การตรวจเอกสาร

ความสำคัญในการคัดแยกเพศ

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

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

วิธีการในการคัดแยกเพศ

สุคนธ์ทิพย์และสายชล (2549) ได้กล่าวถึงวิธีการในการคัดแยกเพศนกด้วยกันอยู่หลายวิธี แต่ละวิธีก็มีความสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังนี้

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

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

กว่าตัวผู้วิธีการนี้ใช้แพร่หลายในเมืองไทย เนื่องจากสะดวกรวดเร็ว และประหยัด แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์เนื่องจากช่องว่างระหว่างตะเกียบของตัวเมียจะลดลงไม่สามารถบอกเพศได้ในขณะที่นกยังไม่โตเต็มวัย ต้องอาศัยความรู้ความชำนาญ ของผู้ตรวจสอบและที่สำคัญคือ ไม่สะดวกสำหรับนกที่มีขนาดใหญ่

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

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

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

6. การตรวจด้วยเทคนิค DNA และอณูพันธุศาสตร์ วิธีการนี้ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันโดยใช้การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดหรือขนนก แล้วนำมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR เป็นวิธีที่สะดวกและไม่ทำให้นกบาดเจ็บทำได้ในนกขนาดเล็ก ได้ผลรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง

ความหมายและหลักการของเทคนิค PCR

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

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

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° ซ

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

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

การใช้PCRในการศึกษา genetic fingerprints

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

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

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

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

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

การคัดแยกเพศโดยใช้พื้นฐานของ CHD

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

ตารางที่ 1 การคัดแยกเพศนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CHD-linked เป็นไพรเมอร์

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

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

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

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

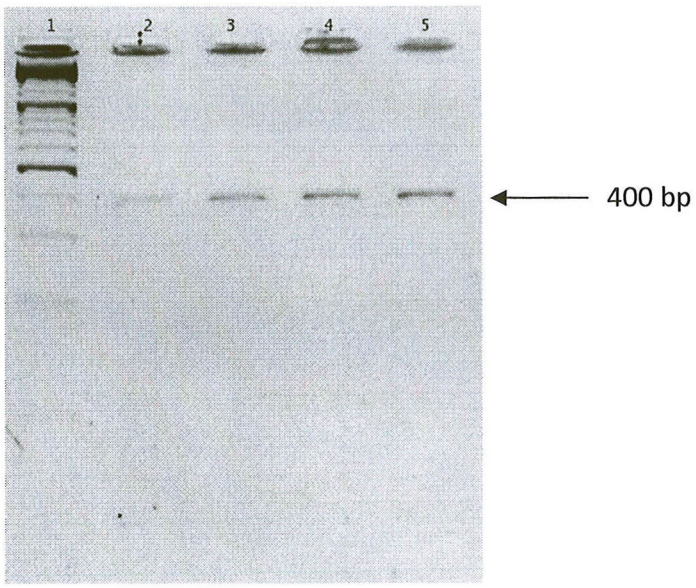
great tit , Eurasian tree creeper และ westen gull การที่จะหลีกเลี่ยงปัญหาเหล่านี้ก็คือ การใช้ 2550F/2718R เป็นไพรเมอร์แทน P2/P8 เพราะ 2550F/2718R ที่ใช้เป็นไพรเมอร์จะมีความแตกต่างกันของ intron ด้านข้าง โดยสามารถจะใช้กับนกที่มีโครงสร้างเป็น polymorphism ใน Z โครโมโซมได้ และถ้าหากว่าชิ้นส่วนที่ได้จาก W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

การจำแนกเพศด้วยเทคนิค PCR และการตรวจวิเคราะห์ผล

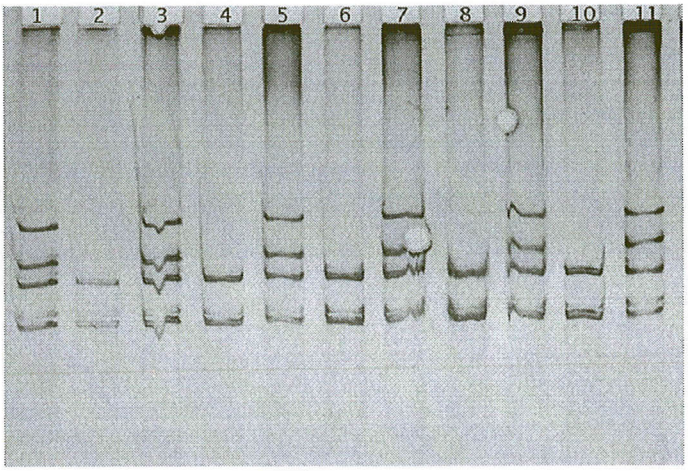
Ramos *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเพศเหยี่ยวจำพวก *Accipiter cooperii* โดยนำตัวอย่างขนที่หน้าอกในลูกนกอายุระหว่าง 15 และ23 วัน และซากของเหยี่ยวเพศผู้ที่โตเต็มวัยมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยเขาได้ใช้ 2 เทคนิคในการวิเคราะห์ผลเทคนิคแรกคือการใช้ P2 และ P8 เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ CHD1 (Chomo-helicase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

การตรวจสอบด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต

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

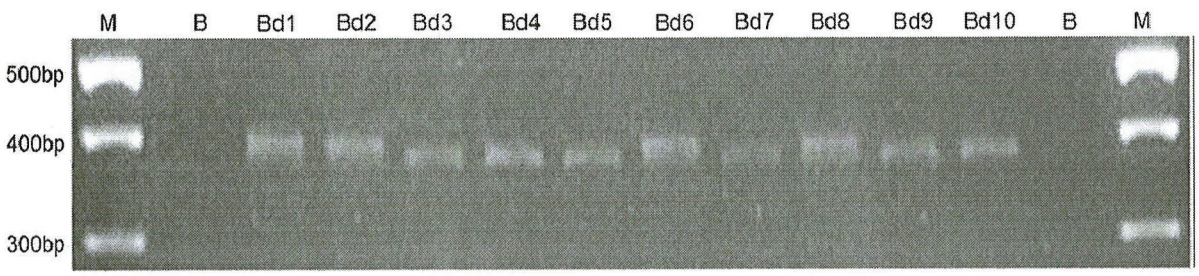


ภาพที่ 1 ผลผลิต PCR โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ CHD 1 ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P8 ในนก *A. Cooperii* บน 3% agarose gel เมื่อเลนที่ 1 = 100 bp maker ; เลนที่ 2 และ 4 = ผลผลิต PCR นกเพศผู้ ; เลนที่ 3 และ5 = ผลผลิต PCR นกเพศเมีย (Ramos *et al.*, 2009)



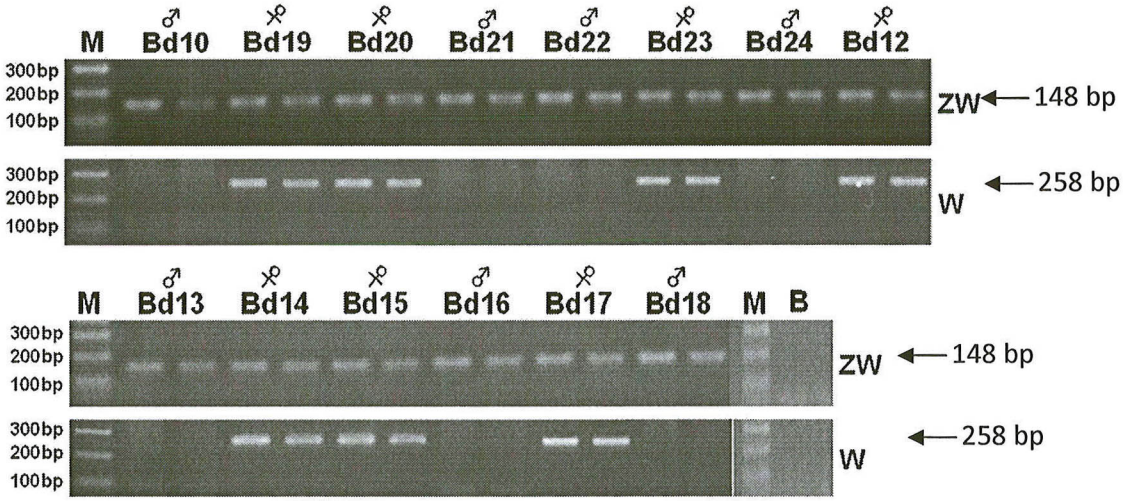
ภาพที่ 2 ผลของ PCR-SSCP ในนก *A. Cooperii* โดยการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของ CHD 1 ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P8 บน 12% polyacrylamide gel และ 1% C,TBE 0.5x โดยใช้กลีเซอรอลเคลือบผิวนอกในเวลา 3 ชั่วโมงและแล้วย้อมด้วย silver stain เมื่อเลนที่ 2,4,6,8,10 เป็นตัวอย่างดีเอนเอที่ได้จากนกเพศผู้ ส่วนเลนที่ 1,3,5,7,9,11เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากนกเพศเมีย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

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



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

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



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

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

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