

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

สุกรสายพันธุ์ Duroc จำนวน 419 ตัว และสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ คือ Large White x Landrace x Duroc จำนวน 547 ตัว รวมทั้งหมด 966 ตัว

1.1 ข้อมูลลักษณะปรากฏ

ข้อมูลถูกบันทึกจากสุกร ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อ (drip loss)

1.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อ

ตัวอย่างเนื้อถูกเก็บจากกล้ามเนื้อสุกรในส่วนของ *longissimus dorsi* ระหว่างซี่โครงซี่ที่ 9 และ 10 จากโรงฆ่าสัตว์

1.3 การหาค่า drip loss

ชิ้นเนื้อเริ่มต้น (Wd1) ของกล้ามเนื้อสุกรที่เก็บจากบริเวณ *longissimus dorsi* นำเนื้อสุกรห่อด้วยผ้าก๊อต เก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น โดยให้ปลายท่อผ้าก๊อตห่างจากก้นถุงประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นในลักษณะแขวน ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุงและผ้าก๊อต ทำการชั่งน้ำหนักของเนื้อสุกร จากนั้นทำการชั่งน้ำหนัก (Wd2) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) จากสูตร $\text{Drip loss (\%)} = (\text{Wd1} - \text{Wd2}) / \text{Wd1} \times 100$ (Honikel *et al.*, 1998) และทำการวัดค่า pH ของเนื้อ ด้วยเครื่อง pH มิเตอร์

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 สารเคมี

- 1) 10X PCR buffer, *Taq* polymerase (Fermentas, USA)
- 2) Acetic acid (Merck, Germany)
- 3) Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)

- 4) Agar-Agar (O.V. chemical, Thailand)
- 5) Agarose (Gibco/BRL, USA)
- 6) Ammonium persulfate (USB corporation, USA)
- 7) Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)
- 8) Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
- 9) Boric acid (Merck, Germany)
- 10) dNTPs (Fermentas, USA)
- 11) EDTA (Fisher Scientific, USA)
- 12) Ethanol (Merck, Germany)
- 13) Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)
- 14) Formaldehyde 37% (Merck, Germany)
- 15) Lambda DNA/AvaII (Fermentas, USA)
- 16) Isopropanol (Merck, Germany)
- 17) Magnesium chloride (Merck, Germany)
- 18) Nitric acid (Merck, Germany)
- 19) N,N-dimethylformamide (Bio Basic Inc, Canada)
- 20) Phenol (Merck, Germany)
- 21) Primers (Bio Basic Inc, Canada)
- 22) Proteinase K (Invitrogen, USA)
- 23) Silver nitrate (Merck, Germany)
- 24) Sodium acetate (Merck, Germany)
- 25) Sodium bicarbonate (Merck, Germany)
- 26) Sodium chloride (Merck, Germany)
- 27) Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- 28) TEMED (USB corporation, USA)
- 29) Tris (USB corporation, USA)

2.2 สารละลาย

- 1) 0.5M EDTA pH 8.0
- 2) 10X TBE buffer
- 3) 10X TAE buffer
- 4) Digestion buffer

- 5) Phosphate-buffered saline (PBS)
- 6) TE buffer

2.3 เอนไซม์

- 1) *Hin6I* (Fermentas, USA)
- 2) *Hin6I* (Fermentas, USA)
- 3) *BsrB1* (Fermentas, USA)
- 4) *BcnI* (Fermentas, USA)

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 μ l, CappAero, Denmark
- 16) Pipette, 20, 200, 1000 μ l, Gilson, France
- 17) Refrigerated Bench Top Centrifuge, Model Universal 32 R, Hettich, Germany
- 19) Vortex mixer, Genie II Model G560E, Scientific Industries, USA

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สุกรสายพันธุ์ Duroc จำนวน 419 ตัว และสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Large White x Landrace x Duroc) จำนวน 547 ตัว รวมทั้งหมด 966 ตัว ถูกสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex® extraction ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

- 1) นำตัวอย่างเนื้อ ขนาด 0.5 x 0.5 cm ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 ml
- 2) ทำการเขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วจึงเทส่วนที่เป็นของเหลวข้างบน (supernatant) ทิ้งเหลือไว้แต่ตะกอน (ทำ 2 รอบ)
- 3) จากนั้นเติม 10% Chelex® solution ปริมาณ 50 µl แล้วเติมน้ำอีก 200 µl และ potenase k 2.5 µl จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 56 °C ซ้ำมคืน
- 4) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป
- 5) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอบน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6 % และส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง gel documentation และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

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

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA} = \text{ค่า OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

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 จะต้องมียค่าประมาณ 1.8

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/μl) ของสุกรทั้ง 3 สายพันธุ์ (สุกรสายพันธุ์ Duroc และสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์) จำนวนทั้งหมด 966 ตัว ถูกใช้เป็น template ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีนโดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังตารางที่ 1 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *LEP*, *IGF2*, *PRKAG3* และ *RYR* ของสุกร

Primer	PCR Cycle	Sequence
<i>LEP</i> (Neuenschwander <i>et al.</i> , 1996)	94 °C 4min/ 94 °C 30s/ 58 °C 30 s/ 72°C 30s/72 °C 5min จำนวน 40 รอบ	forward primer 5'-AGCAGTCTGTCTCCTCCAAA-3' reverse primer 5'-CGATATTTGGATCACATTCTG-3'
<i>IGF2</i> (Vykoulaková <i>et al.</i> , 2005)	94 °C 4min/ 94 °C 30s/ 58 °C 30 s/ 72°C 30s/72 °C 5min จำนวน 40 รอบ	forward primer 5'-CACAGCAGGTGCTCCATCGG-3' reverse primer 5'-GACAGGCTGTCATCCTGTGGG-3'
<i>PRKAG3</i> (Lu-Sheng <i>et al.</i> , 2004)	94 °C 4min/ 94 °C 30s/ 59 °C 40 s/ 72°C 30s/72 °C 5min จำนวน 40 รอบ	forward primer 5' GGAGCAAATGTGCAGACAAG-3' reverse primer 5'-CCCACGAAGCTCTGCTTCTT-3'
<i>RYR</i> (Vögeli <i>et al.</i> , 1994)	94 °C 4min/ 94 °C 30s/ 58 °C 30 s/ 72°C 30s/72 °C 5min จำนวน 35 รอบ	forward primer 5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCTACCA- 3' reverse primer 5'-ATTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAG-3'

Template DNA (100 ng/μl)	1.00	μl
10X PCR buffer	2.00	μl
Forward primer (10 pmol/μl)	0.40	μl
Reverse primer (10 pmol/μl)	0.40	μl
dNTP (2.5 mM)	0.50	μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.20	μl
<i>Taq</i> DNA polymerase (Fermentas 5U/μl)	0.10	μl
dH ₂ O	<u>14.40</u>	μl
ปริมาตรรวม	<u>20.00</u>	μl

ตรวจสอบผลผลิต PCR บน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6 % และส่องภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง gel documentation

3.4 PCR-RFLP

ตารางที่ 3.2 การตรวจสอบความผันแปรของทั้ง 4 ยีน ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ยีน	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	จุดตัดของเอนไซม์
<i>LEP</i>	<i>HinfI</i>	G ∇ ANTC
<i>IGF2</i>	<i>BcnI</i>	CC ∇ SGG
<i>PRKAG3</i>	<i>BsrB1</i>	CC ∇ GCTC
<i>RYR</i>	<i>Hin6I</i>	GCG ∇ C



PCR product	2.50	μ l
enzyme (10U/ μ l)	0.05	μ l
10X buffer Tango	0.50	μ l
dH ₂ O	1.95	μ l
ปริมาตรรวม	5.00	μl

ป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C ซ้ำคืน แล้วทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 6% ด้วยกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลานาน 50 นาที และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining โดยมีรายละเอียดดังนี้

- 1) แช่แผ่นเจลในสารละลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 10% จำนวน 50 มล. นาน 10 นาที
- 2) เติมกรดไนตริกความเข้มข้น 1% ปริมาณ 50 มล. นาน 10 นาทีแล้วล้างด้วย deionized water จำนวน 3 ครั้ง
- 3) แช่ด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO₃) เข้มข้น 0.1% จำนวน 100 มล. ซึ่งถูกผสมด้วยเฟอรัมัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 μ l เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย deionize water จำนวน 2 ครั้ง
- 4) ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ความเข้มข้น 3% ที่มีส่วนผสมเฟอรัมัลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 μ l ที่เจือจางด้วย deionize water ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2 ครั้งๆละ 50 มล.



5) จากนั้นแช่เจลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 3% ที่มี ส่วนผสมฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้น 37% จำนวน 150 μl ปริมาตร 50 มล. จนกระทั่งปรากฏแถบ แบนดีเอ็นเอ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10% นาน 20 วินาที และล้าง แผ่นเจลด้วย deionize water 3 ครั้งก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง gel dryer

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.5.1 การวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์ และความถี่อัลลีลของยีน *LEP*, *IGF2*, *PRKAG3* และ *RYR*

ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน ถูกคำนวณดังนี้ โดยความถี่ของแต่ละ จีโนไทป์คำนวณได้จากสูตร

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

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

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

เมื่อ $f(AB)$ 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

3.5.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอลักษณะ drip loss

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะ drip loss ถูกวิเคราะห์โดยใช้ Proc GLM procedure ของโปรแกรม SAS v.9.0 ในการวิเคราะห์อิทธิพล ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะ drip loss ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

$$y_{ij} = \mu + \text{genotype}_i + \text{breed}_j + \text{sex}_k + e_{ijk}$$

เมื่อ	y_{ij}	คือ ค่าสังเกตของลักษณะปรากฏ
	μ	คือ ค่าเฉลี่ยของประชากร
	genotype_i	คือ ปัจจัยคงที่ของจีโนไทป์บน DNA markers
	breed_j	คือ ปัจจัยเนื่องสายพันธุ์
	sex_k	คือ ปัจจัยเนื่องจากเพศ
	e_{ijk}	คือ residual error