สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกเพศนกแก้วปากขอ

Development of Polymerase Chain Reaction Technique for Sex Identification of Psittacine Birds

โดย

อ.น.สพ. ชนาธิป ธรรมการ
ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์
ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์

RCH
SF
473
.P3
ช149ก 'ฉ.1
เลขหมู่
เลขทะเบียน 120235
วัน, เดือน, ปี 10 ก.พ. 2555

พ.ศ. 2554

b.12339416
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ
เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกเพศนกแก้วปากขอ
Development of Polymerase Chain Reaction Technique for Sex Identification of Psittacine Birds

ปัจจุบันนกสวยงามเป็นสัตว์เลี้ยงที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง การแยกเพศในนกสวยงามถือเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเพาะขยายพันธุ์ ซึ่งวิธีการแยกเพศนั้นสามารถทำได้โดยวิธีการดูจากการสังเกตทางกายวิภาค การจับตะเกียบ การสังเกตพฤติกรรม การตรวจสอบโครโมโซม การสังเกตุพฤติกรรม การตรวจสอบฮอร์โมน และการตรวจด้วยเทคนิค DNA และอณูพันธุศาสตร์ ปัจจุบันวิธีการตรวจแยกเพศนกที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือการใช้พีซีอาร์ที่อาศัยเทคนิคการใช้ยีน CHD เป็นเครื่องตรวจสอบ จากผลการทดสอบพบว่านกพันธุ์อาฟริกันเกรย์สามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 641 bp ส่วนแบนล่างของเพศมีขนาด 457 bp นกพันธุ์เลิฟเบิร์ดสามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 361 bp ส่วนแบนล่างของเพศเมียมีขนาด 305 bp นกพันธุ์เร้ครั้มสามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 366 bp ส่วนแบนล่างของเพศเมียมีขนาด 310 bp นกพันธุ์ซันคอนัวร์สามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 386 bp ส่วนแบนล่างมีขนาด 321 bp จากลำดับเบสที่ได้จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับใช้ในการทดลองคือ ไพรเมอร์ KMITL-1, KMITL-2 และKMITL-R นำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ทั้ง 3 ไพรเมอร์ไปทดสอบแยกเพศในนกพันธุ์ต่างๆที่ทราบ

เพศแน่ชัดแล้ว ได้แก่ Lovebird, Red-rumped Parrot, Sun Conure, African Grey Parrot, Green-winged Macaw และAlexandrine Parakeet พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ชุดใหม่ดังกล่าวแยกเพศนกได้ยกเว้น African Grey Parrot และAlexandrine Parakeet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ นายอำพล กล่อมปัญญา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง คุณอังคณา ทุมดี ที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเนื้อสัตว์ นางวสาวศลิษา วงศ์บุปผา นางสาวอุมานันท์ เทวฤทธิ์ นายทศวัชร์ สุทธิศรี และนางสาวทิพยาภรณ์ กุสี นักศึกษาในหลักสูตรสัตวศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้การช่วยเหลือในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจนทำให้การทำวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

อ.น.สพ. ชนาธิป ธรรมการ
ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์
ผศ.ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์

พฤษภาคม 2554

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	15
สรุป	22
ข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การคัดแยกเพศนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CHD-linked เป็นไพรเมอร์ 7
2 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่กับนกพันธุ์ต่างๆ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลผลิต PCR โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ CHD 1 ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P89	9
2	ผลของ PCR-SSCP ในนก *A. Cooperii* โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ CHD 1 ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P8	10
3	ผลผลิต PCR บริเวณ CHD ยีน ในนก S. c. *hoya*	10
4	การคัดแยกเพศนกอินทรีย์ S. c. *hoya*	11
5	ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์อาฟริกันเกรย์	16
6	ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์เลิฟเบิร์ด	17
7	แสดงผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์เลิฟเบิร์ด เร้ดรั้ม และซันคอนัวร์	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในการจำแนกเพศนกแก้วปากขอ

Development of Polymerase Chain Reaction Technique for Sex Identification of Psittacine Birds

บทนำ

ปัจจุบันนกสวยงามถือเป็นสัตว์เลี้ยงที่ได้รับความนิยมมากชนิดหนึ่ง มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายโดยได้รับความนิยมทั้งที่เลี้ยงเพียงไม่กี่ตัวเพื่อเป็นสัตว์เลี้ยงภายในบ้าน หรือเลี้ยงเป็นจำนวนมากเพื่อวัตถุประสงค์ในเชิงการค้าในรูปแบบของของฟาร์มหรือสวนสัตว์ ปัจจุบันพบว่านกสวยงามได้รับความนิยมมากขึ้นเรื่อยๆ มีการพัฒนาสายพันธุ์ รูปแบบการเลี้ยงและการจัดการตลอดจนการตลาดซึ่งมีมูลค่าซื้อขายสูงจนอาจถือได้ว่านกสวยงามเป็นสัตว์เศรษฐกิจทางเลือกชนิดหนึ่ง ซึ่งในอนาคตอาจมีการพัฒนาจนการเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคต

สำหรับวิธีการเพาะขยายพันธุ์นกสวยงามนั้นปัจจุบันพบว่านกหลายชนิดสามารถเพาะและขยายพันธุ์ได้ภายในฟาร์มเพาะเลี้ยง ซึ่งนกแต่ชนิดจะมีวิธีและเทคนิคในการเพาะขยายพันธุ์ที่แตกต่างกันไป ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการเพาะขยายพันธุ์คือการจับคู่ผสมพันธุ์ ซึ่งโดยปกติแล้วนกที่อยู่ตามธรรมชาติจะสามารถจับคู่ผสมพันธุ์กันเองได้โดยอิสระ แต่เมื่อมีการนำนกเหล่านั้นมาเลี้ยงในพื้นที่จำกัดก็จะส่งผลให้นกเหล่านี้ไม่มีโอกาสที่จะเลือกจับคู่ได้ด้วยตัวเอง การจับคู่หรือเลือกคู่ผสมให้แก่นกนั้นส่วนใหญ่จะกระทำโดยเจ้าของนก

โดยปกติทั่วไปแล้วลักษณะที่แสดงออกภายนอก (Phenotype) ของนกนั้นอาจบ่งบอกถึงลักษณะเพศหรือไม่ก็ได้ นกบางชนิดจะมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Sexual dimorphism) แต่ก็มีนกจำนวนไม่น้อยที่ลักษณะภายนอกไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Sexual monomorphism) ซึ่งการที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียนี้เองทำให้พบว่าบ่อยครั้งที่การจับคู่โดยเจ้าของนกเกิดความผิดพลาด นกในกรงเดียวกันที่เจ้าของเป็นคนเลือกคู่ให้อาจเป็นเพศเดียวกัน ทำให้การเพาะและขยายพันธุ์ไม่ประสบความสำเร็จ และบางครั้งอาจทำให้นกที่นำมาเข้าคู่กันนั้นบาดเจ็บเพราะพฤติกรรมก้าวร้าวจนทำร้ายกันเอง อันเป็นผลมาจากเป็นเพศเดียวกันและอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ นกหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งนกปากขอขนาดใหญ่ซึ่งมีมูลค่าสูง ต้องใช้ระยะเวลานานกว่าจะถึงวัยเจริญพันธุ์ โดยบางพันธุ์อาจต้องอาศัยเวลาเกือบสิบปี หากมีการจับคู่โดยเจ้าของไม่ถูกต้องแล้วก็อาจทำให้เสียเวลาในการเพาะเลี้ยงโดยไม่ได้ผลผลิต ดังนั้นการตรวจแยกเพศนกเพื่อทำการจับคู่และผสมพันธุ์จึงมีความสำคัญสำหรับเจ้าของนกเป็นอย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลำดับเบสบนโครโมโซมเพศของนกในกลุ่มนกแก้วปากขอ
2. เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์
3. เพื่อทดสอบความสามารถของไพรเมอร์ที่ออกแบบในการแยกเพศนกในกลุ่มนกแก้วปากขอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญในการคัดแยกเพศ

นกอินทรีย์ (Eagles) เหยี่ยว (Hawke) เหยี่ยว (Harriers) แร้ง (Vultures) และ เหยี่ยว (Buzzards) เป็นนกที่อยู่ใน family *Accipitridae* order *Falconiformes* ที่ถือว่ามีความสำคัญในลำดับต้นของห่วงโซ่อาหารและนกเหล่านี้จะมีความรู้สึกที่ไวมากต่อการเปลี่ยนแปลง สภาพแวดล้อม การปนเปื้อนสารเคมี การขาดแคลนอาหาร สัดส่วนของเพศที่ผิดปรกติไป และการที่พืชถูกทำลาย ดังนั้นพวกมันจึงเป็นตัวชี้วัดถึงระบบนิเวศและคุณภาพของสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดีแต่ปัญหาในการศึกษานกในกลุ่มนี้คือไม่สามารถบอกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียได้จากขนาดของร่างกายและลักษณะภายนอกของเพราะฉะนั้นจึงเป็นเรื่องยากที่จะจำแนกสัดส่วนเพศในประชากรของมันได้ถึงแม้ว่าจะมีอยู่หลายวิธีที่เราสามารถกำหนดเพศของนกพวกนี้และนกพวก monomorphic ได้ แต่ค่อนข้างสิ้นเปลืองเวลา ค่าใช้จ่ายก็แพงและยังอาจทำให้นกได้รับบาดเจ็บอีกด้วย (Chang *et al.*, 2008 a)

ปัจจุบันได้มีการนำหลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR ใช้ในการจำแนกเพศนกอินทรีย์และนกชนิดอื่นๆ เนื่องจากเพศเมียจะมี W โครโมโซม ส่วน Z โครโมโซมพบได้ทั้งสองเพศ (เพศเมีย ZW ; เพศผู้ ZZ) จึงได้ใช้หลักการของเทคนิค PCR ในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะกับโครโมโซม W ในการตรวจแยกความแตกต่างระหว่างเพศนก ทำให้เกิดประโยชน์ทั้งต่อผู้เลี้ยงและเป็นการช่วยอนุรักษ์นกที่ใกล้จะสูญพันธุ์อีกด้วย

วิธีการในการคัดแยกเพศ

สุคนธ์ทิพย์และสายชล (2549) ได้กล่าวถึงวิธีการในการคัดแยกเพศนกด้วยกันอยู่หลายวิธี แต่ละวิธีก็มีความสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนี้

1. การสังเกตทางกายวิภาค (Anatomical) เป็นการแบ่งเพศที่ง่ายที่สุด โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าถึงสิ่งที่แตกต่างกันในตัวนกเพศผู้และเพศเมียโดยส่วนมากแล้วสิ่งที่จะสังเกตเห็นได้ง่ายคือขนาดตัว เช่น นกหงส์หยกสามารถที่จะสังเกตได้โดยดูที่จมูกของนกในนกตัวผู้เมื่อเจริญเต็มที่หรือพร้อมที่จะผสมพันธุ์จมูกนกจะเป็นสีฟ้าเข้มและในนกตัวเมียนั้นจมูกของนกเมื่อเจริญเต็มที่หรือพร้อมที่จะผสมพันธุ์จมูกของนกจะมีสีออกเป็นสีเนื้อหรือสีน้ำตาลเข้มสีดังกล่าวจะเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออยู่ในระยะผสมพันธุ์ในนกบางประเภทก็สามารถสังเกตได้จากสีเช่นกันเนื่องจากความแตกต่างในตัวสี(pigment)ที่มีลักษณะที่เข้มกว่าเพศเมียจึงมักสังเกตได้ว่านกตัวผู้มีสีสันที่เข้มมากกว่าตัวเมีย

2. การจับตะเกียบ (The Pelvic Bone Test) วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ค่อนข้างเช็คเพศได้ค่อนข้างแน่นอนในนกบางประเภท โดยมากแล้วมักจะใช้กับนกเล็ก เช่น Love bird เนื่องจากสามารถที่จะจับนกมาทดสอบได้ง่ายตัวเมียจะมีตะเกียบซึ่งอยู่ช่วงล่างลำตัวค่อนไปทางด้านหลังห่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่าตัวผู้วิธีการนี้ใช้แพร่หลายในเมืองไทย เนื่องจากสะดวกรวดเร็ว และประหยัด แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์เนื่องจากช่องว่างระหว่างตะเกียบของตัวเมียจะลดลงไม่สามารถบอกเพศได้ในขณะที่นกยังไม่โตเต็มวัย ต้องอาศัยความรู้ ความชำนาญ ของผู้ตรวจสอบและที่สำคัญคือ ไม่สะดวกสำหรับนกที่มีขนาดใหญ่

3. การสังเกตพฤติกรรม (Behavior Signs) วิธีการนี้จัดได้ว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดเพราะพฤติกรรมนกที่ถูกจับมาอยู่ด้วยกันนานอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติได้ นอกจากนี้ในนกบางพันธ์อาจสังเกตได้ทางเสียงร้อง เช่น นกในตระกูลฟินซ์ แต่ก็ไม่แน่นอนเสมอไป

4. การตรวจสอบโครโมโซม (Chromosome Testing) จากการที่เรารู้จักกันดีถึงร่างกายของสิ่งมีชีวิตซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์จำนวนมากมายและจะมีเซลล์อยู่คู่หนึ่งที่เป็นตัวแสดงเพศ เราเรียกว่า **Sex Chromosome** โดยมีความแตกต่างกันที่ความยาวของโครโมโซมในเพศผู้จะประกอบไปด้วยโครโมโซมที่มีขนาดความยาวเท่ากัน 2 โครโมโซมประกอบกัน สำหรับในนกจะแทนด้วยสัญลักษณ์ ZZ ส่วนในเพศเมียจะประกอบไปด้วยโครโมโซมสั้นและยาว ซึ่งจะแทนด้วยสัญลักษณ์ ZW จากทฤษฎีนี้จึงนำมาใช้ในการตรวจสอบเพศนกได้โดยใช้ตัวอย่างทดสอบจากตัวนก เช่น เลือด ขน เล็บ วิธีนี้ดีในด้านความเสี่ยงในการสูญเสียต่ำ และสามารถทดสอบได้ตั้งแต่เป็นคัวอ่อนแต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องค่าใช่จ่ายในการทดสอบค่อนข้างสูงและวิธีการนี้ให้ผลเฉพาะการตรวจสอบเพศนกเท่านั้น

5. การตรวจสอบฮอร์โมน (Steroid Study) วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ล้าสมัยแต่ก็มีใช้อยู่บ้างเป็นวิธีการตรวจสอบฮอร์โมนของนกโดยนำข้อมูลมาตรวจสอบเนื่องจากในเพศผู้จะมีการหลั่งฮอร์โมน Testosterone มากกว่าฮอร์โมน estrogen และกลับกันในนกเพศเมีย จากการทดลองถ้าฮอร์โมน estrogen มากกว่าฮอร์โมน Testosterone 2.5 เท่าจะเป็นนกเพศเมียแต่ถ้าน้อยกว่าจะเป็นนกเพศผู้

6. การตรวจด้วยเทคนิค DNA และอณูพันธุศาสตร์ วิธีการนี้ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน. โดยใช้การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดหรือขนนก แล้วนำมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR เป็นวิธีที่สะดวกและไม่ทำให้นกบาดเจ็บทำได้ในนกขนาดเล็ก ได้ผลรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง

ความหมายและหลักการของเทคนิค PCR

มนตรีและคณะ (2542) ได้อธิบายไว้ว่าเทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อยใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° ซ

ขั้นสอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60° ซ

ขั้นสาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75° ซ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบจะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

การใช้PCRในการศึกษา genetic fingerprints

PCR - linked restriction fragment length polymorphism (PCR - RFLP) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย PCR โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะและตัดผลิตผล PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) อาจใช้เป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดไปแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบแถบของดีเอ็นเอ (DNA banding pattern) ระหว่างสิ่งมีชีวิตหรือสปีชีส์ที่มีขนาดแตกต่างกันเรียก restriction fragment length polymorphism (RFLP) ข้อดีคือสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอในปริมาณเพียงเล็กน้อยระดับนาโนกรัมได้ซึ่งพบว่า PCR - RFLP สามารถแยกสิ่งมีชีวิตได้ทั้งระหว่างสปีชีส์ (inter - specific) และภายในสปีชีส์เดียวกัน (intra-specific) (สุรางค์และเผด็จ, 2546)

Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) เป็นการใช้ PCR ในการทำ genome fingerprints จากดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่ต้องทราบลำดับเบสโดยที่ไพรเมอร์ที่สร้างมาจะมีลำดับเบสที่มีส่วนคล้ายกับดีเอนเอเป้าหมายจึง amplify ได้เพราะใช้สภาวะในการทำ PCR ที่ไม่เข้มงวด (low stringency) แต่เนื่องจากไพรเมอร์สามารถเข้าไป anneal ได้หลายตำแหน่งในจีโนม ดังนั้นจึงได้ผลิตผลPCRจำนวนมากซึ่งในสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันจะมีการเรียงตัวของลำดับเบสที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างกันบางส่วนทำให้รูปแบบของผลผลิต PCR ออกมาแตกต่างกันคล้าย fingerprint ข้อดีของวิธีการนี้คือ เร็ว ง่ายและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากจีโนมดีเอ็นเอจำนวนน้อยเพียงระดับนาโนกรัมได้ และสามารถตรวจกรองทั้งจีโนมโดยไม่ต้องอาศัยข้อมูลก่อนหน้านี้ของลำดับเบสข้อเสียถ้ามีการทำซ้ำ แล้วให้ผลได้ไม่เหมือนเดิมและปัญหาความจำเพาะซึ่งเป็นผลจากการทำ PCR ภายใต้สภาวะในที่ไม่เข้มงวดนัก (สุรางค์และเผด็จ, 2546)

Real - Time PCR เป็นการพัฒนาเทคโนโลยี PCR ขึ้นไปอีกระดับหนึ่งซึ่งสามารถแก้ไขข้อจำกัดต่างๆในเทคนิคPCR ได้โดยสามารถตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมได้ด้วยการใช้ SYBR Green I Dye และตรวจสอบด้วย probe ที่ติดฉลากด้วย Fluorochome ทำให้ทราบปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นได้ในเวลาหลังจากกระบวนการเพียงไม่กี่วินาที (สุรางค์และเผด็จ, 2546)

Single strand conformation polymorphism (SSCP) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจสอบการกลายพันธ์เนื่องจากเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่ายและมีศักยภาพบอกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันแม้เพียงหนึ่งเบสได้ วิธีนี้ใช้ได้ดีกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 100-400 bp หลักการของ SSCP คือการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งเตรียมโดยนำผลิตผล PCR ผสมรวมเข้ากับ loading buffer แล้วให้เคลื่อนที่ผ่าน non - denaturing polyacrylamide gel ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้เห็นจะขึ้นอยู่กับลักษณะ conformation (ขนาดและโครงสร้าง) ของสายดีเอ็นเอซึ่งการเข้าคู่เบสระหว่างนิวคลีโอไทด์ภายในสายดีเอ็นเอจะเป็นตัวกำหนดโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นๆ ดังนั้นความยาวของสายดีเอ็นเอตลอดจนตำแหน่งและจำนวนของเบสที่มีการกลายพันธ์จึงมีผลต่อโครงสร้างทั้งสิ้นซึ่งหมายความว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของลำดับเบสปฐมภูมิจะมีผลเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลได้เมื่อนำมาแยกใน non-denaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ต่างกันด้วยเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ก็สามารถแยกจากกันได้บนแผ่นเจลเพราะมีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ซึ่งเป็นผลมาจากรูปร่างที่ต่างกัน (สุรางค์และเผด็จ, 2546)

การคัดแยกเพศโดยใช้พื้นฐานของ CHD

เทคนิคทางโมเลกุลสำหรับการคัดแยกเพศในนกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างมาก โดยถูกค้นพบขึ้นในปี ค.ศ. 1995 โดยพบที่ตั้งของยีนตัวแรกใน W โครโมโซม และในไม่ช้าหลังจากการค้นพบ W โครโมโซม ก็มีการค้นพบ Z โครโมโซม เช่นเดียวกัน ยีนที่ถูกค้นพบขึ้นนี้จะใช้เป็น marker สำหรับคัดแยกเพศนก ต่อมายีนเหล่านี้ถูกจัดให้เป็น tag สากลที่ใช้ในการคัดแยกเพศ คือ CHD ยีน ซึ่ง CHD ยีนก็ถูกทำให้เป็นรหัสย่อมาจาก chromosome helicase DNA binding protein ซึ่งเป็นที่ตั้งของ W และ Z โครโมโซม ซึ่งจะพบได้ในนกเกือบทุกชนิดยกเว้นพวก ratites โดยรูปแบบของคู่ไพเมอร์ 3 คู่ที่มีความสัมพันธ์ใน CHD ยีนที่ใช้ในการคัดแยกเพศนก (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การคัดแยกเพศนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CHD-linked เป็นไพรเมอร์

Primers	Nucleotide sequence	Source
P2	5′-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3′	GRIFFITHS *et al.* 1998
P8	5′-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3′	
2550F	5′-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3′	FRIDOLFSSON & ELLEGREN 1999
2718R	5′-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3′	
1237L	5′-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3′	KAHN *et al.* 1998
1272H	5′-TCCAGAATATCTTCTGCTCC-3′	

โดยได้จากการติดตามแยกผลผลิต PCR ระหว่าง Z และ W โครโมโซมในเจล เพราะฉะนั้นจึงพบว่าเพศผู้จะปรากฏ 1 แบน และเพศเมียจะปรากฏ 2 แบนบนเจล ส่วน 2550 F/2718R ไพรเมอร์ก็พบว่ามีแค่ 1 ชิ้นส่วน (fragment) เท่านั้นในทั้งเพศเมียและเพศผู้ ซึ่งเป็นผลมาจากผลลัพธ์จากการเพิ่มจำนวนยีนที่มีขนาดสั้นที่คัดลอกมาจาก W โครโมโซม และไม่พบ Z โครโมโซม สำหรับชิ้นส่วนเพียงชิ้นเดียว (single fragment) ทั้งในเพศผู้และเพศเมียจะพบในพวก Anatidae , Gruidae , Scolopacidae , Falconidae และ Accipiteridae ส่วน P2/P8 ไพรเมอร์จะมีชิ้นส่วน (fragment) เพียงแค่ 1 ชิ้นเท่านั้นทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งลำดับดีเอ็นเอจาก Z โครโมโซมจะสั้นกว่าลำดับดีเอ็นเอที่มาจาก W โครโมโซม

P2/P8 ไพรเมอร์ และ 1237L/1272H ไพรเมอร์จะมี intron ที่อยู่ด้านข้างคล้ายกันเพราะฉะนั้นขนาดชิ้นส่วนจะมีความแตกต่างจาก Z และ W โครโมโซมเหมือนกัน เพราะ 1237L/1272H จะมีผลผลิตของชิ้นส่วนที่ไม่จำเพาะขนาดใหญ่กว่า P22/P8 ไพรเมอร์ และดูเหมือนว่าจะนิยมใช้ P2/P8 เป็นคู่ไพรเมอร์เพราะมีความเหมาะสมมากกว่า แต่โดยทั่วไปแล้วขนาดความแตกต่างระหว่า Z และ W - specific ในการขยายชิ้นส่วนเหล่านี้ โดยใช้ 2550F/2718R เป็นไพรเมอร์ ก็จะมีขนาดตั้งแต่ 150 ถึง 250 bp ขณะที่การใช้ P2/P8 เป็นไพรเมอร์ ก็จะมีขนาดตั้งแต่ 10 ถึง 80 bp เพราะฉะนั้นการคัดแยกเพศนกบางชนิดจะใช้คู่ P2/P8 เป็นไพรเมอร์ โดยใช้ polyacrylamide ในการตรวจสอบผลแทน agarose gel ในการแยกแบนของ Z และ W โครโมโซม เพราะ polyacrylamide gel จะสามารถแยกแบนได้แน่นอนและแม่นยำกว่า สำหรับตัวอย่างที่จะเพิ่มขยายชิ้นส่วนโดยใช้ P2/P8 เป็นไพรเมอร์จะไม่สามารถแยกเพศนกจำพวก auklets ได้ ถ้าใช้ agarose gel ในการตรวจสอบผล

นอกจากนี้การใช้ P2/P8 เป็นไพรเมอร์ทำหารคัดแยกเพศนกบางชนิดก็อาจทำได้ยากเนื่องมาจากโครงสร้างที่เป็น polymorphism ใน Z โครโมโซม ซึ่งนกที่มีโครงสร้างเป็นแบบ polymorphism ใน Z โครโมโซม จะมีประมาณ 20 ชนิด ตัวอย่างเช่นนกจำพวก auklet 4 ชนิด ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

great tit , Eurasian tree creeper และ westen gull การที่จะหลีกเลี่ยงปัญหาเหล่านี้ก็คือ การใช้ 2550F/2718R เป็นไพรเมอร์แทน P2/P8 เพราะ 2550F/2718R ที่ใช้เป็นไพรเมอร์จะมีความแตกต่างกันของ intron ด้านข้าง โดยสามารถจะใช้กับนกที่มีโครงสร้างเป็น polymorphism ใน Z โครโมโซมได้ และถ้าหากว่าชิ้นส่วนที่ได้จาก W และ Z โครโมโซมไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของขนาดได้ แต่ยังมีความสัมพันธ์กันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครงสร้างเพศเมียและเพศผู้แบบจำเพาะที่สามารถใช้ restriction enzymes ในผลิตผลของ PCR ได้ สำหรับตัวอย่างที่ใช้ P2/P8 เป็นไพรเมอร์ ซึ่งไม่พบเห็นความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนในนกจำพวก Eurasian woodcock ก็สามารถใช้ restriction enzyme BshNI จำแนกแยกความแตกต่างใน W โครโมโซม ทำให้สามารถคัดแยกเพศนกได้น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น (Dubiec and Neubauer, 2005)

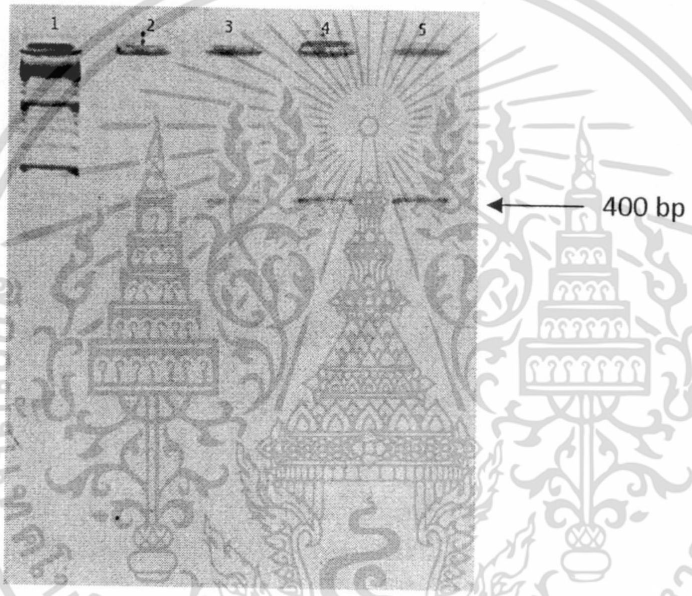
การจำแนกเพศด้วยเทคนิค PCR และการตรวจวิเคราะห์ผล

Ramos *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเพศเหยี่ยวจำพวก *Accipiter cooperii* โดยนำตัวอย่างขนที่หน้าอกในลูกนกอายุระหว่าง 15 และ23 วัน และซากของเหยี่ยวเพศผู้ที่โตเต็มวัยมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยเขาได้ใช้ 2 เทคนิคในการวิเคราะห์ผลเทคนิคแรกคือการใช้ P2 และ P8 เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ CHD1 (Chomo-helicase DNA binding protein 1) ยีนด้วยเทคนิค PCR โดยอาศัยความแตกต่างระหว่าง CHD ยีนในเพศผู้และเพศเมีย โดยความยาวของ intron ในยีน CHD-Z และCHD-W จะมีความยาวแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามความยาวของ intron ในยีน CHD-Z และ CHD-W จะมีความผันแปรระหว่าง species และในบาง species จะสั้นมากเพียงแค่ 3-9 bp เท่านั้นตัวอย่างเช่นพวก *A. gentiles* , *Cireaetus Gallicus* ,*Gyps Indicus* , *Gyps Bengaleni*, *A. Nisus* , *Aquilla Chrysaetos* และ *Spilornis Cheelahoya* ทั้งนี้ CHD1 เป็นยีนที่ถูกเก็บรักษาไว้ในโครโมโซม Z และ W ที่พบในกลุ่มนกบินได้ทุกชนิด ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าผลผลิต PCR ที่ใช้ P2 และ P8 เป็นไพรเมอร์มีขนาดประมาณ 400 bp ทั้งในเพศผู้และเพศเมียทำให้ไม่สามารถจะคัดแยกเพศนกได้เพราะได้แสดงออกมาให้เห็นเพียงแถบเดียวเหมือนกันทั้งสองเพศ (ภาพที่ 1) เทคนิคที่ 2 ใช้วิธี SSCP การตรวจการกลายพันธุ์โดยนำผลิตผล PCR ผสมรวมเข้ากับ loading buffer แล้วให้เคลื่อนที่ผ่าน non-denaturing polyacrylamide gel 12% และ cross-linking 1% และใช้ TBE 0.5 x ในเวลา3ชั่วโมง โดยมีการใช้กลีเซอรอลเคลือบที่ผิวนอก ผลการทดลองพบว่าวิธี SSCP สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง 2 อัลลีลได้ (Z,W) ทำให้สามารถแยกได้ว่าเป็นเพศผู้เพศเมีย (เพศผู้ ZZ, เพศเมีย ZW) โดยเพศเมีย (ZW) แสดงให้เห็นความแตกต่างของโครงสร้างของแบนเดี่ยว 4 แบน(CHD-W 2 แบน , CHD-Z 2 แบน)และเพศผู้ (ZZ) มีเพียงโครงสร้างของแบนเดี่ยวแค่ 2 แบนเท่านั้น (CHD-Z) (ภาพที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

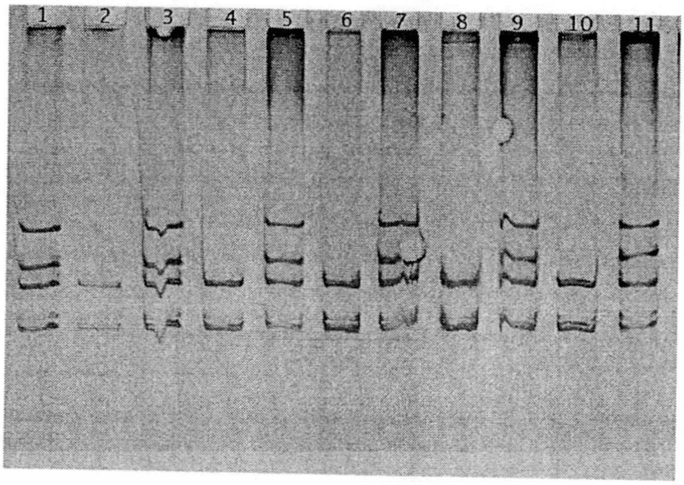
การตรวจสอบด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต

สุคนธ์ทิพย์และสายชล (2549) ได้ทำการศึกษา การตรวจดูแถบ DNA หลังย้อมด้วย ethidium bromide ทำโดยใช้แสงอัลตร้าไวโอเลตความยาวต่ำๆ เพราะ DNA และ ethidium bromide มีความสามารถในการดูดแสงความยาวคลื่น 300 – 360 nm และปล่อยแสงสีส้ม (fluorescent radiation) ออกมาที่ความยาวคลื่น 590 nm ปัจจุบันมีเครื่องกำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลตหลายชนิด ทั้งที่เป็นลักษณะแสงส่องมาจากด้านบนของ gel (incident light) และแสงส่องจากด้านล่างของ gel (transmitted light) ซึ่งเครื่องมือที่มีลักษณะแบบ transmitted light มักมีลักษณะเป็นกล่องและมีหลอดแสงอัลตร้าไวโอเลตอยู่ภายใน บางครั้งเรียกเครื่องนี้ว่า UV Trans Hluminator การตรวจดูแถบ DNA 9องทำในห้องมืดและผู้ตรวจต้องสวมแว่นป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลต



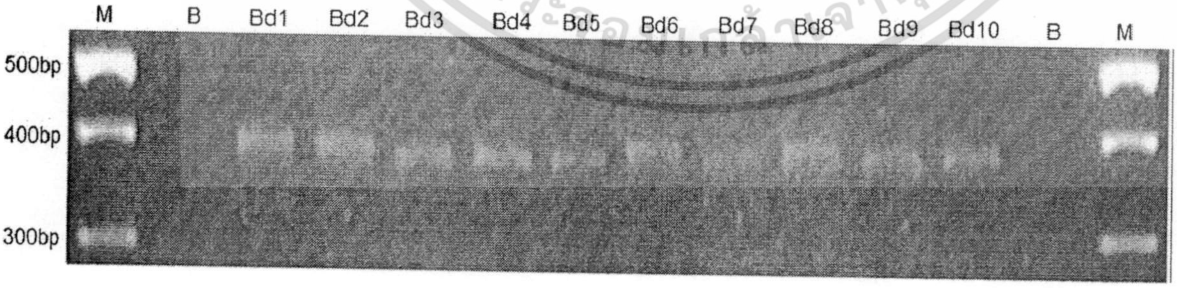
ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ CHD 1 ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P8 ในนก *A. Cooperii* บน 3% agarose gel เมื่อเลนที่ 1 = 100 bp maker ; เลนที่ 2 และ 4 = ผลผลิต PCR นกเพศผู้ ; เลนที่ 3 และ5 = ผลผลิต PCR นกเพศเมีย (Ramos *et al.*, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ผลของ PCR-SSCP ในนก *A. Cooperii* โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ CHD 1 ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P8 บน 12% polyacrylamide gel และ 1% C,TBE 0.5x โดยใช้กลีเซอรอลเคลือบผิวนอกในเวลา 3 ชั่วโมงและแล้วย้อมด้วย silver stain เมื่อเลนที่ 2,4,6,8,10 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากนกเพศผู้ ส่วนเลนที่ 1,3,5,7,9,11เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากนกเพศเมีย (Ramos *et al*., 2009)

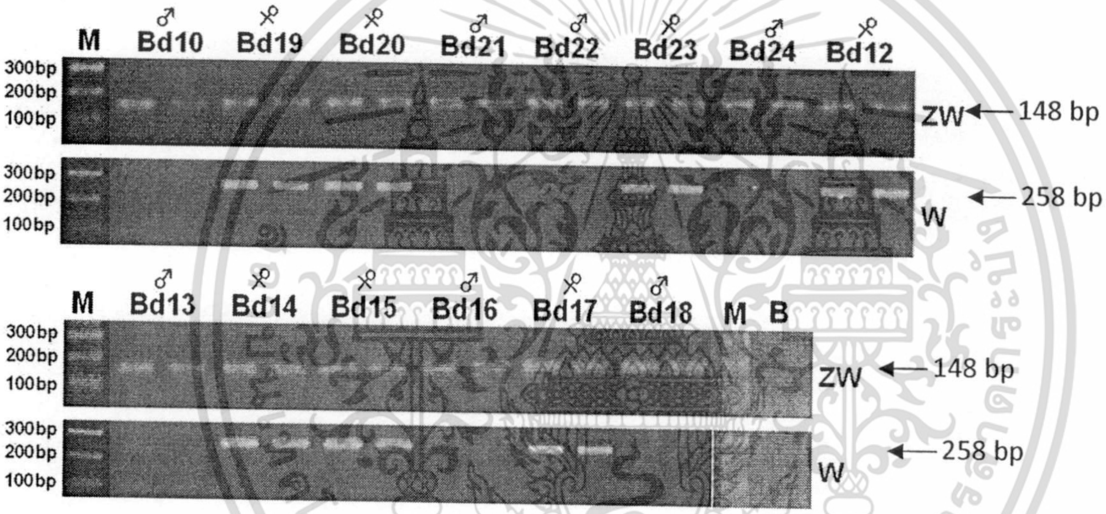
Chang *et al.* (2008a) ได้ศึกษาการคัดแยกเพศนกอินทรีย์โดยได้มีการปรับปรุงและพัฒนาเทคนิค PCR ให้ดียิ่งขึ้นโดยได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดนกอินทรีย์จำพวก *S. c. hoya* จำนวน24 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่างควบคุมคือนก Bird 1 และ 15 เป็นเพศเมีย และใช้ P2 และ P8 เป็นไพรเมอร์ ผลผลิตที่ได้จาก PCR จะทำการแยกโดยวิธีelectrophoresis ด้วย 4 % agarose gel และย้อมโดย ethidium bromide ผลที่ได้นั้นพบว่าผลผลิต PCR มีขนาดใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จึงไม่สามารถระบุเพศของนกที่ทำการทดสอบได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลผลิต PCR บริเวณ CHD ยีน ในนก S. c. *hoya* บน 4% agarose gel เมื่อ M = 100 bp maker , B = Blank และตัวอย่าง Bd 1 เป็นเพศเมียใช้เป็นตัวควบคุม (positive control) (Chang *et al*., 2008a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Chang *et al.* (2008a) ยังได้มีการออกแบบ primer p2/CHD-ZW-common และ p2/CHD-W-specific ซึ่งลำดับยีนบริเวณ CHD-ZW-common จะปรากฏทั้งสองเพศคือเพศผู้และเพศเมีย ส่วนลำดับยีนบริเวณ P2/CHD-W-specific จะปรากฏเฉพาะในเพศผู้ โดยผลผลิต PCR ที่ได้ควรมีขนาด 148 bp และ 258 bp ตามลำดับ การทดลองนี้ใช้ตัวอย่างนกนกอินทรีย์13 ตัวอย่าง โดยมี 1 ตัวอย่างที่ทราบเพศแน่ชัดคือ Bird 15 ที่รู้เพศแล้วว่าเป็นเพศเมีย พบว่าตัวอย่างทั้งเพศเมียและเพศผู้พบแบนขนาด 148 bp ดังนั้นการมีหรือไม่มีแบนขนาด 258 bp จึงเป็นตัวชี้วัดได้ว่าตัวอย่างที่ทดสอบเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย ผลที่ได้พบว่าตัวอย่าง Bd 12,14,15,17,19,20 และ23 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 148 bp และ 258 bp ตามลำดับ จึงสามารถจัดจำแนกเพศได้ว่าเป็นเพศเมียในขณะที่ตัวอย่าง Bd 10,13,16,18,21,22 และ24 เป็นเพศผู้ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การคัดแยกเพศนกอินทรีย์ S. c. *hoya* 14 ตัวอย่าง โดยใช้ CHD-ZW-common (ZW) และ CHD-W-specific (W) เป็นไพรเมอร์ บน 1.5% agarose gel โดยตัวอย่าง Bd 15 เป็นเพศเมียใช้เป็น positive control เมื่อ M = 100 bp maker ; B = Blank (Chang *et al.*, 2008a)

Chang *et al.* (2008 b) ได้ทำการคัดแยกเพศนกอินทรีย์โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดนกอินทรีย์ 13 ตัวอย่าง (Bird 12-24)ที่ไม่ระบุเพศ และเนื้อเยื่ออีก2 ตัวอย่างที่รู้เพศแล้ว (Bird 4966:เพศผู้ และBird 4968:เพศเมีย)จากนกอินทรีย์จำพวก S.c. *hoya* และใช้ชุด Qia Aamp DNA Blood Mini สกัดดีเอ็นเอออกมาโดยเขาใช้วิธี Real-Time PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งวิธีนี้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกช่วงของปฏิกิริยาและใช้เทคนิค TaqMan probe ในการตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่ง TaqMan probe นั้นเป็น Oligonucleotide probe ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีการติดฉลาก Hex-labeled ที่ CHD-ZW-common และติดฉลาก FAM-labeled ที่ CHD-W-specific วัดปริมาณความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ปล่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้อ่านนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมาของฉลาก Hex และ FAM ของ CHD-ZW-common และ CHD-w-specific probe ของ S.c. *hoya* ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณผลิตผล PCR จากนั้นใช้โปรแกรมauto-gender calling ในการแยกอัลลีลและประเมินผลโดยให้อัลลีล 1 เป็น HEX-CHD-ZW และอัลลีล 2 เป็นFAM-CHD-W ซึ่งจากการทดลองถือว่าประสบผลสำเร็จเพราะสามารถคัดแยกเพศนกได้อย่างถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดนกชนิดต่างๆ เน้นเก็บตัวอย่างเลือดนกกลุ่มนกแก้วปากขอที่ยังไม่มีการรายงานเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดนกที่ทราบเพศแน่ชัดแล้วจากฟาร์มเลี้ยงนกสวยงามทั้งในเขตกรุงเทพฯและจังหวัดใกล้เคียง

วิธีการเก็บตัวอย่าง

การเก็บเลือดทำได้โดยใช้ปลายเข็มสะกิดที่เส้นเลือดบริเวณปีก หรือตำแหน่งอื่นของนกที่มีเส้นเลือดมาเลี้ยง แล้วใช้กระดาษกรองซับเลือดที่ซึมออกมาบรรจุในหลอดปลอดเชื้อเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป โดยทำการเก็บตัวอย่างจากนกปากขอพันธุ์ต่างๆดังนี้

1. เลิฟเบิร์ด (Lovebird; *Agapornis* sp.)
2. เร้ดรั้ม (Red-rumped Parrot; *Psephotus haematonotus*)
3. ซันคอนัวร์ (Sun Conure; *Aratinga solstitialis*)
4. อาฟริกันเกรย์ (African Grey Parrot; *Psittacus erithacus*)

สถานที่และห้องปฏิบัติการในการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

นำกระดาษกรองที่มีเลือดนกมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จ (Quigen®) โดยมีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยสรุป คือ เติมน้ำ (dH_2O) ลงไปในหลอดเก็บกระดาษซับเลือดและทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้เลือดที่ถูกซับด้วยกระดาษกรองละลายออกมาอยู่ในน้ำที่เติมลงไป ดูดเลือดที่ละลายแล้วไปผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายของชุดสำเร็จ (FG1 และ FG2) พร้อมทั้งย่อยสลายโปรตีนด้วยProtease K และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isoprapanol และล้างออกด้วย Ethanol 70 % ดีเอ็นเอที่ได้ถูกทำละลายด้วยน้ำกลั่นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลล์เซียสเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ไพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง

ทำการทดสอบดีเอ็นเอที่สะกัดได้จากเลือดไก่ทั้ง 6 ตัว ด้วยวิธี PCRโดยแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองโดยใช้ไพรเมอร์และอุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ต่างกันดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ P2 : 5′-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3′ และ P8 : 5′-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3′ (Griffiths et al., 1998) โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ : Preheating 94 °c 90 นาที Denaturing 95 °c 30 วินาที Annealing 52 °c 30 วินาที Extension 72 °c 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และFinal Extension 72 °c 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจล Agarose ที่มีความเข้มข้น 1.8 – 3 เปอร์เซนต์

การทดลองที่ 2 ไพรเมอร์ NP : 5′-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3′, MP : 5′-AGTCACTATCAG ATCCGGAA-3′ (Ito et al., 2003) และ P2 : 5′-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3′ (Griffiths et al., 1998) โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ : Preheating 94 °c 2 นาที Denaturing 94 °c 30 วินาที Annealing 55 °c 30วินาที Extension 72 °c 45 วินาที และFinal Extension 72 °c 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจล Agarose ที่มีความเข้มข้น 1.2 – 1.8 เปอร์เซนต์

การหาลำดับเบสของนกแต่ละสายพันธุ์

ทำการโคนชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์ของ *E. coli* และสกัดชิ้นส่วนยีนดังกล่าวเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสของเพศผู้และเพศเมียของนกแต่ละสายพันธุ์

การออกแบบและสังเคราะห์ไพร์เมอร์

ทำการตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้พื้นฐานของยีน chromo-helicase-DNA-binding (CHD) เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดและเพศนก ซึ่งในเพศผู้และเพศเมียมีความยาวของอินตรอนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการทดสอบพบว่านกพันธุ์อาฟริกันเกรย์สามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ P2/P8 โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 641 bp ส่วนแบนล่างของเพศมีขนาด 457 bp (ภาพที่ 5)

นกพันธุ์เลิฟเบิร์ดสามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2 โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 361 bp ส่วนแบนล่างของเพศเมียมีขนาด 305 bp (ภาพที่ 6)

นกพันธุ์เร้ดรั้มสามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2 โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 366 bp ส่วนแบนล่างของเพศเมียมีขนาด 310 bp (รูปที่ 7)

นกพันธุ์ซันคอนัวร์สามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2 โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 386 bp ส่วนแบนล่างมีขนาด 321 bp (ภาพที่ 7)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
                           10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
African gray Upper GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATGGTGAGGATGCTGGACATCTTAGCAGAATATCTGAAGTATCGTCAG 100
African gray Lower GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAGAATGCTAGACATCCTAGCGGAGTATTTGAGGTATCGTCAG 100
Clustal Consensus  ************************************ *********** *********** ***** ****** **** ** *** *** ********** 91
                          110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
African gray Upper TTTCCCTTTCAAGTAAGAATCTTGGTGGCAGTAGCCAAGAAGCTTTGATCTTGAATATTAGAAAAATCTTTTCTTTATCTGAGTGTGACAGCTTGTTCAG 200
African gray Lower TTTCCCTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCATTACCA---------------CTTTATCTTAAGAAAAGTGTCCTTTTTG 185
Clustal Consensus  *********** ******** *** *** ************** ****** * *  *               ******** *     *  *    **  * 153
                          210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
African gray Upper AAGATATGAGCTCTGTGACATATTCAGAAGCCACCTGGACATGACACTAGGCAACCTGCTTTTGCTGTCCCCAGTTAAATTGGGGAGTTAGACAATGTCA 300
AG2_L5             AAGA---AAGATTTATGA------------------------------------------------------------AAATT------------------ 205
Clustal Consensus  ****    ** * * ***                                                            *****                   169
      °                   310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
African gray Upper CCTCCTGAGGTCCCTTCCAACCTCATCTGTTTTGTGAATATGATCTGTACCACTTCATTAAGAAAAGACACAAGGAAACATGTTCTTTTTTGATAAAATC 400
African gray Lower --------------------------TTATTTTATGTACA--------------------GGAAAAGAC------------------------------T 229
Clustal Consensus                           * **** ** * *                       ********                                186
                          410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
African gray Upper TGCAATTGCTCTATGCTAAATAATAATTAAATAAGTGCATCAGTTCTGGT-ATTTTTTTAATTCATCACAGGTTTTCTTTTTTTTTCTTCACATAACGGG 499
African gray Lower GGCAATTACTATATGCTAAATAGTATTT-------TGAAACAAAACTGATGAATTACAGAGATTGTTACA----TTACTCTTATCCCCCCCCCAATTGT 318
Clustal Consensus   ****** ** *********** ** **       ** * **  *** * * **    *  *  * ***   **  * ** *  *  *  *  **  * 239

                          510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
African gray Upper TTTGGCAGTTGAGAAGTCAAGGTGCTCTGATTTTGAGTATAGTATAAGAATTACTTTTTAACTGGAGCATTCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAAT 599
African gray Lower TTTGGCAATTGAGATTTCAAGTTGCTTCAATTA-GAATATAGTA--GGAGTTCCTTTTTAATTATGTTATTCAATATCTTTAGAGACTTGATGGATCAAT 415
Clustal Consensus  ******* ******   ***** ****    ***  ** *******   ** ** ******** *     ******* ************************ 317

                          610       620       630       640
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|..
African gray Upper AAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAATAA 641
African gray Lower AAAAGGAGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAATAA 457
Clustal Consensus  ****** *********************************** 358
```

ภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์อาฟริกันเกรย์ระหว่างเพศผู้และแบนล่างของเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

```
                            10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird Lower     GAGAAACTGTGCAAAACAGGTATCTCTGGGGTTTGACCAATTAGCTTTGTTTTTTGTTGGTGGTGATGGTTGGTTTGTTTTTTCATTACTCTTCTTTTGG 100
Lovebird Upper     GAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCTGACTGACCTG--TACTTTTATGTTGCTGTTGGT--TTAGTTAGTTTGTTGGGGGT-----TGTTGG 91
Clustal Consensus  ********************* ***** ** * ****  *   *  *  **** ***** ** ** *  ** *** **** **          * **** 66

                           110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird Lower     CTTGTACTTTTGGGTTGGGTGATTTTCACACATAACACCCCTACACCTACTCCCTCCCTCATTTTTGGCAGGTTAGATAACACATTAAAAAAATGTTTT 200
Lovebird Upper     GTTTTAGTTTTGG----GGTTTTTTTCCTCCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGACTGTATAAAACTTTACTTATTTTTGTT 171
Clustal Consensus   ** ** ******     ***  *****    * *     *   **** **            ****** ***  *  **** ** ***    *  * * ** 117

                           210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird Lower     AGTCACATAGCTTTGAACTACTTAACCTGAAATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAAGGAGACACAGTATGAGCAGAAGATATTCCGGATCTGATAG 300
Lovebird Upper     AATAATGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATACTCTGGATCTGATAG 271
Clustal Consensus  * * *  ****************** **** ***************************** **** *  **** *** ******** ** *********** 203

                           310       320       330       340       350       360       370       380       390
                   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird Lower     TGACT------------------------------------------------------------------------------------- 305
Lovebird Upper     TGACTCCATCTCAGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATTAAAGGATTTAGCGATGCAGA 361
Clustal Consensus  *****                                                                                      208
```

ภาพที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์เลิฟเบิร์ดระหว่างเพศผู้และแบนล่างของเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

120235

```
                          10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird female upper     -----------GAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCTGACTGAC---CTGTACTTTTATGTTGCT-GT--TGGTTTAGTTAGTTTGTTGGGG
Lovebird male             -----------GAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCTGACTGAC---CTGTACTTTTATGTTGCT-GT--TGGTTTAGTTAGTTTGTTGGGG
Red rumped male           -----------GAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCTGACTGAC---CTGTACTTTTATGTTGCT-GT--TGGTTTAGTTAGTTTGTTGGGG
Red rumped female upper   -----------GAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCTGACTGAC---CTGTACTTTTATGTTGCT-GT--TGGTTTAGTTAGTTTGTTGGGG
Sun conour male           GCATCTAGATTGAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCCAACTGAC---CTGTACTTTTATGTTGCTTGT--TGGTTTAGTTAGTTTGTTGGGG
Sun conour female upper   GCATCTAGATTGAGAAACTGTGCAAAACAGGTGTCTCTTGGTTCCAACTGAC---CTGTACTTTTATGTTGCTTGT--TGGTTTAGTTAGTTTGTTGGGG
Lovebird female lower     -----------GAGAAACTGTGCAAAACAGGTATCTCTGGGGTTTGACCAATTAGCTTTGTTTTT-TGTTGGTGGTGATGGTTGGTTTGTTTTTTCATTA
Red rumped female lower   -----------GAGAAACTGTGCAAAACAGGTATCTCTGGGGTTTGACCAATTAACTTTGGTTTT-TGTTGGTTGTGATGGTCGGTTTGTTTTTTTATTA
Sun conour lower          GCATCTAGATTGAGAAACTGTGCAAAACAGGTATCTCTGGGGTTTGACCAATTAACTTAGTTTTT-TGTTGTTGGTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTATTA
Clustal Consensus                    ******************** ***** ** *   ** *   **   **** ***** * **  *  *    **  *** *

                         110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird female upper     GT----TGTTGGGTTTAGTTTTGGG----GTTTTTTTCCTCCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGACTGTATAAAACTTTA
Lovebird male             GT----TGTTGGGTTTAGTTTTGGG----GTTTTTTTCCTCCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGACTGTATAAAACTTTA
Red rumped male           GT----TGTTGGGTTTAGTTTTGGG----GTTTTTTTCCTCCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGGCTGTATAAAACTTTA
Red rumped female upper   GT----TGTTGGGTTTAGTTTTGGG----GTTTTTTTCCTCCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGGCTGTATAAAACTTTA
Sun conour male           GT----TGTTGGGTTTTGGGTTTGGT-----TTTTTTTCCTTCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGGCTGTATAAAACTTTA
Sun conour female upper   GT----TGTTGGGTTTTGGGTTTGGT-----TTTTTTTCCTTCTT----TTCTGGACACATA------------TTTTTGACAGGCTGTATAAAACTTTA
Lovebird female lower     CTCTTCTTTTGGCTTGTACTTTTGGGTTGGGTGATTTTCACACATAACACCCCTACACCTACTCCCTCCCTCATTTTTGGCAGGTTAGATAACACATTA
Red rumped female lower   CTCTTCTCTTGGCTTGTATTTTTGGGTTGGGTGATTTTCACACATGACACCCCCACACCTACTCCCTCCCTCATTTTTGTCAGGCTAGATAACACATTA
Sun conour lower          CTCTTCTTTTGGCTTGTACTTTTGGGTTGGGTGATTTTCACACATGATACCCCCACACCTACTCCCTCCCTAATTTTTGACAGGCTAGATAACACATTA
Clustal Consensus          *    * **** ** *    *****      *  *****   * *        *    **** **           ****** ***  *  **** ** ***

                                                                                      KMITL-2
                         210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Lovebird female upper     CTTATTTTTGTTAATAATGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATA-CT
Lovebird male             CTTATTTTTGTTAATAATGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATA-CT
Red rumped male           CTTATTTTTGTTAATAATGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATA-CT
Red rumped female upper   CTTATTTTTGTTAATAATGTAGCTTTGAACTACTTAATCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATA-CT
Sun conour male           CTTATCTTTGTTAATAATGTAGCTTTGAACTACTTATTCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATA-TT
Sun conour female upper   CTTATCTTTGTTAATAATGTAGCTTTGAACTACTTATTCTGACATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAGGGAGGCGGAGTAGGAGTAGAAGATACTT
Lovebird female lower     AAAAAATGTTTTAGTCACATAGCTTTGAACTACTTAACCTGAAATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAAGGAGACACAGTATGAGCAGAAGATA-TT
Red rumped female lower   AAAAAATGTTTTAGTCACATAGCTTTGAACTGCTTAACCTGAAATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAATGAAAGGAGACACAGTAGGAGCAGAAGATA-TT
Sun conour lower          AAAAAATGTTTTAGTCACATAGCTTTGAACTACTTAATCTGAAATTCCAGATCAGCTTTAATGGAAGTGAAAGGAGACACAGTAGGAGCAGAAGATA-TT
Clustal Consensus            *  * * *** * *   ************ ****   **** ********************** **** **** *  **** *** ******  *
```

KMITL-1 (primer region, positions 12–40)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
                           310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..|.|
Lovebird female upper  CTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATTAAAGGATTTAGCGATGC
Lovebird male          CTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATTAAAGGATTTAGCGATGC
Red rumped male        CTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATTAAAGGATTTAGCGATGC
Red rumped female upper CTGGATCTGATAGTGACTCCATCTCAGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATTAAAGGATTTAGCGATGC
Sun conour male        CCGGATCTGATAGTGACTCCATCTCGGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATAAAAGGATTTAGCGATGC
Sun conour female upper CCGGATCTGATAGTGACTCCATCTCGGAAAGGAAACGGCCAAAAAAGCGTGGAAGACCACGAACTATTCCTCGAGAAAATATAAAAGGATTTAGCGATGC
Lovebird female lower  CCGGATCTGATAGTGACT----------------------------------------------------------------------------------
Red rumped female lower CCGGATCTGATAGTGACT--------------AATCGA-------GAT-----------------------------------------------------
Sun conour lower       CCGGATCTGATAGTGACT--------------AATCGG-------ATCCCGG-------------------------------------------------
Clustal Consensus      * *****************
                         KMITL-R

                        410
                       ....|....|....|.
Lovebird female upper  AGA-------------
Lovebird male          AGA-------------
Red rumped male        AGA-------------
Red rumped female upper AGA-------------
Sun conour male        AGAAATCGGATCCCGG
Sun conour female upper AGAA-TCGGATCCCGG
Lovebird female lower  ----------------
Red rumped female lower ----------------
Sun conour lower       ----------------
Clustal Consensus
```

ภาพที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์เลิฟเบิร์ด เร้ดรั้ม และซันคอนัวร์ ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย พร้อมแสดงตำแหน่งไพเมอร์ที่ออกแบบใหม่ (KMITL-1, KMITL-2 และ KMITL-R)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดเก็บไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าแม้จะใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันแต่เป็นนกต่างพันธุ์กันก็ได้ขนาดของชิ้นยีนที่ไม่เท่ากัน และพบว่าชิ้นยีนที่ได้มีความแตกต่างกันมาก โดยโดยในเพศผู้ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แบน คือชิ้นส่วนของยีน CHD บนโครโมโซม Z ส่วนในเพศเมียปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แบน คือชิ้นส่วนของยีน CHD บนโครโมโซม Z และ โครโมโซม W ความแตกต่างในขนาดของความยาวของชิ้นยีนที่ได้นี้เป็นผลมาจากความยาวของส่วนอินทรอนที่ไม่เท่ากันในนกแต่ละชนิด และเป็นส่วนที่มีความผันแปรมากในนกแต่ละชนิด

การออกแบบไพรเมอร์

จากลำดับเบสที่ได้จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับใช้ในการทดลองดังนี้

1. ไพรเมอร์ KMITL-1 = 5- GAG AAA CTG TGC AAA ACA GGT RTC TCT-3
2. ไพรเมอร์ KMITL-2 = 5- CYA CAC CTA CTC CCT CCC TMA TT-3
3. ไพรเมอร์ KMITL-R = 5- AGT CAC TAT CAG ATC CYG AYT ATC-3

การทดสอบไพร์เมอร์ที่ได้กับนกพันธุ์ต่างๆ

ทำการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่กับนกพันธุ์ต่างๆที่ทราบเพศแล้วดังตารางที่ 2 โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ : Preheating 94 °c 2 นาที Denaturing 94 °c 80 วินาที Annealing 50 °c 45 วินาที Extension 68 °c 45 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และFinal Extension 68 °c 10 นาที และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจล Agarose ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่กับนกพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์นก	จำนวนตัวอย่าง	ผลที่ได้
Lovebird (*Agapornis* sp.)	2	สามารถแยกเพศได้
Red-rumped Parrot (*Psephotus haematonotus*)	2	สามารถแยกเพศได้
Sun Conure (*Aratinga solstitialis*)	2	สามารถแยกเพศได้
African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*)	2	ไม่สามารถแยกเพศได้
Green-winged Macaw (*Ara chloropterus*)	13	สามารถแยกเพศได้
Alexandrine Parakeet or Alexandrian Parrot (*Psittacula eupatria*)	2	ไม่สามารถแยกเพศได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้สามารถใช้ในการตรวจแยกเพศได้ดีในนกปากขอบางพันธุ์ แต่ก็ยังมีบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถแยกได้ในการทดลองนี้ ซึ่งอาจมีสาเหตุหลายประการ เช่น ความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ต่อพันธุ์นก การใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ทั้งนี้การศึกษาต่อไปในอนาคตควรต้องทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้ และอุณภูมิต่างๆในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับนกแต่ละพันธุ์ รวมถึงศึกษาถึงลำดับเบสที่ได้ของนกแต่ละพันธุ์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ ตลอดจนปรับปรุงเทคนิคและวิธีการต่างๆ เพื่อให้สามารถใช้ในการแยกเพศในนกได้คลอบคลุมพันธุ์ต่างๆได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

1. ไพรเมอร์ที่มีใช้ในปัจจุบันนั้นมีหลายชุดโดยสามารถใช้ในการตรวจแยกเพศได้ดีในนกพันธุ์ต่างๆ แต่ก็ยังไม่คลอบคลุมนกทุกชนิด

2. ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้สามารถใช้ในการตรวจแยกเพศได้ดีในนกปากขอบางพันธุ์ แต่ก็ยังมีบางพันธุ์ที่ยังไม่สามารถแยกได้ในการทดลองนี้

3. การศึกษาต่อไปในอนาคตควรต้องทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่นี้ และอุณหภูมิต่างๆในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับนกแต่ละพันธุ์ รวมถึงศึกษาถึงลำดับเบสที่ได้ของนกแต่ละพันธุ์ เพื่อปรับปรุงเทคนิคและวิธีการต่างๆ เพื่อให้สามารถใช้ในการแยกเพศในนกได้คลอบคลุมพันธุ์ต่างๆได้มากขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการเก็บตัวอย่างนกที่ทราบเพศแน่ชัดแล้วนั้นกระทำได้ยากมากเนื่องจากมักเป็นนกที่ให้ผลผลิตเป็นลูกนกแล้วทำให้ได้ตัวอย่างในปริมาณน้อย

2. การแยกเพศโดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์นี้มีความแม่นยำและความไวสูง แต่ในขณะเดียวกันก็อาจเกิดความผิดพลาดได้การใช้อุณหภูมิต่างๆในปฏิกิริยา การใช้เปอร์เซ็นต์เจล และระยะเวลาในการแยกชิ้นยีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ไม่เหมาะสม รวมถึงความผิดพลาดจากการปฏิบัติงานที่ไม่ชำนาญ ดังนั้นในการนำไพรเมอร์ต่างๆไปใช้ในนกชนิดต่างๆนั้นควรทำการทดสอบเพื่อหา อุณหภูมิต่างๆในปฏิกิริยา เปอร์เซ็นต์เจลที่เหมาะสม และระยะเวลาในการแยกชิ้นยีนด้วยกระแสไฟฟ้าก่อน เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

มนตรี จุฬาวัฒนทล. 2542. ชีวเคมี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร. 580 น.

สุคนธ์ทิพย์ จันทนะ และ สายชล แซ่อื้อ. 2549. การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

สุรางค์ นุชประยูร และ เผด็จ สิริยะเสถียร. 2546. เทคนิคทางอณูชีววิทยา, น. 33-59. ใน สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร และ ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์ (บรรณาธิการ). เวชศาสตร์โมเลกุล.ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์, กรุงเทพมหานคร.

Chang, H.-W., T.-C. Chou, D.-L. Gu, C.-A. Cheng, C.-C. Chang, C.-T. Yao, L.-Y. Chuang, C.-H. Wen, Y.-C. Chou, K.-Y. Tan and C.-C. Cheng. 2008a. An improved PCR method for gender identification of eagles. Mol Cell Probes. 22 : 184-188.

Chang, H.-W., D.L. Gu, S.-H. Su, C.-C. Chang, C.-A. Cheng, H.-W. Huang, C.-T. Yao, T.-C.Chou, L.-Y. Chuang and C.-C. Cheng. 2008b. High-throughput gender identification of Accipitridae eagles with real-time PCR using Taqman probes. Theriogenology. 70 : 83-90.

Dubiec, A. and M. Neubauer. 2005. Molecular techniques for sex identification in bird. Biol lett. 43 : 3-12.

Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7: 1071-1075.

Ito, H.A., Abe, M., Murase, T. and Tsubota, T. 2003. Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. *Zoological Science.* 20: 339-344.

Mbwana, J., 2006. Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* isolates from different geographical locations. Mol Cell Probes. 44 : 7-132

Ramos, P.S., E. Bastos, R.W. Mannan and H. Guedes – Pinto. 2009. Polymerase Chain Reaction – Single strand Conformation Polymorphism Applied to Sex Identification of *Accipiter Cooperii.* Mol Cell Probes. 23 : 115-118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้