



วิทยานิพนธ์

การใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจหาเอนโดจีนัสรีโทรไวรัสในไก่

USING PCR TECHNIQUE FOR DETECTION
OF ENDOGENOUS RETROVIRUSES IN CHICKENS

นายนาวี ม่วงแขก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจหาเอนโดจีนัสรีโทรไวรัสในไก่

Using PCR Technique for Detection of Endogenous Retroviruses in Chickens

โดย

นายนาวิ ม่วงแขก

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.อนุชัช ภิญญโณภูมิมนตรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ทวีศักดิ์ ส่งเสริม ประธานการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความอนุเคราะห์ตลอดการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์วิจัยและพัฒนาไก่พื้นเมือง อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดสัตว์ทดลอง และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และคอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา

สุดท้ายนี้ ประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแต่บิดามารดา และครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้การศึกษา และเป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่งตลอดมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นาวิ ม่วงแจก
พฤษภาคม 2551

สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------|------|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (3) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 23 |
| อุปกรณ์ | 23 |
| วิธีการ | 23 |
| ผลและวิจารณ์ | 30 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 45 |
| สรุป | 45 |
| ข้อเสนอแนะ | 46 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 47 |
| ภาคผนวก | 57 |
| ประวัติการศึกษา | 67 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|--------------|---|------|
| 1 | Diseases of domestic animals caused by Retroviruses | 6 |
| 2 | ไพรมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน ALVEs | 28 |
| ตารางผนวกที่ | | |
| 1 | ส่วนผสมในการเตรียมเจล | 65 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | โครงสร้างและองค์ประกอบของ Retrovirus | 8 |
| 2 | วงจรชีวิตและการเข้าเชื่อมต่อของ Retrovirus | 11 |
| 3 | โครโมโซมของไก่ | 16 |
| 4 | ขบวนการของเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) | 19 |
| 5 | จำลอง Annealing site ในปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ | 32 |
| 6 | ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-1 ที่มีขนาด 505 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลียง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100bp | 33 |
| 7 | ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-12 ที่มีขนาด 320 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลียง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100bp | 34 |
| 8 | ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-15 ที่มีขนาด 180bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลียง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100bp | 35 |
| 9 | ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-21 ที่มีขนาด 510bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลียง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100bp | 36 |
| 10 | ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-B3 ที่มีขนาด 458bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลียง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100bp | 37 |
| 11 | รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน ALVE-B3 ในไก่สามเหลียง (เลนที่ 1-2) ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า (เลนที่ 3-4) ไก่พื้นเมือง (เลนที่ 5-6) และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (เลนที่ 7-8) | 39 |
| 12 | ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ตำแหน่ง ALVE-B3 โดยสุ่มจากไก่เนื้อ ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง โดยเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่ม | 43 |

การใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจหาเอนโดจีนัสรีโทรไวรัสในไก่

Using PCR Technique for Detection of Endogenous Retroviruses in Chickens

คำนำ

ไก่เป็นสัตว์ปีกที่มนุษย์คุ้นเคยมากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยไก่ถูกนำมาเลี้ยงเพื่อความเพลิดเพลิน และเลี้ยงเพื่อใช้บริโภคเป็นอาหาร ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคเนื่องจากมีปริมาณไขมันต่ำและไม่ขัดต่อหลักศาสนาทุกศาสนา นอกจากนี้ไก่ยังเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยที่ทำรายได้เข้าประเทศมากที่สุดในด้านปศุสัตว์ที่มีการเลี้ยงทั้งหมด เพราะมีการส่งออกเนื้อไก่ติดอยู่ใน 10 อันดับแรกของสินค้าเกษตรกรรมส่งออกที่สำคัญ ประเทศไทยจึงจัดเป็นประเทศผู้ผลิตเนื้อไก่ที่สำคัญของโลก ทำให้มีประเทศไทยมีคู่แข่งทางการค้ามากขึ้น จึงมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในหลายด้าน เพื่อปรับปรุงพันธุ์กรรมและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงตลอดเวลา ส่งผลให้ลักษณะบางประการที่ถ่ายทอดจากบรรพบุรุษหายไป เช่น ลักษณะของการต้านทานโรค (**disease resistance**) โดยการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ไก่ที่มีวัตถุประสงค์หลักไปในทิศทางเดียว คือ เพิ่มผลผลิต ทำให้ลักษณะต้านทานโรคไม่ถูกคัดเลือก ปัจจุบันความสนใจที่จะศึกษาในด้านความต้านทานโรคมียาวขึ้น จนมีการศึกษาไปถึงในระดับของอณูชีววิทยา เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ในระดับยีนให้มีการพัฒนาเพิ่มปริมาณผลผลิตควบคู่ไปกับระดับของความต้านทานโรคให้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

โรคลิวโคซิสหรือโรคลิวโคซิโตมเพล็กซ์ เป็นโรคเนื้องอกหรือมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในไก่ ซึ่งไก่ทุกสายพันธุ์ไวต่อไวรัสชนิดนี้ และสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากในไก่ที่ใช้เวลาการเลี้ยงที่ยาวนาน และพบว่าโรคลิวโคซิสมีสัมพันธ์กับเอนโดจีนัสรีโทรไวรัส (**endogenous retrovirus**) และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ โดยเชื้อเอนโดจีนัสรีโทรไวรัสมีการก่อโรคทำให้ไก่ทรุดโทรมหรือตาย หรือไม่มีผลเสียต่อสุขภาพและผลผลิต ในไก่ไข่ทำให้มีปริมาณไข่น้อยลง ความสูญเสียที่เกิดขึ้นไม่แน่นอน มีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ไก่ ทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาหาความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอของ **endogenous retrovirus** ในไก่สายพันธุ์ต่างๆ ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการต่างๆ ในการตรวจสอบ **endogenous retrovirus** ให้รวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ คือ การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอโดยเทคนิค **polymerase chain reaction (PCR)** ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ที่จำเพาะกับยีนของ **endogenous retrovirus** ในไก่แต่ละสายพันธุ์ โดยเทคนิค **PCR** เป็นเทคนิคที่รวดเร็วและให้ความแม่นยำสูง ซึ่ง

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะทำให้การควบคุมและป้องกันโรคมมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพ่อแม่พันธุ์

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาตรวจสอบ **endogenous retrovirus** ในไก่ 4 สายพันธุ์ ที่เป็นสายพันธุ์ทางเศรษฐกิจและเลี้ยงภายในประเทศ มีผลผลิตและการเติบโตที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ไก่ไข่เป็นสายพันธุ์ที่ให้ไข่ดก โตช้า ไข่เปลือกสีน้ำตาลและใช้เวลากการเลี้ยงยาวนาน สายพันธุ์ไก่เนื้อโตเร็ว ให้น้ำหนักเฉลี่ย 1.9 กิโลกรัม ใช้เวลาเลี้ยงสั้นประมาณ 39-42 วัน สายพันธุ์พื้นเมืองเป็นไก่ที่มีวิวัฒนาการมาจากไก่ป่าสีแดง ให้ไข่น้อย โตช้าและมีความต้านโรคสูง สายพันธุ์สามเหลี่ยมเป็นไก่พื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ให้ไข่น้อย โตเร็วปานกลางปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี โดยการนำเทคนิค **PCR** มาใช้ตรวจหาและวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของ **endogenous retrovirus** ในไก่แต่ละสายพันธุ์ และศึกษาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างไก่สายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการชักนำการเกิดโรค ลิวโคซิส และนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อโรค ลิวโคซิสต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษายีนที่เจาะจงกับ **endogenous retrovirus** โดยเทคนิคพีซีอาร์
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างลำดับเบสของยีน **endogenous retrovirus** และบริเวณจำเพาะการเข้าแทรกตัวของ **Avian Leukosis Virus** ภายในไก่แต่ละสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์

การตรวจเอกสาร

ไก่เป็นสัตว์ปีกชนิดหนึ่งจำพวกเดียวกับนกทั่วไป แหล่งกำเนิดต้นตระกูลของไก่อยู่ในภูมิภาคเขตร้อนแถบเอเชีย บริเวณประเทศไทย จีน ลาว ญวน กัมพูชา พม่า อินเดีย ซึ่งไก่พื้นเมืองมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Gallus domesticus* ที่มีบรรพบุรุษมาจากไก่ป่าสีแดง (red jungle fowl: *Gallus gallus*) ไก่เป็นสัตว์เลือดอุ่นที่มีลักษณะพิเศษ ลำตัวปกคลุมไปด้วยขน (feathers) มีปีก มีขา 2 ขา ใช้เกาะ เดิน โดยปกติมีเท้า 4 นิ้ว มีปาก (beak) ยื่นออกมายาว ไม่มีฟัน ปอดติดอยู่กับซี่โครง และมีถุงลมช่วยในการหายใจ ไม่มีกระเพาะปัสสาวะ อุณหภูมิของร่างกายอยู่ระหว่าง 40-42 องศาเซลเซียส มีโครโมโซม 39 คู่ แบ่งเป็นโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ (macrochromosome) 8 คู่ โครโมโซมขนาดเล็ก (microchromosome) 30 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ คือ โครโมโซม Z และโครโมโซม W ซึ่งสามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธานของไก่ได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Aves

Order Galliformes

Family Phasianidae

Genus Gallus

Species - *G. domesticus*

- *G. gallus*

ในการเลี้ยงไก่ให้ได้ผลผลิตสูงและคุณภาพที่ดีนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับปัจจัยด้านอาหาร สายพันธุ์ของไก่ และการเลี้ยงดูแล้ว การควบคุมโรคก็นับว่าเป็นอีกหนึ่งสิ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากมีโรคติดเชื้ออยู่หลายชนิดที่ก่อให้เกิดผลกระทบอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ อีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ คือ การเพิ่มระดับความต้านทานต่อโรคซึ่งมีผลทางเศรษฐกิจในการเลี้ยง โดยการเพิ่ม **genetic potential** ต่อการต้านทานโรคจากการคัดเลือกสัตว์ที่จะนำไปทำเป็นพ่อแม่พันธุ์ ทำให้ได้สัตว์ที่มีความต้านทานต่อโรคสูงขึ้น ช่วยให้ลดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูน้องลง (Bennett *et al*, 1999)

ด้วยความก้าวหน้าทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลในปัจจุบัน มีการศึกษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระดับยีนและดีเอ็นเอเพื่อที่จะศึกษาหาความสัมพันธ์ของยีนในสิ่งมีชีวิต ลักษณะของโรค ลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายๆ ลักษณะที่สัตว์แสดงออก ซึ่งการเรียนรู้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้ทำให้มีการสูญเสียทางเศรษฐกิจลดลง

รีโทรไวรัส (Retrovirus)

Retrovirus

รีโทรไวรัสจัดจำแนกอยู่ใน **Family Retroviridae** ไวรัสในตระกูลนี้มีสมาชิกที่ทำให้เกิดและไม่ทำให้เกิดมะเร็ง (ตารางที่ 1) **retro** ภาษาลาตินแปลว่า ย้อนหลัง (**backward** หรือ **reverse**) ที่มีชื่อนี้เพราะว่า ไวรัสกลุ่มนี้มีเอนไซม์ **reverse transcriptase (RT)** ทั้งหมดเป็นไวรัสที่มีขนาด **90-130 nm** ซึ่งแตกต่างจากไวรัสชนิดอื่น คือ มีเอนไซม์ **reverse transcriptase** หรือ **RNA dependent DNA polymerase** ใช้เปลี่ยน **genomic single stranded RNA** ให้เป็น **double stranded DNA** โดยใช้ **RNA** เป็นแม่พิมพ์ (**template**) ขบวนการนี้ย้อนกลับกับขบวนการที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ซึ่งสร้าง **RNA** ขึ้นจาก **DNA template** (ขบวนการสร้าง **RNA** จาก **DNA template** เรียกว่า **transcription**) ก่อนที่จะมีการ **integrate** เข้าไปยัง **DNA** ของโฮสต์ ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดนี้

Retroviridae จำแนกได้เป็น 3 subfamilies

1. Oncovirinae ทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ต่างๆ แบ่งย่อยเป็น 3 genera ได้แก่

1.1 **Genus Oncovirus B** ได้แก่ ไวรัสที่ทำให้เกิดมะเร็งเต้านมในหนู คือ **Mouse mammary tumor virus** หรือเรียกว่า **Bittner's virus** หรือ **milk factor** พบในหนูตะเภา ลิงบาบูน และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ

1.2 **Genus Oncovirus C** ได้แก่ ไวรัสที่ทำให้เกิด **Leukemia** และ **Sarcoma** ในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น **Rous sarcoma virus** ในไก่, **Avian leucosis virus** ในไก่, **Friend leukemia virus** ในหนู, **Feline leukemia virus** และ **Bovine leukemia virus**

1.3 Genus *Oncomavirus* D ได้แก่ Mason Pfizer monkey virus ใน rhesus monkey และ Sheep pulmonary adenomatosis virus

ตารางที่ 1 Diseases of domestic animals caused by Retroviruses

| Subfamily | Host | Virus | V-onc | Diseases |
|------------------------|---------|---|-----------------|---|
| Oncovirinae | Chicken | Avian leukosis virus | - | Lymphomas, leukemias, anemia, osteopetrosis |
| | | Avian sarcoma viruses | + | Sarcomas |
| | | Rticuloendotheliosis viruses | - ^a | Lymphomas, anemia, sarcoma |
| | Cattle | Bovine leukemia virus | - | Leukemia |
| | Swine | Porcine sarcoma virus | + | Sarcoma |
| | Cat | Feline leukemia viruses | - | Leukemia |
| Feline sarcoma viruses | | + | Sarcoma | |
| Lentivirinae | Sheep | Maedi-visna virus | na ^b | Maedi-visna progressive pneumonia |
| | Goat | Caprine arthritis-encephalomyelitis virus | na | Arthritis, encephalomyelitis |
| | Horse | Equine infectious anemia virus | na | Anemia |
| Spumavirinae | Cattle | Bovine foamy virus | na | None |
| | Cat | Feline foamy virus | na | None |

หมายเหตุ ^aReticuloendotheliosis virus-T is a recombinant that contains a v-onc

^bna, not applicable

ที่มา: ดัดแปลงจาก *Fenner et al. (1987)*

2. **Lentivirinae** ทำให้เกิด **slow infection** หรือ **chronic disease** ในคนหรือสัตว์ โดยมีระยะพักตัวของโรคนาน เช่น **Visna-maedi virus** ทำให้เกิดอาการปอดอักเสบ เนื้อเยื่อสมองและเนื้อเยื่อหุ้มสมองอักเสบในแพะแกะ (เกรียงศักดิ์, 2536)

3. **Spumavirinae** จัดเป็นกลุ่ม **commensal virus** ในเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสนี้จะเกิดช่องว่างภายในและเซลล์ตาย

Avian leukosis virus (ALV) เป็นรีโทรไวรัสชนิดหนึ่งที่ก่อโรคในสัตว์ปีก ซึ่งตัวรีโทรไวรัสก่อให้เกิดโรคในสัตว์หลายชนิด แต่ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีกคือ **Avian type C retrovirus** เป็นสาเหตุของโรคเนื้องอก เช่น **Avian leukosis virus (ALV)** และ **Avian sarcoma virus (ASV)** เป็นต้น

นอกจากนี้ไวรัสในกลุ่ม **Avian leukosis virus (ALVs)** ในไก่แบ่งเป็น **6 subgroup** ได้แก่ **subgroup A, B, C, D, E** และ **J** ซึ่ง **subgroup J** เป็น **subgroup** ที่เพิ่งแยกได้หลังสุดโดยแยกได้จากสายพันธุ์ไก่เนื้อ (Payne *et al.*, 1991; Bai *et al.*, 1995b) ส่วน **subgroup E** เป็น **endogenous leukosis viruses** ที่มีคุณสมบัติในการก่อโรคม้า ซึ่งการแยกความแตกต่างระหว่าง **subgroup** ทั้ง **6 subgroup** จะพิจารณาจากความแตกต่างทาง **genetic type** ที่แสดงออกโดย **viral envelope antigen** จาก **chicken embryo fibroblasts** ซึ่งมีผลมาจาก **envelope glycoprotein** ที่มีอยู่บนผิวของอนุภาคไวรัส (Payne และ Fadly, 1997; Adkins *et al.*, 2000)

โครงสร้าง Genome ของ Retrovirus

Genome ของ **Retrovirus** โดยทั่วไปจะประกอบด้วยยีนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ

gag: สำหรับ **code** การสร้างโปรตีนที่เป็น **capsid**

pol: สำหรับ **code** การสร้างเอนไซม์ **reverse transcriptase**

env: สำหรับ **code** การสร้างโปรตีนสำหรับส่วน **envelope**

ไวรัสที่ทำให้เกิดเนื้องอกบางตัวอาจมี **genes** เพิ่มเติมที่เรียกว่า **viral oncogene** หรือ **v-oncogene** นอกจากนี้ยังมี **gene** องค์ประกอบที่อาจพบได้อีก เช่น **common region (C-region)**,

transactivating transcriptional gene (tat) หรือ **long terminal repeats (LTR)** ซึ่งอยู่ปลายทั้งสองข้างของ **genome** ซึ่งเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างและองค์ประกอบของ **Retrovirus**

ที่มา: คัดแปลงมาจาก *Sacco et al. (2000)*

Retrovirus แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างของ **genome** และการทำให้เกิดโรค คือ

1. **Chronic leukemia virus** เช่น **murine leukemia** ไวรัสกลุ่มนี้มีแต่ยีนพื้นฐาน **gag pol** และ **env** เท่านั้น

2. **Acute leukemia/sarcoma viruses** เช่น **avian sarcoma virus** มี **oncogene** เพิ่มขึ้น

3. **Trans-regulating viruses** เช่น **HTLV-I, HTLV-II** มี **tat gene** เพิ่มขึ้น โดย **tat gene** ทำหน้าที่ควบคุมอัตราการเพิ่มจำนวนของไวรัส และกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติ

โครงสร้าง **genome** ของ **retrovirus** (ภาพที่ 1) ไวรัสที่มี **genome** ครบถ้วนตามนี้จะเพิ่มจำนวนได้ด้วยตนเอง แต่ **retrovirus** บางตัวเป็น **defective virus** ต้องการ **helper virus** ตัวอื่นมาช่วยในการเพิ่มจำนวน

Oncogene เป็น **gene** ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเนื้องอก ซึ่ง **retrovirus** เป็น **RNA viruses** ที่มี **oncogene** อยู่ใน **genome** ไวรัสที่มีความสามารถในการก่อมะเร็งสูง มักจะมี **oncogenes** อยู่ใน **genome** ด้วย ซึ่งยีนพวกนี้จะพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังเกือบทุกชนิดและลำดับเบสใน **DNA** ของยีนเหล่านี้จะใกล้เคียงกันมาก (เกรียงศักดิ์, 2536) ในแง่วิวัฒนาการสันนิษฐานว่า **viral oncogene (v-oncogenes)** ที่พบในไวรัสนั้นอาจได้มาจาก **cellular oncogenes (c-oncogenes)** ในเซลล์ปกติอาจเกิดขึ้นจากขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสจะมีการ **integrate** ของ **DNA** ของไวรัส (**provirus**) เข้า

ใน DNA ของเซลล์ ซึ่งอาจใกล้กับตำแหน่งของ **cellular-oncogenes** ขั้นตอนการสร้างหรือเพิ่มจำนวนของจีโนมของไวรัสอาจรวมเอาส่วนของยีนดังกล่าวเข้ามาด้วย

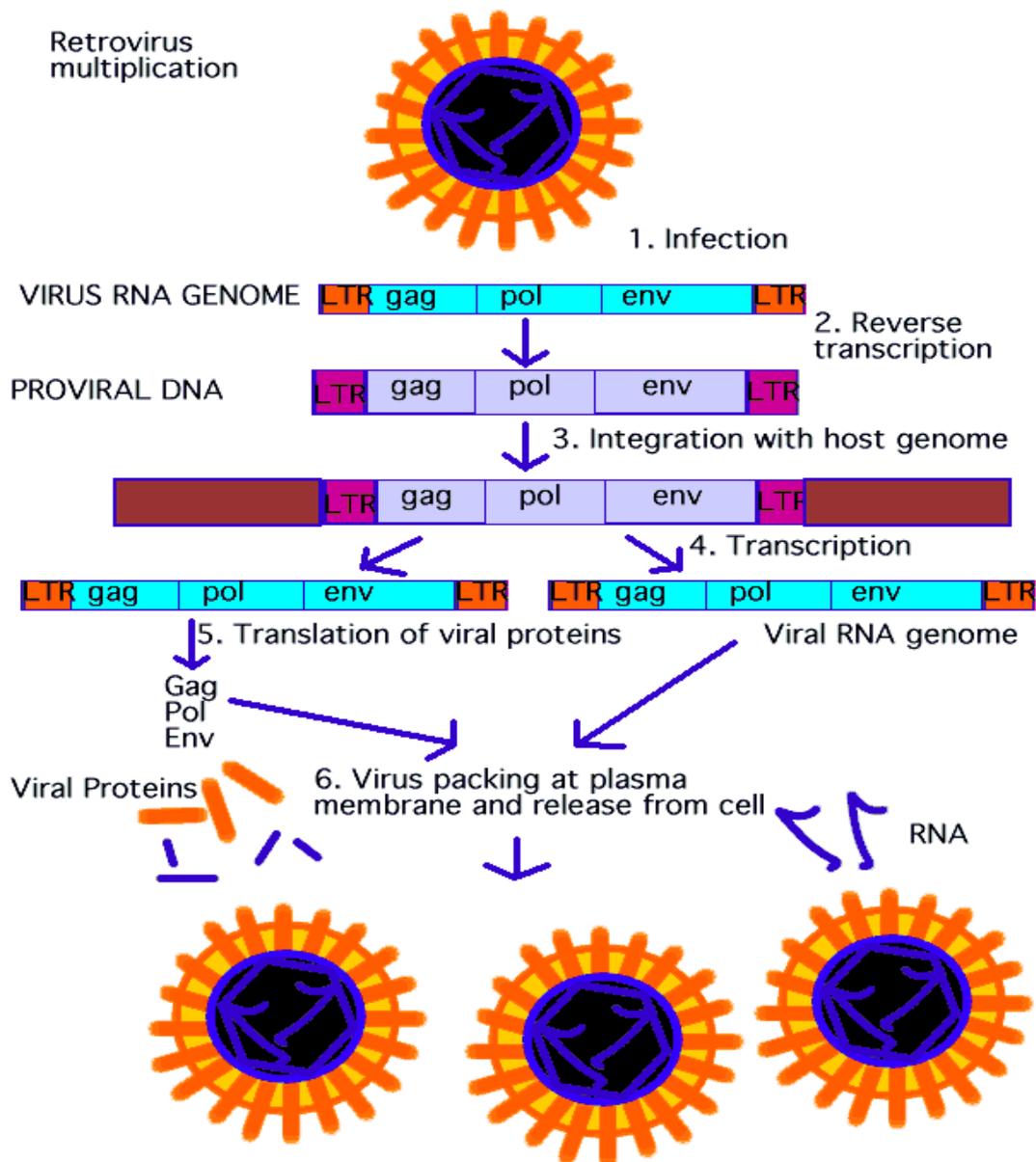
การเพิ่มจำนวนของ Retrovirus

Pathak และ Hu (1997) รายงานถึงจีโนมของ **retrovirus** เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยวแบบบวก (+ sense) และประกอบด้วยโมเลกุลของ **tRNA** ซึ่งเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์จะใช้เอนไซม์ **reverse transcriptase (RT)** ที่ใช้ในการ **transcribe RNA genome** เป็น DNA ซึ่งมี **nucleotide sequence** ที่ **complementary** กัน เรียกว่า **cDNA** จาก DNA สายเดี่ยว สร้างเป็น DNA สายคู่ขึ้น DNA สายคู่นี้เรียกว่า **proviral DNA** หรือ **proviruses** ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของไวรัสที่เข้าเชื่อมต่อกันอย่างสมบูรณ์ ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึม ระยะเวลาต่อมา **proviral DNA** จะเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสและเปลี่ยนรูปจากเส้นตรงเป็นวงกลมเพื่อเข้าไปรวมตัว (**integrate**) อยู่กับโครโมโซมของโฮสต์ซึ่งเป็น DNA เช่นกัน ยีน **LTR** มีความสำคัญในการ **integrate** เอา **proviral DNA** เข้าไปอยู่ใน **cellular DNA** และ **proviral DNA** นี้จะ **integrate** ที่ตรงตำแหน่งใดของ **cellular DNA** ก็ได้ และจะถูก **transcribe** สร้าง **mRNA** เพื่อสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของไวรัสเกิดเป็นไวรัสที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 2) ส่วน **proviruses** จะถูกใช้เป็นแม่แบบ (**template**) ในการสร้างอาร์เอ็นเอของไวรัสรุ่นใหม่ต่อไป

การติดเชื้อ **Oncoviruses** นี้เกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ

1. เกิดจาก **endogenous virus** เซลล์ที่มี **provirus integrate** อยู่ในโครโมโซม จะมีจำนวนของ **provirus** ต่อ **haploid number** ของเซลล์ได้ตั้งแต่ 1-100 ชิ้น **provirus** นี้จะประพฤติเหมือนกับว่าเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมของเซลล์ และแบ่งตัวไปพร้อมกับที่โครโมโซมของเซลล์แบ่งตัว และถ่ายทอด **provirus** ไปสู่เซลล์ลูกหลานที่เกิดใหม่ นอกจากนี้ยังถ่ายทอดจากแม่ไปยังลูก (**vertical transmission**) โดยทาง **gem line DNA (Robinson, 1978)** ในภาวะปกติการแสดงออกของ **provirus** จะถูกกดไว้ด้วยกลไกภายในเซลล์ แต่บางครั้งการควบคุมสูญเสียหรือบกพร่อง **endogenous infection** จะถูกชักนำ (**induce**) ให้มีการแสดงออก มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสเพิ่มขึ้น อาจเกิดขึ้นเองหรือโดยสารเคมีหรือปัจจัยอื่นเป็นตัวชักนำ ไวรัสที่ปรากฏขึ้นมาเนื่องจากมีจีโนมของไวรัสอยู่ในเซลล์นั้นเรียกว่า **endogenous virus** ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ทำให้เกิดโรค เซลล์ทุกเซลล์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเกือบทุก สปีชีส์จะมี **provirus** แฝงอยู่

2. เกิดจาก **exogenous virus** โดยที่ **provirus** ของไวรัสกลุ่มนี้จะไม่ **integrate** เข้าไปใน **gem line cell** แต่ติดต่อแบบ **horizontal transmission** เชื้อ **exogenous virus** ส่วนใหญ่ทำให้เกิดมะเร็ง เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว, **lymphoma, sarcoma**, และ **carcinoma** โดยที่สมาชิกบางตัวมี **oncogene** แต่สมาชิกบางตัวก็ไม่มี พวกที่มี **oncogene** เกือบทั้งหมดเป็น **defective virus**



ภาพที่ 2 วงจรชีวิต และการเข้าเชื่อมต่อกของ Retrovirus

ที่มา: <http://staff.jccc.net/pdecell/bio205/webct/bio205home.html>

Retrovirus ที่สำคัญทางสัตวแพทย์

Rous sarcoma virus

ในปี 1910 Payton Rous สัตวแพทย์ใน Rockefeller Institute, New York ได้ทดลองฉีด spindle cell carcinoma cell suspension และ cell-free filtrate จาก suspension ดังกล่าวเข้าไปในไก่พันธุ์ Banded Plymouth Rock พบว่าสามารถทำให้เกิดมะเร็งชนิด carcinoma ได้ทั้งสอง preparations ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าไวรัสเป็นสาเหตุของมะเร็งได้เป็นครั้งแรก

Avian leukosis virus

โรคลิวโคซิสหรือโรคลิวโคซิสมคอมเพล็กซ์ เป็นโรคเนื้องอกหรือมะเร็งชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยในไก่ ซึ่งไก่ทุกสายพันธุ์ไวต่อไวรัสชนิดนี้และพบว่ามีความสัมพันธ์กับเอนโดจีนัสรีโทรไวรัส (endogenous retrovirus) และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Grunder *et al.*, 1995) โรคนี้พบว่าเป็นโรคหนึ่งที่มีมานานแล้ว ในระยะแรกได้มีการเรียกชื่อตามลักษณะที่เด่นชัดของโรคที่ตรวจพบหลายชื่อ เช่น โรคลิวคีเมียในสัตว์ปีก (Fowl Leukemia), โรคอีรีทรอยด์ (Erythroid) หรือโรคลิวโคซิสในหลอดเลือด (Intravascular Leukosis), โรคเนื้องอกของเซลล์กระดูก (Myeloid) เป็นต้น (Purchase *et al.*, 1977) ในปัจจุบันก็ยังคงประสบปัญหาเช่นเดียวกันในการเรียกชื่อโรคเนื้องอกพวกนี้ เพราะไม่สามารถสรุปเรียกได้ว่าเป็นโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่ง Purchase และ Payne (1978) เรียกกลุ่มอาการโรคพวกนี้ว่า กลุ่มลิวโคซิสชนิดซับซ้อน (Leukosis Complex) เป็นต้น โดยกลุ่มโรคดังกล่าวเกิดจากรีโทรไวรัส (retrovirus)

เป็นสาเหตุของโรค lymphoid leukosis หรือ leukemia ในไก่อายุมากกว่า 4 เดือนขึ้นไป โดยมีเซลล์เป้าหมายที่เชื่อม oviduct reticuloendothelial system และ pre-B cell (Ruddell *et al.*, 1988) ไวรัสจะเปลี่ยนแปลงเซลล์ lymphoblasts ซึ่งจะแพร่กระจายไปที่ตับ ม้าม ไต และ gonad การแพร่ของไวรัสแบบ horizontal ในไก่ไข่ไปยังไก่อื่นมักไม่เกิด leukemia จะมีเพียง viremia สั้นๆ และเกิดภูมิคุ้มกัน ลูกไก่ที่ได้รับเชื้อโดยตรงจากแม่จัดเป็น vertical transmission และจะเกิด persistent viremia ประมาณ 5-10% จะเกิด immunotolerance และจะมีโอกาสเกิด leukemia ตามมาสูง ส่วนลูกไก่ที่มีการติดเชื้อในลักษณะทางผ่าน germ cell (genetic transmission) 90-95% จะเกิด latent infection ซึ่งจะเป็น carriers ที่ถูกกระตุ้นให้แพร่ไวรัสได้ในระยะต่อมา อาการของกลุ่มโรคลิวโคซิสจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับอวัยวะและเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เช่น

โรคลิมโฟอิด ลิวโคซิส (**Lymphoid Leukosis**) จากการทดลองเมื่อไก่ได้รับเชื้อ 10-14 วัน จะเริ่มแสดงอาการซึม การเดินจะเชื่องช้า บางตัวจะหลบมุมขึ้นเงิบๆ อาการเดินเขยง และอาจตรวจพบว่าบางตัวมีนัยน์ตาขุ่นมัว ซึ่งตรวจพบได้ที่ตาข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง อาการทั้งหมดจะเริ่มเด่นชัดเมื่อไก่ได้รับเชื้อนานประมาณ 28 วัน (Sevoian และ Chamberlain, 1964) ส่วนอาการของโรคตามธรรมชาตินั้นไม่แน่นอน อาจพบว่าไก่มีใบหน้าซีด ซึ่งสังเกตได้ชัดบริเวณหงอนเหนียง ในบางตัวใบหน้าจะมีสีดำคล้ำ การทรงตัวการเดินผิดปกติ บางตัวพบหมอบอยู่ที่พื้น (Puschase และ Payne, 1978) โรคนี้เป็นโรคที่พบมากที่สุดใไก่ โดยเฉพาะไก่ไข่ นิยมเรียกว่า โรคตับโต (**Big Liver Disease**) อวัยวะที่ตรวจพบความผิดปกติมากที่สุดส่วนใหญ่จะเป็นต่อมน้ำเหลืองทูดิยภูมิ เช่น ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลือง เนื่องจากลิวโคซิสไวรัสจะเข้าไปทำให้เกิดการทวีจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิดบี (**B-Cell Lymphoproliferative**)

โรคอีริธโรบลาสโตซิส (**Erythroblastosis**) หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โรคอีริธโรลิวโคซิส (**Erythroleukosis**) โรคนี้ระยะการเกิดโรคไม่แน่นอนตั้งแต่ 20-21 วัน ไก่ป่วยจะเริ่มแสดงอาการอ่อนเพลีย ลำตัวใบหน้าซีดเล็กน้อย อาการจะเด่นชัดขึ้นโดยมีเลือดคั่งที่บริเวณหงอน ทำให้มีสีเข้มจนกระทั่งมีสีน้ำเงินดำ (**Cyanosis**) เบื่ออาหาร ท้องเสีย บางตัวอาจพบว่ามีหย่อมเลือดออกที่รูขุมขนหรือที่ผิวหนัง แต่บางตัวถ้าหากก่อนเนื้องอกเกิดที่อวัยวะภายในจะแสดงอาการเลือดจาง โดยที่ใบหน้า หงอน เหนียง และหน้าแข้งจะขาวซีด อัตราการตายต่ำ จากเริ่มแสดงอาการจนถึงตายไม่แน่นอน จะกินเวลาดั้งแต่ 2-3 วัน จนถึง 2-3 เดือน (เกรียงศักดิ์, 2536) การเกิดโรคเนื้องอกชนิดนี้ในไก่พบได้โดยทั่วไป

นอกจากนี้ยังมีโรคเนื้องอกอีกหลายชนิด โดยโรคเนื้องอกเหล่านี้มีสาเหตุจากเชื้อลิวโคซิสไวรัส แต่ไม่พบบ่อยนักว่าจะก่อให้เกิดโรคในฝูงไก่ ได้แก่ โรคเนื้องอกของเซลล์กระดูก (**Osteopetrosis**), โรคมะเร็งของเซลล์พังผืด (**Fibrosarcoma**) เป็นต้น

Endogenous retrovirus genome

ในจีโนมของไก่ประกอบด้วย **avian retrovirus like element** หลายชนิด รวมถึง **endogenous viral loci (ev)** ลำดับเบสของ **ev loci** มีความสัมพันธ์กับ **subgroup E ALVE** รวมทั้งที่มีโครงสร้างสมบูรณ์ (**complete genome**) และส่วนของโครงสร้างที่มีบางส่วนขาดหาย (**defective genome**) พบว่ามีกระจายอยู่ในจีโนม (Best et al., 1997) จากส่วน **endogenous viral loci** ที่เชื่อมต่ออยู่อย่างถาวรในเซลล์สัตว์ และมีการถ่ายทอดได้เหมือนยีนอื่นๆ แต่ก็จะมีทั้งการถ่ายทอดไปเป็นทั้งแบบไม่

มีการแสดงออก และมีการแสดงออก หาก **endogenous retroviral genome** มีการแสดงออก ส่วนประกอบของยีนที่ถูกถอดรหัสจะเหมือนโครงสร้างของ **avian retrovirus (exogenous retroviral avian leucosis virus; ALV)** (Astrin, 1978; Tereba *et al.*, 1979; Savoboda, 1998) ในการเข้าเชื่อมต่อ ภายในจีโนมของ **avian retrovirus** แม้ว่าจะเกิดขึ้นโดยสุ่ม (Miller, 1996) แต่บางชนิดมีการเลือก ตำแหน่งของการเชื่อมต่อ (Benkel, 1998) เป็นการรองรับการที่จะแสดงออกของไวรัส รวมถึงการ ถ่ายทอดต่อไปถึงรุ่นลูกหลานของเซลล์ที่ถูกบุกรุกด้วย หากการเข้าบุกรุกเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับ การสืบพันธุ์ ในการเลือกตำแหน่งพบว่าชิ้นส่วนที่มี **GC rich** จะเข้ากันได้กับส่วน **GC rich** ของ จีโนมรีโทรไวรัส

Endogenous retroviruses (ev) มีการถ่ายทอดจากบรรพบุรุษไก่ป่า (**red jungle fowl**) ไปยัง ลูกหลาน (Boyce-Jacino *et al.*, 1992; Frisby *et al.*, 1979; Borisenko and Rynditch, 2004) การ ถ่ายทอดของ **endogenous retroviruses** จะเป็นแบบถาวรจะมีการถ่ายทอดไปทุกรุ่นตามกฎของเมน เดล (Payne, 1998; Gorbovitskaia *et al.*, 1998) สามารถพบได้ทั้ง 2 เพศ ทั้งบนโครโมโซมร่างกาย (**autosome chromosome**) และโครโมโซมเพศ (**sex chromosome**) พบลำดับเบสของดีเอ็นเอของ บรรพบุรุษไก่ป่าบางส่วนมีความคล้ายคลึงกับจีโนมของ **avian leucosis viruses (ALVs)** (Smith และ Crittenden, 1986) และสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะที่พบของ **ev loci** ได้หลายกลุ่ม คือ กลุ่มของ ยีนที่มีโครงสร้างครบทั้ง 3 ยีน คือ **env, gag** และ **pol** ได้แก่ **ev-2, ev-10** และ **ev-21** ส่วนกลุ่มที่พบ เพียงยีน **env** ได้แก่ **ev-6** และ **ev-9** และนอกจากนี้กลุ่มที่พบ โครงสร้างของยีน **env** และ **gag** ได้แก่ **ev-3**

Kuhllein *et al.* (1989) ได้ศึกษาพบ **endogenous retrovirus** ในไก่สายพันธุ์ **White Leghoms** มีมากกว่า **22 ev loci** ที่สามารถระบุตำแหน่งได้บนโครโมโซม พบทั้งในโครโมโซม ร่างกาย และโครโมโซมเพศ (Tereba และ Astrin, 1982) ส่วนในพันธุ์อื่นพบว่ามี **1-5 ev loci** แต่ใน บางสายพันธุ์อาจไม่พบเลยก็ได้ (Aart *et al.*, 1991) ในขณะที่ Sabour *et al.* (1992) รายงานค่าเฉลี่ย ของ **ev loci** เป็น 7.3 ในไก่ 120 ตัว จากกลุ่มประชากรอ้างอิง 3 กลุ่ม

Gavora *et al.* (1991) รายงานว่ายีน **endogenous retrovirus** บางยีนในไก่สายพันธุ์ **White Leghoms** แสดงความสัมพันธ์กับอัตราการลดลงของผลผลิต น้ำหนัก และคุณภาพของไข่ การ เจริญเติบโตช้าลง (Zavala และ Cheng 2006) การลดลงนี้มีลักษณะคล้ายกับที่สังเกตได้ในกลุ่มที่ มีการติดเชื้อของ **exogenous ALVs** (Gavora, 1987) และยีน **endogenous retroviruses** สามารถไป ช่วยเพิ่มอัตราการติดเชื้อของ **ALVs** ทำให้มีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นตามมา ความสัมพันธ์ระหว่าง

ยีน **endogenous retroviruses** จะไปเพิ่มความไวในการติดเชื้อ **ALVs** (Bacon *et al.*, 1988) ซึ่งมีความสำคัญ เพราะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน **K** ที่มีผลต่อลักษณะของการพัฒนาการเจริญของขนไก่อบนโครโมโซม **Z (Z chromosome)** ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการงอกช้าของขน (**Late-feathering LF**) (Smith และ Levin, 1991)

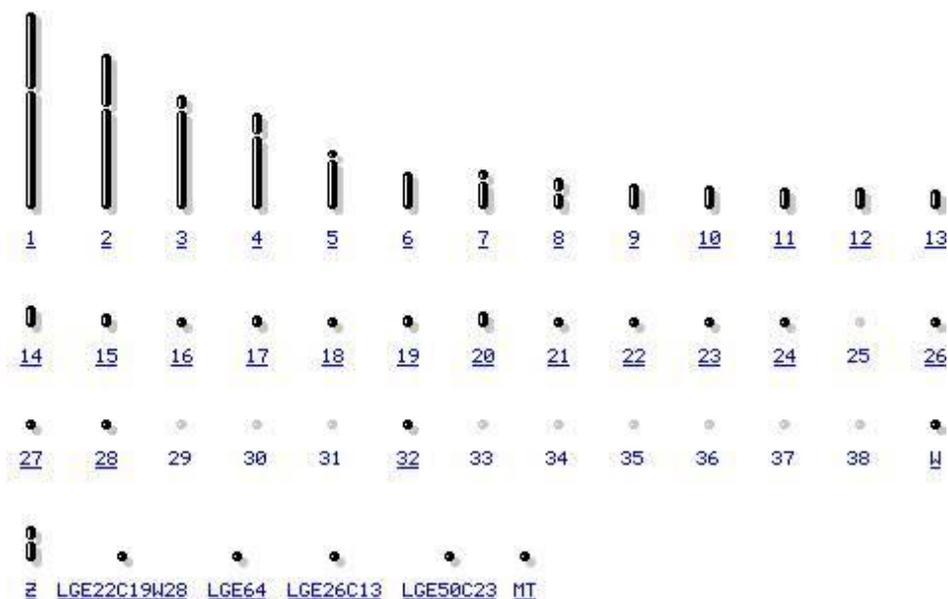
Klucking และ **Young (2004)** รายงานว่าบริเวณ **LTRs** ของ **subgroup E** มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบส โดยส่งผลให้มีความผิดปกติต่อ **amino acid** บริเวณ **receptor** ทำให้มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรค **avian sarcoma** และ **leucosis virus** และความผิดปกติที่เกิดขึ้นบริเวณนี้จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนหรือความสามารถในการเข้าแทรกตัวของ **endogenous retroviruses** (Zachow และ Conklin, 1992) นอกจากนี้ **LTRs** ของ **ALVs** มีบริเวณที่เป็น **CCAAT box** ที่เป็น **enhancer** ช่วยในการจับเกาะโปรตีนที่ใช้ช่วยในการ **transcription** (Ryden และ Beemon, 1989; Zachow และ Conklin, 1992) และ **Hughes (1982)** กล่าวว่าบริเวณ **LTRs** ของ **endogenous retroviruses** จะประกอบด้วยส่วนที่เป็น **TATA box** ซึ่งเป็นบริเวณของโปรโมเตอร์ (**promoter**) ที่ควบคุมการ **transcription** และมีความสัมพันธ์กับส่วนที่เป็น **enhancer** (Cullen *et al.*, 1985) และลำดับเบสที่ซ้ำๆ นี้ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล **TA microsatellite repeat** (Benkel และ Fong 1996)

ลักษณะจีโนมของไก่

ลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จะมีขนาดตั้งแต่พันเบสจนถึงหลายล้านคู่เบสในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยในไก่มีขนาดของจีโนมเท่ากับ 1.2×10^9 คู่เบส (bp) ต่อแฮพลอยด์เซลล์ (**haploid cell**) และภายในนิวเคลียสจะมีปริมาณดีเอ็นเอบรรจุ 2.5 พิโคกรัม (pg) ต่อดิพลอยด์เซลล์ (**diploid cell**) (Smith และ Burt, 1998) ซึ่งลักษณะจีโนมของไก่ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย (**Autosome chromosome**) 38 คู่ และโครโมโซมเพศ (**Sex chromosome**) 1 คู่ โดยโครโมโซมเพศแบ่งเป็นโครโมโซม **Z** และโครโมโซม **W** ซึ่งในไก่เพศผู้จะมีลักษณะเป็นคู่โครโมโซมเดียวกันของโครโมโซม **Z** เรียกว่า **Homogametic sex; ZZ** ส่วนในไก่เพศเมียโครโมโซมเพศจะมีลักษณะเป็นโครโมโซมคู่ผสมระหว่างโครโมโซม **Z** และ **W** เรียกว่าเป็น **Heterogametic sex; ZW** โดยรวมโครโมโซมทั้งหมดเป็น 39 คู่

Bitgood และ **Shoffer (1990)** ได้แบ่งลักษณะจีโนมของไก่ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ (**Macrochromosome**) จำนวน 8 คู่ โครโมโซมขนาดเล็ก (**Microchromosome**) จำนวน 30 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ (ภาพที่ 3) แต่ **Bloom (1981)** ได้รายงานการแบ่งลักษณะ

จีโนมของไก่ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม **Macrochromosome** จำนวน 5 คู่ กลุ่ม **Intermediate chromosome** จำนวน 5 คู่ และกลุ่ม **Microchromosome** จำนวน 29 คู่



ภาพที่ 3 โครโมโซมของไก่

ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

เมื่อพิจารณาจีโนมของไก่เปรียบเทียบกับขนาดจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าจีโนมของไก่มีขนาดเล็กกว่าขนาดของจีโนมสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีขนาดจีโนมประมาณ 3.3×10^9 คู่เบส (Lewin, 1980) แต่เมื่อพิจารณาลักษณะจีโนมของไก่ในระดับโมเลกุลพบว่า DNA sequence ประกอบด้วยส่วนที่เป็น **unique** และ **repetitive sequence** โดยส่วนที่เป็น **repetitive** มีประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมไก่ทั้งหมด (Moran, 1993) ซึ่งขนาดของจีโนมที่แตกต่างกันจะมีอิทธิพลต่อความถี่และจำนวนซ้ำของ **Microsatellites DNA** และยังพบว่า **Microsatellites DNA** ในจีโนมของไก่จะมีความถี่และขนาดเล็กกว่า **Microsatellites DNA** ในจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัวจำนวนซ้ำ $(TG)_n$ **Microsatellite DNA** ในจีโนมของไก่พบว่า มี $(TG)_n$ **Microsatellite DNA** ทุกๆ 200 กิโลเบส (Cheng *et al.*, 1995) แต่ในจีโนมของคน หนู **Rat** และ หนู **Mouse** จะพบทุกๆ 28 กิโลเบส หรือน้อยกว่า (Satalling *et al.*, 1991) และ $(TG)_n$ **Microsatellite DNA** ในจีโนมของไก่จะพบเฉลี่ยประมาณ 10 เบส ซึ่งจะพบน้อยกว่าจำนวนที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Cheng และ Crittenden, 1994)

ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงจีโนมจะมีความซับซ้อนมากเป็นผลให้ลำดับเบสบางกลุ่มมีการซ้ำหลายซ้ำในจีโนม ในช่วงของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำมากๆ และชุดที่ซ้ำกันนี้อยู่ติดกันเป็นช่วงยาวๆ (**Long Tandem Repeat, LTR**) เรียกว่า **Satellite DNA** ปริมาณ **Satellite DNA** จะไม่แน่นอน มีตั้งแต่ **2-50** เปอร์เซ็นต์ ของดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนม และขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2537) เช่น ในจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วย **Satellite DNA** ประมาณ **10-20** เปอร์เซ็นต์ (Beridze, 1986) ในไก่ (*Gallus domesticus*) ประมาณ **10** เปอร์เซ็นต์ และในสุกร (*Sus domesticus*) พบประมาณ **13** เปอร์เซ็นต์ (Moran, 1993) **Satellite DNA** ที่มีความหลากหลายสูงจะถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล (**Molecular Marker**)

เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ **PCR** เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเฉพาะส่วนอย่างเจาะจงภายในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการเลียนแบบการสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (*in vivo*) (Rolfs et al., 1992) ซึ่งอยู่ในสารละลายร่วมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อน สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำมาโคลนก่อน การทำ **PCR** คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์โพลีเมอเรส (**polymerase**) ซ้ำกันหลายๆ รอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจแล้ว จึงสังเคราะห์ **oligonucleotide** สายสั้นๆ **2** ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง **2** ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ส่วนโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ **20-25** เบส ไพรเมอร์จะเกาะดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย **3'** ในทิศทางเข้าหากัน (สุรินทร์, 2545)

ขั้นตอนในการทำ **PCR** เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ (**genomic DNA**) นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (**deoxyribonucleoside triphosphate; dNTPs**) ทั้ง **4** ชนิด และเอนไซม์ **DNA polymerase** โดยปกติบัฟเฟอร์ของปฏิกิริยา **PCR** จะประกอบด้วย **Mg²⁺**, **monovalent cation** และ **co-solvent** บางตัว ซึ่งช่วยให้เอนไซม์คงตัว เทคนิค **PCR** จะประกอบด้วย **3** ขั้นตอน สำหรับการสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอสายใหม่ (ภาพที่ **4**)

1. การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (**Denaturation**) โดยใช้ความร้อน (อุณหภูมิประมาณ **94-97**

องศาเซลเซียส) ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบคลายเกลียวคู่ออกจากกันแยกเป็นสายเดี่ยว เพื่อทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

2 การจับของสายไพรเมอร์ (Primer annealing) เป็นขั้นตอนการให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ตรงตำแหน่งที่เป็น **complementary** กัน โดยอุณหภูมิจะอยู่ในช่วง **45-65 °C**

3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (Primer extension) โดยใช้ อุณหภูมิ **72 °C** ขึ้นอยู่กับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ซึ่งในขั้นตอนนี้ **DNA polymerase** จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายด้าน **3'** ของสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ดีเอ็นเอสายใหม่

การสังเคราะห์จะดำเนินไปทั้ง **3** ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน **20-30** รอบ ซึ่งจำนวนสายดีเอ็นเอที่ได้จะเป็นไปตามสูตร

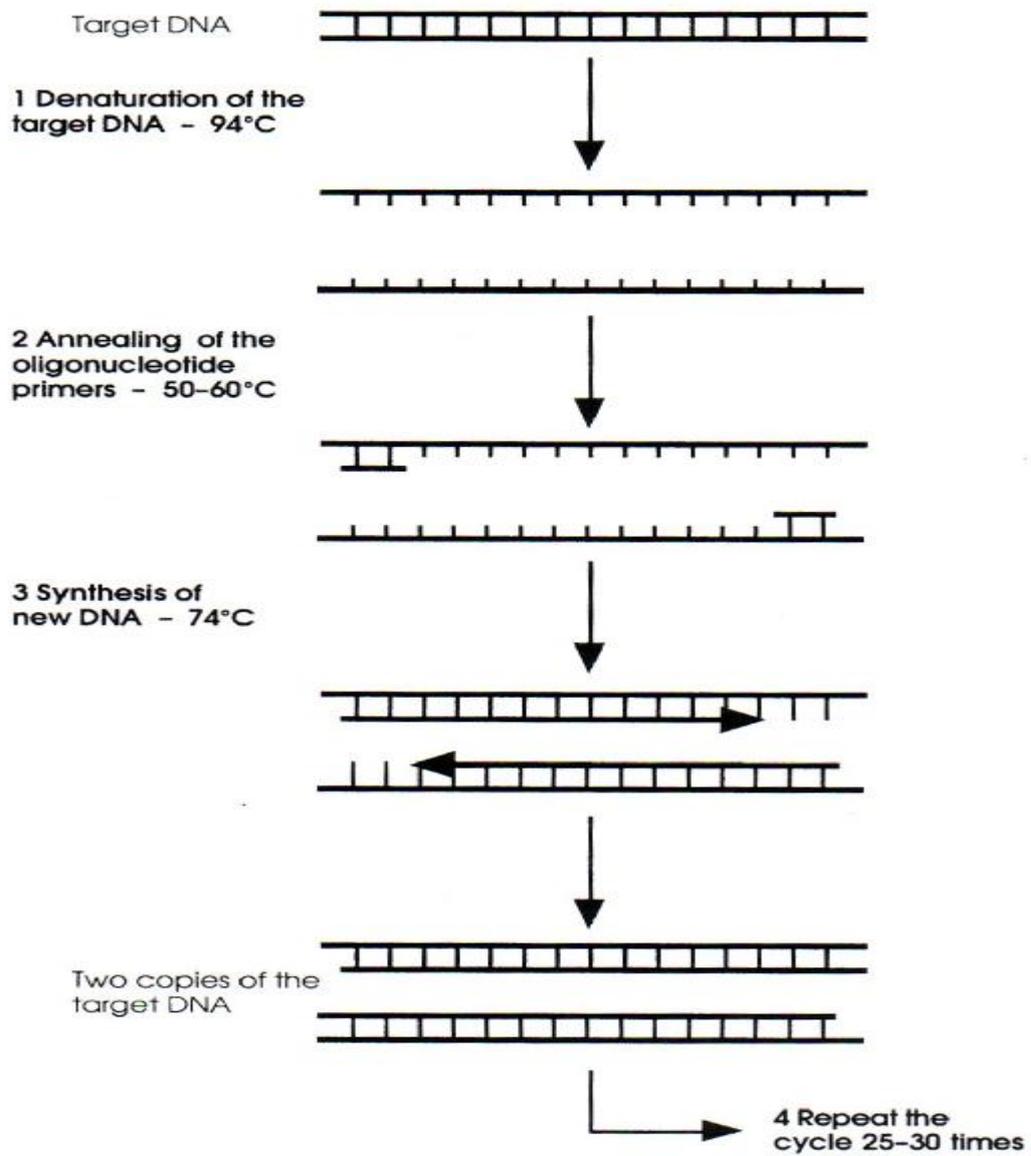
$$(2)^X \text{ เมื่อ } n = \text{จำนวนรอบที่ใช้ในการสังเคราะห์}$$

$$X = \text{จำนวนสายของแม่พิมพ์ที่ใช้ในการเริ่มต้น}$$

องค์ประกอบของเทคนิค PCR

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

2. ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้นๆ หรือไพรเมอร์ (Primer) มีความยาวประมาณ **18-25** นิวคลีโอไทด์ จำนวน **2** สาย สายหนึ่งเรียก ไพรเมอร์เอฟ (forward primer) และอีกสายหนึ่งเรียก ไพรเมอร์อาร์ (reverse primer) แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (complementary) กับสายดีเอ็นเอแม่แบบแต่ละสาย และสามารถจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขอบข้าง (flanking region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน นอกจากนี้ไพรเมอร์ควรมีองค์ประกอบของเบส **C** และ **G** อยู่ระหว่าง **40-60** เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ทั้ง **2** ควรมีส่วนประกอบของเบส **G + C** เท่ากันเพื่อให้ค่า T_m



ภาพที่ 4 ขบวนการของเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ที่มา: <http://www.mta-labor.info>

เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะของปลายทั้ง 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 เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดิมเป็นแม่แบบ (DNA template) เป็นตัวกำหนดลำดับโมเลกุลของ dNTPs โดยเชื่อมโมเลกุลด้านปลาย 3' อีสระ ทำให้มีการเพิ่มความยาวของดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทาง 5' ไป 3' ถ้าใช้เอนไซม์ DNA polymerase จาก *E. coli* หรือจากเซลล์อื่น เมื่อทำให้สายดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะเสียสภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ใหม่ลงในปฏิกิริยาทุก รอบของการสังเคราะห์ ต่อมามีการค้นพบ *Taq* DNA polymerase จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ที่สามารถทนความร้อนได้ที่ 95 องศาเซลเซียส จึงนิยมใช้ในการทำ PCR (สุรินทร์, 2545)

5 สารละลายบัฟเฟอร์ เป็นสารที่ทำหน้าที่เร่งการทำงานและรักษาสภาพของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ประกอบด้วย

5.1 แมกนีเซียมไอออน ช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ แมกนีเซียมไอออนจะทำหน้าที่เป็น co-factor และยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) และมีผลต่อการ annealing ของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนต้องปรับให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะของแมกนีเซียมไอออนคือต้องเหลือแมกนีเซียมในรูปอีสระประมาณ 0.5-1.0 มิลลิโมลาร์ โดยทั่วไปมักใช้แมกนีเซียมความเข้มข้น 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ไม่จำเพาะ และพบว่า การปรับค่าแมกนีเซียมไอออนก็ช่วยให้ไพรเมอร์มีการ annealing ที่มีความจำเพาะขึ้น เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

5.2 สาร KCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

5.3 Tris-HCl ความเข้มข้น 10-15 มิลลิโมลาร์

การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR

เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ง่ายไม่ซับซ้อนและมีศักยภาพในการตรวจพบความเปลี่ยนแปลงหรือความแตกต่างที่เกิดภายในสายดีเอ็นเอ จึงเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานด้านต่างๆ เช่น (วีระพงศ์, 2539)

- การตรวจหายีนต่างๆ ในโรคทางพันธุกรรม และอื่นๆ
- ใช้ในการศึกษา DNA polymorphism และการทำ genetic mapping
- ประยุกต์ใช้ในการทำ competitive PCR
- ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส เช่น Epstein-Barr virus

เทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Single Strand Conformation Polymorphism เป็นวิธีตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) จากดีเอ็นเอที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้นดีเอ็นเอ นั้น (point mutation) หรือ Single nucleotide polymorphism (SNPs) นิยมใช้ในการศึกษา point mutation detection จากสายดีเอ็นเอที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จากขนาดและไม่รู้ลำดับเบสด้วยวิธีทางกายภาพ จึงไม่ต้องทำการหาลำดับเบส (DNA sequencing) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ถ้ามีลำดับเบสภายในสายดีเอ็นเอต่างกันเพียง 1 เบส และการเปลี่ยนแปลงของเบสเกิดในบริเวณที่ไม่มีเอนไซม์ตัดได้ หรือการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ไม่ทราบแน่ชัดก็สามารถแยกความแตกต่างได้ เทคนิค SSCP มีขั้นตอนหลักอยู่ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR, การแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (denature) และการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอสายเดี่ยวบน Nondenaturing Polyacrylamide Gel โดยเทคนิค SSCP จะอาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายใน โมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้างที่จำเพาะ หรือมี conformation ที่จำเพาะขึ้นอยู่กับลำดับเบสของดีเอ็นเอสายนั้น ซึ่งจัดเป็นโครงสร้างขั้นทุติยภูมิ (secondary structure) ที่เกิดจากอิทธิพลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของไอออนต่างๆ จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน Nondenaturing Polyacrylamide Gel โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันเพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิด

โครงสร้างที่แตกต่างกัน ส่งผลให้การเคลื่อนที่บนเจลในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเร็วช้าต่างกัน (สุรินทร์, 2545) นอกจากนี้ปัจจัยในการเคลื่อนที่และ โครงสร้างของดีเอ็นเอแล้วยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด่างของบัฟเฟอร์ 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 อุปกรณ์ที่ใช้เป็นอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการทั่วไป
5. ไม่มีความจำเป็นต้องใช้ **heterozygous** และ **homozygous** ในการเปรียบเทียบอย่างวิธี

HA

6. ไม่ต้องใช้ **formamide** และ **urea** ในแผ่นเจล

SSCP ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง อาทิเช่น ประสิทธิภาพในการตรวจสอบจะลดลงถ้าสายดีเอ็นเอมีขนาดยาวขึ้น ความไวของการตรวจ **SSCP** ขึ้นกับความยาวของสายดีเอ็นเอที่ต้องการ เนื่องจากเป็นการตรวจหาความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีลำดับแตกต่างกันเพียง **1** เบส อาจแก้ไขโดยการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (**restriction enzyme**) ก่อนที่จะนำไปทำ **SSCP** และประสิทธิภาพในการตรวจจะต่ำถ้าเกิด **mutation** แบบ **transversion (G → C, C → G)** และปริมาณตัวอย่างที่ได้มามีมาก่อนข้างน้อย ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ จึงได้มีการผนวกเทคนิค **PCR** เข้ามาร่วมในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งจะมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่สนใจในการตรวจก่อน แล้วจึงนำเอา **PCR product** ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อกับ **SSCP** จึงเรียกว่า **PCR-SSCP**

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองแบ่งแยกเป็นไก่พื้นเมือง และไก่สายพันธุ์ทางการค้า

| | |
|---------------------------|--------|
| 1.1 ไก่พื้นเมือง | 40 ตัว |
| 1.2 ไก่สามเหลือง | 30 ตัว |
| 1.3 ไก่สายพันธุ์ทางการค้า | |
| - ไก่เนื้อ | 30 ตัว |
| - ไก่ไข่ | 30 ตัว |

ในแต่ละกลุ่มเก็บตัวอย่างเลือดและสกัดดีเอ็นเอเป็นรายตัวทุกตัว

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดไก่

ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 ฉาะเลือดบริเวณเส้นเลือดปีก (wing vein venipuncture) ปริมาตร 0.5-1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงใน tube ที่ใส่สาร EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) ในอัตราส่วน 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว และนำเลือดที่ฉาะเข้าน้ำแข็งทันที จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอก่อนนำไปใช้งาน

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่

ก่อนการสกัดดีเอ็นเอให้ทำการละลายเลือดตัวอย่างโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเลือดจะเปลี่ยนสภาพจากที่แข็งตัวกลายเป็นของเหลว โดยคัดแปลงจากวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) วิธีนี้เป็นการขจัด โปรตีนและสิ่งเจือปนออกจากตัวอย่างดีเอ็นเอด้วย proteinase K และทำการสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากโปรตีนอีกครั้งด้วย phenol/chloroform จากนั้นทำการตกตะกอน

สารละลายดีเอ็นเอด้วยเอทานอล **95%** แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล **70%** อีกสองครั้ง และเก็บสารละลายดีเอ็นเอในสารละลาย **TE buffer** ที่ **-20** องศาเซลเซียส

3 การตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

3.1 ตรวจสอบการเรืองแสงบน Agarose gel

นำดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำ **electrophoresis** ใน **agarose gel** แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (**DNA marker**) ของแลมด้าดีเอ็นเอ (**lamda DNA**) ที่มีความเข้มข้น **10** นาโนกรัม/มิลลิลิตร, **30** นาโนกรัม/มิลลิลิตร, **50** นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ **70** นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบใช้สารละลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ **3** ไมโครลิตร ผสมกับ **loading dye** 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 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (**ultraviolet; UV**) โดยเครื่อง **Gel document** แล้วถ่ายรูปเก็บไว้

3.2 ตรวจสอบการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer

วัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (**Absorbance**) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (**spectrophotometer**) เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงอุตราไวโอเล็ตได้ดีที่ความยาวคลื่น **260 nm (A₂₆₀)** ซึ่งในสภาพสารละลายดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่มีความเข้มข้น **50** ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่า **A₂₆₀** เท่ากับ **1** และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอได้โดยการหาอัตราส่วนของ **A₂₆₀:A₂₈₀** ถ้าได้ค่าระหว่าง **1.65-1.85** แสดงว่าได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่บริสุทธิ์ แต่ถ้าหากได้ค่าที่มากกว่า **1.85** แสดงว่าในตัวอย่างดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ และถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า **1.65** แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ซึ่งทำการตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เป็นรายตัว

สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบปริมาณ, คุณภาพ และความเข้มข้นแล้ว จะถูกนำไปเจือจางให้มีความเข้มข้น **10** นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้งานในขั้นต่อไป

4 การเพิ่มปริมาณยีน ALVES ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณยีนส่วนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ (ตารางที่ 2) กับยีนนั้น โดยเตรียมส่วนผสมปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยส่วนผสมประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (ไมโครลิตร) |
|-----------------------------|---------------------|
| DNA Template (10 ng) | 1.50 |
| dNTP mixture (5 mM) | 5.00 |
| UP region primer (10 qM) | 1.00 |
| LTR region primer (10 qM) | 1.00 |
| DWN region primer (10 qM) | 1.00 |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2.00 |
| 10x PCR buffer | 2.50 |
| Taq DNA polymerase (5 u/μl) | 0.15 |
| เติมน้ำกลั่น | 10.85 |
| ปริมาตรทั้งหมด | 25.00 |

ผสมทุกอย่างให้เข้ากัน นำไปเขย่าเล็กน้อยเป็นเวลา 5 วินาที ทุกขั้นตอนในการเตรียมสารละลายต้องทำในภาชนะแห้ง และก่อนนำสารละลายเข้าเครื่อง PCR เคลือบด้านบนด้วย mineral 1 หยด เพื่อป้องกันการระเหยของสารละลายในปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดอุณหภูมิภายในเครื่อง PCR ดังนี้ ปรับอุณหภูมิเครื่องในขั้นตอน Pre-PCR ซึ่งเป็นขั้นตอนการเตรียมสารละลายก่อนทำ PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ และในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบ ดังนี้

1. DNA denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. primer annealing ที่อุณหภูมิตามชนิดของ primer เป็นเวลา 1 นาที
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. สารละลายจะผ่านกระบวนการ PCR อุณหภูมิตามข้อ 1-3 จำนวน 35 รอบ
5. หยุดปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิต่ำที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

อุณหภูมิที่จะใช้ในขั้นตอน **primer annealing** ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์นั้น สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$T_A (\text{°C}) = [4(G+C)+2(A+T)] - 5$$

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการทำ PCR จะเก็บรักษา PCR product ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่ใช้ในกระบวนการปฏิกิริยา PCR ที่ได้เรียกว่า “PCR product”

5. การตรวจสอบการเพิ่มปริมาณยีน ALVEs จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction 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 45 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลย้อมด้วย EtBr เข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเครื่อง gel document แล้วถ่ายรูปเก็บไว้ ตัวอย่าง PCR ถูกเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ของ ladder ขนาด 100 คู่เบส

6. 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 นำตัวอย่างดีเอ็นเอหยอดลงใน 10% nondenaturing polyacrylamide gel ประมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาทำ electrophoresis ใน 1X TBE buffer ด้วยเครื่อง Hoefer SE 600 Series (Amersham Pharmacia Biotech) กระแสไฟฟ้า 10 วัตต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

7. การหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีนที่ได้จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

เพื่อเป็นการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบส และยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR เป็นลำดับเบสของยีนที่ศึกษา จึงทำการสุ่มตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะจากตำแหน่ง ALVE-B3 จากไก่แต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ (ภาคผนวก) จากนั้นจะนำผลที่ได้จากการหาลำดับเบส (sequencing) มาทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสจากยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม GeneDoc

ตารางที่ 2 โพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น ALVEs

| Locus name | Primer* | Product size (bp) | | References |
|------------|---|-------------------|-------|-----------------------------|
| | | ALVE+ | ALVE- | |
| ALVE-1 | Ev1.up = 5'-GCA CCA AAC AAT CTA GTC TGT GC-3' Ev1.dwn = 5'-AAG TAC TCA CTT CTC TGA AC-3' LTR = 5'-CCT GAA TGA AGC AGA AGG CTT C-3' | 295 | 505 | Benkel <i>et al.</i> (1992) |
| ALVE-9 | Ev9.up = 5'-TAG TGC ACA TAT AAT TTC AGA TGA GTT-3' Ev9.dwn = 5'-CAT TCT CCA TGC ACC TGA AGT G-3' LTR = 5'-ACC TGA ATG AAG CTG AAG GCT TC-3' | 115 | 450 | Benkel <i>et al.</i> (1998) |
| ALVE-12 | Ev12.up = 5'-GAA CTT CCA AAG GAC TGA TAA GAG A-3' Ev12.dwn = 5'-TTG AGG CAG GAA TTG GCA ACA C-3' LTR = 5'-CGC CCA TAT GTC CTT GCG TC-3' | 200 | 320 | Iraqi <i>et al.</i> (1994) |
| ALVE-15 | Ev15.up = 5'-CAA ATG AGG GTA ATA AGG GAG-3' LTR = 5'-CAC TAC CAA ATA TAA TTC TGT AG-3' | 460 | 180 | Benkel and Smith (1993) |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| Locus name | Primer* | Product size (bp) | | References |
|------------|---|-------------------|---------|-------------------------------------|
| | | ALVE+ | ALVE- | |
| ALVE-21 | Ev21.up = 5'-GTG GGA ATG GTA CTA CAG AGA AGG-3' Ev21.dwn = 5'-CAT TTC AAG CAA GGG ACT GGC-3' LTR = 5'-ACC TGA ATG AAG CTG AAG GCT TC-3' | 390 | 510 | Tixier-Boichard <i>et al</i> (1994) |
| ALVE-B3 | Ev-B3.up = 5'-CAG CTT CTG AAT TCC CAC ATA GAC A-3' Ev-B3.dwn = 5'-CTG TGC TGC ACA GAC TAC AGA T-3' LTR = 5'-GAG TCC CTA ACG ATT GCG AAC AC-3' | 293 | 458 | Benkel <i>et al</i> (1997) |
| ALVE-B4 | Ev-B4.dwn = 5'-TTG GTT ACA TGC CAA GCA GT-3' LTR = 5'-GAG TCC CTA ACG ATT GCG AAC AC-3' | 175 | no band | Benkel <i>et al</i> (1998) |

* The PCR profile has been modified into a “touchdown” program

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ทำการเจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดปีก (wing vein veripuncture) ปริมาตร 0.5-1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงใน tube ที่ใส่สาร EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ในอัตราส่วน 1.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sambrook *et al* (1989) โดยการแยกดีเอ็นเอจากเลือดไก่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้โดยตรง เนื่องจากในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวของสัตว์ปีกจะมีนิวเคลียสอยู่ ซึ่งจะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่จะพบ นิวเคลียสเฉพาะเม็ดเลือดขาว (Crooijmana *et al*, 1996b) ซึ่งในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจะต้อง กำจัดเศษโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ออกไปก่อน โดยใช้สาร phenol ตกตะกอนเศษโปรตีนจากเซลล์เม็ดเลือดแดง จากนั้นใช้ proteinase K ในการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงที่อาจขัดขวางการสกัดดีเอ็นเอที่มี ขนาดเล็กกว่า

จากการตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีตรวจสอบการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงอุตราไว โอลेटได้ดีที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) ซึ่งในสภาพสารละลายดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีค่า A_{260} เท่ากับ 1 และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอได้โดยการหา อัตราส่วนของ $A_{260}:A_{280}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่บริสุทธิ์ แต่ถ้าหาก ได้ค่าที่มากกว่า 1.85 แสดงว่าในตัวอย่างดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ และถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ซึ่งทำการตรวจวัดความเข้มข้น ของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เป็นรายตัว พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากเลือดสัตว์ทดลองตัวอย่างมีค่าที่ได้ ระหว่าง 1.65-1.85 ทุกตัว

จากการตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอ โดยนำไปแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) ด้วย 0.8% agarose gel เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานของแลมด้าดีเอ็นเอ (lambda DNA) ที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, 50 นาโนกรัม/ มิลลิลิตร และ 70 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมสีดีเอ็นเอด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide; EtBr) ที่มีความเข้มข้น 10 กรัม/น้ำ 1000 มิลลิลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอในเจล

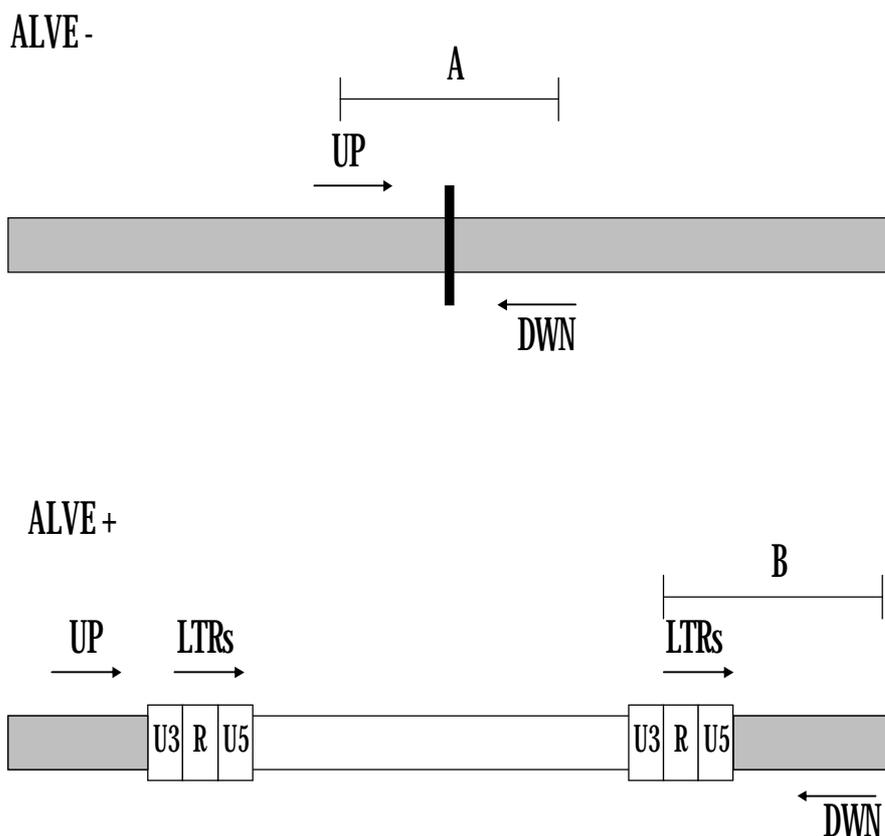
ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet; UV) โดยเครื่อง Gel document พบว่าผลการสกัดดีเอ็นเอที่ได้มีค่าความเข้มข้นอยู่ประมาณ 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีซึ่งสอดคล้องกับวิธีการตรวจสอบการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer

การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Sambrook *et al* (1989) พบว่าเป็นวิธีที่สามารถทำได้รวดเร็ว ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณเพียงพอ และคุณภาพดี

2. ผลการตรวจหายีน ALVEs ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

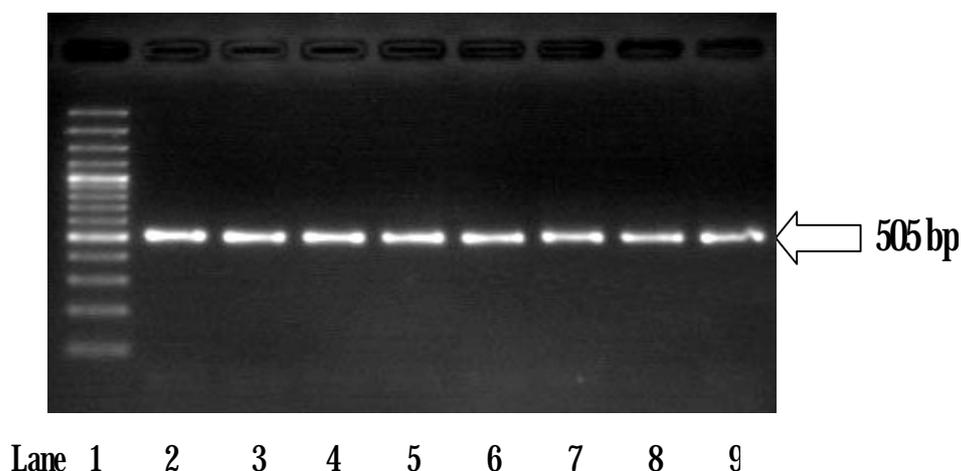
จากการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ แล้วนำมาทำการเพิ่มปริมาณยีน ALVE และยีน ALVE-B แต่ละ locus ส่วนที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วน UP region, DWN region และ LTR region (ภาพที่ 5) ผลพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละตำแหน่งไม่แตกต่างกันในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์

จากการเพิ่มปริมาณยีน ALVE-1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีน ALVE-1 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเหลือง ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมอะกาโรสเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 505 คู่เบส ในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน (ภาพที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Benkel *et al* (1992) แถบดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็นส่วนหนึ่งของหนึ่งของจีโนมไก่ ที่ไม่มีการถูกแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ALVE-1) ส่วนของ endogenous retrovirus (ALVE-1⁺) ไม่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ แสดงว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ ปราศจากยีนของ endogenous retrovirus ซึ่งหมายความว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์เหล่านี้ มีบรรพบุรุษที่ไม่ได้ถูก infected ด้วย endogenous retrovirus ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Aart *et al* (1991) และไก่ที่ใช้ในการศึกษาเป็นคนละสายพันธุ์กับกลุ่มอ้างอิงของ Kuhnlein *et al* (1989) ซึ่งเป็นไก่สายพันธุ์ White Leghorns การตรวจจึงไม่พบ endogenous retrovirus ตำแหน่งนี้



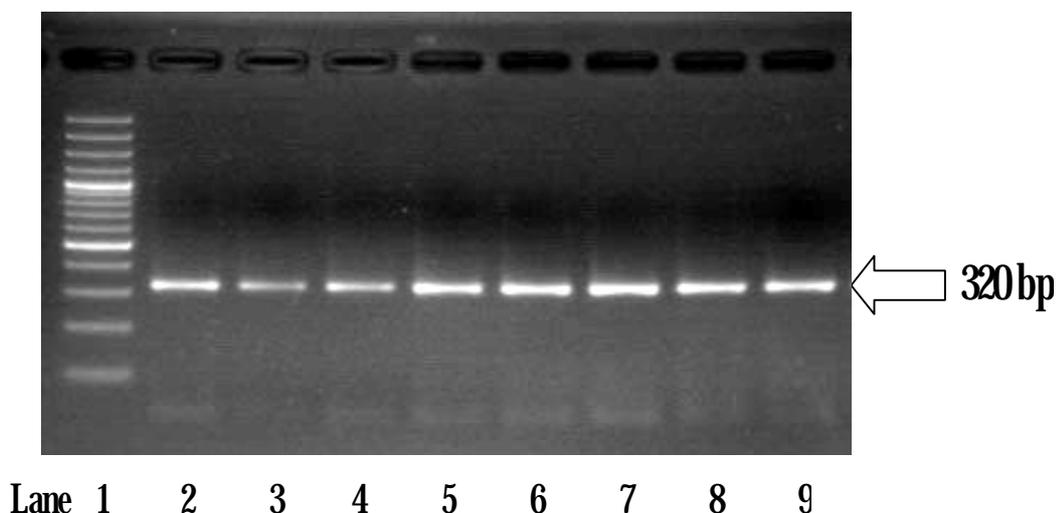
ภาพที่ 5 ภาพจำลอง **Annealing site** ในปฏิกิริยา **PCR** ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

- **ALVE-**: ส่วนของโครโมโซมที่ขาด **endogenous retroviral element (US)**
- **ALVE+**: ส่วนของโครโมโซมที่สอดแทรก **endogenous retroviral element (OS)**
- **A, B**: ขนาดของ **DNA fragment amplified** โดยปฏิกิริยา **PCR**
- ผลจากปฏิกิริยา **PCR** แสดงความแตกต่างเป็น **+/+, +/-, -/-**
- **R** = repeat unit
- **LTRs** = long terminal repeats
- **UP** = up region (forward primer)
- **DWN** = dwn region (reverse primer)



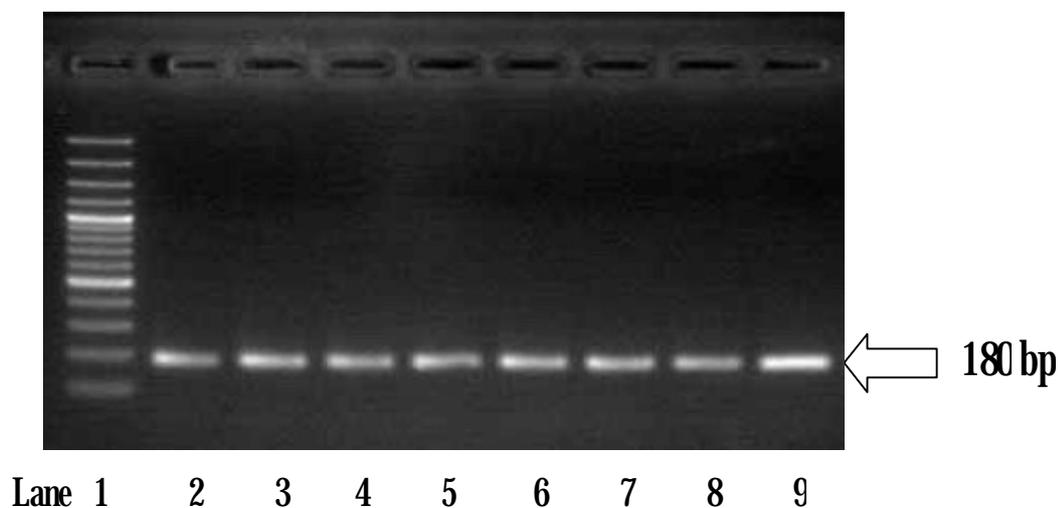
ภาพที่ 6 ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-1 ที่มีขนาด 505 bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลี่ยม (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp

จากการเพิ่มปริมาณยีน ALVE-12 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีน ALVE-12 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเหลี่ยม ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมอะกาโรสเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 320 คู่เบส ในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน (ภาพที่ 7) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Iraqi *et al.* (1994) แถบดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็นส่วนหนึ่งของหนึ่งของจีโนมไก่ ที่ไม่มีการถูกแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ALVE-12) ส่วนของ endogenous retrovirus (ALVE-12') ไม่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ แสดงว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ปราศจากยีนของ endogenous retrovirus ซึ่งหมายความว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์เหล่านี้ มีบรรพบุรุษที่ไม่ได้ถูก infected ด้วย endogenous retrovirus และ ALVE-12 ตำแหน่งนี้ยังมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับลักษณะน้ำหนักไข่ และการให้ไข่ในไก่สายพันธุ์ White Leghorm (Gavora *et al.*, 1991)



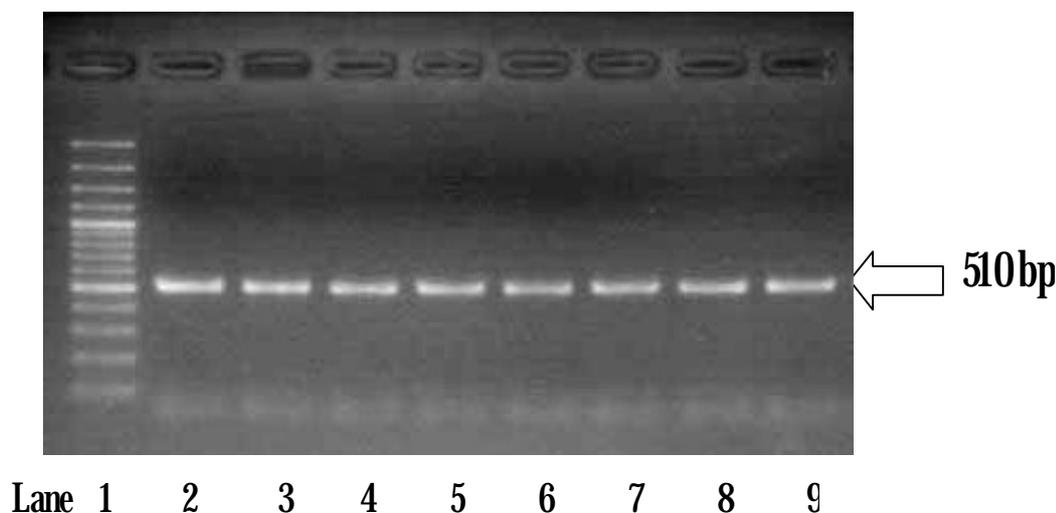
ภาพที่ 7 ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-12 ที่มีขนาด 320bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลือง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp

จากการเพิ่มปริมาณยีน ALVE-15 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีน ALVE-15 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเหลือง ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมอะกาโรสเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180 คู่เบส ในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Benkel และ Smith (1993) แถบดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็นส่วนหนึ่งของหนึ่งของจีโนมไก่ ที่ไม่มีการถูกแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ALVE-15) ส่วนของ endogenous retrovirus (ALVE-15⁺) ไม่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ แสดงว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ปราศจากยีนของ endogenous retrovirus ซึ่งหมายความว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์เหล่านี้มีบรรพบุรุษที่ไม่ได้ถูก infected ด้วย endogenous retrovirus



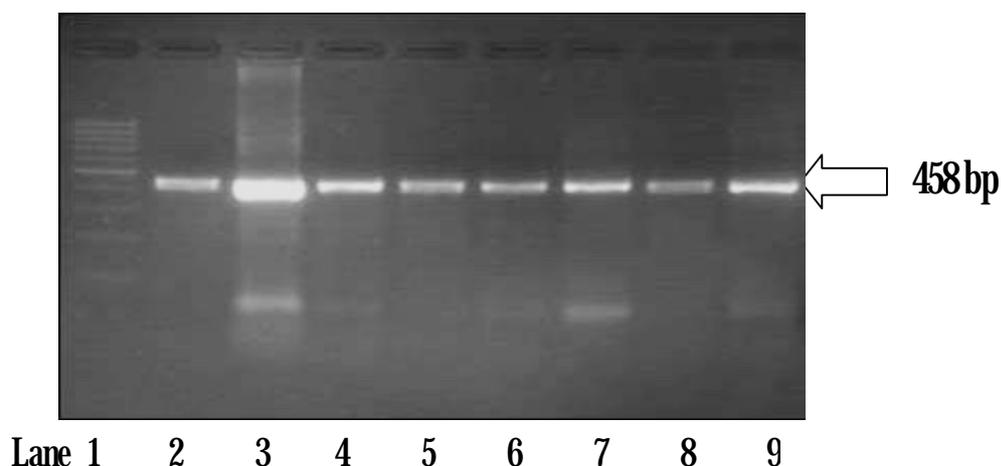
ภาพที่ 8 ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-15 ที่มีขนาด 180bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลือง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp

จากการเพิ่มปริมาณยีน ALVE-21 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีน ALVE-21 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเหลือง ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมอะกาโรสเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 510 คู่เบส ในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน (ภาพที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tixier-Boichard *et al.* (1994) แถบดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็นส่วนหนึ่งของหนึ่งของจีโนมไก่ ที่ไม่มีการแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ALVE-21⁻) ส่วนของ endogenous retrovirus (ALVE-21⁺) ไม่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ แสดงว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ ปราศจากยีนของ endogenous retrovirus ซึ่งหมายความว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์เหล่านี้ มีบรรพบุรุษที่ไม่ได้ถูก infected ด้วย endogenous retrovirus โดยยีน ALVE-21 มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะปรากฏของความสัมพันธ์ระหว่างการงอกของขน โดยถ้ามีการแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ev-21⁺) ส่งผลต่อลักษณะขนงอกเร็ว ถ้าไม่มีการแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ev-21⁻) ส่งผลต่อลักษณะขนงอกช้า (Bouliou *et al.*, 1991) และถ้ามีแทรกตัวของ ev-21⁺ จะส่งผลให้มีการทนทานต่อการติดเชื้อจาก subgroup A (Smith *et al.*, 1990)



ภาพที่ 9 ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-21 ที่มีขนาด 510bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเดือน (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp

จากการเพิ่มปริมาณยีน ALVE-B3 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีน ALVE-B3 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเดือน ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง แล้วนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และย้อมอะกาโรสเจลด้วย EtBr พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 458 คู่เบส ในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่มีขนาดเท่ากัน (ภาพที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Benkel *et al.* (1997) แถบดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็นส่วนหนึ่งของหนึ่งของจีโนมไก่ ที่ไม่มีการถูกแทรกตัวของ endogenous retrovirus (ALVE-B3) ส่วนของ endogenous retrovirus (ALVE-B3') ไม่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ แสดงว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ปราศจากยีนของ endogenous retrovirus ซึ่งหมายความว่าไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์เหล่านี้มีบรรพบุรุษที่ไม่ได้ถูก infected ด้วย endogenous retrovirus โดยยีนในตำแหน่งนี้มีความสำคัญในไก่ไข่ที่มีเปลือกไข่สีน้ำตาล เมื่อตรวจสอบในไก่ไข่ที่ใช้ศึกษาพบว่าไม่มี endogenous retrovirus อาจเพราะเนื่องจากไก่ที่ใช้ในการศึกษาเป็นคนละสายพันธุ์กับกลุ่มอ้างอิง ทำให้ไก่ที่ใช้ในการศึกษาตรวจไม่พบ endogenous retrovirus ตำแหน่งนี้ ทั้งนี้ในการศึกษาของ Benkel *et al.* (1997) ในไก่ไข่สายพันธุ์ White Leghorns พบ endogenous retrovirus ได้ในตำแหน่งนี้ที่ 293 bp



ภาพที่ 10 ผลผลิต PCR ของยีน ALVE-B3 ที่มีขนาด 458bp ในไก่ไข่ (เลนที่ 2-3) ไก่สามเหลียง (เลนที่ 4-5) ไก่เนื้อ (เลนที่ 6-7) และไก่พื้นเมือง (เลนที่ 8-9) ส่วนเลนที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp

การใช้ไพรเมอร์ที่เจาะจงกับยีน ALVE-9 และยีน ALVE-B4 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเหลียง ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใดๆ ในไก่ทุกตัว ทั้ง 4 สายพันธุ์ เนื่องจากไพรเมอร์ไม่ทุกชนิดที่สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอในประชากรที่ทดลองได้เหมือนกันหมด (Cheng *et al.*, 1995) จึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงพันธุกรรมของประชากรว่ามีพื้นฐานพันธุกรรมมาจากไก่สายพันธุ์ใด ดังนั้นในประชากรไก่ทดลองนี้เป็น ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่สามเหลียง ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง จึงมีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างจากประชากรกลุ่มอ้างอิงที่ Benkel *et al.* (1998) สร้างขึ้นและตรวจพบแถบดีเอ็นเอ

นอกจากนี้การที่ไก่แต่สายสายพันธุ์มี **endogenous DNA elements** ที่มีความคล้าย (similarity) กับจีโนม **exogenous retroviral avian leucosis virus (ALVs)** ซึ่งลำดับเบสของ **endogenous viral (ev)** จะมีการถ่ายทอดไปสู่ลูกหลาน ซึ่งบางชิ้นส่วนจะมีความไม่สมบูรณ์ (incomplete) มีการขาดหายของชิ้นส่วน และไม่มีการสร้างเป็นตัวไวรัสสมบูรณ์ หรือจะมีการสร้างเพียงบางส่วน แต่ไม่สามารถสร้างเป็นตัวไวรัสได้ และบางชนิดมีความสามารถในการแสดงออกของยีน สามารถจำลองตัวไวรัสที่สมบูรณ์ได้ (complete) เหตุที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพราะ **ev gene** ที่สามารถสร้างเป็นตัวไวรัสที่สมบูรณ์ได้มีความสัมพันธ์กับการแสดงของอัตราการผลิตไข่และน้ำหนักไข่ (Gavoro *et al.*, 1991) การเจริญเติบโตช้าลง (Zavala และ Cheng 2006) และชักนำ

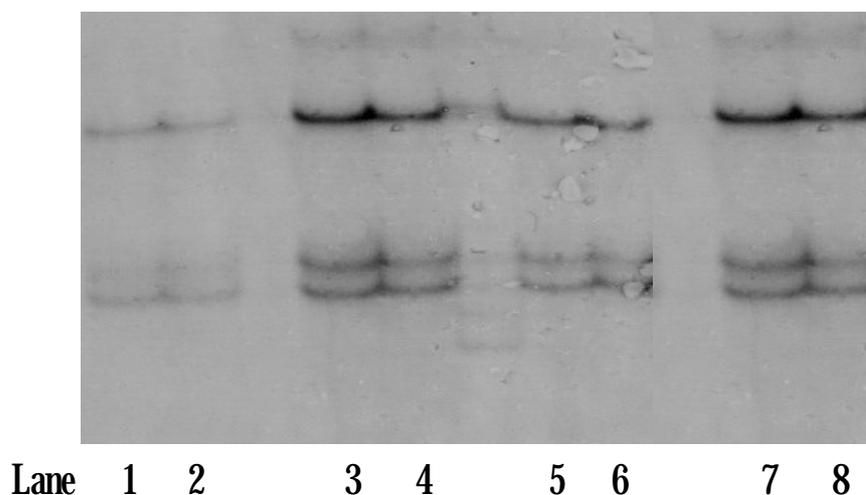
ให้เกิดการติดเชื้อ **exogenous avian leukosis virus** ในไก่ได้อีก (Crittenden *et al*, 1982) นอกจากนี้ **ev gene** ที่มีการสร้างเฉพาะส่วนของ **viral envelope** เป็นส่วนที่เป็น **antigenic** สามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน และเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันที่ทำให้ไก่มีความทนต่อโรคได้ (**immune tolerance**) (Smith และ Fadly, 1988; Bacon *et al*, 1988; Sacco *et al*, 2004) หรือเกิดการต้านทานต่อโรค (Kuhlein *et al*, 1989; Gavora *et al*, 1991)

Endogenous retroviruses เป็นไวรัสที่แทรกตัวเป็นส่วนหนึ่งของจีโนม ซึ่งสามารถใช้ลักษณะที่เกี่ยวข้องของยีนช่วยในการค้นหา และอาจทำนายได้ถึงความทนทานต่อโรค **exogenous avian leukosis viruses** ได้ ซึ่ง **endogenous retroviruses** อาจไปกระตุ้นหรือไปกดการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยคุณวโน้มของการมีชิ้นส่วนประกอบที่จะจำลองตัวเป็นไวรัสตัวใหม่ของ **endogenous retroviruses** ว่าเป็นชิ้นส่วนที่มีส่วนประกอบสมบูรณ์ มีการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม หรือมีชิ้นส่วนที่ขาดหายไป ซึ่งการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมและการขาดหายของบางชิ้นส่วนจะทำให้ความสามารถในการก่อโรคหายไป (Bacon *et al*, 2000)

เนื่องจาก **endogenous retroviruses** มีความสัมพันธ์กับการเกิดของโรค **avian leukosis virus** ซึ่งมักจะก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีกที่มีอายุตั้งแต่ 6 เดือนขึ้นไป และ **endogenous retrovirus** ตำแหน่ง **ALVE-B3** เป็นตำแหน่งที่มักตรวจพบในไก่ไข่เปลือกสีน้ำตาล (Bouliou *et al*, 1991) ซึ่งเป็นไก่ที่มีระยะเวลาของการเลี้ยงในการให้ผลผลิตค่อนข้างยาวนาน โดยจากการตรวจสอบโดยวิธี **PCR** ช่างค้นพบว่าไม่มีความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นจากการทดลองที่ได้ทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาผลผลิตของยีนตำแหน่ง **ALVE-B3**

3 ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี **Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

ผลผลิต **PCR** ตำแหน่ง **ALVE-B3** ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค **PCR** และให้ผลขนาดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ ถูกนำมาวิเคราะห์หา **Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)** โดยใช้เทคนิค **Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)** บน **nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)** ที่ความเข้มข้น 10% แล้วตรวจสอบผลจากแผ่นเจลด้วยวิธี **silver staining** ซึ่งพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว ซึ่งไม่แตกต่างกันในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SSCP ของยีน ALVE-B3 ใน籼สามเหลือง (เลนที่ 1-2) 籼ไขสายพันธุ์ทางการค้า (เลนที่ 3-4) 籼พื้นเมือง (เลนที่ 5-6) และ籼เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (เลนที่ 7-8)

นอกจากนี้ Adkins *et al.* (1997) และ Klucking *et al.* (2002) รายงานการศึกษาบริเวณที่เป็น receptor บริเวณ LTRs ของโรค ALV จาก endogenous retrovirus subgroup E โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 3 แถบ คือ TVB^{s1} จะ susceptible ต่อการรับเชื้อจาก endogenous retrovirus subgroup B, D และ E (Adkins *et al.*, 2000), TVB^{s3} จะชักนำให้เกิดการติดโรค ALV เฉพาะ subgroup B และ D (Brojatsch *et al.*, 1996) และ TVB^r จะต้านทานต่อการติดโรค ALV จาก subgroup B, D และเป็น receptor เฉพาะ subgroup E (Weiss, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Payne (1998) ที่ศึกษาบริเวณ receptor ของโรค ALV ของ endogenous retrovirus subgroup A ถึง E พบว่ามีรูปแบบของยีน 3 ตำแหน่ง คือ *tva* จะ susceptible ต่อการติดโรคจาก endogenous retrovirus subgroup B, D และ E, *tvb* จะชักนำให้เกิดการติดโรค ALV เฉพาะ subgroup B และ D และ *tvc* จะต้านทานต่อการติดโรค ALV จาก subgroup B, D และเป็น receptor เฉพาะ subgroup E

และจากบริเวณที่ศึกษานี้เป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีความจำเพาะต่อการเข้าแทรกตัวของ endogenous retrovirus ซึ่งบริเวณนี้จะเป็นส่วนที่จะชักนำให้ LTRs ของ endogenous retrovirus เข้าแทรกตัวในจีโนมของไก่ โดย LTRs จะมีลักษณะเป็น inverted repeats (Boyce-Jacino *et al.*, 1992) ยาวประมาณ 270-330 bp แล้วแต่ชนิดตำแหน่ง (Hughes, 1982) และมีส่วนที่เป็น promoter ในการทำหน้าที่การควบคุมการแสดงออกของยีนและการเข้าแทรกตัวกับจีโนมของไก่ (Ju และ Skalka,

1980; Hayward *et al.*, 1981; Vamouss และ Brown, 1989) นอกจากนี้บริเวณส่วนของ LTRs ของ endogenous retrovirus ยังมีความคล้ายคลึงกับ exogenous retrovirus ซึ่งมีความสัมพันธ์ช่วยชักนำให้ติดเชื้อโรค (Cullen *et al.*, 1985) และมีการศึกษาการกลายพันธุ์บริเวณ LTRs ของโรค ALV ที่เกิดจากเชื้อ endogenous retrovirus subgroup E และพบการกลายพันธุ์ในบริเวณดังกล่าว (Klucking และ Young 2004)

จากการที่รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบ conformation ด้วยเทคนิค SSCP ตรวจพบเพียงรูปแบบเดียว อาจเป็นเพราะเทคนิค SSCP มีปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีผลต่อการตรวจสอบความหลากหลายที่เกิดขึ้นภายในสายนิวคลีโอไทด์ (วีรพงษ์, 2539) ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะ conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งเทคนิค SSCP จะสามารถแสดงความแตกต่างเมื่อเบสเปลี่ยนไปเพียง 1 เบส ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จะต้องมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ไม่ว่าจะเป็นอุณหภูมิ เปอร์เซ็นต์เจล กำลังไฟฟ้า และระยะเวลา นอกจากนี้ลักษณะการกลายพันธุ์หรือความแตกต่างในสายดีเอ็นเอ เนื่องจากตำแหน่งและชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลง จะมีผลต่อการตรวจสอบโดยเทคนิค SSCP ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตรงปลายของสายนิวคลีโอไทด์ จะส่งผลให้ตรวจสอบได้ยากขึ้น (Baroso *et al.*, 1999) ในขณะที่ชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลง ไม่ว่าจะเป็น transition หรือ transversion มีผลน้อยมาก ส่วนในกรณีที่เบสมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าหนึ่งเบส ถ้าตำแหน่งของเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง รวมอยู่ในบริเวณใด บริเวณหนึ่งในสายนิวคลีโอไทด์ โอกาสตรวจพบการเปลี่ยนแปลงโดยเทคนิค SSCP จะมีมากกว่าในกรณีที่ตำแหน่งเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกระจายอยู่ทั่วสายนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้แล้วลำดับเบสที่อยู่ทั้งสองด้านของตัวเบสที่เปลี่ยนแปลงก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการตรวจพบการเปลี่ยนแปลง (วีรพงษ์, 2539) นอกจากนี้ Sheffield *et al.* (1993) แนะนำว่าความสามารถในการหาความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสของเทคนิค SSCP นั้น ชิ้นส่วนที่เล็กกว่า 200 bp จะสามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน และ Hayashi (1991) ประมาณค่าความไวในการตรวจสอบด้วยวิธี SSCP และสามารถตรวจสอบได้ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อดีเอ็นเอที่ถูกตรวจสอบมีขนาด 100 ถึง 300 bp และ 89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อดีเอ็นเอมีขนาด 300 ถึง 450 bp และเปอร์เซ็นต์การตรวจสอบจะลดลง เมื่อชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ขึ้น

การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน ALVE-B3 ของไก่สามเหลือง ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่พื้นเมือง และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีเพียงรูปแบบเดียวในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ จึงทำให้ไม่สามารถใช้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในการแยกความแตกต่างระหว่างไก่แต่ละสายพันธุ์ได้

4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ALVE-B3

ผลการหาลำดับเบส (sequencing) ของยีน ALVEs โดยเลือกตำแหน่ง ALVE-B3 จากตัวอย่างไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่พื้นเมือง และไก่สามเหลืองกลุ่ม แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบ (Blast) กับยีนที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของยีน ALVE-B3 ที่ได้เหมือนกับโครโมโซมของไก่ที่รายงานใน GenBank ซึ่งไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า มีค่า identity กับยีน ALVE-B3 ที่มีในฐานข้อมูล GenBank 98% (GenBank accession number NW_001471729.1; Griffiths-Jones *et al.* (2006)), ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้ามีค่า identity กับยีน ALVE-B3 ที่มีในฐานข้อมูล GenBank 97%, ไก่พื้นเมืองมีค่า identity กับยีน ALVE-B3 ที่มีในฐานข้อมูล GenBank 99% และในไก่สามเหลืองมีค่า identity กับยีน ALVE-B3 ที่มีในฐานข้อมูล GenBank 96% ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับเบส (Blast) ของยีน ALVE-B3 กับยีนที่มีในฐานข้อมูล พบว่าในไก่สามเหลือง ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า ไก่พื้นเมือง และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ามีลำดับเบสเหมือนกับโครโมโซมคู่ที่ 7 ของไก่ป่าสีแดง (red jungle fowl: *Gallus gallus*) ที่รายงานใน GenBank และในไก่สามเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส 8 ตำแหน่ง ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า 5 ตำแหน่ง ไก่พื้นเมือง 3 ตำแหน่ง และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า 2 ตำแหน่ง ตามลำดับ (ภาคผนวก ก) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation) แบบแทนที่เบส (substitution) ชนิดทรานเวอร์ชัน (transversion) และชนิดทรานซิชัน (transition) (ประดิษฐ์, 2541)

นอกจากนี้ในไก่สามเหลืองยังเป็นที่น่าสังเกตอย่างหนึ่งคือ การเข้าจับของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของไพรเมอร์ ALVE-B3 โดยในไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าจะเข้าจับลำดับเบสที่ 13059370 และไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้าลำดับเบสที่ 13059384 ของโครโมโซมคู่ที่ 7 แต่ในไก่สามเหลืองการเข้าจับของไพรเมอร์จะเข้าจับลำดับเบสที่ 13059013 ซึ่งเข้าจับก่อนไก่สายพันธุ์อื่นๆ ประมาณ 350bp ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าจะมีการศึกษาต่อว่าทำไมถึงได้มีความแตกต่างเกิดขึ้น ซึ่งอาจเกิดได้จากการ deletion ของบริเวณขึ้นส่วนดังกล่าวของโครโมโซม ซึ่งบริเวณ 5' ของ LTRs จะเกิดการ deletion ถึง 16% ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการแทรกตัวเข้าเป็นส่วนหนึ่งของจีโนมกับบริเวณที่จำเพาะ และการขาดหายของ LTRs ยังมีส่วนเกี่ยวข้องชักนำให้เกิดการติดเชื้อ RAV ได้ถึง 19% (Robinson และ Gagnon, 1986) หรือเกิดจากการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของตัว endogenous retrovirus เอง เนื่องจาก endogenous retrovirus ก็เป็น retrotransposon ชนิดหนึ่ง (Sacco *et al.*, 2000) ซึ่งในตำแหน่ง ALVE-7 ในไก่มีการรายงานการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของตัว

endogenous retrovirus ไปตำแหน่งใหม่เอง (Silver และ Keenikatte, 1989) หรือเกิดจากวิวัฒนาการของไก่สามเหลี่ยมที่อาจจะมาจากคนละแหล่งกับสายพันธุ์ของไก่อีก 3 สายพันธุ์ที่ศึกษา

ดังนั้นเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของไก่แต่ละสายพันธุ์ทำให้ไก่สายพันธุ์สามเหลี่ยมไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับของเบสได้ เนื่องจากตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ที่แตกต่างออกไปจากกลุ่ม ทำให้ตำแหน่งในการเข้าจับในการศึกษานี้มีลำดับที่เร็วกว่า (ประมาณ 350 bp) ในไก่สายพันธุ์อื่นๆ จึงทำให้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้แตกต่างออกไป จึงนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มกันไม่ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างสายพันธุ์เพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น คือ ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง

จากการทำ **Multiple alignment** ของลำดับเบสที่ได้จากไพรเมอร์ตำแหน่ง **ALVE-B3** ของไก่เนื้อ ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมือง มาศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างกลุ่มของประชากรแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ไก่พื้นเมืองเป็นฐานเปรียบเทียบ พบว่าไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่แตกต่างไปจากไก่พื้นเมือง 13 ตำแหน่ง และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่แตกต่างไปจากไก่พื้นเมือง 8 ตำแหน่ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ หรือเกิดการกลายพันธุ์ระดับยีน (**point mutation**) จะเป็นแบบแทนที่เบส (**substitution**) ชนิดทรานซิชัน (**transition**) คือการแทนที่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์จากเบสพิวรีน (**purine**) ชนิดหนึ่งด้วยพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง หรือการแทนที่เบสไพริมิดีน (**pyrimidine**) ชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง (ประดิษฐ์, 2541) ดังแสดงในภาพที่ 12

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
Native : CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGCAGGTTTCTCAACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGAT : 108
Broile : CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGCAGGTTTCTCAACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGAT : 108
Layer : CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGCAGGTTTCTCAACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGAT : 108
CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGCAGGTTTCTCAACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGAT

*          120          *          140          *          160          *          180          *          200          *
Native : GTGATGTTGTTTTTATACATACACATATATATATATATATACTTCTGAAGGTAATAAGCCACCCACTAAGACTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAA : 216
Broile : GTGATGTTGTTTTTATACATACATATATATATATATATACTTCTTGAAGGTAATAAGCCACCCACTAAGACTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAA : 216
Layer : GTGATGTTGTTTTTATACATACATATATATATATATATATACTTCTTGAAGGTAATAAGCCACCCACTAAGACTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAA : 216
GTGATGTTGTTTTTATACATACATATATATATATATATATActtcTgTGAAGGTAATAAGCCACCCACTAAGACTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAA

220          *          240          *          260          *          280          *          300          *          320
Native : GGTTTTGTGAAAATAATGACCAAACTAGCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAATGAAGTGTCCAGCATTCCAGAAAT : 324
Broile : GGTTTTGTGAAAATAATGACCAAACTAGCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAATGAAGTGTCCAGCATTCCAGAAAT : 324
Layer : GGTTTTGTGAAAATAATGACCAAACTAGCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAATGAAGTGTCCAGCATTCCAGAAAT : 324
GGTTTTGTGAAAATAATGACCAAACTAGCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAATGAAGTGTCCAGCATTCCAGAAAT

*          340          *          360          *          380          *          400
Native : ATTGCAAATGCCATTACCAAAGTAAATCTACTCAAAACAATCTTTGTTTTGTGGGAATCAAAAA----- : 390
Broile : ATTGCAAATGCCATTACCAAAGTAAATCTCTCAAAACAATCTTTGTTTTGTGGGAATCAAAAA----- : 390
Layer : ATTGCAAATGCCATTACCAAAGTAAATCTCTCAAAACAATCTTTGTTTTGTGGGAATCAAAAA----- : 390
ATTGCAAATGCCATTACCAAAGTAAATCTCTCAAAACAATCTTTGTTTTGTGGGAATCAAAAA

```

ภาพที่ 12 ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ตำแหน่ง ALVE-B3 โดยสุ่มจากไก่เนื้อ ไก่ไข่สายพันธุ์การค้า และไก่พื้นเมือง โดยเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่ม

ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ **transition 7** ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของไก่พื้นเมือง

จาก A เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่งเบสที่ 20

จาก T เปลี่ยนเป็น C ที่ตำแหน่งเบสที่ 149, 152, 372, 384

จาก C เปลี่ยนเป็น T ที่ตำแหน่งเบสที่ 133, 151

ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ **transition 5** ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของไก่พื้นเมือง

จาก T เปลี่ยนเป็น C ที่ตำแหน่งเบสที่ 149, 152, 372

จาก C เปลี่ยนเป็น T ที่ตำแหน่งเบสที่ 133, 151

และเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบแทนที่เบส ชนิดทรานเวอร์ชัน (**transversion**) คือ การแทนที่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์จากเบสพิวรีน (**purine**) ชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกชนิดหนึ่ง หรือการแทนที่เบสไพริมิดีน (**pyrimidine**) ชนิดหนึ่งด้วยพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง (ประคิษฐ์, 2541) ดังแสดงในภาพที่ 12

ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ **transversion 6** ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของไก่พื้นเมือง

จาก **A** เปลี่ยนเป็น **T** ที่ตำแหน่งเบสที่ **150, 313**

จาก **T** เปลี่ยนเป็น **A** ที่ตำแหน่งเบสที่ **374**

จาก **A** เปลี่ยนเป็น **C** ที่ตำแหน่งเบสที่ **355**

จาก **C** เปลี่ยนเป็น **A** ที่ตำแหน่งเบสที่ **385**

จาก **C** เปลี่ยนเป็น **G** ที่ตำแหน่งเบสที่ **154**

ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสแบบ **transversion 3** ตำแหน่ง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของไก่พื้นเมือง

จาก **T** เปลี่ยนเป็น **A** ที่ตำแหน่งเบสที่ **150**

จาก **A** เปลี่ยนเป็น **C** ที่ตำแหน่งเบสที่ **355**

จาก **C** เปลี่ยนเป็น **G** ที่ตำแหน่งเบสที่ **154**

จากการศึกษาในไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่พบการแทรกตัวของ **endogenous retroviruses** ทุกสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองของไทยมีบรรพบุรุษที่ปลอดภัยจากการแทรกตัวของ **endogenous retrovirus** เนื่องจากตัวอย่างไก่พื้นเมืองที่นำมาศึกษา ไม่ตรวจพบบริเวณที่เป็นลำดับเบสจำเพาะของการเข้าแทรกตัวของ **endogenous retrovirus** จึงทำให้ **endogenous retrovirus** ไม่สามารถที่จะเข้าแทรกตัวได้ ส่วนในไก่เนื้อและไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้าที่ทำการศึกษาแล้วตรวจไม่พบการถูกแทรกตัวของ **endogenous retrovirus** ซึ่งขัดแย้งกับรายงานก่อนนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้ใช้กลุ่มประชากรคนละสายพันธุ์กับกลุ่มอ้างอิง ซึ่งกลุ่มอ้างอิงใช้สายพันธุ์ **White Leghoms** ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน (สุวรรณ, 2535)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การตรวจหารูปแบบของแถบดีเอ็นเอ **endogenous retroviruses** ด้วยเทคนิค **PCR** โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งต่างๆ 7 ตำแหน่ง **ALVE-1, ALVE-12, ALVE-15, ALVE-21, ALVE-B3, ALVE-9** และ **ALVE-B4** พบว่าไพรเมอร์ **ALVE-1, ALVE-12, ALVE-15, ALVE-21** และ **ALVE-B3** จะให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ที่มีขนาด **505, 320, 180, 510** และ **458 bp** ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันของรูปแบบแถบดีเอ็นเอภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นส่วนหนึ่งของจีโนม แสดงให้เห็นว่าไม่พบการ **insertion** ของ **endogenous retroviruses** ส่วนไพรเมอร์ **ALVE-9** และ **ALVE-B4** ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอในทั้ง 4 สายพันธุ์

2. การตรวจหารูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน **ALVE-B3** ในตัวแทนไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค **Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)** ให้ผลเพียงรูปแบบเดียวที่ไม่แตกต่างกันทั้ง 4 สายพันธุ์

3. การศึกษาลำดับเบส (**Sequencing**) ของยีน **ALVE-B3** ในตัวแทนไก่ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในสายนิวคลีโอไทด์ หรือเกิดการกลายพันธุ์ระดับยีน (**point mutation**) แบบแทนที่เบส (**substitution**) ชนิดทรานเวอร์ชัน (**transversion**) และแบบแทนที่เบสชนิดทรานซิชัน (**transition**)

ข้อเสนอแนะ

1. การตรวจหา **endogenous retrovirus** ควรสุ่มเก็บตัวอย่างให้มากกว่านี้ และศึกษาในสายพันธุ์ต่างๆ ให้หลากหลายมากกว่านี้ อาจทำให้การศึกษาสามารถตรวจพบและเป็นประโยชน์ใช้ในการศึกษาต่อไปได้อีก

2. ควรมีการเปรียบเทียบพวกที่เป็น **positive endogenous retrovirus**, ตำแหน่งของการแทรกตัว และพวกที่มีการติดเชื้อ **avian leukosis virus** ว่ามีตำแหน่งของการกลายพันธุ์เหมือนหรือต่างกัน เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นส่วนหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2536 โรคติดต่อในไก่. คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 286 น.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. พันธุศาสตร์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2537. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 282 น.
- สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2535. การเลี้ยงไก่ฉบับปรับปรุงแก้ไข พ.ศ.2535. ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วีรพงศ์ ลulitanนท์. 2539. Detection of point mutation by PCR-SSCP, น. 16(1) - 16(9). ใน วสันต์ จันทราทิตย์ ปราณี ลิขณะลัย และ วาสนา ศิริรังสี, บรรณาธิการ. วิทยาการทันสมัย ในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- Aart, H.J.M, M.C. Vander Hulst-Van Arkel, G. Bouving and F.R. Leenstra. 1991. Variation in endogenous viral gene patterns in white leghorn, medium heavy white Plymouth-rock and Comish chicken. Poultry Sci. 70: 1281-1286.
- Adkins, H.B., J. Brojatsch, J. Naughton, M.M. Rolls, J.M. Pesola and J.A. Young. 1997. Identification of a cellular receptor for subgroup E avian leukosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11617-11622.

- Adkins, H.B., J. Brojatsch and J.A. Young 2000. Identification and characterization of a shared TNFR-related receptor for subgroup B, D and E avian leukosis viruses reveal cysteine residues required specifically for subgroup E viral entry. *J. Virol.* 74: 3572-3578.
- Astin, S. 1978. Endogenous viral genes of the White Leghorn chicken: common site of residence and site associated with specific phenotypes of viral expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5941-5945.
- Bacon, L.D., H.D. Hunt and H.H. Cheng 2000. A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases. *Poultry Sci.* 79: 1082-1093.
- Bacon, L.D., E.J. Smith, L.B. Crittenden and G.B. Haverstein 1988. Association of the slow-feathering (K) and an endogenous viral (ev-21) gene on the Z chromosome of chickens. *Poultry Sci.* 67: 191-197.
- Bai, J., K. Howes, L.N. Payne and M.A. Skinner 1995b. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). *Gen. Virol.* 76: 181-187.
- Baroso, A., S. Durrer and J. Cannom 1999. Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Anim. Sci.* 76: 1353-1358.
- Benkel, B.F. 1998. Locus-specific diagnostic tests for endogenous avian leukosis-type viral loci in chickens. *Poultry Sci.* 77: 1027-1035.
- Benkel, B.F. and Y. Fong 1996. Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR. *Genetic analysis: Biomol. Eng.* 13: 123-127.

- Benkel, B.F., A.A. Grunder, D. Burke and F.A. Ponce de Leon. 1997. A diagnostic assay for the endogenous ALV-type provirus ALVE-B3 of broiler chickens. *Anim. Genet.* 28: 238.
- Benkel, B.F., A.A. Grunder, P.S. Ramos and F.A. Ponce de Leon. 1998. A diagnostic assay for the endogenous ALV-type provirus ALVE-B2 of broiler chickens. *Anim. Genet.* 29: 375.
- Benkel, B.F., J. Mucha and J.S. Gavora. 1992. A new diagnostic method for the detection of endogenous Rous-associated virus-type provirus in chicken. *Poultry Sci.* 71: 1520-1526.
- Benkel, B.F. and E.J. Smith. 1993. Research note: A rapid method for the detection of the Rous-associated endogenous solitary long terminal repeat, ev15. *Poultry Sci.* 72: 1601-1605.
- Bennett, R.M., K. Christensen and R.S. Clifton-Hadley. 1999. Modelling the impact of livestock infection on production: case studies of non-notifiable infection of farm animal in Great Britain. *Anim. Sci.* 68: 681-689.
- Beridze, T. 1986. *Satellites DNA*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York. *Cited by* B.B. Jacob, L.J. Nijman, C. Zijlstra and J.A. Lenstra. A satellite DNA element specific for roe deer (*Capreolus xapreolus*). *Chromosoma.* 107: 1-5.
- Best, S., P.R. Tissier and J.P. Stoye. 1997. Endogenous retroviruses and the evolution to retrovirus infection. *Trends Microbiol.* 5: 313-318.
- Bitgood, J.J. and R.N. Shoffner. 1990. Cytology and cytogenetics. pp. 401-427. *In* R.D. Crawford, ed. *Poultry Breeding and genetics*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bloom, S.E. 1981. Detection of normal and aberrant chromosome in chicken embryos and in tumor cells. *Poultry Sci.* 60: 1355-1361.

- Borisenko, L., A.V. Rynditch. 2004. Complete nucleotide sequences of ALV-related endogenous retroviruses available from the draft chicken genome sequence. *Folia Biologica (Praha)* 50: 136-141.
- Boulliou, A., J.P. Le Penec, G. Hubert, R. Donald and M. Smiley. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of endogenous avian leukosis viral loci: determination of frequencies in commercial broiler lines. *Poultry Sci.* 70: 1287-1296.
- Boyce-Jacino, M.T., K. Odonoghie and A.J. Faras. 1992. Multiple complex families of endogenous retroviruses are highly conserved in the Genus *Gallus*. *J. Virol.* 66: 4919-4929.
- Brojatsch, J., J. Naughton, M.M. Rolls, K. Ziegler and J.A.T. Young. 1996. CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *J. Cell.* 87: 845-855.
- Cheng H.H. and L.B. Crittenden. 1994. Microsatellites markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci.* 73: 539-546.
- Cheng H.H., I. Levin, R.L. Vallejo, H. Khatib, J.B. Dodgson, L.B. Crittenden and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Sci.* 74: 1855-1874.
- Crittenden, L.B., A.M. Fady and E.J. Smith. 1982. Effect of endogenous leukosis virus genes on response to infection with avian leukosis and reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis.* 26: 279-294.
- Crooijmans, R.P.M.A., P.A.M.V. Oers, J.A. Strijk, J.J.V.D. Poel and M.A.M. Groenen. 1996b. Preliminary map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellites marker. 77 New markers mapped. *Poultry Sci.* 75: 746-754.

- Cullen, B.R., K. Raymond and G. Ju. 1985. Transcriptional activity of avian retroviral long terminal repeats directly correlates with enhancer activity. *J. Virol.* 53: 515-521.
- Fenner, F., P.A. Bachmann, E.P.J. Gibbs, F.A. Murphy, M.J. Studdert and D.O. White. 1987. *Veterinary Virology*. Academic press, inc.
- Frisby, D.P., R.A. Weiss, M. Roussel and D. Stehelin. 1979. The distribution of endogenous chicken retrovirus sequences in the DNA of galliform bird does not coincide with avian phylogenetic relationships. *J. Cell.* 17: 623-634
- Gavora, J.S. 1987. Influences of avian leukosis virus infection on production and mortality and the role of genetic selection in the control of lymphoid leucosis, pp. 241-260. *In* G.F. de Boer, ed. *Avian Leukosis*. Martinus Nijhoff Publishing Boston, MA.
- Gavora, J.S., U. Kuhnlein, L.B. Crittenden, J.L. Spenser and M.P. Sabour. 1991. Endogenous viral gene: Association with reduced egg production rate and egg size in White Leghorn. *Poultry Sci.* 70: 618-623.
- Gorbovitskaia, M., J.L. Coville and M. Tixier-Boichard. 1998. Molecular characterization of endogenous viral genes of the avian leukosis virus family in an experimental population of Brown-Egg Layers. *Molec. Biol.* 77: 605-614
- Griffiths-Jones S., R.J. Grocock, S. Van Dongen, A. Bateman and A.J. Enright. 2006. miRbase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34: 140-144
- Grunder, A.A., B.F. Benkel, J.R. Chambers, M.P. Sabour and J.S. Gavora. 1995. Characterization of eight endogenous viral (ev) gene of meat chicken in semicongenic lines. *Poultry Sci.* 74: 1506-1514

- _____. 2004. *Gallus gallus* (chicken) genome view. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9031, March 20, 2006.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth. Appl.* 1: 34-38
- Hayward, W.S., B.G. Neel and S.M. Astrin. 1981. Activation of a cellular one gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature (London)*. 290: 475-480.
- Hughes, S.H. 1982. Sequence of the long terminal repeat and adjacent segments of the endogenous avian virus rous-associated virus 0. *J. Virol.* 43: 191-200.
- Iraqi, F., M. Soller and E.J. Smith. 1994. Determination of avian endogenous provirus-cellular junction sequences using inverse polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.* 5: 69-80
- Ju, G. and A.M. Skalka. 1980. Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat (LTR) of avian retroviruses: structural similarities with transposable elements. *J. Cell.* 22: 379-386.
- Klucking S., H.B. Adkins and J.A.T. Young. 2002. Resistance to infection by subgroup B, D and E avian sarcoma and leukosis viruses is explained by a premature stop codon within a resistance allele of the *tvb* receptor gene. *J. Virol.* 76: 7918-7921.
- Klucking S. and J.A.T. Young. 2004. Amino acid residues Tyr-67, Asn-72 and Asp-73 of the TVB receptor are important for subgroup E avian sarcoma and leukosis virus interaction. *J. Virol.* 318: 371-380.
- Kuhnlein, U., M. Sabour, J.S. Gavora, R.W. Fairfull and D.E. Bemon. 1989. Influence of selection for egg production and Marek's disease resistance on the incidence of endogenous viral gene in White Leghorn. *Poultry Sci.* 68: 1161-1167.

- Lewin B. 1980. Gene Expression. Vol. 2: Wiley, New York. 298 p.
- _____. 2004. Life cycle of retrovirus view. Available Source: <http://staff.jccc.net/pdecell/bio205/webct/bio205home.html>, March 20, 2006.
- Miller, A.D. 1996. Cell-Surface receptors for retroviruses and implication for gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 11407-11413.
- Moran, C. 1993. Microsatellites repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genome. J. Hered. 84: 274-280.
- Pathak, V.M. and W.S. Hu. 1997. "Might as well jump" template switching by retroviral reverse transcriptase, defective genome formation, and recombination. Seminars in Virology. 8: 141-150.
- Payne, L.N. 1998. Retrovirus-induced disease in poultry. Poultry Sci. 77: 1204-1212.
- Payne, L.N., S.R. Brown, N. Bumstead, K. Howes, J.A. Frazier and M.E. Thouless. 1991. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chicken. Gen. Virol. 72: 801-807.
- Payne, L.N., and A.F. Fadly. 1997. Neoplastic disease/leukosis/sarcoma group, pp. 414-466. In B.W. Calnek, ed. Disease of Poultry. 10th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- _____. 2004. Polymerase chain reaction view. Available Source: <http://www.mta-labor.info>, March 20, 2006.
- Purchase, H.G., W. Okazaki, P.K. Vogt, H. Hanafusa, B.R. Bumester and L.B. Crittenden. 1977. Oncogenicity of avian leukosis viruses of different subgroups and of mutants of sarcoma viruses. Infect. Immunol. 15: 423-428.

- Purchase, H.G. and L.N. Payne. 1978. Leukosis, Sarcoma group, Diseases of Poultry. 7th ed., Hofstad, Iowa State University Press, Iowa.
- Robinson, H.L. 1978. Inheritance and expression of chicken genes that are related to avian leukosis sarcoma virus genes. *Microbiol. Immunol.* 83: 1-36.
- Robinson, H.L. and G.C. Gagnon. 1986. Patterns of proviral insertion and deletion in avian leukosis virus induced lymphomas. *J. Virol.* 57: 28-36.
- Rolf, A., I. Schuller, U. Finckh and I. Weber Rolf. 1992. PCR: Clinical diagnostics and Research. Springer Verlag Berlin Heidelberg Germany. 271 p.
- Ruddell, A., M. Linial, W. Shubach and M. Groudine. 1988. Lability of leukosis virus enhancer-binding proteins in avian hematopoietic cells. *J. Virol.* 62: 2728-2735.
- Ryden, T.A. and K. Beemon. 1989. Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 9: 1155-1164.
- Sabour, M.P., J.R. Chambers, A.A. Grunder, U. Kuhnlein and J.S. Gavora. 1992. Endogenous viral gene distribution in population of meat-type chicken. *Poultry Sci.* 71: 1259-1270.
- Sacco, M.A., D.M.J. Flannery, K. Howes and K. Venugopal. 2000. Avian endogenous retrovirus EAV-HP shares regions of identity with avian leukosis virus subgroup J and the avian retrotransposon ART-CH. *J. Virol.* 74: 1296-1306.
- Sacco, M. A., K. Howes, L.P. Smith and V.K. Nair. 2004. Assessing the roles of endogenous retrovirus EAV-HP in avian leukosis virus subgroup J emergence and tolerance. *J. Virol.* 78: 10525-10535.

- Sanbrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 638 p.
- Satalling R.L., A.F. Ford, D. Nelson, D.C. Toney, C.E. Hildebrand and R.K. Moyzis. 1991. Evolution and distribution of (TG)_n repetitive sequence in mammalian genome. *Genomics*. 10: 807-815.
- Savoboda, J. 1998. Molecular biology of cell non permissiveness to retroviruses. *Genetics*. 206: 153-163.
- Sevoian, M and D.M Chamberlain. 1964. Avian Lymphomatosis IV: Pathogenesis. *Avian Dis.* 8: 281-347.
- Sheffield, V.C., J.S. Beck, A.E. Kwitek, D.W. Sandstrom and E.M. Stone. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 16: 325-332.
- Silver, J. and V. Keerikatte. 1989. Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol.* 63: 1924-1928.
- Smith, E.J. and D.W. Burt. 1998. Parameter of the chicken genome (*Gallus domesticus*). *Anim. Genet.* 29: 290-294.
- Smith, E.J. and L.B. Crittenden. 1986. Endogenous viral gene in slow-feathering line of White Leghorn chickens. *Avian Pathol.* 15: 359-406.
- Smith, E.J. and A.M. fadly. 1988. Influence of congenital transmission of endogenous virus-21 on the immune response to avian leucosis virus infection and incidence of tumors in chickens. *Poultry Sci.* 67: 1674-1679.

- Smith, E.J. and A.M. Fadly and L.B. Crittenden. 1990. Interactions between endogenous viral loci ev-6 and ev-21: Immune response to exogenous avian leukosis virus infection. *Poultry Sci.* 69: 1244-1250.
- Smith, E.J. and I. Levin. 1991. Application of a locus-specific DNA hybridization probe in the analysis of the slow-feathering endogenous virus complex of chickens. *Poultry Sci.* 70: 1957-1964.
- Tereba, A. and S.M. Astrin. 1982. Chromosomal location of fine defined endogenous retrovirus loci in White Leghorn chicken. *J. Virol.* 43: 737-740.
- Tereba, A., M.M. Lai and K.G. Marti. 1979. Chromosome 1 contains the endogenous RAV-0 retrovirus sequences in chicken cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6486-6490.
- Tixier-Boichard, M.H., B.F. Benkel, J.R. Chambers and J.S. Gavora. 1994. Research note: screening chickens for endogenous virus ev-21 viral element by the polymerase chain reaction. *Poultry Sci.* 73: 1612-1616.
- Weiss, R.A. 1993. *The Retroviridae*. Plenum, New York, pp 1-107.
- Varmus, H. and P. Brown. 1989. Retroviruses, pp. 53. *In Mobile DNA*. D.E. Berg and M.M. Howe, ed. American Society for Microbiology. Washington, DC.
- Zachow, K.R. and K.F. Conklin. 1992. CA₁G, CCAAT-Like protein binding sites in avian retrovirus long terminal repeat enhancers. *J. Virol.* 66: 1959-1970.
- Zavala, G. and S. Cheng. 2006. Detection and characterization of avian leukosis virus in Marek's disease vaccines. *Avian Dis.* 50: 209-215.

ภาคผนวก

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ALVE-B3ในไก่สามเหลืองกับยีนในฐานข้อมูล GenBank

```

>  ref|NW_001471729.1|Gga7_WGA155_2 Gallus gallus chromosome 7 genomic contig,
reference assembly
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=13602625

Score = 604 bits (327), Expect = 4e-171
Identities = 385/398 (96%), Gaps = 3/398 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 27      AATGGCAATTTGCAATATTTCTGGGAATGCTGAACACTTCATTCCAGGATTAGACACTGA 86
              |||
Sbjct 13059031 AATGGCAATTTGCAATATTTCTGGGAATGCTG-ACACTTCATTCCAGGATTAGACACTGA
13059089

Query 87      ACTCAAGGTTATGATTTCTCACAGTGGCAGCTGGGCTAGGTTTGGTCATTATTTTCACA 146
              |||
Sbjct 13059090 ACTCAAGGTTATGATTTCTCACAGTGGCAGCTGGGCTAGGTTTGGTCATTATTTTCACA
13059149

Query 147     AAACCTTGTCAGAATAACCCAGATTGCTGGTTGGGGGTCGTCTTAGTGGGTGGCATTTT 206
              |||
Sbjct 13059150 AAACCTTGTCAGAATAACCCAGATTGCTGGTTGGTGGTAGTCTTAGTGGGTGGCATTTT
13059209

Query 207     ACCTTCAGAAGNAtatatatatatatat--GTNTGTATAAAAAACAACATCACATCACCA 264
              |||
Sbjct 13059210 ACCTTCAGAAGTATATATATATATATATATGTATGTATAAAAAACAACATCACATCACCA
13059269

Query 265     GCTCTGTTGGATTCTAACACAGTGTGAGATATAGAGAGGTTGAGAAACCTGCCCCAGGG 324
              |||
Sbjct 13059270 GCTCTGTTGGATTCTAACACAGTGTGAGATATAGAGAGGTTGAGAAACCTGCCCAAGTA
13059329

Query 325     GGATGTTAACACGTCAAATAATGACTTTTGTTCATATTTGTGGGGTAACTACAGAAGTC 384
              |||
Sbjct 13059330 GGATGTTAACACGTCAAATAATGACTTTTGTTCATATTTGTAGGGTAACTACAGAAGTC
13059389

Query 385     TGGACTTCCTTAAAAACAAATTGTAATCTGTAGTCTGT 422
              |||
Sbjct 13059390 TGGACTTCCTTAAAAGCAAATTGTAATCTGTAGTTTGT 13059427

```

หมายเหตุ Query คือยีนที่ได้จากการทดลอง

Sbjct คือยีนจากในฐานข้อมูล GenBank

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ALVE-B3 ในไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้ากับยีนในฐานข้อมูล GenBank

```

>  ref|NW_001471729.1|Gga7_WGA155_2 Gallus gallus chromosome 7 genomic contig,
reference assembly
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=13602625

Score = 623 bits (337), Expect = 9e-177
Identities = 389/397 (97%), Gaps = 3/397 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 23          CTGTAGTTTTCC-ACAAATATGCAACAAAAGTCGTTATTTGACGTGTTAACATCCTACTT 81
                |||          || |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059384    CTGTAGTTACCCTACAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTT
13059325

Query 82          GGGCAGGTTTCTCAACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTG 141
                |||          |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059324    GGGCAGGTTTCTCAACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTG
13059265

Query 142         ATGTGATGTTGTTTTTATACATAC--atatatatatatataCTTCTGAAGGTAAAT 199
                |||          |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059264    ATGTGATGTTGTTTTTATACATACATATATATATATATACTTCTGAAGGTAAAT
13059205

Query 200         GCCACCCACTAAGACTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAAGGTTTGTGA 259
                |||          |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059204    GCCACCCACTAAGACTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAAGGTTTGTGA
13059145

Query 260         AAATAATGACCAAACCTAGCCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGT 319
                |||          |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059144    AAATAATGACCAAACCTAGCCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGT
13059085

Query 320         GTCTAATCCTGGAATGAAGTGTGAGCATTTCCAGAAATATTGCAAATTGCCATTACCAA 379
                |||          |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059084    GTCTAATCCTGGAATGAAGTGTGAGCATTTCCAGAAATATTGCAAATTGCCATTACCAA
13059025

Query 380         GTAAATCTCTCAAACAATCTTTGTCTATGTGGGAAT 416
                |||          |||          |||          |||          |||
Sbjct 13059024    GTAAATCTACTCAAACAATCTTTGTCTATGTGGGAAT 13058988

```

หมายเหตุ Query คือยีนที่ได้จากการทดลอง

Sbjct คือยีนจากในฐานข้อมูล GenBank

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ALVE-B3 ในไก่พื้นเมืองกับยีนในฐานข้อมูล GenBank

```

>  ref|NW_001471729.1|Gga7_WGA155_2 Gallus gallus chromosome 7 genomic contig,
reference assembly
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=13602625

Score = 632 bits (342), Expect = 2e-179
Identities = 382/385 (99%), Gaps = 0/385 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 34          CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGGCAGGTTTCTCA 93
                  |||
Sbjct 13059370   CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGGCAGGTTTCTCA
13059311

Query 94          ACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGATGTGATGTTGTTT 153
                  |||
Sbjct 13059310   ACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGATGTGATGTTGTTT
13059251

Query 154         TTTATACATACACatatatatatatatataCTTCTGAAGGTAAAATGCCACCCACTAAGA 213
                  |||
Sbjct 13059250   TTTATACATACATATATATATATATATACTTCTGAAGGTAAAATGCCACCCACTAAGA
13059191

Query 214         CTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATCTTGACAAGGTTTGTGAAAATAATGACCAAAA 273
                  |||
Sbjct 13059190   CTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATCTTGACAAGGTTTGTGAAAATAATGACCAAAA
13059131

Query 274         CCTAGCCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAA 333
                  |||
Sbjct 13059130   CCTAGCCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAA
13059071

Query 334         TGAAGTGTGAGCATTCCAGAAATATTGCAAATGCCATTACCAAAGTAAATCTACTCAA 393
                  |||
Sbjct 13059070   TGAAGTGTGAGCATTCCAGAAATATTGCAAATGCCATTACCAAAGTAAATCTACTCAA
13059011

Query 394         ACAATCTTTGTTTTTGTGGGAATTC 418
                  |||
Sbjct 13059010   ACAATCTTTGTCTATGTGGGAATTC 13058986

```

หมายเหตุ Query คือยีนที่ได้จากการทดลอง

Sbjct คือยีนจากในฐานข้อมูล GenBank

การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ALVE-B3 ในไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ากับยีนในฐานข้อมูล GenBank

```

>  ref|NW_001471729.1|Gga7_WGA155_2 Gallus gallus chromosome 7 genomic contig,
reference assembly
(based on Gallus_gallus-2.1)
Length=13602625

Score = 627 bits (339), Expect = 7e-178
Identities = 382/386 (98%), Gaps = 2/386 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 34          CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGGCAGGTTTCTCA 93
                |||
Sbjct 13059370    CAAATATGCAACAAAAGTCATTATTTGACGTGTTAACATCCTACTTGGGCAGGTTTCTCA
13059311

Query 94          ACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGATGTGATGTTGTTT 153
                |||
Sbjct 13059310    ACCTCTCTATATCTCAGCACTGTGTTAGAATCCAACAGAGCTGGTGATGTGATGTTGTTT
13059251

Query 154         TTTATACATAC--atatatatatatataCTTCTGAAGGTAAAATGCCACCCACTAAGA 211
                |||
Sbjct 13059250    TTTATACATACATATATATATATATATACTTCTGAAGGTAAAATGCCACCCACTAAGA
13059191

Query 212         CTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAAGGTTTTGTGAAAATAATGACCAAA 271
                |||
Sbjct 13059190    CTACCACCAACCAGCAATCTGGGTTATTCTTGACAAGGTTTTGTGAAAATAATGACCAAA
13059131

Query 272         CCTAGCCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAA 331
                |||
Sbjct 13059130    CCTAGCCCAGCTGCCACTGTGAGGAAATCATAACCTTGAGTTCAGTGTCTAATCCTGGAA
13059071

Query 332         TGAAGTGTGAGCATTCCAGAAATATTGCAAATTGCCATTACCAAAGTAAATCTCCTCAA 391
                |||
Sbjct 13059070    TGAAGTGTGAGCATTCCAGAAATATTGCAAATTGCCATTACCAAAGTAAATCTCCTCAA
13059011

Query 392         ACAATCTTTGTCTTTGTGGGAATCA 417
                |||
Sbjct 13059010    ACAATCTTTGTCTATGTGGGAATCA 13058985

```

หมายเหตุ Query คือยีนที่ได้จากการทดลอง

Sbjct คือยีนจากในฐานข้อมูล GenBank

การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก Sambrook และคณะ, 1989) ตามขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือดที่แช่แข็งมาละลายโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดตัวอย่างเลือด 20-30 μ l ใส่หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml ผสมกับ lysis buffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) เขย่าให้เข้ากันแล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม proteinase-K (10mg/ml) 25 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน

2. นำส่วนผสมเข้าตู้บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

3. จากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) ผสมให้เข้ากันดี เขย่าเบาๆ นำไปให้แยกชั้นโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

4. ดูดส่วนใสใส่หลอด Eppendorf อันใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) เพื่อให้สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

5. ดูดส่วนน้ำใสใส่หลอด Eppendorf อันใหม่ เติม alcohol 95% ที่แช่เย็นจัดพร้อมกับกลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอมีการเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม

6. ดูด alcohol 95% ออกจากหลอด Eppendorf จากนั้นเติม alcohol 70% เพื่อล้างดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

7. ดูด alcohol 70% ออกจาก Eppendorf แล้วผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) 50 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ โดยนำไปเข้าตู้ incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมดใน TE buffer จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

อะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel Electrophoresis)

สารละลาย

1. 10X TBE buffer (1,000 ml)

| | |
|------------------|-------|
| Tris-base | 108 g |
| Boric acid | 55 g |
| 0.5 MEDTA (pH 8) | 40 g |

เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

2. เอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 µg/ml

| | |
|-------------------|--------|
| เอธิเดียมโบรไมด์ | 250 µg |
| dH ₂ O | 500 ml |

เก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. ประกอบถาดหล่อเจลเข้ากับซี่หวี (comb) เพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่อง (wells) ซึ่งใช้สำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ

2. ชั่ง agarose 2.0 g ใส่ลงในขวดชมพู แล้วเติม 1X TBE buffer ปริมาตร 100 ml จะได้ agarose ความเข้มข้น 2.0%

3. ละลาย agarose โดยนำเข้า microwave นานประมาณ 2 นาที เมื่อเดือดให้นำออกมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้า microwave อีกครั้ง จนกระทั่ง agarose ละลายจนเป็นสารละลายใส

4. ปล่อยให้สารละลายเจลที่แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น นำไปเทลงบนถาดหล่อเจลโดยระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวและเย็น

5. ดึงซี่หวีออกจากเจล ค่อยๆ ดึงแผ่นเจลขึ้นนำไปวางใน electrophoresis chamber โดยหันด้านช่องหยอดตัวอย่างไปทางขั้วลบ

6. เติม **1X TBE buffer** ลงใน **electrophoresis chamber** จนท่วมผิวหน้าเจลขึ้นมาประมาณ **3mm**

7. ผสม **loading dye** กับตัวอย่างดีเอ็นเอบนแผ่นพาราฟิน ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นลง **3-4** ครั้ง แล้วนำไปหยอดลงในช่องหยอดตัวอย่าง

8. ปิดฝา **electrophoresis chamber** ต่อขั้วไฟฟ้า แล้วเปิดสวิตช์ปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ **100V** โดยให้กระแสไฟฟ้าไหลจากขั้วลบไปหาขั้วบวกตามความยาวของแผ่นเจล

9. สังเกตสีของ **loading dye** เมื่อสีเคลื่อนที่ไปจนถึงด้านปลายของแผ่นเจลให้หยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า

10. นำแผ่นเจลออกไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน **15** นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่านาน **15** นาที (ระวังไม่ให้เอธิเดียมโบรไมด์โดนร่างกาย)

11. นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต และถ่ายรูปแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ **Gel document Gene Genius**

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1. นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ **95%** โดยใช้กระดาษ **kinwipe** 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 10% (acrylamide: bisacrylamide = 49: 1) โดยมีส่วนผสมดังนี้

ตารางผนวกที่ 1 ส่วนผสมในการเตรียมเจล

| สารที่ใช้ | เจลเข้มข้น 10% ปริมาณที่ใช้ 70 มิลลิลิตร |
|--------------------|--|
| 40% acrylamide gel | 14 ml |
| 5x TBE | 14 ml |
| dH ₂ O | 42 ml |
| 10% APS | 700 µl |
| TEMED | 70 µl |

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

การย้อมสีดีเอ็นเอที่อยู่บน Polyacrylamide gel ด้วยวิธี Silver Staining

1. แกะแผ่นเจลออกจากกระจก แล้วแช่ใน 10% Acetic Acid เพื่อตรึงแถบดีเอ็นเอบนเจลเป็นเวลา 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 Na₂CO₃, 37% Formaldehyde และ 10 mg/ml Na₂S₂O₃·5H₂O) 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** ทิ้ง
4. ล้าง **SV Minicolumn** โดยเติม **Membrane Solution** (ที่เจือจางด้วยเอทานอล 95%) 700 μ l แล้ว **centrifuge** ที่ 14,000 rpm (16,000 x g) เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่อยู่ใน **microcentrifuge tube** ทิ้ง หลังจากนั้นล้าง **SV Minicolumn** อีกครั้งด้วย **Membrane Solution** (ที่เจือจางด้วยเอทานอล 95%) 500 μ l 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

นายนาวิ ม่วงแขก

วัน เดือน ปี ที่เกิด

วันที่ **16** มีนาคม **2526**

สถานที่เกิด

นครพนม

ประวัติการศึกษา

วท.บ (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร)

มหาวิทยาลัยศิลปากร (พ.ศ. **2548**)

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร