เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2554; 9(2): 81-91

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก โดยใช้ลายพิมพ์ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในสุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน

เบญจวรรณ ต่อนใจ[1], วัชรศักดิ์ จอมทัน[1], กรกฎ งานวงศ์พานิชย์[1], วารณี ประดิษฐ์[2] และ สิริวดี ชมเดช[2*]

[1]ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ ศึกษาการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเพื่อบ่งบอกความเป็น พ่อ แม่ และ ลูก ในสุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ คือ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 (ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1, 12, 14 และ 31 ของสุนัขตามลำดับ) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม จากสุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ 2 ครอบครัว (8 ตัว) และสุนัขพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน 3 ครอบครัว (9 ตัว) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ใน 5 % โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการทดลองพบว่า ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่สามารถใช้บ่งบอกความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ได้ คิดเป็น 100 (2/2) เปอร์เซ็นต์ และไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 สามารถใช้บ่งบอกความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียนได้ คิดเป็น 100 (3/3), 100 (3/3), 66.67 (2/3) และ 66.67 (2/3) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ ในการตรวจสอบหาความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และพันธุ์ปอมเมอร์-เรเนียนได้ **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2554; 9(2): 81-91

คำสำคัญ : ไมโครแซทเทลไลท์, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, ไซบีเรียนฮัสกี้, ปอมเมอร์เรเนียน

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : สิริวดี ชมเดช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200 E-mail address:siriwadee@yahoo.com
ได้รับบทความ วันที่ 28 มกราคม 2554

ปัจจุบันใบรับรองประวัติ (pedigree) ของสุนัขในประเทศที่พัฒนาแล้ว มีการรับรองโดยใช้เทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะของสุนัขแต่ละตัว สามารถนำไปพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกได้ แต่ในประเทศไทยการรับรองประวัติของสุนัข ผู้ซื้อจะซื้อด้วยความเชื่อใจกันว่าสุนัขที่ซื้อนั้น เป็นสุนัขที่มาจากพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกกล่าวอ้างว่าเป็นพ่อแม่ของลูกตัวนั้นจริง ตัวอย่างเช่น พ่อแม่พันธุ์ที่เป็นแชมป์การประกวด ซึ่งอาจเกิดปัญหาการปลอมแปลงใบรับรองประวัติ ซึ่งยังขาดการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดในระดับดีเอ็นเอ

การพิสูจน์ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตชนิด (species) เดียวกันหรือระหว่างชนิด สามารถใช้เครื่องหมาย 2 ประเภท ได้แก่ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) ใช้ลักษณะภายนอกทางสรีรวิทยาเป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อบ่งบอกความแตกต่าง โดยในสุนัขใช้ลักษณะทางกายภาพ ยกตัวอย่างเช่น สีขน หรือสีตา ซึ่งสามารถเปรียบเทียบได้ด้วยตาเปล่า แต่ลักษณะทางกายภาพที่ปรากฏอาจไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างได้ทั้งหมด ทำให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ เครื่องหมายอีกประเภทที่ใช้คือ เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน ซึ่งในสุนัขมีข้อจำกัด คือ ยีนที่ตรวจสอบได้ไม่ครอบคลุมทั้งจีโนม และโปรตีนยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย อีกระดับ คือ ระดับดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถนำเซลล์ใดที่มีดีเอ็นเอมาตรวจได้ทั้งหมดและสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่ยีนและการตรวจสามารถทำได้ครอบคลุมทั้งจีโนม[1]

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นเครื่องหมายที่ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือระดับต่างสปีชีส์ เป็นเครื่องมือที่มีความจำเพาะและน่าเชื่อถือในการพิสูจน์ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ซึ่งปรากฏเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งการเกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิตนั้น อาศัยหลักการ คือ ดีเอ็นเอในสัตว์แต่ละตัวมีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์และมีความหลากหลายของลำดับเบสที่เรียงตัวอยู่ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ที่เรียกว่ามี polymorphism[2,3]

ปัจจุบันวิธีการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายวิธี เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) มินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism: AFLP) และ อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism: RFLP) เป็นต้น[4] ซึ่งนำมาพัฒนาใช้ประโยชน์ในสุนัข ยกตัวอย่างเช่น วิธีการพิสูจน์หาพ่อแม่ในสุนัข[5]

สุนัขมีโครโมโซม 39 คู่ ดีเอ็นเอมีประมาณ 3,000 ล้านเบส ซึ่งพบอยู่ทั้งในส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสและในไมโตคอนเดรีย ประกอบด้วยยีนประมาณ 35,000 – 40,000 ยีน[6] ซึ่งการศึกษาการพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัข สายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้และสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียนครั้งนี้ได้เลือกใช้ไมโครแซทเทลไลท์ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส

เช่น (A)n, (CA)n, (TAA)n หรือ (GATA)n เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง[4] ในสุนัขมีไมโครแซทเทลไลท์กระจายอยู่ทั่วจีโนม[7,8]โดยพบเบสซ้ำ (CA)n และ (GT)n เป็นส่วนใหญ่ โดยพบเบสซ้ำดังกล่าวทุกๆ 43 กิโลเบส[6] ทำให้มีความผันแปรของจำนวนซ้ำของเบสสูง หรือกล่าวได้ว่ามีความหลากหลายของอัลลีล (alleles) ในไมโครแซลเทลไลท์อยู่หลายตำแหน่งบนจีโนม ทำให้สามารถตรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ทีละหลายโลคัสไมโครแซทเทลไลท์จึงสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้อย่างละเอียดและถูกต้อง[9] ดังนั้นจากเหตุผลดังกล่าวไมโครแซทเทลไลท์จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสุนัขแต่ละตัวได้ ขณะเดียวกันรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีการถ่ายทอดจากพ่อ แม่ ไปสู่ลูก ได้ตามกฎการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล[10] จึงมีประโยชน์สำหรับการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดระหว่าง พ่อ แม่ ลูก

นอกจากนี้ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ได้รับการพัฒนาในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ยังสามารถนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในครอบครัวหรือสกุลเดียวกันได้ เนื่องจากในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้กันจะมีลำดับเบสที่เหมือนกัน (conserved sequence) ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาสุนัขสายพันธุ์อื่นได้อีกด้วย[22]

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ในสัตว์ ยกตัวอย่างเช่น สามารถตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเสือโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์-ไพรเมอร์ นำไปสู่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเสือโคร่งในสวนสัตว์ในประเทศไทยที่สามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้[3] การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอในไก่หลายสายพันธุ์[12,13] และได้มีการนำไมโครแซทเทลไลท์มาใช้ในการทำแผนที่ยีนในกุ้ง[14] นำไปสู่การพัฒนาในการตรวจพบไมโครแซทเทลไลท์ถึง 335 ตำแหน่งในจีโนมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย[9] ส่วนการศึกษาที่เกี่ยวกับไมโครแซทเทลไลท์ในสุนัขพบว่ามีการศึกษาความหลากหลายและการพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูกในสุนัขสายพันธุ์บีเกิลและสุนัขสายพันธุ์ลาบราดอล์ โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์[15] และมีการศึกษาวิจัยพบไมโครแซทเทลไลท์ใหม่บนจีโนมของสุนัขตามมาอีกมากมาย[8,16] และในประเทศไทยได้มีการศึกษาการพิสูจน์หาพ่อแม่สุนัขสายพันธุ์บีเกิลโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์[7] แต่การใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์เพื่อพิสูจน์ความเป็นญาติในสุนัขของประเทศไทยยังมีการทำกันเพียงบางกลุ่ม อีกทั้งการศึกษายังไม่รัดกุมเพียงพอที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกได้ทั้งที่เทคนิคนี้ได้แสดงให้เห็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้บ่งบอกความสัมพันธ์ในเครือญาติ ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการพิสูจน์หาความเป็นพ่อ แม่ ลูกในสุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และสายพันธุ์ปอมเมอร์-เรเนียน ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 คุณลักษณะของไพรเมอร์คู่ RYR 1, MEP1A, PON3 และ APP1[16]

Primer	Tm	Repeat structure	Primer sequence (5' - 3')	HET
RYR1	58	(AT3)12	AGGATGTGCTTTGAGACAATG	0.90
			GCTCAGCAGGGAGTCTAGTT	
			GCTCAGCAGGGAGTCTAGTTC	
MEP1A	59	(GA3)23	GGTTCTGGGATCAAGTTCCA	0.50
			CTGGTGGTTTCCTCTCCCTA	
			TGTCGCTGTTTTGGTACAGAAT	
PON3	59	(GT)22	GAATAAATTTTGCCCTGATAATGA	0.70
APP1	55	(A3G)11AAG(A4G)13	GGCTTAGAACCTGAGTGTTG	0.04
			TCTGGCTTCAAAATGAAATT	

จากนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวนำมาแยกความแตกต่างบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอริซิส (electrophoresis) และย้อมสีดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรด

โดยมีการออกแบบการทดลองให้รัดกุมมากยิ่งขึ้น เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 4 ตำแหน่งในสุนัข และเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เชิงคลินิกและธุรกิจได้

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างสุนัข

ทำการเจาะเก็บเลือดสุนัขแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง ดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 สุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ ทั้งหมด 8 ตัว จำนวน 2 ครอบครัว คือ ครอบครัว A จำนวน 5 ตัว ประกอบด้วย แม่ของพ่อ (GP') พ่อ (P) แม่ (P') และลูกสุนัข (F1) เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 1 ตัว ครอบครัว B จำนวน 3 ตัว ประกอบด้วย พ่อ แม่ ลูกสุนัขเพศผู้ 1 ตัว กลุ่มที่ 2 สุนัขสายพันธุ์ ปอม-เมอร์เรเนียนทั้งหมด 9 ตัว จำนวน 3 ครอบครัว คือ ครอบครัว C, D และ E ตามลำดับ โดยในแต่ละครอบครัวจะประกอบด้วย พ่อ แม่ และลูกสุนัข โดยสุนัขแต่ละครอบครัวต้องไม่มีสายเลือดเดียวกันอย่างน้อย 5 ช่วงอายุ และกลุ่มที่ 3 สุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียนที่ไม่มีความเป็นญาติกับครอบครัวข้างต้น จำนวน 13 ตัว

ขั้นตอนการเก็บเลือดและสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างเลือดจากสุนัขพันธุ์ปอมเมอร์-เรเนียนบริเวณหลอดเลือดดำบริเวณขาหน้า

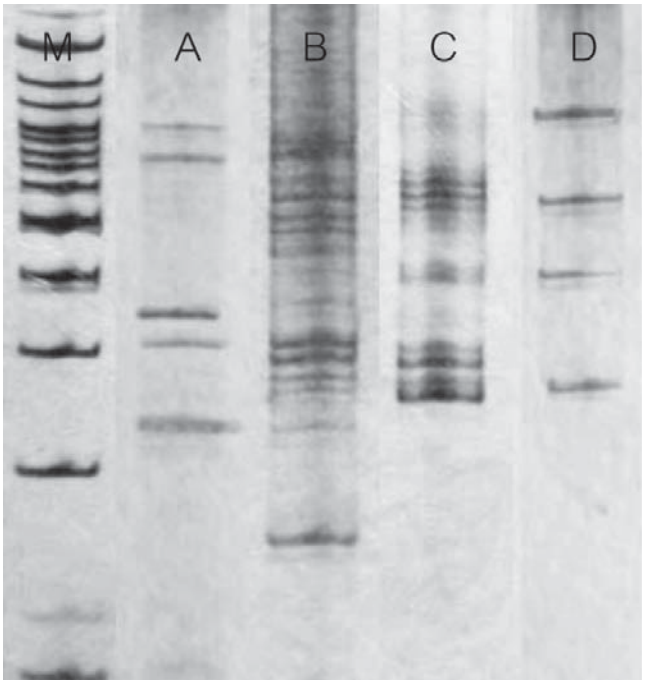
(cephalic vein) จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดเก็บเลือดที่มี EDTA บรรจุอยู่ และผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็ง และทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม[12]

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (พีซีอาร์)

ใช้วิธีพีซีอาร์แบบทัชดาวน์ (touch down) โดยใช้อุณหภูมิในการจับของไพร์เมอร์ที่ 50-55 องศาเซลเซียส (annealing) โดยลดอุณหภูมิลง 0.5 องศาเซลเซียสต่อรอบ ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 คู่ ดังตารางที่ 1

ผลการทดลอง

ผลของการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุนัขสายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และสุนัขสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน พบว่าปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งในแต่ละครอบครัวของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและแสดงแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (รูปที่ 1) จึงสามารถใช้ตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูกของสุนัขทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ ดังตารางที่ 2 และ 3



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ คือ RYR1 (A), MEP1A (B), PON3 (C) และ APP1 (D) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดลองของการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 ของครอบครัวสุนัขสายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ (A และ B) และสุนัขสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน (C, D และ E)

Primer	A-Family					B-Family			C-Family			D-Family			E-Family		
Name	GP'_A	P_A	P'_A	$F1_{1A}$	$F1_{2A}$	P_B	P'_B	$F1_B$	P_C	P'_C	$F1_C$	P_D	P'_D	$F1_D$	P_E	P'_E	$F1_E$
RYR1	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MEP1A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PON3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
APP1	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถของไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ คือ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 ตามลำดับ

Primer	Dog Parentage Testing (%)
RYR1	100
MEP1A	100
PON3	66.67
APP1	66.67

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการพิสูจน์หาความเป็นพ่อแม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ จำนวน 2 ครอบครัว โดยเลือกใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ จากรายงานผลการศึกษาของ Litt และคณะ[16] จำนวน 4 คู่ คือ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 ซึ่งเป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่พบบนโครโมโซมคู่ที่ 1, 12, 14 และ 31 ของสุนัข และมีค่า heterozygosity เท่ากับ 0.90, 0.50, 0.70 และ 0.04 ตามลำดับ พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ คู่ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 สามารถแสดงรูปแบบของแถบอัลลีลที่แตกต่างกันในสุนัขแต่ละตัว และสามารถแสดงอัลลีลของพ่อและแม่ที่ถ่ายทอดไปยังลูกได้ ตามกฎของเมนเดลดังนั้น จึงสามารถใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ บ่งบอกความเป็นพ่อแม่ ลูก ได้ แต่ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์คู่ PON3 ไม่สามารถแสดงแถบอัลลีลของลูกสุนัขจากครอบครัว E ($F1_E$) และไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ คู่ APP1 ไม่สามารถแสดงแถบอัลลีลของแม่สุนัขจากครอบครัว D (P'_D)ได้ สาเหตุอาจเกิดจากไมโครแซลเทลไลท์ไพรเมอร์

คู่นี้ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุนัขดังกล่าวได้ อาจเป็นเพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่บริเวณตำแหน่งจับของไพรเมอร์ของสุนัขที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตั้งอยู่ ดังนั้น ควรใช้ไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งคู่ในการตรวจสอบหาความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัข ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของจันทร์จิรา[7] ที่ทำการพิสูจน์หาความเป็นพ่อ แม่ ลูกของสุนัขพันธุ์บีเกิลจำนวน 1 ครอบครัว โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 4 คู่ พบว่าต้องใช้ไพรเมอร์อย่างน้อยสองคู่ในการพิสูจน์หาความสัมพันธ์ และจากการศึกษาของ Lee และ Cho[17] ที่ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์จำนวน 14 คู่ หาความเป็นพ่อ แม่ ลูกของม้าแข่งในประเทศเกาหลีพบว่าต้องใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์มากกว่าหนึ่งคู่ในการหาความเป็นพ่อ แม่ ลูก และการศึกษาของ Lee และ Cho[17] ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขน ซึ่งต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ที่การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด แสดงให้เห็นว่าสามารถนำวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นขนไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาในครั้งต่อไปได้

อีกทั้ง Xu[11] และ สุดา[3] ซึ่งทำการศึกษาความหลากหลายของเสือโคร่ง (*Panthera tigris*) พบว่า การใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 7 คู่ สามารถบอกความสัมพันธ์ทางสายเลือดในเสือได้ การศึกษาของ Peelman และคณะ [18] ที่ทำการศึกษาในโคสายพันธุ์ Holstein Friesian, Belgian Blue, Belgian Red Pied และ East Flemish พบว่าสามารถใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์จำนวน 23 คู่ ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ งานวิจัยของ Schnabel และคณะ[19] ที่พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ จำนวน 15 คู่ สามารถใช้พิสูจน์หาความเป็น พ่อ แม่ ลูก ในโคสายพันธุ์ North American bison (*Bison bison*) และ domestic cattle ได้ รวมทั้ง Nechtelberger และคณะ[20] ที่ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ไมโครแซทเทลไลท์ในการพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุกรสายพันธุ์ Landrace, Pietrain และ Large White และพบว่า สามารถใช้ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 5 คู่ ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ และ Luikart และคณะ[21] ที่พบว่าสามารถใช้ไมโครเซทเทลไลท์ไพรเมอร์จำนวน 22 คู่ในการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูกในแพะได้ ซึ่งงานวิจัยข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ที่สามารถใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ในการพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ได้

การศึกษาครั้งนี้ใช้จำนวนครอบครัวของสุนัขมากกว่าการศึกษาในประเทศไทยที่ผ่านมา และทำการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดถึงระดับปู่ย่า อีกทั้งทำการศึกษาในสุนัขสายพันธุ์เดียวกันที่ไม่มีความสัมพันธ์กับครอบครัวสุนัขที่ต้องการพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูก เพื่อตรวจสอบไพร์เมอร์ที่นำมาใช้ แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นรูปแบบจำเพาะในแต่ละครอบครัว และนำไพร์เมอร์ไปใช้พิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ในสุนัขพันธุ์อื่น คือ สายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน พบว่าไพร์เมอร์ที่นำมาใช้สามารถหาความเป็น

พ่อแม่ลูกในสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียนได้ จึงเพิ่มความน่าเชื่อถือของไพร์เมอร์ทั้ง 4 คู่นี้มากยิ่งขึ้น จากการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ไม่สามารถแสดงแถบอัลลีลที่บ่งบอกเพศผู้หรือเพศเมีย และไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ ดังนั้น หากต้องการบ่งบอกเพศของสุนัขโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ควรเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมเพศ และนอกจากนี้อาจทำการศึกษาโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ทั้ง 4 คู่ ในการพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์อื่นๆ เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่นี้อีกด้วย นอกจากนี้ กลุ่มประชากรที่ใช้ในการทดลอง ควรมาจากการเตรียมสัตว์ทดลองเองโดยการสร้างครอบครัวของพ่อ แม่ ลูกสุนัขที่นำมาใช้ เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของแหล่งที่มาของกลุ่มประชากร

จากการศึกษาการพิสูจน์หาความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียน โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ทั้งหมด 4 คู่ คือ RYR1, MEP1A, PON3 และ APP1 พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมดสามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นรูปแบบเฉพาะของสุนัขแต่ละตัว และแสดงอัลลีลของพ่อและแม่ที่ถ่ายทอดไปยังลูกได้ ซึ่งไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่สามารถใช้บ่งบอกความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ได้ คิดเป็น 100 (2/2) เปอร์เซ็นต์ และไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ RYR 1, MEP1A, PON 3 และ APP1 สามารถใช้บ่งบอกความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขสายพันธุ์ปอมเมอร์เรเนียนได้ คิดเป็น 100 (3/3), 100 (3/3), 66.67 (2/3) และ 66.67 (2/3) เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ทั้ง 4 คู่ในการตรวจสอบหาความเป็นพ่อ แม่ ลูก ในสุนัขพันธุ์ไซบีเรียนฮัสกี้ และพันธุ์ปอมเมอร์-เรเนียนได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณฟาร์มสุนัขอำเภอแม่วาง และอำเภอแม่แตง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดสุนัขและข้อมูลของประชากรที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ขอขอบคุณโครงการหน่วยบริการการออกแบบและสร้างนวัตกรรมทางด้านชีววัสดุเพื่ออุตสาหกรรมขนาดเล็กและกลาง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนทุนวิจัย ขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2545.
2. ธานินทร์ ภู่พัฒน์. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. เชียงใหม่: ภาควิชานิติเวช-ศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2538. หน้า 16-32.

3. สุดา ศรีส่อง. การศึกษาความหลากหลายของเสือโคร่งโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์มาร์คเกอร์. [ปัญหาพิเศษ]. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2550.

4. วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิลกรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสายพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2541. หน้า 18-69.

5. Oberbauer AM, Sampson J. Pedigree analysis, genotype testing and genetic councelling: the genetics of the dog. London: CABI Publishing; 2001. p. 461-86.

6. Sargan DR, Sampson J, Binus MM. Molecular genetics of the dog: the genetics of the dog. London: CABI Publishing; 2001. p. 139-158.

7. จันทร์จิรา ภวภูตานนท์. การพิสูจน์หาพ่อแม่สุนัขโดยใช้ลายพิมพ์ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. วารสารสัตวแพทย์. 2548; 15: 37-42.

8. Richman M. Characterization of a minimal screening set of 172 microsatellite markers for genome-wide screen of the canine genome. J Biochem Biophys Methods. 2001; 47: 137-49.

9. อัญชลี ทัศนาขจร, วิเชียร ริมพณิชยกิจ, ศิราวุธ กลิ่นบุหงา. การวิเคราะห์ลักษณะและความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ในจีโนมของกุ้งกุลาดำและความเป็นไปได้ในการจำแนกพันธุกรรม. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย; 2543.

10. ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, สมศักดิ์ อสิทธิวาณิช. ชีววิทยา 3. กรุงเทพฯ: มูลนิธิส่งเสริมโอลิมปิกวิชาการและพัฒนามาตรฐานวิทยาศาสตร์ศึกษาในพระอุปถัมภ์สมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนากรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์; 2548. หน้า 28-36,135.

11. Xu YC, Li B, Li WS, Bai SY, Jin Y, Li XP, et al. Individualization of tiger by using microsatellites. Forensic Sci Int. 2005; 151: 45-51.

12. ทรรศิน ปณิธานะรักษ์. การศึกษาความหลากหลายของ DNA ในไก่สายพันธุ์ (Gallus gallus domesticus) โดยใช้ microsatellite marker (MCW-1). [ปัญหาพิเศษ]. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2543.

13. Takahashi H, Nirasawa K, Ngamine Y, Tsudzuki M, Yamamoto Y. An analysis of genetic relationships between Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA

polymorpisms. J Hered. 1998; 89: 543-6.

14. Acacia AW. Development of expressed sequence tags (ESTs) and microsatellite marker for mapping shrimp genome. Proceeding of the 5th Plant and Animal Genome Conference; 1997 Jan 12-16; California, USA; 1997.

15. Ichikawa Y, Takagi K, Tsumagari S, Ishihama K, Morita M, Kanemaki M, et al. Canine parentage testing based on microsatellite polymorpisms. J Vet Med Sci. 2001; 63: 1209-13.

16. Litt MM, Bestwick LM, Winther J, Jakobs PM. Fifty-four new genes based canine microsatellite markers. J Hered. 2005; 96: 843-6.

17. Lee SY, Cho GJ. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. J Vet Sci. 2006; 7: 63-7.

18. Peelman LJ, Mortiaux F, Zeveren AV, Dansercoer A, Mommens G, Coopman F, et al. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. Anim Genet. 2002; 29: 161-7.

19. Schnabel RD, Ward TJ, Derr JN. Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, Bison bison and domestic cattle. Anim Genet. 2008; 31: 360-6.

20. Nechtelberger D, Kaltwasser C, Stur I, Meyer JN, Mueller M, Mueller S. DNA microsatellite analysis for parentage control in Austian pigs. Anim Biotechnol. 2001; 12: 141-4.

21. Luikart G, Biju-Duval MP, Ertugrul O, Zagdsuren Y, Maudet C, Taberlet P. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (Capra hircus). Anim Genet. 2001; 30: 431-8.

22. ฉัตรมงคล สุวรรณภูมิ. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกบทูด (Limnonectes blythii) ในบางพื้นที่ของจังหวัดแม่ฮ่องสอนโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอและไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ. [วิทยานิพนธ์] เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2552.