อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สถานที่เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดนกชนิดต่างๆ เน้นเก็บตัวอย่างเลือดนกกลุ่มนกแก้วปากขอที่ยังไม่มีการรายงานเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดนกที่ทราบเพศแน่ชัดแล้วจากฟาร์มเลี้ยงนกสวยงามทั้งในเขตกรุงเทพฯและจังหวัดใกล้เคียง

วิธีการเก็บตัวอย่าง

การเก็บเลือดทำได้โดยใช้ปลายเข็มสะกิดที่เส้นเลือดบริเวณปีก หรือตำแน่งอื่นของนกที่มีเส้นเลือดมาเลี้ยง แล้วใช้กระดาษกรองซับเลือดที่ซึมออกมาบรรจุในหลอดปลอดเชื้อเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป โดยทำการเก็บตัวอย่างจากนกปากขอพันธุ์ต่างๆดังนี้

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

สถานที่และห้องปฏิบัติการในการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

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

ไพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง

ทำการทดสอบดีเอ็นเอที่สะกัดได้จากเลือดไก่ทั้ง 6 ตัว ด้วยวิธี PCR โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลอง โดยใช้ไพรเมอร์และอุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ต่างกันดังนี้

243128

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

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

การหาลำดับเบสของนกแต่ละสายพันธุ์

ทำการโคนชิ้นส่วน DNA ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์ของ *E. coli* และสกัดชิ้นส่วนยีนดังกล่าวเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับเบสของเพศผู้และเพศเมียของนกแต่ละสายพันธุ์

การออกแบบและสังเคราะห์ไพร์เมอร์

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

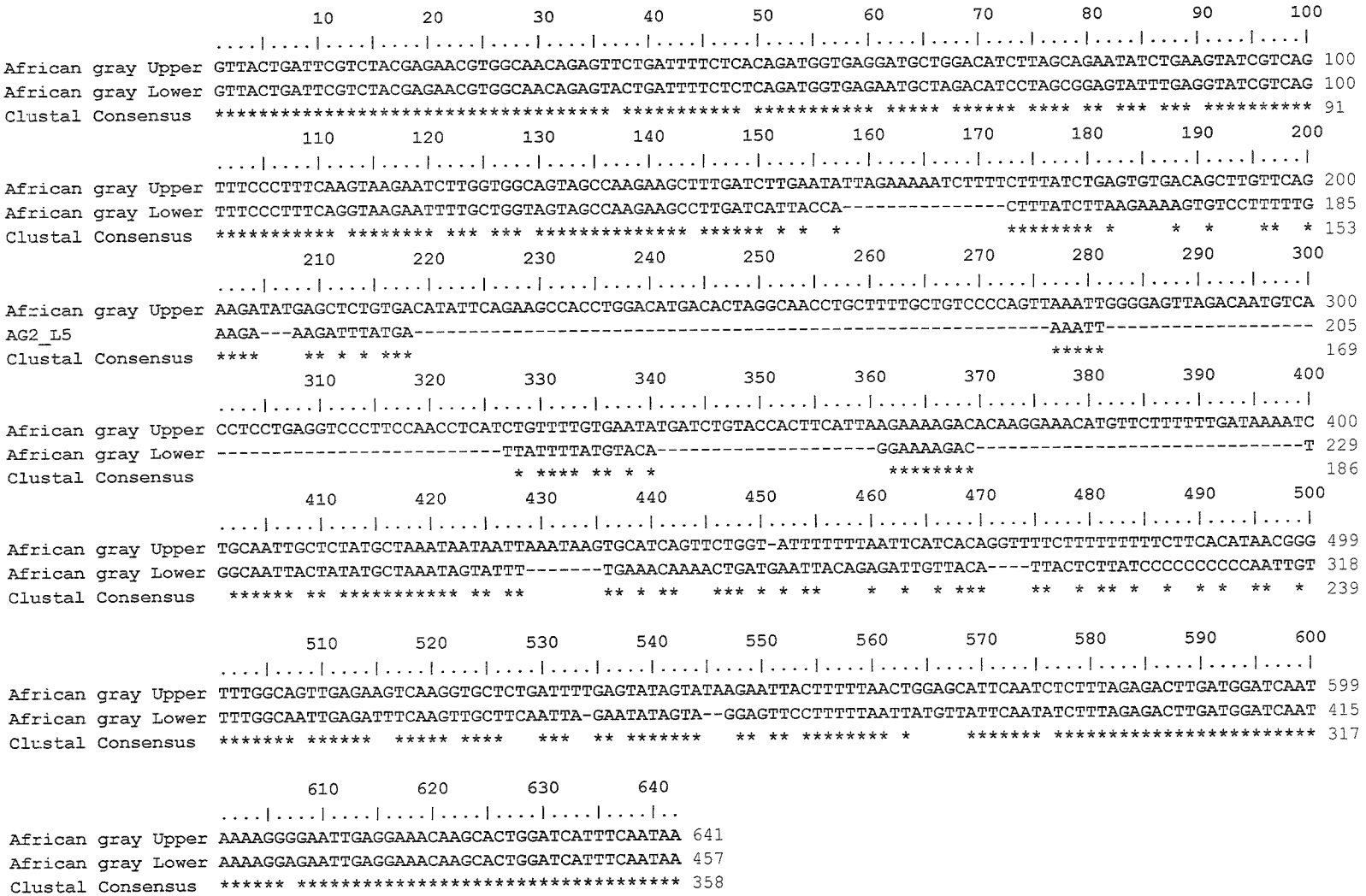
ผลการทดลองและวิจารณ์

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

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

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

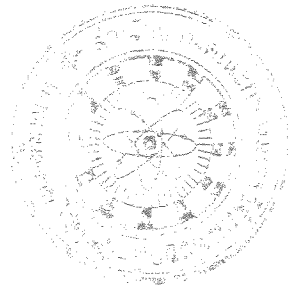
นกพันธุ์ซันคอนัวร์สามารถแยกเพศได้ดีด้วยการใช้ไพรเมอร์ NP/MP/P2 โดยผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ได้พบว่าเพศผู้มีขนาด 386 bp ส่วนแบนล่างมีขนาด 321 bp (ภาพที่ 7)

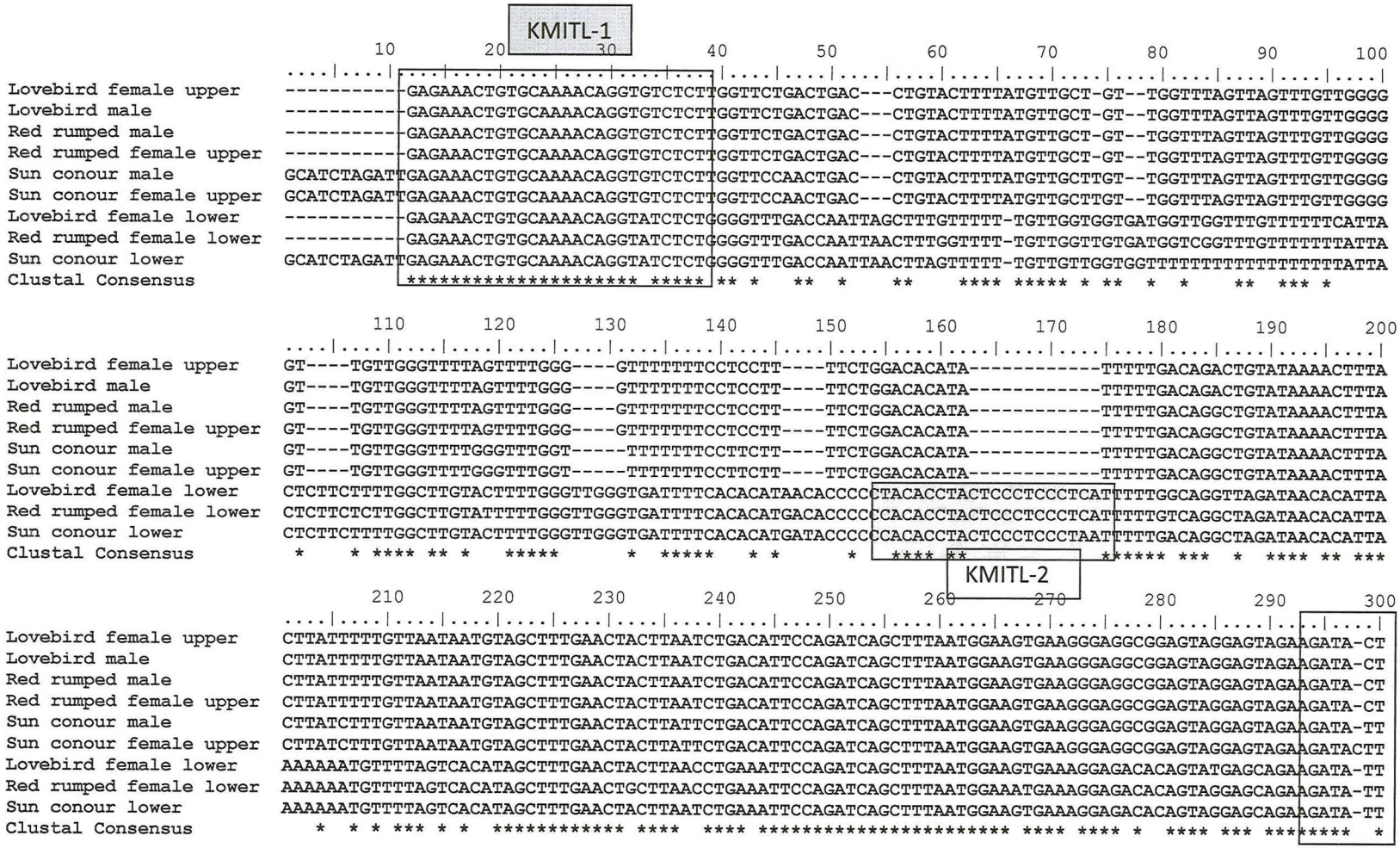


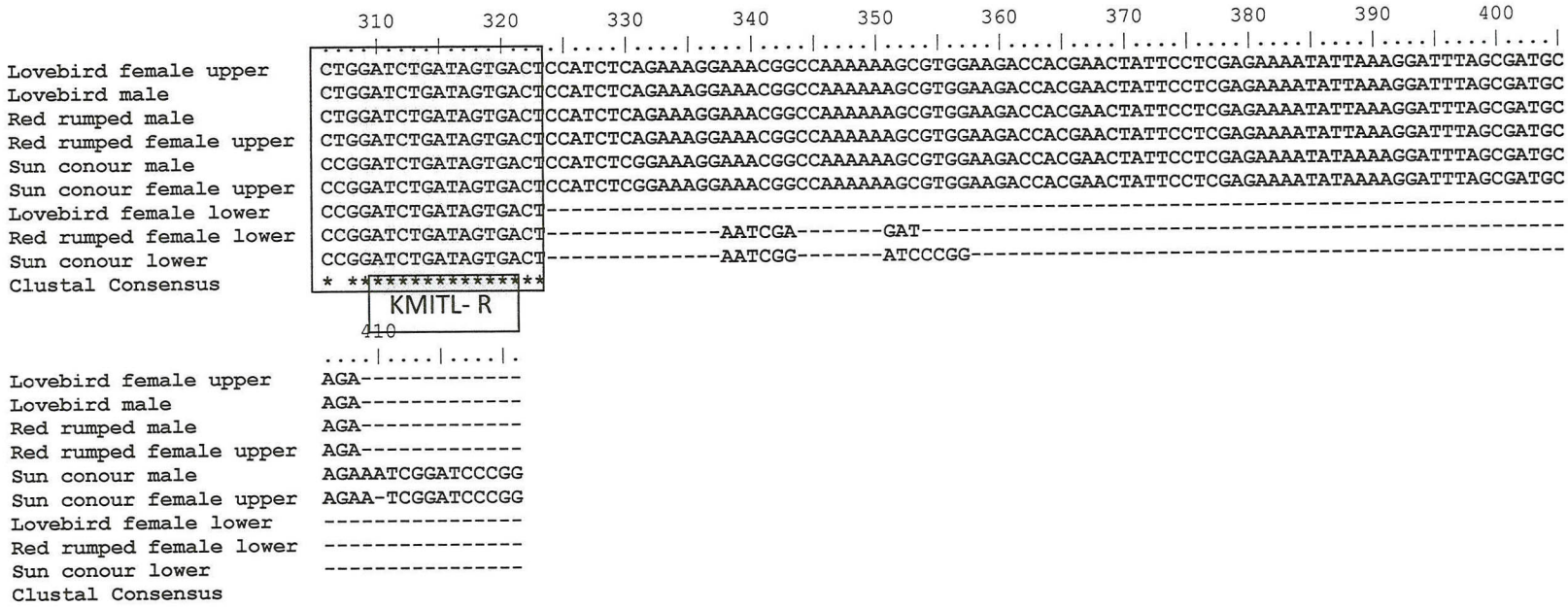
ภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์อาฟริกันเกรย์ระหว่างเพศผู้และแบนล่างของเพศเมีย

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

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

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

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

ภาพที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากการโคลนของนกพันธุ์เลิฟเบิร์ดระหว่างเพศผู้และแบนล่างของเพศเมีย




KMITL-1
KMITL-2
Lovebird female upper
Lovebird male
Red rumped male
Red rumped female upper
Sun conour male
Sun conour female upper
Lovebird female lower
Red rumped female lower
Sun conour lower
Clustal Consensus



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

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

การออกแบบไพรเมอร์

จากลำดับเบสที่ได้จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับใช้ในการทดลองดังนี้

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

การทดสอบไพร์เมอร์ที่ได้กับนกพันธุ์ต่างๆ

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

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่กับนกพันธุ์ต่างๆ

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

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