข้นของ DNAโดยเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น ในการทดลองครั้งนี้ใช้ λDNA/*HIND* III ความเข้มข้น 1 mg/µl เป็น DNA มาตรฐาน นำมา

หยอดลงบน 0.8% agarose gel ซึ่งจะปรากฏแถบสว่าง 8 แถบ ที่ขนาดคู่เบสและความเข้มข้นแตกต่างกัน แล้วเทียบกับความเข้มข้นของ DNA ตัวอย่างจากแถบสว่างภายใต้ UV ที่ได้ และคำนวณสัดส่วนความเข้มข้นตามตารางที่ 3.1 (มนต์ชัยและคณะ, 2551)

ตารางที่ 3.1 ขนาดคู่เบสและความเข้มข้นโดยประมาณของ λDNA/*HIND* III (1 µg)

ขนาดคู่เบส (bp)	ความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นทั้งหมด (1 µg)	ความเข้มข้น (µg)	ความเข้มข้นโดยประมาณ (µg)
23,130	23,130 x 1 / 48,502	0.477	0.50
9,416	9,416 x 1 / 48,502	0.194	0.20
6,557	6,557 x 1 / 48,502	0.135	0.15
4,361	4,361 x 1 / 48,502	0.089	0.10
2,322	2,322 x 1 / 48,502	0.047	0.05
2,027	2,027 x 1 / 48,502	0.041	0.04
564	564 x 1 / 48,502	0.011	0.01
125	125 x 1 / 48,502	0.003	0.003
48,502			

ที่มา : มนต์ชัยและคณะ (2551)

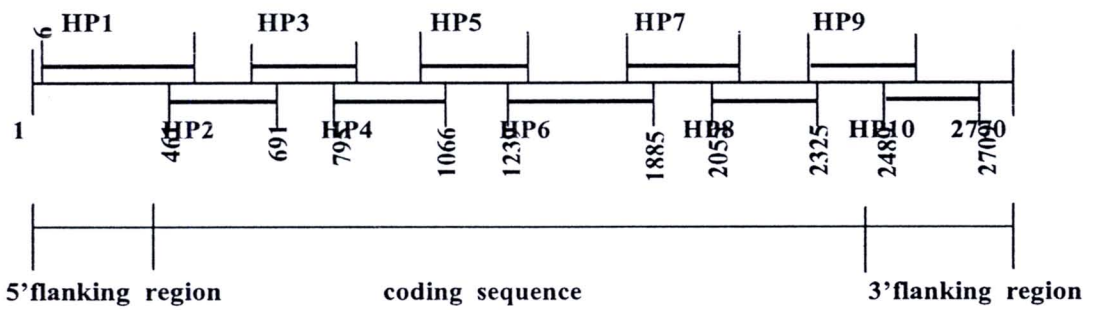
5. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ไพรเมอร์ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน HSP70-2 ซึ่งรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www .ncbi.nlm.nih.gov.) accession number คือ BTU02892 (Grosz, 1993) เป็นต้นแบบในการศึกษาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ GENEFISH2 (http://bibiserv.techfak.un-ibielefeld.de/genefisher2 submission.html) และ Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3) พิจารณาอุณหภูมิ annealing และเปอร์เซ็นต์ GC ที่เหมาะสม เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับ DNA ต้นแบบและจำลองเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่ต้องการได้ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอ-ไทด์กับฐานข้อมูล เพื่อตรวจสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อยีนที่ใช้ศึกษาด้วย NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov /Blast.cgi) และตรวจสอบโอกาสที่จะเกิด hairpin loop และโอกาส ที่ไพรเมอร์จะจับกันเองระหว่างเกิดปฏิกิริยา (Self dimer) (ปรีชา,2551) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligoanalyzer (http://www.idtdna.com

/analyzer/applications/oligoanalyzer/) ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ (HP1-HP10) ซึ่งครอบคลุมบริเวณต่าง ๆ ของยีนดังนี้

1) 5'flanking region รวมถึง coding sequence ส่วนต้น จำนวน 1 คู่ (HP1)
2) coding sequence จำนวน 7 คู่ (HP2-HP8)
3) coding sequence ส่วนปลาย รวมถึง 3' flanking region จำนวน 1 คู่ (HP9)
4) 3'flanking region จำนวน 1 คู่ (HP10)

การออกแบบไพรเมอร์ให้มีบางส่วนของแต่ละไพรเมอร์ซ้อนทับกัน เพื่อประโยชน์ในการศึกษาและจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนทับกันเป็นตัวเชื่อมต่อในการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ความสมบูรณ์ ซึ่งมีบริเวณศึกษาของแต่ละช่วงไพรเมอร์ดังภาพที่ 3.1 และตารางที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 บริเวณที่ใช้ในการศึกษายีน HSP70-2 ของแต่ละไพรเมอร์

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีน HSP70-2

Primer	Sequence 5' → 3'	Size of PCR product (bp)	Annealing temperature (°C)	Position	Electrophoresis protocol (volt/time)
HP1	F: CTCCTGTTTCCTCCAGCGAA R: GTCGTTGGCGATGATCTCCA	517	63	จากตำแหน่งที่ 6-523 บริเวณ 5'flanking region และ coding sequence	200V 360 min
HP2	F: GCACCACCTACTCCTGCGTA R: CTTCATGTCCGACTGCACCA	230	66	จากตำแหน่งที่ 461-691 บริเวณ coding sequence	200V 180 min
HP3	F: CGCAGAACACGGTGTTCGA R: GTGATCACCGCGTTGGTCA	247	62	จากตำแหน่งที่ 614-862 บริเวณ coding sequence	200V 180 min
HP4	F: GCTGACCAAGATGAAGGAGA R: GTCGATCGTCAGGATGGACA	271	61	จากตำแหน่งที่ 795-1066 บริเวณ coding sequence	200V 180 min
HP5	F: GTTCGACGTGTCCATCCTGA R: GAACAGGGAGTCGATCTCCA	253	64	จากตำแหน่งที่ 1038-1291 บริเวณ coding sequence	200V 180 min
HP6	F: GAGAACCTTGTCGTCCAGCA R: CAGGATGCCATTGGCATCGA	646	66	จากตำแหน่ง 1239-1885 บริเวณ coding sequence	200V 390 min
HP7	F: AGATCGAGGTGACCTTCGACA R: CTTCAGCCCCTCATCCTCCA	260	66	จากตำแหน่ง 1844-2304 บริเวณ coding sequence	200V 240 min
HP8	F: GTCGTACGCCTTCAACATGA R: AGACCCAGAGCCCCCTTTA	271	66	จากตำแหน่ง 2055-2325 บริเวณ coding sequence	200V 240 min
HP9	F: GTGTAACCCCATCATCAGCAGA R: TCGAAACATTCTGGTGAACACA	290	64	จากตำแหน่ง 2232-2522 บริเวณ coding sequence และ 3'flanking region	200V 240 min
HP10	F: GTTATAGTGAGTGTGTTCACCAGA R: AAGCCATTATCCCTCCCCAA	238	64	จากตำแหน่ง 2489-2709 บริเวณ 3'flanking region	200V 180 min

6. การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มชิ้นส่วน DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน HSP70-2 ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งในแต่ละ reaction ประกอบด้วย DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโค (50 ng/µl DNA template) ปริมาตร 1 µl, 10X PCR buffer 1µl, 50 mM $MgCl_2$ 0.8 µl, 1 mM/each dNTPs 1 µl, 1 µM forward primer และ reverse primer ที่ออกแบบจากตารางที่ 3.1 อย่างละ 1 µl, 5 U/µl *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience) 0.1 µl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย sterile water 4.1 µl ได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 10 µl โดยมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้

เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95^{0}C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ มีรายละเอียด ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95^{0}C เป็นเวลา 45 วินาที primer annealing อุณหภูมิของแต่ละไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เป็นเวลา 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C เป็นเวลา 45 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้ว นำ PCR product ที่ได้มา ตรวจการปรากฏของแถบ DNA ใน 2% agarose gel และเก็บ PCR-product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C หรือ -20^{0}C เพื่อนำไปวิเคราะห์รูปแบบของยีน HSP70-2 ด้วยวิธี SSCP

7. การตรวจสอบ PCR product ด้วย Agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบ PCR product ด้วยการเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน (DNA marker ; 100bp DNA ladder (GeneRuler^{TM}, Fermentas)) ที่ทราบขนาดและความเข้มข้นแล้ว โดยใช้ PCR product ปริมาตร 2 µl ผสมกับ 1X loading dye 4 µl หยอดลงในหลุมบนแผ่น 2% agarose gel ใน 0.5X TAE buffer แยกขนาดของ DNA โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลล์ เป็นเวลา 25-30 นาที จากนั้นนำ agarose gel ที่ได้ไปย้อมสีด้วย gel star (Gelstar INC., NY) เพื่อตรวจดูการเคลื่อนที่ของแถบ DNA ภายใต้แสง UV โดยเครื่อง Gel document (IN Genius Syngene Bioimagine) ถ่ายรูปและบันทึกภาพการปรากฏของแถบ DNA

8. การตรวจสอบความหลากหลายของ DNA ด้วย Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

นำ PCR product มาตรวจสอบรูปแบบด้วยวิธี SSCP โดยให้ความร้อนแก่ PCR product ที่อยู่ใน SSCP loading dye (0.0006%Bromo phenol blue, 0.0007%Xylencyanol, 5M NaOH, 94%Formamide, dH_2O)ในอัตราส่วน 1 : 1 ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที เพื่อทำให้ DNA อยู่ในสภาพสายเดี่ยว แล้วทำให้เย็นอย่าง รวดเร็วโดยวางบนน้ำแข็ง จากนั้นทำ electrophoresis โดยใช้ตัวอย่าง PCR product ที่อยู่ในสภาพสายเดี่ยวปริมาตร 3 µl หยอดลงบนแผ่น 5%nondenaturing polyacrylamide gel แนวตั้งใน 0.5X TBE buffer กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้อมแผ่นเจลด้วย gel star (Gelstar INC, NY) เพื่อดูรูปแบบของ PCR-SSCP product ที่ปรากฏภายใต้แสง UV โดยเครื่อง gel document (IN Genius Syngene Bioimagine) แล้วถ่ายรูป และบันทึกข้อมูลรูปแบบ SSCP ที่ปรากฏในแต่ละไพรเมอร์ในโคแต่ละตัว

9. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA (DNA sequencing)

นำข้อมูลรูปแบบ PCR-SSCP ที่ปรากฏในแต่ละไพรเมอร์มาจัดกลุ่มและบันทึกผลสุ่มตัวอย่างจากรูปแบบที่จัดกลุ่มแล้วในโคพื้นเมืองไทย และโคโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน รูปแบบละ 1 ตัวอย่าง/สายพันธุ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (macrogen, South Korea และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคทั้ง 2 สายพันธุ์แต่ละรูปแบบมาจัดเรียงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน กลุ่มรูปแบบเดียวกัน กลุ่มไพรเมอร์เดียวกัน และลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนต้นแบบด้วยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2, BioEdit และ ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk /Tools/clustalw2/index.html) จากนั้นจัดกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi) เพื่อตรวจสอบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นต้นแบบ

10. การจำแนกกลุ่มด้วยค่าความต่างทางพันธุกรรมและสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

10.1 การจำแนกกลุ่มพันธุกรรมและสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ด้วยข้อมูลการจัดกลุ่มรูปแบบ PCR-SSCP

นำข้อมูลการจัดกลุ่มรูปแบบ PCR-SSCP ในแต่ละไพรเมอร์ที่บันทึกมาแปลงข้อมูลให้อยู่ในข้อมูล binary data โดยแทนค่า 0 หรือ 1 เมื่อ 0 คือ การไม่ปรากฏของรูปแบบในไพรเมอร์นั้น และ 1 คือ การปรากฏรูปแบบในไพรเมอร์นั้น ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ค่าความต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1 แล้วทำการจัดกลุ่มข้อมูล

10.2 การจำแนกกลุ่มพันธุกรรมและสร้างแผนภาพ phylogenetic tree ด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อ 9 มาวิเคราะห์ค่าความต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbo- joining (NJ) และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม DNAMAN version 5.2.2 แล้วทำการจัดกลุ่มข้อมูล

นำกลุ่มแผนภาพ phylogenetic tree จากข้อมูลรูปแบบ SSCP กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มา เปรียบเทียบหาความสอดคล้องในแต่ละกลุ่ม และประเมินความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากรที่ศึกษา แล้วสุ่มเลือกตัวอย่างในแต่ละกลุ่มมาเป็นตัวแทนสำหรับสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมร่วมกับยีน HSP70 ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เพื่อวิเคราะห์ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มานั้นสอดคล้องกับยีน HSP70 ในสิ่งมีชีวิตใดบ้าง

11. การวิเคราะห์หาเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme analysis)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่พบความแตกต่างในโค 2 สายพันธุ์จากข้อ 9 มาตัดด้วยเอนไซม์ ที่มีตำแหน่งตัดที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม DNAMAN version 5.2.2 และ NEB cutter v2.0 (http://tools. neb.com/NEBcutter2/) เพื่อนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษา marker สำหรับใช้ในการตรวจสอบโคที่มีความสามารถในการทนร้อน

12. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยพิจารณาข้อมูลความถี่ที่พบจากรูปแบบ SSCP ในแต่ละไพรเมอร์จากโคแต่ละตัวในแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี Chi – square โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปทางสถิติ SAS (SAS, 1997) เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของโคและความถี่ที่พบจากรูปแบบของแต่ละไพรเมอร์

13. สถานที่ทำงานวิจัย

13.1 หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

13.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

14. ระยะเวลาทำงานวิจัย

ทำการทดลองในระหว่างเดือน กันยายน พ.ศ. 2551 ถึงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2553