RESEARCH ARTICLE

# Novel Primer Sets for Sex Identification in Eld's Deer *(Cervus eldii thamin)* and Hog Deer *(Axis porcinus)* by Using Non-Invasive Samples

Manakorn Sukmak[1], Suthathip Dejchaisri[1],
Sitthawee Thongtipsiridech[2], Worawidh Wajjwalku[3]*

## Abstract

**Objective** —To develop a new set of primer for sex identification by polymerase chain reaction (PCR) technique in Eld's deer and hog deer.

**Materials and Methods** — Blood and fecal samples of Eld's deer and hog deer were used for DNA extraction and determined for nucleotide sequences of *DBY* (dead box polypeptide, Y linked) gene, Y chromosome specific gene . The specific primer for *DBY* gene was designed for PCR technique and used for the sex identification in both deer. The specific primer for MHC class II was also performed as a positive PCR control.

**Results** — The new primer set was able to apply for sex identification not only DNA extraction from blood but also from fecal samples in both Eld's deer and hog deer. Female deer showed only 302 bp, the positive PCR control, but male deer showed amplification bands of 302 bp and 220 bp, specific for DBY gene.

**Conclusion** — This is the first PCR primer set that useful for a non-invasive sexing in Eld's deer and hog deer and can be used to follow these deer reintroduced into the forest of wildlife sanctuary in Thailand.

*KKU Vet J. 2010;20(1):11-20* *http://vet.kku.ac.th/journal/*

**Keywords**: Sex identification; Eld's deer; Hog deer; PCR

[1]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140.
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand.
[2]Department of Large animal and Wildlife Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kamphaeng Saen Campus, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140.
[3]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kamphaeng Saen Campus, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140.
***Corresponding author** E-mail: fvetwww@ku.ac.th

# ไพรเมอร์ชุดใหม่สำหรับการจำแนกเพศจากมูลในละมั่ง *(Cervus elldi thamin)* และเนื้อทราย *(Axis porcinus)*

มานะกร สุขมาก[1], สุธาทิพย์ เดชชัยศรี[1],
สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช[2], วรวิทย์ วัชชวัลคุ[3]*

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อพัฒนาชุดของไพรเมอร์ชุดใหม่สำหรับการจำแนกเพศโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) ในละมั่งและเนื้อทราย

**วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ** นำตัวอย่างเลือดและมูลของละมั่งและเนื้อทรายมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DBY* ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมวาย และออกแบบไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะต่อยีน DBY สำหรับใช้ในการจำแนกเพศละมั่งและเนื้อทรายด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ MHC class II เป็นตัวควบคุมความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา PCR

**ผลการศึกษา** ไพรเมอร์ชุดใหม่นี้สามารถใช้จำแนกเพศละมั่งและเนื้อทรายได้ทั้งในตัวอย่างเลือดและมูล โดยในละมั่งและเนื้อทรายเพศเมียปรากฏเพียงแถบผลผลิต PCR ขนาด 302 คู่เบส เป็นการควบคุมความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา PCR ในละมั่งและเนื้อทรายเพศผู้ปรากฏแถบผลผลิต PCR ขนาด 302 คู่เบส และ 220 คู่เบสซึ่งจำเพาะต่อยีน *DBY*

**ข้อสรุป** ไพรเมอร์ชุดนี้เป็นไพรเมอร์ชุดแรกที่ได้รับการพัฒนา และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกเพศจากตัวอย่างที่ไม่รบกวนตัวสัตว์ (non-invasive sample) ในละมั่งและเนื้อทราย ซึ่งจะนำไปใช้ในการติดตามการฟื้นฟูละมั่งและเนื้อทรายสู่ป่าในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในประเทศไทย

*วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(1):11-20* *http://vet.kku.ac.th/journal/*

**คำสำคัญ :** การจำแนกเพศ ละมั่ง เนื้อทราย ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษา
[2]ภาควิชาเวชศาสตร์คลีนิคสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[3]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: fvetwww@ku.ac.th

## บทนำ

ในการอนุรักษ์สัตว์ป่านั้นอัตราส่วนทางเพศถือเป็นกุญแจสำคัญในการดำรงอยู่และการวิวัฒนาการของประชากรสัตว์ป่า โดยแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของการผสมพันธุ์ ความสามารถในการผสมพันธุ์ การขยายจำนวนของประชากร ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นประโยชน์สำหรับการจัดการประชากรสัตว์ป่าต่อไปในอนาคต ดังนั้นการจำแนกเพศประชากรสัตว์ป่าโดยหลีกเลี่ยงการรบกวนสัตว์จึงมีการพัฒนาวิธีใหม่ๆเรื่อยมา วิธีหนึ่งที่เป็นที่นิยมคือ การจำแนกเพศจากมูลโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยอาศัยชุดของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโครโมโซมวาย (Y chromosome) ซึ่งเป็นโครโมโซมที่จำเพาะต่อสัตว์เพศผู้ ยีนบนโครโมโซมเพศวายทีนิยมใช้ในการจำแนกเพศที่นิยมใช้กัน ได้แก่ ยีน SRY (sex-determination region Y) [1-4] ซึ่งยีนนี้เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาเป็นเพศผู้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายๆ ชนิดและพบได้เพียงโครโมโซมวายเท่านั้น

อีกหนึ่งวิธีหนึ่งที่นิยมเป็นการใช้ไพรเมอร์เพียงหนึ่งคู่ที่จำเพาะทั้งโครโมโซมเอ็กซ์ (X chromosome) และวาย ซึ่งจะมีตำแหน่งสมกันบนโครโมโซมทั้งสองแท่ง (X/Y homology group) แต่จะให้ขนาดของผลผลิต PCR ที่แตกต่างกัน โดยยีนที่นิยมใช้จำแนกเพศได้แก่ ยีน ZFX/ZFY (zinc-finger protein, X/Y-linked) [5,6] และยีน AMELX/Y (amelogenin, X/Y-linked) [7-9] ในสัตว์หลายๆ ชนิดพบว่าผลิตผล PCR ของยีนทั้งสองนี้มีขนาดแตกต่างกันจึงใช้ในการจำแนกเพศได้ แต่อย่างไรก็ตามสำหรับสัตว์บางชนิดความแตกต่างของผลผลิต PCR ไม่ชัดเจนซึ่งทำให้แปรผลได้ยาก

สืบเนื่องจากโครงการฟื้นฟูประชากรละมั่งและเนื้อทรายสู่ธรรมชาติ มานะกร [10] ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่ง โดยรายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน DBY (dead box polypeptide, Y-linked) ในละมั่งและเนื้อทรายไว้บางส่วน ในรายงานนี้ได้ใช้ข้อมูลดังกล่าว ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน DBY ซึ่งอยู่บนโครโมโซมวาย เพื่อใช้ในวิธี PCR เพื่อใช้ในการแยกเพศในละมั่งและเนื้อทราย และการประยุกต์ใช้แยกเพศจากตัวอย่างมูลที่เก็บจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

**ตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ**

เก็บตัวอย่างเลือดละมั่งและเนื้อทราย โดยใช้ EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด 0.2 มล. ด้วยวิธี phenol-chloroform และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8.0) จำนวน 0.1 มล.

เก็บมูลสดของละมั่งและเนื้อทรายจากกรงเลี้ยง และมูลเนื้อทรายที่ปล่อยสู่ธรรมชาติจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จังหวัดพะเยา โดยเก็บมูล 3-4 ก้อนแช่ในน้ำยาเก็บมูล (DETs Buffer; 20% DMSO, 250mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH7.5 และสารละลายอิ่มตัวของเกลือ NaCl) ปริมาตร 20 มล. [11] และสกัดดีเอ็นเอจากมูลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II

**การศึกษาลำดับเบสของ DBY ในละมั่งและเนื้อทราย**

ใช้วิธี PCR เพื่อเพิ่มจำนวนพันธุกรรมของยีน DBY กับตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากเลือดของละมั่งและเนื้อทราย โดยใช้วิธีเดียวกับรายงานของ Hellborg และ Ellegren 2003. [12] โดยไพรเมอร์ที่ใช้คือ DBY7Fw และ DBY8Re โดยอุณหภูมิสำหรับการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) ได้แสดงไว้ใน **Table 1** โดยทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือดของละมั่งและเนื้อทรายในเพศผู้และเพศเมีย แถบผลผลิต PCR ที่ได้ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin® Extract II และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงด้วยไพรเมอร์เดียวกันที่ใช้ในการทำ PCR โดยบริษัท 1st BASE Laboratories, Malaysia. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวรายงานไว้ใน Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (GU902196 และ Bankit; 1326654 อยู่ในขั้นตอนดำเนินการ)

**การจำแนกเพศละมั่งและเนื้อทรายด้วยวิธี PCR**

***การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน amelogenin***

ใช้ไพรเมอร์ (SE47 และ SE48) ที่มีรายงานการใช้จำแนกเพศในวัว [5] และกวางซิก้าได้ (Cervus Nippon) [13] ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ใน **Table 1** โดยการตรวจดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดละมั่งและเนื้อทรายที่ทราบเพศ และเปรียบเทียบผลกับการตรวจดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคเพศผู้และเพศเมีย

***การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน DBY***

ออกแบบไพรเมอร์จากการเปรียบเทียบผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในละมั่งและเนื้อทรายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของละมั่งจาก Genbank (Accession number; GU902196) และเนื้อทรายจาก Genbank (Bankit; 1326654 อยู่ในขั้นตอนดำเนินการ) ไพรเมอร์ที่เลือกใช้คือ SEX1W และ SEX2W โดยผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์นี้แสดงรายละเอียดไว้ใน **Table 1**

***การใช้ไพรเมอร์เพื่อยืนยันคุณภาพดีเอ็นเอ***

เพื่อการยืนยันคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้เหมาะกับการทำปฏิกิริยา PCR ได้เลือกใช้ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W ดังแสดงรายละเอียดไว้ใน **Table 1** ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เหมาะกับการตรวจ PCR กับสัตว์ได้หลายชนิด [14]

ประเมินผลการทำปฏิกิริยา PCR โดยแยกไพรเมอร์แต่ละชนิดทำแยกกันในแต่ละหลอด (singleplex PCR) เปรียบเทียบผล PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดใส่ในหลอดเดียวกัน (multiplex PCR) หลังจากนั้นนำ ดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนมาทดสอบโดยการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis ใน Agarose gel เข้มข้น 1.5% และย้อมสีด้วย ethidium bromide เพื่อประเมินขนาดของแถบดีเอ็นเอ

**Table 1.** PCR Primer Sequences, Annealing Temperature and Estimated Size (bp) for Sex Identification

| Primer name | Sequences 5'-3' | Condition (Ta) | Size (bp) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| DBY7Fw | GGTCCAGGAGA(A/G)GCTTTGAA | Annealing 54 ˚C | 480 | [8] |
| DBY8Re | CAGCACCACCATA (G/T)ACTACA | Annealing 54 ˚C | 480 | [8] |
| SE47 | CAGCCAAACCTCCCTCTGC | Annealing 58 ˚C | 220 | [5] [20] |
| SE48 | CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC | Annealing 58 ˚C | 220 | [5] [20] |
| DRA1W | CCCCCTTTCTTGTCTTTTCAGAG | Annealing 55 ˚C | 302 | [17] |
| DRA2W | CAATTCCCAAGTCTAGGAGGACTG | Annealing 55 ˚C | 302 | [17] |
| SEX1W | CTCTCCTTGGTTTTAGCCCCA | Annealing 55 ˚C | 181 | This study |
| SEX2W | ACACTACACAAGGACGAACTC | Annealing 55 ˚C | 181 | This study |

For total volume 50 µl, reaction contained 5 µl DNA template (~100 ng), 25 µl of 2x QIAGEN® Multiplex PCR master mix, 2.5 µl 20 mM for each primers, 5 µl of 5x Q-solution (QIAGEN® Multiplex PCR) and RNase-free water up to 50 µl. The condition composed of initial activation step at 95˚C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturing at 95 ˚C for 30 sec, annealing step at 54-58˚C (depended on primers) 90 sec, extension step at 72˚C 30 sec and final extension step at 72˚C 5 min. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

## ผลการศึกษา

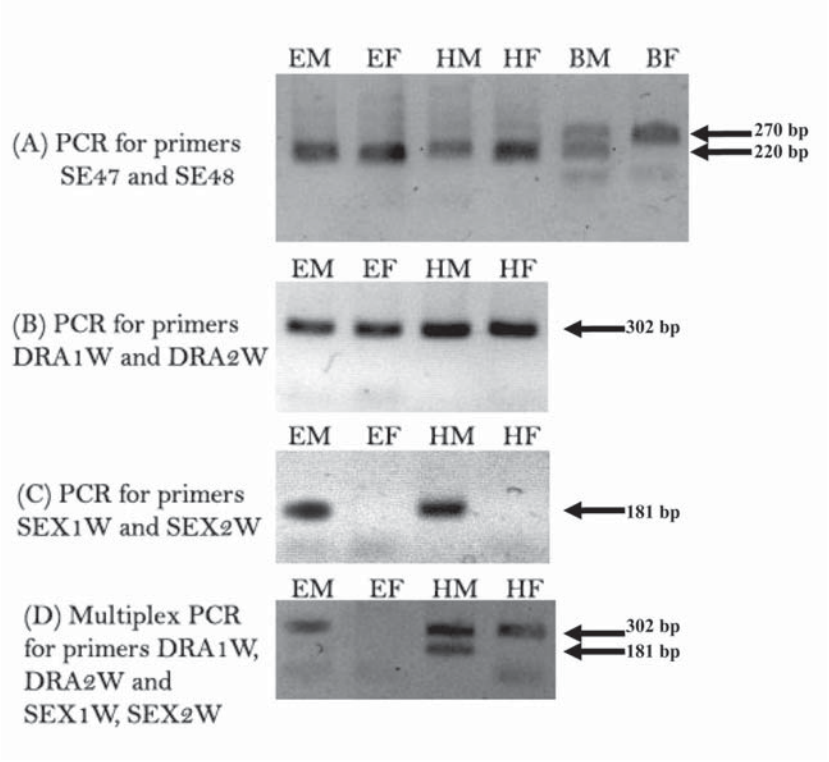
สำหรับไพรเมอร์ DBY7Fw และ DBY8Re ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 508 คู่เบส ทั้งในละมั่งและเนื้อทราย โดยให้ผลบวกกับตัวอย่างละมั่งและเนื้อทรายเพศผู้ และให้ผลลบกับตัวอย่างเพศเมีย และจากการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน DBY ระหว่างละมั่งชนิดย่อยพม่าและเนื้อทรายได้แสดงตำแหน่งที่เหมือนและแตกต่างกัน รวมถึงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ไว้ใน **Figure 1** เป็นบางส่วน

การใช้ไพรเมอร์ SE47 และ SE48 สามารถใช้แยกเพศในโคได้ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 270 คู่เบส และ 220 คู่เบสในตัวอย่างวัวเพศผู้ และปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 220 คู่เบสในตัวอย่างวัวเพศเมีย แต่ในกรณีดีเอ็นเอของละมั่งและเนื้อทรายไม่สามารถใช้ไพรเมอร์คู่นี้แยกเพศได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมียโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 220 คู่เบส ดังแสดงไว้ใน **Figure 2**

**Figure 1.** The Locations of Primers SEX1W and SEX2W

This figure showed the locations of primers SEX1W and SEX2W on the alignment of DBY gene of Eld's deer (GU902196) and hog deer (Bankit; 1326654 on operation).

**Figure 2.** Sex Identification from Blood Samples in Eld's Deer and Hog Deer

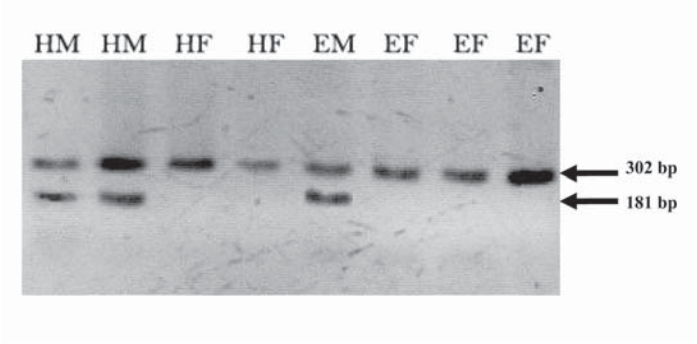



(A) = PCR product for primers SE47 and SE48. (B) = PCR product for primers DRA1W and DRA2W. (C) = PCR product for primers SEX1W and SEX2W. (D) = Multiplex PCR for primers DRA1W, DRA2W and SEX1W, SEX2W. Abbreviations: EM, male Eld's deer; EF, female Eld's deer; HM, male Hog deer; HF, female Hog deer; BM, male cattle; BF, female cattle.

ไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบยีน DBY ของละมั่งและเนื้อทราย สามารถใช้ในการตรวจสอบแยกเพศผู้และเพศเมียจากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด โดยพบผลผลิต PCR ที่ขนาด 181 คู่เบสในเพศผู้และไม่ปรากฏผลผลิต PCR ในเพศเมีย สำหรับการยืนยันคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ สามารถใช้ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W และปรากฏแถบผลผลิต PCR ขนาด 302 คู่เบส ในทุกตัวอย่างเลือดที่ทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีที่นำไพรเมอร์ทั้งสองชุดใส่ในการทดสอบ PCR หลอดเดียวกันสามารถใช้ทดสอบได้ในเนื้อทรายเท่านั้น ดังแสดงไว้ใน **Figure 2**

การตรวจแยกเพศในละมั่งและเนื้อทรายจากตัวอย่างมูลนั้นจะเป็นวิธีการที่ไม่รบกวนสัตว์ป่า จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถใช้ตรวจสอบแยกเพศได้ทั้งในละมั่งและเนื้อทรายให้ผลดีเช่นเดียวกับกรณีการตรวจแยกเพศจากตัวอย่างเลือด ดังแสดงไว้ใน **Figure 3** และจากการจำแนกเพศมูลละมั่งที่ทราบเพศ 6 ตัวอย่างและเนื้อทรายที่ทราบเพศ 6 ตัวอย่างได้ทั้งหมดคิดเป็นอัตราสำเร็จ 100%

**Figure 3.** Singleplex PCR Amplification Using Primers DRA1W, DRA2W and SEX1W, SEX2W from Fecal Samples




Singleplex PCR amplification using primers DRA1W, DRA2W and SEX1W, SEX2W from fecal samples were loaded in the same lane. Abbreviations: EM, male Eld's deer; EF, female Eld's deer; HM, male hog deer; HF, female hog deer.

การทดสอบกับตัวอย่างมูลเนื้อทรายที่ไม่ทราบเพศจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าจำนวน48ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกต่อไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W จำนวน 41 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราสำเร็จ 85% และใน 41 ตัวอย่างนี้ปรากฏผลบวกต่อไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W เป็นจำนวน 27 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแปรผลได้ว่าจากตัวอย่าง 41 ตัวอย่างนี้เป็นเนื้อทรายเพศผู้ 27 ตัวอย่างและเป็นเพศเมีย 14 ตัวอย่าง จากผลบวกที่ปรากฏต่อไพรเมอร์ DRA1W, DRA2W และ SEX1W,SEX2W มี 3 ตัวอย่างที่ปรากฏแถบผลผลิต PCR ที่มีความเข้มน้อย แต่สำหรับการนำไพรเมอร์ทั้งสองชุดมาทำ PCR พร้อมกัน (multiplex PCR) พบว่าไม่สามารถใช้ในการแยกเพศได้ (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

## วิจารณ์

แม้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน amelogenin จะสามารถจำแนกเพศในวัว [7] แกะ [9] กวาง [8,13] สัตว์เคี้ยวเอื้อง [15] และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทางทะเล [16] ได้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวเกิดในส่วน intron ของยีน amelogenin จากโครโมโซมทั้งสองแท่ง แต่จากการศึกษานี้พบว่าไม่สามารถใช้จำแนกเพศในละมั่งและเนื้อทรายได้ แสดงให้เห็นว่า intron ของยีนนี้มีขนาดที่ไม่แตกต่างกันในละมั่งและเนื้อทราย แม้แต่ในคนเองมีความแตกต่างของผลิตผล PCR ของยีนนี้เพียง 6 คู่เบส สำหรับการแยกเพศจึงต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ยุ่งยาก นอกจากนี้ปัจจุบันมีรายงานพบว่ามีการสูญหาย (deletion) ของยีน AMELY ในคนบางกลุ่มประชากร ทำให้เกิดการผิดพลาดในการตรวจยืนยันเพศในคน และเป็นปัญหาในการนำมาใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ [17] อย่างไรก็ตามในสัตว์ยังไม่มีรายงานการสูญหายของยีน AMELY ดังกล่าว

ไพรเมอร์ชุดนี้สามารถใช้ในการจำแนกเพศจากมูลละมั่งและเนื้อทรายได้ โดยทำการประเมินคุณภาพดีเอ็นเอหรือความสำเร็จของปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W ก่อน แล้วจึงจำแนกเพศด้วยไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W แต่เห็นได้ว่ามี 3 ตัวอย่างที่ความเข้มของแถบผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ SEX1W และ SEX2W มีลักษณะจาง ซึ่งจะสัมพันธ์กับความเข้มของแถบผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W ซึ่งจะมีลักษณะที่จางเช่นกัน

การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนบนโครโมโซมวาย เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพดีเอ็นเอได้ ดังนั้นการจำแนกเพศจากตัวอย่างมูลซึ่งมีคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างอาจจะมีปริมาณและคุณภาพที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ไพรเมอร์อีกชุดหนึ่งที่ไม่จำเพาะต่อโครโมโซมวายเพื่อเป็นตัวรับรองคุณภาพดีเอ็นเอและความสำเร็จในการทำ PCR [18] ซึ่งการใช้ไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W เพื่อประเมินคุณภาพดีเอ็นเอจะเป็นประโยชน์สำหรับการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมูล เพื่อจะนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเกี่ยวกับ microsatellite DNA ผลผลิต PCR ของไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W มีขนาด 302 คู่เบส ซึ่งใหญ่กว่าผลผลิต PCR จาก microsatellite ซึ่งมีขนาดน้อยกว่า 250 คู่เบส เนื่องจากในกรณี DNA มีคุณภาพต่ำหรือมีปริมาณน้อยจะทำให้เกิดปัญหา allelic drop-out ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาด [19] ดังนั้นสำหรับตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อไพรเมอร์ DRA1W และ DRA2W จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษา microsatellite DNA

แม้ว่าการทำ PCR โดยใช้ชุดของไพรเมอร์สองชุดร่วมกัน (multiplex PCR) จะช่วยประหยัดเวลาและสารเคมีในการใช้งาน แต่มีความยุ่งยากในการพัฒนาวิธีดังกล่าว การนำไปใช้ หรือไม่สามารถใช้งานได้ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบนั้นมีปริมาณหรือคุณภาพต่ำ ดังนั้นการทำ PCR โดยแยกชุดของไพรเมอร์ (singleplex PCR) จึงมีความง่ายและเหมาะสม [20] อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมกับตัวอย่างมูลที่ทราบเพศเพื่อหาอัตราความแม่นยำต่อการนำไปใช้ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสำรวจสัดส่วนทางเพศต่อไปในอนาคต

จากการฟื้นฟูประชากรละมั่งและเนื้อทรายกลับสู่ธรรมชาติในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ ไพรเมอร์ที่ได้จากการศึกษานี้จะนำ

ไปใช้ในการหาข้อมูลสัดส่วนทางเพศของประชากรละมั่งและเนื้อทราย เพื่อติดตามรูปแบบการผสมพันธุ์ตลอดจนการขยายจำนวนของประชากรในอนาคตได้

ในการสกัดดีเอ็นเอจากมูลนั้นสิ่งสำคัญสิ่งหนึ่ง คือตัวอย่างมูลที่เก็บมานั้น ควรจะต้องเป็นตัวอย่างมูลที่สด และจำนวนมูลที่เก็บใส่หลอดเก็บตัวอย่างนั้นควรเก็บมาในสัดส่วนที่พอเหมาะ ไม่ควรเก็บมามากเกินไปเนื่องจากอาจมีสารบางอย่างปนมากับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมูลและอาจไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR และทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อน รวมถึงควรระมัดระวังในการเก็บตัวอย่างไม่ให้มีการปลอมปนดีเอ็นเอจากมนุษย์ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปฏิบัติงาน และ ขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเพื่อการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณนางสาวน้องนิด เก้าลิ้มที่ให้ความช่วยเหลือในการสกัดดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

## เอกสารอ้างอิง

1. Drobnic K, A new primer set in a SRY gene for sex identification. *International Congress Series Elsevier.* 2006;1288:268-270.
2. Emiko F, Masaaki K, Midori Y. Determination of nucleotide sequence of *SRY* gene in sika deer *(Cervus nippon). Anim Sci J.* 2006;77(2):250-252.
3. Dallas JF, David NC, Freda M, Klaus-Peter K, Hans K, Stuart BP, Phillip JB. Sex identification of Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraint. *Conserv Genet.* 2000; 1(2):181-183.
4. Matsubara K, Ishibashi Y, Ohdachi S, Matsuda Y. A new primer set for sex identification in the genus Sorex (Soricidae, Insectivora). *Mol Ecol Notes.* 2001;1(2):241-242.
5. Morin PA, Aviva N, Nadia TRC, Kelly MR and Sarah LM. Interfamilail characterization of region of the ZFX and ZFY facilitates sex determination in cetaceans and other mammals. *Mol Ecol.* 2005;14(10):3275-3286.
6. Poloumienko A. Cloning and comparative analysis of the bovine, porcine and equine sex chromosome genes *ZFX* and *ZFY. NRC Genome.* 2004;47(1):74-83.
7. Ennis S, Galagher TF. A PCR-based sex determination assay in cattle based on bovine amelogenin locus. *Anim Genet.* 1994;25(6):425-427.

8. Gurgul A, Anna R, Ewa S. Characteristics of X- and Y-chromosome specific regions of amelogenin gene and a PCR-based method for sex identification in red deer *(Cervus elaphus). Mol Biol Rep.* 2009;doi:10.1007/s11033-009-9852-4.
9. Pfeiffer I. and Brenig B. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep *(Ovis aries)* and European red deer *(Cervus elaphus). BMC Genet.* 2005;6(16):1-4.
10. มานะกร สุขมาก. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนโครโมโซมวายในละมั่ง. *วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2010.
11. Frantzen MAJ, Silk JB, Ferguson JWH, Wayne RK, Kohn MH. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol Ecol.* 1998;7(10):1423-1428.
12. Hellborg L, Ellegren H, Y chromosome conserved anchored tagged sequences (YCATS) for the analysis of male-specific DNA. *Mol Ecol.* 2003;12(1):283-291.
13. Yamauchi K, Hamasaki S, Miyasaki K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Sex determining based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in Sika deer *(Cervus Nippon). J Vet Med Sci.* 2000;62(6):669-671.
14. Sena L, Schneider MPC, Brenig B, Honerycutt RL, Womack L, Skow LC. Polymorphisms in MHC-DRA and -DRB alleles of water buffalo *(Bubalus bubalis)* reveal different features from cattle DR alleles. *Anim Genet.* 2003;34(1):1-10.
15. Pajares G, Isabel A, Ivan F, Lucia P, Felix G and Luis JR. A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin genes AMELX and AMELY (short communication). *Arch Tierz Dummerstorf.* 2007;50(5):442-446.
16. Mace M, Brigitte CR. A highly polymorphic insertion in the Y-chromosome amelogenin gene can be used for evolutionary biology, population genetics and sexing in *Cetacea* and *Artiodactyla*. *BMC Genet.* 2008;9:64.doi:10.1186/1471-2156-9-64.
17. Kumagai R, Sasaki Y, Tokuta T, Biwasaka H, Aoki Y. DNA analysis of family members with deletion in Yp11.2 region containing amelogenin locus. *Leg Med.* 2008;10(1):39-42.
18. Robertson BC, Gemmell NJ. PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology?. *Conserv Genet.* 2006;7(2):267-271.
19. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced of STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2003;48(5):1054-1064.
20. Taberlet P, Waits LP, Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol Evol.* 1999;14(8):323-327.