



วิทยานิพนธ์

การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของ
ยีนคาร์เทปซินดี และยีนไวเทลโลเจนนิน ทู ในไก่

USE OF A PCR-SINGLE STRAND CONFORMATION
POLYMORPHISM (PCR-SSCP) FOR DETECTION OF A
POINT MUTATION IN CHICKEN *CATHEPSIN D* AND
VITELLOGENIN II GENES

นางสาวกุลสุตา ชมวิศรุตกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนคาร์เทปซินดี และยีนไวเทลโลเจนนิน ทู ในไก่

Use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for Detection of a Point Mutation in Chicken *Cathepsin D* and *Vitellogenin II* Genes

นามผู้วิจัย นางสาวกุลสุดา ชมวิศรุตกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุกมิตร เมฆฉาย, Dr.agr.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เนรมิตร สุขมณี, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนคาร์เทปซินดี
และยีนไวเทลโลเจนนิน ทู ในไก่

Use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for Detection of a Point
Mutation in Chicken *Cathepsin D* and *Vitellogenin II* Genes

โดย

นางสาวกุลสุดา ชมวิศรุตกุล

เสนอ

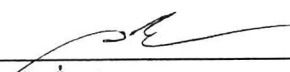
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

กุลสุดา ชมวิศรุตกุล 2550: การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของ
ยีนคาร์เทปซินดี และยีนไวเทลโลเจนนิน ทู ในไก่ ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับ
บัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์วิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.
73 หน้า

ยีนคาร์เทปซินดี (Cathepsin D; *CTSD*) และยีนไวเทลโลเจนนิน ทู (Vitellogenin II; *VTG II*) มีบทบาทต่อกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไข่แดงในสัตว์ปีก ยีนทั้งสองจึงจัดเป็น candidate gene ที่มีความสำคัญต่อลักษณะการให้ไข่ดกในไก่ ซึ่งการศึกษาค้นคว้านี้ใช้ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ที่เป็นไก่ที่มีพันธุกรรมให้ไข่ดก จำนวน 30 ตัว และไก่สามเหลียงที่ให้ไข่ไม่ดก จำนวน 30 ตัว ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ในยีน *CTSD* และ *VTG II* โดยออกแบบไพรเมอร์จาก cDNA และ genomic DNA จากฐานข้อมูลใน GenBank เพื่อใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนทั้งสอง กับลักษณะการให้ไข่ ยีน *CTSD* ถูกเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ในส่วน 5' -flanking region และส่วน coding sequence สำหรับยีน *VTG II* ถูกเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน 5' -end region และส่วน coding sequence ในบริเวณ exon 4 และ บริเวณ exon 27 พบแถบ DNA ที่ได้จาก cDNA ของยีน *CTSD* ทั้งสองบริเวณมีขนาด 194 และ 223 bp ตามลำดับ และที่ได้จาก genomic DNA ของยีน *VTG II* ทั้งสามบริเวณมีขนาด 261, 216 และ 169 bp ตามลำดับ แถบดีเอ็นเอทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์หา Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) ด้วยเทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) บน nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ที่ความเข้มข้น 8% และยืนยันผลด้วยโปรแกรม BioNumerics version 4.60 (Applied Maths) พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CTSD* และ *VTG II* ในบริเวณต่าง ๆ ระหว่างไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่สามเหลียง ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อนำยีนทั้งสองไปหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสยีน *VTG II* บริเวณ 5' -end region ของไก่ไข่แตกต่างจากไก่สามเหลียง เนื่องจากลำดับเบสมีการกลายพันธุ์ โดยมีการแทนที่เบส

กุลสุดา ชมวิศรุตกุล
ลายมือชื่ออิเล็กทรอนิกส์


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

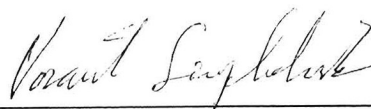
๔๔ / เม.ย. / ๕๐

Kunsuda Chomwisarutkun 2007: Use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for Detection of a Point Mutation in Chicken *Cathepsin D* and *Vitellogenin II* Genes. Mater of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agriculture Biotechnolgy, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Voravit Siripholvat, D.Agr. 73 pages.

Cathepsin D (*CTSD*) and Vitellogenin II (*VTG II*) genes play a major role in the protein synthesis of the precursor of avian egg yolk. The *CTSD* and *VTG II* are considered as candidate genes for high egg production trait. Thirty commercial layers represented as high egg production and 30 Tri-yellow chickens represented as low egg production are used in this study. Polymorphisms of *CTSD* and *VTG II* genes were identified in cDNA and genomic DNA of both chicken breeds to carry out an association analysis between two these genes and egg production traits. PCR primers were designed from sequence in GenBank database. The 5' -flanking region and coding sequence of *CTSD* gene were amplified with polymerase chain reaction (PCR), as well as the *VTG II* gene was amplified at the 5' -end region, exon 4 and exon 27. Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) were identified within two *CTSD* (194 and 223 bp) and three *VTG II* (261, 216 and 169 bp) fragments by using single strand conformation polymorphism (SSCP). The SSCP patterns were analysed on the 8% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and confirmed the results by BioNumerics version 4.60 (Applied Maths). The results showed that the SSCP bands did not different in commercial layer and Tri-yellow chickens. But, nucleotide sequences of *VTG II* gene in the commercial layer were different from Tri-yellow chickens. Because, there were 10 point mutations in this gene with substitution.

Kunsuda Chomwisarutkun

Student's signature



Thesis Advisor's signature

2A / 229 / 07

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภูมิตร เมฆฉาย กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และรองศาสตราจารย์ ดร. เนรมิต สุขมณี กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษา และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ดี และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม ผู้แทนบัณฑิต ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย และขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาทกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ และภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่สนับสนุนตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ๆ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอบอบแด่ คุณพ่อเฉลิม ชมวิศรุตกุล ที่จากไปก่อนจะเห็นความสำเร็จของข้าพเจ้า คุณแม่ และพี่สาว รวมถึงทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนแก่ข้าพเจ้าในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

กุลสุดา ชมวิศรุตกุล

พฤษภาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
ระบบสืบพันธุ์เพศเมียของไก่ (Reproductive System of the Female)	5
พันธุ์ไก่	10
คาร์เทปซินดี (Cathepsin D; CTSD)	11
ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin; VTG)	14
บทบาทของคาร์เทปซินดี และไวเทลโลเจนินในการสร้างไข่แดง	16
เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)	18
เทคนิค Reverse Transcriptase – PCR (RT–PCR)	21
เทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	23
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	34
ผล	34
ผลการเพิ่มปริมาณยีน CTSD และยีน VTG II ด้วยเทคนิค	
Polymerase chain reaction (PCR)	34
ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism	
(SSCP)	38
ผลการหาลำดับเบสของยีน CTSD และยีน VTG II	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	47
สรุป	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	50
ภาคผนวก	58
ลำดับเบสของยีน <i>CTSD</i> จากฐานข้อมูล GenBank	59
ลำดับเบสของยีน <i>VTG II</i> จากฐานข้อมูล GenBank	61
ลำดับเบสของยีน <i>VTG II</i> บางส่วนจากฐานข้อมูล GenBank	63
การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล	70
การเตรียม Polyacrylamide gel สำหรับแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ	71
การย้อมจีนดีเอ็นเอที่อยู่บน Polyacrylamide gel ด้วยวิธี Silver Staining	71
วิธีการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด kit (Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)	72
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน <i>CTSD</i> และยีน <i>VTG II</i>	30
ตารางผนวกที่		
1	ส่วนผสมในการเตรียมเจล	71

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครโมโซมของไก่	4
2 อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของไก่	7
3 องค์ประกอบของไข่	8
4 โครงสร้างของคาร์แทปซิน (Cathepsin D)	13
5 ตำแหน่งของยีน <i>CTSD</i> บนโครโมโซมคู่ที่ 5 ของไก่	14
6 กระบวนการสังเคราะห์ VTG	15
7 องค์ประกอบของโพลีเปปไทด์ที่ได้จากการแตกตัวไวเทลโลเจนนิน	15
8 การสังเคราะห์และหลั่งไวเทลโลเจนนินโดย hepatocyte	16
9 บทบาทในการสร้างไข่แดงของคาร์แทปซินดี และไวเทลโลเจนนิน	18
10 ผลผลิต PCR ของยีน <i>CTSD</i> ในส่วน 5' flanking region ที่มีขนาด 194 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp	34
11 ผลผลิต PCR ของยีน <i>CTSD</i> ในส่วน coding sequence ที่มีขนาด 223 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp	35
12 ผลผลิต PCR ของยีน <i>VTG II</i> ในส่วน 5' end region ที่มีขนาด 261 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp	36
13 ผลผลิต PCR ของยีน <i>VTG II</i> ในส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 ที่มีขนาด 216 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp	36
14 ผลผลิต PCR ของยีน <i>VTG II</i> ในส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 ที่มีขนาด 169 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน <i>CTSD</i> ส่วน 5' flanking region ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)	38
16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน <i>CTSD</i> ส่วน coding sequence ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)	39
17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน <i>VTG II</i> ส่วน coding sequence ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)	39
18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน <i>VTG II</i> ส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)	40
19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน <i>VTG II</i> ส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)	40
20 ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากยีน <i>CTSD</i> ส่วน 5' -flanking region (บางส่วน) โดยสุ่มจากไก่ไข่และไก่สามเหลืองกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank	42
21 ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากยีน <i>VTG II</i> ส่วน 5' end region (บางส่วน) โดยสุ่มจากไก่ไข่และไก่สามเหลืองกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank	44

การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนคาร์เทปซินดี และ ยีนไวเทลโลเจนนิน ทุ ในไก่

Use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for Detection of a Point Mutation in Chicken *Cathepsin D* and *Vitellogenin II* Genes

คำนำ

ไก่เป็นสัตว์ปีกที่มนุษย์คุ้นเคยมากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยไก่ถูกนำมาเลี้ยงเพื่อการผลิตเนื้อ และถูกนำมาบริโภคทั้งเนื้อและไข่มาใช้ ซึ่งผลผลิตดังกล่าวให้คุณค่าทางโภชนาการสูง ไก่เป็นสัตว์ อีกชนิดหนึ่งที่เหมาะสำหรับใช้ศึกษาด้านการพัฒนาและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในไข่ฟัก นอกจากนี้ไก่ยังเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ที่ทำรายได้เข้าประเทศมากที่สุดในด้าน ปศุสัตว์ที่มีเลี้ยงการทั้งหมด เพราะมีการส่งออกเนื้อไก่คิดอยู่ใน 10 อันดับแรกของสินค้า เกษตรกรรมส่งออกที่สำคัญ ไทยจึงจัดเป็นประเทศผู้ผลิตเนื้อไก่ที่สำคัญของโลก แต่การส่งออกไข่ ของไทยนั้นยังมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับปริมาณที่ผลิตได้ภายในประเทศ ซึ่งปริมาณการผลิตไข่ของ ไทยนั้นยังไม่เพียงพอต่อการส่งออก ซึ่งเพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น ในช่วงที่ ผลผลิตไข่ไก่ใกล้เคียงกับความต้องการบริโภคภายในประเทศ จะมีปริมาณไข่ที่หมุนเวียนใน ท้องตลาดน้อย ราคาจำหน่ายจึงสูงขึ้นจนไม่อาจส่งไข่ไปขายต่างประเทศได้ แต่เมื่อมีการเร่งการ ผลิตไข่จนมีไข่ในประเทศล้นตลาดจะทำให้ราคาตกต่ำ จำเป็นต้องมีการระบายไข่ออกไปยังตลาด ต่างประเทศแต่กลับไม่สามารถทำได้ เพราะความเชื่อถือทางด้านการค้าลดลง และมีไข่ไก่ของ ประเทศคู่แข่งบางประเทศได้เข้ามาแทนที่ เมื่อพิจารณาปริมาณการส่งออกไข่ของไทยในแต่ละ เดือนแล้ว พบว่ามูลค่าการส่งออกยังไม่สม่ำเสมอ ทำให้ไทยยังไม่สามารถเป็นประเทศผู้ผลิตไข่ที่ สำคัญ นอกจากนี้การเลี้ยงไก่ไข่ในประเทศไทยยังต้องมีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า เป็นประจำทุกปี แต่เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานการผลิตเฉลี่ยของไก่แม่พันธุ์จากการนำเข้าแล้ว ยังมี ปริมาณค่อนข้างต่ำ

ดังนั้นเพื่อเตรียมความพร้อมที่จะผลิตสายพันธุ์ไก่ไข่ขึ้นเองภายในประเทศ จะต้องนำ ความรู้วิชาการและเทคโนโลยีต่าง ๆ เข้ามาใช้ เพื่อให้ได้ไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง แต่การ ปรับปรุงพันธุ์ไก่เพื่อให้ได้ไก่ที่ทนต่อโรคหรือไก่ที่ไข่ดก ต้องใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มี การเอาความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรมาใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถปรับปรุงพันธุ์

ขยายพันธุ์ หรือสร้างสัตว์พันธุ์ใหม่ ๆ ได้อย่างรวดเร็ว และเป็นเครื่องมือแบบใหม่ ที่ให้โอกาสทางการเกษตร และช่วยกำจัดอุปสรรคที่มีอยู่ นอกจากนี้เทคโนโลยีชีวภาพมีศักยภาพ ที่จะช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม โดยการลดความจำเป็น ในการทำลายที่อยู่ทางธรรมชาติของพืช และสัตว์ และกรรมวิธีทางการเกษตร ที่สร้างความเสียหาย ยังช่วยให้ได้รับผลกำไรเพิ่มขึ้น เพราะผลผลิตใหม่ๆ จะทำให้เกิดตลาดใหม่ๆ ช่วยลดต้นทุน ช่วยเปิดโอกาสพิเศษทางการเกษตรในการเพิ่มปริมาณ เพิ่มความปลอดภัย น่าเชื่อถือ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของทรัพยากรอาหารของโลก ช่วยแก้ปัญหาทางสุขภาพที่เกิดจากการเกษตร และปัญหาที่เกิดกับสิ่งแวดล้อม

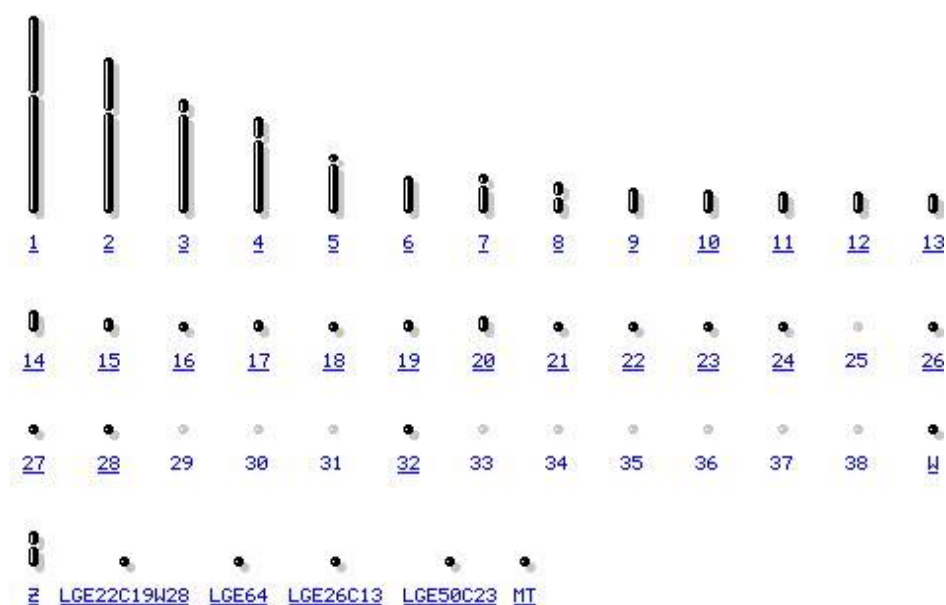
ยีนคาร์แทปซิน ดี (cathepsin D; *CTSD*) และยีนไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; *VTG*) เนื่องจากเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์และโปรตีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไข่แดงของสัตว์ปีก และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากยีน *CTSD* และ *VTG* ของไก่ไข่และไก่สามเหลือง เพื่อใช้ความแตกต่างที่ได้จากแถบดีเอ็นเอมาพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมาย สำหรับช่วยในการคัดเลือก (marker – assisted selection) ไก่ที่ไข่ดก จะสามารถลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการคัดเลือกเป็นอย่างมาก และยังสามารถเป็นแนวทางในการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ไก่ของไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อออกแบบโปรแกรมให้จำเพาะเจาะจงกับยีน *Cathepsin D* และ *Vitellogenin II*
2. เพื่อหาความหลากหลายของยีน *Cathepsin D* และ *Vitellogenin II* ในประชากรจากไก่ไข่
คอกและไก่ไข่ไม่คอก

การตรวจเอกสาร

ไก่ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Gallus gallus* เป็นสัตว์เลือดอุ่น ที่มีลักษณะพิเศษ กล่าวคือ ลำตัวมีขน (feathers) ปกคลุม มีปีก และขา 2 ข้าง โดยขาแต่ละข้างประกอบด้วยเท้า 4 นิ้ว มีปาก (beak) ยื่นออกมายาว ไม่มีฟัน ปอดติดอยู่กับซี่โครง และมีถุงลมช่วยในการหายใจ ไม่มีกระเพาะปัสสาวะ อุณหภูมิของร่างกายอยู่ระหว่าง 40 – 42 องศาเซลเซียส มีโครโมโซม 39 คู่ ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งแบ่งเป็นโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ (macrochromosome) 8 คู่ โครโมโซมขนาดเล็ก (microchromosome) 30 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ คือ โครโมโซม Z และโครโมโซม W



ภาพที่ 1 โครโมโซมของไก่

ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

และสามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธานของไก่ได้ดังนี้

Kingdom **Animalia**

Phylum **Chordata**

Subphylum **Vertebrata**

Class **Aves**

Order **Galliformes**

Family **Phasianidae**

Genus **Gallus**

Species ***G. domesticus***

ที่มา: <http://www.enchantedlearning.com/subjects/birds/info/chicken/>

ระบบสืบพันธุ์เพศเมียของไก่ (Reproductive System of the Female)

ระบบการสืบพันธุ์ของไก่เพศเมีย จะมีอวัยวะสืบพันธุ์ข้างเดียว กล่าวคือ ข้างซ้าย ซึ่งประกอบด้วย รังไข่ (ovary) และ ท่อนำไข่ (oviduct) ดังแสดงในภาพที่ 2 ในระยะที่ยังเป็น ตัวอ่อนเพศเมียในไข่ จะมีอวัยวะสืบพันธุ์ 2 ข้าง แต่อวัยวะข้างขวาจะฝ่อไม่พัฒนาต่อไป เมื่อลูกไก่ ฟักออกจากไข่ จะมีแต่อวัยวะข้างซ้ายเพียงข้างเดียวที่เจริญเติบโตจนไก่เป็นสาว (ทัศนีย์, 2543)

รังไข่ (Ovary)

รังไข่ประกอบด้วยส่วน medulla และส่วน cortex มีกระเปาะไข่ (follicle) ที่อยู่ในช่วงการ เจริญเติบโตในระยะต่าง ๆ มากมาย ในระยะที่ยังเป็นตัวอ่อนบริเวณผิวหนังนอกจะมี germinal epithelium ปกคลุมอยู่ ซึ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อนี้เจริญเข้ามาจากชั้นผิวหนังกลายเป็น primary oocyte กระเปาะไข่แต่ละอันถูกยึดอยู่กับก้านเล็ก ๆ (stalk) ของรังไข่ (ovary) บนกระเปาะประกอบด้วย เส้นโลหิต ซึ่งทำหน้าที่ส่งสารอาหารไปสร้างไข่ (อาวูธ, 2538) ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ของ ตัวอ่อน (embryo) จะมีรังไข่และท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้าง ยังมีการพัฒนาอยู่ แต่หลังจากฟักไข่ได้ 8 วัน รังไข่และท่อนำไข่ข้างขวาจะหยุดการเจริญเติบโตและฝ่อไป ทำให้เหลือรังไข่และท่อนำไข่ เพียงข้างซ้ายเท่านั้น รังไข่ข้างซ้ายตั้งอยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับอวัยวะข้างซ้ายในเพศผู้ คือใกล้ส่วน หน้าของไตซ้าย เมื่อไก่ฟักออกเป็นตัวแล้ว ภายในรังไข่มีไข่ (ovum) ที่ยังไม่เจริญ จำนวนหลายพัน ฟอง และไม่เพิ่มจำนวนจนกว่าไก่จะถึงวัยสาว เมื่อไก่โตเต็มที่เริ่มเข้าสู่ช่วงการผลิตไข่ ไข่เหล่านี้มี

การเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นเป็นไข่แดง (yolk) รังไข่แขวนติดกับผนังช่องท้องด้านบนโดยเยื่อ mesovarium และเชื่อมติดกับเส้นเลือดดำทาง ovarium stalk ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นเลือด ระบบประสาท และกล้ามเนื้อเรียบ

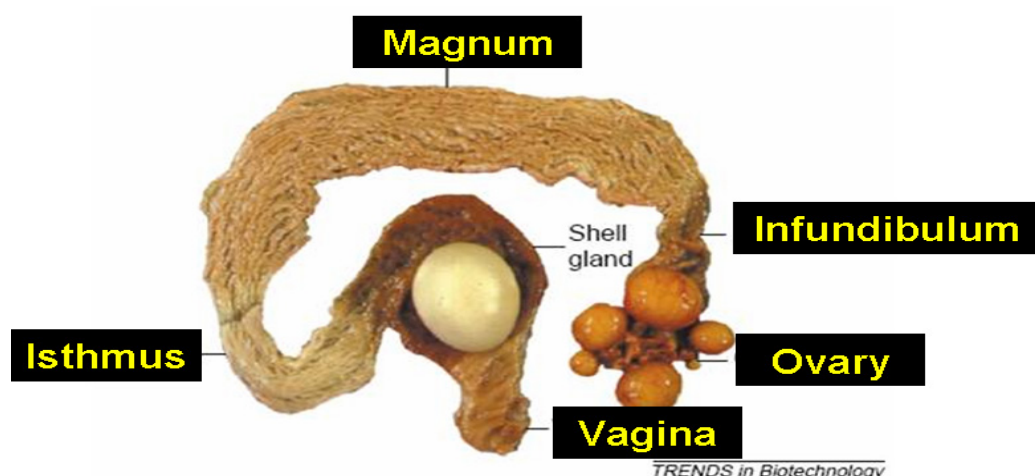
การทำงานของรังไข่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH (follicle stimulating hormone) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้ไข่มีการพัฒนาโดยการสะสมไข่แดงที่ลำเลียงมารวมกัน ส่วนฮอร์โมน เอสโตรเจน (estrogen) ที่ผลิตจากรังไข่ยังมีส่วนกระตุ้นให้มีการเพิ่มปริมาณแคลเซียม โปรตีน ไขมัน ไบโตามิน และสารอื่น ๆ ในกระสแลโลหิตซึ่งจำเป็นต่อการสร้างไข่ นอกจากนี้ฮอร์โมน เอสโตรเจน ยังกระตุ้นให้เชิงกรานและก้นขยายกว้างออกเพื่อสะดวกในการวางไข่ (oviposition) สำหรับโปรเจสเตอโรนก็เป็นฮอร์โมนอีกชนิดที่สร้างจากรังไข่ ทำหน้าที่กระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลั่ง LH (leuteinizing hormone) ซึ่งจำเป็นต่อการตกไข่ (ovulation) ของไข่

รังไข่ของไก่ในช่วงอายุ 3 – 4 เดือน มีน้ำหนัก 0.3 – 0.5 กรัม มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็น 2 กรัม เมื่ออายุ 18-20 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไก่ และก่อนที่จะมีการวางไข่น้ำหนักจะเพิ่ม เป็น 4-6 กรัม เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ รังไข่จะเริ่มทำงาน โดยไข่เล็ก ๆ 7 – 10 ใบ จะเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว และจะมีการแบ่งขนาดในการเจริญเติบโต ไข่แต่ละใบจะใช้เวลาประมาณ 10 วันก่อนที่จะโตเต็มที่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร น้ำหนักประมาณ 20 กรัม และตกลงสู่ท่อหน้าไข่ เมื่อไข่ใบแรกเจริญเติบโตเต็มที่แล้วก็จะมีการตกไข่ ฟองไข่ที่มีขนาดเล็กลงไปจะเจริญขึ้นมาแทนที่ และจะตกในวันถัดมาจนครบ 4-6 ฟองโดยเฉลี่ย หลังจากนั้นจะหยุดพักประมาณ 24 – 36 ชั่วโมง แล้วจึงมีการตกไข่ต่อเนื่องกันอีก ไข่แดงที่สะสมอยู่ภายใน follicular membrane ซึ่งเป็นเยื่อบาง ๆ ที่ยึดไข่แดงกับรังไข่ไว้ ที่ผิวเยื่อนี้จะมีเส้นเลือดฝอยจำนวนมาก นำสารอาหารจากกระสแลโลหิตมาเลี้ยงไข่ แต่จะมีบริเวณหนึ่งที่เป็นแนวยาวซึ่งไม่มีเส้นเลือดฝอย เรียกว่า stigma เป็นตำแหน่งที่จะมีการนิกขาด และปล่อยให้ไข่แดงหลุดออกจากรังไข่ บางครั้งเส้นเลือดฝอยที่อยู่ใกล้เคียงอาจนิกขาดด้วย ทำให้พบจุดเลือดติดไปกับไข่แดง ซึ่งเป็นลักษณะที่ผู้บริโภคมองไม่ต้องการ ในทำนองเดียวกัน หากมีส่วนของ follicular membrane หลุดติดไปกับไข่แดงด้วยก็จะเกิดเป็นลักษณะจุดเนื้อ (meat spot) ในฟองไข่ได้

ท่อนำไข่ (Oviduct)

ท่อนำไข่ของไก่มีขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับลำตัว อยู่เต็มด้านซ้ายของช่องท้อง ไก่ที่กำลังไข่มีท่อนำไข่ยาวประมาณ 20 – 30 นิ้ว ที่ผนังท่อนำไข่มีเส้นเลือดมาเลี้ยงมากมาย ไข่แดงที่ตกจากรังไข่จะเข้าสู่ท่อนำไข่ หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการสร้างเป็นฟองไข่ ซึ่งไข่จะใช้เวลาอยู่ในท่อนำไข่ประมาณ 23 – 25 ชั่วโมง และหลังจากวางไข่แล้ว ภายใน 15 – 30 นาที ต่อมาก็จะเกิดการตกไข่ใบใหม่ที่รังไข่อีก (ทัศนีย์, 2543) ท่อนำไข่แบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ (ภาพที่ 2)

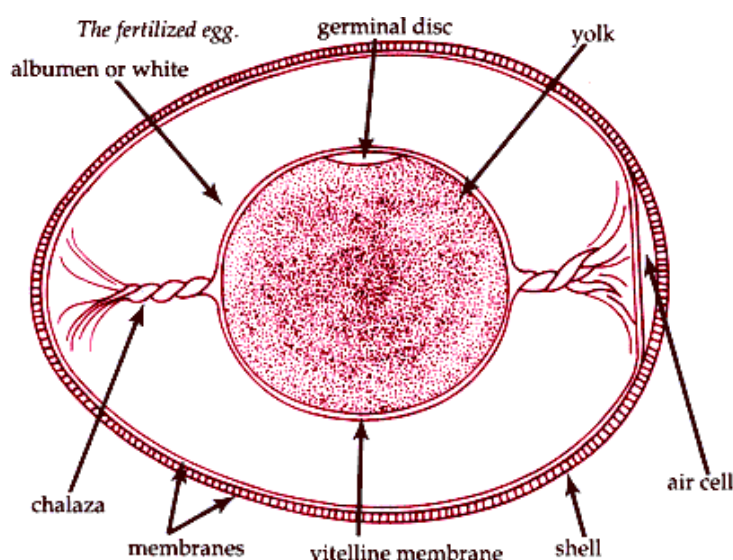
1. ปากแตร (funnel หรือ infundibulum) เป็นส่วนแรกของท่อนำไข่มีลักษณะแผ่บานออกคล้ายปากแตร ทำหน้าที่รองรับไข่ตก
2. magnum เป็นท่อนำไข่ที่ต่อจากส่วนแรก ทำหน้าที่ผลิตไข่ขาว (albumen) เพื่อเคลือบไข่แดง ที่เคลื่อนที่ผ่านมา
3. isthmus ทำหน้าที่ผลิตเยื่อเปลือกไข่ (shell membrane)
4. uterus เป็นส่วนที่สร้างเปลือกไข่ (shell) โดยที่ผนังเยื่อบุจะมีต่อมสร้างเปลือกไข่ (shell gland) อยู่มากมาย
5. vagina เป็นตำแหน่งที่ไข่จะมาพัก เพื่อรอเวลาปล่อยออกสู่ cloaca ต่อไป



ภาพที่ 2 อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของไก่

ที่มา: Ivarie (2003)

ไข่แดงที่ตกเข้าสู่ท่อหน้าไข่นั้นใช้เวลาอยู่ที่ infundibulum ประมาณ 15 นาที ถ้ามีการผสมพันธุ์กับเพศผู้ อสุจิจะมารออยู่ที่นี้ก่อนหน้าแล้ว การปฏิสนธิจะเกิดขึ้นก่อนแล้วจะเดินทางเข้าสู่ส่วน magnum ต่อไป ไข่ขาวที่ผลิตใน magnum จะห่อหุ้มไข่แดงเป็นชั้น ๆ ชั้นในสุดคือ chalaziferous layer (หรือ inner thick albumen) ซึ่งปลายด้านหนึ่งจะหมุนเป็นเกลียวตามเข็มนาฬิกา ส่วนด้านตรงข้ามนั้นหมุนทวนเข็มนาฬิกา เรียกขั้วทั้งสองด้านว่า chalazae ชั้นถัดมาได้แก่ inner thin albumen, thick albumen และ outer thin albumen ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ไข่ขาวมีส่วนประกอบของ thick albumen และ outer thin albumen ประมาณ 60% และ 25% ตามลำดับ ไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดได้แก่ ovalbumen 54%, conalbumen 13%, ovomucoid 11%, ovoglobulin 37%, lysozyme 3.5% และ ovomucin 2% โดยสาร ovomucin เป็นตัวที่ทำให้ไข่ขาวมีลักษณะคล้ายเจล



ภาพที่ 3 องค์ประกอบของไข่

ที่มา: <http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>

การสร้างไข่แดง

ไข่แดงไม่ใช่เซลล์สืบพันธุ์แต่เป็นแหล่งอาหารของเซลล์เล็ก ๆ ที่เรียกว่า "บลาสโตเดิร์ม" (Blastoderm) เมื่อไข่เข้าสู่วัยสาว ขนาดของรังไข่และท่อหน้าไข่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก โดยก่อนที่แม่ไก่จะวางไข่ฟองแรก 11 วัน การทำงานของระบบฮอร์โมนเพศจะเริ่มขึ้นโดยฮอร์โมน

FSH (follicle stimulating hormone) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะไปกระตุ้น ovarian follicle ให้มีการขยายขนาดขึ้น หลังจากนั้นรังไข่จะเริ่มสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และเทสโทสเตอโรน (testosterone) ทำให้เกิดการสะสมโปรตีนและไขมันในฟองไข่ ซึ่งส่งมาจากตับทางกระแสเลือดทำให้ไข่แดงสุก 1 – 2 วันต่อมาไข่แดงฟองที่ 2 จะเริ่มเจริญ เมื่อไข่แดงฟองแรกออกจากตัวแม่ไก่ ไข่แดงอีก 5 – 10 ฟองจะเข้ากระบวนการเจริญต่อไป ดังนั้นการที่ไข่แต่ละฟองสุกต้องใช้เวลา 10-11 วัน การสะสมสารต่าง ๆ ในไข่แดงจะช้ามากในระยะแรก แต่เมื่อเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ (ovum) ได้ 6 มิลลิเมตรไปแล้ว การสะสมสารต่าง ๆ จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เส้นผ่าศูนย์กลางจะเพิ่มขึ้นวันละ 4 มิลลิเมตร (ปฐม, 2541) การเกิดสีในไข่แดงเนื่องจากการสะสมสารแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ซึ่งเป็น carotenoid pigment ในอาหาร การสะสมจะเกิดขึ้นมากในช่วงกินอาหารทำให้มีสีเข้ม และจะสะสมน้อยในช่วงที่อดอาหารทำให้มีสีจาง การสะสมจะเริ่มสะสมจากชั้นนอกเข้าไปหาชั้นใน แถบเข้มและแถบสว่างในไข่แดงจะมี 7-11 ชั้น ตามระยะเวลาในการสร้างไข่

การตกไข่ (Ovulation)

ไข่ที่กำลังเจริญและขยายขนาดจะอยู่ภายในเยื่อบาง ๆ ที่เรียกว่า follicle ซึ่งแต่ละอันจะยึดอยู่กับก้านกระเปาะเล็ก ๆ ของรังไข่ที่เรียกว่า follicle stalk บริเวณผิวของถุงหุ้มไข่แดงจะมีเส้นเลือดแดงจำนวนมากมาหล่อเลี้ยง ยกเว้นตอนกลางของไข่ ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ถุงหุ้มไข่เกิดการฉีกขาด เรียกแนวนี้ว่า stigma เมื่อไข่แดงสุกรังไข่จะหลั่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไปที่สมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งส่งผลกระทบต่อปมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่งฮอร์โมน LH (leuteinizing hormone) มาที่รังไข่เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ทำให้ถุงหุ้มไข่เกิดการฉีกขาด (อาวูธ, 2538) ไข่ที่สุกจะตกลงสู่ท่อนำไข่ส่วนปากแตร ไข่ที่ตก (ovum) ประกอบด้วย เยื่อหุ้มไข่ (vitelline membrane) เซลล์สืบพันธุ์ (germinal disc) และส่วนประกอบของไข่แดง (yolk) การตกไข่ในครั้งแรก เกิดจากการกระตุ้นโดยระบบประสาทและฮอร์โมน (สุจินต์, 2532) การตกไข่ฟองต่อมาจะเกิดหลังจากการวางไข่ฟองแรก 15 – 40 นาที ไข่ในแต่ละชุดที่ตกไข่จะมี 4 – 6 ฟอง แม่ไก่ที่ไข่ดี ดับไข่จะยาว หลังจากเกิดการตกไข่แล้ว ยังต้องใช้เวลาในการสร้างไข่ขาว เยื่อหุ้มไข่และเปลือกไข่อีก 23 – 26 ชั่วโมง ถ้าแม่ไก่ใช้เวลาในการสร้างนานกว่า 24 ชั่วโมง จะทำให้การวางไข่ในแต่ละวันช้าลง และทำให้การตกไข่เกิดขึ้นช้าตามไปด้วย ไข่ที่วางในตอนบ่ายจะอยู่ในท่อนำไข่นานกว่าไข่ที่วางในตอนเช้าและหลังจากตอนบ่ายไปแล้วจะไม่เกิดการตกไข่ แม่ไก่ที่ดับไข่ยาวจะวางไข่ฟองแรกในตอนเช้า การตกไข่ฟองต่อมาจะเกิดขึ้นเร็ว ทำให้ช่วงเวลาที่แม่ไก่วางไข่เข้าไปในแต่ละวันสั้นลง (lag) เมื่อแม่ไก่เริ่มไข่ในช่วงสัปดาห์แรกการตกไข่จะไม่สม่ำเสมออาจตกไข่เพียง 2 – 4 ฟอง เนื่องจากระบบ

ฮอร์โมนยังไม่สมบูรณ์ และนอกจากนี้แม่ไก่ที่เริ่มไข่ใหม่ ๆ มักจะไข่แฝด เนื่องจากรังไข่ทำงานมากเกินไป มักเกิดไข่แฝดมากกว่าไข่ไข่

พันธุ์ไก่

ไก่ไข่

ไก่ไข่ที่เลี้ยงอยู่ในประเทศไทยได้มีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ไข่ดก กินอาหารน้อย ไข่ฟองโต และไข่ทน เริ่มให้ไข่เมื่ออายุ 5 เดือนครึ่ง – 6 เดือน ให้ไข่ปีละประมาณ 280 – 300 ฟอง (ไสว, 2546) พันธุ์ไก่ที่เลี้ยงอยู่ในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ ไก่พันธุ์แท้ ไก่พันธุ์ผสม และไก่ไฮบริด ลักษณะของไก่พันธุ์ต่าง ๆ มีดังนี้ (ธำรงค์ศักดิ์, 2531)

1. **ไก่พันธุ์แท้** เช่น ไก่พันธุ์เล็กฮอร์นขาว ไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์แดง และไก่พันธุ์บาร์พลีมัทรอค หรือพันธุ์บาร์
2. **ไก่พันธุ์ผสม** เป็นไก่ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างไก่พันธุ์แท้ 2 พันธุ์ โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ไก่ที่ไข่ดก เพื่อเป็นการผลิตไข่ในราคาที่ถูกลงที่สุด ส่วนมากแล้วการผสมไก่ประเภทนี้ ลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะบางอย่างที่ดีกว่าพ่อแม่พันธุ์ โดยเฉพาะความทนทานต่อโรค ไก่ลูกผสมที่ยังมีผู้นิยมเลี้ยงอยู่บ้าง ได้แก่ ไก่ลูกผสมระหว่างพ่อโร้ด+แม่บาร์, พ่อบาร์+แม่โร้ด, เล็กฮอร์น+โร้ด, โร้ด+ไฮบริด และลูกผสม 3 สายเลือด คือ ลูกตัวเมียที่ได้จากลูกผสมพ่อโร้ด+แม่บาร์ นำไปผสมกับพ่อไก่กู ลูกผสมที่ได้จะมีเนื้อดี โตเร็ว และไข่ดีพอสมควร เหมาะสำหรับนำไปเลี้ยงเป็นรายได้เสริม (ไสว, 2546)
3. **ไก่ไฮบริด** เป็นไก่พันธุ์ไข่ที่มีผู้นิยมเลี้ยงมากที่สุดในปัจจุบัน เป็นพันธุ์ไก่ที่ผสมขึ้นเป็นพิเศษ ซึ่งบริษัทผู้ผลิตลูกไก่พันธุ์จำหน่ายได้มีการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ไก่พันธุ์ที่ให้ผลผลิตไข่สูง และมีคุณภาพตามความต้องการของตลาด คือ ให้ไข่ดก เปลือกไข่สีน้ำตาล ไข่ฟองโต และไข่ทน ไก่ไฮบริดจะมีลักษณะเด่นประจำพันธุ์และมีข้อมูลประจำพันธุ์อย่างละเอียด เช่น อัตราการเจริญเติบโต เปอร์เซนต์การไข่ ระยะเวลาในการให้ไข่ ขนาดของแม่ไก่ อัตราการเลี้ยงรอด ขนาดของฟองไข่ สีของเปลือกไข่ ปริมาณอาหารที่กิน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ไก่ไฮบริดนี้ต้องเลี้ยงด้วยอาหารที่มีคุณภาพสูง มีการจัดการที่ถูกต้อง เช่น การควบคุมน้ำหนักตัว การควบคุมการกินอาหาร การควบคุมแสงสว่าง ตลอดจนการสุขาภิบาลและการป้องกันโรคที่ดี (ไสว, 2546)

ด้วยเหตุนี้ที่ไถ่ไอบริดส่วนใหญ่มีการผสมพันธุ์ที่ดำเนินการโดยบริษัทผลิตพันธุ์ไถ่ไอบริดเป็น การค้า ซึ่งจะรักษาไถ่ไอบริดพันธุ์และระบบการผสมพันธุ์ไว้เป็นความลับเพื่อผลประโยชน์ในทาง การค้า ไถ่ไอบริดจึงมีชื่อแตกต่างกันออกไปตามแต่บริษัทผู้ผลิตจะตั้งขึ้น ที่นิยมเลี้ยงกันใน ประเทศไทย ได้แก่ ดีคาร์บ, ซุปเปอร์ฮาร์โก้, เอ-เอบราวัน, เซฟเวอร์สตาร์ครีอส, เมโทรบราวัน เป็นต้น

ไถ่ไอบริดพันธุ์

ไถ่ไอบริดพันธุ์ รวมทั้งไถ่ไอบริดพันธุ์ต่าง ๆ มีต้นกำเนิดมาจากไถ่ไอบริดสีดง ที่อยู่ทวีปเอเชีย โดยเฉพาะ ประเทศอินเดีย และตอนใต้ของประเทศจีน ไถ่ไอบริดพันธุ์ (ธำรงค์ศักดิ์, 2535) ไถ่ไอบริดพันธุ์มีหลากหลาย สายพันธุ์ แต่ละพันธุ์ก็จะมีจุดเด่นเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว เช่น ความต้านทานโรคและแมลง สามารถเติบโต และขยายพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมการเลี้ยงดูของเกษตรกรในชนบท โดยเฉพาะ รายย่อย จึงเหมาะที่จะทำการอนุรักษ์และพัฒนาใช้ประโยชน์ (สวัสดี และคณะ, 2546) ไถ่ไอบริดพันธุ์ ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้น สามารถเพิ่มการเติบโตจากวันละ 9 กรัม เป็นวันละ 15 - 21 กรัม การให้ผลผลิตไข่ ก็สามารถเพิ่มผลผลิตจากเดิม 60 ฟองต่อปี เป็น 160 - 180 ฟองต่อปี และยังปล่อย เลี้ยงในชนบทได้ง่าย หากินง่าย ฝึกไข่ได้เอง (กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, 2547)

ไถ่ไอบริดสีดงมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ลักษณะประจำพันธุ์ คือ มีขนสีเหลือง ขาเหลือง หงอนมีสีเหลือง เลี้ยงง่าย โตเร็ว หากินเก่ง มีความทนทานต่อพยาธิ ปรับตัว เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เมื่อมีรสชาติดี ไถ่ไอบริดสีดงที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้ผลผลิตไข่ปีละ ประมาณ 150 ฟองต่อปี (กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, 2547)

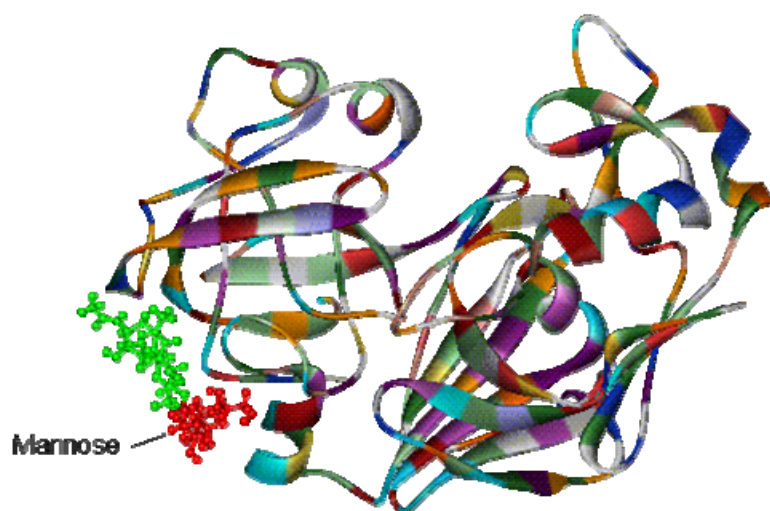
การไทเปซินติ (Cathepsin D; CTSD)

CTSD จัดเป็นโปรตีโอไลติก เอนไซม์ (proteolytic enzyme) ในกลุ่มของแอสพาร์ติล โปรตีเอส (aspartyl proteases) มีพันธะเปปไทด์ (peptide bond) คล้ายกับเปปซิน แต่พันธะเปปไทด์ ของ CTSD ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เช่น Phe-Phe, Phe-Tyr และ Leu-Tyr (Elkin *et al.*, 1995) CTSD ประกอบด้วยเอนไซม์สายเดี่ยว (single-chain) ขนาด 43 กิโล ดาลตัน และเอนไซม์สายคู่ (two-chain) ที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือสายสั้น (light chain) ขนาด 14 กิโลดาลตัน และสายยาว (heavy chain) ขนาด 34 กิโลดาลตัน (Westley and May, 1996) ซึ่งพบ เฉพาะใน CTSD ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนในสัตว์ปีกและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เป็นเอนไซม์

สายเดี่ยวที่มีขนาด 40 และ 43 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เนื่องจาก CTSD ของสัตว์ปีกและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำไม่มีบริเวณที่เกิด proteolytic processing ในลำดับเบสของ cDNA (Ito *et al.*, 2003)

CTSD เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (pH 5.0 – 5.8) โดยมากมักพบในไลโซโซม (lysosome) หลังจากสังเคราะห์ขึ้นจะถูกส่งไปยังเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ในรูปของ inactive pre-proenzyme ขนาด 52 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ที่ยังไม่สามารถทำงานได้ (inactive enzyme) หลังจากเข้าสู่กระบวนการตัดแปลงจะเปลี่ยนเป็น intermediate proenzyme ที่มีขนาด 48 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ (active enzyme) เมื่ออยู่ในรูปที่เจริญเต็มที่มีขนาด 32 กิโลดาลตัน จากนั้นจะถูกส่งเข้าสู่ไลโซโซม (Egberts *et al.*, 2004) CTSD มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรต่าง ๆ ภายในร่างกาย ประกอบด้วย การแตกตัวของโปรตีนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ กระบวนการตัดแปลง, การหลั่ง, และการกระตุ้นของเอนไซม์และฮอร์โมน (Brooks *et al.*, 1997) นอกจากนี้ CTSD ยังเป็นเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) หลักที่อยู่ในไลโซโซม ซึ่งสามารถทำงานร่วมกับเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) ตัวอื่น ๆ เช่น cathepsin A, B, C, H และ L โปรตีเอสเหล่านี้สามารถย่อยโปรตีนส่วนใหญ่ให้เป็นเปปไทด์ (peptide) และกรดอะมิโน (amino acid)

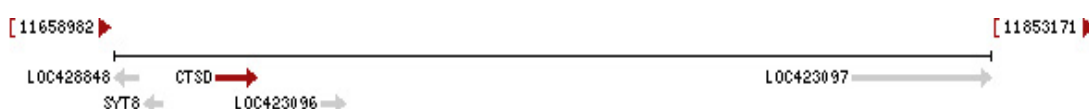
CTSD มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับแอสพาร์ติล โปรตีเอสตัวอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มของเปปซิน (pepsin family) กล่าวคือ มีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกับแอสพาร์ติล โปรตีเอสตัวอื่น ๆ แต่มี 2 ลักษณะที่แตกต่าง และสามารถใช้แยกความแตกต่างออกจากเอนไซม์อื่น ๆ ในกลุ่มของเปปซิน (Baldwin *et al.*, 1993) คือ CTSD มีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต ประกอบด้วยน้ำตาลหลายโมเลกุล (oligosaccharide) 2 ชนิด และหมู่ฟอสเฟต สำหรับใช้ในการกำหนดเป้าหมายของเอนไซม์นี้ไปยังไลโซโซมผ่านทางรีเซพเตอร์ที่เป็น mannose-6-phosphate (M6Pr) และ CTSD เป็นโปรตีนสายคู่ จนกระทั่งเข้าสู่กระบวนการ posttranslational ขณะที่แอสพาร์ติล โปรตีเอสชนิดอื่น ๆ เป็นเอนไซม์สายเดี่ยว (ภาพที่ 4) การชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ของ CTSD เริ่มจากสังเคราะห์เป็น proenzyme แล้วเปลี่ยนเป็น procathepsin D ที่ทำงานในไลโซโซม จากนั้นเปลี่ยนเป็น CTSD ที่เป็นสายเดี่ยวและเป็นเอนไซม์สายคู่ ตามลำดับ (Yonezawa *et al.*, 1988)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของคาร์แทปซิน (Cathepsin D)

ที่มา: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch5D5.htm>

สำหรับในสัตว์ปีก ยีน *CTSD* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5 (ภาพที่ 5) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างไข่แดง (yolk formation) โดยเอนไซม์ CTSD กระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ภายในโอโอไซต์ (oocyte) ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ เมื่อโอโอไซต์ได้รับพลาสมา (plasma) จากกลุ่มของโปรตีนผ่านทางรีเซพเตอร์ (receptor) ที่จำเพาะบนเยื่อหุ้มพลาสมา (plasma membrane) หลังจากที่ได้เข้าไปภายในโอโอไซต์แล้วกลุ่มของโปรตีนเหล่านี้จะแตกตัวออกเป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) หลาย ๆ ชนิด โดยมี CTSD เป็นตัวกระตุ้น โปรตีนหลักที่เข้าสู่โอโอไซต์ประกอบด้วยไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; VTG), ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก (very low density lipoprotein; VLDL) และไลโปฟอสโฟไกลโคโปรตีน (lipophosphoglycoprotein) การเจริญของโอโอไซต์ในสัตว์ปีกจะต้องได้รับโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) ซึ่งถูกสังเคราะห์และมีการขนส่งที่รวดเร็ว, จำเพาะและมีประสิทธิภาพผ่านทางเยื่อหุ้มพลาสมา ในระยะสุดท้ายของการพัฒนา เซลล์นี้ต้องได้รับโปรตีนอย่างน้อย 2 กรัมต่อวัน โปรตีนเหล่านี้ลำเลียงมาจากกระแสเลือดแล้วส่งเข้าไปในไข่แดง เพื่อเก็บรวมกับองค์ประกอบของไข่ขาวที่สร้างขึ้นในท่อนำไข่ สำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารหลักในการพัฒนาของเอ็มบริโอ และ CTSD ยังเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนไข่แดง (Shen *et al.*, 1993)



ภาพที่ 5 ตำแหน่งของยีน CTSD บนโครโมโซมคู่ที่ 5 ของไก่

ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

ไวเทลโลเจนนิน (Vitellogenin; VTG)

VTG จัดเป็นฟอสโฟไกลโคโปรตีน (phosphoglycoprotein) ขนาดใหญ่ มีขนาดประมาณ 200 – 700 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมอยู่กับฟอสเฟต และล้อมรอบด้วยไลปิดประมาณ 20% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นฟอสโฟไลปิด (phospholipids) (Sappington and Raikhel, 1998; Thomas *et al.*, 1998) ในสภาวะปกติมักเกิด oligomeric กับโมโนเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 1 – 4 หน่วย และมักกระจายเป็นไดเมอร์ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 ชนิด ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ขนาด 170 – 200 กิโลดาลตัน VTG แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ VTG I, VTG II (VTG หลักที่สำคัญในการสร้างไข่แดง) และ VTG III (Bergink and Wallace, 1973) โดยจะพบ VTG II มากที่สุด VTG แต่ละชนิดเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีมวลโมเลกุล 260,000, 246,000 และ 210,000 ตามลำดับ ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลาย ๆ ชนิด (Sun and Zhang, 2001) เช่น อะลานีน (Alanine; Ala), กรดกลูตามิก (Glutamic acid; Glu), กรดแอสพาร์ติก (Aspartic acid; Asp), เซอรีน (Serine; Ser), ลิวซีน (Leucine; Leu), วาลีน (Valine; Val) และ ไลซีน (Lysine; Lys) และยังประกอบด้วยฟอสฟอรัส 2% (Yamamura *et al.*, 1995) VTG ไม่ใช่โปรตีนเดี่ยว แต่จัดเป็นชุดโปรตีนขนาดเล็กที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นจากยีนหลาย ๆ ชนิด และเนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ จึงต้องเข้าสู่กระบวนการคัดแปลงภายใน hepatocyte หลังจากถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน หรือ post-translation ซึ่ง VTG ส่วนใหญ่ที่พบภายในเซลล์จะเป็นโพลีเปปไทด์ที่ไม่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (nonphosphorylation) แต่เฉพาะ VTG ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) เท่านั้นที่จะถูกปลดปล่อยออกมา VTG จะสังเคราะห์ขึ้นภายในตับ ตามการตอบสนองต่อการกระตุ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจน แล้วส่งไปยังกระแสเลือดเพื่อเข้าสู่รังไข่บริเวณที่มีโอโอไซด์ที่กำลังพัฒนา ดังแสดงในภาพที่ 6 กระบวนการชีวสังเคราะห์ของ VTG ประกอบด้วย Polypeptide synthesis, Glycosylation, Phosphorylation และ Secretion (Wang and Williams, 1982)

POLYPEPTIDE SYNTHESIS



GLYCOSYLATION



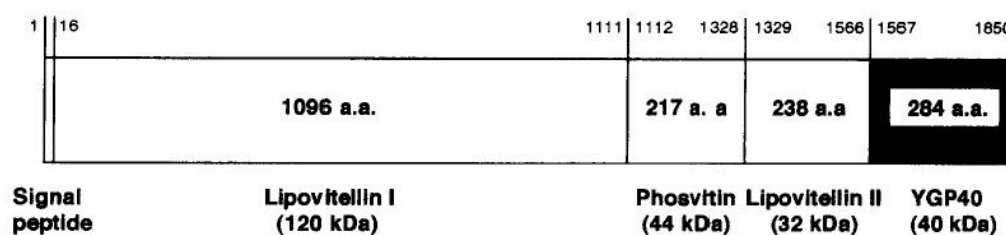
PHOSPHORYLATION



SECRETION

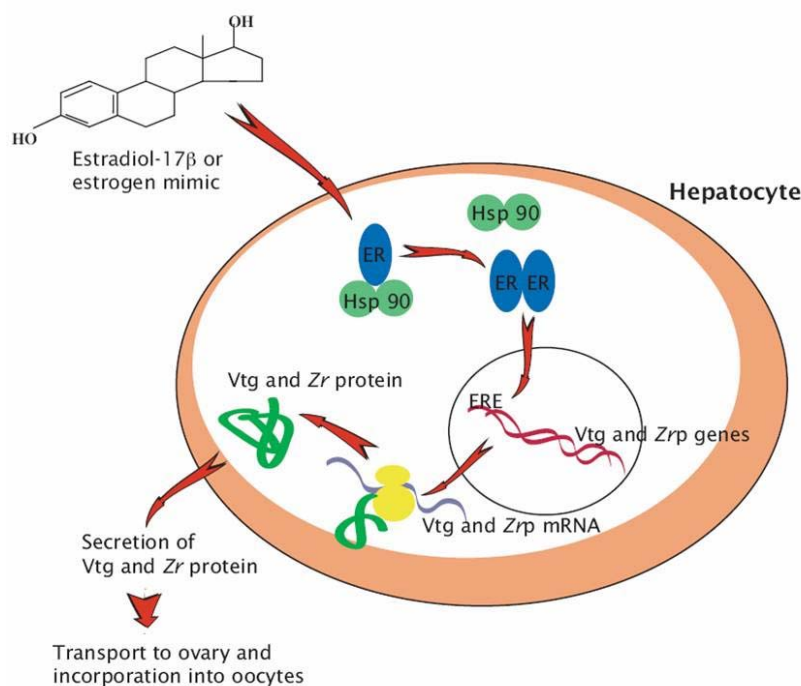
ภาพที่ 6 กระบวนการสังเคราะห์ VTG

หลังจากที่ VTG มีการเติมหมู่ฟอสเฟตอย่างสมบูรณ์ จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ตับ (hepatocyte) อย่างรวดเร็ว เพื่อเข้าสู่โอโอไซด์ (ภาพที่ 8) แล้วถูกย่อยออกเป็นฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) หลายชนิด ซึ่งประกอบด้วยไลโปไวเทลลิน-1 (lipovitellin-1), ไลโปไวเทลลิน-2 (lipovitellin-2) และฟอสไวทิน (phosvitin) ที่มีขนาด 120 กิโลดาลตัน, 32 กิโลดาลตัน และ 44 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Mullinix *et al.*, 1976; Ito *et al.*, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 7 โดยมี CTSD เป็นตัวกระตุ้น VTG มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด จึงจัดเป็นสารตั้งต้นในการสร้างไข่แดงของสัตว์ปีกและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการพัฒนาของเอมบริโอ



ภาพที่ 7 องค์ประกอบของโพลีเปปไทด์ที่ได้จากการแตกตัวไวเทลโลเจนิน

ที่มา: Yamamura *et al.* (1995)



ภาพที่ 8 การสังเคราะห์และหลั่งไวเทลโลเจนนินโดย hepatocyte

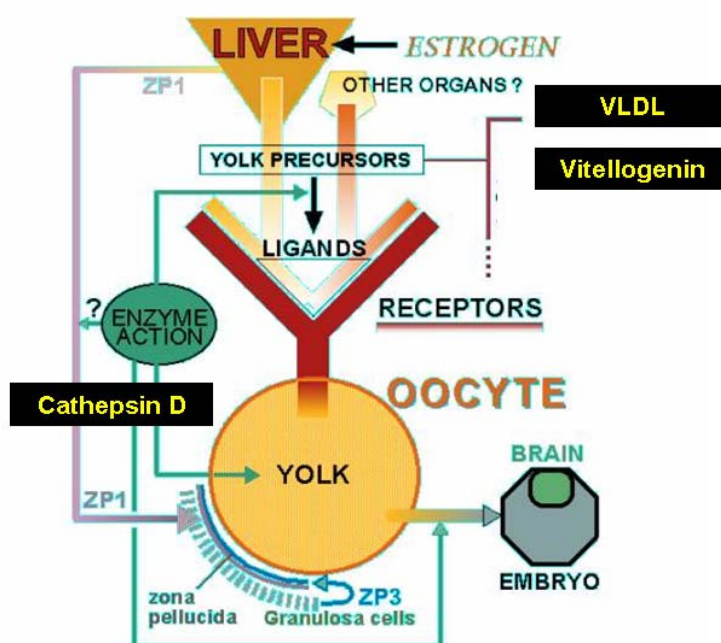
ที่มา: Arukwe and Goksøyr (2003)

บทบาทของคาร์เทปซินดี และไวเทลโลเจนนินในการสร้างไข่แดง

ระยะ oogenesis and embryogenesis ของสัตว์ปีก สฮอร์โมน FSH (follicle stimulating hormone) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าไปกระตุ้น ovarian follicle ให้มีการขยายขนาดขึ้น หลังจากนั้นรังไข่เริ่มทำงาน โดยสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และ เทสโทสเตอโรน (testosterone) ส่งผลต่อสะสมโปรตีนและไขมันในฟองไข่ ทำให้ไข่แดงสุก 1 – 2 วันต่อมา (ปทุม, 2541) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (Deeley *et al.*, 1976) ทำให้โอโอไซด์ในระยะนี้มีอายุอย่างรวดเร็ว (Tyler *et al.*, 1994) เข้าสู่ระยะ vitellogenesis ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างและสะสมไข่แดง ไข่แดงนี้มีทั้งที่สร้างภายในโอโอไซด์ และรับจากภายนอกซึ่งดับเป็นตัวสร้างแล้วปล่อยมาตามกระแสเลือด (Stifani *et al.*, 1990) โปรตีนเหล่านี้จัดเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการสร้างไข่แดง ส่วนใหญ่เป็นฟอสโฟไลโปโปรตีน (phospholipoprotein) ประกอบด้วย ไวเทลโลเจนนิน (vitellogenin; VTG), ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก (very low density lipoprotein; VLDL) และไลโปฟอสโฟไกลิโคโปรตีน (lipophosphoglycoprotein) (Vieira *et al.*, 1995) ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นในตับแล้วถูก

ปลดปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดตรงส่วนพลาสมา เพื่อส่งไปยังโอโอไซด์ในรูปของไลโปโปรตีน (lipoprotein) โดยผ่านทางรีเซพเตอร์ด้วยวิธีเอนโดไซโตซิส (receptor-mediated endocytosis) ปกติแล้วในไข่ไม่มีรีเซพเตอร์สำหรับไลโปโปรตีนอยู่ 2 ชนิด คือ รีเซพเตอร์ที่สร้างโดยเซลล์ร่างกาย (somatic cell) มีขนาด 130 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่ควบคุมและรับคอเลสเตอรอล (cholesterol) และรีเซพเตอร์ขนาด 95 กิโลดาลตัน ที่พบบนเยื่อหุ้มพลาสมาของโอโอไซด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรับสารตั้งต้นของการสร้างไข่แดงทั้ง 2 ชนิด (VTG, VLDL) จากพลาสมาไปยังไซโกต (Steyrer *et al.*, 1990) กลุ่มไข่แดงของไข่ไก่ที่ประกอบด้วยไลโปโปรตีนสองชนิดคือ VTG, VLDL จะจับกับรีเซพเตอร์โดยผ่านทางอะโพลีโพรตีน บี (Apolipoprotein B; apo B) (Nimpf *et al.*, 1988) ระหว่างที่มีการส่ง VTG และ VLDL เข้าไปในโอโอไซด์ องค์ประกอบของโปรตีนจะถูกตัดออกโดย CTSD และหลังจากที่เข้าสู่โอโอไซด์ ไลโปโปรตีนเหล่านี้จะถูกทำให้แตกตัวด้วยการกระตุ้นจาก CTSD (Retzek *et al.*, 1992; Elkin *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 2003) ทำให้ได้โพลีเปปไทด์ขนาดเล็กหลาย ๆ ชนิด กรดอะมิโน รวมทั้งโปรตีนไข่แดง (yolk protein) ซึ่งโพลีเปปไทด์ที่ได้จากการแตกตัวของไลโปโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไข่แดงจะเป็นแหล่งของกรดอะมิโน และพลังงาน ซึ่งเก็บไว้ร่วมกับโปรตีนไข่แดง และองค์ประกอบของไลปิดใน yolk platelets หรือ yolk spheres สำหรับให้เอมบริโอที่กำลังพัฒนาใช้เป็นแหล่งอาหารร่วมกับองค์ประกอบที่เป็นของเหลวที่อยู่ภายในอนุภาคของ VLDL ในระยะนี้โอโอไซด์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยการเพิ่มขนาดดังเช่น โอโอไซด์ของปลาเทราท์ (rainbow trout) เพิ่มขนาดจาก 0.5 มิลลิเมตร เป็น 5 มิลลิเมตร (Tyler *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1997) หรือมีปริมาตรมากขึ้นถึง 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร (cm³) (Retzek *et al.*, 1992) นอกจากนี้ VTG และ VLDL ยังส่งพลังงานในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerols)

ภายในโอโอไซด์ที่โตเต็มที่ของไข่ พบว่ามี yolk mass ที่ประกอบด้วย yolk spheres ที่รวมตัวกันแน่นและมีเยื่อหุ้ม มีส่วนประกอบ 2 ชนิด คือกลุ่มของแกรนูล (granules) ขนาด 11.4 นาโนเมตร และของแข็งที่มีอนุภาคขนาด 26.7 นาโนเมตร ไข่แดงที่ได้รับการผสมจะถูกล้อมด้วยถุงหุ้มไข่แดง (yolk sac) องค์ประกอบหลักของไข่แดงภายในไข่ประกอบด้วย VTG, ฟอสโฟกลีเซอรอล (phosphoglycerol), ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และคอเลสเตอรอล ไข่แดงเป็นส่วนที่มีการสะสมไลปิดมากที่สุดของเชื้อก่อพันธุ์ (germ cell) เพื่อเก็บเป็นแหล่งอาหารหลักของเอมบริโอเนื่องจาก yolk material ทั้งภายในและภายนอก endodermal cell มีลักษณะคล้ายกัน ทำให้ไข่แดงที่อยู่ภายนอกเซลล์สามารถเข้าสู่ endodermal cell ของถุงหุ้มไข่แดงด้วยวิธีฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และถูกย่อยโดยเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น CTSD, CTSB และ D หรือ alkaline และ acid phosphatases ที่อยู่ในถุงหุ้มไข่แดง เช่นเดียวกับสารตั้งต้นของไข่แดง (Yoshizaki *et al.*, 2004)



ภาพที่ 9 บทบาทในการสร้างไข่แดงของคาร์เทปซินดี และไวเทลโลเจนนิน

ที่มา: <http://www.meduniwien.ac.at/medbchmolgenwjsgroup/>

เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายขึ้นสั้น ๆ ซึ่งอยู่ในสารละลายร่วมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อน สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำมาโคลนก่อน การทำ PCR คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์โพลีเมอเรส (polymerase) ซ้ำกันหลาย ๆ รอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ

1. การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (Denaturation) โดยใช้ความร้อน (อุณหภูมิประมาณ 94 – 97 องศาเซลเซียส) ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบคลายเกลียวคู่ออกจากกันแยกเป็นสายเดี่ยว เพื่อทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

2. การจับของสายไพรเมอร์ (Primer annealing) โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (55 – 57 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอแม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (Primer extension) โดยใช้อุณหภูมิ 55 – 75 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ในขั้นตอนนี้ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายด้าน 3' ของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ดีเอ็นเอสายใหม่

การสังเคราะห์จะดำเนินไปทั้ง 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 – 30 รอบ ($n = 20 - 30$) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขึ้นเป็นปริมาณ 2^n (สุรินทร์, 2545ข)

องค์ประกอบของเทคนิค PCR

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ หรือดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ สัตว์ พืช สิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ และเป็นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสแล้ว สามารถใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวและสายคู่ แต่ดีเอ็นเอที่เป็นวงกลมจะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณน้อยกว่าดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง

2. ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้น ๆ หรือไพรเมอร์ (Primer) มีความยาวประมาณ 18 – 30 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 2 สาย สายหนึ่งเรียก ไพรเมอร์เอฟ (forward primer) และอีกสายหนึ่งเรียก ไพรเมอร์อาร์ (reverse primer) แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับสายดีเอ็นเอแม่แบบแต่ละสาย และสามารถจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้าง (flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ไพรเมอร์ควรมีองค์ประกอบของเบส C และ G อยู่ระหว่าง 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ทั้ง 2 ควรมีส่วนประกอบของเบส G + C เท่ากัน เพื่อให้ค่า T_m เท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะปลายทั้ง 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) ทั้งภายในไพรเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด การออกแบบไพรเมอร์ที่ดีจะช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตที่ได้ และลดการเพิ่มปริมาณในส่วนที่ไม่ต้องการ

3. **Deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs)** ประกอบด้วย deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP), deoxycytidine triphosphate (dCTP) และ deoxythymosine triphosphate (dTTP) ปริมาณของ dNTPs แต่ละชนิดในปฏิกิริยาจะต้องเท่ากัน ควรมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 50 – 200 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละ dTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว ควรมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 ไมโครโมลาร์ ถ้ามีความเข้มข้นสูงเกินไป อาจก่อให้เกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด

4. **DNA polymerase I** ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ (DNA template) เป็นตัวกำหนดลำดับโมเลกุลของ dNTPs โดยเชื่อมโมเลกุลด้านปลาย 3' อิสระ ทำให้มีการเพิ่มความยาวของดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทาง 5' ไป 3' ถ้าใช้เอนไซม์ DNA polymerase จาก *E. coli* หรือจากเซลล์อื่น เมื่อทำให้สายดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสียสภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงในปฏิกิริยาทุกรอบของการสังเคราะห์ ต่อมามีการค้นพบ *Taq* DNA polymerase จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ที่สามารถทนความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส จึงนิยมใช้ในการทำ PCR (สุรินทร์, 2545ข)

5. **สารละลายบัฟเฟอร์** เป็นสารที่ทำหน้าที่เร่งการทำงานและรักษาสภาพของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ประกอบด้วย

5.1 แมกนีเซียมไอออน ช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ แมกนีเซียมไอออนจะทำหน้าที่เป็น co-factor และยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ anneal ของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนต้องปรับให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะของแมกนีเซียมไอออนคือต้องเหลือแมกนีเซียมในรูปอิสระประมาณ 0.5 – 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยทั่วไปมักใช้แมกนีเซียมความเข้มข้น 0.5 – 2.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่าแมกนีเซียมไอออนก็ช่วยให้ไพรเมอร์มีการ anneal ที่มีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

5.2 สาร KCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

5.3 Tris-HCl ความเข้มข้น 10 – 15 มิลลิโมลาร์

เทคนิค Reverse Transcriptase – PCR (RT-PCR)

RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ Complementary DNA (cDNA) จาก mRNA และใช้ในการพ่นคิ่นและโคลน (clone) ปลาย 5' และ 3' ของ mRNAs สำหรับสร้าง cDNA library ที่มีขนาดใหญ่จาก mRNA ที่มีปริมาณน้อยมาก นอกจากนี้ RT-PCR ยังสามารถปรับเพื่อใช้ระบุการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง (mutation) และ โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ในการลอกรหัส และเพื่อวัดความสามารถในการแสดงออกของยีนเมื่อมี mRNA ในปริมาณที่จำกัด หรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายที่สนใจแสดงออกในระดับที่ต่ำมาก (Sambrook *et al.*, 2001) หลักการของเทคนิค RT-PCR จะเป็นการเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้กลับเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ RNA – dependent DNA polymerase ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก ส่วนในการสังเคราะห์ cDNA สายที่สองจะใช้ deoxyoligonucleotide primer และ DNA – dependent DNA polymerase ซึ่ง cDNA ที่ได้จากการลอกรหัสมาจาก mRNA เป็นส่วนของยีนที่ไม่มีอินตรอน (intron) เพราะ mRNA ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ได้ผ่านการตัดแต่งเอาอินตรอนออกแล้ว (สุรินทร์, 2545ข) หลังจากนั้นนำเอาดีเอ็นเอที่ได้เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ cDNA ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง อาจออกแบบไพรมเมอร์ให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายที่สนใจ หรือสามารถจับได้กับ mRNAs ทั้งหมด ซึ่งไพรมเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยเทคนิค RT-PCR แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ (Sambrook *et al.*, 2001)

1. **ไพรมเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีนนั้น** (gene specific primer; GSP) ในการสังเคราะห์ cDNA สามารถใช้ antisense oligonucleotide ที่เข้าจับอย่างจำเพาะเจาะจงในบริเวณที่ต้องการของอาร์เอ็นเอเป้าหมาย หรือกลุ่มของ mRNAs การเพิ่มปริมาณ cDNA ในส่วนที่ต้องการอาจใช้ sense และ antisense oligonucleotide primer ที่สอดคล้องกับลำดับเบสที่จำเพาะใน cDNA และเพื่อให้ได้ความจำเพาะเจาะจงมากที่สุดควรออกแบบให้ antisense primer อยู่บริเวณ upstream ของ oligonucleotide ที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA
2. **Oligo (dT)** ที่เข้าจับปลาย poly (A)⁺ ของ mRNAs ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถใช้เป็นไพรมเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก
3. **random hexamer primer** สามารถเข้าจับกับอาร์เอ็นเอที่เป็นแม่แบบได้หลาย ๆ จุด ทำให้ประชากรทั้งหมดของโมเลกุล mRNA มีชิ้นส่วนขนาดสั้น ๆ จะนำไปใช้ประโยชน์เมื่อ mRNA เป้าหมายมีขนาดยาวมาก ๆ หรือประกอบด้วยโครงร่างทุติยภูมิ (secondary structure) จำนวนมาก

จนไม่สามารถใช้ Oligo (dT) หรือ gene specific primer ในการสังเคราะห์ cDNA เพราะ mRNA ทั้งหมดในกลุ่มประชากรสามารถใช้เป็นแม่แบบได้

การสังเคราะห์ cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบ เริ่มจากการแยก RNA ทั้งหมดจากเนื้อเยื่อและใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก โดยไม่จำเป็นต้องแยก mRNA จาก RNA ทั้งหมดก่อน อาศัยกระบวนการ reverse transcription จากปฏิกิริยาของ enzyme reverse transcriptase (RT) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นที่หนึ่งจากปลายด้าน 3' ของอาร์เอ็นเอ เริ่มต้นจาก Oligo dT primer สำหรับอาร์เอ็นเอที่มี Poly (A) tail ที่ปลาย หรือ Random hexa – nucleotide primer สำหรับอาร์เอ็นเอที่ไม่มี Poly (A) สายดีเอ็นเอเส้นที่หนึ่งที่ถูกสังเคราะห์นี้มักเกิดการโค้งกลับของปลาย 3' ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า 3' Hairpin ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ของการสร้างดีเอ็นเอเส้นที่สองโดยปฏิกิริยาของ Klenow DNA polymerase ได้ ดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขั้นนี้ จะประกอบด้วยดีเอ็นเอสองเส้น (+ และ -) ที่มีเบสคู่กัน หลังจากนั้นย่อยอาร์เอ็นเอออกโดยใช้ด่างให้เหลือเฉพาะ cDNA สายเดียวที่มีปลาย 3' วงกลับมาคล้ายตะขอ จึงสามารถสังเคราะห์ cDNA อีกสายโดยไม่ต้องใช้ไพรเมอร์ ซึ่งจะถูกละลายออกได้โดยใช้ S_1 nuclease นอกจากนี้วิธีการเตรียม cDNA ที่ทำเป็นขั้นตอน โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นที่หนึ่งและตามด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นที่สอง ยังอาจทำปฏิกิริยารวมโดยใช้วิธีการเตรียมโดยตรงจากอาร์เอ็นเอ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) (ศกรณ์ และ พัฒนา, 2536)

เอนไซม์ reverse transcriptase ทำงานโดยสามารถสร้างสายดีเอ็นเอได้ทั้งจากแม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ โดยทั่วไป RT ที่ใช้ในงาน cDNA เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจาก retroviruses สองตัว คือ Avian myeloblastosis (AMV) และ Moloney leukemia virus (MMIV) ซึ่ง RT จากไวรัสทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการสร้าง cDNA ไม่แตกต่างกัน โดยขั้นตอนนี้อาจใช้ไพรเมอร์ที่เป็น gene specific primer (GSP) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการสร้างสาย cDNA ที่จำเพาะที่สุด หรือจะใช้ Oligo (dT) primer ซึ่งการใช้ไพรเมอร์ประเภทนี้จะมีอาร์เอ็นเอจำเพาะที่เป็น Poly (A)⁺ RNA เท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบในการสร้างสาย cDNA หรือการใช้ Random primer เป็นไพรเมอร์ที่ไม่มีความจำเพาะ จึงสามารถเข้าจับกับอาร์เอ็นเอทุกชนิด ดังนั้น cDNA ที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายมากที่สุด ขั้นตอนสุดท้ายในการทำ PCR โดยอาศัยแม่แบบจาก cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาแล้ว โดยสร้างสายดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่มีลักษณะรูปแบบการทำเหมือน PCR ธรรมดา ซึ่งจะได้สายดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนมากมายจากสายอาร์เอ็นเอตั้งต้น (Gibthai Co.Ltd, 2005)

การสังเคราะห์ cDNA สายแรก แล้วใช้เอนไซม์ S₁ nuclease ตัดปลายด้านที่ปิดให้เปิดออก อาจจะมีประสิทธิภาพไม่ค่อยดีนัก และทำให้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดสั้นลงหรือมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน นำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเออื่นได้ยาก ต่อมาจึงได้มีการนำเอนไซม์ RNase H มาใช้แทนต่าง ซึ่งเอนไซม์นี้จะตัดอาร์เอ็นเอแบบสุ่มภายในสายแล้วจึงใช้อาร์เอ็นเอที่ยังเกาะอยู่กับ cDNA สายแรก เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA สายที่สอง (สุรินทร์, 2545) ในปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ที่ถูกกำจัดเอาการทำงานของเอนไซม์ RNase H ที่สามารถย่อยอาร์เอ็นเอ ต้นแบบได้ออกไป จึงทำให้ได้สาย cDNA ที่สมบูรณ์มากขึ้น นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังมีคุณสมบัติที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้เพิ่มความจำเพาะ และเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเมื่อนำไปทำ PCR ต่อไปได้มากขึ้น และยังมีประโยชน์กับแม่แบบที่มี GC เป็นองค์ประกอบมาก ซึ่งก่อให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งขวางกั้นไม่ให้เอนไซม์ reverse transcriptase ทำงานหรือไพรเมอร์มาจับกับแม่แบบได้ การทำ RT-PCR ที่อุณหภูมิสูง ๆ จะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ (Gibthai Co.Ltd, 2005)

การสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA เป็นกระบวนการที่ต้องการความละเอียดรอบคอบ และต้องระมัดระวังมาก เนื่องจาก mRNA มีช่วงอายุสั้นและถูกย่อยสลายไปได้ง่ายถ้ามีการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase ปกติแล้วประมาณ 90% ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อเป็น rRNA และ tRNA ส่วน mRNA มีอยู่น้อยมาก เมื่อนำมาใช้สังเคราะห์ cDNA ผลผลิตของ cDNA ที่ได้ยิ่งต่ำลงอีก และอาจได้ cDNA ไม่ครบตามชนิดของ mRNA โดยเฉพาะ mRNA ที่มีปริมาณน้อย ๆ ในเนื้อเยื่อ จึงมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA เพื่อให้ได้ผลผลิตของ cDNA สูงขึ้น

เทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP เป็นวิธีตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) จากดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้นดีเอ็นเอ (point mutation) หรือ Single nucleotide polymorphism (SNPs) นิยมใช้ในการศึกษา point mutation detection จากสายดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จากขนาดและไม่รู้ลำดับเบสด้วยวิธีทางกายภาพ จึงไม่ต้องทำการหาลำดับเบส (DNA sequencing) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ถ้ามีลำดับเบสภายในสายดีเอ็นเอต่างกันเพียง 1 เบส และการเปลี่ยนแปลงของเบสเกิดในบริเวณที่ไม่มีเอนไซม์ตัดได้ หรือการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ไม่ทราบแน่ชัด ก็สามารถแยกความแตกต่างได้ เทคนิค SSCP มีขั้นตอนหลักอยู่ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR, การแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (denature) และการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอสายเดี่ยวบน Nondenaturing

Polyacrylamide Gel โดยเทคนิค SSCP จะอาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็นโครงร่างที่จำเพาะ หรือมี conformation ที่จำเพาะ ขึ้นอยู่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอสายนั้น ซึ่งจัดเป็นโครงสร้างขั้นทุติยภูมิ (secondary structure) ที่เกิดจากอิทธิพลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของไอออนต่าง ๆ จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟริซิสบน Nondenaturing Polyacrylamide Gel โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันเพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงสร้างที่แตกต่างกัน ส่งผลให้การเคลื่อนที่บนเจลในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟริซิสเร็วช้าต่างกัน (สุรินทร์, 2545ก) นอกจากนี้ปัจจัยในการเคลื่อนที่และโครงสร้างของดีเอ็นเอแล้วยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ส่วนประกอบของเจล acrylamide และอุณหภูมิที่ใช้ และพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการทำ SSCP คือความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ที่อุณหภูมิห้อง และมีกลีเซอรอลอยู่ภายในเจลร้อยละ 5

การตรวจหาความแตกต่างของลำดับเบส มีอยู่หลายวิธี ได้แก่ RNase cleavage, chemical cleavage, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Heteroduplex Analysis (HA) และ Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ซึ่ง SSCP เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากขั้นตอนง่าย ไม่ยุ่งยาก และมีข้อได้เปรียบดังนี้

1. เป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการปฏิบัติงานไม่ยุ่งยาก จำนวนขั้นตอนมีน้อย
2. มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความแตกต่างสูง โดยเฉพาะในสายดีเอ็นเอที่มีความยาวน้อยกว่า 220 คู่เบส และยิ่งความยาวของสายดีเอ็นเอสั้นลง ประสิทธิภาพในการตรวจสอบจะยิ่งมากขึ้น
3. ไม่มีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย โดยเฉพาะในขั้นตอนการย้อมสีดีเอ็นเอ
4. ต้นทุนในการปฏิบัติงานต่ำ อุปกรณ์ที่ใช้เป็นอุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ทั่ว ๆ ไป
5. ไม่มีความจำเป็นต้องใช้ heterozygous และ homozygous ในการเปรียบเทียบอย่างวิธี HA
6. ไม่ต้องใช้ formamide และ urea ในแผ่นเจล

SSCP ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง อาทิเช่น ประสิทธิภาพในการตรวจสอบจะลดลงถ้าสายดีเอ็นเอมีขนาดยาวขึ้น ความไวของการตรวจ SSCP ขึ้นกับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการ เนื่องจาก

เป็นการตรวจหาความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับแตกต่างกันเพียง 1 เบส อาจแก้ไขโดยการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) ก่อนที่จะนำไปทำ SSCP และประสิทธิภาพในการตรวจจะต่ำถ้าเกิด mutation แบบ transversion ($G \rightarrow C$, $C \rightarrow G$) และปริมาณตัวอย่างที่ได้มามีค่อนข้างน้อย ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ จึงได้มีการผนวกเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาร่วมในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งจะมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่สนใจในการตรวจก่อน แล้วจึงนำเอา PCR product ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อด้วย SSCP จึงเรียกว่า PCR-SSCP

การประยุกต์ใช้ PCR-SSCP

เนื่องจาก PCR-SSCP เป็นเทคนิคที่ง่ายไม่ซับซ้อนและมีศักยภาพในการตรวจพบความเปลี่ยนแปลงหรือความแตกต่างที่เกิดภายในสายดีเอ็นเอ จึงเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานด้านต่าง ๆ เช่น (วีระพงศ์, 2539)

- การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนต่าง ๆ ในโรคทางพันธุกรรม และโรคมะเร็ง
- ใช้ในการศึกษา DNA polymorphism และการทำ genetic mapping
- ประยุกต์ใช้ในการทำ competitive PCR
- ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส เช่น Epstein-Barr virus
- ใช้ในการตรวจหาเชื้อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

- | | | |
|-----|--------------------------|--------|
| 1.1 | ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า | 30 ตัว |
| 1.2 | ไก่สามเหลือง | 30 ตัว |

ถูกเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมและการจัดการ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดไก่

ไก่ถูกเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณเส้นเลือดปีก (wing vein venipuncture) โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 ปริมาตร 0.5 – 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน tube ที่มีสาร EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ในอัตราส่วน 1.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว และนำเลือดที่เจาะแช่น้ำแข็งทันที จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอก่อนนำไปใช้งาน

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่

ก่อนการสกัดดีเอ็นเอให้ทำการละลายเลือดตัวอย่างโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเลือดจะเปลี่ยนสภาพจากที่แข็งตัวกลายเป็นของเหลว คูดตัวอย่างเลือด 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ใหม่ เติม lysis buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม proteinase K 50 ไมโครกรัม แล้ว vortex ให้เข้ากัน จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เติม phenol : chloroform : isoamyl (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้ว vortex ให้เข้ากัน นำไป centrifuge ที่ 300 rpm นาน 10 นาที คูดส่วนใสด้านบนใส้หลอด microcentrifuge tube ใหม่ เติม 95% ethanol ที่เย็นจัด

ประมาณ 2 เท่าของส่วนใสที่ดูมา เอียงหลอดไปมาเบา ๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอลอยอยู่ จุดของเหลวใสทิ้งแล้วล้างด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง เติม TE buffer 100 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอละลายหมด เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งาน

3. การเก็บตัวอย่างตับไก่

ชิ้นส่วนตัวอย่างตับที่ได้จากไก่แต่ละตัว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน เพื่อรักษาสภาพอาร์เอ็นเอ

4. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่อจากตับไก่มาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy; Qiagen) บดตัวอย่างตับประมาณ 10 – 30 มิลลิกรัม เติม liquid nitrogen บดให้ละเอียดด้วย แล้วใส่ลงใน microcentrifuge tube ใหม่ เติม liquid nitrogen ที่เย็นจัด ปล่อยให้ liquid nitrogen ระเหย เติม Buffer RLT ที่ประกอบด้วย β – mercaptoethanol (β – ME) เข้มข้น 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร แล้ว homogenized ให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงใน microcentrifuge tube ใหม่ (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) เติม 70% ethanol 1 เท่าของส่วนใสที่ดูมา เพื่อปรับสภาพอาร์เอ็นเอให้จับกับแผ่นกรองดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต แล้วใส่ลงใน RNeasy column (Qiagen) นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งส่วนใสล้าง column ด้วย Buffer RW1 และ Buffer RPE นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ RNeasy silica – gel membrane แห้ง แล้วย้าย RNeasy column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ใหม่ แล้วเติม RNase – free water ลงใน silica – gel membrane แล้ว centrifuge ที่ 10,000 เป็นเวลา 1 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

5.1 ตรวจสอบการเรียงแถบบน Agarose gel

นำดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำ electrophoresis ใน agarose gel แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ของแลมด้าดีเอ็นเอ (lambda DNA) ที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/

มิลลิลิตร, 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 70 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบใช้สารละลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dry จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลง agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8% ซึ่งเป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ใน 0.5X TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide; EtBr) ที่มีความเข้มข้น 10 กรัม/น้ำ 1000 มิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet; UV) โดยเครื่อง Gel document แล้วถ่ายรูปเก็บไว้

5.2 ตรวจสอบการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer

การตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (สุรินทร์, 2545ก) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ 2 ไมโครลิตรต่อน้ำ 98 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าความเข้มข้น, OD_{260} และค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280}

สารละลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบปริมาณ, คุณภาพ และความเข้มข้นแล้ว จะถูกนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้งานในขั้นต่อไป

6. การสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse Transcription – Polymerase chain reaction (RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้มาสังเคราะห์เป็น cDNA โดยใช้ oligo(dT)₁₈ (Fermentas) เป็นไพรเมอร์ และใช้เอนไซม์ RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) เป็น reverse transcribed ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรกประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม

- สารละลาย RNA ความเข้มข้น 30 นาโนกรัม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
- สารละลาย oligo(dT)₁₈ เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- น้ำกลั่น ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

2. incubate ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที
3. หลังจากนั้นเติม
 - สารละลาย 5X reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
 - สารละลาย dNTP เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
 - สารละลาย Ribonuclease Inhibitor เข้มข้น 40 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
 - Diethylpyrocarbonate (DEPC) – treated water ปริมาตร 10.5 ไมโครลิตร
4. incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
5. เติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase เข้มข้น 200 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
6. หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วางบนน้ำแข็งทันที

จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ ตามวิธีของ Sambrook *et al.*; 2001

7. การเพิ่มปริมาณยีน *Cathepsin D* และ ยีน *Vitellogenin II* ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

7.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ที่ใช้ถูกออกแบบโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) จากการพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cathepsin D* และ *vitellogenin II* ของไก่ *Gallus gallus* จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ดังต่อไปนี้แสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น *CTSD* และชิ้น *VTG II*

Gene	Region	Sequence (5' – 3')	Position	Product size (bp)
<i>Cathepsin D</i>	5' flanking region	TGC TTT AGG GGG TGT AGT GC	-86	194
		ACT GGG TGA TGG CGT TCA T	279	
	coding sequence	ACT CAT GCT AGG TGG GAA GC	1,106	223
		AGG CGC TTA GAC ACA TTT GG	1,328	
<i>Vitellogenin II</i>	5' end region	AAT CTA GGA AAG CAA GTA GCA C	-234	261
		CTT TTA TGG AAG AAT GTT CAG G	-494	
	coding sequence exon 4	GTT TCA CCC GGC TCT TCA AA	1,860	216
		CAG AAC GCA TCC TTT CAG CA	2,075	
	coding sequence exon 27	GCT TTT CGC TCC ATT GTA GG	13,343	169
		ACC TCA CCA TTC AAC CAC TG	13,511	

ส่วนของยีน *CTSD* จะออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ จากยีน prepro-cathepsin D (accession number S49650) โดยไพรเมอร์คู่แรกถูกใช้เพิ่มปริมาณยีนส่วน 5' flanking region จากตำแหน่งเบสที่ 86 ถึง 279 มีขนาด 194 คู่เบส และมีค่า Tm ประมาณ 62 องศาเซลเซียส และเพิ่มปริมาณส่วน coding sequence จากตำแหน่งเบสที่ 1,106 ถึง 1,328 ให้มีขนาด 223 คู่เบส และมีค่า Tm ประมาณ 60 องศาเซลเซียส

ส่วนของยีน *VTG II* จะออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ คู่แรกจากยีน Gallus gallus 5' end region of major vitellogenin ที่มี accession number X00204 ให้เพิ่มปริมาณส่วนของ 5' end region ให้มีขนาด 261 คู่เบส จากตำแหน่งเบสที่ 234 ถึง 494 และมีค่า Tm ประมาณ 54 องศาเซลเซียส คู่ที่ 2 และ 3 จากยีน Chicken vitellogenin II ที่มี accession number X13607 ให้เพิ่มปริมาณส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 ให้มีขนาด 216 คู่เบส จากตำแหน่งเบสที่ 1,860 ถึง 2,075 และมีค่า Tm ประมาณ 56 องศาเซลเซียส และเพิ่มปริมาณบริเวณ exon 27 ให้มีขนาด 169 คู่เบส จากตำแหน่งเบสที่ 13,343 ถึง 13,511 และมีค่า Tm ประมาณ 56 องศาเซลเซียส ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

7.2 ปฏิกริยา PCR

นำดีเอ็นเอ และ cDNA ที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีนส่วนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนนั้น เตรียมส่วนผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทุกขั้นตอนในการเตรียมสารละลายต้องทำในภาชนะแห้ง ส่วนผสมประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัม หรือสารละลาย cDNA ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
2. สารละลาย 10X PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
3. สารละลาย $MgCl_2$ เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.6 ไมโครลิตร
4. สารละลาย dNTP เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร
5. สารละลายไพรเมอร์ (forward + reverse) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
6. สารละลาย *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.16 ไมโครลิตร

7. น้ำกลั่น (de – ionized) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9.44 ไมโครลิตร

จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermocycles โดยกำหนดอุณหภูมิภายในเครื่องดังนี้

1. ขั้นตอน Pre – PCR เป็นขั้นตอนการเตรียมสารละลายก่อนทำ PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2. จากนั้นตั้งการเปลี่ยนอุณหภูมิต่อรอบดังนี้

2.1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

2.2 อุณหภูมิ 59 – 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

2.3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

2.4 แล้วทำซ้ำตามข้อ 1 – 3 จำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 2.2 ของยีน *CTSD* ส่วน 5' flanking region และส่วน coding sequence ใช้ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 45 วินาที ตามลำดับ ส่วนยีน *VTG II* ส่วน 5' end region ขั้นตอนที่ 2.2 ใช้อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ยีน *VTG II* บริเวณ exon 4 และ exon 27 ขั้นตอนที่ 2.2 ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 45 วินาที ตามลำดับ และขั้นตอนที่ 2.3 ของยีน *VTG II* บริเวณ exon 27 เพิ่มเวลาเป็น 1 นาที 15 วินาที

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ PCR จะเก็บรักษาผลผลิต (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน *CTSD* และยีน *VTG II* จากปฏิกิริยา PCR โดย agarose electrophoresis

ผลผลิต PCR (PCR product) จำนวน 3 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงใน 2% agarose gel ซึ่งเป็นตัวกลางสำหรับเคลื่อนที่ของสารละลายดีเอ็นเอใน 1X TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลย้อมด้วย EtBr เข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเครื่อง gel document แล้ว

ถ่ายรูปเก็บไว้ ตัวอย่าง PCR ถูกเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ของ ladder ขนาด 100 คู่เบส

9. การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

ผลผลิต PCR ถูกเจือจางด้วย SSCP loading buffer (60% formamide, 10 mM NaOH, 0.09% bromophenolblue, 0.09% xylene cyanol) อัตราส่วน 1:1 และ denature ผลผลิตดังกล่าวที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยวางในถาดน้ำแข็ง นำตัวอย่างดีเอ็นเอหยดลงใน 8% nondenaturing polyacrylamide gel ประมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาทำ electrophoresis ใน 1X TBE buffer ด้วยเครื่อง Hoefer SE 600 Series (Amersham Pharmacia Biotech) กระแสไฟฟ้า 12 วัตต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

10. การหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีนที่ได้จากปฏิกิริยา PCR

กลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 คู่ ยีน *CTSD* ส่วน 5' flanking region ตำแหน่งเบสที่ 86 ถึง 279 และยีน *VTG II* ส่วน 5' end region ตำแหน่งเบสที่ 234 ถึง 494 จากไก่สายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง โดยใช้ PCR product ที่นำไปทำให้บริสุทธิ์ (ภาคผนวก) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสจากยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

11. การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม BioNumerics version 4.50 (Applied Maths) แล้วเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น จากวิธี SSCP ในไก่ทั้งสองชนิด

ผลและวิจารณ์

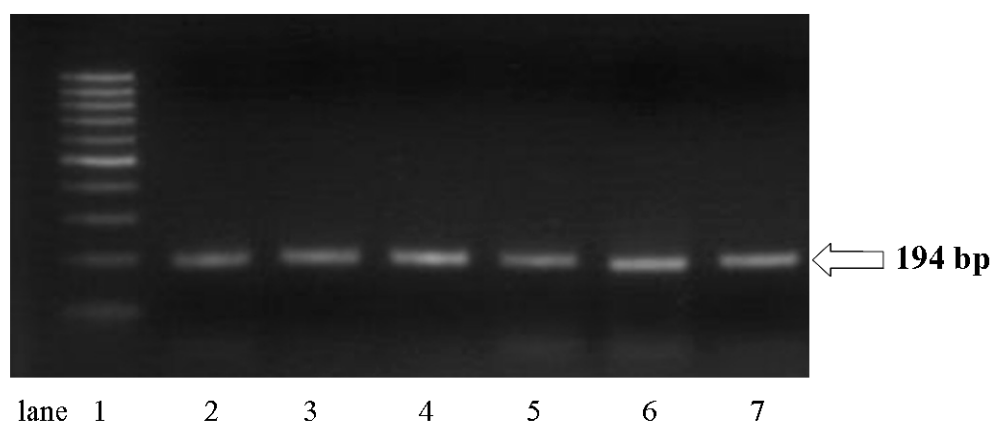
ผล

ผลการเพิ่มปริมาณยีน *CTSD* และยีน *VTG II* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ยีน *CTSD*

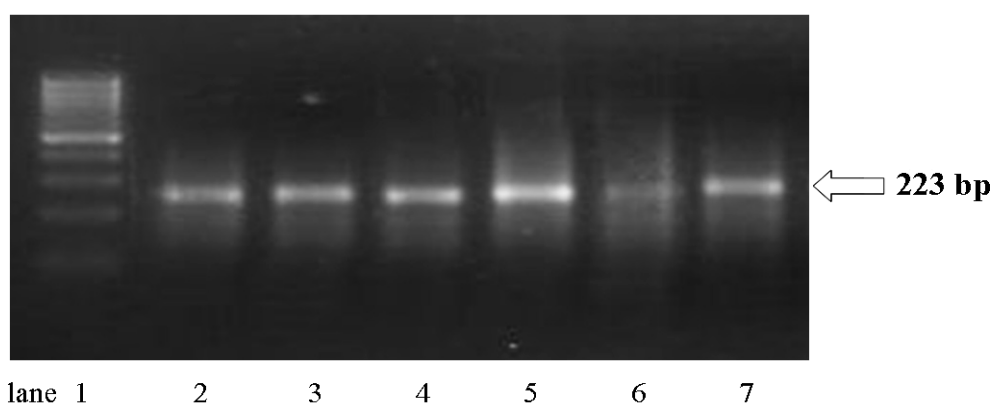
ทำการเพิ่มปริมาณยีน *CTSD* ส่วนที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน *CTSD* ส่วน 5'-flanking region และส่วน coding sequence ของยีน *cathepsin D* (GenBank accession number S49650) ให้ผลดังนี้

จากการสังเคราะห์ first strand cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตับไก่ ด้วยเทคนิค RT-PCR แล้วนำมาเพิ่มปริมาณยีน *CTSD* ส่วน 5'-flanking region โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และย้อมเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 194 คู่เบส ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ผลผลิต PCR ของยีน *CTSD* ในส่วน 5' flanking region ที่มีขนาด 194 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

ส่วนผลผลิต PCR ของยีน *CTSD* ส่วน coding sequence ของไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้าและไก่สามเหลือง เมื่อนำมาแยกขนาดด้วยเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และย้อมเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 223 คู่เบส ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่สามเหลืองที่มีขนาดเท่ากันทุกตัว ดังแสดงในภาพที่ 11

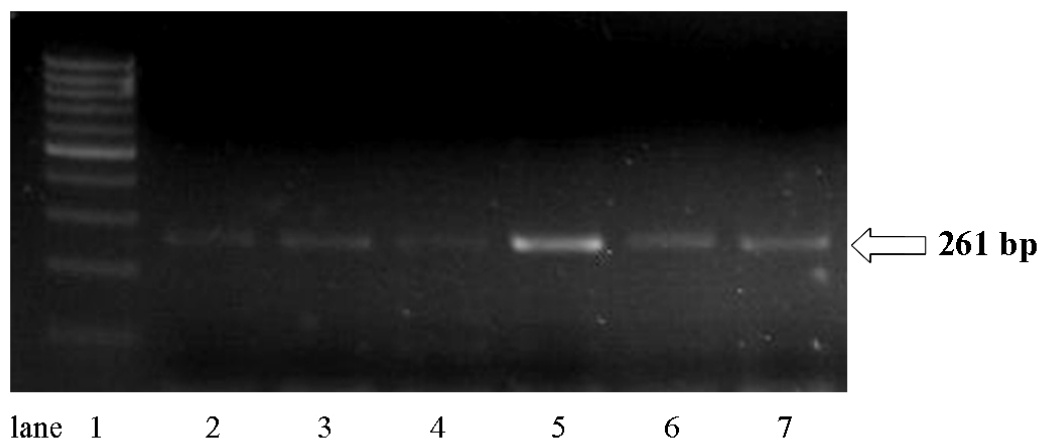


ภาพที่ 11 ผลผลิต PCR ของยีน *CTSD* ในส่วน coding sequence ที่มีขนาด 223 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

ยีน *VTG II*

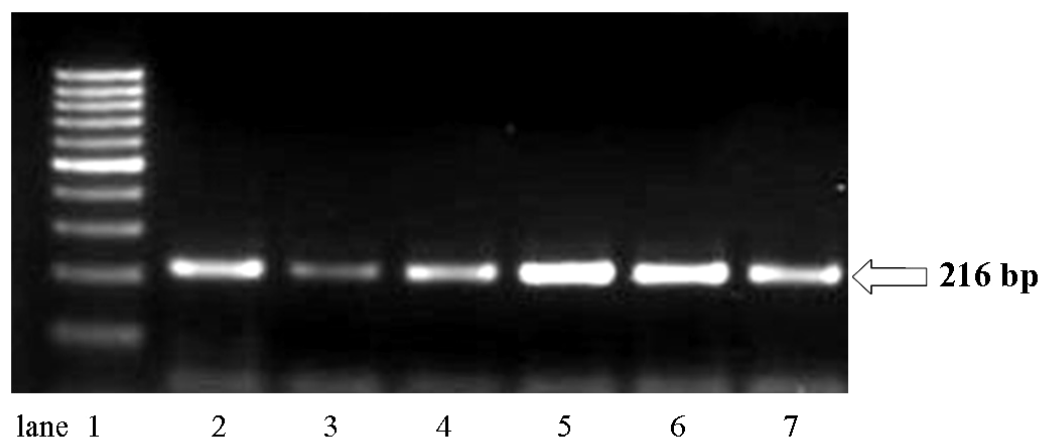
ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน *VTG II* ส่วนที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณต่าง ๆ ของยีน ประกอบด้วยส่วน 5' end region ของยีน *Vitellogenin* (GenBank accession number X00204) และส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 และ exon 27 ของยีน *Chicken vitellogenin II* (GenBank accession number X13607)

สำหรับผลผลิต PCR ของยีน *VTG II* ด้วยในส่วน 5' end region ของไก่ทั้งสองสายพันธุ์เมื่อแยกขนาดด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และย้อมเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 261 คู่เบส ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์มีขนาดเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 12



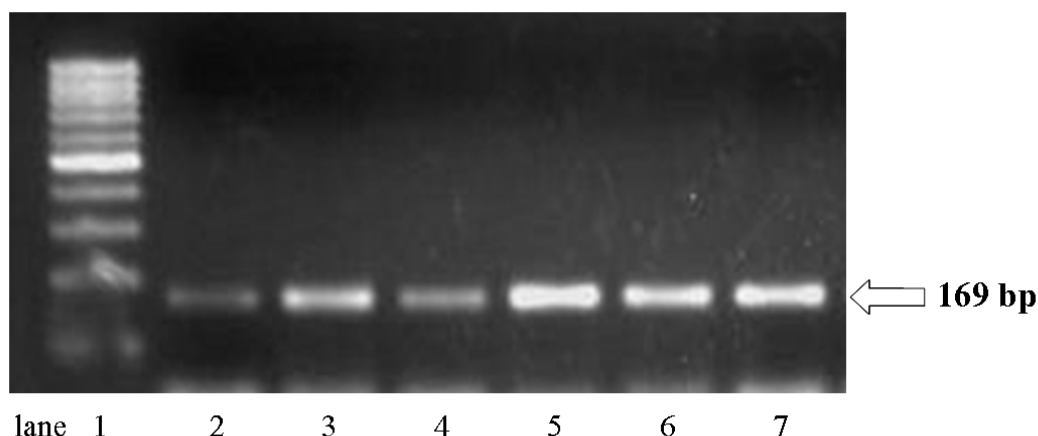
ภาพที่ 12 ผลผลิต PCR ของยีน *VTG II* ในส่วน 5' end region ที่มีขนาด 261 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน *VTG II* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในส่วน of coding sequence บริเวณ exon 4 แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และย้อมเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 216 คู่เบส ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 13



ภาพที่ 13 ผลผลิต PCR ของยีน *VTG II* ในส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 ที่มีขนาด 216 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

และการเพิ่มปริมาณยีน *VTG II* โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 169 คู่เบส ในไก่ทุกตัวทั้งสองสายพันธุ์ที่ให้ขนาดเท่ากัน ดังแสดงในรูปที่ 14



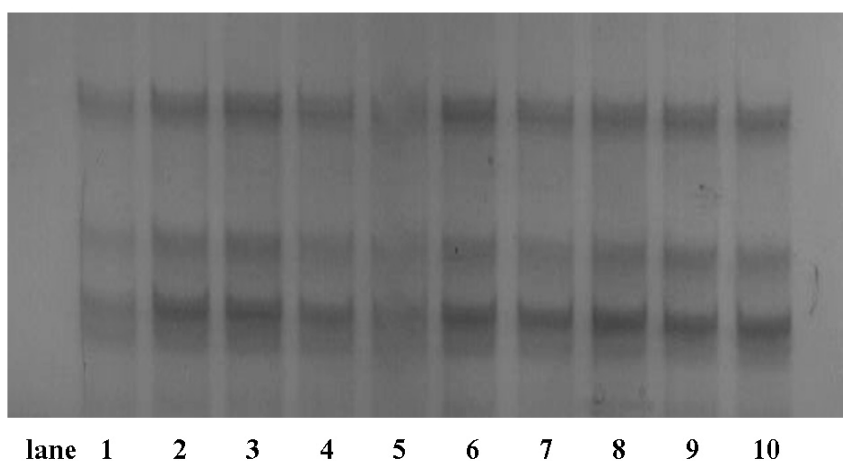
ภาพที่ 14 ผลผลิต PCR ของยีน *VTG II* ในส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 ที่มีขนาด 169 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2 – 4) และไก่สามเหลืง (เลนที่ 5 – 7) เลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp

ในการเพิ่มปริมาณยีน *CTSD* ส่วน 5' flanking region และส่วน coding sequence และยีน *VTG II* ส่วน 5' end region และส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 และบริเวณ exon 27 โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับส่วนต่าง ๆ ดังกล่าวของยีนทั้งสอง พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบในการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้เพิ่มปริมาณยีน *CTSD* และยีน *VTG II* ของไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้าและไก่สามเหลืงได้ในส่วนที่ต้องการได้ เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ ในแต่ละไพรเมอร์ ตามที่กำหนด อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์มีขนาดไม่แตกต่างกันและพบว่าในไก่ไข่และไก่สามเหลืงมียีน *CTSD* และยีน *VTG II* ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณยีนส่วนดังกล่าวได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอในไก่ไข่และไก่สามเหลืงทุกตัวที่ใช้ในการทดลอง แต่ระดับในการแสดงออกของยีน *CTSD* และยีน *VTG II* ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์มีระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการไข่แดงของไก่ทั้งสองสายพันธุ์ ทำให้ปริมาณการให้ไข่เฉลี่ยของไก่ในแต่ละตัวแตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างไก่ที่มีลักษณะให้ไข่ดกและให้ไข่ไม่ดกได้

ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

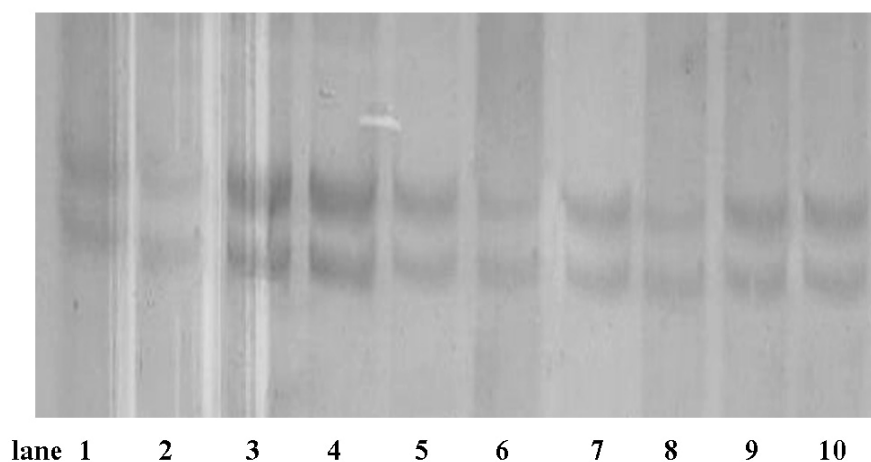
ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และให้ผลขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันในทุกๆ สองสายพันธุ์ จะถูกนำมาวิเคราะห์หา Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) โดยใช้เทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) บน nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ที่ความเข้มข้น 8% และ 10% แล้วตรวจผลจากแผ่นเจลด้วยวิธี silver staining พบว่าเจลที่ความเข้มข้น 8% ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับเจลที่ความเข้มข้น 10%

ผลการวิเคราะห์ SSCP ของแถบดีเอ็นเอของยีน *CTSD* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนส่วน 5' flanking region พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว ซึ่งไม่แตกต่างกันในทุกๆ สองสายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 15



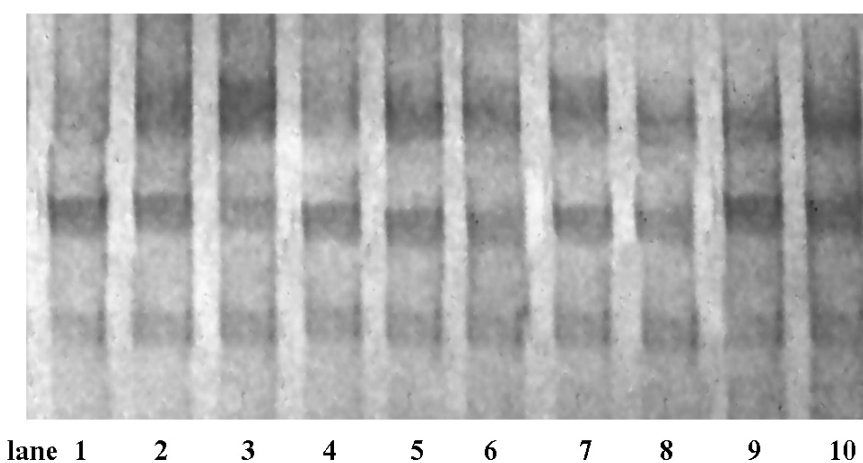
ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน *CTSD* ส่วน 5' flanking region ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)

และการวิเคราะห์ SSCP ของแถบดีเอ็นเอของยีน *CTSD* ส่วน coding sequence ของไก่ไข่ และไก่สามเหลืองจากผลผลิต PCR จะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอมีเพียงรูปแบบเดียวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 16



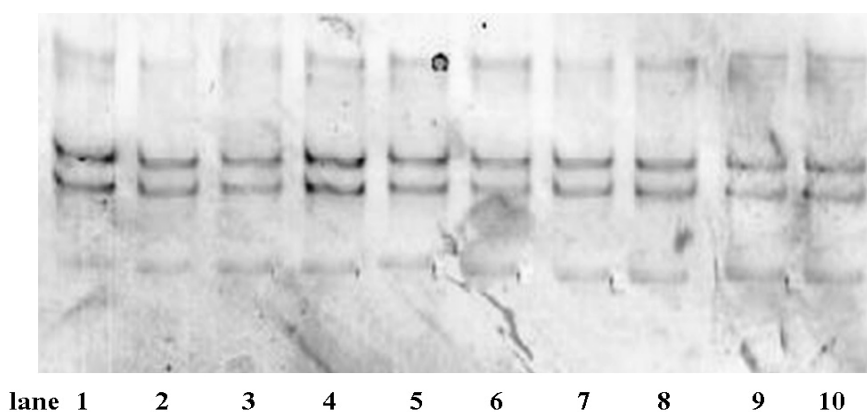
ภาพที่ 16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน *CTSD* ส่วน coding sequence ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)

ส่วนการตรวจสอบ SNPs ของยีน *VTG II* ในส่วน 5' end region ด้วยเทคนิค SSCP พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว ไม่แตกต่างกันในไก่ไข่และไก่สามเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 17



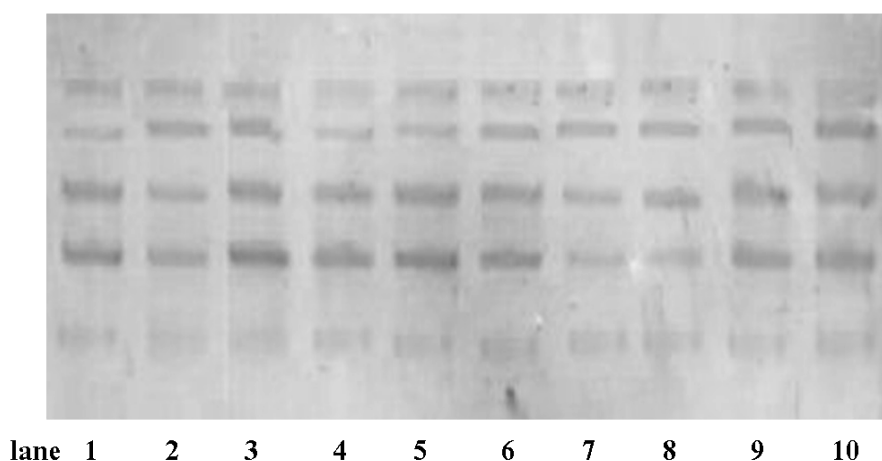
ภาพที่ 17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน *VTG II* ส่วน coding sequence ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลือง (เลนที่ 6 – 10)

สำหรับการตรวจสอบความหลากหลายของยีน *VTG II* ส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 ด้วยเทคนิค SSCP พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว ไม่แตกต่างกันในไก่ทุกตัว ดังแสดงในรูปที่ 18



ภาพที่ 18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน *VTG II* ส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลียง (เลนที่ 6 – 10)

และการตรวจสอบความหลากหลายของยีน *VTG II* ส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 ด้วยเทคนิค SSCP พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว ไม่แตกต่างกันในไก่ไข่และไก่สามเหลียง ดังแสดงในรูปที่ 19



ภาพที่ 19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน *VTG II* ส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 ในไก่ไข่ (เลนที่ 1 – 5) และไก่สามเหลียง (เลนที่ 6 – 10)

ในการตรวจสอบความหลากหลายด้วยเทคนิค SSCP มักจะพบว่าแถบดีเอ็นเอเป็น 2 หรือ 4 แถบ ดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น 2 แถบ จัดเป็นโฮโมไซกัส (homozygotes) ส่วนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น 4 แถบ จัดเป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygotes) (Barroso *et al.*, 1998) แต่อาจจะพบจำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า 2 หรือ 4 แถบ เนื่องจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวสามารถแยกตัวออกเป็น 2 หรือมากกว่า 2

แถบ ถึงแม้จะมีลำดับเบสเหมือนกัน (Orita *et al.*, 1989; Hayashi, 1991; Tokue *et al.*, 1995) แต่สายนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสเหมือนกันอาจมี conformation ต่างกัน ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอหลายแบบภายใต้สภาวะการทำ electrophoresis เดียวกัน (Bastos *et al.*, 2001)

การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CTSD* และยีน *VTG II* ของไก่ไข่และไก่สามเหลียง พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น มีเพียงรูปแบบเดียวในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ จึงทำให้ไม่สามารถใช้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในการแยกความแตกต่างระหว่างไก่ที่ให้ไข่ดกและไก่ที่ให้ไข่ไม่ดกได้ ถึงแม้ว่าในไก่ไข่และไก่สามเหลียงจะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CTSD* และยีน *VTG II* ที่เหมือนกัน แต่อาจมีการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสายนิวคลีโอไทด์ของยีน *CTSD* และยีน *VTG II* ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ จึงได้ทำการหาลำดับเบสของยีนทั้งสองเพื่อนำมาเปรียบเทียบ มีผลดังนี้

ผลการหาลำดับเบสของยีน *CTSD* และยีน *VTG II*

ยีน *CTSD*

ผลการหาลำดับเบส (sequencing) ของยีน *CTSD* ส่วน 5' -flanking region โดยสุ่มตัวอย่างจากไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่สามเหลียงกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีนที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของยีน *CTSD* ที่ได้เหมือนกับยีน cathepsin D (GenBank accession number S49650) ซึ่งรายงานโดย Retzek *et al.* (1992) โดยยีน *CTSD* ใน ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และในไก่สามเหลียงมีความเหมือน หรือมีค่า identity กับยีน *CTSD* ที่มีในฐานข้อมูล GenBank 98 % แต่ยีน *CTSD* ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า กับในไก่สามเหลียงจะมีค่า identity 100%

จากการเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment) ของยีน *CTSD* ที่มีความยาว 86 เบส โดยตรงกับลำดับเบสของยีน prepro-cathepsin D ตำแหน่งเบสที่ 191 – 276 ซึ่งมีความเหมือน 85 เบส และต่างกัน 1 เบส พบว่ายีน *CTSD* ของไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้าและไก่สามเหลียงมีลำดับเบสแตกต่างกันไปจากไก่ป่าสีแดง (red jungle fowl : *Gallus gallus*) เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ หรือเกิดการกลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation) แบบแทนที่เบส (substitution) ชนิดทรานเวอร์ชัน (transversion) คือการแทนที่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์จากเบสพิวรีน (purine) ชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง หรือการแทนที่เบสไพริมิดีน (pyrimidine) ชนิด

หนึ่ง ด้วยพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง (ประดิมฐ์, 2541) โดยมีการเปลี่ยนจากเบส A เป็น C ที่ตำแหน่งเบสที่ 83 ดังแสดงในภาพที่ 20

```
commercial      CAGGATCCCCCTCACCAAATTCACCTCCACGCGCCGCATGCTGACCGAGGTGGGCAGCGA 60
Tri-yellow      CAGGATCCCCCTCACCAAATTCACCTCCACGCGCCGCATGCTGACCGAGGTGGGCAGCGA 60
prepro-cathepsin CAGGATCCCCCTCACCAAATTCACCTCCACGCGCCGCATGCTGACCGAGGTGGGCAGCGA 60
*****

commercial      GATCCCTGACATGAACGCCATCCCCC 86
Tri-yellow      GATCCCTGACATGAACGCCATCCCCC 86
prepro-cathepsin GATCCCTGACATGAACGCCATCCCCC 86
*****
```

ภาพที่ 20 ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากยีน *CTSD* ส่วน 5' -flanking region (บางส่วน) โดย สุ่มจากไก่ไข่และไก่สามเหลืองกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank

จากการหาลำดับเบสของยีน *CTSD* ส่วน 5' -flanking region แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *Cathepsin D* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งลำดับเบสของยีน *CTSD* ในไก่ไข่และไก่สามเหลืองมีความเหมือนกันสูงกับลำดับเบสของยีน *Cathepsin D* นอกจากนี้ลำดับเบสของยีน *CTSD* ในไก่ยังมีความเหมือนกับยีน *CTSD* ในสัตว์ชนิดอื่น จะเห็นได้จากการรายงานของ Brooks *et al.* (1997), Carnevali *et al.* (1999) และ Retzek *et al.* (1992) พบว่ายีน *CTSD* ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ มีความเหมือนกันค่อนข้างสูง ในการทดลองของ Carnevali *et al.* (1999) ได้เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *CTSD* ในปลา seabream (*Sparus aurata*) กับลำดับเบสของยีน *CTSD* ที่เป็น cDNA จากหนู mouse (*Mus musculus*), หนู Rat (*Rattus norvegicus*), มนุษย์ (*Homo sapiens*), สุกร (*Sus scrofa*), ไก่ (*Gallus gallus*), ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และกบ (*Xenopus tropicalis*) ซึ่งยีน *CTSD* ในปลา seabream มีความเหมือนกับหนู และหนูขนาดเล็ก 73%, มนุษย์ และปลา trout 72%, ไก่ 69%, สุกร 66% และกบ 65% ส่วน Brooks *et al.* (1997) ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *CTSD* ใน ปลา rainbow trout กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CTSD* ที่ได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์หลายชนิด เช่น เนื้อเยื่อตับของมนุษย์, ต่อมใต้สมอง (pituitary) ของหนูขนาดเล็ก, เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ของหนู, กระจาไข่ (follicles) ของไก่ และตัวอ่อนของลูกอ๊อด (*Xenopus*) ถึงแม้ความยาวของยีน *CTSD* ของสัตว์ต่าง ๆ จะมีความยาวแตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 1940 คู่เบส ในหนูขนาดเล็ก ไปจนถึง 3.3 กิโลเบส (kb) ในไก่ แต่ลำดับของกรดอะมิโนยังมีความเหมือนกันสูง

ซึ่งยีน *CTSD* ใน ปลา rainbow trout มี identity กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (หนู 64%, มนุษย์ 68%), ไก่ 68% และกบ 64%

ในการสร้างไข่แดงของไก่ ถึงแม้เอนไซม์คาร์เทปซินดีจะเข้าไปทำงานภายในโอโอไซต์ แต่การใช้รังไข่ในการศึกษามีข้อจำกัดค่อนข้างมาก คือเนื้อเยื่อมีปริมาณจำกัด ทำให้ได้ยีน *CTSD* ในปริมาณต่ำ และการสกัดจากตับก็ได้ *CTSD* ที่เป็นโพลีเปปไทด์สามชนิด ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่ได้จากฟอลลิเคิลที่กำลังพัฒนา และการสกัดจากตับจะช่วยลดการปนเปื้อนที่พบได้ในรังไข่ (Retzek *et al.*, 1992) และตับยังเป็นอวัยวะที่สำคัญในการสร้างไข่แดงของไก่ เป็นส่วนที่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่สำคัญในการสร้างไข่แดง นอกจากนี้ Retzek *et al.* (1992) ยังทำการทดลองย่อย VTG ด้วย *CTSD* ที่ได้จากตับและฟอลลิเคิลภายใต้สภาวะเดียวกัน (ที่ pH 5.2 – 5.8) พบว่าให้ผลเช่นเดียวกัน โดยพบแถบโพลีเปปไทด์ 4 กลุ่ม

ยีน *VTG II*

สำหรับลำดับเบสของยีน *VTG II* ส่วน 5' end region ของไข่ไก่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่สามเหลืง ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับเบสของยีน *VTG II* ที่ได้เหมือนกับลำดับเบสของยีน 5' end region of major vitellogenin (GenBank accession number X00204) (Walker *et al.*, 1983) โดยยีน *VTG II* ของไก่สามเหลืงมีค่า identity กับยีน 5' end region of major vitellogenin 100% ส่วนยีน *VTG II* ในไก่ไข่มีค่า identity กับยีน 5' end region of major vitellogenin และยีน *VTG II* ในไก่สามเหลืง 92%

จากการ alignment ของยีน *VTG II* ที่มีความยาว 129 เบส ซึ่งตรงกับลำดับเบสของยีน 5' end region of major vitellogenin gene ตำแหน่งเบสที่ 366 – 494 พบว่ายีน *VTG II* ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า มีความเหมือนกับยีน *VTG II* ในไก่ป่าสีแดง (red jungle fowl : *Gallus gallus*) และยีน *VTG II* ในไก่สามเหลืงทั้งหมด 119 เบส และต่างกัน 10 เบส ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส (mutation) แบบแทนที่เบส ชนิดทรานซิชัน (transition) คือการแทนที่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์จากเบสพิวรีน (purine) ชนิดหนึ่งด้วยพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง หรือการแทนที่เบสไพริมิดีน (pyrimidine) ชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง (ประคิษฐ์, 2541) ประกอบด้วย (ภาพที่ 21)

T → C ที่ตำแหน่งเบสที่ 11
 A → G ที่ตำแหน่งเบสที่ 80
 G → A ที่ตำแหน่งเบสที่ 88

และเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบแทนที่เบส ชนิดทรานเวอร์ชัน (transversion) คือ การแทนที่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์จากเบสปิวรีน (purine) ชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง หรือการแทนที่เบสไพริมิดีน (pyrimidine) ชนิดหนึ่งด้วยปิวรีนอีกชนิดหนึ่ง (ประดิษฐ์, 2541) ประกอบด้วย (ภาพที่ 21)

A → C ที่ตำแหน่งเบสที่ 42, 60, 87, 97, 101, 115
 T → G ที่ตำแหน่งเบสที่ 55

VTG	TTTGATTTTCCTTTATTGCGCCGTGAAGAGAAATTTATGATTGCAAAAAGAGGAGTGTTTACA 60
Tri-yellow	TTTGATTTTCCTTTATTGCGCCGTGAAGAGAAATTTATGATTGCAAAAAGAGGAGTGTTTACA 60
commercial	TTTGATTTTCCTTTATTGCGCCGTGAAGAGAAATTTATGATTGCCAAAAGAGGAGTGTTTACC 60

VTG	TAAACTGATAAAAAACTTGAGAATTCAGCAGAAAACAGCCACGTGTTTCCTGAACATTCTT 120
Tri-yellow	TAAACTGATAAAAAACTTGAGAATTCAGCAGAAAACAGCCACGTGTTTCCTGAACATTCTT 120
commercial	TAAACTGATAAAAAACTTGGAATTCACAGAAAACCGCCCGTGTTTCCTGAACCTTCTT 120

VTG	CCATAAAAG 129
Tri-yellow	CCATAAAAG 129
commercial	CCATAAAAG 129

ภาพที่ 21 ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากยีน *VTG II* ส่วน 5' end region (บางส่วน) โดยสุ่มจากไก่ไข่และไก่สามเหลืงกลุ่มละ 1 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล GenBank

ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lorenzen *et al.* (2001) ที่เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *VTG II* ในไก่เล็กฮอร์นขาว (White Leghorn: *Gallus domesticus*) กับลำดับเบสของยีน *VTG II* ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นไก่ป่าสีแดง พบว่าลำดับเบสจากไก่เล็กฮอร์นขาวแตกต่างจากลำดับเบสของไก่ป่าสีแดง โดยมีลำดับเบสแตกต่าง 2 เบส คือ เบส G เปลี่ยนเป็น A และเบส T เปลี่ยนเป็น C นอกจากนี้ Lorenzen *et al.* (2001) ยังได้ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *VTG II* ในไก่เล็กฮอร์นขาว (White Leghorn : *Gallus domesticus*), นกนางนวลแฮร์ริง (herring gull : *Larus*

argentatus), นกนางนวลแกลบธรรมดา (common tern : *Sterna hirundo*), นกนางนวลแคสเปียน (Caspian tern : *Sterna caspia*), เหยี่ยวเครสเตรลออเมริกัน (American kestrel : *Falco sparverius*), นกโรบิน (American robin : *Turdus migratorius*) และนกฟินช์ม้าลาย (zebra finch : *Taeniopygia guttata*) พบว่าลำดับเบสของยีน *VTG II* ในสัตว์ปีกแต่ละชนิดมีความเหมือนกันตั้งแต่ 86.4 ถึง 90.2% โดยมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบแทนที่เบส ทั้งชนิดทรานซิชัน และ ทรานเวอร์ชัน

นอกจากนี้ Walker *et al.* (1983) ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *VTG* ส่วน 5' end region ในกบ (*Xenopus laevis*) และไก่ตัวผู้ (roosters) พบว่าลำดับเบสมีความเหมือนกันประมาณ 70% เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบแทนที่เบส ทำให้มีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกัน

ลำดับเบสของยีน *VTG II* ในไก่ไข่และไก่สามเหลี่ยมมีความแตกต่างกัน เนื่องจากตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่บริเวณ 5' end region เป็นตำแหน่งที่ค่อนข้างมีความหลากหลาย รวมทั้งยังเป็นตำแหน่งโปรโมเตอร์ (promoter) ที่ประกอบด้วย TATA box (ATAAAA) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ควบคุมการแปลรหัสเป็นโปรตีนของยีน ทำให้การหาลำดับเบสจากไก่ไข่และไก่สามเหลี่ยมมีความแตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้พัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับใช้คัดเลือกไก่ที่ให้ไข่มากได้ เพราะไม่มีการเก็บข้อมูลปริมาณการให้ไข่ของไก่แต่ละตัวสำหรับใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของไก่ทั้งสองสายพันธุ์

จากการที่รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบความหลากหลายด้วยเทคนิค SSCP และลำดับเบสของยีน *VTG II* ส่วน 5' end region ไม่สอดคล้องกัน อาจเป็นเพราะในการใช้เทคนิค SSCP มีปัจจัยหลาย ๆ อย่างที่มีผลต่อการตรวจสอบความหลากหลายที่เกิดขึ้นภายในสายนิวคลีโอไทด์ (วีระพงศ์, 2539) ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะ conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว นอกจากนี้ลักษณะการกลายพันธุ์หรือความแตกต่างในสายดีเอ็นเอ เนื่องจากตำแหน่งและชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลง รวมทั้งส่วนประกอบและลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ จะมีผลต่อการตรวจสอบโดยเทคนิค SSCP ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตรงปลายของสายนิวคลีโอไทด์ จะส่งผลให้ตรวจสอบได้ยากขึ้น (Barroso *et al.*, 1999) ในขณะที่ชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลง ไม่ว่าจะเป็นทรานซิชันหรือทรานเวอร์ชัน มีผลน้อยมาก ส่วนในกรณีที่เบสมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าหนึ่งเบส ถ้าตำแหน่งของเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง รวมอยู่ในบริเวณใดบริเวณหนึ่งในสายนิวคลีโอไทด์ โอกาสตรวจพบการเปลี่ยนแปลงโดยเทคนิค SSCP จะมีมากกว่าในกรณีที่ตำแหน่งเบสที่เกิดการ

เปลี่ยนแปลงกระจายอยู่ทั่วสายนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้แล้วลำดับเบสที่อยู่ทั้งสองด้านของตัวเบสที่เปลี่ยนแปลงก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการตรวจพบการเปลี่ยนแปลง (วิระพงษ์, 2539)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะเจาะจงต่อยีน *CTSD* จากยีน cathepsin D ส่วน 5'-flanking region (forward primer 5'-TGCTTTAGGGGGTGTAGTGC-3' และ reverse primer 5'-ACTGGGTGATGGCGTTCAT-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 194 คู่เบส และส่วน coding sequence (forward primer 5'-ACTCATGCTAGGTGGGAAGC-3' และ reverse primer 5'-AGGCGCTTAGACACATTTGG-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 223 คู่เบส
2. การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะเจาะจงต่อยีน *VTG II* จากยีน major vitellogenin gene ส่วน 5' end region (forward primer 5'-AATCTAGGAAAGCAAGTAGCAC-3' และ reverse primer 5'-CTTTTATGGAAGAATGTTTCAGG-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 261 คู่เบส, ส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 (forward primer 5'-TTTCACCCGGCTCTTCAA-3' และ reverse primer 5'-CAGAACGCATCCTTTCAGCA-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 216 คู่เบส และส่วน coding sequence บริเวณ exon 27 forward primer 5'-GCTTTTCGCTCCATTGTAGG-3' และ reverse primer 5'-ACCTCACCATTCAACCACTG-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 169 คู่เบส
3. ไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจากการใช้เทคนิค SSCP ทั้งในยีน *CTSD* ส่วน 5'-flanking region และส่วน coding sequence หรือในยีน *VTG II* ส่วน 5' end region และส่วน coding sequence บริเวณ exon 4 และ exon 27 โดยจะพบแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียวทั้งในไก่ไข่และไก่สามเหลือง
4. สำหรับการหาลำดับเบสของยีน *CTSD* ส่วน 5' flanking region และยีน *VTG II* ส่วน 5' end region โดยสุ่มจากไก่ไข่และไก่สามเหลืองอย่างละ 1 ตัวอย่าง แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน *CTSD* ความยาว 86 คู่เบสในไก่ไข่และไก่สามเหลืองมีความเหมือนกับยีน prepro-cathepsin D 98% เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบแทนที่เบส (substitution) จากเบส A เป็น C ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 11

5. ส่วนลำดับเบสของยีน *VTG II* ในไก่ไข่ และไก่สามเหลืองที่มีความยาว 129 คู่เบส มีความเหมือนกับยีน major vitellogenin gene 92 และ 100% ตามลำดับ โดยยีน *VTG II* ในไก่ไข่เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบแทนที่เบส (substitution) คือ มีการเปลี่ยนแปลงจากเบส T เป็น C ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 11, มีการเปลี่ยนแปลงจากเบส A เป็น G ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 80 และมีการเปลี่ยนแปลงจากเบส G เป็น A ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 88, มีการเปลี่ยนแปลงจากเบส A เป็น C ของ นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 42, 60, 87, 97, 101 และ 115 และมีการเปลี่ยนแปลงจากเบส T เป็น G ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 55

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาอิทธิพลของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SSCP ในยีน *VTG II* และยีน *CTSD* ต่อลักษณะการให้ไข่ตก จะต้องใช้ประชากรในการทดสอบที่มากกว่านี้
2. การศึกษาความหลากหลายของยีน *VTG II* และยีน *CTSD* ต่อลักษณะการให้ไข่ตก ควรเลือกใช้ประชากรที่มีลักษณะที่แตกต่างกันสูง เช่น ไก่ไข่ และไก่เนื้อ
3. การทำเทคนิค SSCP ยังมีปัจจัยหลาย ๆ อย่างที่ส่งผลต่อความไวของ SSCP จึงควรมีการควบคุมสถานะให้เหมาะสมทุกขั้นตอน เพื่อให้สามารถตรวจพบความหลากหลายที่เกิดขึ้นภายในสายนิวคลีโอไทด์ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. 2547. **ไก่สามเหลือง**. การพัฒนาสัตว์ปีก เพื่อเกษตรกร.
แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/breeding/P/p_c_n_y.htm, 10 กันยายน 2006.
- ทัศนีย์ อภิชาติสรารกูร. 2543. การสืบพันธุ์, น. 115 - 140. ใน นุชา สิมะสาธิตกุล, บรรณาธิการ.
สัตวศาสตร์และการผลิตสัตว์เบื้องต้น. บริษัททรีโอ แอดเวอร์ไทซิง แอนด์ มีเดีย จำกัด,
เชียงใหม่.
- ธำรงค์ดี พลบำรุง. 2531. **การเลี้ยงไก่พันธุ์ไข่**. ครั้งที่ 1. บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด,
กรุงเทพฯ.
- _____. 2535. **การเลี้ยงไก่พื้นเมือง**. ครั้งที่ 4. บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ปฐม เลหาเกษตร. 2541. **การเลี้ยงสัตว์ปีก**. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. **พันธุศาสตร์**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วีระพงศ์ คูลิตานนท์. 2536. เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction, น. 20.2 – 20.12. ใน
วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ, บรรณาธิการ. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการ
วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ: เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม**. โรงพิมพ์
สาธิตสุขุมมูลฐานอาเซียน, กรุงเทพฯ.
- _____. 2539. Detection of point mutation by PCR-SSCP, น. 16(1) – 16(9). ใน วสันต์ จันทรา
ทิพย์ ปราณี ลิขณะลัย และ วาสนา ศิริรังสี, บรรณาธิการ. **วิทยาการทันสมัยในการตรวจ
วินิจฉัยโครโมโซมและยีน**. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

- สุจินต์ สิมารักษ์. 2532. **สรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ปีก**. ครั้งที่ 1. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- _____. 2545. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สวัสดิ์ ธรรมบุตร, ศิริพันธ์ โมราถบ, บุญศักดิ์ เกลียวกมลทัต และ อัมพร ธรรมบุตร. 2546. **ความสำคัญของไก่พื้นเมือง**. การเลี้ยงไก่พื้นเมือง. แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th/service/webeggs/nativmai.html>, 11 เมษายน 2550.
- ไสว นามคุณ. 2546. **พันธุ์ไก่ไข่**. การเลี้ยงไก่ไข่. แหล่งที่มา: <http://www.dld.go.th/service/layer/type.html>, 11 เมษายน 2550.
- ศรณ์ มงคลสุข และ พัฒนา ศรีฟ้า. 2536. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอนำรหัส, น. 17.20 – 17.30. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ, บรรณาธิการ. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ: เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม**. โรงพิมพ์สารานุกรมฐานอาเซียน, กรุงเทพฯ.
- อาวุธ ดันโซ. 2538. **การผลิตสัตว์ปีก**. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- Angel, B., S. Dunner, and J. Canñón. 1998. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). **J. Anim. Sci** (76): 1535–1538.
- _____. 1999. Technical Note: Use of PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for Detection of Bovine κ -Casein Variants A¹, A², A³, and B. **J. Anim. Sci** (77): 2629–2632.

- Arukwe, A. and A. Goksøyr. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology** (2): 1 – 21.
- Baldwin, E.T., T.N. Bhat, S. Gulnik, M.V. Hosur, R.C. Sowder, R.E. Cachau, J. Collins, A.M. Silva and J.W. Erickson. 1993. Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (90): 6796 - 6800.
- Barber, D.L., E.J. Sanders, R. Aebersold and W. J. Schneider. 1991. The Receptor for Yolk Lipoprotein Deposition in the Chicken Oocyte. **J. Biol. Chem** (266): 18761 – 18770.
- Barroso, A., S. Dunner and J. Canñón. 1998. Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). **J. Anim. Sci.** (76): 1353 - 1358.
- Bastos, E., A. Cravador, J. Azevedo and H.G. Pinto. 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed “Churra da Terra Quente”. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ** (5): 7 – 15.
- Bergink E. W. and R. A. Wallace. 1973. Precursor-Product Relationship between Amphibian Vitellogenin and the Yolk Proteins, Lipovitellin and Phosvitin. **J. Biol. Chem** (249): 2897 – 2903.
- Brooks, S., C.R. Tyler, O. Carnevali, K. Coward and J.P. Sumpter. 1997. Molecular characterisation of ovarian cathepsin D in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Gene** (20): 45 – 54.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita and N. Bromage. 1999. Yolk Formation and Degradation during Oocyte Maturation in Seabream *Sparus aurata*: Involvement of Two Lysosomal Proteinases. **J. Biol. of Reprod** (60): 140–146.

Davail, B., F. Pakdel, H. Bujo, L.M. Perazzolo, M. Waclawek, W.J. Schneider and F.L. Menn.

1998. Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. **J. Lipid. Res** (39): 1929 – 1937.

Deeley, R.G, K.P. Mullinix, W. Wetekam, H.M. Kronenberg, M. Meyers, J.D. Eldridge and R.F.

Goldberger. 1976. Vitellogenin Synthesis in the Avian Liver: vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. **J. Biol. Chem** (250): 9060 – 9066.

Egberts, F., M. Heinrich, J.M. Jensen, S.W. Morbach, S. Pfeiffer, M. Wickel, M. Schunck, J.

Steude, P. Saftig, E. Proksch and S. Schütz. 2004. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. **J. Cell Sci** (117): 2295 – 2307.

Elkin, R.G., M.B. Freed, S.A. H. Danetz and C.A. Bidwell. 1995. Proteolysis of Japanese quail

and chicken plasma apolipoprotein B and vitellogenin by cathepsin D: similarity of the resulting protein fragments with egg yolk polypeptides. **Comp Biochem Physiol** (112B): 191 – 196.

Gerhartz, B., H.J. Kolb and J. Wittmann. 1999. Proteolytic activity in the yolk sac membrane of

quail eggs. **Comp Biochem Physiol** (123A): 1 – 8.

Gibthai Traing Center. 2005. ความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์. แหล่งที่มา:

www.dld.go.th/biologic/research/techni_pcr.pdf, 15 กรกฎาคม 2548.

Ivarie, R. 2003. Avian transgenesis: progress towards the promise. **Trends Biotechnol** (21): 14

– 19.

Ito, Y., M. Kihara, E. Nakamura, S. Yonezawa and N. Yoshizaki. 2003. Vitellogenin transport

and yolk formation in the Quail Ovary. **Zoo. Sci** (20): 717 – 726.

- K. Hayashi. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods Appl** (1): 34 - 38.
- Lorenzen, A., W.L. Casley and T.W. Moon. 2001. A Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Bioassay for Avian Vitellogenin mRNA. **Toxicol. Appl. Pharmacol** (176): 169 – 180.
- Mullinix, K.P., W. Wetekam, R.G. Deeley, J.I. Gordon, M. Meyers, K.A. Kent and R.F. Goldberger. 1976. Induction of vitellogenin synthesis by estrogen in avian liver: Relationship between level of vitellogenin mRNA and vitellogenin synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sc. USA** (73): 1442 – 1446.
- Nakajima, E., T. Matsumoto, R. Yamada, K. Kawakami, K. Takeda, A. Ohnishi, and M. Komatsu. 1996. Technical Note: Use of a PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) for Detection of a Point Mutation in the Swine Ryanodine Receptor (*RYR1*) Gene. **J. Anim. Sci** (74): 2904 – 2906.
- National Center for Biotechnology Information. 2004. **CTSD cathepsin D (lysosomal aspartyl peptidase) [*Gallus gallus*]**. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=396090, March 20, 2005.
- _____. 2004. ***Gallus gallus* (chicken) genome view**. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9031, March 20, 2005.
- Nespoli, L.M. 2001. **Regulation of Vitellogenin and Other Serum Proteins by Estrogen and Xenobiotic Estrogens in Salamanders**. Degree of MASTER OF SCIENCE And Degree of MASTER OF ENVIRONMENTAL SCIENCE and MANAGEMENT thesis, Duquesne University.

- Nimpf, J., R. George and W.J. Schneider. 1988. Apolipoprotein specificity of the chicken oocyte receptor for low and very low density lipoprotein: Lack of recognition of apolipoprotein VLDL-II. **J. Lipid Res** (29): 657 – 667.
- Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics** (5): 874 - 879.
- Retzek H., E. Steyrer, E. J. Sanders, J. Nimpf and W. J. Schneider. 1992. Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. **DNA Cell Biol** (11): 661 – 672.
- Romanoff, A.L. 1997. **Avian Embryo**. Available Source: <http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>, March 20, 2005.
- 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 receptors. **Insect Biochem** (28): 277 – 300.
- Schneider, W.J. 2002. **Molecular Mechanisms of Oocyte Development**. Available Source: www.at.embnet.org/molg/, July 15, 2005.
- Shen, X., E. Steyrer, H. Retzek, E.J. Sanders and W. J. Schneider. 1993. Chicken oocyte growth: receptor-mediated yolk deposition. **J. cell tissue Res** (272): 459 – 471.
- Steyrer, E., D.L. Barber and W.J. Schneider. 1990. Evolution of Lipoprotein Receptors. **J. Biol. Chem** (265): 19575 – 19581.

- Stifani, S., J. Nimpf and W.J. Schneider. 1990. Vitellogenesis in *Xenopus Zueuis* and Chicken: Cognate Ligands and Oocyte Receptors. **J. Biol. Chem** (265): 882 - 888.
- Sun, X. and S. Zhang. 2001. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*). **Comp Biochem Physiol** (129B): 121 – 127.
- Tokue, Y., K. Sugano, T. Noda, D. Saito, Y. Shimosato, H. Ohkura, T. Kakizoe and T. Sekiya. 1995. Identification of Mycobacteria by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis** (23): 129 - 133.
- Tyler, C.R., J.J. Nagler, T.G. Pottinger and M.A. Turner. 1994. Effects of unilateral ovariectomy on recruitment and growth of follicles in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiol. Biochem.** 13: 309–316.
- Vieira, P.M., A.V. Vieira, E.J. Sanders, E. Steyrer, J. Nimpf and W.J. Schneider. 1995. Chicken yolk contains bona fide high density lipoprotein particles. **J. Lipid. Res** (36): 601 - 610.
- Walker, P., M. Brown-Luedi, J.E. Germond, W. Wahli, F.C. Meijlink, A.D. van het Schip, H. Roelink, M. Gruber and G. Ab. 1983. Sequence homologies within the 5' end region of the estrogen-controlled vitellogenin gene in *Xenopus* and chicken. **J. EMBO** (12): 2271-2279.
- Wang, S.Y. and D.L. Williams. 1982. Biosynthesis of the Vitellogenins. **J. Biol. Chem** (257): 3837 – 3846.
- Westley, B.R. and F.E.B. May. 1996. Cathepsin D and Breast Cancer. **Eur J Cancer** (32A): 15 – 24.

Yamamura, J.I., T. Adachi, N. Aoki, H. Nakajima, R. Nakamura and T. Matsuda. 1995.

Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: the 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. **Biochim. Biophys. Acta** (1244): 384 – 394.

Yonezawa, S., T. Takahashi, X.J. Wang, R.N.S. Wong, J.A. Hartsuck and J. Tang. 1988.

Structures at the Proteolytic Processing Region of Cathepsin D. **J. Biol. Chem** (263): 16504 – 16511.

Yoshizaki, N., M. Soga, Y. Ito, K.M. Mao, F. Sultana and S. Yonezawa. 2004. Two-step

consumption of yolk granules during the development of quail embryos. **Develop. Growth Differ** (46): 229 – 238.

ภาคผนวก

ลำดับเบสของยีน *CTSD* จากฐานข้อมูล GenBank

LOCUS	S49650 1448 bp mRNA linear VRT 08-MAY-1993
DEFINITION	prepro-cathepsin D [chickens, follicles, mRNA, 1448 nt].
ACCESSION	S49650
VERSION	S49650.1 GI: 259834
KEYWORDS	.
SOURCE	Gallus gallus (chicken)
ORGANISM	<u>Gallus gallus</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus.
REFERENCE	1 (bases 1 to 1448)
AUTHORS	Retzek,H., Steyrer,E., Sanders,E.J., Nimpf,J. and Schneider,W.J.
TITLE	Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation
JOURNAL	DNA Cell Biol. 11 (9), 661-672 (1992)
PUBMED	<u>1418623</u>
REMARK	GenBank staff at the National Library of Medicine created this entry [NCBI gibbsq 118573] from the original journal article.
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1448 /organism="Gallus gallus" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon:9031"
<u>gene</u>	1..1448 /gene="prepro-cathepsin D, prepro-CD"
<u>CDS</u>	126..1322 /gene="prepro-cathepsin D, prepro-CD" /note="Method: conceptual translation with partial peptide sequencing; prepro-CD"

/codon_start=1

/product="prepro-cathepsin D"

/protein_id="AAB24157.1"

/db_xref="GI: 259835"

/translation="MAPRGLLVLLLLALVGPCAALIRIPLTKFTSTRRMLTEVGSEIPDMNAITQFL
KFKLGFADLAEPTPEILKNYMDAQYYGEIGIGTPPQKFTVVFDTGSSNLWVPSVHCHLLD
IACLLHHKYDASKSSTYVENGTFAIHYGTGSLSGFLSQDTVTLGNLKIKNQIFGEAVKQP
GITFIAAKFDGILGMAFPRISVDKVTFFDNVMQQKLEKNIFS FYLNRPDPTAQPGGELLLG
GTDPKYYSGDFSWNVNTRKAYWQVHMDSVDVANGLTLCKGGCEAIVDTGTSLITGPTK
EVKELQTAIGAKPLIKQYVISCDKISSLPVVTLMMLGGKPYQLTGEQYVFKVSAQGETICL
SGFSGLDVPPPGGPLWILGDVFIGPYTTFDRDNDSSVGFAKCV"

ORIGIN

1 ggggccccgt cagctgacgc tccgtgccgg gcctgaggcc gccgctacaa aagcgggggtg
61 gcaggcgagg cgggttctgc gcttctgctt taggggggtgt agtgcgttgt aagcgttccg
121 ccgctatggc gccccgcggc cttctcgtcc tgctgctcct cgccttggtg gggccctgcg
181 cggcactcat caggatcccc ctcacaaat tcacctccac gcgccgcatg ctgaccgagg
241 tgggcagcga gatccctgac atgaacgcca tcaccagtt cctcaagttc aagctgggtt
301 ttgctgacct ggctgagccc accccggaaa tctcaagaa ttacatggat gccagttatt
361 atggtgagat tggcattggg accccccac agaagttcac tgtggtcttt gacacgggct
421 cctccaacct ctgggtgccg tcagtgcact gtcacctgct agacatgcc tgtttgctac
481 accacaagta tgatgcatcc aaatctagca cctatgtgga gaatggcact gagtttgcca
541 tccactatgg gactgggagc ctctctggat tctgagcca ggacacagtc acacttggtg
601 acttgaaaat caagaaccag atcttcgggg aggctgtgaa gcagccaggc atcaccttta
661 ttgctgcaa gtgcgatggc atcttgggca tggcattccc aagaatctct gtggacaagg
721 tcacaccttt ctttgataat gtcatgcagc agaagctgat tgagaaaaac atcttctcct
781 tctacctgaa cagggatccc acagtcagc caggcgggtga gctgctgctt ggggggactg
841 acccaaata ctacagtggg gacttcagct ggggtgaatgt cacacgcaa gcctactggc
901 aggtccacat ggactcgggt gatgttgcca atgggctgac tcttgcaaa gggggctgcg
961 aggccattgt ggacacaggc acttccctca tcaatggccc caccaaggaa gtgaaggagc
1021 tgcaaacagc cattggtgca aaaccactca tcaaaggcca gtacgtgac tctgtgata
1081 agatctctgc tctgcctgtt gtcacactca tgctaggtgg gaagccctac cagctcactg

1141 gggagcaata cgtctcaag gttctgcac aaggagaaac catctgcctg agtggggttt
 1201 ctggcctgga tgtccacca cctggaggcc cactctggat cctgggagat gtcttcattg
 1261 gcccctacta cactgtcttt gaccgtgata acgactctgt tggtttcgcc aaatgtgtct
 1321 aagcgctga cccccccctc cctcctcact gtctctgcta cacacaaaca ctgcataca
 1381 cacacaggag ctgtagagaa gttgtagaga aagattatca ggattagaaa ccactcagt
 1441 ggggaaga

ลำดับเบสของยีน *VTG II* จากฐานข้อมูล GenBank

LOCUS	GGVITE	974 bp	DNA	linear	VRT 18-APR-2005
DEFINITION	Gallus gallus 5' end region of major vitellogenin gene.				
ACCESSION	X00204				
VERSION	X00204.1 GI:63884				
KEYWORDS	signal peptide; vitellogenin.				
SOURCE	Gallus gallus (chicken)				
ORGANISM	<u>Gallus gallus</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 974)				
AUTHORS	Walker,P., Brown-Luedi,M., Germond,J.E., Wahli,W., Meijlink,F.C., van het Schip,A.D., Roelink,H., Gruber,M. and Ab,G.				
TITLE	Sequence homologies within the 5' end region of the estrogen-controlled vitellogenin gene in Xenopus and chicken				
JOURNAL	EMBO J. 2 (12), 2271-2279 (1983)				
PUBMED	6199194				
COMMENT	Data kindly reviewed (18-JUN-1984) by W. Wahli.				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..974 /organism="Gallus gallus" /mol_type="genomic DNA"				

/db_xref="taxon:9031"
TATA_signal 488...493
precursor_RNA 518...>974
 /note="primary transcript"
CDS join (532...571,657...707,808...959)
 /codon_start=1
 /product="vitellogenin"
 /protein_id="CAA25027.1"
 /db_xref="GI: 63885"
 /db_xref="GOA: P02845"
 /db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P02845"
 /translation="MRGIILALVLTVAHVVFSLFVGSQKFDIDPGFNRRSYLYNYEGSMLNGL
 QDRSLGKAGVRLSSKLEISGLPENAYLLK"

ORIGIN

1 tacacatgta atacagtaat agcaaagggt tatctggatt agcctctggc ctgcaggaat
 61 ggccataaac caaagctgag ggaagaggga gagtatagta actgtagatt atagctagtag
 121 gctattgggt tattatcagc tagataacaa ctggctcagtg ccaggccaac ataacctggg
 181 caaaaccagt ctcatctgtg gcaggaccat gtaccagcag ccagccgtga cccaatctag
 241 gaaagcaagt agcacatcaa ttttaaattt attgtaaatg ccgtagtaga agtgttttac
 301 tgtgatacat tgaaacttct ggtcaatcag aaaaagggtt ttatcagag atgccaagggt
 361 attattttga tttctttat tcgccgtgaa gagaatttat gattgcaaaa agaggaggtg
 421 ttacataaac tgataaaaaa ctgagaatt cagcagaaaa cagccacgtg ttcctgaaca
 481 tttctcata aaagtctcac catgcctggc agagccctat tcaccttcgc tatgaggggg
 541 atcactactg cattagtgt cacccttga ggtaagctta cacatccgt cttcattctt
 601 cttccctgga atttcttga gttcactgac aacaattagg ttagactgc atagactca
 661 tgtggtttt ctatctctt ttgtaggcag ccagaagttt gacattggta agtacatttc
 721 tacctataaa ctgggtgact ttgttatgat gactattcat tagaatatgc ttacagcttc
 781 tacgtaaatg gctgttattc cccacagacc caggattcaa tagcagaagg agttacctgt
 841 acaactatga aggttctatg ttgaatgggc ttcaagacag aagtttgggc aaagctgggt
 901 tgcgcttgag cagcaagcta gagatcagtg ggctaccaga gaatgcttac ctctcaagg
 961 tactggccat gtct

ลำดับเบสของยีน *VTG II* บางส่วนจากฐานข้อมูล GenBank

LOCUS	GGVITIIG 20343 bp DNA linear VRT 18-APR-2005
DEFINITION	Chicken vitellogenin II gene.
ACCESSION	X13607
VERSION	X13607.1 GI: 63886
KEYWORDS	vitellogenin.
SOURCE	Gallus gallus (chicken)
ORGANISM	<u>Gallus gallus</u> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus.
REFERENCE	1 (bases 1 to 20343)
AUTHORS	van het Schip,F.D., Samallo,J., Broos,J., Ophuis,J., Mojet,M., Gruber,M. and AB,G.
TITLE	Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin gene and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein
JOURNAL	J. Mol. Biol. 196 (2), 245-260 (1987)
PUBMED	<u>3477646</u>
REFERENCE	2 (bases 1 to 20343)
AUTHORS	Ab,G.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (28-NOV-1988) AB G., Dept. of Biochemistry, Nijenborgh 16, 9747 AG Groningen, the Netherlands
COMMENT	The sequence overlaps with that reported by Byrne <i>et al.</i> in Biochemistry 23:4275-4279(1984) K02113, by Nardelli <i>et al.</i> in J. Biol. Chem 262:15377-15385(1987) M18060, by Nardelli <i>et al.</i> Biochemistry 26:6397- 6402(1987) and Walker <i>et al.</i> in EMBO J. 2:2271-2279(1983).
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..20343 /organism="Gallus gallus"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="White Leghorn"

/db_xref="taxon:9031"

/clone="22, 24"

/tissue_type="blood"

/clone_lib="Charon 4A"

CDS

join (14...53,169...189,290...441, 1769...2020, 2532...2693, 2799...2947,
3116...3266, 3385...3542, 3625...3790, 4692...4817, 5222...5440,
6011...6228, 6345...6442, 6920...7044, 7166...7267, 7906...8025,
8112...8301, 9055...9148, 9281...9466, 9959...10103, 10225...10447,
10538...10713, 11067...11756, 12221...12271, 12525...12614,
13054...13266, 13362...13504, 13889...14027, 14568...14703,
15161...15347, 15679...15770, 16857...16954, 17704...17863,
18919...19080, 20003...20121)

/codon_start=1

/product="vitellogenin"

/protein_id="CAA31942.1"

/db_xref="GI: 63887"

/db_xref="GOA: P02845"

/db_xref="InterPro:IPR001747"

/db_xref="InterPro:IPR001846"

/db_xref="InterPro:IPR011030"

/db_xref="UniProt/Swiss-Prot:P02845"

/translation="MRGIIALVLT LVGSQKFDIDPGFNRRSYLYNYEGSMLNGLQDRSLGKAG
VRLSSKLEISGLPENAYLLKVRSPQVEEYNGVWPRDPFTRSSKITQVISSCFTRLFKFEYSS
GRIGNIYAPEDCPDLCVNIVRGILNMFQMTIKKSQNVYELQEAGIGGICHARYVIQEDRK
NSRIYVTRTVDLNNCQEKVQKSIGMAYIYPCPVDVMKERLTKGTTAFSYKLKQSDSGTLI
TDVSSRQVYQISPFNEPTGVAVMEARQQLTLVEVRSESGAPDVPMQNYGSLRYRFPVAV
LPQMPLQLIKTKNPEQRIVETLQHIVLNNQQDFHDDVSYRFLEVVLQCRANADNLESIW
RQVSDKPRYRRWLLSAVSASGTTETLKFLKNRIRNDDLNYIQTLLTVSLTLHLLQADEHT
LPIAADLMTSSRIQKNPVLQQVACLGYSVVNRYCSQTSACPKEALQPIHDLADEAISRG

REDKMKLALKCIGNMGEPASLKRLKFLPISSSSAADIPVHIQIDAITALKKIAWKDPKTVQ
 GYLIQILADQSLPPEVRMMACAVIFETRPALALITTIANVAMKESNMQVASFVYSHMKSL
 SKSRLPFMYNISSACNIALKLLSPKLDSMSYRYSKVIRADTYFDNYRVGATGEIFVNSPR
 TMFPSAIIISKLMANSAGSVADLVEVGIRVEGLADVIMKRNIPFAEYPTYKQIKELGKALQ
 GWKELPTETPLVSAYLKILGQEVAFININKELLQQVMKTVVEPADRNAAIKRIANQIRNSI
 AGQWTQPVWMGELRYVVPSCGLPLEYGSYTTALARAASVEGKMTPPLTGDFRLSQL
 LESTMQIRSDLKPSLYVHTVATMGVNTEYFQHAVEIQGEVQTRMPMKFDAKIDVKLKNL
 KIETNPCREETEIVVGRHKAFVSRNIGELGVEKRTSILPEDAPLDVTEEPFQTSERASREH
 FAMQGPDSMPRKQSHSSREDLRRSTGKRAHKRDICLKMHHIGCQLCFSRRSRDASFIQNT
 YLHKLIGEHEAKIVLMPVHTDADIDKIQLEIQAGSRAAARIITEVNPESSEEEDESSPYEDIQ
 AKLKRLGIDSMFKVANKTRHPKNRPSKKGNTVLAIEFGTEPDAKTSSSSSSASSTATSSSS
 SSASSPNRKKPMDEEENDQVKQARNKDASSSSRSSKSSNSSKRSSSKSSNSSKRSSSSSSSS
 SSSSRSSSSSSSSSSNSKSSSSSSKSSSSSSSRSSSKSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS
 HSHSHHSGHLNGSSSSSSSSRSVSHHSHEHHSGHLEDDSSSSSSSSSVLSKIWGRHEIYQY
 RFRSAHRQEFPKRKLPGDRASTRYSSTRSSHDTSRASWPKFLGDIKTPVLA AFLHGISNN
 KKTGGLQLVVYADTDSVRPRVQVFVTNLTDSSKWKLCADASVRNAHKAVAYVKWGW
 DCRDYKVSTELVTGRFAGHPAAQVKLEWPKVPSNVRSVVEWFYEFVPGA AFMLGFSER
 MDKNPSRQARMVVALTSPRTCDVVVKLPDIILYQKAVRLPLSLPVGPRIPASELQPPIWN
 VFAEAPSAVLENLKARCSVSYNKIKTFNEVKFNYSMPANCYHILVQDCSELKFLVMMK
 SAGEATNLKAINIKIGSHEIDMHPVNGQVKLLVDGAESPTANISLISAGASLWIHNENQGF
 ALAAPGHGIDKLYFDGKTITIQVPLWMAGKTCGICGKYDAECEQEYRMPNGYLAKNAV
 SFGHSWILEEAPCRGACKLHRSFVKLEKTVQLAGVDSKCYSTEPVLRCAGKCSATKTP
 VTVGFHCLPADSANS�TDKQMKYDQKSEDMQDTVDAHTTCSCENEEST"

ORIGIN

1 attcaccttc gctatgaggg ggatcact ggcattagt ctcacccctg taggtaagct
 61 tacacatccc gtcttcattc ttctccctg gaatttcctt gagttcactg acaacaatta
 121 ggtttagact gcatatagct catgtggttt ttctatctct tttgtaggc agccagaagt
 181 ttgacattgg taagtacatt tctacctata aacttggtga cttgttatg atgactatc
 241 attagaatat gcttacagct tctacgtaaa tggtgttat tccccacaga cccaggattc
 301 aatagcagaa ggagttacct gtacaactat gaaggttcta tgttgatgg gcttcaagac
 361 agaagtttgg gcaaagctgg tgtgcgctg agcagcaagc tagagatcag tgggctacca

421 gagaatgctt acctcctcaa ggtactggcc atgtcttgtt ccaaacgcac caaccaacac
 481 tgaattcaag tcacattcat ttacaggtgt ttgctcacc tgtgttcaa gaaggctata
 541 ggagacagaa ttggaaactt agtactgtag gtttcagaga atggtttgc aactgaagt
 601 tcaaatttga ggagtgttt accatccaat tgcttacatg tgcttactgt gaaaattgt
 661 tgtagcaggg acttctcaag actttatatg tgaagtagag gtgtcaatac cagggattct
 721 gttacaaaat gtttatttct aacttaaggc acttcagcct gctctgattt taagatttta
 781 ttcaatttcc aacaatatt tccaagtcct gtggggagaa aggacttggg tatgtagaat
 841 gcagatacgc agatctatgg tcatgcagat aattaataag catagattgt gtttacacac
 901 ttgggggaaa acgtgggagg catcagaaag gacatctctc aagggtttta gaagagctgt
 961 agagcttcta tcgttaagga tgaagctcgt taagatatca aatgagttag ggattgtact
 1021 tctcattgtt gtattgatcc tgaattgtg ttgagtgtcc cagacggtgc tctgagggac
 1081 acacctcaac ttgctgtaac ttcaacaaag tcagtaaaat tgcttctgat ttccattgtg
 1141 tttctgtatg tagaaggaaa caagcaaaca aacgaaaaag tgttgattta atcaattcat
 1201 aactatggat caaatatggt aacttgttta gtcaaagcaa taaactttt ttgagaggg
 1261 gaagaattaa aatgaagcat tctaagaatg gttggggggg gggagggggg tggftgggta
 1321 ggaattagaa tgattttaca atttaaagt taaatttagt ccaaagcaga tccaggcaca
 1381 gctattgtag ttaaggctg aagaaaaatg gagggaattt catttgattt acttgaaatt
 1441 tcattttatt actttctgaa tgatttttc cccctctgta gtccatgaga gtaaaactgt
 1501 cacaatcttc ccaagagta acaagggcgt gttaactgct tctctacagc aaaagagcac
 1561 tattgagccc ccaggacttg taccgatttt acaaagtaag caacagatag aagaatcaa
 1621 gaatcaactg ctactggac atctaagcct aaatttgaa ggaaggagta gataactagt
 1681 gattaggtca atttttcca atctgtttac acatttagtg ccaaagtaat ttattcacg
 1741 tcagtatata tttttatctt cctctcaggt ccgctctcca caagtggagg agtacaatgg
 1801 ggtctgcccc agggatccct tcaactgac ttccaaaac acccaagtga tctcatcgtg
 1861 tttcacccgg ctcttcaaat ttgaatacag cagtggacgg atcggaaca ttatgcccc
 1921 agaagactgc ccagatctgt gtgttaacat agtgagagga atattgaaca tgttccagat
 1981 gaccattaaa aaatcacaga acgtctacga attacaagag gtttgtgtt tccattccca
 2041 tttctaaaac aactttgctg aaaggatgag ttctgggttag gggctcttca ttcaggtttt
 2101 tctttatttg aatctccttt caagcataca tcgtgaaaaa ctgtgtttt tcattcacat
 2161 agaaaataca tgtgaacatg ttgaaggaat tgcttttgc ggaattcttt aaaagcattt
 2221 gttaaattgc tttgtttaaa acgcaatacc ttcatcaaga aggaaccatt ttctgagatc

2281 cttgactgaa tttaaaatat gtctatttca tgcgtttgtc tgtctgtttt ttagtttgg
 2341 aggattaatt gtgagcaatg ggtaacagct ttcaaacat agatgagtga atccttatcc
 2401 aatttgtctt tgcccaaac atgtctcggg gtatccttac cctcctatgg atacttcaaa
 2461 gattgttctc ctgcaggga atcctgatac aattcacaag tctctctctc tctctcaact
 2521 tatcccttca ggctggaatt ggaggtattt gtcattgcaag gtatgtcatt caggaagaca
 2581 ggaagaatag ccgaatctat gttaccagaa ctgtggactt gaataattgc caggaaaagg
 2641 tgcaaaaaag cattggaatg gcttacatct atccctgccc tgtggacgtg atggtatgtg
 2701 agacgtggaa agaccttct caccacaagc aggtggaaaa gatgagtaac acgagccatc
 2761 tgccccattc actctgtgct ctctctgtgc ttctctagaa agaaaggctc accaaaggga
 2821 ccaccgcttt ctctacaag ctgaagcagt cagacagcgg cacgctgac acagatgtct
 2881 cgtcgggca ggtgtatcag atctcccat tcaatgagcc cactggggtg gctgtcatgg
 2941 aagcaaggta ggtgaggtgc agggctgctt ctctaagtga gaataattgc aagtttggg
 3001 ggtcccttc aacctagat gaaatgagaa gagaattgag ctagcagca gttgggtaaa
 3061 gctgtaagta cacatactta atgacaactt ctattcctc tctgtgcctt gacagacagc
 3121 agctcacttt ggtcgagggtg agaagtgagc ggggcagtgc ccagatgtc cccatgcaga
 3181 actatggcag ccttcgtac cgttcccag ccgtactgcc acagatgcca cttcagctga
 3241 tcaagacaaa aaacctgag caacgggtat ggaatgctta ggtctttgaa tcactgtctt
 3301 aattgaaat taagtacca gaaataggat cagaaatacc aagggaattta atgacatgtc
 3061 gctgtaagta cacatactta atgacaactt ctattcctc tctgtgcctt gacagacagc
 3121 agctcacttt ggtcgagggtg agaagtgagc ggggcagtgc ccagatgtc cccatgcaga
 3181 actatggcag ccttcgtac cgttcccag ccgtactgcc acagatgcca cttcagctga
 3241 tcaagacaaa aaacctgag caacgggtat ggaatgctta ggtctttgaa tcactgtctt
 3301 aattgaaat taagtacca gaaataggat cagaaatacc aagggaattta atgacatgtc
 3361 cttctctct ctgtgttgt acagatagta gaaacgtgc agcacatagt cctgaataac
 3421 caacaagatt tccatgacga tgttcatac agattcttag agtggtcca gcttgccgg
 3481 atagcaaatg ctgacaatct tgagtctatc tggagacaag tttagataa acctcgttac
 3541 aggtatttca ttgtgaatc tgctgtgaaa ttcttctt ctggagacct gagagctaga
 3601 cttcttttc taactgtct gcaggcgatg gctcctgagc gcagtttctg cgagtggcac
 3661 cacagaaaca ctaaaattcc ttaagaacag aattcgcaat gatgacctca actacattca
 3721 gaccttcta actgtttctt tgactcttca ttattgcaa gctgatgaac acacattcc
 3781 aatagcagca gtgagtaaat ccatgtgaat cttccaatt tggtagcaaa aagaatgta

3841 attgatggca accttgatt ataaagtca ctagagtggg ttctccatc atgtatacca
 3901 attttgcata tatgctgac catgatttt tttatttat ttaacatat atgagaagat
 3961 aatgcatctt caatttggtg tagtgataga agagcccttc tctcttaaca gcttctgaga
 4021 agtagtacca ttttagtatg ctggactaat ctgtcatgcc ttctacaggc aaattcttg
 4081 tccacattat ctctccttc tgaacataa atggtgattt gtgcattgca tcattgaat
 4141 ggctcttgta attacaaaac attcctataa attggaaagc gctgcaagtt aaaatgttag
 4201 tgcaaagtc aaatagtttg cacggtgcat agaatagtgt aatcatttat actgaacagg
 4261 attttttcc catctaat caglatcct ctctgtaagt aggaagcaaa atatattagc
 4321 tgacagtget ttctaatgc aattgagaca cacgctgttc taaagatgtt ctatttttg
 4381 actgatgttc acccataatc ttactttgt gtaatgctca actgaggaaa atcaaatggc
 4441 tctccatgaa ctaatatgtg tgctattta tgtgaaacc aatgtggaac taaggctcta
 4501 agtgaatctt gtaaatgaaa tgtctacagg ctgatttaat ttgtcttgat gtgaagaata
 4561 atcattctga aattactccc ctagataag ctgtgatgat ttctctctc tgacagctat
 4621 gccaaagcatt gtctaaatg ccaatgttaa tttatgtat ttatttctt ttcttttat
 4681 tctcccaca ggattaatg accagctctc gaattcagaa aaatcctgtg ctccagcaag
 4741 tggcctgett gggatatagc tctgtagtca acagatactg ctctcagacc tcagcatgic
 4801 ctaaggaagc tcttcaggta ggtaaatgta cacttggtat tgtacactac ttgggttaa
 4861 ctctttttg atctggtatg aatatgttga ctagacattt ttaactatc agtcaactag
 4921 acaaatgcac atttcattgg cctccttcag aacaaaggca ataatcatt ttactaaagt
 4981 agacaataat tcaataatt catcactgaa aacacagctt tcacatctt ttttggttg
 5041 ttgtttcc cctctttt ttctacag ccatcactgg gtactttat taggaccatt
 5101 tactttatcg tgatagctt ttagtgggt atggggaaaa ctatggacaa tacatatata
 5161 tatatacata tatatgata cattaggtag aaaaggttga actgtgctt gtgtccata
 5221 gccatccat gacctggcag atgaagcaat cagcaggggc cgtgaagaca aatgaaatt
 5281 agctctaaag tgcatggta acatgggaga accagccagc taaagcgca tctgaagtt
 5341 cttccaata tctcatcca gtgtgtga tatcccagtc cacattcaga tagatccat
 5401 aacggccttg aaaaagatag ctggaagga ccccaaaaca gtaagtaaca tctgtcaggg
 5461 atttcttac ttaaggaact gaagaaagaa aatgtatgct ctgagggtta ttaattcaat
 5521 aacatcaaat ctgtggttc attatgttg ctattttta agaacaacag aatacaagct
 5581 tacattctg ctagtgttt ctgtaatat ataataata tcgttcagta gaaagcttc
 5641 agaagggtat cagcactgtt tctgaagta actgatataa cgaattaagt ctgatgttg

5701 ctatatatgg tagaaattta gccacttaga agtggataat ttagtcttcc tcaagagtca
 5761 tgaggagaga gagagagacc ttctgttgac ttctcaggca aaatgctgcc atagagctgc
 5821 ttcttttaga cctttccctg acgttgggtg agtcaccagt gacctcctgt tgaccactgg
 5881 ggttacttgc atggcgagta taggcaaggc ttgggtcttt cagatgggtg agacagctaa
 5941 aggtgttata ggaggcagac tccagtcaga cagtctttgg taattcccaa caatgtgttt
 6001 ctctctgcag gtgcagggtc atctcatcca gatccttga gaccaatcac tccccctga
 6061 ggtgcgaatg atggcttgtg ctgttatctt tgagacaagg cctgcccttg ctttgataac
 6121 gactatagct aacgtggcaa tgaaggagag caatatgcaa gtggccagtt ttgtatattc
 6181 ccacatgaag tctttgtcaa agagcagatt gccatttatg tacaacatgt aagtagagac
 6241 aagaataaag tgtgctatct tctgcatttg ctgacaaact gaattcattt tcttattctg
 6301 atggagtata gctttttctg aatatattac ctttctttgt atagatcttc cgcttgtaac
 6361 attgccctta agctcctgtc ccccaaactg gacagtatga gctatcggta cagcaaggtc
 6421 attcgagcag acacttactt tggtagagtaa agcatttcag cgactttaga aatcccttct
 6481 gaagggttac caagttcttt ggaggaatgc aaattgtcag tgcctgtgtg gtttatgtct
 6541 agagaagttt tcccccttag aactgctgat ctctgcaaaa agagattctg taaaatgctt
 6601 gctaagattg gtttctgaaa tgtttagttt attttttatt gaaaaattaa tctatttctt
 6661 cttacaacta tggtagaagc ttctccatt taatacagaa attacgtata ttaataata
 6721 ttaatgatt taataattaa ttgataatat ttactattta atagtattta ataatagtac
 6781 aggagtactt gagcctgaac aatttgaact cacgtaatga tgtatcttag agtcagtaac
 6841 taaaaaagct ccagaaatac agtctttaat gatgagtaga atggttagaa aaatggcttt
 6901 ttatttactt ctgccccaga taactataga gttggtgcta ctggagaaat ctttgttgtg
 6961 aacagcccaa gaactatgtt cccatcagca ataattcca aattgatggc aaattctgca
 7021 ggttcagtgg ctgactcgtt agaggtaaatt atttacttaa attagtaata aagcaaatgg
 7081 aacaattttc atattaaaat ttgactccta agttccact ctgtaagtac gtttcagact
 7141 attccttctc acattgtttt ttaggttgg catccgagtg gaaggcctcg cagatgtcat
 7201 aatgaaaaga aacatcccat ttgctgaata tcccacatac aagcagataa aggagcttgg
 7261 aaaagctgta ggtgttttta gcaatataat gtgtgggtta catgaaggga tatttagtga
 7321 ggcttatcat gaaagttaag ctcatctcag aggggacgtt acccaccagc agtcagtttg
 7381 agtatctctg cagtgaact gcaggagaca ttctcctgt aatgtctgtg acagcttttg
 7441 caagtcttgc tgcagcacca ctctctccc acctcagata tgactgcagg aggagcagag
 7501 agatgagggg aaagtggatg tcacagcaca aacatctccc atgcctggca ggttttctcc

7561 tccctccgtt ttccagcgt agtttataag ttctctttaa cttcaagaga aatggtgatt
 7621 tgggtgcaatg ctttcagact ggggttaaca gcacaaatgg cccagcccct ctgcatcaga
 7681 gtaaaagttg tttcaccgga atagaggaca gtggataggg aacatcacag tgataggaag
 7741 tatgtctaaa atagcaacac tacacagtta acaggacaac aaggaaatat gaggggcaaa
 7801 agaaggctgt ggggttggtca gtaatagttg tcattgcctt gctaaactgc catttgtaaa
 7861 gtgtgcatc aaggaacttc actgtttcc tgatctgttc cttagctgca gggatggaaa
 7921 gagctgccga cagaaacccc ttggtatca gcctactga aaatacttg ccaagaagtg
 7981 gccttcata acatcaacaa ggaactcctg caacagggtca tgaagggtacc agggccccct
 8041 actttcttt gcaagactg acaccactgt ccttcattt cctcacccct tggacctctg
 8101 tcttctgcca gactgtagtg gaacctgtg atcgaaacgc agcaataaag agaatcgcca
 8161 accagatccg caacagcatt gcagggcagt ggacgcagcc ggtgtggatg ggagagctgc
 8221 gatactggtg tcccagctgt ctcggcctgc cgctggagta cgggtcctac accaccgccc
 8281 tggcacgagc tgcatgcagc ggtgggttgg gaagtatgag gtctgctgtg ccagcgagtg
 8341 ggaggggacag gctaagagag gctgggggaaa gatgtaggaa agcatacaaa caaaaaaag
 8401 cctgatgttt ttagtgcatt aaaacacagg aggagagata gtgaagggtat taaaaaagaa
 8461 gctggacgca catgaaagcg gtgagagttg tcactgtgct ggggggtcgg gctgccgctc
 8521 caggggacgg cgacaggctg gagggatggc ctgacaggag tgtgctgaat cgtggcaaag
 8581 ggacagagta acccccgtgc gtgtgcaggc tgggcatcgc ccaggcagca gccgctttgc
 8641 agaaaagggc ctgggaggcc tgggtggataa gttgatggtg aatcggcagc gttctctgt

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1. นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยใช้กระดาษ kimwipe เช็ดให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น
2. เช็ดกระจกทั้ง 2 แผ่นด้วย clear view เพื่อป้องกันเจลติดกระจก
3. จากนั้นเช็ดกระจกทั้ง 2 แผ่นด้วยแอลกอฮอล์ 95% อีก 1 ครั้ง
4. นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง แล้วประกบเข้ากับตัวเครื่อง electrophoresis จากนั้นเทเจลที่เตรียมไว้ลงไป

การเตรียม Polyacrylamide gel สำหรับแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอ

การเตรียม Polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 8 และ 10% (acrylamide : bisacrylamide = 49 : 1) โดยมีส่วนผสมดังนี้

ตารางผนวกที่ 1 ส่วนผสมในการเตรียมเจล

สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้สำหรับเตรียมเจล 70 มิลลิลิตร	
	เจลเข้มข้น 8%	เจลเข้มข้น 10%
40% acrylamide gel	17.5 ml	14 ml
5x TBE	14 ml	14 ml
dH ₂ O	38.5 ml	42 ml
10% APS	700 µl	700 µl
TEMED	70 µl	70 µl

ผสม acrylamide, TBE และน้ำในบีกเกอร์หรือขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หัวลงปิดด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าจะปล่อยเจลไว้ข้ามคืนควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิดด้านบนและล่างของเจลไว้ เพื่อให้มีความชื้น

การย้อมชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่บน Polyacrylamide gel ด้วยวิธี Silver Staining

1. แกะแผ่นเจลออกจากกระจก แล้วแช่ใน 10% Acetic Acid เพื่อตรึงแถบดีเอ็นเอบนเจล เป็นเวลา 20 นาที
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
3. แช่แผ่นเจลใน Straining Solution (0.1% Silver Nitrate) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

4. ทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยแช่แผ่นเจลใน Developer Solution (anhydrous Na_2CO_3 , 37% Formaldehyde และ 10 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ที่เตรียมใหม่ และแช่เย็นจัด จนกว่าแถบดีเอ็นเอจะปรากฏ

5. หยุดปฏิกิริยา โดย Stop Solution (10% Acetic Acid) เป็นเวลา 3 นาที

6. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไปทำให้แห้ง แล้วนำไปถ่ายรูป

วิธีการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด kit (Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)

1. วาง SV Minicolumn ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
2. ใส่ PCR product ลงใน SV Minicolumn แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
3. นำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm (16,000 x g) เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน microcentrifuge tube ที่
4. ล้าง SV Minicolumn โดยเติม Membrane Solution (ที่เจือจางด้วยเอทานอล 95%) 700 μl แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm (16,000 x g) เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน microcentrifuge tube ที่ หลังจากนั้นล้าง SV Minicolumn อีกครั้งด้วย Membrane Solution (ที่เจือจางด้วยเอทานอล 95%) 500 μl แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm (16,000 x g) เป็นเวลา 5 นาที
5. นำ SV Minicolumn ไป centrifuge อีกครั้ง เป็นเวลา 1 นาที
6. ย้าย SV Minicolumn ไปยัง microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม Nuclease-Free Water โดยเติมลงตรงกลางของ column และไม่สัมผัสกับ membrane จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm (16,000 x g) เป็นเวลา 1 นาที
7. เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -20 °C

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกุลสุดา ชมวิศรุตกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 กรกฎาคม 2525
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	วท.บ (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (พ.ศ. 2546)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย ภายใต้โครงการพัฒนาระบบบัณฑิตศึกษา และการวิจัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน