การตรวจสอบเพศในสัตว์ด้วยเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction
Sex Determination in Animal by Multiplex Polymerase Chain Reaction

ช่อทิพ อรุณเดชาชัย มนต์ชัย ดวงจินดา และ ยุพิน ผาสุก
Chortip Aroondechachai, Monchai Duangjinda and Yupin Phasuk

Abstract

The objective of this study was to develop a multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) technique for sex determination of cattle and buffalo. Twenty-seven blood samples were collected from both sex of crossbred Holstein Friesian, native cattle, Brahman, and buffalo. DNA samples were extracted, and sex of animals were determined by multiplex PCR method. Two pairs of specific primers derived from the sequence of a SRY gene served as male-specific primers. They were used for a verification of Y chromosome. The Kappa-casein gene was used as an internal control. The results showed that the SRY gene specific primer was able to determine the sex of cattle and buffalo with high efficiency. The Kappa-casein gene primer was designed as an internal control for the cattle but not for buffalo.

Keywords : Multiplex polymerase chain reaction, sex determination, SRY

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR) สำหรับใช้ในการตรวจสอบเพศในโคและกระบือ โดยใช้กลุ่มตัวอย่างของโคลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเชียน โคพื้นเมือง และโคบรามัน และกระบือ ทั้งเพศเมียและเพศผู้จำนวน 27 ตัว ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ male-specific primers สำหรับยีน SRY เพื่อตรวจสอบยีนบนโครโมโซม Y ที่มีในสัตว์เพศผู้ และ internal control gene specific primers สำหรับยีน Kappa-casein พบว่า specific primers สำหรับยีน SRY สามารถใช้ในการตรวจสอบยีน SRY ได้ถูกต้องในโคทุกพันธุ์และกระบือแต่สำหรับ specific primers สำหรับยีน Kappa-casein สามารถใช้เป็น internal control ได้ดีเฉพาะในโคเท่านั้นและไม่สามารถใช้ได้ในกระบือ

คำสำคัญ : การตรวจสอบเพศ Multiplex Polymerase Chain Reaction ยีน SRY

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

บทนำ

การตรวจสอบเพศ (sex determination) จัดได้ว่า มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบการผลิตสัตว์ โดยทั่วไประบบการผลิตสัตว์แต่ละชนิดอาจมีความต้องการให้ลูกสัตว์ที่เกิดมาเป็นเพศใดเพศหนึ่งมากกว่าเพื่อให้ได้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากที่สุด เช่น ผู้เลี้ยงโคนมต้องการให้ลูกโคที่เกิดมาเป็นเพศเมียซึ่งสามารถให้ผลผลิตน้ำนมได้มากกว่าเพศผู้ เป็นต้น ในกลุ่มของสัตว์ปีกจำพวกนกและไก่ฟ้าบางชนิดการแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากทั้งสองเพศมีรูปร่างลักษณะภายนอก (phenotype) คล้ายคลึงกันมากจึงทำให้มักเกิดปัญหาในด้านการจับคู่ผสมพันธุ์นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีการตรวจสอบเพศของลูกสัตว์ตั้งแต่ระยะเอ็มบริโอเพื่อให้สามารถผลิตตัวอ่อนที่มีเพศตรงตามที่ต้องการได้ (Kitiyanant et al., 2000; Lambert et al., 2000; Chen et al., 2004; Hirayama et al., 2004) ทั้งนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศของสัตว์อย่างต่อเนื่องเรื่อยมาและมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ตั้งแต่วิธีการทำคาริไทป์เพื่อตรวจสอบโครโมโซม XY ซึ่งต้องใช้เวลานานถึง 8 ชั่วโมง จนกระทั่งได้มีการนำเอาเทคนิคทาง molecular genetic เข้ามาใช้ในการตรวจสอบเพศและเทคนิค (Polymerase Chain Reaction, PCR) จัดได้ว่าเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากให้ผลการตรวจสอบเพศที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว จึงสามารถตรวจสอบเพศได้ภายในเวลา 3 ชั่วโมง (Kitiyanant et al., 2000; Lambert et al., 2000)

การเลือกใช้ specific primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนต่างๆ บนโครโมโซมเพศนั้นจัดได้ว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้เทคนิค PCR เพื่อให้ได้วิธีการที่มีความแม่นยำในการตรวจสอบเพศในสัตว์ชนิดต่างๆ บริเวณของยีน SRY หรือ sex determining region Y gene เป็นยีนขนาดเล็กเพียง 1 exon ที่มีตำแหน่งอยู่บน short (p) arm ของโครโมโซม Y มีบทบาทสำคัญในฐานะของ “master gene” ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระยะเอ็มบริโอทำให้ตัวอ่อนถูกพัฒนาไปเป็นเพศผู้ โดยยีน SRY นี้ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนซึ่งทำหน้าที่ transcription factor ที่ไปควบคุม HMG (High Mobility Group) domain ทำให้ดีเอ็นเอเกิดการฟอร์มตัวเป็น loop การเปลี่ยนแปลงรูปร่างเช่นนี้มีผลต่อการกระตุ้นกระบวนการทำงานของยีนต่างๆ ทำให้เกิดการพัฒนาของ testes ในระยะต่อมา (Hanhua et al., 2001) อย่างไรก็ตามแม้ว่ากระบวนการทำงานของยีน SRY ยังไม่เป็นที่แน่ชัดนักแต่เป็นที่แน่นอนว่าในเพศเมียจะไม่มียีน SRY นี้ และการตรวจสอบยีน SRY สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วด้วยเทคนิค PCR (Baker, 2000; Chen et al., 2004) ดังนั้นยีน SRY จึงมีความเหมาะสมในการนำมาเป็นตัวชี้วัดเพื่อตรวจสอบเพศในสัตว์ชนิดต่างๆ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction (multiplex PCR) และทดสอบ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน SRY สำหรับใช้ในการตรวจสอบเพศในโคและกระบือ

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่าง genomic DNA ของโคพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ โคลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเชียน โคพื้นเมือง และโคบรามัน และกระบือ ทั้งเพศเมียและเพศผู้ จำนวนทั้งหมด 27 ตัว

การสกัด DNA

สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดใช้เฉพาะเม็ดเลือดขาว (buffy coat) นำมาทำการล้างเซลล์ด้วย 0.9% NaCl จากนั้นจึงสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัด DNA สำเร็จรูป PUREGENE™ (GENTRA INC.,MA) โดยมีหลักการดังนี้ เริ่มด้วยการทำลายผนังเซลล์และตกตะกอนโปรตีนด้วย Cell lysis buffer และ Protein precipitation buffer ตามลำดับ แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol จากนั้นจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNA hydration

buffer และปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอเป็น 50 μg/μl เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ในตู้แช่ -20 °ซ เพื่อรอใช้ต่อไป

การตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ด้วยเทคนิค Multiplex PCR

ทำการตรวจสอบเพศของสัตว์ด้วยเทคนิค Multiplex Polymerase Chain Reaction โดยมี male-specific primers สำหรับยีน SRY (Chen et al., 2004) เพื่อใช้ตรวจสอบยีนบนโครโมโซม Y ที่มีในสัตว์เพศผู้ และ internal control autosomic primers ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ยีน Kappa-casein (Braunschweig, 1998) ซึ่งเป็นยีนบนออโตโซมเพื่อใช้ตรวจสอบ genomic DNA ของสัตว์ทั้งสองเพศ โดยมีรายละเอียดลำดับเบสของ primers ดังแสดงใน Table 1

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ DNA template 100 ng และสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10XPCR-buffer, $MgCl_2$ (25 mM), dNTP's (1 mM), primers (Proligo Primers, Singapore) อย่างละ 5 μM, 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega, San Diego, CA) และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย sterile water ให้ได้ 10 μl โดยมี PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิที่ 94 °ซ นาน 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 15 รอบของ denaturation ที่ 94 °ซ นาน 30 วินาที primer annealing ที่ 65 °ซ นาน 30 วินาที และ primer extension ที่ 72 °ซ นาน 1 นาที และปฏิกิริยา 25 รอบของ denaturation ที่ 94 °ซ นาน 30 วินาที primer annealing ที่ 56 °ซ นาน 30 วินาที และ primer extension ที่ 72 °ซ นาน 1 นาทีจากนั้นจบด้วยขั้นตอน final extension ที่ 72 °ซ นาน 5 นาที

Table 1 Primers information for Multiplex PCR

Primers	Sequence
SRY	
Forward	5'-AGC ATT CTG AAA GTC GTT AGC AC-3'
Reverse	5'-ATG AAG GTG CAG CAG ACA TAC TA-3'
Kappa-casein	
Forward	5'-AAG AAA TAA TAC CAT TCT GCA TAA TTT ATT TTT TTA CAG-3'
Reverse	5'-GGC TGT TAT TCA TTT TGC CTT ATT TAC CTG-3'

เมื่อได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี multiplex PCR แล้ว นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบ ด้วย 2.0% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วยสี gel star จากนั้นจึงส่องดูภายใต้แสง UV เพื่อทำการบันทึกภาพและวิเคราะห์ผล

ผลการทดลอง

การตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ยีน SRY primers และ internal control gene primers (Kappa-casein) พบว่า ผลการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอสำหรับยีน SRY และยีน Kappa-casein ทำให้ได้ชิ้นส่วนขนาด 255 bp และ 583 bp ตามลำดับ ดังนั้นในการตรวจสอบสัตว์เพศผู้จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ 255 bp และ 583 bp แต่ในสัตว์เมียจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 583 bp เท่านั้น เนื่องจากเพศเมียไม่มีโครโมโซม Y ดังแสดงใน Fig.1 ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอทั้งสองมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทำให้การตรวจสอบเกิดความผิดพลาดได้น้อย ในขณะที่การตรวจสอบโดยใช้ ZFX/ZFY หรือ P2/P8 ทำให้ได้

แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียง (Fredsted and Villesen, 2004)

การใช้เทคนิค multiplex PCR โดยใช้ยีน SRY primers และยีน Kappa-casein primers แสดงผลการตรวจสอบเพศของโคลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเชียน โคพื้นเมือง โคบรามัน และกระบือ จะเห็นได้ว่า สำหรับโคลูกผสมโฮลสไตน์ ฟรีเชียน โคพื้นเมือง และโคบรามัน เพศผู้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 255 bp และ 583 bp และเพศเมียปรากฏเพียงแถบดีเอ็นเอขนาด 583 bp เท่านั้น สอดคล้องกับรายงานของ Chen et al., (2004) สำหรับกระบือเพศผู้ปรากฏเพียงแถบดีเอ็นเอขนาด 255 bp ซึ่งเป็นบริเวณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน SRY เท่านั้น และกระบือเพศเมียไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงผลใน Fig. 2 ทั้งนี้ในกระบือ ยีน SRY primers สามารถใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซม Y ได้อย่างถูกต้อง แต่อาจเนื่องจาก specific primers สำหรับยีน Kappa-casein นี้มีความจำเพาะต่อโคจึงไม่สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอในกระบือ ได้ ดังนั้นการตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค multiplex PCR ในกระบือจึงควรใช้ internal control gene primers ของบริเวณยีนอื่นๆ ที่มีความจำเพาะต่อกระบือเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอ

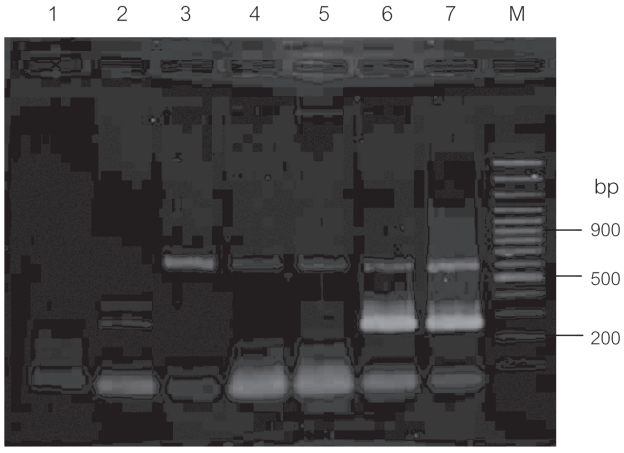

Fig.1 Amplification results of the SRY and casein genes by multiplex PCR. 1, negative control; 2, positive control for SRY; 3, positive control for kappa casein; 4 and 5, female individuals; 6 and 7, male individuals; and M, 100 bp DNA ladder marker plus

สรุปและวิจารณ์

การตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ยีน SRY primers และ internal control gene primers (Kappa-casein) สามารถใช้ได้ดีและถูกต้องในโคพันธุ์ต่างๆ โดยเพศผู้จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด ได้แก่ 255 bp และ 583 bp แต่ในสัตว์เพศเมียจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 583 bp เพียงแถบเดียว สำหรับในกระบือนั้น ยีน SRY สามารถใช้ตรวจสอบโครโมโซม Y ได้ แต่หากต้องการใช้วิธี multiplex PCR ในการตรวจสอบเพศควรเปลี่ยน internal control gene primers ที่มีความจำเพาะต่อกระบือ

การตรวจสอบเพศของโคพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค multiplex PCR สามารถทำได้สะดวก รวดเร็วและให้ผลถูกต้อง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า โคทั้ง 23 ตัว สามารถใช้ multiplex PCR ตรวจสอบเพศได้ถูกต้องทั้งหมด

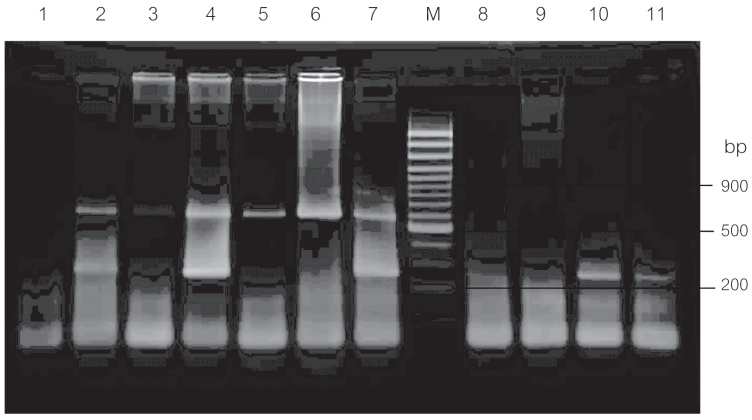

Fig.2 Sex identification in several animals (M = male, F = female) using multiplex PCR with the SRY and casein genes specific primers. 1, negative control; 2, Native cattle (M); 3, Native cattle (F); 4, Brahman (M); 5, Brahman (F); 6, crossbred Holstein (F); 7, crossbred Holstein (M); 8,9, Buffalo (F); 10,11, Buffalo (F); and M,100 bp DNA ladder marker plus.

(100%) โดยทำ PCR เพียงครั้งเดียวและใช้ดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงทำให้สามารถนำเทคนิค multiplex PCR นี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเพศของสัตว์ในระยะเอ็มบริโอต่อไปได้ ซึ่งแม้ว่าการสกัดดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอจะได้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อยกว่าการสกัดจากเม็ดเลือด การเลือกใช้ primers ที่เหมาะสมจัดได้ว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความแม่นยำของการตรวจสอบเพศ ในปัจจุบันมีการศึกษาการตรวจสอบเพศโดยการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการโดยใช้ specific primers ของบริเวณยีนต่างๆ บนโครโมโซมเพศ เช่น SRY, ZFX/ZFY, และ CHD เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่า primers สามารถตรวจสอบเพศได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และให้ผลการตรวจสอบเพศที่แม่นยำเป็นที่น่าเชื่อถือทั้งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด เช่น โค แพะ กวาง นกชนิดต่างๆ เป็นต้น (Yamauchi et al., 2000; Bryja et al., 2003; Phua et al., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือก primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน SRY ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องทั้งในโคนมและกระบือ นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีการใช้ internal control gene primers เพื่อลดผลของ false negative และเพิ่มความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Baker, A. J. 2000. Molecular methods in ecology. Blackwell Science Ltd. 295-321 pp.

Braunschweig, M. 1998. Associations between casein haplotypes and milk production traits of Braunvieh and Fleckvieh. Ph. D. Diss. ETH No. 12731, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. 140 pp.

Bryja, J. and A. Konecny. 2003. Fast sex identification in wild mammals using PCR amplification of the Sry gene. Folia Zool. 52: 269 - 274.

Chen, C-Y., L-S. Huang, J-B. Chen, N-S. Ding, L-L. Zhou, and H-X. Xiao. 2004. Establishing and optimizing the system for sex determination of bovine preimplantation embryos. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 1:13-16.

Fredsted, T. and P. Villesen. 2004. Fast and reliable sexing of prosimian and human DNA. Am. J. Primatol. 64: 345-350.

Hanhua, C., S. Huifang, Z. Rongjia, G. Yiqing, L. Li, L. Jiangdong, J. Yong, K. Toshiyuki, and S. Shizuyo. 2001. Characterization of Bovidae sex-determining gene SRY. Genet. Sel. Evol. 33: 687-694.

Hirayama, H., S. Kageyama, S. Moriyasu, K. Sawai, S. Onoe, Y. Takahashi, S. Katagiri, K. Toen, K. Watanabe, T. Notomi, H. Yamashina, S. Matsuzaki, and A. Minamihashi. 2004. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology 62: 887-896.

Kitiyanant, Y., J. Saikhun, B. Siriaroonrat, and K. Pavasuthipaisit. 2000. Sex determination by polymerase chain reaction and karyotyping of bovine embryos at first cleavage in vitro. Sci. Asia. 26: 9-13.

Lambert, J-F., B. O. Benoit, G. A. Colvin, J. Carlson, Y. Delville, and P. Quesenberry. 2000. Quick sex determination of mouse fetuses. J. Neurosci. 95: 127-132.

Phua, A. C. Y., R. B. Abdullah, and Z. Mohamed. 2003. A PCR-based sex determination method for possible application in Caprine Gender selection by simultaneous amplification of the SRY and Aml-X genes. J. Reprod. Dev. 49: 307-311.

Yamauchi, K., S. Hamasaki, K. Miyazaki, T. Kikusui, Y. Takeuchi, and Y. Mori. 2000. Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in Sika deer (Cervus nippon). J. Vet. Med. Sci. 62: 669-671.