



วิทยานิพนธ์

การตรวจสอบยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจีนิ
รีเซพเตอร์ในไก่สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้วิธีเอสเอสซีพี

**DETECTION OF VERY LOW DENSITY LIPOPROTEIN
AND VITELLOGENIN RECEPTOR GENE IN CHICKENS
BY SSCP TECHNIQUE**

นายวิโรจน์ ลิขิตระกูลวงศ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การตรวจสอบยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจีนินรีเซพเตอร์
ในไก่สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้วิธีเอสเอสซีพี

Detection of Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor Gene
in Chickens by SSCP Technique

นามผู้วิจัย นายวิโรจน์ ลิขิตตระกูลวงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์เนรมิต สุขมณี, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 21 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจีนินรีเซพเตอร์
ในไก่สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้วิธีเอสเอสซีพี

Detection of Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor Gene
in Chickens by SSCP Technique

โดย

นายวิโรจน์ ลิขิตระกูลวงศ์

เสนอ

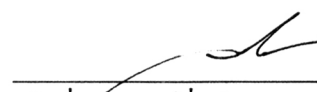
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

วิโรจน์ ลิขิตระกูลวงศ์ 2551: การตรวจสอบยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและ
ไวเทลโลจีนิรีเซพเตอร์ในไก่สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้วิธีเอสเอสซีพี ปรินญาวิทยาศาสตร์
มหบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการ
ระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์,
D. Agr. 71 หน้า

ลักษณะการให้ไข่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมไก่ไข่
ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจีนิรีเซพเตอร์ (Very Low
Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor; VLDL/VTG Receptor) ที่มีตำแหน่งอยู่
โครโมโซมเพศ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน
VLDL/VTG Receptor ในไก่ไข่สายพันธุ์การค้ำและไก่สามเหลียง โดยนำเลือดไก่ไข่สายพันธุ์
การค้ำที่ให้ปริมาณไข่สูงและไก่สามเหลียงที่ให้ปริมาณไข่ต่ำเป็นจำนวน 27 และ 24 ตัวตามลำดับ
นำมาสกัดดีเอ็นเอเป็นรายตัวแล้วเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ
จำเพาะเจาะจงกับยีน VLDL/VTG Receptor ในบริเวณ 5' flanking region (-1351 และ -1599,
-973 และ -1333, -712 และ -1204, -697 และ -1110) จำนวน 4 คู่ พบแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ
248, 389, 492 และ 413 คู่เบสตามลำดับ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์มีขนาดเท่ากันในไก่
ทั้งสองสายพันธุ์ แล้วนำผลที่ได้จาก PCR ไปแยกหาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี SSCP
โดยวิเคราะห์แถบ SSCP บน nondenaturing condition ที่มีความเข้มข้น 8% และยืนยันผลด้วย
โปรแกรม Image Quant TL v2005 พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยไพรเมอร์ที่ 1
พบทั้งหมด 6 รูปแบบ ไพรเมอร์ที่ 2 พบทั้งหมด 3 รูปแบบ ไพรเมอร์ที่ 3 พบทั้งหมด 3 รูปแบบ
ไพรเมอร์ที่ 4 พบทั้งหมด 4 รูปแบบ และเมื่อนำยีนนี้ไปหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสยีน
VLDL/VTG Receptor บริเวณ 5' flanking region ของไก่ไข่สายพันธุ์การค้ำแตกต่างจากไก่สาม
เหลียง เนื่องจากลำดับเบสมีการกลายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากการแทนที่เบส ดังนั้นรูปแบบแถบดีเอ็นเอ
ที่ต่างกันและลำดับเบสที่ต่างกันคาดว่าจะมีผลต่อลักษณะที่แสดงออกของการให้ไข่ที่ต่างกันของ
ไก่ทั้งสองสายพันธุ์

วิโรจน์ ลิขิตระกูลวงศ์
ลายมือชื่อนี้


ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 27 / 2 / 2551

Wiroad Likittrakulwong 2008: Detection of Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor Gene in Chickens by SSCP Technique. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Voravit Siripholvat, D. Agr. 71 pages.

High egg production is an important economic trait, especially in layer industry. This trait might associate with Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor gene (VLDL/VTG Receptor gene), which located on sex chromosome (Z). The objective of this study is to find genetic polymorphism of VLDL/VTG Receptor gene in commercial layer and Tri-Yellow chicken breeds by PCR-SSCP technique. DNA was precipitated from whole blood of 27 commercial laying-hen and 24 Tri-Yellow breeds. PCR-SSCP Technique was used to detect the polymorphism of VLDL/VTG Receptor gene. Specific Primer of these gene were designed and amplified at the 5' flanking region (-1351 to -1599, -973 to -1333, -712 to -1204, -697 to -1110). The fragments of 248, 389, 492 and 413 bp were found, respectively. The same size of VLDL/VTG Receptor gene in both commercial and Tri-Yellow breeds was found. SSCP patterns were analyzed on the 8% nondenaturing polyacrylamide gel and the result was confirmed by Image Quant TL v2005. The result showed the different SSCP bands between commercial and Tri-Yellow breeds. Primer I, II, III and IV found 6, 3, 3 and 4 conformations, respectively. Nucleotide sequences of VLDL/VTG receptor at the 5' flanking region between commercial layer and Tri-Yellow breeds were also different. In Conclusion, the different conformations and nucleotide sequence may relate to the egg production in both breeds.

Wiroad Likittrakulwong Voravit Siripholvat 27 / 02 / 2008
Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร.วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.เนรมิตร สุขมณี กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่ให้ความกรุณาต่อข้าพเจ้านับตั้งแต่การสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ สอบวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย การประเมินผลการทดลอง และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์และขอบพระคุณ รศ.ดร.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม ผู้แทนบัณฑิต และ รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้ความคิดเห็น ข้อเสนอแนะ ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งให้คำแนะนำต่างๆ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านจึงระลึกในความเมตตาและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวจากกลสิกิจเพื่อค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ และภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ขอบพระคุณ Dr. Hugo Volkaert อาจารย์ประจำศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยในด้านเทคนิคต่างๆ และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำในงานวิจัยเพื่อบรรลุผลสำเร็จ และขอบคุณสมาชิกห้อง A312 และ พี่ๆเพื่อนๆ โดยเฉพาะห้อง A311 ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำเรื่องต่างๆที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนให้คำปรึกษาในการวิจัยมาโดยตลอด

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้หากมีข้อบกพร่องหรือไม่สมบูรณ์ประการใด ข้าพเจ้าขออ้อมรับไว้ด้วยความเต็มใจและหากวิทยานิพนธ์นี้ก่อให้เกิดคุณประโยชน์ในการศึกษาแล้วข้าพเจ้าขอมอบให้เป็นกตเวทิตาแก่บุพการีบิดามารดาและผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ต่างๆ จนข้าพเจ้าสามารถจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

วิโรจน์ ลิขิตตระกูลวงศ์
กุมภาพันธ์ 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	29
ผล	29
ผลการเพิ่มปริมาณชิ้น VLDL/VTG Receptor ด้วยเทคนิค	
Polymerase Chain Reaction (PCR)	29
ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Strand Conformational	
Polymorphism (SSCP)	33
ผลการหาลำดับเบสชิ้น VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากกระบวนการ PCR	
(DNA Sequencing)	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	42
สรุป	42
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	44
ภาคผนวก	50
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	โปรตีนและอนุภาคที่จับตัวจำเพาะแบบ Receptor Mediated Endocytosis พบในเซลล์สัตว์	10
2	เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเจลและขนาดที่เหมาะสมในการแยก	23
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR	26
4	การกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 1 ในไก่เฉพาะพันธุ์	33
5	การกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 2 ในไก่เฉพาะพันธุ์	34
6	การกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 3 ในไก่เฉพาะพันธุ์	36
7	การกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 4 ในไก่เฉพาะพันธุ์	37

ตารางผนวกที่

1	สารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	51
2	ส่วนประกอบของสารละลาย Lysis Buffer	51
3	ส่วนประกอบของ TBE Buffer	51
4	แสดงเบอร์ไกที่ใช้ในการทดลอง	67
5	แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ SSCP (SSCP Pattern) ของยีน VLDL/VTG Receptor ของไก่แต่ละตัว	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ข้อสันนิษฐานวิวัฒนาการของสัตว์ปีก	4
2	ระยะเวลาการผลิตลูกไก่พื้นเมืองในแต่ละชุด (9-17) สัปดาห์	7
3	ระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเพศเมีย	9
4	Receptor –Mediated นำ lipoprotein ไปใช้ในการพัฒนา Oocyte และ Somatic cell	10
5	โครงสร้าง VLDL	11
6	องค์ประกอบของ LDL กับ VLDL Receptor	13
7	ระบบการขนส่ง VLDL กับ VLDL Receptor ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย	14
8	ความสัมพันธ์ระหว่าง VTG กับ VTG Receptor	16
9	แผนที่โครโมโซมเพศ (Chromosome Z)	17
10	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR	20
11	ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ 1	30
12	ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ 2	30
13	ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ 3	31
14	ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ 4	31
15	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ 1	32
16	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ 2	34
17	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ 3	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ 4	37
19	ลำดับเบสของ PCR Product ที่ได้จากยีน VLDL/VTG Receptor ในบริเวณ 5'flanking region จากไพรเมอร์ที่ 4 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank	40

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$A_{260,280}$	= Absorbance at 260 nm ,280 nm
APS	= ammonium persulfate
bp	= base pair
DNA	= deoxyribonucleic acid
dNTP	= deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	= ethylene diaminetetraacetic acid
EtBr	= ethidium bromide
mg	= milli-gram
$MgCl_2$	= magnesium chloride
ml	= milli-litre
mM	= milli-Molar
$NaCO_3$	= sodium carbonate
NaCl	= sodium chloride
$Na_2 SO_3 .5H_2 O$	= sodium thiosulfate
ng	= nano- gram
$OD_{260,280}$	= optical density at 260 nm,280 nm
PCR	= polymerase chain reaction
SDS	= sodium dodecyl sulphate
SSCP	= single strand conformation polymorphism
TBE	= Tris-borate ,ethylenediamine tetraacetic acid buffer
TEME	= N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine
TE	= Tis-ethylenedamine tetraacetic acid buffer
Tis-HCl	= Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloric acid
Tm	= melting temperature, mid point , thermal denaturation
UV	= ultra-violet
μl	= microlitre
$^{\circ}C$	= degree of celsius

การตรวจสอบยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจีนิรีเซพเตอร์ ในไก่สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้วิธีเอสเอสซีพี

Detection of Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor Gene in Chickens by SSCP Technique

คำนำ

ไก่เป็นสัตว์ที่มีความผูกพันกับมนุษย์มาช้านานดังที่สะท้อนให้เห็นในด้านต่าง ๆ เช่น ประวัติศาสตร์ ประเพณี วัฒนธรรม ภาษา และการกีฬา เป็นต้น การเลี้ยงไก่แต่เดิมจะเลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติไม่ได้มีการเอาใจใส่ดูแล หรือให้อาหารที่พิเศษ วัตถุประสงค์มีได้มุ่งเน้นเพื่อการค้า แต่เลี้ยงไว้เพื่อเป็นอาหารในครัวเรือน แต่ต่อมาได้มีการปรับปรุงพันธุ์โดยมุ่งเน้นลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การให้ผลผลิตไข่ จนเกิดเป็นพันธุ์ที่สำคัญ ได้แก่ พันธุ์โรดไอแลนด์เรด, ไวท์เลกฮอร์น และบาลีพลิมัทธอร์ท เป็นต้น

ส่วนในช่วงที่ผ่านมาหลังวิกฤตการใช้หวัดนกทำให้ไก่ไข่ และไก่ไข่ที่ติดโรคถูกทำลายมากกว่า 40 ล้านตัว ทำให้ประสบปัญหาหลายด้าน เช่น ภาระด้านค่าอาหาร ไข่ไก่ที่ผลิตได้แต่กลับจำหน่ายไม่ได้ เนื่องจากผู้บริโภคขาดความมั่นใจจึงเกิดภาวะไข่ล้นตลาด แต่ในขณะนี้สถานการณ์ไก่ไข่ในประเทศปรับตัวดีขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากความต้องการบริโภคปรับตัวสูง จึงทำให้การผลิตและการส่งออกไข่ไก่สูงขึ้นตามแต่ทว่าปัญหาของผู้เลี้ยงไก่ไข่ก็คือ ต้นทุนถ้าไก่มีอัตราการให้ไข่สูงก็จะส่งผลให้ต้นทุนต่อหน่วยลดลงด้วย

ไก่พื้นเมืองเป็นไก่ที่ให้ผลผลิตน้อย เนื่องจากชุดไข่หนึ่ง ๆ แม่ไก่ให้ไข่ 10 – 15 ฟอง ปีหนึ่งแม่ไก่ให้ไข่ 3 – 4 ชุด แม้ว่าไก่พื้นเมืองจะให้ผลผลิตน้อยแต่มีจุดเด่นในเรื่องรสชาติดี เนื้อแน่นรสชาติดี จึงมุ่งเน้นในด้านการให้ผลผลิตเนื้อมากกว่าไข่ (สุวรรณ และคณะ, 2526) แต่อย่างไรก็ตามไก่พื้นเมืองมีความต้องการแม่ไก่ที่มีความสม่ำเสมอในการให้ไข่จึงต้องมีการพัฒนาพันธุ์ไก่พื้นเมืองต่อไป การศึกษาพันธุศาสตร์โมเลกุลด้านความหลากหลายและข้อมูลทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของไก่พื้นเมืองยังมีน้อยจึงสามารถจะนำคุณสมบัติที่ดีของไก่พื้นเมืองมาปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้เกิดประโยชน์ขึ้นต่อไป โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ไก่สามเหลือง ซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองของประเทศไทยซึ่งมีพฤติกรรมและปริมาณการให้ไข่คล้ายไก่พื้นเมืองของไทย

และข้อมูลทางพันธุศาสตร์โมเลกุลยังน้อยมาก ดังนั้นในที่นี้จึงใช้ไก่สามเหลืองเป็นตัวแทนของไก่พื้นเมือง

ยีนความหนาแน่นต่ำมากไลโปโปรตีนและไวเทลโลจินินรีเซพเตอร์ (Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor; VLDL/VTG Receptor) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไข่แดงของสัตว์ปีก ดังนั้นเพื่อให้ได้ไก่ที่ไข่ดก จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอเพื่อดูความแตกต่างระหว่างในไก่ไข่สายพันธุ์การค้ากับไก่พื้นเมือง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจินินรีเซพเตอร์ (Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor; VLDL/VTG Receptor)
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจินินรีเซพเตอร์ (Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor; VLDL/VTG Receptor) ในประชากรไก่ไข่สายพันธุ์การค้ำและไก่สามเหลืงโดยใช้วิธีเอสเอสซีพี (SSCP)
3. เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างการกลายพันธุ์ (Point mutation) ของยีนยีนไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำมากและไวเทลโลจินินรีเซพเตอร์ (Very Low Density Lipoprotein and Vitellogenin Receptor; VLDL/VTG Receptor) ในประชากรไก่ไข่สายพันธุ์การค้ำกับไก่สามเหลืง

การตรวจเอกสาร

การจัดจำแนกไก่ (Classification)

โลกเรามีสัตว์ต่าง ๆ อยู่ราว 600,000 สปีชีส์ ในจำนวนนี้เป็นพวกนกประมาณ 10,000 สปีชีส์ แบ่งเป็นหมวดหมู่ต่าง ๆ กันตามลักษณะโครงสร้างของร่างกายสัตว์ ลักษณะเด่นของสัตว์จำพวกนก ก็คือ ขนที่ขึ้นปกคลุมลำตัวจากการศึกษาซากโบราณเท่าที่มีหลักฐานยืนยัน พบว่าสัตว์ปีกโบราณ จำพวกสัตว์พวกอาคีโออบเทอริกซ์ (Archaeopteryx) เมื่อสมัยประมาณ 150 ล้านปี ก่อนเป็น สัตว์เลื้อยคลานขนาดลำตัวประมาณนกพิราบมีฟันเป็นซี่แหลมอยู่ที่ขากรรไกรบนและล่าง มีปีกบินได้ ปลายปีกมีนิ้ว 3 นิ้ว มีหางยาวกระดูกท่อนหาง 18 – 21 ท่อน หางตรงมีขนยื่นออกด้านข้างคล้าย ท่อนและขนหางแพร์คล้ายพัด(Hutt, 1949) (ตามภาพที่1)

ปลา(Fish)



สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ

(Amphibians)

มีปอด ขาคู่หน้า และส่วนหัวคล้ายปลา



สัตว์เลื้อยคลาน

(Reptiles)

มีอวัยวะบางส่วนคล้ายสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น ระบบท่อหุ้มร่างกาย ขา และนิ้วเท้า



สัตว์ปีก มีระบบท่อหุ้มร่างกาย ระบบสืบพันธุ์ (Aves) และระบบขับถ่ายคล้ายสัตว์เลื้อยคลาน

ภาพที่ 1 ข้อสันนิษฐานวิวัฒนาการของสัตว์ปีก

ที่มา: อรรณ (2547)

สัตว์ปีกเป็นสัตว์ที่มีขนขึ้นปกคลุมร่างกายขาหน้าเปลี่ยนเป็นปีกใช้สำหรับการบินออกไข่ และเป็นสัตว์เลือดอุ่น ไก่เป็นสัตว์ปีกที่มีรูปร่างกะทัดรัดกระดูกเบาปราศเปรี๊ยะ อุณหภูมิร่างกาย อยู่ระหว่าง 105 – 109 ฟาเรนไฮต์ (นุชา, 2544) ไก่มีจีโนม diploid ประมาณ 1.2×10^9 bp DNA เทียบได้กับมนุษย์และหนูมีประมาณ 40% ไก่มีจำนวนโครโมโซม 39 คู่ แบ่งเป็นโครโมโซมที่ ขนาดใหญ่ (Macrochromosome) 8 คู่ โครโมโซมขนาดเล็ก (Microchromosome) 30 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ คือ โครโมโซม Z และโครโมโซม W โดยตัวผู้มีจีโนไทป์เป็น ZZ ตัวเมีย มีจีโนไทป์เป็น ZW และสามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Enchanted Learning, 2006)

Kingdom **Animalia**

Phylum **Chordata**

Subphylum **Vertebrata**

Class **Aves**

Order **Galliformes**

Family **Phasianidae**

Genus **Gallus**

Species ***G. domesticus***

ไก่พื้นเมือง

ไก่มีต้นกำเนิดมาจากไก่ป่าในทวีปเอเชียโดยเฉพาะในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และมนุษย์ยังได้นำมาเลี้ยง วิวัฒนาการของไก่เป็นไปตามวิถีชีวิตของมนุษย์เจ้าของซึ่งขึ้นอยู่กับ ธรรมชาติบางปีเกิดภัยพิบัติ หรือ โรคระบาด จึงเป็นการคัดเลือกโดยธรรมชาติจนเป็นไก่พื้นเมือง ไก่พื้นเมืองจึงเป็นมรดกวัฒนธรรม และเทคโนโลยีชีวภาพที่มีความหลากหลายเป็นทรัพย์สิน ภูมิปัญญาของชาวบ้านเป็นไก่ที่มีการเปลี่ยนแปลง ปรับปรุงพันธุ์มาโดยอาศัยพื้นฐานธรรมชาติ จึงทำให้มีความหลากหลาย

ข้อดีของไก่อพื้นเมือง

1. หอาหารเก่งสามารถเลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติได้ ทำให้ประหยัดค่าอาหารได้มาก และยังเป็นแหล่งโปรตีนที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย
2. ทนต่อสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศได้เป็นอย่างดีและทนต่อโรคพยาธิได้ดีกว่าไก่อพื้นเมืองอื่น
3. มีความสามารถในการเลี้ยงลูกเก่ง
4. มีรสชาติดี เนื้อแน่น มีไขมันน้อย

ข้อเสียของไก่อพื้นเมือง

1. ไข่ น้อย เฉลี่ยประมาณ 40 – 50 ฟองต่อปี ให้ไข่เป็นชุด ๆ ละ 7 – 15 ฟอง และมีการเจริญเติบโตช้า
2. เมื่อไข่ครบชุดแล้วไก่อพื้นบ้านมีนิสัยชอบฟักไข่ โดยจะฟักไข่ประมาณ 21 วัน ไข่นอกเป็นลูกเจี๊ยบ และเลี้ยงลูกเจี๊ยบต่อไปอีกประมาณ 2 เดือน จึงจะเริ่มกลับมาให้ไข่ใหม่อีก (วรวิทย์, 2542; วัลลภ, 2544)

การให้ผลผลิตไข่ของไก่อพื้นเมือง

ไก่อพื้นเมืองไทยมีพฤติกรรมของสัตว์ปีกป่า การไข่เป็นชุดหรือด๊ับ การไข่แต่ละชุดใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ซึ่งได้ไข่ประมาณ 8-12 ฟอง เมื่อไข่หมดชุดแม่ไก่อจะใช้เวลาฟักไข่ 21 วัน และเลี้ยงลูกไปอีกประมาณ 1-3 เดือน จึงจะเข้าสู่รอบการผสมพันธุ์ต่อไป ซึ่งการผสมใช้เวลา รอบละประมาณ 3-4 เดือน (เจนรงค์, 2549) (ภาพที่ 2)

ไข่	ฟักไข่	เลี้ยงลูก
2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4-12 สัปดาห์

ภาพที่ 2 ระยะเวลาการผลิตลูกไก่พื้นเมืองในแต่ละชุด (9-17 สัปดาห์)

ที่มา: เจนรงค์ (2549)

การให้ผลผลิตไข่เฉลี่ยของไก่ลูกผสม ไก่พื้นเมืองไทย และไก่พื้นเมืองญี่ปุ่นมีค่าเท่ากับ 52.21, 43.21 และ 33.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ทรงยศ, 2546) และจำนวนไข่เฉลี่ยของไก่พื้นเมืองตั้งแต่เริ่มไข่จนครบ 240 วัน มีเพียง 61 ฟอง/ตัว (อภิชัย, 2525) ส่วนจำนวนไข่สะสมของไก่พันธุ์ต่างในช่วง 20-56 สัปดาห์ หรือ 252 วันพบว่า จำนวนไข่เฉลี่ยของไก่พื้นเมืองเท่ากับ 53.00 ± 5.0 ไก่เล็กฮอร์นเท่ากับ 147.8 ± 6.5 ไก่โรดไอส์แลนด์เรดเท่ากับ 133.7 ± 7.4 ไก่บาร์พลีมัธร็อกเท่ากับ 115.2 ± 4.5 ฟอง/ตัว (นิรัตน์, 2535) งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ไก่สามเหลืองซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองจีนซึ่งก็มีพฤติกรรมและปริมาณการให้ไข่คล้ายกับไก่พื้นเมือง ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวแทนไก่พื้นเมืองในการศึกษาต่อไป

ระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเพศเมีย (Female Reproductive System) ประกอบด้วย

1. รังไข่ (Ovary) ในระยะแรกของการเจริญเติบโตของตัวอ่อน จะมีรังไข่และท่อนำไข่
- 2 ข้างแต่หลังจากฟักไข่ได้ประมาณ 8 วัน รังไข่และท่อนำไข่ข้างขวาจะหยุดเจริญเติบโตและฝ่อไป ทำให้เหลือเพียงข้างซ้ายเท่านั้น รังไข่มีลักษณะคล้ายพวงองุ่น มีกลุ่มไข่แดงขนาดเล็กประมาณ 900 – 3,600 ฟอง ในช่วงอายุ 3 – 4 เดือน มีน้ำหนัก 0.3 – 0.5 กรัม แต่จะเพิ่มขนาดเป็น 2 กรัมเมื่ออายุ 18 – 20 สัปดาห์ ก่อนที่จะมีการวางไข่ น้ำหนักจะเพิ่มเป็น 4 – 6 กรัม ไข่แดงแต่ละฟองจะเจริญอยู่ภายในถุงหุ้มไข่แดง ไข่แดงที่พัฒนาเต็มที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 มม. น้ำหนักประมาณ 20 กรัม จะตกจากรังไข่ลงสู่ท่อนำไข่ ถุงหุ้มไข่แดงจะมีเส้นเลือดฝอย จำนวนมากมาหล่อเลี้ยงเพื่อนำโภชนามาใช้สร้างไข่แดง เมื่อไข่ใบแรกเจริญเติบโตเต็มที่แล้วก็จะมีการตกไข่ ฟองไข่ที่มีขนาดเล็กลงไปจะเจริญขึ้นมาแทน และจะตกในวันถัดมาจนจำนวนครบ 4 – 6 ฟอง

และจะหยุดพักประมาณ 24 – 36 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มมีการตกไข่ต่อเนื่องกันอีกจำนวน ไข่แต่ละชุดที่แม่ไก่ไข่ติดต่อกันทุกวันโดยไม่หยุดเรียกว่าตัวไข่ ไข่จะทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย และผลิตฮอร์โมนเพศเมียเอสโตรเจน

2. ท่อนำไข่ (Oviduct) เป็นกล้ามเนื้อเรียบ ท่อนำไข่ของไก่ที่กำลังอยู่ในช่วงว่างไข่ มีความยาวประมาณ 70 – 80 เซนติเมตร ท่อนำไข่มีเส้นเลือด และเส้นประสาทมหาล่องเลี้ยวเป็นจำนวนมากเพื่อทำหน้าที่ลำเลียงโภชนาต่างๆ ในการสร้างไข่แดงแต่ละฟองซึ่งเกิดภายในท่อนำไข่ ใช้ระยะเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงตกไข่ฟองใหม่ ท่อนำไข่ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

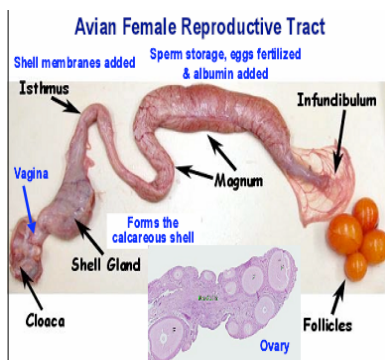
2.1 ปากแตร (Funnel, Infundibulum) ลักษณะเป็นรูปกรวย มีรอยหยักเรียกว่า fimbria ส่วนนี้มีความยาวประมาณ 9 เซนติเมตร เป็นที่รองรับฟองไข่ที่สุก ฟองไข่จะอยู่ในส่วนนี้ประมาณ 15 นาที บริเวณนี้จะเป็นที่กักเก็บตัวอสุจิและเป็นบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิ

2.2 ท่อนไข่ขาว (Magnum) ทำหน้าที่สร้างไข่ขาว (albumen) หุ้มไข่แดง มีความยาวประมาณ 33 เซนติเมตร ไข่อยู่ที่ส่วนนี้ประมาณ 2 ชั่วโมง 54 นาที

2.3 ท่อเยื่อเปลือกไข่ (Isthmus) ส่วนนี้มีขนาดสั้นประมาณ 10 เซนติเมตร ไข่ใช้เวลาอยู่ในส่วนนี้ประมาณ 70 นาที ทำหน้าที่ในการผลิตเยื่อหุ้มไข่ขาวชั้นใน (inner shell membrane) และเยื่อหุ้มไข่ขาวชั้นนอก (outer shell membrane) ซึ่งเยื่อหุ้มไข่มีหน้าที่ปกป้ององค์ประกอบต่าง ๆ ภายในฟองไข่ไม่ให้ติดเชื้อจากบริเวณภายนอก ในด้านป้านของฟองไข่จะพบว่าเยื่อหุ้มไข่ขาวทั้ง 2 ชั้นจะแยกออกจากกันเกิดเป็นช่องว่าง เรียกว่า air cell มีความจำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกเป็นแหล่งรวบรวมอากาศบริสุทธิ์

2.4 มดลูก (Uterus) ลักษณะเป็นถุง ยาวประมาณ 10 – 12 เซนติเมตร ลักษณะเป็นกล้ามเนื้อหนา หน้าที่สร้างเปลือกไข่ และสีเปลือกไข่ ในช่วง 5 ชั่วโมงก่อนไข่ออกมา ผนังของท่อนี้จะเต็มไปด้วยต่อมเปลือกไข่ (shell gland) ไข่จะอยู่ในส่วนนี้นาน 20 ชั่วโมง 40 นาที

2.5 ช่องออกไข่ (Vagina) เชื่อมระหว่าง uterus กับ cloacae ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร ไม่ได้มีหน้าที่ในการสร้างองค์ประกอบของฟองไข่ แต่ทำหน้าที่ช่วยในการวางไข่ และผลิตโปรตีนปิดส่วนรูเปลือกไข่ (egg pores) เพื่อปกป้องฟองไข่ไม่ให้เกิดการติดเชื้อหลังจากการวางไข่ไปแล้ว (เกียรติกศักดิ์, 2544; อรรณพ, 2547) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเพศเมีย

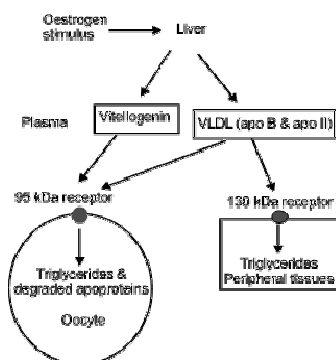
ที่มา: <http://ag.ansc.purdue.edu/nielsen/www245/lecnotes/avianrepro.html> (2006)

การพัฒนาตัวอ่อนสัตว์ปีก

การพัฒนาตัวอ่อนของสัตว์ปีกต้องอาศัยองค์ประกอบจากไข่แดง ซึ่งไข่แดงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อ oocyte โดย yolk protein และ yolk lipid จะถูกสังเคราะห์และลำเลียงมาในรูปของ lipoprotein จากตับ ซึ่งอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน และตับยังเป็นแหล่งที่เกิดกระบวนการ lipid biosynthesis พบว่ามีการทำงานอย่างหนักในไก่ไข่เพศเมียที่โตเต็มที่ (Aydin, 2005) (ภาพที่ 4)

Yolk precursors เป็นสารจำพวก lipoprotein, lipophosphoglycoprotein, VLDL และ VTG ซึ่งจะจับกับตัวรีเซพเตอร์จำเพาะเจาะจง โดยการขนส่งจากกระแสเลือดผ่านทางวิธี Endocytosis เพื่อให้ oocyte ของไข่เจริญเติบโต

การศึกษาระดับ VLDL และ VTG ใน Plasma ในแม่ไก่ระยะไข่พบว่าจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นขึ้นอยู่กักระดับเอสโตรเจนที่ให้ (Nimpf *et al.*, 1988)



ภาพที่ 4 Receptor –mediated นำ lipoprotein ไปใช้ในการพัฒนา Oocyte และ Somatic cell

ที่มา: Aydin (2005)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารที่จับจะต้องมีความจำเพาะเจาะจงต่อตัวรับรีเซพเตอร์นั้น ๆ
(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 โปรตีนและอนุภาคที่จับกับตัวจำเพาะแบบ Receptor mediated endocytosis
พบในเซลล์สัตว์

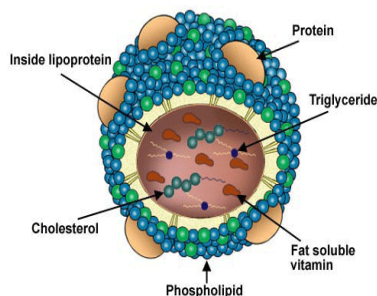
Ligand	Function of Receptor / Ligand complex	Cell type
Low-density lipoprotein (LDLs)	Supply Cholesterol	Most
Transferring	Supply iron	Most
Phosphovitellogenin	Supply protein to embryo	Developing oocyte

ที่มา: Darnell *et al.* (1990)

VLDL/VTG Receptor

Receptor – Mediated Endocytosis จะจับกับ ligand ที่จำเพาะคือ VLDL และ VTG VLDL เป็นสารพวก lipoprotein ซึ่งเป็นสารซับซ้อนที่มีโมเลกุลใหญ่ที่มีแกน ประกอบด้วย lipid ประเภท cholesteroesters และ triglycerides ที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic lipid core) ส่วนผิวของโมเลกุล ประกอบด้วยสารที่ละลายน้ำ (hydrophilic surface) เช่น phospholipids, free cholesterol และ โปรตีนที่เรียกว่า apolipoprotein ในการจำแนกประเภทของ lipoprotein นั้นแบ่งได้ตามคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ตามขนาด (particle Size) ส่วนประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ และการลอยตัว เป็นต้น โดยการแบ่งตามกระบวนการทางเคมีและฟิสิกส์โดยใช้การปั่นแยกที่ความเร็วสูง (ultracentrifugation) แบ่งได้เป็น 1.Chylomicrons ($d < 0.93 \text{ g/ml}$) 2.Very Low Density Lipoprotein (VLDL; $0.93 < d < 1.006$) 3. Intermediate Density Lipoprotein (IDL; $d = 1.006 - 1.019 \text{ g/ml}$) 4.Low Density Lipoprotein (LDL; $d = 1.019 - 1.063 \text{ g/ml}$) 5. High Density Lipoprotein (HDL; $d = 1.063 - 1.210 \text{ g/ml}$)

Very Low Density Lipoprotein (VLDL; $0.93 < d < 1.003 \text{ g/ml}$) เป็น lipoprotein ที่มีอายุสั้น มีขนาดเล็กกว่า chylomicrons VLDL ประกอบด้วย lipid fraction (90%) คือ triglyceride (51%), free cholesterol (7%), esterified cholesterol (12%), phospholipids (18%), non-esterified fatty acid (2%) protein fraction (10%) คือ apolipoprotein B, CI, CII, CIII และ E (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ VLDL

ที่มา: <http://tlt.its.psu.edu/mto/index.html> (2006)

VLDL เป็น lipoprotein ตัวหลักที่ขนส่ง lipid จากตับแม่ไก่ไปยัง oocyte มีปริมาณถึง 60 % ของ dry yolk mass (speake *et al.*, 1998) ตับจะนำสารตั้งต้นมาสังเคราะห์ไตรเอซิลกลีเซอรอลและคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน VLDL ซึ่งตับจะส่งออกในรูป nascent VLDL โดยจะมารวมกับโปรตีนที่สังเคราะห์จาก rough endoplasmic reticulum; RER ที่บริเวณภายในร่างกาย(endogenous lipid)ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ

Apolipoprotein เป็นโปรตีนพิเศษที่เป็นส่วนประกอบของ lipoprotein ที่ lipid ไปในกระแสเลือด โดยจะกระตุ้นหรือยับยั้งเอนไซม์ร่วมในกระบวนการ lipid metabolism และมีหน้าที่เชื่อมโยง lipoprotein กับ lipoprotein Receptor บนผิวเซลล์ โดย VLDL ที่พบมีส่วนประกอบเป็น apolipoprotein B (ApoB) เป็นหลัก (พรทิพย์, 2526; ปนัดดา, 2545)

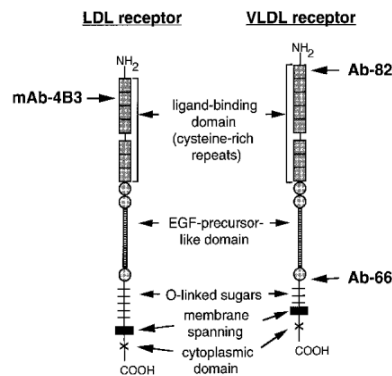
ApoB มี 2 ชนิด ApoB-100 และ ApoB-48 ในไก่จะไม่พบ ApoB-48, ApoE และ ApoA-II แต่พบ ApoB-100, ApoA-I และ Apo VLDL –II โดย Receptor ของ oocyte จะจดจำ apoB-100 ของ VLDL, Lipophosphoglycoprotein, Vitellogenin ซึ่งทั้งหมดเป็นองค์ประกอบหลักของไข่แดง (susanna *et al.*, 2003)

Apo VLDL-II (ApoII) จะมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ lipoprotein lipase (LPL) ที่บริเวณผนังหลอดเลือดทำงานย่อยสลายกรดไขมันออกจากไตรเอซิลกลีเซอรอล ผลลัพธ์คือไตรเอซิลกลีเซอรอลใน VLDL จะไม่ถูกใช้ในกล้ามเนื้อลาย หรือเนื้อเยื่อไขมันแต่จะถูกส่งผ่าน granule basal lamina ของ Ovarian follicle (klasing, 1998) จากการศึกษาถึงระดับ ApoII ใน plasma ของไก่พบว่าถ้ามีระดับเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ มีการสะสม triacylglycerol-rich ในไข่แดง (Nimpf *et al.*, 1988)

Receptor binding ของ VLDL และ VTG จะทำงานไม่ได้ถ้ามีการ methylation ของ lysine residues และในการสกัด Oocyte membrane โดย Sulfhydryl-reducing reagent จะทำให้ไม่สามารถจับได้ทั้ง 2 ligand (Stifani *et al.*, 2002)

VLDL Receptor จัดอยู่ในกลุ่ม LDL Receptor family ซึ่งมีโครงสร้างที่เหมือนกัน โดยแบ่งเป็นส่วน Extracellular domain และส่วน Intracellular domain Receptor มี 5 ส่วน คือ

1. binding repeat ประกอบด้วย กรดอะมิโน 40 ตัว เป็น triple –disulfide bond ผิดเป็นประจุลบ ใช้ในการจับกับ ligand ที่จำเพาะเจาะจง
2. Epidermal growth factor precursor (EPF) ประกอบด้วย 6 Cysteines มีกรดอะมิโน 50 ตัว เป็นแบบอนุรักษ tetrapeptide(Tyr-Trp-Thr-Asp;YWTD)
3. O-linked sugar
4. Transmembrane
5. Cytoplasmic ซึ่งเป็นบริเวณส่งสัญญาณของ Receptor ผ่านทาง coated pit เป็นแบบอนุรักษมี tetrapeptide (Asn-Pro-Xaa-Tyr;NPXY) แต่ข้อแตกต่างระหว่าง LDL กับ VLDL Receptor ตรงที่ ligand binding domain ของ LDL Receptor มี 7 cysteines และจดจำ apoB และ apoE แต่ VLDL Receptor มี 8 cysteines (Bujo *et al.* , 1994) (ภาพที่ 6)

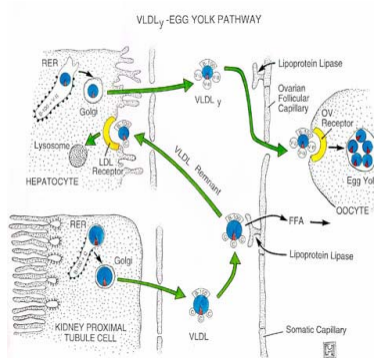


ภาพที่ 6 องค์ประกอบของ LDL กับ VLDL

ที่มา: Bujo *et al.* (1994)

Patel *et al.* (1997) ได้อธิบายว่าในไก่มี 8 repeat ที่บริเวณ binding domain จะมีความสำคัญต่อการสะสม VLDL ในการพัฒนาของไข่ Aydin *et al.* (2005) พบว่าการเกิด lipogenesis ในตับที่มากเกินไปความสามารถในการขนส่งจะทำให้มีการสะสม lipoprotein ในตับเกิดเป็น fatty liver syndrome ซึ่งมักเกิดหลังจาก peak egg production ในสัตว์ปีก C18:1(n-9) จะกระตุ้นการสังเคราะห์และหลั่ง VLDL และ apoB-100 นอกจากนี้ fatty acid ในตับ เช่น sterculic acid, conjugated linoleic acid จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในตับ จะมีผลทำให้ขนาดไข่ลดลงและเพิ่มการสะสม lipoprotein ในตับ และลดการขนส่ง lipid จากตับ

กระบวนการสร้าง VLDL โดยในไก่ไข่จะพบที่บริเวณตับจะเริ่มสร้าง apoB 100 ซึ่งจะประกอบใน VLDLy โดย VLDLy มีเป้าหมายเฉพาะที่รังไข่ (ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 30 mm) และรวม apoVLDL-II ซึ่งจะป้องกัน lipoprotein lipase hydrolysis และ VLDLy ผ่านทาง ovarian capillaries เข้าไปในรังไข่โดยผ่านทาง receptor – mediated endocytosis (OV Receptor) ใน oocyte ซึ่งจะย่อยต่อเป็นกรดอะมิโนคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ และกรดไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบ egg yolk ส่วนในไตบริเวณ proximal tubule cells มีการสร้าง VLDL (ขนาดใหญ่ 60 nm) และรวมกับ apo C ซึ่งกระตุ้น lipoprotein lipase ส่งไป somatic capillary ได้เป็น free fatty acid ซึ่งจะได้เข้าไปยัง oocyte นอกจากนี้ยังมีบางส่วนที่นำกลับไปใช้ใหม่ (Walzem *et al.*, 1990) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ระบบการขนส่ง VLDL กับ VLDL Receptor ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

ที่มา: Walzem *et al.* (1999)

ไกมีรีเซพเตอร์อยู่ 2 กลุ่มคือ oocyte receptor มีขนาด 95 KDa และ somatic cell receptor มีขนาด 130 KDa มีหน้าที่ควบคุมคอเลสเตอรอล (cholesterol homeostasis) (Ernst *et al.*, 1990; Rajan *et al.*, 1987) VLDL/VTG receptor อยู่บนโครโมโซมเพศ (Z chromosome) (ภาพที่ 9)

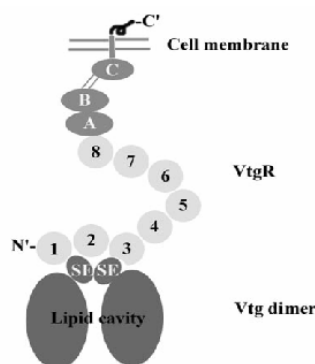
Vitellogenin (VTG) จัดเป็น phosphoglycoprotein มีขนาดประมาณ 200 – 700 KDa VTG แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ VTG I, VTG II (เป็นตัวหลักและมีมากที่สุด) และ VTG III VTG ไม่ใช่โปรตีนเดี่ยว แต่จัดเป็นชุดโปรตีนขนาดเล็กๆ สังเคราะห์จากยีนหลายๆ ชนิด VTG จะสังเคราะห์ภายในตับ และลำเลียงไปยังไข่บริเวณที่ oocyte พัฒนาแล้วจะถูกย่อยออกเป็นฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein), ฟอสไวกิน (phosvitin) และไลโปไวเทลลิน (lipovitellin) โดยมี cathepsin D (CTSD) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยได้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไข่แดงของสัตว์ปีกต่อไป

VTG Receptor ก็จัดอยู่ในกลุ่ม LDL superfamily แบ่งได้เป็น 5 ส่วน เช่น

1. Cysteine – rich ligand – binding repeat (LBRs)
2. Cysteine – rich epidermal growth factor precursor (EGFP) – like domain
3. O – linked sugar domain
4. Single transmembrane domain
5. Short carboxyl terminal cytoplasmic tail เป็นบริเวณสั้นที่มี serine และ threonine

residues

ตำแหน่งในการจับที่ต่างกันบริเวณ LBRs จะมีผลให้ได้ ligand ที่ต่างกัน เช่น ในบริเวณ LBRs ที่ repeat ที่ 5 จำเป็นสำหรับการจับกับ apoE ส่วน repeat ที่ 2 – 7 ช่วยในการจับ apoB VTG จะจับกับตำแหน่ง repeat ที่ตำแหน่ง 1 – 3 ของ LBRs ในลักษณะ dimmer (ภาพที่ 8) (Ankang *et al.*, 2003)

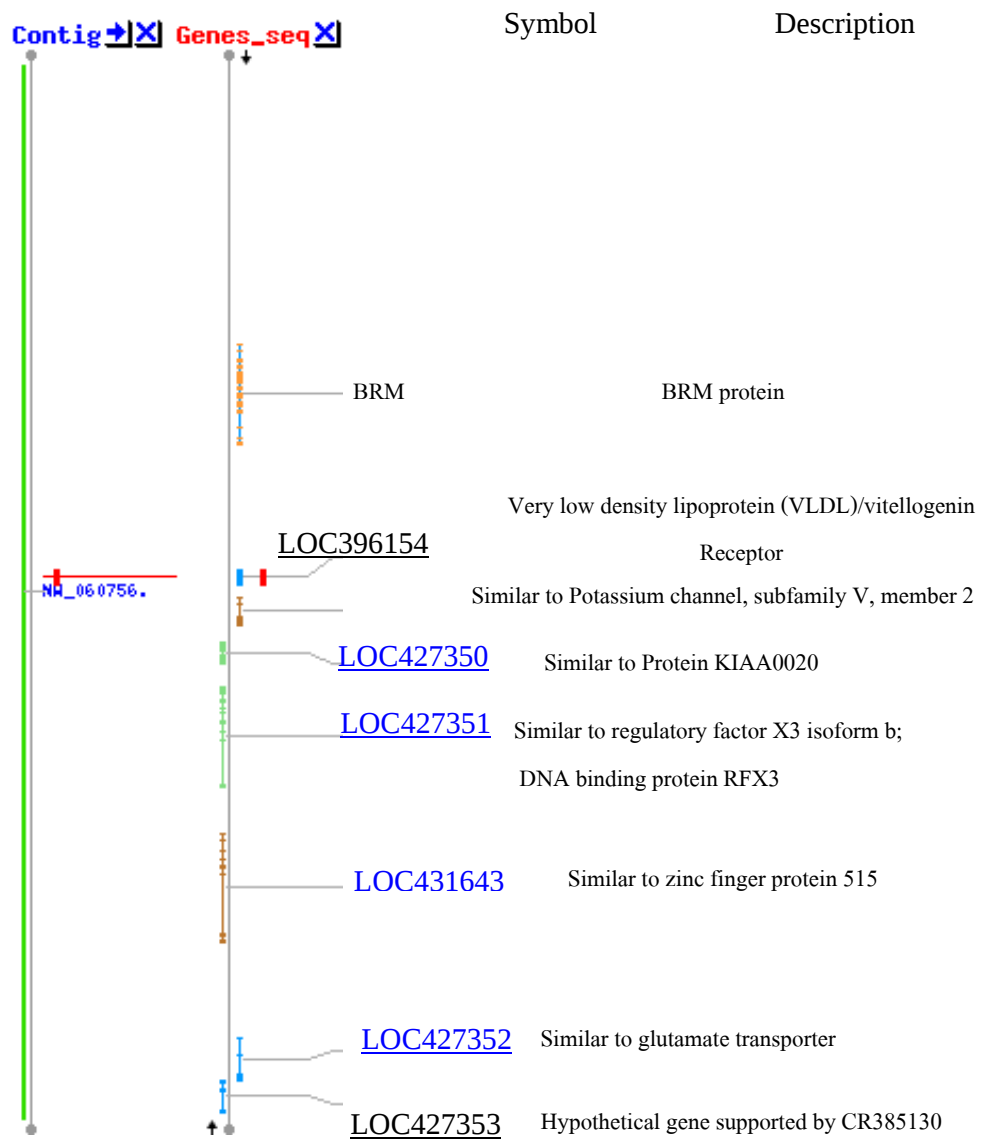


ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง VTG กับ VTG Receptor

ที่มา: Ankang *et al.* (2003)

ปัจจุบันมีการศึกษาโมเลกุลของ VTG receptor กันมากทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ไก่ (Bujo *et al.*, 1994) กบ (Okabayashi *et al.*, 1996) ปลา (Li *et al.*, 2003) และในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังเช่น ยุง (Sappington *et al.*, 1998) มดแดง (Chen *et al.*, 2004) และแมลงสาบ (Tufail and Takeda, 2005)

VTG Receptor ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพบว่า VTG receptor และ yolk protein receptor มีขนาดประมาณ 190 – 214 KDa ซึ่งเป็น 2 เท่าของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (95 – 115 KDa) (Chen *et al.*, 2000) ในกรณียุง (*A. aegypti*: AaVTGR) และ *Drosophila* (*D. melanogaster*: DmVTGR) yolk-protein receptor ประกอบด้วย 2 ligand – binding domain ประกอบด้วย 5 และ 8 repeat ซึ่งไม่เหมือนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง VTG receptor เป็น single ligand binding domain ประกอบด้วย 8 cysteine – rich repeat (Bujo *et al.*, 1994) ในไก่พบว่าเป็น single receptor protein VLDL/VTG receptor จะจับได้ทั้ง VLDL และ VTG แต่ในกรณีของปลา rainbow trout พบว่า VTG receptor จะจับกับ VTG ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ VLDL (Prat *et al.*, 1998) ไก่พบที่ VTG receptor จะนำ VLDL, riboflavin – binding protein และ alpha – macroglobulin เข้าไปใช้ในการเติบโตของ oocyte ถ้ามีการกลายพันธุ์ ผลทำให้ไม่สามารถแสดงออกของ VTG receptor ทำให้ไก่ไม่ไข่ กรณี *Drosophila melanogaster* พบว่ารูปแบบ ovarian expression, mRNA และ โปรตีนที่แปลรหัสให้ *Drosophila melanogaster* Vitellogenin receptor gene เรียกว่า gene yolkless (yl) ซึ่งพบว่าถ้ามีการ mutation ของยีน yl พบว่าจะทำให้ *Drosophila* เป็นหมัน (Schonbaum *et al.*, 2000)



ภาพที่ 9 แผนที่โครโมโซมเพศ (Z)

ที่มา: <http://www.ncbi.nih.gov> (2006)

เทคนิคทางชีวโมเลกุล

1. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้การเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ใช้วิเคราะห์ความผันแปรของโมเลกุลโปรตีน หรือดีเอ็นเอ ตามขนาดรูปร่าง หรือประจุของโมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์ หลักการดีเอ็นเอมีประจุ รูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน เมื่อไปวางในสนามไฟฟ้า โมเลกุลจะเคลื่อนที่ไปตามคุณสมบัติของโมเลกุล เช่น โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบของสนามไฟฟ้า เป็นต้น โดยในการเคลื่อนที่ที่ต้องอาศัยตัวกลาง อาทิ เช่น แป้ง (starch) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) อะกาโรส (Agarose) และ อะกาโรส – อะคริลาไมด์ (agarose – acrylamide) เจลพวกนี้ถูกเคลือบเป็นแผ่นบาง ๆ บนแผ่นพลาสติกหรือแผ่นกระจก (อาภัสสร, 2537)

2. เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reactions) เป็นเทคนิคที่ถูกคิดค้นใช้ครั้งแรกโดย Kar Mullis และคณะ ปี 1985 (Voet *et al.*, 2006) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์ โดยอาศัยหลักการ DNA replication ใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลาย ๆ รอบของปฏิกิริยาจำนวนผลผลิตที่ได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) กระบวนการ PCR ต้องอาศัยส่วนประกอบสำคัญดังนี้

- 1) บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา
- 2) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dNTP) คือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP ใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่
- 3) Oligonucleotide primer 2 สาย ขนาด 20 – 24 นิวคลีโอไทด์ ใช้สำหรับตั้งต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยทิศทางและตำแหน่งในการสังเคราะห์จะต่อจากปลาย 3' ของไพรเมอร์ ดังนั้นในการทำ PCR ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอ บริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณอาจจะทั้งหมดหรือบางส่วนเพื่อใช้ในการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ให้มีเบสเป็นคู่สมกับบริเวณหนึ่งของดีเอ็นเอต้นแบบ

- 4) ดีเอ็นเอเป้าหมาย เป็นดีเอ็นเอที่เราต้องการเพิ่มจำนวน

5) แมกนีเซียมคลอไรด์ ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส

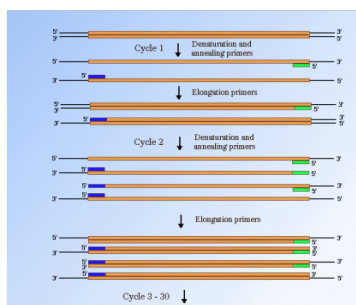
6) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ช่วยในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นแม่แบบ โดยการเชื่อมโมเลกุลด้านปลาย 3' เพิ่มความยาวของดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทางจาก 5' ไป 3' นอกจากนี้ยังพบว่ามีความผิดปกติ 3' → 5' exonuclease ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย่อยโมเลกุลของ dNTP ออกจากปลาย 3' และทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีความผิดพลาด (proofreading) ในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดย PCR จะเกิดขึ้นแบบต่อเนื่องเป็นลักษณะลูกโซ่

ขั้นตอนการทำ PCR แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนต่อไปนี้

1) Denaturing ขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิประมาณ 94 – 95 องศาเซลเซียส

2) Primer annealing ขั้นตอนการลดอุณหภูมิมาที่ประมาณ 25 – 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer เข้าจับดีเอ็นเอบริเวณเบสคู่สม (complementary) ที่ปลาย 3' ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ขึ้นกับขนาดและองค์ประกอบของเบสใน primer ที่ใช้ซึ่งมีผลต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแยกเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์ melting temperature (T_m) $T_m = \{4x(G+C)\} + \{2x(A+T)\}$ อุณหภูมิสำหรับ annealing จะใช้ประมาณ $T_m - 5$ องศาเซลเซียส

3) Primer extension ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากสาย primer จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งจะทำงานได้ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส เมื่อทำการสังเคราะห์ทั้ง 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 -30 รอบ ($n = 20 - 30$) ทำให้ได้ส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขึ้นเป็นปริมาณหลายล้านเท่า (ภาพที่ 10) (Voet *et al.*, 2006)



ภาพที่ 10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

ที่มา: Voet *et.al.* (2006)

3. เทคนิค Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) เป็นการตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้นดีเอ็นเอ (point mutation) โดยอาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดียวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะหรือมี conformation ที่จำเพาะขึ้นอยู่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอสายนั้น ซึ่งจัดเป็นโครงสร้างขั้นทุติยภูมิ (secondary structure) ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ในสภาพ non denaturing polyacrylamide gel ต่างกัน ตรวจสอบความแตกต่าง โดยย้อม DNA ด้วย silver nitrate และ SSCP เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบ single nucleotide polymorphism (SNPs) โมเลกุลดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเร็วช้าต่างกัน (สุรินทร์, 2545) แต่ปริมาณตัวอย่างที่ได้มาตรวจ มักค่อนข้างน้อยทำให้ปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์จึงมีการผนวกกับเทคนิค PCR ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในส่วนที่สนใจตรวจก่อนแล้วนำเอา PCR product มาวิเคราะห์ SSCP ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์จึงนิยมใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ SSCP จึงเรียกว่า PCR – SSCP นอกจากนี้ต้องคำนึงว่า SSCP สามารถตรวจสอบได้เฉพาะชิ้น DNA ขนาดเล็ก ๆ เท่านั้น ประมาณ 0.3 – 0.7 Kb ดังนั้นถ้าชิ้น DNA ที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะต้องนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาดเล็ก แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR – RF – SSCP หรือ Ref – SSCP (restriction endonuclease fingerprinting – SSCP)

เทคนิค SSCP ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ ดังนี้

- 1) การเพิ่มขยายปริมาณ DNA ในส่วนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์
- 2) การ Denature PCR Product เพื่อให้ DNA แยกเป็นสายเดี่ยว
- 3) การทำสภาพ Non Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis เพื่อแยกความแตกต่าง (polymorphism) แล้วนำแผ่นเจลมาย้อมสี เช่น การใช้ silver staining หรือ EtBr

ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อ SSCP มีดังนี้

- 1) อุณหภูมิขณะทำ electrophoresis ซึ่งทั่วไปอุณหภูมิต่ำ ๆ จะเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อชิ้น DNA มีขนาดเล็กมาก ๆ
- 2) ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์
- 3) อัตราส่วนระหว่าง acrylamide ต่อ bi – acrylamide
- 4) glycerol มีผลทำให้เกิดการเสียสภาพของโครงสร้างทุติยภูมิของ DNA สายเดี่ยว และคลายตัวและยังเพิ่มความเหนียวของ gel และลดค่าความไม่นำไฟฟ้า ของตัวกลางและช่วยคลาย gel matrix ในระหว่างการ polymerization

ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้อาจมีอิทธิพลต่อการเกิดโครงรูปทุติยภูมิของ DNA สายเดี่ยว ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SSCP จะเห็นว่าเทคนิค PCR – SSCP สามารถทำได้ง่าย ประหยัดเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นที่สามารถแยกหาความแตกต่างได้ละเอียดในระดับเดียวกัน และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (Fukuoka *et al.*, 1994) เทคนิค SSCP เป็นวิธีในการตรวจสอบ single – base substitutions, small insertions และ small deletion ใน DNA fragments และเป็นเทคนิคที่ใช้ในตรวจหา mutation ของโรคหลาย ๆ โรค เช่น phenylketonuria, ornithine transcarbamylase deficiency และ ornithine δ - amino transferase deficiency (Tsai *et al.*, 1993)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

พันธุ์ไก่ที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย

- | | |
|-----------------------------|--------|
| 1. ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า | 27 ตัว |
| 2. ไก่สามเหลือง | 24 ตัว |

โดยทำการเลี้ยง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดไก่

เก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดปีก (wing vein Venipuncture) ใส่หลอด
Eppendorf ที่ใส่ 0.5M Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) นำเลือดที่เจาะแช่น้ำแข็งทันที
จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอก่อนนำไป
วิเคราะห์ต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยใช้ตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตรใส่ใน Eppendorf อันใหม่
แล้วทำการปั่นตกตะกอน ด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ lysis buffer (250mM
NaCl pH 8, 100 mM Tris-HCl, 100mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) ประมาณ 600 μ l บดและกลับ
หลอดให้เป็นเนื้อเดียวกันนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม
Proteinase K 50 μ g/ml แล้วใส่ตู้ปั่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วเติม

Phenol:Choroform:Isoamyl (25:24:1) 600 μ l แล้วปั่นแยกชั้น 3000 rpm 10 นาที แล้วดูดส่วนใส ด้านบนหลอดใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Ethanol 95% ที่แช่เย็นประมาณ 2 เท่าของส่วนใส แล้วเอียงหลอดไปมาจนเห็นตะกอนดีเอ็นเอดูดสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติม TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) 50 μ l เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ แล้วใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอ ละลายหมด เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่-20 องศาเซลเซียส (Sambrook *et al.*, 2001)

3. การตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

3.1 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบขนาดโดยในที่นี้เราจะใช้ Gene Ruler 100 bp DNA ladder โดยใช้ DNA จากจำนวน 3 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye 2 ไมโครลิตร ใช้ 0.8% agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกดีเอ็นเอ ใน 1% TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วย สารละลาย EtBr 0.5 μ g/ml ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างสีของ EtBr ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ gel ไปส่องด้วย UV-Source โดยใช้เครื่องคือ Gene douctement เพื่อดูแถบ DNA ใน gel

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์ความเข้มข้นของเจลและขนาดที่เหมาะสมในการแยก

ความเข้มข้นของเจล (%)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (bp)	ลักษณะการใช้งาน
0.8	500-7,000	ตรวจสอบการสกัด DNA
1.5	200-4,000	ตรวจสอบPCR

ที่มา: สุรินทร์ (2539)

3.2 การตรวจสอบโดยวิธี Optical method

กรดนิวคลีอิกเช่นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ จะดูดกลืนแสงเหนือม่วงได้ดีทำให้สามารถใช้วิธีนี้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอได้ โดยดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่เป็น Double Strand ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ จะมีค่า Absorbance $A_{260 \text{ nm}}=1$ วิธีการวัด Absorbance ด้วย Spectrophotometer โดยวัด Absorbance ที่ 260 nm (A_{260} , OD_{260}) และที่ 280 nm (A_{280} , OD_{280})

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

- TE สำหรับใช้เจือจางกรดนิวคลีอิก (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA)
- น้ำกลั่น (Distilled Water)

การคำนวณหาปริมาณ

- สำหรับดีเอ็นเอจะใช้ค่า $A_{260} = 1$ หมายถึงมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ = 50 $\mu\text{g/ml}$
- สำหรับอาร์เอ็นเอจะใช้ค่า $A_{280} = 1$ หมายถึงมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ = 40 $\mu\text{g/ml}$

$$\text{DNA Concentration } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260 \text{ nm}} \times 100(\text{dilution}) \times 50$$

โดย 50 คือ DNA $OD = 50 \mu\text{g/ml}$ เนื่องจากที่ค่า $OD_{260 \text{ nm}}$ มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลาย DNA มีความเข้มข้นเป็น 50 $\mu\text{g/ml}$ และ 100 คือ การเจือจาง ไป 100 เท่า ตรวจสอบโดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอนั้นมีอาร์เอ็นเอปะปนอยู่ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีน หรือฟีนอลปะปน อยู่สำหรับอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่า $A_{260}/A_{280} = 2$ (วัฒนาลัย, 2536)

4. การเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor ด้วยวิธี PCR

4.1 การหาลำดับเบสของ VLDL/VTG Receptor

ฐานข้อมูลใน Genbank ของ NCBI จะทราบลำดับเบสของ VLDL Receptor โดยที่สนใจ คือ VLDL Receptor รหัสคือ NM_205229 และ VLDL/VTG Receptor รหัส X80207 นำไป Alignment พบว่าทั้งสองรหัสมีความเหมือนกันจึงเลือกลำดับเบสของ VLDL/VTG Receptor มาใช้นอกจากนี้พบว่า VLDL/VTG Receptor อยู่บนโครโมโซม Z จึงนำลำดับเบสของโครโมโซม Z Genome Sequence Center นำมาเทียบกับ VLDL/VTG Receptor โดยใช้โปรแกรม Gene doc พบว่ามี 18 exon และ 18 intron โดยลำดับเบสที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ตั้งเบสตัวที่+287 ถึง -1600 นับจาก coding sequence ขึ้นไป

4.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer3, Fast PCR และ Genedoc จากการพิจารณาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน VLDL/VTG Receptor ของไก่ *Gallus gallus* จากฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ ที่มี accession number X802075.2 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor

Gene	Region	Sequence (5' – 3')	Position	Product size (bp)
VLDL/VTG Receptor	5' flanking region	Primer 1 TAGCAGCCAATGCCACATCCAAAGC ACAAATGATTGTCCAGGCCAT CC	-1599 -1351	248
	5' flanking region	Primer 2 CGAGATAATCCACTCTGAAGTCATT CCCAGTGGTTCTGTTTCATATTTAC	-1333 -973	389
	5' flanking region	Primer 3 GAAGCATGGAAAGGCAAACAGTGC TACATCTGCATTCCGAGATCAGG	-1204 -712	492
	5' flanking region	Primer 4 ACTTTACTTCCAAGGAACGAAAGC TGAGGAGAAAAATCACTACATCTGC	-1,110 -697	413
	5' flanking region	Primer 5 ACCAAGGTATAACTGGATGTTCAAA AGAAAAATCACTACATCTGCATTCC	-873 -703	172
	5' flanking region	Primer 6 TGCATGTTTCCAGCTCCCTGC TCGGTGGCAGTACGCAGG	-107 -116	240
	5' flanking region	Primer 7 TCACCAAAAACACGCAGAGT GAGAGAGGGAGGGAGGAGAG	-173 -33	158
	5' flanking region	Primer 8 CTCTCCTAATCGCCTCTTTGAC ATATACACACGCACACACACACAC	-88 +287	375

4.3 ปฏิกริยา PCR

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor ที่ต้องการ ด้วยไพรมเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีนนั้น โดยเตรียมส่วนผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งทุกขั้นตอนในการเตรียมสารละลายต้องทำในภาคน้ำแข็งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

- 1) สารละลายดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
- 2) สารละลาย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 3) สารละลาย dNTPs เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร
- 4) สารละลาย แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.44 ไมโครลิตร
- 5) สารละลาย forward primer เข้มข้น 5 พิโคโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

- 6) สารละลาย reverse primer เข้มข้น 5 พิโคโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 7) สารละลาย i-TaqTM DNA Polymerase เข้มข้น 5 หน่วย/ไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- 8) น้ำกลั่น (De-ionized water) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 6.96 ไมโครลิตร

การปรับอุณหภูมิ โดยจะเริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นตั้งการเปลี่ยนอุณหภูมิต่อรอบ ดังนี้

- 1) 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
- 2) 50-60 องศาเซลเซียส (ตามไพรเมอร์) นาน 50 นาที
- 3) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- 4) เครื่องจะทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ซ้ำตามข้อ 1-3 จำนวน 35 รอบ
- 5) 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR จะเก็บรักษา PCR products ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor จากวิธี PCR โดย agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณยีน โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบขนาดโดยในที่นี้เราจะใช้ Gene Ruler 100 bp DNA ladder โดยใช้ DNA จากวิธี PCR จำนวน 3 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye 2 ไมโครลิตร ใช้ 1.5% agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกดีเอ็นเอ ใน 1% TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำ gel ไปย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide 0.5 µg/ml ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างสีของ Ethidium bromide (EtBr) ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำ gel ไปส่องด้วย UV-Source โดยใช้เครื่อง Gene douctement เพื่อดูแถบ DNA ใน gel

6. การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)

ผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกลูโซ่จำลองตัว(PCR Product) จำนวน $5 \mu\text{l}$ แล้วนำมาตรวจสอบโดยเทคนิค Electrophoresis บน acrylamide gel ซึ่งใช้ PCR ต่อ denature solution (95%formamide, 10mM NaOH, 0.05% bromophenol blue และ 0.05% Xylene cyanol) อัตราส่วน 2:1 แล้ว denature PCR Product เพื่อให้ DNA แยกเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว หลอดตัวอย่างประมาณ $10 \mu\text{l}$ ลงใน nondenaturing polyacrylamide gel (8% acrylamide gel มี acrylamide:bisacrylamide = 49:1, 10% glycerol, 0.5XTBE, 1/1000TEMED และ 1/100 ของ 10 เปอร์เซนต์ ammonium persulfate) ด้วยเครื่อง Electrophoresis (BioRad ขนาด 38x50cm) ใช้กระแสไฟฟ้า 12 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Silver Staining

7. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอหรือยีนที่ได้จากกระบวนการ SSCP (DNA Sequencing)

เพื่อยืนยันว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการวิธี SSCP สามารถตรวจสอบการเกิด point mutation และเป็นลำดับเบสของยีน VLDL/VTG Receptor ที่เราสนใจ จึงนำตัวอย่างจากกลุ่มรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิธี SSCP แต่ละคู่ไพรเมอร์ โดยเลือกตัวแทนไพรเมอร์ที่ 3 จำนวน 1 คู่ ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นส่วน 5' flanking region นำไปทำการหาลำดับเบส (Sequencing) โดยใช้ตัวแทนไปทำตามรูปแบบที่ได้จาก SSCP แล้วนำผล Sequencing ที่ได้นำมาทำการเปรียบเทียบความแตกต่างกับยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Genbank

8. การวิเคราะห์ความถี่

วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากวิธี SSCP ในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยใช้โปรแกรม Image Quant TL v2005 ช่วยในการนับแถบดีเอ็นเอ

- ค่า Pattern Frequency คำนวณจาก

% Pattern Frequency (PF.) = (จำนวนตัวอย่างที่พบ pattern นั้น / N)

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ผลและวิจารณ์

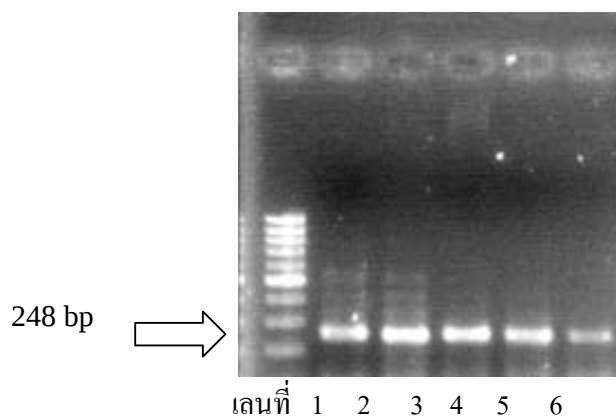
ผล

ผลการเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

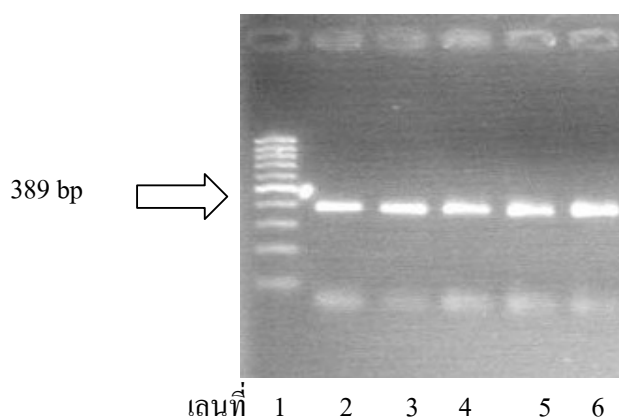
การเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor ในบริเวณ 5'-flanking region โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วนดังกล่าวนี้ พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบในครั้งนี้ สามารถใช้เพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor ของไก่ไข่สายพันธุ์การค้ำ และไก่สามเหลืองได้ในส่วนที่ต้องการเป็นจำนวน 4 คู่ จาก 8 คู่ ซึ่งคิดเป็น 50% ซึ่งอาจจะเกิดจากลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบมาจากไก่ป่า ซึ่งอาจมีบางเบสที่แตกต่างไปทำให้ไม่เหมาะสมต่อการจับของไพรเมอร์ได้

ไพรเมอร์ที่สามารถทำ PCR ได้นั้นแสดงว่าในไก่ไข่สายพันธุ์การค้ำและไก่สามเหลืองมียีน VLDL/VTG Receptor ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณยีนส่วนดังกล่าวได้ แต่พบว่าแถบดีเอ็นเอของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่ของแต่ละไพรเมอร์มีขนาดไม่แตกต่างกัน (Non-Polymorphism)

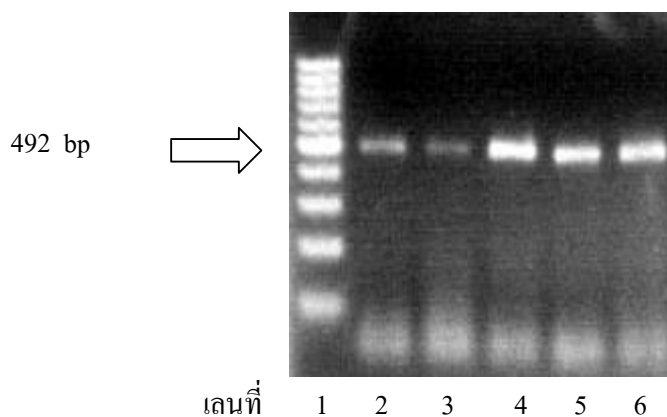
การเพิ่มปริมาณยีน VLDL/VTG Receptor ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่ออกแบบในบริเวณ 5' flanking region แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 1.5 % โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วนำเจลไปย้อมด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 248 คู่เบส (ภาพที่ 11), 389 คู่เบส (ภาพที่ 12), 492 คู่เบส (ภาพที่ 13) และ 413 คู่เบส (ภาพที่ 14) ในไก่ทุกตัวตามลำดับ



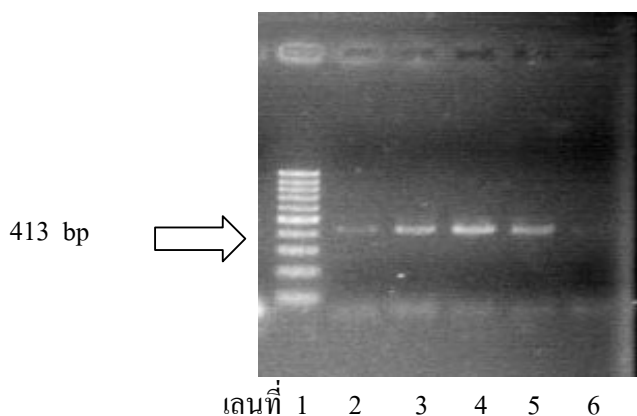
ภาพที่ 11 ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่ 1 ที่ออกแบบในบริเวณ 5' flanking region เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (Gene Ruler 100 bp DNA ladder) เลนที่ 2 และ 3 เป็นไก่สามเหลือง เลนที่ 4 ถึง 6 เป็นไก่ไข่สายพันธุ์การคำ



ภาพที่ 12 ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่ 2 ที่ออกแบบในบริเวณ 5' flanking region เลนที่ 1 เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (Gene Ruler 100 bp DNA ladder) เลนที่ 2 และ 3 เป็นไก่สามเหลือง เลนที่ 4 ถึง 6 เป็นไก่ไข่สายพันธุ์การคำ



ภาพที่ 13 ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ที่ 3 ที่ออกแบบบริเวณ 5' flanking region แล้วเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (Gene Ruler 100 bp DNA ladder) เลนที่ 2 และ 3 เป็นไก่สามเหลือง เลนที่ 4 ถึง 6 เป็นไก่ไข่สายพันธุ์การคำ



ภาพที่ 14 ยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR โดยไพรเมอร์ที่ 4 ที่ออกแบบบริเวณ 5' flanking region แล้วเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp (Gene Ruler 100 bp DNA ladder) เลนที่ 2 และ 3 เป็นไก่สามเหลือง เลนที่ 4 ถึง 6 เป็นไก่ไข่สายพันธุ์การคำ

สุรินทร์ (2545) ได้กล่าวว่า การทำ PCR แถบดีเอ็นเอที่เกิดแตกต่างกันเกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือขาดหาย (Insertion/deletion) แต่ถ้าความแตกต่างของเบสภายในดีเอ็นเอเกิดจาก Base Substitution ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้อาจเท่ากันซึ่งแถบดีเอ็นเอในไก่ไข่ และไก่สามเหลืองทุกตัวที่ใช้มีขนาดเหมือนกัน แต่ปริมาณการให้ไข่เฉลี่ยของไก่ทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่าง ดังนั้น ในการแสดงออก

ระดับเบสของยีน VLDL/VTG Receptor อาจจะมีผลต่อการสร้างไข่แดงเกล็ดที่แตกต่างกันของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบ Point mutation ในขั้น SSCP ต่อไป

ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

การตรวจสอบหาความแตกต่างโดยวิธี PCR ยังไม่พบความแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องหาความแตกต่างกันเฉพาะ 1 เบส (Single Nucleotide Polymorphism; SNPs) ด้วยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ในสภาวะ nondenaturing condition ที่มีความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์แล้วตรวจผลจากแผ่นเจล โดยวิธี Silver Staining

1. ผลการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor

การทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 1 ที่ออกแบบจากส่วนของ 5' flanking region พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (SSCP pattern) มากถึง 6 รูปแบบ ดังภาพที่ 15 โดยทั้ง 6 รูปแบบ จะมีการกระจายตัวในไก่แต่ละพันธุ์ ดังตารางที่ 4



ภาพที่ 15 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ ที่ 1 โดยเลนที่ 1 และ 2 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 1 เลนที่ 3 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 2 เลนที่ 4 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 3 เลนที่ 5 เป็นตัวอย่างของรูปแบบ 4 เลนที่ 6 เป็นตัวอย่างของรูปแบบ 5 เลนที่ 7 เป็นตัวอย่างของรูปแบบ 6

ตารางที่ 4 แสดงการกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่
ในไก่เฉพาะพันธุ์

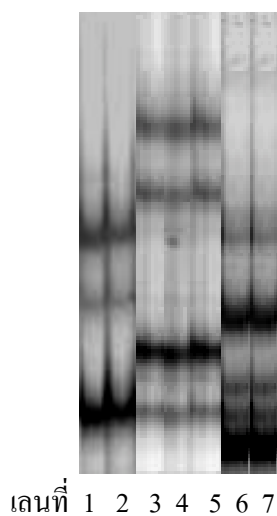
พันธุ์	เปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของรูปแบบของ SSCP					
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3	รูปแบบที่ 4	รูปแบบที่ 5	รูปแบบที่ 6
ไก่สามเหลือง (N=24)	0.250 (6)	0.042 (1)	0.542 (13)	0.042(1)	0.042(1)	0.083 (2)
ไก่ไข่ (N=27)	0.185(5)	0(0)	0.778(21)	0(0)	0(0)	0.037(1)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนตัวของไก่

การเกิดรูปแบบ SSCP จากภาพที่ 15 พบรูปแบบได้มากถึง 6 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่า
ไพรเมอร์ที่ 1 ที่ออกแบบในส่วน 5' flanking region ของยีน VLDL/VTG Receptor ในไก่ที่นำมา
ทดลองนี้มีความแตกต่างกัน (Polymorphism) หรือเกิด point mutation ขึ้นภายในยีนส่วนดังกล่าว

การพบรูปแบบSSCP มากถึง 6 รูปแบบ ในตารางที่ 4 คือ รูปแบบที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ใน
ไก่สามเหลือง พบรูปแบบที่ 3 เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดพบถึง 0.542 รองลงมาคือ รูปแบบที่ 1 พบ
ถึง 0.250 และ รูปแบบที่ 6 จำนวน 0.083 ส่วนรูปแบบที่พบน้อยที่สุดคือ รูปแบบที่ 2, 4 และ 5 พบ
เท่ากันคือ 0.042 ในไก่ไข่พบรูปแบบถึง 3 รูปแบบ คือรูปแบบที่ 1, 3 และ 6 โดยรูปแบบที่ 3 พบมาก
ที่สุดถึง 0.778 รองลงมาคือ รูปแบบ ที่ 1 เป็นจำนวน 0.185 ส่วนรูปแบบที่ 6 พบน้อยสุดแค่ 0.037
แต่ในไก่ไข่ ไม่พบรูปแบบที่ 2, 4 และ 5

การทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 2 ที่ออกแบบจากส่วนของ
5' flanking region พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (SSCP pattern) 3 รูปแบบ ดังภาพที่ 16 โดยทั้ง
3 รูปแบบ จะมีการกระจายตัวในไก่แต่ละพันธุ์ ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 16 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ ที่ 2 โดยเลขที่ 1 และ 2 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 1 เลขที่ 3 ถึง 5 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 2 เลขที่ 6 และ 7 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 3

ตารางที่ 5 แสดงการกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL Receptor จากไพรเมอร์ที่ 2 ในไก่เฉพาะพันธุ์

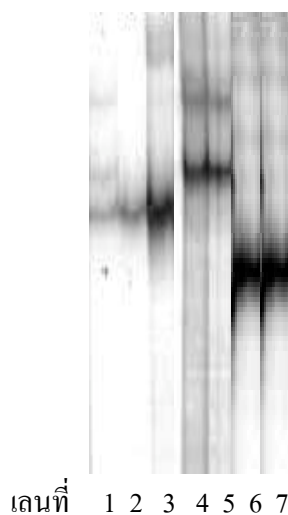
พันธุ์	เปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของรูปแบบของ SSCP		
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3
ไก่สามเหลือง (N=24)	0.667(16)	0.125 (3)	0.208 (5)
ไก่ไข่ (N=27)	1.000(27)	0(0)	0(0)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนตัวของไก่

การเกิดรูปแบบ SSCP จากภาพที่ 16 เกิดรูปแบบได้ถึง 3 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ 2 ที่ออกแบบในส่วน 5' flanking region ของยีน VLDL/VTG Receptor ในไก่ที่นำมาทดลองนี้ มีความแตกต่างกัน (Polymorphism) หรือเกิด point mutation ขึ้นภายในยีนส่วนดังกล่าว

การพบรูปแบบ SSCP ทั้งหมด 3 รูปแบบ ในตารางที่ 5 โดยไก่สามเหลืองพบรูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่พบความถี่สัมพัทธ์มากที่สุดถึง 0.667 รองลงมาคือ รูปแบบที่ 3 พบ 0.208 รูปแบบที่ 2 พบน้อยที่สุดคือ 0.125 ส่วนในไก่ไข่พบเพียงรูปแบบเดียวคือ รูปแบบที่ 1 พบความถี่สัมพัทธ์เท่ากับ 1.000

การทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 3 ที่ออกแบบจากส่วนของ 5' flanking region พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (SSCP pattern) ถึง 3 รูปแบบ ดังภาพที่ 17 โดยทั้งรูปแบบจะมีการกระจายตัวในไก่แต่ละพันธุ์ ดังตารางที่ 6



ภาพที่ 17 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ ที่ 3 โดยเลนที่ 1 ถึง 3 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 1 เลนที่ 4 และ 5 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 2 เลนที่ 6 และ 7 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 3

ตารางที่ 6 แสดงการกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 3 ในไก่เฉพาะพันธุ์

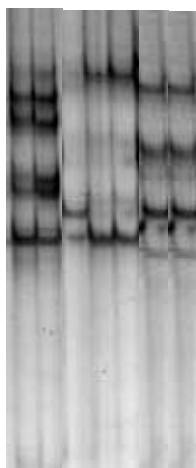
พันธุ์	%การกระจายตัวของรูปแบบของ SSCP		
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3
ไก่สามเหลือง			
(N=24)	0.500(12)	0.458 (11)	0.042 (1)
ไก่ไข่			
(N=27)	0(0)	1.000(27)	0(0)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนตัวของไก่

รูปแบบ SSCP เกิดรูปแบบได้ถึง 3 รูปแบบ จากภาพที่ 17 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ 3 ที่ออกแบบในส่วน 5' flanking region ของยีน VLDL/VTG Receptor ในไก่ที่นำมาทดลองนี้ มีความแตกต่างกัน (Polymorphism) หรือเกิด point mutation ขึ้นภายในยีนส่วนดังกล่าว

ไก่สามเหลืองพบรูปแบบ SSCP เป็นจำนวน 3 รูปแบบ จากตารางที่ 6 คือรูปแบบที่ 1, 2 และ 3 โดยรูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่พบความถี่สัมพัทธ์มากที่สุดถึง 0.500 รองลงมาคือ รูปแบบที่ 2 พบ 0.458 รูปแบบที่ 3 พบน้อยที่สุดคือ 0.042 ส่วนในไก่ไข่พบเพียงรูปแบบเดียวคือ รูปแบบที่ 2 พบความถี่สัมพัทธ์เท่ากับ 1.000

การทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 4 ที่ออกแบบจากส่วนของ 5' flanking region พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (SSCP pattern) ถึง 4 รูปแบบ ดังภาพที่ 18 โดยทั้งรูปแบบจะมีการกระจายตัวในไก่แต่ละพันธุ์ ดังตารางที่ 7



เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7

ภาพที่ 18 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor โดยใช้ไพรเมอร์ที่ 4 โดยเลนที่ 1 และ 2 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 1 เลนที่ 3 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 2 เลนที่ 4 และ 5 เป็นตัวอย่างของรูปแบบที่ 3 เลนที่ 6 และ 7 เป็นตัวอย่างของรูปแบบ 4

ตารางที่ 7 แสดงการกระจายตัวของรูปแบบ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor จากไพรเมอร์ที่ 4 ในไก่เฉพาะพันธุ์

พันธุ์	เปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของรูปแบบของ SSCP			
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3	รูปแบบที่ 4
ไก่สามเหลือง				
(N=24)	0.833(20)	0.042 (1)	0.083 (2)	0.042(1)
ไก่ไข่				
(N=27)	1.000(27)	0(0)	0(0)	0(0)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือจำนวนตัวของไก่

จากภาพที่ 18 การเกิดรูปแบบ SSCP ถึง 4 รูปแบบ จากภาพที่ 18 แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ 4 ที่ออกแบบในส่วน 5' flanking region ของยีน VLDL/VTG Receptor ในไก่ที่นำมาทดลองนี้ มีความแตกต่างกัน (Polymorphism) หรือเกิด point mutation ขึ้นภายในยีนส่วนดังกล่าว

ไก่สามเหลืองพบรูปแบบ SSCP เป็นจำนวนถึง 4 รูปแบบ จากตารางที่ 7 โดยรูปแบบที่ 1 เป็นรูปแบบที่พบความถี่สัมพัทธ์มากที่สุดถึง 0.833 รองลงมาคือ รูปแบบที่ 3 พบ 0.083 รูปแบบที่ 2 และ 4 เป็นรูปแบบที่พบน้อยที่สุดคือ 0.042 ส่วนในไก่ไข่พบเพียงรูปแบบเดียวคือ รูปแบบที่ 1 พบความถี่สัมพัทธ์เท่ากับ 1.000

ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไป โดยการหาลำดับเบสของยีนในส่วนดังกล่าวนี้ ว่ามีตำแหน่ง Point mutation ในส่วนใด และการเกิด mutation ในตำแหน่งดังกล่าวจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะการแสดงออกของการให้ไข่ของไก่หรือไม่

Satifani *et al.* (2002) อธิบายว่าความหลากหลายในการ Splice VLDLR แบบ Shorter form จะไม่มีส่วน O-linked sugar ซึ่งจะแสดงออกใน germ cell ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ในธรรมชาติถ้าเกิด point mutation ใน gene ที่แปลให้ short form ของ VLDLR จะมีผลเป็น Restricted Ovulator (RO) ทำให้ชะงักการให้ไข่ของแม่ไก่ ซึ่งแม่ไก่จะไม่สามารถแสดงการทำงาน Oocyte Receptor กับ VLDL ได้ และ Single gene ที่ขาดหายไปมีผลต่อการจับ ligand กับ Oocyte Receptor

Tsai *et al.* (1993) ได้ใช้เทคนิค SSCP เพื่อตรวจหา polymorphism ของ apolipoprotein E (ApoE) ในคนพบความแตกต่างอย่างชัดเจนใน 3 allele มีอยู่ 5 รูปแบบ

กุลสุดา (2550) ศึกษาในคาร์เทปซินดี (Cathepsin D; *CTSD*) และยีนไวเทลโลเจนนินทู (Vitellogenin II; *VTG II*) ยีน *CTSD* ศึกษาในส่วน 5' -flanking region และส่วน coding sequence สำหรับยีน *VTG II* ศึกษาในส่วน 5' -end region ส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 และบริเวณ exon 27 โดยใช้เทคนิค SSCP ความเข้มข้น 8% ในไก่ไข่และไก่สามเหลืองไม่พบความแตกต่างกัน แต่ผลของลำดับเบสของยีน *VTG II* บริเวณ 5' -end region ของไก่ไข่แตกต่างจากไก่สามเหลือง

กรณีไก่ไข่พบเพียงแค่รูปแบบเดียวในไพรเมอร์เกือบทั้งหมดยกเว้นเฉพาะไพรเมอร์ที่ 1 ในขณะที่ไก่สามเหลืองพบรูปแบบ SSCP ที่มีความหลากหลาย ในทุกไพรเมอร์ผลแตกต่างดังกล่าว เป็นเพราะไก่ไข่มีการคัดเลือกลักษณะปริมาณไข่สูงมาอย่างต่อเนื่องจนทำให้เกิดความสม่ำเสมอของสายพันธุ์ ส่วนไก่สามเหลืองยังคงไว้ซึ่งความหลากหลายของการให้ไข่ และรูปแบบ SSCP ที่มีความหลากหลายโดยเฉพาะที่พบในไก่สามเหลืองย่อมแสดงว่าในบริเวณ 5' flanking region ของยีน VLDL/VTG receptor เกิด SNPs เป็นผลทำให้รูปแบบ SSCP ในไก่สามเหลืองบางส่วนแตกต่างไปจากรูปแบบ SSCP ของไก่ไข่สายพันธุ์การค้าที่เป็นไก่ไข่คอก จึงเป็นไปได้ว่ารูปแบบ SSCP เหล่านี้จะเป็นรูปแบบที่แสดงถึงการให้ปริมาณไข่ต่ำในไก่สามเหลือง ในขณะที่รูปแบบ SSCP ในไก่สามเหลืองที่มีรูปแบบเหมือนในไก่ไข่น่าจะให้ผลผลิตที่ดีกว่ารูปแบบ SSCP แบบอื่น

การศึกษา SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor คาดว่าน่าจะมีผลต่อปริมาณการให้ไข่เฉลี่ยของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ที่ต่างกัน นอกจากนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษา ลำดับเบสของยีนในส่วนดังกล่าวนี้ ว่ามีตำแหน่ง point mutation ในส่วนใด และการเกิด mutation ตำแหน่งดังกล่าว น่าจะมีผลต่อลักษณะการแสดงออกของการให้ไข่ของไก่ต่อไป

ผลการหาลำดับเบสของยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากระบวนการ PCR (DNA Sequencing)

การนำ PCR product ของไพรเมอร์ คู่ที่ 4 ของยีน VLDL/VTG Receptor ในบริเวณ 5' flanking region ซึ่งอยู่บนส่วน Chromosome Z ที่ให้รูปแบบของ SSCP ทั้งหมด 4 รูปแบบ โดยใช้ตัวแทนของไก่สามเหลือง เบอร์ NO3, NO4 และ NO15 และ ไก่ไข่สายพันธุ์การค้า เบอร์ NO57 ไปทำการหาลำดับเบส (Sequencing) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ (Blast) กับลำดับเบสของยีน VLDL/VTG Receptor ในไก่ป่าสีแดง (red jungle fowl) (Miller *et al.*, 2004) ที่มีในฐานข้อมูล Genbank (accession number NW_001488835.1) พบว่ายีน VLDL/VTG Receptor รูปแบบทั้ง 3 ในไก่สามเหลือง และอีกรูปแบบในไก่ไข่สายพันธุ์การค้า จะมีความเหมือนหรือมีค่า identity เท่ากับ 99%, 98%, 98% และ 98% ตามลำดับ ซึ่งผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment) ของยีน VLDL/VTG Receptor บริเวณ 5' flanking region 4 รูปแบบทั้งในไก่สามเหลืองและไก่ไข่สายพันธุ์การค้าเป็นดังนี้

1. ไกล่สายพันธุ์การคำ (รูปแบบที่1:NO57) ที่มีความยาว 260 เบสจะมีลำดับเบสตรงกับลำดับเบสของยีน VLDL/VTG Receptor ใน Genbank ที่ตำแหน่งเบส 522,011– 522,271 เบส มีค่า identity 98% ในจำนวน 260 เบสนั้น จะมีความเหมือนกัน 255 เบส ส่วนที่แตกต่างกัน 5 เบส ประกอบด้วย การเกิดเพิ่ม 1 เบส (C) ในตำแหน่งที่ 114 และมีความแตกต่างกัน 4 เบส โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) แบบ transition คือ $T \rightarrow C$ ที่ตำแหน่งเบสที่ 16 และแบบ transversion 3 ตำแหน่ง ประกอบด้วย $T \rightarrow G$, $A \rightarrow C$ และ $T \rightarrow A$ ที่ตำแหน่งที่ 131, 230 และ 250 ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

```
no3      1      TCGCTGAGGCTCGTGTGGCCACCAAGATATTAAGGGCACAGAACACATTACTAACGTGAA 60
no4      1      TCGCTGAGGCTCGTGTGGCCACCAAGATATTAAGGGCACAGAACACATTACTAACGTGAA 60
no15     1      TCGCTGAGGCTCGTGTGGCCACCAAGATATTAAGGGCACAGAACACATTACTAACGTGAA 60
no57     1      TCGCTGAGGCTCGTGTGGCCACCAAGATATTAAGGGCACAGAACACATTACTAACGTGAA 60
chro.z 522011 TCGCTGAGGCTCGTGTGGCCACCAAGATATTAAGGGCACAGAACACATTACTAACGTGAA 522070
*****

no3      61      ATAGCAGGACTACAAAAGTAAATATGAAACAGAACCACTGGGGTTCAGCTGTG-AATTT 120
no4      61      ATAGCAGGACTACAAAAGTAAATATGAAACAGAACCACTGGGGTTCAGCTGTG-AATTT 120
no15     61      ATAGCAGGACTACAAAAGTAAATATGAAACAGAACCACTGGGGTTCAGCTGTG-AATTT 120
no57     61      ATAGCAGGACTACAAAAGTAAATATGAAACAGAACCACTGGGGTTCAGCTGTGCAATTT 120
chro.z 522071 ATAGCAGGACTACAAAAGTAAATATGAAACAGAACCACTGGGGTTCAGCTGTG-AATTT 522131
*****

no3      121     TAAGAGTGACGTGAACAAAATCACATTTGCTTTTTAAGGATCCATCCTCTTTCTTTAATT 180
no4      121     TAAGAGTGACATGAACAAAATCACATTTGCTTTTTAAGGATCCATCCTCTTTCTTTAATT 180
no15     121     TAAGAGTGACATGAACAAAATCACATTTGCTTTTTAAGGATCCATCCTCTTTCTTTAATT 180
no57     121     TAAGAGTGACGGGAACAAAATCACATTTGCTTTTTAAGGATCCATCCTCTTTCTTTAATT 180
chro.z 522131 TAAGAGTGACGTGAACAAAATCACATTTGCTTTTTAAGGATCCATCCTCTTTCTTTAATT 522191
*****

no3      181     CACCAAGGTATAACTGGATGTTCAAAGGTTACATGTGTAGAACAAAACCAATCT 240
no4      181     CACCAAGGTATAACTGGATGTTCAAAGGTTACACGTGTAGAACAAAACCAATCT 240
no15     181     CACCAAGGTATAACTGGATGTTCAAAGGTTACACGTGTAGAACAAAACCAATCT 240
no57     181     CACCAAGGTATAACTGGATGTTCAAAGGTTACATGTGTAGAACAAAACCCCAATCT 240
chro.z 522192 CACCAAGGTATAACTGGATGTTCAAAGGTTACATGTGTAGAACAAAACCAATCT 522251
*****

no3      241     CCTTCTCAAAATCAAAGGTTAA 260
no4      241     CCTTCTCAAAATCAAAGGTTAA 260
no15     241     CCTTCTCAAAATCAAAGGTTAA 260
no57     241     CCTTCTCAAAATCAAAGGTTAA 260
chro.z 522252 CCTTCTCAAAATCAAAGGTTAA 522273
*****
```

ภาพที่ 19 ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากยีน VLDL/VTG Receptor บริเวณ 5' flanking region จากไพรเมอร์ที่ 3 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

2. ไกล่สามเหลี่ยม (รูปแบบที่2: NO3) ที่มีความยาว 260 เบส มีค่า identity 99% โดยจากความยาว 260 เบส จะมีความเหมือนกับลำดับเบสใน Genbank 259 เบส ส่วนที่แตกต่าง 1 เบส เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion โดยเปลี่ยนจาก $A \rightarrow C$ ในตำแหน่งที่ 251 (ภาพที่ 19)

3. ไก่สามเหลือง (รูปแบบที่3: NO4) ที่มีความยาว 260 เบส มีค่า identity 98% โดยจากความยาว 260 เบส จะมีความเหมือนกับลำดับเบสใน Genbank 256 เบส ส่วนที่แตกต่าง 4 เบส เป็นการเปลี่ยนแปลง transition ทั้ง 4 เบส ซึ่งประกอบด้วย $A \rightarrow G$, $T \rightarrow C$, $G \rightarrow A$, และ $T \rightarrow C$ ในตำแหน่งที่ 77, 104, 130 และ 214 ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

4. ไก่สามเหลือง (รูปแบบที่4: NO15) ที่มีความยาว 260 เบส มีค่า identity 98% โดยจากความยาว 260 เบส จะมีความเหมือนกับลำดับเบสใน Genbank 256 เบส ส่วนที่แตกต่าง 4 เบส เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ transition ทั้งหมด เช่นเดียวกันกับรูปแบบ NO4 (ภาพที่ 19)

การที่รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบหาความหลากหลายด้วยเทคนิค SSCP ของ NO4 แตกต่างจาก NO15 แต่ลำดับเบสที่ยีน VLDL/VTG Receptor ส่วน 5' flanking region เหมือนกัน อาจเป็นเพราะการใช้เทคนิค SSCP มีปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีผลต่อการตรวจสอบความหลากหลายที่เกิดขึ้นในสายนิวคลีโอไทด์ (วีระพงศ์, 2539) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง Conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวจึงทำให้เกิดแตกต่างกันได้

ยีน VLDL/VTG Receptor ในไก่มีความเหมือนกับยีน VLDL Receptor ในสัตว์อื่น จะเห็นได้จากการรายงานของ Wruss *et al.* (2007) พบว่าลำดับเบสของยีน VLDL Receptor ในคน (*Homo sapiens*) เมื่อเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลจะมีค่า identity 84% ส่วน Prat *et al.* (1998) ได้เปรียบเทียบลำดับเบสของ VTG Receptor ในปลา rainbow trout ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด ชนิด 1 Receptor ที่ครบทั้ง 5 ส่วน (tt-LPR) ชนิดที่ 2 ไม่มีส่วน O-linked sugar domain (LP(OS)R) จาก cDNA โดยเปรียบเทียบกับไก่ และ กบ (*Xenopus*) พบมีค่าความเหมือนกับ VLDL/VTG Receptor เท่ากับ 59% และ 67% และเหมือนกับ LDLRs ในไก่และกบ เท่ากับ 52% และ 54% ตามลำดับนอกจากนี้ยังพบว่าลำดับของกรดอะมิโนของ trout lipoprotein Receptor cDNA จะเหมือนกับ ไก่ และกบ ประมาณ 75% และ 79% ตามลำดับ

Tufail and Takeda (2005) ได้หาความสัมพันธ์โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ VTG Receptor ในแมลงสาบ (*Periplaneta americana*) เทียบกับยุง (*Aedes aegypti*) *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*) และ มดแดง (*Solenopsis invicta*) พบว่าแมลงสาบจะมีความสัมพันธ์มีความใกล้ชิดกับยุง, *Drosophila* และ มดแดงในเปอร์เซ็นต์ 36, 34 และ 34%

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ไพรเมอร์ที่ออกแบบ 4 ใน 8 คู่ มีความสามารถจะจำเพาะเจาะจงกับ ยีน VLDL/VTG Receptor ส่วน 5' flanking region โดยไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ มีลำดับเบสดังนี้ ไพรเมอร์ที่ 1 มี forward primer 5'TAGCAGCCAATGCCACATCCAAAGC 3' และ reverse primer 5'ACAAATGATTG TCCAGGCCAT CC 3' สามารถเพิ่มขนาดดีเอ็นเอได้ 248 คู่เบส ไพรเมอร์ที่ 2 มี forward primer 5' CGAGATAATCCACTCTGAAGTCATT 3' และ reverse primer 5' CCCAGTGGTTCTG TTTTCATATTTAC 3' สามารถเพิ่มขนาดดีเอ็นเอได้ 389 คู่เบส ไพรเมอร์ที่ 3 มี forward primer 5' GAAGCATGGAAAGGCAAACAGTGC 3' และ reverse primer 5' TACATCTGCATTCCGA GATCAGG 3' สามารถเพิ่มขนาดดีเอ็นเอได้ 492 คู่เบส ไพรเมอร์ที่ 4 มี forward primer 5' ACTTTA CTTCCAAGGAACGAAAGC 3' และ reverse primer 5' TGAGGAGAAAAATCACTACATC TGC 3' สามารถเพิ่มขนาดดีเอ็นเอได้ 413 คู่เบส
2. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) สามารถพบความหลากหลายของ ยีน VLDL/VTG Receptor ส่วน 5' flanking region โดยพบ 6, 3, 3 และ 4 รูปแบบ ในไพรเมอร์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ
3. SSCP ที่พบในไก่ไข่มีเพียง 1 รูปแบบ ในไพรเมอร์ที่ 1 ในขณะที่พบในไก่สามเหลืง พบ 3, 3 และ 4 รูปแบบตามลำดับ คาดว่ารูปแบบที่แตกต่างกันในไก่ทั้งสองสายพันธุ์น่าจะมีส่วน เกี่ยวข้องกับปริมาณการให้ไข่เฉลี่ยของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน
4. ลำดับเบสของยีน VLDL/VTG Receptor ที่ได้จากไพรเมอร์ 3 ในส่วน 5' flanking region ที่สุ่มจากไก่สามเหลืงจำนวน 3 ตัว และไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า จำนวน 1 ตัว ที่มีรูปแบบ ของ SSCP แตกต่างกันแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล Genbank พบว่า มีความเหมือนกันกับบน Chromosome Z ไก่สามเหลืง NO3, NO4 และ NO 15 และไก่ไข่สายพันธุ์ การค้า NO57 ประมาณ 99%, 98%, 98% และ 98% ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาอิทธิพลของรูปแบบ SSCP ในยีน VLDL/VTG Receptor ต่อลักษณะปริมาณการไข่เฉลี่ยของไก่ จึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบในประชากรที่มากกว่านี้ และเลือกประชากรที่แตกต่างกันสูง เช่น ไก่ไข่ และ ไก่พื้นเมือง

2. เทคนิค SSCP มีปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีผลต่อความไวของ SSCP เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะ Conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว จึงควรมีการควบคุมปัจจัยเหล่านั้นให้เหมาะสม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กุลสุตา ชมวิศรุตกุล. 2550. การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนคาร์เทปซินดีและยีนไวเทโลโลเจนนิน ฎในไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกียรติศักดิ์ สร้อยสุวรรณ. 2544. การผลิตสัตว์ปีก. คณะสัตวศาสตร์ เทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตนครศรีธรรมราช.
- เจนรงค์ คำมุงคุณ. 2549. การศึกษาค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะน้ำหนักตัวไก่พื้นเมืองไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทรงยศ กิตินมรัช. 2544. อิทธิพลของน้ำหนักตัวและรูปแบบการให้อาหารต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ของไก่ไข่ลูกผสมทางการค้าที่เลี้ยงในโรงเรือนระบบทำความเย็นโดยวิธีระเหยน้ำ (Evap). วิทยานิพนธ์ปริญญาพิเศษปริญญาโท, ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิรัตน์ กองรัตนานันท์. 2535. การศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาทางสืบพันธุ์ของไก่พื้นเมืองเปรียบเทียบกับไก่พันธุ์แท้บางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นุชา สิมะสาธิตกุล. 2544. โรคสัตว์ปีก. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์. 2545. ชีวเคมีทางการแพทย์เมตาบอลิสมของสารอาหารเชิงบูรณาการสำหรับนักศึกษาสายวิทยาศาสตร์การแพทย์. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. พันธุศาสตร์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรทิพย์ โล่ห์เลขา. 2536. **ไลโปโปรตีนและภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง**. คณะแพทยศาสตร์
โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ:เทคนิคทาง**

วรวิทย์ สิริพลวัฒน์. 2542. **การเลี้ยงไก่พื้นบ้าน**. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

วัลลภ คงเพิ่มพูล. 2544. **คู่มือการเลี้ยงไก่พื้นเมือง**. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน, กรุงเทพฯ.

สุวรรณ เกษตรสุวรรณ, ประทีป ราชแพทยาคม, กระจ่าง วิสุทธารมรณ์, บุญธง ศิริพานิช,
วรรณดา สุจริต และ สุภาพร อัสริโยดม. 2526. **การเลี้ยงไก่ ฉบับปรับปรุง**. โรงพิมพ์
ชมรมพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ:ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟ
แอลพี**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรรณ ชินราศรี. 2547. **เทคโนโลยีการผลิตสัตว์ปีก**. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

อภัสสรา ชมิดท์. 2537. **เทคนิคอิเล็กทรอนิกส์**. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Aydin, R. 2005. Type of Fatty Acids, Lipoprotein Secretion from Liver and Fatty Liver
Syndrome in Laying Hens. **Poult.Sci.** 11: 917-919.

Bujo, H., M. Hermann, M.O. Kaderli, L. Jacobsen, S. Sugawara, J. Nimpf, T. Yamamoto and
W.J. Schneider. 1994. Chicken Oocyte growth is mediated by an eight ligand binding
repeat member of the LDL receptor family. **JEMBO.** 13: 5165-5175.

- Chen, M.E., D.K. Lewis, L.L. Keeley and P.V. Pietrantonio. 2004. cDNA Cloning and transcriptional regulation of vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Bruen (Hymenoptera:Formicidae). **Insect Mol Biol.** 13 (2): 195-204.
- Damell, J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. **Molecular cell Biology.** 2nd ed. Scientific American Books, New York.
- Donald, V., J.G. Voet and C.W. Pratt. 2006. **Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular.** 2nd ed. University of Pennsylvania.
- Enchanted Learning. 2006. **Classification of the Chicken.** Available Source: <http://www.enchantedlearning.com/subjects/birds/info/chicken/>. January 25, 2006.
- Ernst, S., D.L. Barber and W.J. Schneider. 1990. Evolution of Lipoprotein Receptor. **J.Biol.Chem.** (265).
- Fukuoka, S., T. Inoue, A. Migao and L. Monna. 1994. Mapping of sequence-tagged sites in rice by single strand conformation polymorphism. **DNA Research** 1 (6): 271-277.
- Hutt, F.B. 1949. **Genetic of the Fowl.** McGraw-Hill,Inc, New York.
- Li, A., M. Sadasivam and L.J. Ding. 2003. Receptor-Ligand Interaction between Vitellogenin Receptor (VtgR) and Vitellogenin (Vtg),Implications and Low Density Lipoprotein Receptor and ApolipoproteinB/E. **J.Biol.Chem** (278): 2799-2806.
- Miller, W., L.W. Hiller, E. Birney, W. Warren, R.C. Hardison, C.P. Ponting, P. Bork, D.W. Burt, M.A.M. Groenen, M.E. Delany and J. B. Dodgson. 2004. Sequence and Comparative analysis of the Chicken genome provide unique perspective on vertebrate evolution. **J.Nature** (432): 695-716.

National Center for Biotechnology Information. 2005. **VLDL receptor,VLDL/VTG receptor (Gallus gallus)**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.November 18, 2006.

Nimpf, J. and J.W. Schneider. 1991. Receptor-Mediated Lipoprotein Transport in Laying Hens. **J.Nutr** (121): 1471-1474.

Nimpf, J., R. George and J.W. Schneider. 1988. Apolipoprotein specificity of the chicken oocyte receptor for low and very low density lipoprotein:lack of recognition of Apo lipoprotein VLDL-II. **J.Lipid.Res** (29): 657-667.

Okabayashi, K., H. Shoji, T. Nakamura, O. Hashimoto, M. Asashima and H. Sugino. 1996. cDNA cloning and expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin Receptor. **Biochem Biophys Res Commun** (224): 406-413.

Patel, D.D., F.A. Robert, S.L. Anne and K.L. Brian. 1997. Synthesis and properties of the very low density lipoprotein Receptor and a comparison with the low density lipoprotein Receptor. **J.Biol.Chem.**

Prat, F., K. Conard, J.P. Sumpter and C.R. Tyler. 1998. Molecular Characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptor in the rainbow trout. **Biol.Reprod** (58): 1146-1153.

Rajan,G., D.L. Barber and W.J. Schneider. 1987. Characterization of the Chicken Oocyte Receptor for Low and Very Low Density Lipoproteins. **J.Biol.Chem** 262 (35): 16838-16847.

Sambrook, Joseph and D.W. Russell. 2001. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3 rd ed. Cold spring laboratory press, New York.

- Sappington, T.W. and A.S. Raikhel. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin Receptor. **Insect Biochem Mol Biol** (28): 277-300.
- Schonbavm, C.P., J.J. Perrino and A.P. Mahowald. 2000. Regulation of the Vitellogenin Receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. **Mol Biol Cell** (11): 511-521.
- Speake, B.K., A.M.B. Murray and R.C. Noble. 1998. Transport and trans formations of yolk lipid during development of the avian embryo. **Prog.Lipid Res** (37): 1-32.
- Stifani, S., D.L. Barber, J. Nimpf and W.J. Schneider. 2002. chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. **Proc.Natl.Acad.Sci** (87): 1955-1959.
- Susanna, H., E.G. Lynn, A. Osanger, S. Hirayama, J. Nimpf, W.J. Schneider. 2003. Molecular Characterization of the first avian LDL Receptor:role in sterol metabolism of ovarian follicular cells. **J.Lipid.Res** (44).
- Tsai, Y.M., P. Suess, K. Schwichtenberg, H.J. Eckfeldt, J. Yuan, M. Tuchmanand and D. Humminghake. 1993. Determination of Apolipoprotein E Genotypes by Single-Strand Conformational Polymorphism. **Clin.Chem.** (39): 2121-2124.
- Tufail, M. and M. Takeda. 2005. Molecular cloning,Characterization and regulation of the cockrach Vitellogenin Receptor during oogenesis. **Insect Mol Biol** 14 (4): 389-401.
- University of Georgia, Department of Poultry Sciences. 2006. Available Source:
<http://www.ga.ansc.prudue.edu/nielsen/www245/lecnotes/avianrepro.html/>.
 February 20, 2006.
- Voet, D., J.G. Voet and C.W. Pratt. 2006. **Fundamentals of Biochemistry Life the Molecular.**
 2nd ed. University of Pennsylvania,

Walzem, R.L., J.R. Hamsen, L.D. Wiliams and L.R. haniton. 1999. Estrogen induction of VLDLy assembly in egg-laying hens. **J.Nutr** (129): 467s-472s.

Wruss, J., D. Runzler, C. Steiger, P. Chiba, G. Kohler and D. blaas. 2007. Attachment of VLDL receptors to an icosahedral virus along the 5-fold symmetry axis:multiple binding modes evidenced by fluorescence. **J.Biol.Chem.** (46): 6331-6339.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 สารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

สาร (ความเข้มข้น)
- Lysis buffer
- Proteinase - K
- Phenol:Choroform:Isoamy (25:24:1,V,V,V)
- 95 % Ethanol
-70 % Ethanol
-TE buffer (100mM Tris,pH 8.0;40 mM EDTA)

ตารางผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลาย Lysis buffer

สาร	ปริมาณ 300 ml (ml)
100 mM Tris –HCl , pH 8.0	30
250 mM NaCl	75
100 EDTA , pH8.0	60
0.5% SDS	15
น้ำกลั่น	120

ตารางผนวกที่ 3 ส่วนประกอบของ TBE buffer

สาร	10X ปริมาณ 1000 ml	5X ปริมาณ 1000 ml
Tris-base	108 g	54 g
Boric acid	55 g	27.5 g
0.5M EDTA	40 ml	20 ml
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 1000 ml	เติมจนครบ 1000 ml

ลำดับเบสของยีน VLDL Receptor จากฐานข้อมูล Genbank

LOCUS NM_205229 3224 bp mRNA linear VRT 18-NOV-2006
 DEFINITION Gallus gallus very low density lipoprotein Receptor (VLDLR), mRNA.
 ACCESSION NM_205229
 VERSION NM_205229.1 GI:45382562
 SOURCE Gallus gallus (chicken)
 ORGANISM Gallus gallus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae;
 Phasianinae; Gallus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 3224)
 AUTHORS Bujo,H., Hermann,M., Kaderli,M.O., Jacobsen,L., Sugawara,S.,Nimpf,J.,
 Yamamoto,T. and Schneider,W.J.
 TITLE Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat
 member of the LDL Receptor family
 JOURNAL EMBO J. 13 (21), 5165-5175 (1994)
 PUBMED 7957081
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..3224
 /organism="Gallus gallus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9031"
 /breed="Leghorn"
 gene 1..3224
 /gene="VLDLR"
 /note="very low density lipoprotein Receptor"
 /db_xref="GeneID:396154"

CDS 13..2604

/gene="VLDLR"

/note="very low density lipoprotein (VLDL)/vitellogenin
Receptor"

/codon_start=1

/product="very low density lipoprotein Receptor"

/protein_id="NP_990560.1"

/db_xref="GI:45382563"

/db_xref="GeneID:396154"

/translation="MRSSRQRGDRSAATGGGCGARRWALPRCGALCLLLALGCLRTAT
DGAKAKCEESQFQCSNGRCIPLLWKCDGDEDCSDGSDSACVKKTCAESDFVCNSGQC
VPNRWQCDGDPDCEDGSDESAELCHMRTCRVNEISCGPQSTQCIPVSWKCDGEKDCDS
GEDEENCGNVTCSAAEFTCSSGQCISKSFVCNGQDDCSDGSDELECAPPTCGVHEFQC
KSSTCIPISWVCDDDDADCSDHSDSLEQCGRQPAPPVKCSTSEVQCGSGECIHKKWRC
DGDPCDKDGSDEINCPSTCRPDQFRCEGNCIHGSRQCNGVRDCLDGTDEANCNNVI
QCSGPGKFKCRSGECIDINKVCNHHGDCKDWSDEPLKECNINECLVNNGGCSHICRDL
VIGYECDCPAGFELVDRRTCGDIDECQNPICISQICINLKGGYKCECSRGYQMDLATG
VCKAVGKEPCLIFTNRRDIRKIGLERKEYIQLVEQLRNTVALDADIAEQKLYWADFSQ
KAIFSASIDTRDKVGTHTRILDNIHSPAGIAVDWIYKNYWTDSAKTISVASLNGKK
RKVLFLSELREPASIAVDPLSGFMYWSDWGEPKIEKAGMNGFDRQQLVTTEIQWPNG
IALDLVKSRLYWLDLHMLSSVDLNGQDRRLVLKSHMFLPHPLALTIFEDRVFWIDG
ENEAVYGANKFTGAELVTLVNNLNDQAQDIIVYHELQPSGRNWCEENMVNNGGCSYLCL
PAPQINEHSPKYTCTCPAGYFLQEDGLRCGGFNISVVSEVAARGAAGAWAVLPILL
VTAALAGYFMWRNWQHKNMKS MNFDNPVYLKTTEEDLTIDIGRHSGSVGHTYPAISVV
STDDML"

ORIGIN

1 ctcggcgcg cgcgcggc gagccggcag cgcggagacc ggagcgcggc gaccggcggc

61 ggggtgtggg cgcggcggtg ggcgctcccg cgctgcgggg cgctctgcct gctgctgcc

121 ctcggctgcc tgcgtactgc caccgacggt gcaaaagcaa aatgtgagga gtcccagtc

181 cagtgtagta atggacgctg tattccttta ctctggaaat gtgatggtga tgaagactgt
 241 tcagacggca gtgatgaaag tgcttgtgtc aagaagacat gtgctgaatc tgactttgtg
 301 tgtaacagtg gtcagtgtgt gccgaacaga tggcagtgtg atggggatcc ggactgtgag
 361 gatgggtctg acgagagtgc tgaactgtgc catatgagaa catgccgggt aaatgagatc
 421 agctgtggtc ctacgtcaac ccagtgtatc ccagtgtcct ggaaatgtga tggtagaaaa
 481 gactgtgaca gtggagaaga tgaagagaat tgtggcaatg tgactttagt tgcagcagag
 541 ttcacatgca gtagtgggca gtgtatttcc aagagctttg tctgcaatgg tcaagatgac
 601 tgcagtgatg gtagtgatga gttggagtgt gcacctcaa catgtggtgt tcatgagttc
 661 cagtgcgaaga gctccacttg catccctatc agctgggtgt gtgatgatga tgctgactgc
 721 tctgaccact ctgatgaatc ttggagcag tgtggccgac agcctgcacc tcctgtgaag
 781 tgctctacca gtgaggtgca gtgcggctca ggtgaatgta tccacaagaa gtggcgctgt
 841 gatggagatc ctgactgcaa agatggaagt gatgaaatca actgcccttc tcggacctgc
 901 agaccagacc agtttaggtg tgaagatggg aactgcatcc atgggagcag gcagtgcaat
 961 ggtgtgagag actgtctaga tggcactgat gaagcaaact gtaacaatgt tattcagtgt
 1021 tctggacctg gcaaatcaa gtgcagaagt ggagaatgca tagatattaa taaagtgtgt
 1081 aaccatcacg gagactgcaa ggactggagt gatgagcctc tcaaggaatg taacataaat
 1141 gagtgtttgg tcaacaatgg tggatgctcg cacatctgca gagatcttgt tattggctat
 1201 gaatgtgact gtccagctgg gtttgagctt gtagacagga gaacctgtgg agatattgat
 1261 gaatgccaga atcctggtat ctgtagccaa atctgtatca acctgaaagg gggatacaag
 1321 tgtgaatgta gccgtggcta tcagatggat ctgtctacag gagtgtgcaa ggctgtgggg
 1381 aaagaacctat gtctgatttt caccaaccga cgggatatca ggaagattgg ccttgagaga
 1441 aaagaatata ttcagctagt agagcagcta agaaacacag ttgctctaga tgctgatatt
 1501 gctgagcaaa agctttattg ggctgacttc agccaaaaag caattttcag tgcctctatt
 1561 gatacccggtg ataaagtgg aacacacact agaactcctag acaacataca cagccctgca
 1621 ggaattgctg ttgactggat ttataagaac atctactgga ctgactcacc tgcaaagacc
 1681 atttcagtgg ccagcctgaa tggcaagaaa agaaagggtt tatttcttcc tgagctgaga
 1741 gagccagctt ctattgctgt agatcctctc tctggcttta tgtactggtc agactggggt
 1801 gagccagcaa aaattgaaaa agcaggaatg aatggatttg acagacagca gcttgtgaca
 1861 acagaaatcc aatggcctaa tggcattgct ttgatcttg taaaagccg ttgtattgg
 1921 ctgattctta aactacatat gctctcaagt gtggatctga atggccagga tcgtagactt

1981 gtgctcaagt ctcatatgtt ccttctcat cctcttgctc taacaatatt tgaggatcgt
 2041 gtattctgga ttgacggaga gaacgaggca gtctatgggt ccaacaaatt tactggagct
 2101 gaattggtea ccctagtaaa caacctcaat gatgcgcagg acatcattgt ttatcatgaa
 2161 cttgttcaac cttcaggcag gaactgggtg gaagagaaca tggtaaatgg aggctgtagc
 2221 tacctgtgcc tgcctgctcc tcagataaat gaacactctc cgaagtatac ttgcacatgt
 2281 cctgtcggat atttcttgca ggaggacggt ctgagatgtg gaggattcaa catcagtagt
 2341 gtggtgtctg aagtagctgc aagaggagca gcaggagctt gggctgttct tcctatctta
 2401 ctgctgggtga cggtgcatt ggctggctac ttcattgtgc gtaattggca gcacaagaac
 2461 atgaaaagca tgaatttga taatcccgct tatctgaaaa ctacagaaga ggacctcaca
 2521 attgatattg gcagacacag tggttcagtg ggacacacct acctgcaat atctgttgta
 2581 agcacagatg atgatatgct gtgagtgtctg gatcagcaat cactttcagt ttactttgtg
 2641 ttttacctt acggggatga taaacatgct tgtggctgaa agacttctc cattcttgga
 2701 agaatgaaga aactttctct gtgtatggaa cacttacata attagctgtt ttatacagct
 2761 taacaaccaa ctctgtaaat acctgtccac aacaattcag cttttactgg ttactatatt
 2821 atcagcaacc ctgaattgg tcagtcagta acaccactgg ccaatacaa agcactttcc
 2881 atagaaagcc atattccagc cacaactgtg gctatagtgt aacagctgta catatgtgta
 2941 tatgccactt gtaaatatta ttctggaaa atcactatca agcacttga aatacttaaa
 3001 atgtaaatta ttgtacactg tcttttcaa tggttggggc aatggcaata ggaaaaaacg
 3061 ggttactatg attgcaaaa atttgaagc ataagtaatt ttgtatgtat gactgaaaca
 3121 atcttgtctg ttacctctta gagctctaca ggtatgaatg ctcttgagg aaaccactgt
 3181 aaatctgaaa tgcagagaag ggggaaaaat aaaacaagc aatt//

ลำดับเบสของยีน VLDL / VTG จากฐานข้อมูล Genbank

LOCUS X80207 3224 bp mRNA linear VRT 18-APR-2005

DEFINITION G.gallus VLDL/vitellogenin Receptor.

ACCESSION X80207

VERSION X80207.1 GI:609265

KEYWORDS very low density lipoprotein / vitellogenin Receptor.

SOURCE Gallus gallus (chicken)

ORGANISM Gallus gallus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae;

Phasianinae; Gallus.

REFERENCE 1

AUTHORS Bujo,H., Hermann,M., Kaderli,M.O., Jacobsen,L., Sugawara,S.,

Nimpf,J., Yamamoto,T. and Schneider,W.J.

TITLE Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat
member of the LDL Receptor family

JOURNAL EMBO J. 13 (21), 5165-5175 (1994)

PUBMED 7957081

REFERENCE 2 (bases 1 to 3224)

AUTHORS Schneider,W.J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-SEP-1994) W.J. Schneider, University & Biocenter of
Vienna, Dept of Molecular Genetics, Dr. Bohrgasse 9/2, 1030 Vienna, AUSTRIA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..3224

/organism="Gallus gallus"

/mol_type="mRNA"

/strain="White Leghorn"

/db_xref="taxon:9031"

/sex="female"
 /tissue_type="ovary"
 /dev_stage="adult"
CDS 13..2604
 /codon_start=1
 /product="chicken very low density lipoprotein
 (VLDL)/vitellogenin Receptor"
 /protein_id="CAA56505.1"
 /db_xref="GI:609266"
 /db_xref="GOA:P98165"
 /db_xref="InterPro:IPR000033"
 /db_xref="InterPro:IPR000152"
 /db_xref="InterPro:IPR000742"
 /db_xref="InterPro:IPR001881"
 /db_xref="InterPro:IPR002172"
 /db_xref="InterPro:IPR006209"
 /db_xref="InterPro:IPR006210"
 /db_xref="InterPro:IPR013032"
 /db_xref="InterPro:IPR013091"
 /db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P98165"

/translation="MRSSRQRGDRSAATGGGCGARRWALPRCGALCLLLALGCLRTAT
 DGAKAKCEESQFQCSNGRCIPLLWKCDGDEDCSDGSDESACVKKTCAESDFVCNSGQC
 VPNRWQCDGDPDCEDGSDESAELCHMRTCRVNEISCGPQSTQCIPVSWKCDGEKDCDS
 GEDEENCGNVTCSAAEFTCSSGQCISKSFVCNGQDDCSDGSDELECAPPTCGVHEFQC
 KSSTCIPISWVCDDDDADCSDHSDESLEQCGRQPAPPVKCSTSEVQCGSGECIHKKWRC
 DGDPDCKDGSDEINCPSRTCPRDQFRCEDGNCIHGSRQCNGVRDCLDGTDEANCNNVI
 QCSGPGKFKCRSGECIDINKVCNHHGDCKDWSDEPLKECNINECLVNNGGCISHICRDL
 VIGYECDCPAGFELVDRRTCGDIDECQNPGICSQICINLKGGYKCECSRGYQMDLATG

VCKAVGKEPCLIFTNRRDIRKIGLERKEYIQLVEQLRNTVALDADIAEQKLYWADFSQ
 KAIFSASIDTRDKVGTHTRILDNIHSPAGIAVDWIYKNYWDSSAKTISVASLNGKK
 RKVFLSELREPASIAVDPLSGFMYWSDWGEPKIEKAGMNGFDRQQLVTTEIQWPNG
 IALDLVKSRLYWLD SKLHMLSSVDLNGQDRRLVLKSHMFLPHPLALTIFEDRVFWIDG
 ENEAVYGANKFTGAELVTLVNNLND AQDIIVYHEL VQPSGRNWCEENMVNGGCSYLCL
 PAPQINEHSPKYTCTCPAGYFLQEDGLRCGGFNISVVSEVAARGAAGAWAVLPILL
 VTAALAGYFMWRNWQHKNMKSMNFDNPVYLKTTEEDLTIDIGRHSGSVGHTYPAISVV
 STDDML"

misc_feature 2164^2165

/note="splice site. Intron entered in X95100"

ORIGIN

1 ctcggcgagg cgatcggtc gagccggcag cgccggagacc ggagcgcggc gaccggcggc
 61 ggggtgtggg cgccggcggtg ggcgtcccg cgctgcgggg cgctctgcct gctgctgcc
 121 ctcggctgcc tgcgtactgc caccgacggt gcaaaagcaa aatgtgagga gtcccagtc
 181 cagtgtagta atggacgctg tattcctta ctctggaaat gtgatggtga tgaagactgt
 241 tcagacggca gtgatgaaag tgcttgtgc aagaagacat gtgctgaac tgactttgtg
 301 tgtaacagtg gtcagtgtg gccgaacaga tggcagtgtg atggggatcc ggactgtgag
 361 gatgggtctg acgagagtgc tgaactgtgc catatgagaa catgccgggt aatgagatc
 421 agctgtggc ctcagtcaac ccagtgtatc ccagtgtcct ggaaatgta tggtaaaaa
 481 gactgtgaca gtggagaaga tgaagagaat tgtggcaatg tgactgtag tgcagcagag
 541 ttcacatgca gtagtgggca gtgtattcc aagagcttg tctgcaatgg tcaagatgac
 601 tgcagtgatg gtagtgatga gttggagtgt gcacctcaa catgtggtgt tcatgagtc
 661 cagtgaaga gtcacctg catccctatc agctgggtgt gtgatgatga tgctgactgc
 721 tctgaccact ctgatgaac ttggagcag tgggccgac agcctgcacc tcctgtgaag
 781 tgctctacca gtgaggtgca gtccggctca ggtgaatga tccacaagaa tggcgctgt
 841 gatggagatc ctgactgcaa agatggaagt gatgaaatca actgcccttc tcggacctgc
 901 agaccagacc agtttagtg tgaagatggg aactgcatcc atgggagcag gcagtgcaat
 961 ggtgtgagag actgtctaga tggcactgat gaagcaaact gtaacaatg tattcagtgt
 1021 tctggacctg gcaaatcaa gtgcagaagt ggagaatgca tagatattaa taaagtgtgt

1081 aaccatcacg gagactgcaa ggactggagt gatgagcctc tcaaggaatg taacataaat
 1141 gagtgtttgg tcaacaatgg tggatgctcg cacatctgca gagatcttgt tattggctat
 1201 gaatgtgact gtccagctgg gtttgagctt gtagacagga gaacctgtgg agatattgat
 1261 gaatgccaga atcctgggat ctgtagccaa atctgtatca acctgaaagg gggatacaag
 1321 tgtgaatgta gccgtggcta tcagatggat ctgctacag gagtgtgcaa ggctgtgggg
 1381 aaagaacct gtctgatttt caccaaccga cgggatatca ggaagattgg ccttgagaga
 1441 aaagaataca ttcagctagt agagcagcta agaaacacag ttgctctaga tgctgatatt
 1501 gctgagcaaa agctttattg ggctgacttc agccaaaaag caatttcag tgcctctatt
 1561 gataccctg ataaagtgg aacacacact agaactcctag acaacataca cagccctgca
 1621 ggaattgctg ttgactggat ttataagaac atctactgga ctgactcacc tgcaaagacc
 1681 atttcagtgg ccagcctgaa tggcaagaaa agaaaggttt tatttcttc tgagctgaga
 1741 gagccagctt ctattgctgt agatcctctc tctggcttta tgtactggtc agactggggt
 1801 gagccagcaa aaattgaaaa agcaggaatg aatggatttg acagacagca gcttgtgaca
 1861 acagaaatcc aatggcctaa tggcattgct ttagatcttg taaaaagccg tttgtattgg
 1921 ctgattcta aactacatat gctctcaagt gtggatctga atggccagga tcgtagactt
 1981 gtgctcaagt ccatatgtt ccttctcat cctctgtctc taacaatatt tgaggatcgt
 2041 gtattctgga ttgacggaga gaacgaggca gtctatgggt ccaacaaatt tactggagct
 2101 gaattgtgca ccctagtaaa caacctcaat gatgcgcagg acatcattgt ttatcatgaa
 2161 ctgttcaac cttcaggcag gaactgggtg gaagagaaca tggtaaatgg aggctgtagc
 2221 tacctgtgcc tgctgtcc tcagataaat gaacactctc cgaagtatac ttgcacatgt
 2281 cctgtggat atttctgca ggaggacggt ctgagatgtg gaggattcaa catcagtagt
 2341 gtggtgtctg aagtagctgc aagaggagca gcaggagctt gggctgttct tcctatctta
 2401 ctgctggtga cggtgcatt ggctggctac ttcattgtgc gtaattggca gcacaagaac
 2461 atgaaaagca tgaattttga taatccctgc tatctgaaaa ctacagaaga ggacctcaca
 2521 attgatattg gcagacacag tggttcagtg ggacacacct acctgcaat atctgttgta
 2581 agcacagatg atgatatgct gtgagtgtctg gatcagcaat cactttcagt ttactttgtg
 2641 ttttacctt acggggatga taaacatgct tgtggctgaa agacttctc cattcttggga
 2701 agaataaga aactttctct gtgtatggaa cacttacata attagctgtt ttatacagct
 2761 taacaaccaa ctctgtaaat acctgtccac aacaattcag ctttactgg ttactattt
 2821 atcagcaacc cttgaattgg tcagtcagta acaccactgg ccaatacaa agcactttcc

2881 atagaaagcc atattccagc cacaacttgt gctatagtgt aacagctgta catatgtgta
 2941 tatgccactt gtaaatatta ttcttggaat atcactatca agcactttga aatacttaaa
 3001 atgtaaatta ttgtacactg tcttttcaa tgggtggggc aatggcaata ggaaaaaacg
 3061 ggttactatg attgcaaaa atttgaagc ataagtaatt ttgtatgat gactgaaaca
 3121 atcttgtctg ttaccttcta gagctctaca ggtatgaatg ctcttgagg aaaccactgt
 3181 aaatctgaaa tgcagagaag ggggaaaaat aaaaacaagc aatt //

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน VLDL Receptor กับ ยีน VLDL/VTG Receptor

Score = 6001 bits (3121), Expect = 0.0
 Identities = 3121/3121 (100%), Gaps = 0/3121 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query	104	TCTGCCCTGCTGCTCGCCCTCGGCTGCCTGCGTACTGCCACCGACGGTGCAAAAGCAAAAT	163
Sbjct	104	TCTGCCCTGCTGCTCGCCCTCGGCTGCCTGCGTACTGCCACCGACGGTGCAAAAGCAAAAT	163
Query	164	GTGAGGAGTCCCAGTTCAGTGTAGTAATGGACGCTGTATTCCTTTACTCTGGAAATGTG	223
Sbjct	164	GTGAGGAGTCCCAGTTCAGTGTAGTAATGGACGCTGTATTCCTTTACTCTGGAAATGTG	223
Query	224	ATGGTGATGAAGACTGTTTCAGACGGCAGTGATGAAAGTGCTTGTGTCAAGAAGACATGTG	283
Sbjct	224	ATGGTGATGAAGACTGTTTCAGACGGCAGTGATGAAAGTGCTTGTGTCAAGAAGACATGTG	283
Query	284	CTGAATCTGACTTTTGTGTGTAACAGTGGTCAGTGTGTGCCGAACAGATGGCAGTGTGATG	343
Sbjct	284	CTGAATCTGACTTTTGTGTGTAACAGTGGTCAGTGTGTGCCGAACAGATGGCAGTGTGATG	343
Query	344	GGGATCCGGACTGTGAGGATGGGTCTGACGAGAGTGCTGAACTGTGCCATATGAGAACAT	403
Sbjct	344	GGGATCCGGACTGTGAGGATGGGTCTGACGAGAGTGCTGAACTGTGCCATATGAGAACAT	403
Query	404	GCCGGGTAAATGAGATCAGCTGTGGTCTCAGTCAACCCAGTGTATCCCAGTGTCTCTGGA	463
Sbjct	404	GCCGGGTAAATGAGATCAGCTGTGGTCTCAGTCAACCCAGTGTATCCCAGTGTCTCTGGA	463
Query	464	AATGTGATGGTGAAAAAGACTGTGACAGTGGAGAAGATGAAGAGAATTGTGGCAATGTGA	523
Sbjct	464	AATGTGATGGTGAAAAAGACTGTGACAGTGGAGAAGATGAAGAGAATTGTGGCAATGTGA	523
Query	524	CTTGTAGTGCAGCAGAGTTCACATGCAGTAGTGGGCAAGTGTATTTCCAAGAGCTTTGTCT	583
Sbjct	524	CTTGTAGTGCAGCAGAGTTCACATGCAGTAGTGGGCAAGTGTATTTCCAAGAGCTTTGTCT	583
Query	584	GCAATGGTCAAGATGACTGCAGTGATGGTAGTGATGAGTTGGAGTGTGCACCTCCAACAT	643
Sbjct	584	GCAATGGTCAAGATGACTGCAGTGATGGTAGTGATGAGTTGGAGTGTGCACCTCCAACAT	643
Query	644	GTGGTGTTTCATGAGTTCAGTGCAAGAGCTCCACTTGATCCCTATCAGCTGGGTGTGTG	703
Sbjct	644	GTGGTGTTTCATGAGTTCAGTGCAAGAGCTCCACTTGATCCCTATCAGCTGGGTGTGTG	703
Query	704	ATGATGATGCTGACTGCTCTGACCACTCTGATGAATCTTTGGAGCAGTGTGGCCGACAGC	763
Sbjct	704	ATGATGATGCTGACTGCTCTGACCACTCTGATGAATCTTTGGAGCAGTGTGGCCGACAGC	763

Query	764	CTGCACCTCCTGTGAAGTGCTCTACCAAGTGAGGTGCAGTGCGGCTCAGGTGAATGTATCC	823
Sbjct	764	CTGCACCTCCTGTGAAGTGCTCTACCAAGTGAGGTGCAGTGCGGCTCAGGTGAATGTATCC	823
Query	824	ACAAGAAGTGGCGCTGTGATGGAGATCCTGACTGCAAAGATGGAAGTGATGAAATCAACT	883
Sbjct	824	ACAAGAAGTGGCGCTGTGATGGAGATCCTGACTGCAAAGATGGAAGTGATGAAATCAACT	883
Query	884	GCCCTTCTCGGACCTGCAGACCAGACCAGTTTAGGTGTGAAGATGGGAACGCATCCATG	943
Sbjct	884	GCCCTTCTCGGACCTGCAGACCAGACCAGTTTAGGTGTGAAGATGGGAACGCATCCATG	943
Query	944	GGAGCAGGCAGTGCAATGGTGTGAGAGACTGTCTAGATGGCACTGATGAAGCAAACCTGTA	1003
Sbjct	944	GGAGCAGGCAGTGCAATGGTGTGAGAGACTGTCTAGATGGCACTGATGAAGCAAACCTGTA	1003
Query	1004	ACAATGTTATTTCAGTGTTCTGGACCTGGCAAATTCAGTGCAAGATGGAGAATGCATAG	1063
Sbjct	1004	ACAATGTTATTTCAGTGTTCTGGACCTGGCAAATTCAGTGCAAGATGGAGAATGCATAG	1063
Query	1064	ATATTAATAAAGTGTGTAACCATCACGGAGACTGCAAGGACTGGAGTGATGAGCCTCTCA	1123
Sbjct	1064	ATATTAATAAAGTGTGTAACCATCACGGAGACTGCAAGGACTGGAGTGATGAGCCTCTCA	1123
Query	1124	AGGAATGTAACATAAATGAGTGTTTGGTCAACAATGGTGGATGCTCGCACATCTGCAGAG	1183
Sbjct	1124	AGGAATGTAACATAAATGAGTGTTTGGTCAACAATGGTGGATGCTCGCACATCTGCAGAG	1183
Query	1184	ATCTTGTTATTGGCTATGAATGTGACTGTCCAGCTGGGTTTGAGCTTGATAGACAGGAGAA	1243
Sbjct	1184	ATCTTGTTATTGGCTATGAATGTGACTGTCCAGCTGGGTTTGAGCTTGATAGACAGGAGAA	1243
Query	1244	CCTGTGGAGATATTGATGAATGCCAGAATCCTGGTATCTGTAGCCAAATCTGTATCAACC	1303
Sbjct	1244	CCTGTGGAGATATTGATGAATGCCAGAATCCTGGTATCTGTAGCCAAATCTGTATCAACC	1303
Query	1304	TGAAAGGGGGATACAAGTGTGAATGTAGCCGTGGCTATCAGATGGATCTTGCTACAGGAG	1363
Sbjct	1304	TGAAAGGGGGATACAAGTGTGAATGTAGCCGTGGCTATCAGATGGATCTTGCTACAGGAG	1363
Query	1364	TGTGCAAGGCTGTGGGGAAAGAACCATGTCTGATTTTCACCAACCGACGGGATATCAGGA	1423
Sbjct	1364	TGTGCAAGGCTGTGGGGAAAGAACCATGTCTGATTTTCACCAACCGACGGGATATCAGGA	1423
Query	1424	AGATTGGCCTTGAGAGAAAAGAATACATTTCAGCTAGTAGAGCAGCTAAGAAACACAGTTG	1483
Sbjct	1424	AGATTGGCCTTGAGAGAAAAGAATACATTTCAGCTAGTAGAGCAGCTAAGAAACACAGTTG	1483
Query	1484	CTCTAGATGCTGATATTGCTGAGCAAAAGCTTTATTGGGCTGACTTCAGCCAAAAGCAA	1543
Sbjct	1484	CTCTAGATGCTGATATTGCTGAGCAAAAGCTTTATTGGGCTGACTTCAGCCAAAAGCAA	1543
Query	1544	TTTTCAGTGCCTCTATTGATACCCGTGATAAAGTTGGAACACACACTAGAATCCTAGACA	1603
Sbjct	1544	TTTTCAGTGCCTCTATTGATACCCGTGATAAAGTTGGAACACACACTAGAATCCTAGACA	1603
Query	1604	ACATACACAGCCCTGCAGGAATTGCTGTTGACTGGATTTATAAGAACATCTACTGGACTG	1663
Sbjct	1604	ACATACACAGCCCTGCAGGAATTGCTGTTGACTGGATTTATAAGAACATCTACTGGACTG	1663
Query	1664	ACTCATCTGCAAAGACCATTTTCAGTGCCAGCCTGAATGGCAAGAAAAGAAAGGTTTTAT	1723
Sbjct	1664	ACTCATCTGCAAAGACCATTTTCAGTGCCAGCCTGAATGGCAAGAAAAGAAAGGTTTTAT	1723
Query	1724	TTCTTTCTGAGCTGAGAGAGCCAGCTTCTATTGCTGTAGATCCTCTCTCTGGCTTTATGT	1783
Sbjct	1724	TTCTTTCTGAGCTGAGAGAGCCAGCTTCTATTGCTGTAGATCCTCTCTCTGGCTTTATGT	1783
Query	1784	ACTGGTCAGACTGGGGTGAGCCAGCAAAAATTGAAAAAGCAGGAATGAATGGATTTGACA	1843
Sbjct	1784	ACTGGTCAGACTGGGGTGAGCCAGCAAAAATTGAAAAAGCAGGAATGAATGGATTTGACA	1843

Query	1844	GACAGCAGCTTGTGACAACAGAAATCCAATGGCCTAATGGCATTGCTTTAGATCTTGTA	1903
Sbjct	1844		1903
Query	1904	AAAGCCGTTTGTATTGGCTTGATTCTAAACTACATATGCTCTCAAGTGTGGATCTGAATG	1963
Sbjct	1904		1963
Query	1964	GCCAGGATCGTAGACTTGTGCTCAAGTCTCATATGTTCTTCCTCATCCTCTTGCTCTAA	2023
Sbjct	1964		2023
Query	2024	CAATATTTGAGGATCGTGTATTCTGGATTGACGGAGAGAACGAGGCAGTCTATGGTGCCA	2083
Sbjct	2024		2083
Query	2084	ACAAATTTACTGGAGCTGAATTGGTCACCCTAGTAAACAACCTCAATGATGCGCAGGACA	2143
Sbjct	2084		2143
Query	2144	TCATTGTTTATCATGAACCTTGTCAACCTTCAGGCAGGAAGTGGTGTGAAGAGAACATGG	2203
Sbjct	2144		2203
Query	2204	TAAATGGAGGCTGTAGCTACCTGTGCCTGCCTGCTCCTCAGATAAATGAACACTCTCCGA	2263
Sbjct	2204		2263
Query	2264	AGTATACTTGACATGTCCTGCTGGATATTTCTTGACAGGAGGACGGTCTGAGATGTGGAG	2323
Sbjct	2264		2323
Query	2324	GATTCAACATCAGTAGTGTGGTGTCTGAAGTAGCTGCAAGAGGAGCAGCAGGAGCTTGGG	2383
Sbjct	2324		2383
Query	2384	CTGTTCTTCCTATCTTACTGCTGGTGACGGCTGCATTGGCTGGCTACTTCATGTGGCGTA	2443
Sbjct	2384		2443
Query	2444	ATTGGCAGCACAGAACATGAAAAGCATGAATTTTGATAATCCCGTCTATCTGAAAACCTA	2503
Sbjct	2444		2503
Query	2504	CAGAAGAGGACCTCACAAATTGATATTGGCAGACACAGTGGTTTCAGTGGGACACACCTACC	2563
Sbjct	2504		2563
Query	2564	CTGCAATATCTGTTGTAAGCACAGATGATGATATGCTGTGAGTGTGGATCAGCAATCAC	2623
Sbjct	2564		2623
Query	2624	TTTCAGTTTACTTTGTGTTTTACACTTACGGGGATGATAAACATGCTTGTGGCTGAAAGA	2683
Sbjct	2624		2683
Query	2684	CTTCCTCCATTCTTGGAAGAATGAAGAACTTTCTCTGTGTATGGAACACTTACATAATT	2743
Sbjct	2684		2743
Query	2744	AGCTGTTTTATACAGCTTAACAACCAACTCTGTAATACCTGTCCACAACAATTAGCTT	2803
Sbjct	2744		2803
Query	2804	TTACTGGTTACTATTTTATCAGCAACCCCTGAATTGGTCAGTCAGTAACACCACTGGCCA	2863
Sbjct	2804		2863
Query	2864	AATACAAAGCACTTTCCATAGAAAGCCATATTCCAGCCACAACCTTGTGCTATAGTGTAAC	2923
Sbjct	2864		2923

Query	2924	AGCTGTACATATGTGTATATGCCACTTGTAATATTATTCCTGGAAAATCACTATCAAGC	2983
Sbjct	2924	AGCTGTACATATGTGTATATGCCACTTGTAATATTATTCCTGGAAAATCACTATCAAGC	2983
Query	2984	ACTTTGAAATACTTAAATGTAAATTATTGTACACTGTCTTTTCAATGGTTGGGGCAAT	3043
Sbjct	2984	ACTTTGAAATACTTAAATGTAAATTATTGTACACTGTCTTTTCAATGGTTGGGGCAAT	3043
Query	3044	GGCAATAGGAAAAACGGGTACTATGATTGCCAAAAATTTGTAAGCATAAGTAATTTTG	3103
Sbjct	3044	GGCAATAGGAAAAACGGGTACTATGATTGCCAAAAATTTGTAAGCATAAGTAATTTTG	3103
Query	3104	TATGTATGACTGAAACAATCTTGTCTGTTACCTCTTAGAGCTCTACAGGTATGAATGCTC	3163
Sbjct	3104	TATGTATGACTGAAACAATCTTGTCTGTTACCTCTTAGAGCTCTACAGGTATGAATGCTC	3163
Query	3164	TTTGAGGAAACCACTGTAAATCTGAAATGCAGAGAAGGGGGAAAAATAAAAAACAAGCAAT	3223
Sbjct	3164	TTTGAGGAAACCACTGTAAATCTGAAATGCAGAGAAGGGGGAAAAATAAAAAACAAGCAAT	3223
Query	3224	T	3224
Sbjct	3224	T	3224

*หมายเหตุ Query คือ ยีน VLDL/VTG Receptor

Sbjct คือ ยีน VLDL Receptor

การเตรียม Polyacrylamide gel สำหรับแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ

1. นำกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาดซึ่งมี 2 ขนาด คือขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95% โดยใช้กระดาษ Kimwipe ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

2. กระจกเล็กเช็ดด้วย Clear view เพื่อป้องกันเจลติดกระจก

3. กระจกใหญ่เช็ดด้วย 95% เอทานอล ใน 0.5 % acetic acid ผสมกับ glass bond เพื่อให้ติดกระจกใหญ่

4. นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้ง 2 ข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แล้วเตรียมเจลซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

เตรียม 5 % Polyacrylamide gel ใน 1x TBE gel buffer โดยเตรียมดังนี้

10xTBE buffer	10	ml
29:1 40% acrylamide:bisacrylamide solution	12.5	ml
10% ammonium persulfate	800	μl
TEMED	80	μl
น้ำ	62	ml

5. ผสมให้เข้ากันแล้วเทเจล รอนจนเกิด Polymerize ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เตรียม 1xTBE ใส่ลงใน take ของเครื่อง electrophoresis

6. นำตัวอย่างไป Denature ที่ 80-90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

7. ทำความสะอาดช่องเจล (Well) ของเจลด้วย 1xTBE แล้วหยอดตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร ลงในช่องหัว และคั่นหัวท้ายโดยใช้ Gene Ruler 100 bp DNA ladder

8. เปิดเครื่องให้พลังงานไฟฟ้า (Power supply) 10V เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

9. เมื่อครบเวลา นำเจลออกจากเครื่องแล้วนำแผ่นกระจกไปย้อมด้วย Silver stain เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

การย้อมซันดีเอ็นเอที่อยู่บน Polyacrylamide gel ด้วย Silver-Staining

สารเคมี

1. Staining solution (2,000 ml)

Silver nitrate	4	g
37% formaldehyde	3	ml
น้ำ	2	L

2. Developing solution (2,000 ml)

Anhydrous Na_2CO_3	50	g
37 % formaldehyde	1.08	ml
10 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	400	μl
น้ำ	2	L

วิธีการ

1. นำแผ่นกระจกวางลงในถาดสำหรับย้อม โดยให้ด้านหน้าเจลหงายขึ้น
2. ตรึงซันดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วย 10 % acetic acid 30 นาที โดยแช่ถาดย้อมตลอดเวลา
3. ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที โดยแช่ถาดย้อมตลอดเวลา

4. ย้อมเจสด้วย Staining solution ปริมาตร 2 ลิตร นาน 30 นาที โดยเขย่าภาดย้อมตลอดเวลา
5. ล้างน้ำ 1 ครั้ง โดยเทให้น้ำผ่านเจสแล้วเททิ้งทันที ประมาณ 10 วินาที
6. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยแช่ใน developing solution ที่เย็นจัด ปริมาตร 2 ลิตร เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอ
7. หยุดปฏิกิริยาด้วย Stop solution (10% acetic acid ที่ใช้ในข้อ 2) นาน 5 นาที
8. ล้างน้ำ อีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที โดยเขย่าภาดย้อมตลอดเวลา
9. ตากกระจกให้แห้ง ก่อนนำกระจกไปอ่านผล

ตารางผนวกที่ 4 แสดงเบอร์ไก่ที่ใช้ในการทดลอง

ตัวที่	เบอร์ไก่	พันธุ์ไก่
1	N01	ไก่สามเหลือง
2	N02	ไก่สามเหลือง
3	N03	ไก่สามเหลือง
4	N04	ไก่สามเหลือง
5	N05	ไก่สามเหลือง
6	N06	ไก่สามเหลือง
7	N07	ไก่สามเหลือง
8	N08	ไก่สามเหลือง
9	N09	ไก่สามเหลือง
10	N10	ไก่สามเหลือง
11	N11	ไก่สามเหลือง
12	N12	ไก่สามเหลือง
13	N13	ไก่สามเหลือง
14	N14	ไก่สามเหลือง
15	N15	ไก่สามเหลือง
16	N16	ไก่สามเหลือง
17	N17	ไก่สามเหลือง
18	N18	ไก่สามเหลือง
19	N19	ไก่สามเหลือง
20	N20	ไก่สามเหลือง
21	N21	ไก่สามเหลือง
22	N22	ไก่สามเหลือง
23	N23	ไก่สามเหลือง
24	N24	ไก่สามเหลือง
25	N25	ไก่ไข่
26	N26	ไก่ไข่
27	N27	ไก่ไข่

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

ตัวที่	เบอร์ไก่	พันธุ์ไก่
28	N28	ไก่ไข่
29	N29	ไก่ไข่
30	N30	ไก่ไข่
31	N31	ไก่ไข่
32	N32	ไก่ไข่
33	N33	ไก่ไข่
34	N34	ไก่ไข่
35	N35	ไก่ไข่
36	N36	ไก่ไข่
37	N37	ไก่ไข่
38	N38	ไก่ไข่
39	N39	ไก่ไข่
40	N40	ไก่ไข่
41	N41	ไก่ไข่
42	N42	ไก่ไข่
43	N43	ไก่ไข่
44	N44	ไก่ไข่
45	N45	ไก่ไข่
46	N46	ไก่ไข่
47	N47	ไก่ไข่
48	N48	ไก่ไข่
49	N49	ไก่ไข่
50	N50	ไก่ไข่
51	N51	ไก่ไข่

ตารางผนวกที่ 5 รูปแบบแถบสีเฝ้าจากการทำ SSCP (SSCP pattern) ของยีน VLDL/VTG
Receptor ของไก่แต่ละตัว

เบอร์ไก่	รูปแบบแถบสีเฝ้าจากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์			
	ไพรเมอร์ที่ 1	ไพรเมอร์ที่ 2	ไพรเมอร์ที่ 3	ไพรเมอร์ที่ 4
N01	1	1	1	1
N02	1	1	1	1
N03	1	2	2	2
N04	1	2	3	3
N05	2	1	2	3
N06	1	1	2	1
N07	3	1	2	1
N08	3	1	2	1
N09	3	3	1	1
N10	3	1	2	1
N11	4	3	1	1
N12	3	1	1	1
N13	3	1	1	1
N14	3	1	1	1
N15	3	2	2	4
N16	5	3	1	1
N17	3	3	1	1
N18	3	1	2	1
N19	3	3	1	1
N20	1	1	1	1
N21	3	1	1	1
N22	3	1	2	1
N23	6	1	2	1
N24	6	1	2	1
N25	6	1	2	1

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

เบอร์ไก่	รูปแบบแถบสีเนื่องจากการทำ SSCP ของยีน VLDL/VTG Receptor ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์			
	ไพรเมอร์ที่ 1	ไพรเมอร์ที่ 2	ไพรเมอร์ที่ 3	ไพรเมอร์ที่ 4
N26	1	1	2	1
N27	1	1	2	1
N28	1	1	2	1
N29	1	1	2	1
N30	1	1	2	1
N31	3	1	2	1
N32	3	1	2	1
N33	3	1	2	1
N34	3	1	2	1
N35	3	1	2	1
N36	3	1	2	1
N37	3	1	2	1
N38	3	1	2	1
N39	3	1	2	1
N40	3	1	2	1
N41	3	1	2	1
N42	3	1	2	1
N43	3	1	2	1
N44	3	1	2	1
N45	3	1	2	1
N46	3	1	2	1
N47	3	1	2	1
N48	3	1	2	1
N49	3	1	2	1
N50	3	1	2	1
N51	3	1	2	1

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายวิโรจน์ ลิขิตตระกูลวงศ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 9 กรกฎาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี คณะเกษตรศาสตร์ วิชาเอกสัตวศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนการศึกษา	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษา และวิจัยสาขา เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษา และวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ