

# การตรวจจีโนทัยป์เพศตัวอย่างดีเอ็นเอมนุษย์ โดยวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1*

นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา<sup>1</sup> วิมาลา อินอุ้นโชติ<sup>1</sup> สุกัญญา วัฒนาโกคยกิจ<sup>1</sup> ไทเชะ มุชิโรตะ<sup>2</sup> และสุรค์เมธ มหาศิริมงคล<sup>1</sup>

<sup>1</sup>กองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นครบุรี 11000

<sup>2</sup>Laboratory for Pharmacogenomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama 230-0045 Japan

**บทคัดย่อ** การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับลักษณะการแสดงออก (genotype-phenotype association study) เช่น การเกิดโรค ความรุนแรงของโรค การตอบสนองต่อยา มักใช้เทคนิคการตรวจทางพันธุกรรมที่มีขั้นตอนซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูง จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง ซึ่งการตรวจเหล่านี้ไม่สามารถระบุการสลับตัวอย่างหรือการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างที่อาจเกิดขึ้นโดยเฉพาะขั้นตอนที่ทำโดยมนุษย์ การตรวจจีโนทัยป์เพศของตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อยืนยันว่าตรงกับบันทึกข้อมูลเพศของบุคคลในฐานข้อมูล เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความมั่นใจในคุณภาพผลการศึกษา จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจจีโนทัยป์เพศด้วยเทคนิค real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ของยีน *CDY-1* บนโครโมโซม Y ผลการทดสอบประสิทธิภาพในตัวอย่างดีเอ็นเอ 377 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลตรวจจีโนทัยป์เพศตรงกับบันทึกในฐานข้อมูลบุคคลร้อยละ 100 วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจเพศในตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพัฒนาให้การตรวจนี้สามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยจะทำให้ได้วิธีตรวจที่นำไปใช้ประโยชน์ได้สมบูรณ์ขึ้น

**คำสำคัญ** การตรวจจีโนทัยป์เพศ, ดีเอ็นเอมนุษย์, เรย์ลโทมัส พีซีอาร์

Corresponding author E-mail: nuanjun.w@dmsc.mail.go.th

Received: 28 January 2020

Revised: 23 June 2020

Accepted: 4 August 2020

## บทนำ

การเตรียมตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA; gDNA) สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม (genotyping) เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในการวิจัยทางพันธุศาสตร์ มีขั้นตอนตั้งแต่การเก็บตัวอย่าง เช่น เลือด น้ำลาย เยื่อบุกระพุ้งแก้มของบุคคล การติดฉลากรหัสตัวอย่าง การแบ่งตัวอย่างเพื่อแยกเก็บรักษา การสกัดและการเจือจาง gDNA แต่ละขั้นตอนมีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้ โดยเฉพาะจากคนทำงาน (human error) เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่มีคุณภาพ สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจจีโนทัยป์กับลักษณะที่แสดงออกของผู้ป่วย (genotype-phenotype analysis) และได้ผลการศึกษามีความถูกต้องแม่นยำ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจคุณภาพและปริมาณ gDNA ก่อนการศึกษานี้ ทางห้องปฏิบัติการ เช่น ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ gDNA โดยประมาณ ทราบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีในช่วงคลื่น 260/280 นาโนเมตร<sup>(1,2)</sup> การใช้สารเรืองแสงที่จับจำเพาะกับดีเอ็นเอสายคู่ เช่น PicoGreen หรือ Hoechst H33258 หรือ SYBR Green<sup>(3,4)</sup> จะทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน ส่วนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) จะทำให้ทราบความสมบูรณ์ (integrity) ของ gDNA ว่ายังคงสภาพเป็นสายยาวโดยปรากฏเป็นแถบหนามากกว่า 30 kb<sup>(5)</sup> ไม่ขาดเป็นท่อนสั้น ๆ ซึ่งจะเห็นเป็นแถบป็น (smearing pattern) ปัจจุบันมีเครื่องอัตโนมัติที่สามารถตรวจคุณภาพและปริมาณ gDNA เช่น เครื่องที่ใช้หลักการ microfluidic electrophoresis (Tape Station System, Agilent) หรือ capillary electrophoresis (Fragment Analyzer System, Agilent) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นพร้อมค่าความสมบูรณ์ของสายดีเอ็นเอ (DNA Integrity Number; DIN)

การตรวจคุณภาพและปริมาณดังกล่าวเป็นการตรวจแต่ละตัวอย่างดีเอ็นเอ ไม่สามารถระบุบุคคลของตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA identification) หรือการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างได้ ซึ่งเป็นข้อผิดพลาดที่เกิดได้บ่อยจากคนทำงาน โดยเฉพาะในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ในการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequencing) หรือทั้ง exome (whole exome sequencing) หรือการวิเคราะห์ความหลากหลายแบบนิวคลีโอไทป์เดี่ยวทั้งหมด (whole single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping) สามารถระบุเพศของบุคคลจากการวิเคราะห์ผลจีโนทัยป์ (gender genotyping) ได้ เพื่อนำมาตรวจสอบกับข้อมูลเพศที่บันทึกในฐานข้อมูลบุคคล ซึ่งเป็นขั้นตอนการตรวจคุณภาพข้อมูลก่อนการศึกษาต่อไป<sup>(6,7)</sup> ตัวอย่างที่มีผลจีโนทัยป์เพคไม่ตรงกับฐานข้อมูลจะมีการทวนสอบการบันทึกข้อมูลและขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการตั้งแต่การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ หากยังไม่ตรงกัน ตัวอย่างนั้นจะถูกตัดออกจากการวิเคราะห์ ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากให้ผลไม่ตรงกัน จะทำให้สูญเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจระดับจีโนมที่มีราคาสูง ซึ่งหากเป็นการศึกษาพันธุกรรมเฉพาะตำแหน่ง จะไม่สามารถตรวจสอบความผิดพลาดเหล่านั้นได้ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอว่าถูกต้องตรงตัวบุคคลก่อนการนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปศึกษาด้วยเทคนิคขั้นสูงต่างๆ ในงานวิจัยทางพันธุศาสตร์ เพื่อให้ได้ผลการศึกษามีคุณภาพน่าเชื่อถือ ลดความเสี่ยงการเกิดความผิดพลาดและการสูญเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจที่ไม่สามารถนำผลมาใช้ประโยชน์ได้

การตรวจจีโนทัยป์เพค (gender genotyping) เป็นวิธีการระบุเพศโดยอาศัยการตรวจด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล มีการใช้กันมากโดยเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจ genetic markers ชนิด short tandem repeats (STRs) หรือ microsatellites หรือ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ในการตรวจยืนยันบุคคล (person identification) และงานพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลทางนิติเวช (Forensic Sciences) โดยเฉพาะกรณีที่วัตถุพยานเป็นชิ้นส่วนของร่างกายหรืออวัยวะ<sup>(8,9)</sup> นอกจากนี้ยังใช้ในการยืนยันเพศของนักกีฬาหญิงว่าไม่มีโครโมโซม Y ซึ่งอาจทำให้ได้เปรียบในการแข่งขันกีฬายาชีพ หรือในเวชศาสตร์การกีฬา (Sport Sciences)<sup>(10)</sup> ยีนที่มีการนำมาใช้ตรวจจีโนทัยป์เพค ได้แก่ *Amelogenin*<sup>(11)</sup> หรือ Zinc Finger Protein X-linked/Zinc Finger Protein Y-linked (ZFX/ZFY)<sup>(12)</sup> ซึ่งมีอยู่บนทั้งโครโมโซม -X และ -Y ด้วยขนาดที่ไม่เท่ากัน ยีน *DYS390* *DYS438* *DYA439* และ *sex-determination region Y (SRY)* บนโครโมโซม Y การตรวจยีนเหล่านี้ใช้เทคนิค

PCR เพิ่มขยายยีนก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์หาขนาดท่อนยีนด้วย capillary electrophoresis โดยใช้เครื่องมือและซอฟต์แวร์จำเพาะ เช่น Fragment Analyzer หรือ Genetic Analyzer<sup>(13,14,15,16)</sup> มีรายงานการใช้เทคนิค multiplex PCR ในการเพิ่มขยายยีน *SRY* โดยมีคูไพรเมอร์ยีน *Alastin GTPase1 (ATL1)* บนโครโมโซม 14 เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control)<sup>(17)</sup>

ห้องปฏิบัติการกองการแพทย์จีโนมิกส์และสนับสนุนนวัตกรรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ใช้การตรวจจีโนมที่เป็ผลด้วยวิธี PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ยีน *Chromodomain Y-linked 1 (CDY-1)* บนโครโมโซม Y และคูไพรเมอร์ *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1)* บนโครโมโซม X แบบแยกหลอด ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับถ่ายทอดจากความร่วมมือกับ RIKEN Center for Integrative Medical Sciences ประเทศญี่ปุ่น (Mushiroda T. ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่) สามารถระบุการสลับระหว่างตัวอย่างต่างเพศกัน หรือมีการสลับตัวอย่างจำนวนมาก แต่ไม่สามารถระบุการสลับตัวอย่างระหว่างดีเอ็นเอจากเพศเดียวกัน วิธีการทำ PCR เป็นแบบแยกยีนคนละหลอด และอ่านผลด้วยการทำ agarose gel electrophoresis เป็นข้อจำกัดในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีตรวจจีโนมที่รวดเร็วด้วยเทคนิค duplex-PCR และ real-time PCR เพื่อลดการใช้ทรัพยากรและเวลา สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมาก สำหรับใช้ตรวจเพศของตัวอย่างดีเอ็นเอก่อนการตรวจวิเคราะห์อื่น ๆ ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

## วัสดุและวิธีการ

### การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

เลือกยีน *TIMP-1* บนโครโมโซม X และยีน *CDY-1* บนโครโมโซม Y เป็นเป้าหมายในการพัฒนาการตรวจจีโนมที่เป็ผล โดยตรวจสอบลำดับเบสและปรับเลือกลำดับเบสของไพรเมอร์ให้อยู่ในบริเวณที่ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอ้างอิงลำดับเบสจากฐานข้อมูล ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); *TIMP-1* reference ID: NG\_012533 และ *CDY-1* reference ID: G\_011754) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบส ขนาด ตำแหน่ง และ melting temperature ( $T_m$ ) ของไพรเมอร์ และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์

| Primer Name     | Sequence (5' to 3')                    | Length (bp) | Postion*  | $T_m^{**}$ (°C) | PCR product size (bp) |
|-----------------|----------------------------------------|-------------|-----------|-----------------|-----------------------|
| <i>TIMP-1_F</i> | AGT TTC TCA TTG CTG GTG AGG CAC CGT CC | 29          | 8027-8055 | 73.20           | 817                   |
| <i>TIMP-1_R</i> | AGC CAT CAG GGA ACA GGC TTG GAC TAG CC | 29          | 8843-8815 | 67.23           |                       |
| <i>CDY-1_F</i>  | GCA CAA ACG CTT CAG AGA C              | 19          | 7422-7440 | 53.96           | 817                   |
| <i>CDY-1_R</i>  | CCT AAA TCT GCA CAT TCC AC             | 20          | 7708-7689 | 50.98           |                       |

\*อ้างอิงตำแหน่งจาก *TIMP-1* reference ID: NG\_012533 และ *CDY-1* reference ID: NG\_011754)

\*\* คำนวณด้วยวิธี Nearest Neighbor โดย Oligonucleotide Properties Calculator<sup>(18)</sup>

### Duplex PCR

การเพิ่มขยายยีน *TIMP-1* และ *CDY-1* ใช้คูไพรเมอร์ของทั้งสองยีนในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน (duplex PCR) โดยในน้ำยาปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ในบัฟเฟอร์สำเร็จรูป (KAPA 2G Fast Multiplex Mix Kit, Wilmington, Massachusetts, USA) ที่มี 200 nM

ของแต่ละไพรเมอร์ และตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร (5–50 นาโนกรัม) ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (ABI 9700, GeneAmp PCR system, Forster, USA) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส (°C) นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ที่ 95°C นาน 10 วินาที ที่ 60°C นาน 15 วินาที และที่ 72°C นาน 15 วินาที ตรวจผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 817 bp ของยีน *TIMP-1* และขนาด 287-bp ของยีน *CDY-1* โดยการเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs Inc., Massachusetts, USA) ใน 1.5% agarose ภายหลังการทำ electrophoresis

### real-time PCR

ทำในปริมาตรรวม 5 ไมโครลิตร โดยใช้รีเอเจนต์ real-time PCR ที่มีเอ็นไซม์ DNA polymerase และสารเรืองแสงชนิด SYBR ในบัฟเฟอร์ (KAPA SYBR Fast qPCR, Massachusetts, USA) และใช้ 200 nM ของไพรเมอร์แต่ละเส้น โดยทำเป็นแบบแยกหลอดคู่ไพรเมอร์ของยีน *TIMP-1* และ *CDY-1* และแบบรวมหลอดของไพรเมอร์ทั้งสองคู่ (duplex real-time PCR) ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร (2.5–50 นาโนกรัม) ใส่ในเครื่อง real-time PCR (ABI 7900 HT real-time, Forster City, USA) ตั้งการทำงานที่อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที ตามด้วย 35 รอบ ที่ 95°C นาน 5 วินาที และที่ 60°C นาน 45 วินาที จากนั้นทำ melting curve analysis โดยตั้งอุณหภูมิที่ 95°C นาน 15 วินาที และ 60°C นาน 15 นาที ก่อนเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ (2% ramp rate) ไปที่ 95°C นาน 15 วินาที วิเคราะห์ผลด้วย 7900 HT Sequence Detection System software v2.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 817 bp ของยีน *TIMP-1* และขนาด 287-bp ของยีน *CDY-1* โดยการทำ electrophoresis เช่นเดียวกับวิธี PCR

### การหาลำดับเบส

นำผลผลิตพีซีอาร์ไม่จำเพาะ (non-specific product) ซึ่งเกิดขึ้นในหลอดปฏิกิริยาชุดไพรเมอร์ *CDY-1* กับตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง ขนาดประมาณ 450-bp มาหาลำดับเบส โดยย่อยทำลายไพรเมอร์ *CDY-1* และ dNTP ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยเอ็นไซม์ Exonuclease I และ Alkaline phosphatase ตามคู่มือของรีเอเจนต์ ExoProStar (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England) จากนั้นนำ 1 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยาแบบ dideoxy chain termination ด้วย *CDY-1* forward primer หรือ *CDY-1* reverse primer แบบแยกหลอดปฏิกิริยา โดยใช้รีเอเจนต์ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) หลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดรีเอเจนต์ D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit (NimaGenBV, Nimagen, NL) จึงนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง 3500XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

### การทดสอบประสิทธิภาพวิธีการตรวจ

เปรียบเทียบวิธีตรวจจีโนมที่พัฒนาขึ้นกับข้อมูลเพศของอาสาสมัครที่บันทึกไว้ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 377 ตัวอย่าง ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดอาสาสมัครโครงการวิจัยเพื่อหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดจอประสาทตาเสื่อมในผู้สูงอายุ<sup>(19)</sup> ที่ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยโรงพยาบาลราชวิถี เลขที่ 001/2556 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายจำนวน 180 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอเพศหญิง 197 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจคุณภาพ (A260/A280 ratio) และปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Germany)

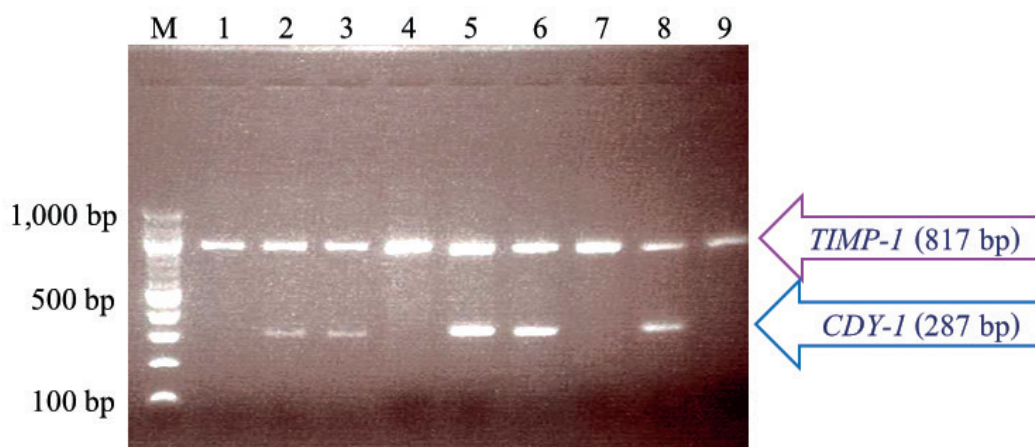
### การทดสอบความไวของการตรวจการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอ

ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย (20 ng/ul) ลงในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง (20 ng/ul) เพื่อเตรียมเป็น ดีเอ็นเอผสม (M-DNA/F-DNA) ที่อัตราส่วน 1/5 โดยผสมดีเอ็นเอเพศชาย 1 ส่วนผสมกับดีเอ็นเอเพศหญิง 4 ส่วน จากนั้นเจือจาง 5 เท่าด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงต่อไปอีก 4 หลอด ได้ดีเอ็นเอผสมที่มีอัตราส่วน M-DNA/F-DNA เท่ากับ 1/25, 1/125, 1/625 และ 1/1,325 ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอผสมทั้ง 5 หลอด และดีเอ็นเอเพศชายและเพศหญิงจากหลอดที่ไม่มีการผสม โดยวิธี real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์ *CDY-1*

### ผล

#### Duplex PCR

การผสมคูไพรเมอร์ของยีน *TIMP-1* และ *CDY-1* ลงในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน โดยปรับอุณหภูมิ annealing temperature ให้คูไพรเมอร์ทั้งสองจับกับยีนเป้าหมาย พบว่าที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการเพิ่มขยายยีน สามารถเห็นผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 817 bp สำหรับยีน *TIMP-1* และขนาด 287 bp สำหรับยีน *CDY-1* ได้ชัดเจนภายหลังการทำ gel electrophoresis โดยตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายพบผลผลิตทั้งสองขนาด ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงพบเฉพาะผลผลิตขนาด 817 bp ดังแสดงในภาพที่ 1

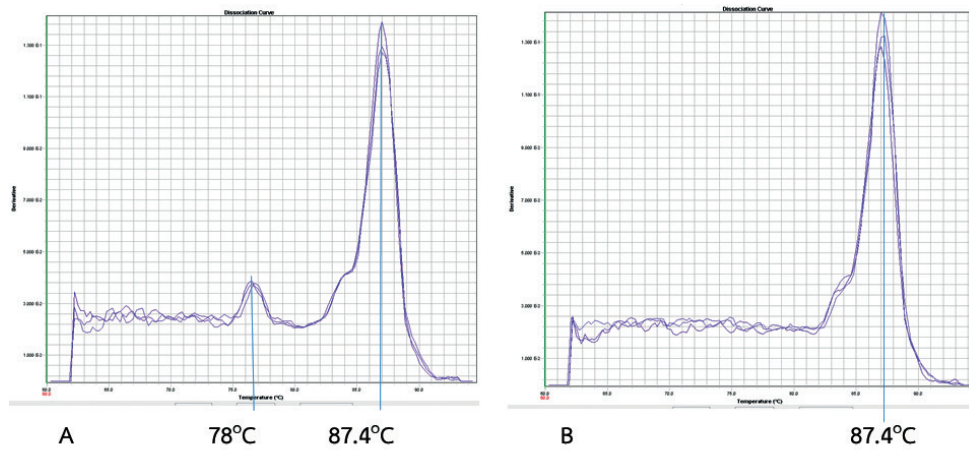


ภาพที่ 1 gel electrophoresis ผลการตรวจจีโนทัยป์เพศด้วยวิธี duplex PCR แสดงผลผลิตพีซีอาร์ด้วยคูไพรเมอร์ *TIMP-1* มีขนาด 817 bp และจากคูไพรเมอร์ *CDY-1* มีขนาด 287 bp Lane M: DNA Ladder, ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงใน Lane 1, 4, 7 และ 9 ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย ใน Lane 2, 3, 5, 6 และ 8

#### real-time PCR

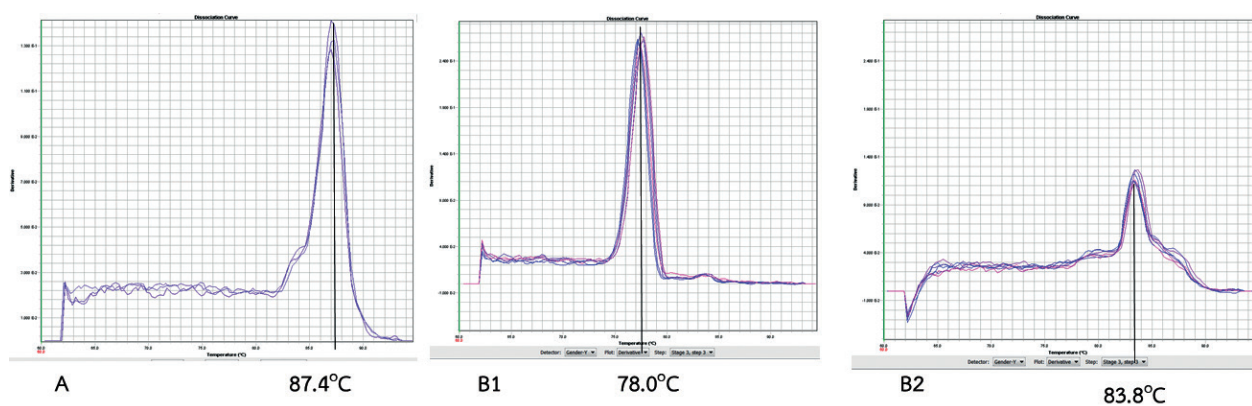
ในการทำ real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์ที่ออกแบบ พบว่าสามารถใช้อุณหภูมิตามคำแนะนำในคู่มือ น้ำยาและเครื่องตั้งรายละเอียดที่แสดงในวัสดุและวิธีการ การทดลองทำ duplex real-time PCR โดยใส่ไพรเมอร์ของทั้งสองยีนในหลอดเดียวกัน และอ่านค่า melting temperature ( $T_m$ ) จากการทำ melting curve analysis ผลตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายพบผลผลิตจากคูไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด คือ *TIMP-1* มี  $T_m = 87.4^\circ\text{C}$  และ *CDY-1* มี  $T_m = 78.0^\circ\text{C}$  โดยผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *TIMP-1* มีความสูงของพีคมากกว่าผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *CDY-1* อย่างมาก ดังแสดงในภาพที่ 2A ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงพบเฉพาะผลผลิตคูไพรเมอร์ *TIMP-1* ที่มี  $T_m = 87.4^\circ\text{C}$  เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 2B



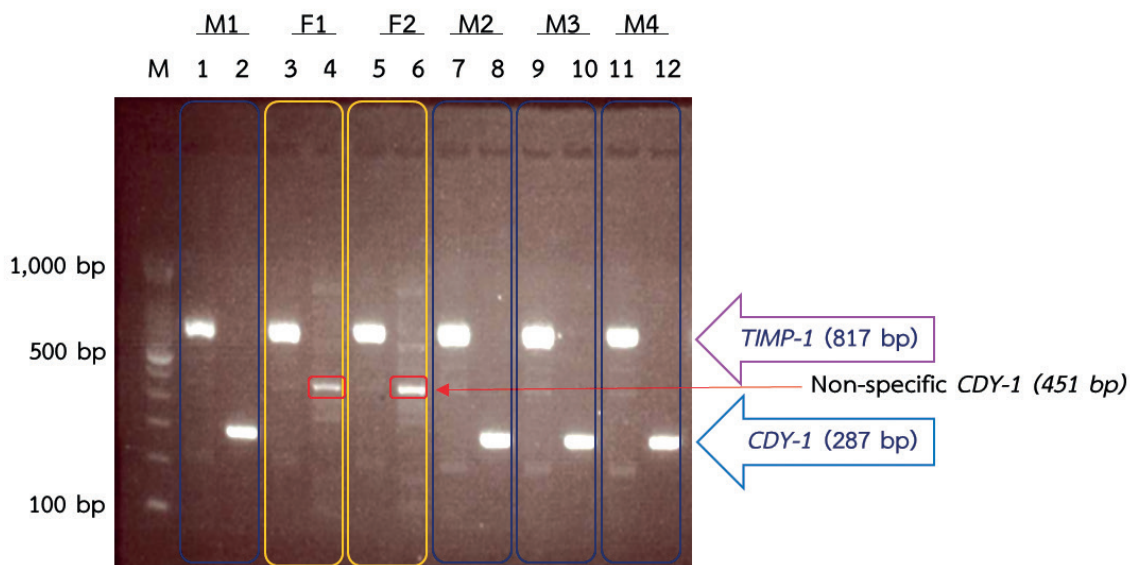


ภาพที่ 2 melting curve analysis ผล duplex real-time PCR แสดง  $T_m$  ของผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายมีผลผลิตยีน *CDY-1* ที่มี  $T_m = 78.0^\circ\text{C}$  และ *TIMP-1* ที่มี  $T_m = 87.4^\circ\text{C}$  (A) ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงมีผลผลิตยีน *TIMP-1* ที่มี  $T_m = 87.4^\circ\text{C}$  (B)

ในการทดลองแบบแยกหลอดปฏิกิริยา พบว่าไพรเมอร์ *TIMP-1* ให้ผลผลิตที่มี  $T_m = 87.4^\circ\text{C}$  ทั้งในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงและเพศชาย โดยมีค่าจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณ (Cycle threshold: Ct) ประมาณ 17-20 ส่วนไพรเมอร์ *CDY-1* นอกจากให้ผลผลิตที่มี  $T_m = 78.0^\circ\text{C}$  มีค่า Ct ประมาณ 18-20 ในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายแล้ว ยังพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงให้ผลผลิตที่มี  $T_m = 83.8^\circ\text{C}$  โดยมีค่า Ct สูงกว่าดีเอ็นเอเพศชาย (Ct ประมาณ 26-28) ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อนำผลผลิต real-time PCR ไปทำ gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายให้ผลผลิตขนาด 817 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *TIMP-1* และขนาด 287 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *CDY-1* ส่วนตัวอย่างเพศหญิงนอกจากให้ผลผลิตขนาด 817 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *TIMP-1* แล้ว ยังให้ผลผลิตไม่จำเพาะขนาดประมาณ 450 bp ในหลอดปฏิกิริยาที่มีไพรเมอร์ *CDY-1* ด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 Melting curve analysis ของผลผลิตพีซีอาร์จากการทำ real-time PCR โดยแยกไพรเมอร์ *TIMP-1* และ *CDY-1* คนละหลอดปฏิกิริยา โดยผลผลิตยีน *TIMP-1* พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายและหญิง มี  $T_m = 87.4^\circ\text{C}$  (A) ผลผลิตยีน *CDY-1* พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย มี  $T_m = 78.0^\circ\text{C}$  (B1) และผลผลิตยีน *CDY-1* พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง มี  $T_m = 83.8^\circ\text{C}$  (B2)



ภาพที่ 4 gel electrophoresis ผลผลิตพีซีอาร์จากการตรวจจีโนทัยป์เพศด้วย real-time PCR แบบแยกคู่ไพรเมอร์ *TIMP-1* และ *CDY-1* คนละหลอดปฏิกิริยา Lane M: DNA ladder ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย M1, M2, M3 และ M4 ใน Lane 1 & 2, 7 & 8, 9 & 10 และ 11 & 12 ตามลำดับ และตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง F1 และ F2 ใน Lane 3 & 4 และ 5 & 6 ตามลำดับ

จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้เทคนิค real-time PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* สามารถตรวจจีโนทัยป์เพศชายและเพศหญิงได้โดยการวิเคราะห์ค่า  $T_m$  กล่าวคือ ตัวอย่างที่มี  $T_m = 78^\circ\text{C}$  เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย ส่วนตัวอย่างที่มีค่า  $T_m = 83.8^\circ\text{C}$  เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง วิธีนี้ใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว อ่านผลได้ง่าย เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย จึงเลือกวิธีการนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

#### การหาลำดับเบส

การหาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ไม่จำเพาะขนาดประมาณ 450 bp ของตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงที่เกิดขึ้นในหลอดปฏิกิริยาที่มีคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* นำไปเทียบความเหมือน (blast search) กับฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่ามีลำดับเบสที่อยู่ระหว่างคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ขนาด 412 bp ตรงกับดีเอ็นเอที่แปลรหัสได้เป็นโปรตีน APCDD1-like precursor บนโครโมโซมคู่ที่ 20 (Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary Assembly Sequence ID: NC\_000020.11 Length: 64444167) โดยมีความเหมือนกันร้อยละ 99.76 (411/412 bp) ลำดับเบสของชิ้นส่วนนี้ที่มีความยาวรวม 451 bp พร้อมตำแหน่งที่จับกับไพรเมอร์ *CDY-1\_F* และ *CDY-1\_R* ดังแสดงในภาพที่ 5

#### ความไวของวิธีการ real-time PCR ในการตรวจการปนเปื้อนระหว่างดีเอ็นเอเพศหญิงและเพศชาย

การทดสอบความไวในการตรวจการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายและหญิงของวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* พบว่าตัวอย่าง M-DNA/F-DNA ที่ 1/5 พบผลผลิตที่มี  $T_m = 78^\circ\text{C}$  เท่านั้น และที่ 1/25 พบผลผลิต 2 ชนิด ที่มี  $T_m = 78^\circ\text{C}$  และ  $87.4^\circ\text{C}$  โดยพีคของผลผลิต  $T_m$  ที่  $87.4^\circ\text{C}$  ค่อนข้างต่ำมาก และค่อยๆ มีความสูงเพิ่มขึ้น ในขณะที่พีคของผลผลิตที่  $T_m = 78^\circ\text{C}$  ค่อยๆ ลดลงในหลอด M-DNA/F-DNA ที่ 1/125 และ 1/625 ส่วนที่ 1/1,325 พบเฉพาะผลผลิตที่  $T_m = 87^\circ\text{C}$  เท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 6

**Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary Assembly**Sequence ID: **NC\_000020.11** Length: **64444167** Number of Matches: **1**Range 1: **58479826 to 58480276** [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect | Identities   | Gaps      | Strand    |
|---------------|--------|--------------|-----------|-----------|
| 810 bits(897) | 0.0    | 450/451(99%) | 0/451(0%) | Plus/Plus |

**Features:** [protein APCDD1-like isoform 1 precursor](#)[protein APCDD1-like isoform 2](#)

|       |          |                                                               |          |
|-------|----------|---------------------------------------------------------------|----------|
|       |          | <b>GCACAAACGCTTCAGAGAC</b>                                    |          |
| Query | 1        | GCCATTAAGCTTCAGAGACCGGCTGTGGAAATGGAGCCATTCCAGCACTGCTGCAGCCAA  | 60       |
| Sbjct | 58479826 | GCCATTAAGCTTCAGAGACCGGCTGTGGAAATGGAGCCATTCCAGCACTGCTGCAGCCAA  | 58479885 |
| Query | 61       | AGATGTACTTTCCAATGAAGTCACTGCACAAAAGGCATGCAGGGTTTGCACCAGAACACC  | 120      |
| Sbjct | 58479886 | AGATGTACTTTCCAATGAAGTCACTGCACAAAAGGCATGCAGGGTTTGCACCAGAACACC  | 58479945 |
| Query | 121      | CCCAGAAGGCTGCAGATTGGATGCTATGACTGGATGCTGCATCAACAAACACAGAAATAT  | 180      |
| Sbjct | 58479946 | CCCAGAAGGCTGCAGATTGGATGCTATGACTGGATGCTGCATCAACAAACACAGAAATAT  | 58480005 |
| Query | 181      | GAAGACACACTTTGCATTCTAAGAAGCCACCTCCAACCTCTGGTGTGAATGGCTGGTCC   | 240      |
| Sbjct | 58480006 | GAAGACACACTTTGCATTCTAAGAAGCCACCTCCAACCTCTGGTGTGAATGGCTGGTCC   | 58480065 |
| Query | 241      | TCAGATACCTCACATGTCTCTCATTTGGCTATAATGGAATCTCCTCATCCACCTAATCCG  | 300      |
| Sbjct | 58480066 | TCAGATACCTCACATGTCTCTCATTTGGCTATAATGGAATCTCCTCATCCACCTAATCCG  | 58480125 |
| Query | 301      | AGAATCTTCGTGTTTCAGGGCTGGCAGGCAAGTTGGGGAATGGGTTGGACTTTGCTACCTT | 360      |
| Sbjct | 58480126 | AGAATCTTCGTGTTTCAGGGCTGGCAGGCAAGTTGGGGAATGGGTTGGACTTTGCTACCTT | 58480185 |
| Query | 361      | GGGAAACACAGAAATGATATGCTCTAAACAAAGCACCTCCACCCGCCGAGCCTTCAGC    | 420      |
| Sbjct | 58480186 | GGGAAACACAGAAATGATATGCTCTAAACAAAGCACCTCCACCCGCCGAGCCTTCAGC    | 58480245 |
| Query | 421      | ATCCCAGCCCTGTGGAATGTGCCCTCCTCTG                               | 451      |
| Sbjct | 58480246 | ATCCCAGCCCTGTGGAATGTGCCCTCCTCTG                               | 58480276 |
|       |          | <b>CACCTTACACGCTCTAAATCC</b>                                  |          |

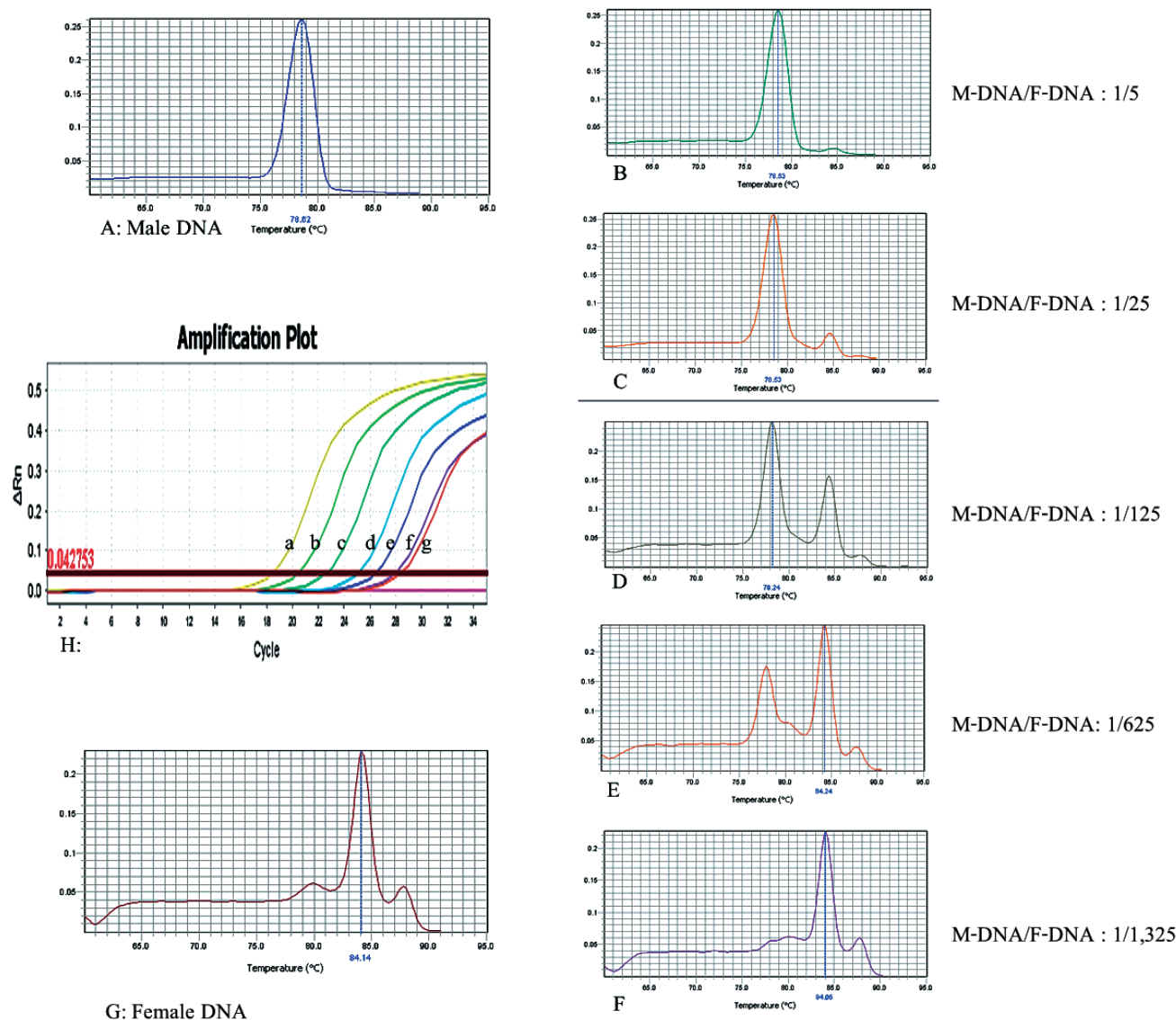
ภาพที่ 5 ลำดับเบสของผลผลิตขนาด 451 bp จากไพรเมอร์ *CDY-1* จากตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงเมื่อเทียบกับลำดับเบสอ้างอิง APCDD1-like precursor บนโครโมโซมคู่ที่ 20 (Homo sapiens chromosome 20, GRCh38.p12 Primary Assembly Sequence ID: NC\_000020.11 Length: 64444167) ลำดับเบสระหว่างไพรเมอร์มีความเหมือนกัน ร้อยละ 99.76 (411/412 bp)

หมายเหตุ: ลูกศรไปและกลับแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ *CDY-1\_F* และ *CDY-1\_R* ตามลำดับ

**การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการ real-time PCR ด้วยไพรเมอร์ *CDY-1***

ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอในโครงการวิจัยเพื่อหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดจอประสาทตาเสื่อมในผู้สูงอายุจำนวน 377 ตัวอย่าง ผลจีโนทัยป์เพศพบเป็นดีเอ็นเอเพศชายจำนวน 180 ตัวอย่าง และเป็นดีเอ็นเอเพศหญิง 197 ตัวอย่าง ตรงกับข้อมูลเพศของอาสาสมัครที่บันทึกไว้ร้อยละ 100





ภาพที่ 6 ผล real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีการผสมระหว่างดีเอ็นเอเพศชาย (M-DNA) และดีเอ็นเอเพศหญิง (F-DNA) แสดง amplification plot (H) ของ M-DNA (a), ส่วนผสมระหว่าง M-DNA/F-DNA ในอัตราส่วน 1/5 (b), 1/25 (c), 1/125 (d), 1/615 (e), 1/1326 (f) และของ F-DNA (g) พร้อม melting curve analysis ของ M-DNA (A) และ F-DNA (G) และ melting curve analysis ของ M-DNA/F-DNA ที่อัตราส่วนต่างๆ ดังกล่าว ดังรูป B C D E และ F ตามลำดับ

## วิจารณ์

การตรวจสอบจีโนทัยป์เพศในตัวอย่างดีเอ็นเอโดยวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่สิ้นเปลืองแรงงานและทรัพยากร โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดียวในปฏิกิริยาปฏิกิริยารวมเพียง 5 ไมโครลิตร และการวิเคราะห์ค่า  $T_m$  ที่แตกต่างกันระหว่างดีเอ็นเอเพศชายและเพศหญิง โดยดีเอ็นเอเพศชายมีค่า  $T_m = 78^\circ\text{C}$  ส่วนดีเอ็นเอเพศหญิงมีค่า  $T_m = 83.8^\circ\text{C}$  เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ตรวจจีโนทัยป์เพศตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถตรวจสอบจีโนทัยป์เพศของตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนมากถึง 384 ตัวอย่างต่อรอบ ในกรณีที่ใช้เครื่อง real-time PCR ที่สามารถใช้กับ 384-well plate ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ 384-well plate

และ 96-well plate กับเครื่องรุ่นอื่น (QuantStudio6, Thermo-Fisher, USA) และเครื่องรุ่นที่ใช้ได้เฉพาะ 96-well plate (QuantStudio5, Thermo-Fisher, USA) พบว่าให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในการนำเทคนิคนี้ไปใช้กับน้ำยา หรือเครื่อง real-time PCR รุ่นอื่นหรือยี่ห้ออื่น อาจมีค่า  $T_m$  ที่เปลี่ยนแปลงไปจากค่านี้ จึงควรทดสอบอุณหภูมิการทำปฏิกิริยาและค่า  $T_m$  ก่อนนำไปใช้งาน

ในการทำ real-time PCR แบบแยกคู่ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ *TIMP-1* ให้ผลผลิตที่มี  $T_m = 87^\circ\text{C}$  ทั้งในดีเอ็นเอเพศหญิงและเพศชาย โดยมี  $C_t$  ประมาณ 17-20 ในช่วงความเข้มข้นดีเอ็นเอ 2.5-50 ng/ $\mu\text{l}$  ส่วนคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* สามารถเข้าจับกับเป้าหมายบนโครโมโซม-Y ในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายได้อย่างจำเพาะ เกิดผลผลิตที่มี  $T_m = 78^\circ\text{C}$  และมีค่า  $C_t$  ประมาณ 18-20 ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงมี non-specific product ขนาด 451 bp จากยีน *protein APCDD1-like precursor* เกิดขึ้นที่  $C_t$  ประมาณ 26-28 ซึ่งช้ากว่าผลผลิตจำเพาะที่พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชายประมาณ 8-10 รอบ การวิเคราะห์ลำดับเบสส่วนปลายของท่อนผลิตผลพีซีอาร์ที่คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* เข้าจับ พบว่ามีความเข้าคู่กัน (complementary) ที่ปลายด้าน 3' ยาวติดต่อกัน 11 bp (ร้อยละ 58 ของความยาวไพรเมอร์) สำหรับ *CDY-1* Forward primer และ 13 bp (ร้อยละ 55 ของความยาวไพรเมอร์) สำหรับ *CDY-1* Reverse primer การที่ไพรเมอร์มีส่วนปลาย 5' ไม่เหมือนเป้าหมายแต่มีส่วนปลาย 3' มีความเหมือนมากกว่าร้อยละ 50 ของความยาวไพรเมอร์ทั้งหมดนี้ทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับยีนดังกล่าวได้ มีการประยุกต์ใช้ออกแบบไพรเมอร์ชนิด 5' tagging portion และ 3' specific portion เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจ การต่อตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme recognition site) หรือการต่อบาร์โค้ดเพื่อรวมหลายตัวอย่างการหาลำดับเบสในระบบ next generation sequencing<sup>(20,21,22)</sup> สภาวะการทำปฏิกิริยาที่มีองค์ประกอบของน้ำยาและอุณหภูมิที่ใช้และค่อยๆ เกิดผลผลิตสะสมจนตรวจวัดได้เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาไปมากกว่า 25 รอบ ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* เข้าจับกับเป้าหมายจำเพาะบนโครโมโซม-Y ได้อย่างสมบูรณ์และเกิดผลผลิตพีซีอาร์ได้ชัดเจนไม่เกิด non-specific product คุณลักษณะการเกิด non-specific product แบบล่าช้านี้พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงทุกตัวอย่าง และไม่พบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศชาย ทำให้สามารถใช้เฉพาะคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ในการตรวจจีโนทัยป์เพศชายและหญิงได้ นอกจากนี้การพบผลผลิต  $T_m$  ที่  $83.8^\circ\text{C}$  และ  $C_t$  ประมาณ 26-28 รอบในตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิง สามารถใช้เป็นการควบคุมภายใน (internal control) ที่แสดงว่าองค์ประกอบการทำปฏิกิริยามีความปกติตั้งแต่การเตรียมน้ำยา การเติมดีเอ็นเอ และการทำงานของเครื่อง real-time PCR

วิธี duplex PCR เพื่อตรวจจีโนทัยป์เพคเป็นวิธีที่ต้องการเพียงเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้งานในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล การใส่คู่ไพรเมอร์ของยีน *CDY-1* และ *TIMP-1* ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาทำให้สะดวกมากขึ้นกว่าวิธีเดิมที่เคยทำแบบแยกหลอดปฏิกิริยาของแต่ละยีน อีกทั้งยังช่วยประกันผลการตรวจกรณีที่คู่ไพรเมอร์ *CDY-1* ให้ผลลบลว่าเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอเพศหญิงจริง เพราะยังคงเห็นผลผลิตจากคู่ไพรเมอร์ *TIMP-1* ขนาด 817 bp ไม่ได้เกิดจากความผิดปกติในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ อย่างไรก็ตามขั้นตอนการทำ gel electrophoresis ก็ยังคงเป็นข้อจำกัดในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ต้องมีการอ่าน บันทึก และลงผลในตารางด้วยมือ จึงเหมาะสำหรับงานวิจัยที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอไม่มาก

วิธีการตรวจจีโนทัยป์เพคด้วยที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถประยุกต์ใช้งานการตรวจทางวิทยาศาสตร์การกีฬา หรือตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จากตัวอย่างที่ไม่เสียหายมาก เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* มีขนาด 287 bp หรือ 451 bp และ *TIMP-1* มีขนาด 817 bp ซึ่งค่อนข้างใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ที่มีขนาดเล็กกว่า 100 bp<sup>(9)</sup>

## สรุป

การตรวจจีโนไทป์เพศด้วยวิธี real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ *CDY-1* สามารถใช้ระบุเพศของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ก่อนการนำไปตรวจด้วยวิธีวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยประกันความถูกต้องของตัวอย่างดีเอ็นเอและความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัย การพัฒนาต่อยอดให้เป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดปริมาณ (quantitative method) จะช่วยให้การนำวิธีนี้ไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Teisei Mushiroda หัวหน้าทีมวิจัยเภสัชพันธุศาสตร์ จาก RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama ประเทศญี่ปุ่น ในการให้คำปรึกษาแนะนำในที่ใช้ตรวจเพศ

## เอกสารอ้างอิง

1. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
2. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995; 18: 62-3.
3. Armbrecht M, Gloe J, Goemann W. Determination of nucleic acid concentrations using fluorescent dyes in the Eppendorf BioSpectrometer<sup>®</sup> fluorescence. In: Eppendorf application note 271. Hamburg, Germany: Eppendorf AG.; 2013. p.1-10.
4. Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem* 1999; 276: 59-64.
5. Piovesan A, Pelleri MC, Antonaros F, Strippoli P, Caracausi M, Vitale Lorenza, et al. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes* 2019; 12: 106. (7 pages).
6. Turner S, Armstrong LL, Bradford Y, Carlson CS, Crawford DC, Crenshaw AT, et al. Quality control procedures for genome-wide association studies. *Curr Protoc Hum Genet* 2011; 68: 1.19.1-18.
7. Tischfield JA, DiCola M, Van Hummelen P, Wang Q, Brooks AI. High-throughput DNA quality control: allelic discrimination panel for determining sample contamination, gender and ethnicity in a biorepository setting. Hawaii, USA: American Society of Human Genetics; 2009.
8. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 179-92.
9. Boonyarit H, Mahasirimongkol S, Chavavechakul N, Aoki M, Amitani H, Hosono N, et al. Development of a SNP set for human identification: a set with high powers of discrimination which yields high genetic information from naturally degraded DNA samples in the Thai population. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 11: 166-73.
10. Simpson JL, Ljungqvist A, de la Chapelle A, Ferguson-Smith MA, Genel M, Carlson AS, et al. Gender verification in competitive sports. *Sports Med* 1993; 16: 305-15.

11. Mannucci A, Sullivan KM, Ivanov PL, Gill P. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int J Legal Med* 1994; 106: 190-3.
12. Aasen E, Medrano JF. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Nat Biotechnol.* 1990; 8: 1279-81.
13. Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, Hammer MF. A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *Forensic Sci Int* 2002; 129: 10-24.
14. Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, et al. Identification and characterization of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: e8. (5 pages).
15. Gilson A, Syvanen M, Levine K, Banks J. Deer gender determination by polymerase chain reaction: validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Calif Fish Game* 1998; 84: 159-69.
16. Kupfer DM, Jenkins M, Burian D, Canfield DV. Use of alternative primers for gender discrimination in human forensic genotyping. [online]. 2008; [cited 2020 Jul 7]; [14 screens]. Available from: URL: [https://www.faa.gov/data\\_research/research/med\\_humanfacs/oamtechreports/2000s/media/200808.pdf](https://www.faa.gov/data_research/research/med_humanfacs/oamtechreports/2000s/media/200808.pdf).
17. Osman J, Murad NAA, Chin SF, Jamal R. Highly sensitive and reliable human sex determination using multiplex PCR. *Asia Pac J Mol Med* 2014; 4: 1-4.
18. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 2007; 35 (Web Server issue): W43-6.
19. Ruamviboonsuk P, Tadarati M, Singhanetr P, Wattanapokayakit S, Kunhapan P, Wanitchanon T, et al. Genome-wide association study of neovascular age-related macular degeneration in the Thai population. *J Hum Genet* 2017; 62: 957-62.
20. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif* 2017; 14: 19-28.
21. Choi SY, Ro H, Yi H. Designing PCR primer for cloning. In: *DNA cloning: a hands-on approach*. Springer Nature B.V; 2019. p. 41-43.
22. Mir K, Neuhaus K, Bossert M, Schober S. Short barcodes for next generation sequencing. *PLoS ONE* 2013; 8: e82933. (8 pages).



---

# Human Gender Genotyping Using real-time PCR with *CDY-1* Primers

---

Nuanjun Wichukchinda<sup>1</sup> Wimala Inunchot<sup>1</sup> Sukanya Wattanapokayakit<sup>1</sup>

Taisei Mushiroda<sup>2</sup> and Surakameth Mahasirimongkol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Division of Genomic Medicine and Innovation Support, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand*

<sup>2</sup>*Laboratory for Pharmacogenomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, 230-0045 Japan*

**ABSTRACT** In genotype-phenotype association study such as disease susceptibility and/or progression and drug responsibility, genomic DNA (gDNA) quantification and qualification are necessary steps prior to genotyping application. An individual DNA sample checking cannot identify miss-handling (labeling or samples mixed-up) which could especially occur from human error at any steps of gDNA preparation. Gender genotyping becomes useful for confirmation with records in participant database, leading to quality of genetic analysis results. We, therefore, developed the gender genotyping method by amplifying *CDY-1* in Y-Chromosome with real-time PCR. Efficiency testing of this method with DNA samples (n = 377) showed 100% concordance with clinical data record of individual participant. This novel gender genotyping method is rapid, inexpensive, and usable to apply for genetic studies with high numbers of samples. Further development on quantitation of the amount of DNA will possibly fulfill utilization of our developed method.

**Keywords:** gender genotyping, human gDNA, real-time PCR