

การพัฒนาเทคนิค High resolution melting real-time PCR เพื่อตรวจหารูปแบบยีน *24BP-PRL* ในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำ

The developing of high resolution melting real-time PCR technique for detection of *24BP-PRL* in Pradu Hang Dam

เกศรา อำพากรณ์¹, มนต์ชัย ดวงจินดา^{1,2*} และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ^{1,2}

Kessara Ampaporn¹, Monchai Duangjinda^{1,2*} and Thevin vongpralab^{1,2}

บทคัดย่อ: การศึกษาค้นคว้าเพื่อตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์, ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ และเปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบยีน *24BP-PRL* จากน้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำจำนวน 25 ตัว ด้วยเทคนิค Allele Specific-Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) และ High resolution melting real-time PCR (real-time PCR-HRM) ผลการศึกษาพบว่า เทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM สามารถตรวจพบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* ได้ 3 รูปแบบ ได้แก่จีโนไทป์ DD, ID และ II ซึ่งมีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.80, 0.08 และ 0.12 ตามลำดับ ความถี่อัลลีล D (0.84) มีค่าสูงกว่าอัลลีล I (0.16) เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนทั้งราคาและเวลา พบว่า เทคนิค real-time PCR-HRM มีราคาถูกกว่าเทคนิค AS-PCR (90 กับ 150 บาท/ตัวอย่าง) และใช้เวลาน้อยกว่า (3.5 กับ 4.5 ชั่วโมง/ตัวอย่าง) ดังนั้น เทคนิค real-time PCR-HRM จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมต่อการจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* ด้วยดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อในไก่ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ราคาถูก ใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค AS-PCR อีกทั้งยังลดการเกิดของเสียจากห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ: เทคนิค High resolution melting real-time PCR, ยีน *24BP-PRL*, น้ำเชื้อไก่

ABSTRACT: This study was to investigated of genotype pattern, allele and genotype frequencies, and comparison the cost of *24BP-PRL* gene in Pradu Hang Dam. The Allele Specific-Polymerase Chain Reaction (AS-PCR) and High resolution melting real-time PCR(real-time PCR-HRM) techniques were used to investigated, a total of 25 chicken semens were collected and analyzed. The results showed that, the AS-PCR and real-time PCR-HRM can detected the genotype of *24BP-PRL* gene in Pradu Hang Dam with 3 genotype: DD (0.80), ID (0.08) and II (0.12), the D allele (0.84) had allele frequency higher than I allele (0.16). For the comparison of cost included in the price per sample and time, the real-time PCR-HRM showed that the lower of price (90 vs 150 bath/sample) and time (3.5 vs 4.5 hours) than AS-PCR. Therefore, the real-time PCR-HRM technique was suitable technique to the application for investigate the genotype pattern of *24BP-PRL* gene using chicken semen. Because its high performance, cheap, less time than AS-PCR, and real-time PCR-HRM can reduced the laboratory waste.

Keywords: high resolution melting real-time PCR, *24BP-PRL* gene, chicken semen

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

Research and Development Network Center for Animal Breeding (Native Chicken) Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: monchai@kku.ac.th

บทนำ

ลักษณะการให้ผลผลิตในไก่ถูกควบคุมด้วยยีน *24BP-PRL* ยีนนี้มีผลยับยั้งการทำงานของยีน โพรแลคติน (Prolactin, *PRL*) โดยปกติไก่พื้นเมืองจะแสดงพฤติกรรมพักไข่ยาวนาน ซึ่งเป็นผลมาจากอิทธิพลของฮอร์โมนโพรแลคติน จึงทำให้ผลผลิตไข่น้อย การเพิ่มเข้ามาของเบสจำนวน 24 bp (24 bp insertion) ของยีน *24BP-PRL* สามารถยับยั้งการทำงานของยีน โพรแลคติน เพื่อไก่สามารถให้ผลผลิตไข่เพิ่มขึ้นได้ (Jaroensin et al., 2012) การตรวจสอบยีน *24BP-PRL* โดยทั่วไปใช้เทคนิค Allele specific PCR (AS-PCR) ซึ่งภายหลังจากทำการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย thermal machine แล้ว สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* ได้เลย โดยไม่ต้องทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังใช้เวลานานและราคาสูง เนื่องจากต้องตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วย gel electrophoresis และย้อมสีด้วย gel star หรือ ethidium bromide ซึ่งทำให้ราคาตรวจวิเคราะห์สูงและอาจก่อให้เกิดอันตรายจากการสะสมสารเคมีในร่างกายได้ อีกทั้งการเกิดของเสียจากห้องปฏิบัติการ เช่น เจลที่ใช้แล้ว สารเคมีที่ใช้ย้อมเจล เป็นต้น

เทคนิค High resolution melting real-time PCR (real-time PCR-HRM) เป็นเทคโนโลยีสำหรับการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่เกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา โดยการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 95 องศาเซลเซียส และวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละชนิดจะมี melting temperature เฉพาะตัว และจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง ซึ่งโดยทั่วไปจะสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส ในขณะที่ non-specific product จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า (อินทชัย, 2549) ดังนั้น melting curve analysis จึงสามารถใช้เพื่อยืนยันดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการได้ โดยไม่ต้องใช้วิธี gel electrophoresis จึงลดต้นทุนในการวิเคราะห์และลดปัญหาด้านสุขภาพและของเสียจากห้องปฏิบัติการได้

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษารูปแบบยีน *24BP-PRL* จากน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำด้วยเทคนิค real-time PCR-HRM มีเพียงการศึกษาการใช้น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำเพื่อ

ตรวจสอบรูปแบบยีน *24BP-PRL* ด้วยเทคนิค AS-PCR ของผู้วิจัยที่ได้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ซึ่งอยู่ระหว่างตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่งานวิจัย เพื่อเป็นการศึกษาให้ต่อเนื่องจึงนำมาซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค real-time PCR-HRM ในการจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* จากน้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำ เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาพันธุกรรมของลักษณะการให้ผลผลิตไข่นอกสายพ่อพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีด้านอนุพันธุศาสตร์ที่ทันสมัย

วิธีการศึกษา

สัตว์ที่ใช้ศึกษา

ใช้น้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ จำนวน 25 ตัว โดยเป็นไก่พ่อพันธุ์ที่ติดเก็บน้ำเชื้อและผสมเทียมในฟาร์ม จากศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง)

การสกัดและตรวจคุณภาพดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้ นำน้ำเชื้อไก่ 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 0.9% NaCl ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารละลายเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเทส่วนใสทิ้ง เติม 5M Guanidine HCl ปริมาตร 625 ไมโครลิตร, 20% SDS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร, 7.5M Na-acetate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 1% proteinase K ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมให้สารเข้ากันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม absolute isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาจะปรากฏเห็นตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอซ้ำ 2 รอบ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop 2000,

Wilmington, Delaware USA)

การตรวจสอบยีน 24BP-PRL ด้วยเทคนิค AS-PCR

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำไปเพิ่มชิ้นส่วนยีนโดยใช้เทคนิค AS-PCR ในแต่ละรอบปฏิกิริยา ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้น 50 ng/μl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, MgCl₂ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร, dNTPs (1.0 mM/each) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR-buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Primer F (5' TTTAATATTGGTGGG TGAAGAGACA 3') และ Primer R (5' ATGCCACTGATCCTC-GAAACTC 3') อย่างละปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5 U/μl Taq DNA Polymerase (Thermo scientific) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย sterile water ให้มีปริมาตรสุทธิรวม 10 ไมโครลิตร โดยมีการวนการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (Biometra, English Inc.) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจสอบชิ้นส่วนยีนด้วย 3% agarose gel ขนาดของ PCR products ของยีน 24BP-PRL มีขนาด 130 และ 154 bp (Cui et al, 2006) การศึกษาในครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างเลือดที่มีรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ จีโนไทป์ II, ID และ DD เป็นตัวเปรียบเทียบ (positive control)

การตรวจสอบยีน 24BP-PRL ด้วยเทคนิค real-time PCR-HRM

ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน 24BP-PRL ด้วยเทคนิค real-time PCR-HRM โดยเครื่อง Bio-Rad CFX96™ โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากไก่ชุดเดิมที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค AS-PCR ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ SsoFast™ Evagreen® ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร (dNTPs, Sso7d fusion polymerase, MgCl₂, Evagreen® dye, และ Stabilizer) วิเคราะห์

melting curve ด้วย CFX 2-step AmpEvagreen® โดยวนรอบการทำปฏิกิริยาดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที ปริมาณการเกิดดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกอ่านในทุกๆ รอบของปฏิกิริยา ค่า fluorescence จะสร้างเป็นกราฟด้วยการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 0.2 องศาเซลเซียส จาก 65 ถึง 95 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงของ Evagreen® ซึ่งเป็น fluorescence ในแต่ละรอบจะแสดงผลในช่อง SYRB Green ด้วย Bio-Rad CFX Manager™ 3.0 software (Klomtong et al., 2015) ดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันจะเกิดกราฟ (melting peak) ที่แตกต่างกัน จึงสามารถนำ melting peak ไปใช้จำแนกจีโนไทป์ต่างๆ ได้

การวิเคราะห์ข้อมูล

รูปแบบจีโนไทป์ของยีน 24BP-PRL

จำแนกรูปแบบจีโนไทป์ของยีน 24BP-PRL จากขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยเทคนิค AS-PCR และจำแนกจาก melting curve ของเทคนิค real-time PCR-HRM

ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์

วิเคราะห์ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของยีน 24BP-PRL ของไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำที่ศึกษาด้วยเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM ตามวิธีของ Falconer and Mackey (1996)

ต้นทุน (cost)

วิเคราะห์ต้นทุนต่อตัวอย่าง โดยบันทึกเวลาที่ใช้วิเคราะห์และค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นทั้งหมดในการตรวจสอบยีน 24BP-PRL ด้วยเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนการตรวจสอบรูปแบบยีน ซึ่งพิจารณาจากค่าแรงงานชั่วโมงละ 40 บาท ค่าวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และค่าบริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่อง PCR และเครื่อง real-time PCR

ผลการศึกษาและวิจารณ์

รูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* ด้วยเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM

รูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการให้ผลผลิตไข่ของไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำจากเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM ให้ผลการศึกษาเหมือนกัน โดยพบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ จีโนไทป์ DD, ID และ II (Figure 1 และ Figure 2) ซึ่งอัลลีล D และ I มีขนาด 130 และ 154 bp ตามลำดับจากการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานในไก่พื้นเมืองของ Jaroensin et al. (2012) และ Kunhareang et al. (2016) พบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* จำนวน 3 รูปแบบ

สำหรับการแสดงผลของเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM จะแตกต่างกัน เนื่องจากเทคนิค AS-PCR จะเป็นการนำดีเอ็นเอมาวิ่งผ่านเจลอะกาโรสด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า และย้อมเจลด้วย gel star เพื่อให้เกิดภาพแถบ ดีเอ็นเอที่สามารถบ่งบอกขนาดของดีเอ็นเอได้ แต่สำหรับเทคนิค real-time PCR-HRM เป็นการวัดขนาดของดีเอ็นเอจากการให้อุณหภูมิสูง (high melting temperature) ซึ่งดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จะเกิด melting peak ที่แตกต่างกัน จึงได้กราฟแสดงผลที่สัมพันธ์กับขนาดของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบจาก Figure 2 แสดงให้เห็นว่าเทคนิค real-time PCR-HRM สามารถจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* ได้อย่างชัดเจน

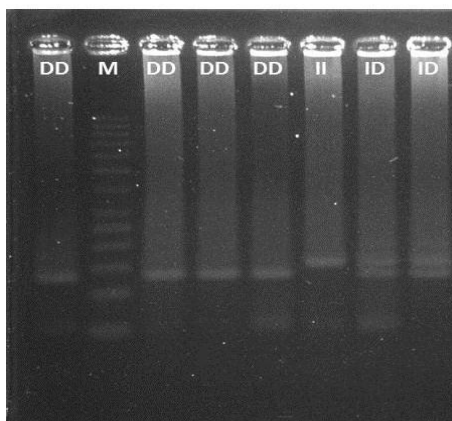


Figure 1 The genotyping of *24BP-PRL* gene of Pradu Hang Dam by AS-PCR. (M = 100 bp ladder, DD = genotype DD, ID = genotype ID and II = genotype II)

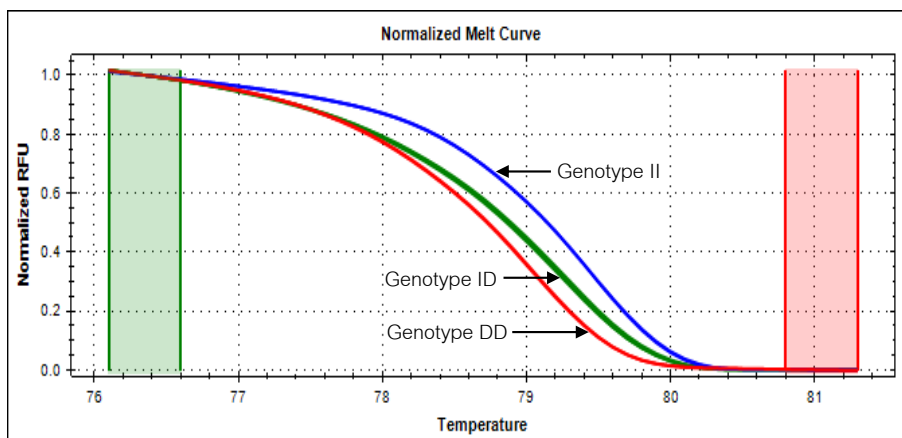


Figure 2 The genotyping of *24BP-PRL* gene of Pradu Hang Dam by real-time PCR-HRM

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบรูปแบบยีน *24BP-PRL* สามารถตรวจสอบได้จากน้ำเชื้อของไก่พ่อพันธุ์ประดู่หางดำด้วยเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ทำให้

ไก่ไม่ได้รับความเจ็บปวดจากการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด จึงเป็นไปตามหลักสวัสดิภาพต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

Table 1 Allelic and genotypic frequencies of *24BP-PRL* gene in Pradu Hang dam chickens by AS-PCR and real-time PCR-HRM

Techniques	n	Allele frequencies		Genotype frequencies		
		D	I	DD	ID	II
AS-PCR	25	0.84	0.16	0.80	0.08	0.12
real-time PCR-HRM	25	0.84	0.16	0.80	0.08	0.12

ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์

ความถี่อัลลีลของยีน *24BP-PRL* ในไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM พบว่าทั้งสองเทคนิคมีความถี่อัลลีลเท่ากัน โดยอัลลีล D และ I มีเท่ากับ 0.84 และ 0.16 ตามลำดับ และความถี่จีโนไทป์ DD, ID และ II มีเท่ากับ 0.80, 0.08 และ 0.12 ตามลำดับ (Table 1) สอดคล้องกับ Jaroensin et al. (2012); Kunhareang et al. (2012) และ Kunhareang et al. (2016) รายงานว่า ไก่พื้นเมืองมีความถี่ของอัลลีล D สูงกว่าอัลลีล I

Jaroensin et al. (2012) รายงานว่า รูปแบบจีโนไทป์ II ของยีน *24BP-PRL* มีความสัมพันธ์กับลักษณะการให้ผลผลิตไข่สูงในไก่ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าไก่พื้นเมืองพ่อพันธุ์ประดู่หางดำมีความถี่จีโนไทป์ DD สูงกว่า จีโนไทป์ II จึงทำให้ทราบว่า ไก่พ่อพันธุ์ประดู่หางดำมีความสามารถในการให้ผลผลิตไข่ต่ำ เนื่องจากมีสัดส่วนของจีโนไทป์ DD เป็นองค์ประกอบสูงกว่าจีโนไทป์ II แต่ทั้งนี้การปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองด้านการให้ผลผลิตไข่ยังสามารถทำได้โดยการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ II มาใช้ผสมพันธุ์และคัดเลือก ซึ่งจะสามารถเพิ่มความถี่ของจีโนไทป์ II ได้

ต้นทุนการตรวจสอบยีน *24BP-PRL*

ต้นทุนการตรวจสอบยีน *24BP-PRL* ด้วยเทคนิค AS-PCR และ real-time PCR-HRM โดยพิจารณาทั้ง

ราคา (สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ แรงงานและค่าบริการเครื่องมือด้านอนุพันธุศาสตร์) และเวลา จาก Table 2 จะเห็นได้ว่า ต้นทุนของเทคนิค AS-PCR มีราคาสูงกว่าเทคนิค real-time PCR-HRM ซึ่งมีค่าเท่ากับ 150 และ 90 บาท/ตัวอย่าง ตามลำดับ และระยะเวลาในการตรวจสอบด้วยเทคนิค AS-PCR (4.5 ชั่วโมง) ใช้เวลานานกว่าเทคนิค real-time PCR-HRM (3.5 ชั่วโมง) ประมาณ 1 ชั่วโมง ในการทำ gel electrophoresis ส่วนต้นทุนของเทคนิค AS-PCR ที่สูงกว่าเทคนิค real-time PCR-HRM นี้เป็นผลเนื่องมาจากการใช้ agarose และ gel star ในการเตรียมเจลและย้อมเจล จึงทำให้เทคนิค AS-PCR มีราคาสูงกว่าเทคนิค real-time PCR-HRM ทางห้องปฏิบัติการได้สังเกตเห็นความสำคัญของความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติการจึงเลือกใช้ gel star เพราะมีความปลอดภัยสูงกว่า ethidium bromide ที่ใช้กันทั่วไป จึงทำให้ต้นทุนการวิเคราะห์สูงกว่าที่เคยมีรายงานไว้ เช่นจากการศึกษาของ Jearapong and Jarukamjorn (2014) รายงานว่าค่าตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR ถูกกว่าเทคนิค real-time PCR (90 และ 140 บาท/ตัวอย่าง) ซึ่งความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุมาจากการเลือกใช้สารเคมีที่แตกต่างกัน และราคาเครื่อง real-time PCR ในอดีตอาจมีราคาสูงกว่าปัจจุบัน จึงทำให้ต้นทุนต่อตัวอย่างของการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างกัน

Table 2 The cost of AS-PCR and real-time PCR-HRM technique

	AS-PCR	Real-Time PCR-HRM
Time (hour)	4.5	3.5
Cost		
- Solutions (bath/sample)	0.63	101.90
- Labor (bath/sample)	4.35	5.60
- Material (bath/sample)	52.22	32.50
- Tools (bath/sample)	32.80	10.00
- Total (bath/sample)	90.00	150.00

สรุป

เทคนิค real-time PCR-HRM สามารถใช้ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *24BP-PRL* จากน้ำเชื้อของ ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก รวดเร็วและราคาถูกกว่าเทคนิค AS-PCR ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากไม่มีขั้นตอนการทำ gel electrophoresis และการตรวจสอบยีน *24BP-PRL* จากน้ำเชื้อของไก่ด้วยเทคนิค real-time PCR-HRM นี้ไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดทรมานแก่สัตว์ จึงเป็นการรักษาสวัสดิภาพให้แก่สัตว์ทดลองด้วย ดังนั้นการตรวจสอบยีน *24BP-PRL* จากน้ำเชื้อไก่ด้วยเทคนิค real-time PCR-HRM จึงเป็นเทคโนโลยีอนุพันธุ์ศาสตร์และเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงอีกแนวทางหนึ่งที่ควรพิจารณาเลือกใช้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ที่สนับสนุนน้ำเชื้อ ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกลางด้านปรับปรุงพันธุ์สัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนการปฏิบัติการในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

อโณทัย โกคาธิกรณ. 2549. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Introduction to Real time- PCR and its applications. วันที่ 16-17 พฤศจิกายน 2549, ห้อง

ประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Cui, J.X., H.L. Du, Y. Liang, X. M. Deng, N. Li, and X.Q. Zhang. 2006. Association of polymorphism in the promoter region of chicken prolactin with egg production. *Poult. Sci.* 85: 26-31.

Falconer, D. S., and Trudy F. C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group Ltd, Oxford.

Jaroensin, S., M. Duangjinda, S. Katawatin, and P. Sopannarath. 2012. Detection of genetic marker associated with egg production traits in Pradu Hang Dam and Chee chickens. *Khon Kaen Agr. J.* 40: 257-268.

Jearapong, N., and K. Jarukumjorn. 2014. Droplet digital Polymerase Chain Reaction: A novel method for absolute quantification of the target DNA. *J. Sci. Technol. MSU.* 33(5): 518-525.

Klomtong, P., K. Chaweewan, Y. Phasuk, and M. Duangjinda. 2015. *MC1R*, *KIT*, *IGF2*, and *NR6A1* as markers for genetic differentiation in Thai native, wild boars, and Duroc and Chinese Meishan pigs. *Genet. Mol. Res.* 14(4): 12723-12732.

Kunhareang, S., M. Duangjinda, B. Laopaiboon, W. Boonkum, and S. Charoensin. 2012. Detection of *24BP-PRL* and *VIPR-1* patterns associated with egg production traits in Thai Native Chickens. *Khon Kaen Agr. J.* 40(Suppl.2): 351-366.

Kunhareang, S., T. Buasook, M. Duangjinda, B. Laopaiboon, and Y. Phasuk. 2016. Genetic variation of *FASN*, *ApoB*, *24BP-PRL* and *VIPR-1* in Thai native chicken-Chee KKKU12. *Khon Kaen Agr. J.* 44(Suppl.1): 546-551.