เทคนิคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์สำหรับการสกัดดีเอนเอและการตรวจแยกเพศในนก

Non-Invasive Technique for DNA Extraction and Sex Determination in Bird

เฉลิมชาติ สมเกิด [1] ขวัญเรือน ดวงสอาด [2] ตุลยวรรธ สุทธิแพทย์ [1] ณัฐวุฒิ สถิตเมธี [3]

Chaleamchat Somgird [1], Khwanruean Doungsa-ard [2], Tulyawat Suttipat [1], Nattawooti Sthitmatee [3]

บทคัดย่อ

การสกัดดีเอนเอและการตรวจแยกเพศนกด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) จากของเสียในเปลือกไข่และมูล โดยใช้ตัวอย่างจากไก่ต๊อก (*Numida meleagris*) ที่ไม่ทราบเพศ 15 ตัว พบว่าสามารถทำการสกัดดีเอนเอและตรวจแยกเพศได้อย่างถูกต้องซึ่งตัวอย่างจากของเสียในเปลือกไข่ให้ผลเป็นเพศผู้ 10 ตัวและตัวอย่างมูลให้ผลเป็นเพศผู้ 3 ตัวเมื่อทำการเทียบกับผลที่ได้จากดีเอนเอที่สกัดจากเลือดและตรวจแยกเพศด้วยวิธีเดียวกัน ร่วมกับการสังเกตพฤติกรรมและลักษณะทางเพศภายนอก ที่ให้ผลเป็นเพศผู้ทั้งหมด 15 ตัว ทั้งนี้ตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกเพศได้นั้นพบว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณที่มากและมีปริมาณดีเอนเอที่สกัดได้ปริมาณน้อยในขั้นตอนของการสกัดดีเอนเอในบางตัวอย่าง ซึ่งผลที่ได้นี้บ่งชี้ว่าสามารถสกัดดีเอนอและตรวจแยกเพศนกจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และมูลได้ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งในการเก็บตัวอย่างแบบเทคนิคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวนก

ABSTRACT

The bird sex determination by polymerase chain reaction which used extracted DNA from egg waste product and fecal samples of 15 unknown sex guinea fowls (*Numida meleagris*) was performed. The result showed 10 egg waste product samples and 3 fecal samples were male as same as the result of blood samples from these birds. The comparison of sexing bird methods with polymerase chain reaction and behavioral observation and secondary sex characteristics were same, the all of the results were male bird. It was concluded that the method can use the non-invasive technique for sexing bird by polymerase chain reaction with extracted DNA from egg waste product and fecal sample. Although some samples could not identify the sex because of the protein contamination and small amount of extracted DNA.

Key words : Non-invasive Technique, DNA Extraction, Bird Sex Determination, Polymerase Chain Reaction

e-mail address : ninvet59@yahoo.co.uk

---

1 สาขาวิชาคลินิกช้างและสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100

Elephant and Wildlife Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University 50100

2 นักศึกษาชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100

Sixth year student, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University 50100

3 สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100

Veterinary Public Health Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University 50100

บทนำ

การตรวจแยกเพศนกนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งในด้านการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ การจัดการฝูงนกในที่เลี้ยงและในธรรมชาติ การศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรม ลักษณะทางสังคม นิเวศวิทยาของนก ตลอดจนการตรวจวินิจฉัยโรคในโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับเพศ เช่น ภาวะไข่ค้าง และ egg yolk peritonitis เป็นต้น เพื่อประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจสำหรับนกสวยงามหรือนกเลี้ยงเป็นเพื่อนและในเชิงการอนุรักษ์สำหรับนกที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ รวมถึงการตรวจวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาต่อไป ถึงแม้ว่านกบางชนิดสามารถที่จะแยกเพศได้จากลักษณะทางเพศภายนอกที่เห็นจากรูปร่าง สีขน และลักษณะเฉพาะของเพศบางอย่าง เป็นต้น ซึ่งนกในกลุ่มนี้เรียกว่า Dimorphic Bird ยกตัวอย่างเช่น นกที่อยู่ในกลุ่มไก่และกลุ่มเป็ด ที่นกเพศผู้มีสีสันสวยงามกว่านกเพศเมียมาก แต่ก็ยังมีนกอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถแยกเพศได้จากลักษณะภายนอก กล่าวคือเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางเพศภายนอกที่คล้ายคลึงกันหรือเหมือนกัน โดยกลุ่มนกเหล่านี้เรียกว่า Monomorphic Bird ตัวอย่างเช่น นกในกลุ่มนกแก้ว นกจับคอน นกเหยี่ยว เป็นต้น ตลอดจนรวมถึงลูกนกในนกทุกชนิดที่อยู่ในช่วงวัยอ่อนและนกในกลุ่ม Dimorphic Bird บางชนิดพันธุ์ที่อายุน้อยยังไม่เข้าสู่ช่วงวัยเจริญพันธุ์หรืออยู่ในช่วงที่อยู่นอกฤดูผสมพันธุ์ที่นกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางเพศภายนอกเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะแยกเพศด้วยสายตาเพียงอย่างเดียว

การตรวจแยกเพศนกในปัจจุบันนั้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน โดยแต่ละวิธีก็มีข้อดี ข้อเสีย และความเหมาะสมแตกต่างกันไปตามชนิดของนก ได้แก่ การแยกเพศนกจากลักษณะทางเพศภายนอก (morphology) เช่น สีขน สีตา เป็นต้น การแยกเพศนกจากพฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์ (behavior) การแยกเพศนกจากการคลำช่องเชิงกราน (pelvic width) การแยกเพศโดยวิธีการปลิ้นก้น (vent sexing) การแยกเพศโดยเปิดผ่าช่องท้องหรือใช้กล้องส่องตรวจภายใน (laparoscopy หรือ laparotomy) การแยกเพศจากการวิเคราะห์ฮอร์โมน (hormone analysis) การวิเคราะห์โครโมโซม (chromosome mapping) และ การวิเคราะห์ดีเอนเอ (molecular sexing) เป็นต้น

การแยกเพศนกจากดีเอนเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ก็เป็นวิธีการที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีการที่ได้ผลรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง และสามารถใช้ได้กับนกทุกช่วงอายุ (Griffiths, 2000a and 2000b, Fridolfsson และคณะ, 1999, Millar และคณะ, 1997, นำดีและคณะ, 2544) โครโมโซมเพศในนกมี 2 ชนิดคือ W – chromosome และ Z- chromosome โดยนกเพศผู้มีโครโมโซมเพศเป็น ZZ (homogametic male) และนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น ZW (heterogametic female) โดยบนโครโมโซมเพศทั้งสองชนิดนั้นมี conserved gene ที่ชื่อว่า Chromo-helicase-DNA binding protein (CHD) และสามารถพบได้ในนกที่เป็นนกกลุ่ม non-ratite ทุกชนิด ซึ่งยีน CHD ที่อยู่บน W–chromosome เรียกว่า CHD1-W และ ยีน CHD ที่อยู่บน Z– chromosome เรียกว่า CHD1-Z (Griffiths, 2000a and 2000b, Fridolfsson และคณะ,1999, Cortes และคณะ,1999) การตรวจแยกเพศนกสมัยใหม่โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา คือ PCR ร่วมกับ gel electrophoresis จึงสามารถอาศัยความแตกต่างของยีน 2 ชนิดนี้ได้

โดยนกเพศเมียจะพบแถบของ CHD1-W และ CHD1-Z ส่วนนกเพศผู้จะพบเพียง 1 แถบคือ CHD1-Z ปรากฏบนแผ่นเจล (Griffths, 2000a and 2000b)

วิธีการเก็บตัวอย่างในนกเพื่อนำมาทำการตรวจแยกเพศหรือการวินิจฉัยอื่นๆ ก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยทั่วไปการเก็บตัวอย่างมีอยู่ 2 วิธีหลัก ๆ คือ แบบที่มีการกระทำกับตัวสัตว์ (invasive) และแบบที่ไม่กระทำกับตัวสัตว์หรือที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ (non-invasive) การเก็บตัวอย่างแบบที่มีการกระทำกับตัวสัตว์ คือการเก็บตัวอย่างที่ต้องมีการจับ ควบคุมสัตว์ ได้แก่ ตัวอย่างเลือด และขน ซึ่งวิธีนี้มีผลกระทบต่อตัวนกมาก เนื่องจากนกเป็นสัตว์ที่เปราะบาง ตื่นเต้นและตกใจง่าย โดยเฉพาะนกที่มีขนาดเล็ก ลูกนก และนกที่มีคุณค่าทางการอนุรักษ์หรือเศรษฐกิจ ถ้าการจับควบคุมบังคับไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการสูญเสียได้ นอกจากที่กล่าวมาวิธีนี้ยังทำได้ลำบากกรณีนกที่เลี้ยงในกรงใหญ่หรือนกป่าที่ไม่สามารถจับได้ สำหรับการเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ คือการเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ต้องมีการควบคุมบังคับนก ทำให้ไม่มีผลกระทบต่อตัวนกมากนัก และสามารถใช้ได้กับลูกนก นกตัวเล็ก นกที่เลี้ยงในกรงใหญ่หรือนกป่าได้ ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะ มูล และของเสียในเปลือกไข่ เป็นต้น ทั้งนี้ตัวอย่างปัสสาวะและมูลก็มีเซลล์เยื่อบุลำไส้ปะปนอยู่ จึงสามารถนำมาสกัดดีเอนเอและนำไปใช้แยกเพศได้ (Nota และ Takenata,1999, Bradley, 2001) ส่วนของเสียในเปลือกไข่ซึ่งประกอบไปด้วยสิ่งคัดหลั่ง เนื้อเยื่อ หรือเลือดที่ติดกับเปลือกไข่ จึงสามารถเป็นแหล่งดีเอนเอที่นำมาใช้ในการแยกเพศได้เช่นกัน วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อนำตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่หรือปัสสาวะและมูลนก มาทำการสกัดดีเอนเอและแยกเพศโดยเทคนิค PCR ร่วมกับ gel electrophoresis ทั้งนี้เพื่อเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเลือกเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ เพื่อใช้ในการแยกเพศนก โดยเฉพาะนกที่ไม่สามารถจับต้องตัวได้ เช่น นกป่าหรือนกที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ นอกเหนือจากนกที่เป็นนกเลี้ยง เป็นสำคัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ไข่ฟักของไก่ต๊อก (*Numida meleagris*) 15 ฟอง นำมาฟักเพื่อเก็บตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่ หลังจากนั้นทำการเลี้ยงไก่ต๊อกกลุ่มนี้ต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการเก็บตัวอย่างมูลและเลือด ทำการแยกเพศด้วยการทำการปลิ้นก้น ภายหลังลูกไก่ต๊อกฟักเป็นตัว พร้อมทั้งสังเกตพฤติกรรมและลักษณะเพศภายนอกของไก่ต๊อกกลุ่มนี้หลังจากที่เลี้ยงไปแล้วระยะหนึ่ง เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากทำ PCR

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่ โดยทำการเก็บภายหลังจากที่ลูกไก่ฟัก โดยทำการประยุกต์จากวิธีการของ Nota และ Takenata (1999) คือ ทำการล้างเก็บตัวอย่างของเสียในส่วนที่เป็นมูลไก่และส่วนที่เป็นสิ่งคัดหลั่งและเลือดด้วยการใช้ก้านสำลีที่ชุ่มด้วย 0.9 % NaCl หรือ Phosphate Buffer Solution (PBS) และเก็บใน 70 % Ethanol ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C รอการสกัดดีเอนเอต่อไป ส่วนตัวอย่างปัสสาวะและมูลนก ทำการเก็บเช่นเดียวกัน แต่ทำการเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นปัสสาวะและผิวด้านนอกของมูลนก ซึ่งเป็นส่วนที่คาดว่าเป็นส่วนที่มีเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่ลอกหลุดอยู่ และตัวอย่างเลือดจะทำการเก็บโดยการเก็บจากเส้นเลือดดำที่ปีกหรือปลาย

เล็บ แล้วเก็บไว้ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) เพื่อนำไปสกัดหาดีเอนเอต่อไป

การสกัด DNA

ทำการการสกัดดีเอนเอตามวิธีของ นำดีและคณะ (2544) ในตัวอย่างเลือด ส่วนการสกัดดีเอนเอจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และมูลนก จะใช้ปริมาณตัวอย่าง 200 µl เติม proteinase K buffer 470 µl และ 20 mg/ml proteinase K 30 µl ทิ้งไว้เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเติม 5 M NaCl 100 µl และ CTAB/NaCl 80 µlก่อนทำการสกัดด้วย phenol และ chloroform ต่อไป โดยใช้ Isopropanol ในการตกตะกอนดีเอนเอ

คู่ Primer

primer1 : 2551F 5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA-3'

primer2 : 2719R 5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3'

Polymerase Chain Reaction

นำตัวอย่างดีเอนเอที่สกัดมาเพิ่มปริมาณดีเอนเอกับสารละลายผสม (Master mix) ที่ปริมาตรรวม 15 µl ซึ่งประกอบด้วย ซึ่งประกอบด้วย 10x Mg^{2+} free buffer (Finzyme®),2.5 mM $MgCl_2$ (Finzyme®), 0.25 µM dNTPs (SibEnzyme®), 1 unit DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finzyme®), 0.2 pmol primer 1 และ primer 2, distilled water และ DNA template ที่ได้จากการสกัด จากนั้นทำการปรับเครื่อง Thermal cycle (Thermo Hybaid®) ให้มีขั้นตอนดังนี้คือ ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 denature ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 60°C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3 final extension 72 °C เป็นเวลา 7 นาที ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้าย นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปวัดปริมาณ ดีเอนเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Eppendorf Bio Photometer) โดยตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260} nmเพื่อวัดปริมาณดีเอนเอและ OD_{280} nm เพื่อวัดปริมาณของโปรตีนที่ปนเปื้อน

Gel electrophoresis

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจหาดีเอนเอบนแผ่นเจลของ 1.5 % Agarose Gel ใช้ความต่างศักดิ์ไฟฟ้าที่ 100 V หลังจากนั้นอ่านผลภายใต้แสง UV ของเครื่อง UV lighter (Geldoc2000 ®) โดยใช้ Ethidiumbromide เป็นสีย้อม

โดยทำการตรวจเทียบกับตัวอย่างดีเอนเอที่ได้จากเลือดของไก่ต๊อกเพศผู้และเพศเมีย (positive control) และสารละลายผสมที่ปราศจากดีเอนเอต้นแบบ (negative control) ทุกครั้งที่ทำในขบวนการ PCR และ gel electrophoresis

ผลการทดลอง

จากการทำ PCR และ gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างทั้ง 15 ตัวอย่างให้ผลเป็นเพศผู้ทั้งหมดจากตัวอย่างเลือด ส่วนจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และมูลพบว่าให้ผลเป็นเพศผู้ 10 และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ (Table1) ซึ่งแถบของยีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลจะอยู่ระหว่าง 400-600 bp โดยที่ไก่ต๊อกเพศผู้จะพบ

แถบยีน 1 แถบ ของ CHD1-Z ที่ 600 bp ส่วนไก่ต๊อกเพศเมียพบแถบยีน 2 แถบ คือ CHD1-Z ที่ 600 bp และ CHD1-W ที่ประมาณ 400 bp (Figure1)

จากการนำดีเอนเอ ที่สกัดได้ไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260} เพื่อวัดปริมาณดีเอนเอ และ OD_{280} เพื่อวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งความบริสุทธิ์ของดีเอนเอที่สกัดได้ดูได้จากสัดส่วนของ OD_{260}/OD_{280} ถ้าดีเอนเอ ที่สกัดได้บริสุทธิ์จะมีสัดส่วนอยู่ที่ 1.8 แต่ถ้าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.5 หรือมากกว่า 2.0 จะแสดงถึงการมีโปรตีนที่ไม่ต้องการปนเปื้อนในปริมาณมาก (Table2) สำหรับผลการวัดปริมาณดีเอนเอพบว่า ผลจากตัวอย่างเลือดพบปริมาณดีเอนเอจำนวนมากและค่อนข้างบริสุทธิ์มีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย ผลจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และตัวอย่างมูลพบมีการปนเปื้อนของโปรตีนค่อนข้างมากในตัวอย่างที่ไม่ปรากฏแถบยีนบนแผ่นเจล ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลเป็นเพศผู้นั้นจะพบปริมาณดีเอนเอที่ค่อนข้างมากและสามารถปรากฏแถบยีนบนแผ่นเจลได้ และผลการแยกเพศด้วยการทำการปลิ้นก้น และสังเกตพฤติกรรมและลักษณะเพศภายนอกของไก่ต๊อกที่ใช้เป็นตัวอย่างเหล่านี้ พบว่าเป็นเพศผู้ทั้งหมด (Table1)

วิจารณ์

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การแยกเพศจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และมูลของไก่ต๊อกให้ผลเป็นเพศผู้ 10 ตัวอย่างและ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยเทียบกับผลการแยกเพศจากตัวอย่างเลือดจากไก่ต๊อกกลุ่มตัวอย่างเดียวกันนี้ซึ่งให้ผลเป็นเพศผู้ทั้ง 15 ตัวอย่าง ร่วมกับตัวอย่างที่ทราบเพศแน่นอน ทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยเพศผู้จะปรากฏแถบยีนของยีน CHD1-Z เพียงแถบเดียวที่ 600 bp ส่วนตัวเมียมีแถบยีนปรากฏ 2 แถบคือที่ประมาณ 400-500 bp 1 แถบของยีน CHD1-W และที่ 600 bp ของยีน CHD1-Z อีก1 แถบ จากการทำ gel elctrophoresis ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการแยกเพศนกเลิฟเบิร์ดด้วย PCR และ gel electrophoresis (นำดีและคณะ, 2544) พบว่าเพศเมียปรากฏแถบยีนที่ 400 และ 600 bp อย่างชัดเจน ส่วนเพศผู้ปรากฏแถบยีนที่ 600 bp อย่างชัดเจน โดยที่คู่ primer ที่ใช้นั้นเป็น primer คู่เดียวกัน คือ primer 2551F และ primer 2719R

ผลการทดลองในเพศเมียที่แตกต่างกันสามารถอธิบายได้หลายสาเหตุ ได้แก่ คุณสมบัติความจำเพาะของยีน ซึ่งจากรายงานการศึกษาวิจัยอื่นๆ (Fridolfsson และคณะ,1999) พบว่าถึงแม้ว่า primer คู่ที่ใช้ในการทดลองคือ primer 2551F และ primer 2719R มีความสามารถในการตรวจหาเพศนกได้ทุกชนิดยกเว้นนกในกลุ่ม ratite แต่ในนกบางชนิดมีจำนวนเบสบนยีนทั้งสองแตกต่างกันไม่มากนัก (CHD1-Z และ CHD1-W) ทำให้แถบยีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลไม่ชัดเจนหรืออาจซ้อนทับเป็นแถบเดียวกันได้ ซึ่งทำให้บางครั้งผลของเพศเมียอาจมีแถบยีนเพียงแถบเดียวได้ และสำหรับ CHD1-W สามารถปรากฏบนแผ่นเจลได้ในช่วง 400 – 450 bp ส่วน CHD1-Z สามารถปรากฏบนแผ่นเจลได้ในช่วง 600 – 650 bp ดังนั้นผลการแยกเพศที่แสดงจาก gel electrophoresis จึงแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยตามชนิดของนก นอกจากคุณสมบัติจำเพาะของยีนและชนิดนกแล้ว เทคนิคในการทำ PCR ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแยกเพศเช่นกัน

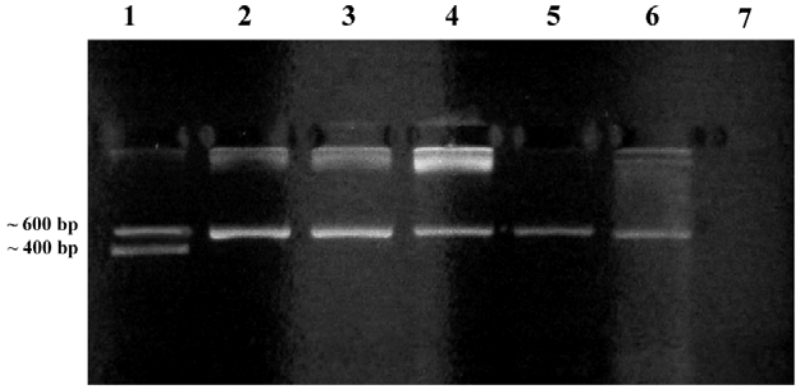

Figure 1 Electrophoretic patterns of DNA for sex identification of guinea fowl. The CHD1-W (~400 bp) and CHD1-Z (~600 bp) were amplified from blood sample of female positive control (lane 1).The male positive control (lane 2), egg waste product samples (lanes 3 and 4) and fecal samples (lanes 5 and 6) were indicated male which observed only one band of CHD1-Z. No DNA band was observed in negative control (lane 7)

Table 1 Comparison of sex determination in 15 unknown sex guinea fowls.

Birds	PCR and Gel Electrophoresis			Vent Sexing	Morphology and
	Egg waste product	Feces	Blood		Behavior
1	Male	Male	Male	Male	Male
2	Male	-	Male	Male	Male
3	-	-	Male	Male	Male
4	-	Male	Male	Male	Male
5	Male	Male	Male	Male	Male
6	Male	-	Male	Male	Male
7	Male	-	Male	Male	Male
8	Male	-	Male	Male	Male
9	Male	-	Male	Male	Male
10	Male	-	Male	Male	Male
11	-	-	Male	Male	Male
12	-	-	Male	Male	Male
13	Male	-	Male	Male	Male
14	-	-	Male	Male	Male
15	Male	-	Male	Male	Male

Table 2 OD_{260}/OD_{280} ratio of samples of 15 unknown sex guinea fowls for evaluate protein and DNA.

Samples	Blood			Egg waste product			Feces		
Birds	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}
1	1.231	0.763	1.61	1.582	2.222	0.72	1.230	0.764	1.61
2	0.995	0.542	1.83	2.317	1.672	1.38	0.917	2.380	0.39
3	1.387	0.802	1.73	0.108	0.082	1.31	0.054	0.057	0.95
4	2.698	1.715	1.57	0.071	0.046	1.54	0.703	0.402	1.74
5	0.689	0.375	1.83	1.375	2.112	0.65	0.993	0.540	1.84
6	0.992	0.541	1.83	2.531	1.672	1.51	0.075	0.051	1.47
7	0.703	0.394	1.78	1.602	0.715	1.98	0.123	0.111	1.12
8	1.544	1.150	1.34	1.391	0.817	1.70	0.094	0.055	1.71
9	0.703	0.394	1.78	2.645	1.730	1.53	0.997	0.892	1.12
10	0.545	0.399	1.36	2.721	1.729	1.57	0.071	0.047	1.49
11	0.833	0.497	1.67	0.150	0.086	1.74	0.082	0.054	1.51
12	1.543	1.151	1.34	0.098	0.074	1.32	0.089	0.077	1.15
13	0.702	0.395	1.78	1.646	0.796	2.07	0.195	0.164	1.19
14	1.390	0.805	1.72	0.087	0.066	1.31	0.098	0.075	1.32
15	2.645	1.731	1.53	1.004	2.112	0.48	0.108	0.084	1.29

The units is μg/ml in OD

กล่าวคือ โดยทั่วไปการทำ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ denaturation, annealing และ extension ซึ่งถ้าไม่เหมาะสมจะส่งผลต่อผลผลิต PCR ได้แก่ time and temperature อุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยาที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนจะส่งผลถึงปริมาณและคุณภาพของดีเอนเอ เช่น การตั้งอุณหภูมิในการ annealing ต่ำเกินไปทำให้เกิดการจับกันของ primer ได้ (primer dimer) จำนวนรอบในการทำ PCR (cycle number) ถ้าใช้จำนวนรอบน้อยเกินไปจะให้ผลผลิตน้อย แต่ถ้าใช้จำนวนรอบมากเกินไป โอกาสที่จะได้ PCR ที่ผิดพลาดก็มากขึ้นตาม อันได้แก่ ผลผลิต PCR มีความจำเพาะเจาะจงน้อยลง สัดส่วนที่เหมาะสมของปฏิกิริยา มีผลต่อปริมาณและความจำเพาะของดีเอนเอ ที่ได้ (จริยาและคณะ 2540)ทั้งนี้การทดลองในครั้งนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนขั้นตอนการทำ PCR มาจากการทดลองในการตรวจแยกเพศนกเลิฟเบิร์ด (นำดีและคณะ, 2544) ตามความเหมาะสม ซึ่งอาจยังไม่เหมาะสมที่สุดจึงมีผลต่อผลผลิต PCR ได้เช่นกัน เอนไซม์ Taq polymerase ก็มีข้อด้อยตรงที่ไม่มีคุณสมบัติ proof reading ดังนั้นอาจมีความผิดพลาดในการนำเบสที่ถูกต้องมาต่อในสายดีเอนเอ นั้นได้ ทำให้ได้เบสที่ผิดไปจากต้นแบบ (นิโลบล, 2542)

จากการนำ ดีเอนเอ ที่สกัดได้ไปวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ผลจากตัวอย่างเลือดพบปริมาณ ดีเอนเอ จำนวนมากและค่อนข้างบริสุทธิ์มีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อย ผลจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และพบว่าตัวอย่างมีการปนเปื้อนของโปรตีนค่อนข้างมากและตัวอย่างส่วนใหญ่ มีปริมาณดีเอนเอน้อยโดยเฉพาะตัวอย่างที่ได้จากมูล ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นเพศผู้พบปริมาณ ดีเอนเอ จำนวนมากจึงสามารถปรากฏบนแถบยีนบนแผ่นเจลได้ถึงแม้จะมีแถบโปรตีนปนเปื้อนปรากฏอยู่ด้วย แต่ตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุเพศได้มีปริมาณ ดีเอนเอ น้อยจึงไม่ปรากฏแถบใดๆบนเจล ทั้งนี้การดูความบริสุทธิ์ของดีเอนเอ จากอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} และปริมาณดีเอนเอ ที่วัดได้อาจไม่สามารถเชื่อถือได้เต็มที่เนื่องจากตัวอย่างอาจมีการปนเปื้อนของ phenol ทำให้ผลการวัดผิดพลาดได้เช่นกัน (Joseph และ David, 1999) อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อนของโปรตีนก็เกิดได้จากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ สาเหตุจากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และมูลเอง กล่าวคือ ตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่ ประกอบไปด้วย เนื้อเยื่อ สิ่งคัดหลั่งต่างๆ เลือด และส่วนที่เป็นของเสียจากตัวอ่อน ซึ่งทำให้มีความสกปรกมากกว่าตัวอย่างเลือด จึงเกิดการปนเปื้อนของโปรตีนที่ไม่ต้องการได้มากกว่า ส่วนมูลนั้นก็เช่นเดียวกัน อีกทั้งมูลเองเป็นแหล่งของแบคทีเรียที่อาจเป็นแหล่งของโปรตีนที่ปนเปื้อนเหล่านี้ ประกอบกับปริมาณเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่หลุดลอดออกมากับมูลนั้นมีปริมาณน้อย (Nota และ Takenata,1999) ทำให้การสกัดดีเอนเอจากมูลค่อนข้างลำบาก ดังนั้นการเก็บตัวอย่างจากของเสียในเปลือกไข่นั้นควรเก็บส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อหรือเลือด หลีกเลี่ยงที่จะเก็บส่วนที่เป็นของเสียจากตัวอ่อนเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนได้ ส่วนการเก็บตัวอย่างจากมูลควรเก็บในส่วนของปัสสาวะและผิวนอกของมูลที่เป็นส่วนที่เซลล์เยื่อบุลำไส้ติดอยู่ให้มากที่สุด นอกจากนี้การปนเปื้อนอาจมาจากการปนเปื้อนในขั้นตอนการสกัด ดีเอนเอ เช่น การตกค้างของ phenol หรือ การปนเปื้อนของโมเลกุลโปรตีนอื่นในระหว่างการสกัด เป็นต้น ,การปนเปื้อนในกระบวนการทำ PCR ทั้งนี้เนื่องจาก PCR เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสูง โดยสามารถเพิ่มจำนวน ดีเอนเอ ต้นแบบได้เป็นล้านเท่า ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นในงาน PCR แม้เพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ (false positive) การปนเปื้อนอาจเกิดระหว่างสิ่งส่งตรวจในขั้นตอนการเตรียม (cross-contamination) หรืออาจเกิดการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ครั้งก่อน (carry- over contamination) การ

ปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากละอองลอย (aerosol) ในขั้นตอนการเปิดปิดฝาหลอด การปั่นแยก การดูดถ่ายสารละลาย เป็นต้น (จริยาและคณะ, 2540 อังคณา, 2537)นอกจากปัจจัยต่างๆที่กล่าวมา ความชำนาญของผู้ทำการทดลอง คุณภาพของสารเคมี การควบคุมการปนเปื้อน และการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการล้วนส่งผลต่อ PCR ทั้งสิ้น

สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การตรวจแยกเพศนกสามารถทำได้จากตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่ และมูลโดยใช้เทคนิค PCR และสามารถแยกเพศได้อย่างถูกต้อง 66 % และ 20 % จาก 15 ตัวอย่างตามลำดับ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเลือกเก็บตัวอย่างในนกแบบที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวนกเพื่อนำมาทำการแยกเพศ แต่ตัวอย่างของเสียในเปลือกไข่และมูลนั้นจะมีการปนเปื้อนจากของเสียของตัวอ่อนและแบคทีเรียตามลำดับ ซึ่งบางครั้งทำให้การแยกเพศไม่ได้ผล ซึ่งอาจแก้ไขได้ โดยวิธีการเก็บตัวอย่างและวิธีการสกัดดีเอนเอที่เหมาะสม ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจแยกเพศนกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความร่วมมือของผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ตลอดจนนักศึกษาคณะสัตวแพทยศาสตร์ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างและเลี้ยงสัตว์ทดลอง นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องทดลองผู้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างและอำนวยความสะดวกในการวิจัย หน่วยงานชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และห้องทดลองในการทำการสกัดดีเอนเอและทำ PCR และ gel eletrophoresis ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้อุปกรณ์การทดลองในการวัดปริมาณดีเอนเอ และท้ายสุดคือโครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ประจำปี 2546 สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทางด้านงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

จริยา ชมวารินทร์ และคณะ. 2540. PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น

นิโลบล เฟื่องต้น . 2542. ชีวเคมี 1.พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัทธรรมสารจำกัด, กรุงเทพมหานคร

นำดี แซ่เฮง และคณะ. 2544. การตรวจแยกเพศนกโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction. วารสารสัตวแพทย์ 3 : 1-8

อังคณา ฉายประเสริฐ. 2537. PCR ในโรคติดต่อ. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพมหานคร

Bradley Brenda J., Chambers Karen E. and Vigilant Linda. 2001. Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. Conservation Genetics. 2 :179–181.

Cortes O., Barroso A. and Dunner S. 1999. Avian sexing : an optimized protocol using polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism. J Vet Diagn Invest. 11 : 297-299

Fridolfsson A. K. and Hans E. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds . Journal of Avian Biology . 30:116-121.

Griffiths R . 2000a. Sex Identification Using DNA Markers. Molecular methods in ecology, Blackwell Science, London.

Griffiths R. 2000b. Sex Identification in Birds . Seminar in avian and exotic pet medicine. 9 : 14.

Joseph S. and David W.R. 1999. Molecular cloning a laboratory manual volume 1. 3rd. Cold spring harbor lab press. New York.

Millar Craig D., Reed Christine E. M., Halverson Joy L. and Lambert David M. 1997. Captive management and molecular sexing of endanger avian species : an applicatipn to the Black Stilt *Himantopus novaezelandiae* and hybrids. Biological conservation. 82 : 81-86.

Nota Y. and Takenaka O. 1999. DNA extraction from urine and sex identification of birds. Molecular ecology. 8 : 1235-1238.