การศึกษาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม

นางสาวศิริลักษณ์ เตชะนรราช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1571-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENOTYPES OF KAPPA-CASEIN IN DAIRY SIRES IN DIVISION OF ARTIFICIAL INSEMINATION

Miss Sirilux Techanoraraj

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Animal Breeding
Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-1571-4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม
โดย	นางสาวศิริลักษณ์ เตชะนรราช
ภาควิชา	สัตวบาล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.วิวัฒน์ ชวนะนิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ สพ.ญ.ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวศิริลักษณ์ เตชะนรรราช : การศึกษาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนม ของกองผสมเทียม. (GENOTYPES OF KAPPA-CASEIN IN DAIRY SIRES IN DIVISION OF ARTIFICIAL INSEMINATION. อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ. 63 หน้า. ISBN 974-17-1571-4.

การศึกษาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน ที่ควบคุมปริมาณแคปปา-เคซีนที่ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในน้ำนม ในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์จำนวน 60 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ Holstein-Friesian จำนวน 15 ตัว และกลุ่มพ่อโคลูกผสมที่มีสายเลือดของพันธุ์ Holstein-Friesian ในระดับเลือด 75 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป จำนวน 45 ตัว โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) พบยีนแคปปา-เคซีนทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ A, B และ E ความถี่ของอัลลีลเป็น 0.6, 0.33 และ 0.07 ตามลำดับ ในกลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ และ 0.74, 0.17 และ 0.09 ตามลำดับ ในกลุ่มพ่อโคลูกผสม และพบลักษณะจีโนไทป์ทั้งสิ้น 5 แบบ ได้แก่ AA, AB, BB, AE และ BE ความถี่จีโนไทป์เป็น 0.34, 0.4, 0.13, 0.13 และ 0 ตามลำดับ ในกลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ และ 0.56, 0.27, 0, 0.11 และ 0.06 ตามลำดับ ในกลุ่มพ่อโคลูกผสม เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ในพ่อโคแต่ละกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติระหว่างพ่อโคทั้ง 2 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าความถี่ของอัลลีล A, B และ E และความถี่จีโนไทป์ AA, AB, BB, AE และ BE ในกลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ไม่ต่างกับกลุ่มพ่อโคลูกผสม ทั้งนี้อาจเนื่องจากเป้าหมายการปรับปรุงพันธุ์โคนมในกลุ่มที่นำมาศึกษาไม่ได้มุ่งเน้นไปในลักษณะทางด้านโปรตีนในน้ำนมแต่มุ่งเน้นไปที่ปริมาณน้ำนมเป็นหลัก นอกจากนี้การตรวจหาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมด้วยวิธี PCR-RFLP ทำให้ทราบการกระจายตัวของอัลลีลชนิดต่าง ๆ ในฝูงพ่อพันธุ์โคนม และยังอาจใช้จีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนเป็นดัชนีตัวหนึ่งในการคัดเลือกพ่อโคเพื่อปรับปรุงลักษณะทางด้านโปรตีนในน้ำนมได้ในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สัตวบาล ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4275560831 : MAJOR ANIMAL BREEDING

KEY WORD: KAPPA-CASEIN / GENOTYPE / DAIRY SIRES / PCR-RFLP

SIRILUX TECHANORARAJ : GENOTYPES OF KAPPA-CASEIN IN DAIRY SIRES IN DIVISION OF ARTIFICIAL INSEMINATION. THESIS ADVISOR : DUANGSMORN SUWATTANA, Ph.D. THESIS COADVISOR : MEENA SARIKAPUTI, Ph.D. 63 pp. ISBN 974-17-1571-4.

Fifteen purebred (Holstein-Friesian) sires and 45 crossbred (more than 75 percent Holstein-Friesian) sires from Division of Artificial Insemination (AI), Department of Livestock Development were investigated on genotypes of kappa-casein by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Allelic frequencies of A, B and E were 0.6, 0.33 and 0.07 respectively in purebred sires and 0.74, 0.17 and 0.09 respectively in crossbred sires. Genotypic frequencies of AA, AB, BB, AE and BE were 0.34, 0.4, 0.13, 0.13 and 0 respectively in purebred sires and 0.56, 0.27, 0, 0.11 and 0.06 respectively in crossbred sires. There were no differences found when allelic and genotypic frequencies were compared on both purebred and crossbred sires. In conclusion, the proposed method will be a valuable tool for the early selection of AI sires by using kappa-casein genotype as genetic marker. The method is hoped to be integrated into the regular program of sire selection in the future.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Animal Husbandry
Field of study Animal Breeding
Academic year 2002

Student's signature……
Adivisor's signature……...
Co-advisor's signature……..

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้แนวทางแก้ไข ตลอดจนช่วยดูแลการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด และ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.มีนา สาริกะภูติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำ โดยเฉพาะทางด้านวิธีการวิเคราะห์ทางด้านห้องปฏิบัติการ และดูแลการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ ที่ให้คำปรึกษา ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสัตวบาลที่ให้คำแนะนำในการศึกษา ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมในการวิเคราะห์ครั้งนี้ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาล และเจ้าหน้าที่ประจำหน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา ในการอำนวยความสะดวก และช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์และสารเคมี

สุดท้ายขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้อง ๆ ที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจ อย่างดีมาตลอดการศึกษา ตลอดจนผู้เกี่ยวข้องที่ไม่ได้กล่าวถึงในที่นี้ที่ช่วยทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศิริลักษณ์ เตชะนรราช

กุมภาพันธ์ 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญรูป..... ฌ
สารบัญตาราง..... ญ
คำย่อ..... ฏ

บทที่1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
องค์ประกอบของน้ำนม..... 4
โปรตีนในน้ำนม..... 5
ลักษณะโครงสร้างระดับโปรตีนของแคปปา-เคซีน..... 6
ลักษณะโครงสร้างระดับโมเลกุลของยีนแคปปา-เคซีน..... 8
ชนิดของแคปปา-เคซีน..... 9
การกระจายตัวของแคปปา-เคซีน..... 12
ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแคปปา-เคซีนต่อผลผลิตนม..... 14
ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแคปปา-เคซีนต่อการแปรรูปน้ำนม..... 17
วิธีการจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีน 18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่3 วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์..... 21

วิธีการดำเนินงาน..... 21

การหาความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนและความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสม..... 28

บทที่4 ผลการวิเคราะห์

จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน..... 30

ความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน..... 41

ความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน..... 42

บทที่5 สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

วิธีการจำแนกจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน..... 43

ชนิดและจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน..... 44

ความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน..... 45

ความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน..... 46

ข้อเสนอแนะ..... 48

รายการอ้างอิง..... 49

ภาคผนวก..... 54

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 63

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงองค์ประกอบในน้ำนม	4
2	แสดงโครงสร้างของไมเซลล์ (micelles) ในแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ	6
3	โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของแคปปา-เคซีนชนิด A	7
4	ขบวนการตกตะกอนของเคซีน	8
5	ลำดับเบสของยีนแคปปา-เคซีน ชนิด A เฉพาะ exon ที่ 4	10
6	แสดงลำดับเบสที่เปลี่ยนไปที่ตำแหน่งต่าง ๆ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของแคปปา-เคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับแคปปา-เคซีนชนิด A	11
7	แสดงชนิดของกรดอะมิโน (amino acids) ที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งต่าง ๆ แตกต่างกันไปตามชนิดของแคปปา-เคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับแคปปา-เคซีนชนิด A	12
8	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ KCN1F และ KCN 1R ที่จับกับสายดีเอ็นเอ และตำแหน่งของไพรเมอร์ KP1 และ KP2 ที่จับกับสายดีเอ็นเอ	26
9	แผนผังการวิเคราะห์หาชนิดและจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนโดยใช้วิธี PCR-RFLP	27
10	ผลที่ได้หลังจากการแยกด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hin*dIII	31
11	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI	32
12	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII	32
13	แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Hin*fI	33
14	ผลที่ได้หลังจากการแยกด้วยเอนไซม์ *Hae*III	35
15	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III	35
16	แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III	36
17	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II)	38
18	แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II)	38
19	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I	39
20	แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I	40
21	แสดงความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน	41
22	แสดงความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน	42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความแตกต่างขององค์ประกอบในน้ำนมของโคนมสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	5
2	แสดงความถี่ของแคปปา-เคซีนที่พบในโคสายพันธุ์ต่างกัน.....	13
3	แสดงจำนวนพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการศึกษา.....	21
4	แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR amplification)	23
5	แสดงสารประกอบในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR Amplification Mix).....	24
6	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hind*III.....	31
7	จำนวนจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนแบ่งตามกลุ่มจีโนไทป์ AA, AB และ BB.....	34
8	จำนวนอัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A และ B.....	34
9	จำนวนจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนที่ตรวจพบหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III.....	37
10	จำนวนอัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E.....	37
11	ความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E	41
12	ความถี่จีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมที่ทำการวิเคราะห์.....	42
13	จำนวนและความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E.....	46
14	จำนวนและความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน แบบ AA, AB, BB, AE และ BE...	47

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่		
1	แสดงข้อมูลเฉพาะตัวของพ่อพันธุ์โคนมที่นำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีน.....	57
2	แสดงจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์โคนมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-RFLP.....	60

คำย่อ

Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartic acid
Cys	Cysteine
Gln	Glutamine
Glu	Glutamic acid
Gly	Glycine
His	Histidine
Ile	Isoleucine
Leu	Leucine
Lys	Lysine
Met	Methionine
Phe	Phenylalanine
Pro	Proline
Ser	Serine
Thr	Threonine
Trp	Trptophan
Tyr	Tyrosine
Val	Valine
mM	Millimole
ng	nanogram
P	Phosphate Group
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	round per minute
µl	microliter

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เป้าหมายสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์โคนมในประเทศไทย มุ่งเน้นผลิตโคนมที่ให้น้ำนมปริมาณมากและมีคุณภาพดี องค์ประกอบทางเคมีในน้ำนม จะบอกถึงคุณค่าทางโภชนาการของน้ำนม โดยปริมาณของโปรตีนเป็นตัวชี้วัดตัวหนึ่งที่บ่งบอกถึงคุณภาพของน้ำนมที่ผลิตได้ โปรตีนสำคัญที่พบในน้ำนมมี 3 ชนิด ได้แก่ เคซีน แลคโตโกลบูลิน และแลคตัลบูมิน โดย 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด คือ เคซีน ซึ่ง โปรตีนเคซีน ประกอบด้วย เคซีน 4 ชนิด คือ แอลฟาเอส1-เคซีน, แอลฟาเอส2-เคซีน, เบต้า-เคซีน และ แคปปา-เคซีน โดยเคซีนทั้ง 4 ชนิด จะรวมตัวกันอยู่ในรูปของไมเซลล์ (micelles) โดยแคปปา-เคซีนเป็นเคซีนเพียงชนิดเดียวที่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ ซึ่งต่างกับเคซีนอีก 3 ชนิดที่ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ แคปปา-เคซีนเป็นตัวที่ห่อหุ้มเคซีนที่เหลือไว้ ทำให้เคซีนทั้ง 4 ชนิดแขวนลอยอยู่ในน้ำนม นอกจากนี้แคปปา-เคซีนมีความสำคัญในขบวนการแปรรูปน้ำนมเป็นผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตเนยแข็ง (cheese) เนื่องจากปริมาณแคปปา-เคซีน จะมีผลต่อโครงสร้างของไมเซลล์ ถ้าปริมาณแคปปา-เคซีนมากขนาดของไมเซลล์จะยิ่งมีขนาดเล็ก ส่งผลต่อความละเอียดของนมที่ตกตะกอน (curd firmness) และจะทำให้เนื้อเนยแข็งที่ได้เนียน และมีความคงรูปมากขึ้น เนื่องจากมีช่องว่างของเนื้อเนยแข็งน้อยลง นอกจากนี้ ไมเซลล์ที่มีขนาดเล็กยังมีคุณสมบัติในการทนความร้อนมากกว่าไมเซลล์ขนาดใหญ่ ทำให้เคซีนในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วมีปริมาณมากกว่าน้ำนมที่ได้มาจากเคซีนที่มีขนาดไมเซลล์ใหญ่ (FitzGerald, 1997) โดยปริมาณแคปปา-เคซีนเป็นลักษณะทางคุณภาพ (qualitative character) กล่าวคือเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีนเพียงตำแหน่งเดียว (single locus) จากการศึกษาพบว่าชนิดของอัลลีลของยีนแคปปา-เคซีนที่แตกต่างกันจะมีผลต่อปริมาณแคปปา-เคซีนในน้ำนม ซึ่งส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในน้ำนม นอกจากนี้ยังมีบางรายงานที่กล่าวว่ายีนแคปปา-เคซีนส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำนมด้วย (Eenennaam and Medrano, 1991 ; Lin *et al.*, 1989)

จากการพัฒนาเทคโนโลยีทางอณูพันธุศาสตร์ในปัจจุบัน ทำให้สามารถหาชนิดและการกระจายตัวของยีนแคปปา-เคซีนในแต่ละประชากรได้ โดยการหาชนิดของแคปปา-เคซีน หาได้ทั้งจากน้ำนม จากเลือดหรือน้ำเชื้อของโคที่ยังไม่ได้ให้ผลผลิต และเนื่องจากปริมาณแคปปา-เคซีนถูกควบคุมโดยยีนแคปปา-เคซีน จึงสามารถใช้ยีนแคปปา-เคซีน เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม

(genetic marker) ในการปรับปรุงลักษณะทางด้านปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในน้ำนมได้ โดยสามารถคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ได้ตั้งแต่สัตว์อายุยังน้อย หรือที่ยังไม่ได้ให้ผลผลิต ช่วยเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก ทำให้เพิ่มความรวดเร็วในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันมีหลายประเทศ เช่น ประเทศออสเตรีย, สวิสเซอร์แลนด์ และ อิตาลี พิจารณาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในการคัดเลือกตัวสัตว์ เพื่อปรับปรุงลักษณะดังกล่าว (FitzGerald, 1997) และปัจจุบันประเทศไทยการผสมเทียมโคนมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งนั้น เป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวางและได้ผลดี สามารถแพร่กระจายสัตว์พันธุ์ดีสู่ประชากรโคนมได้รวดเร็วขึ้น โดยงานผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์อยู่ในความรับผิดชอบของกลุ่มงานผลิตและวิจัยน้ำเชื้อ กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ เป็นหน่วยงานที่ผลิตน้ำเชื้อ แช่แข็ง (frozen semen) ของพ่อพันธุ์โคนม เพื่อใช้ในงานผสมเทียมทั่วประเทศ ซึ่งพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จะมีทั้งพ่อโคพันธุ์แท้ก็คือ พันธุ์Holstein-Friesian และเป็นพ่อโคลูกผสมระหว่างโคพันธุ์ Holstein-Friesian กับโคพันธุ์พื้นเมือง เช่น พันธุ์Sahiwal, Brahman เป็นต้น จากความแตกต่างของอัลลีลของยีนแคปปา-เคซีนที่ส่งผลต่อปริมาณแคปปา-เคซีน ปริมาณโปรตีน และคุณภาพของโปรตีนที่ส่งผลต่อขบวนการแปรรูปน้ำนม จึงเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีทางด้านอณูพันธุศาสตร์ในการตรวจหาจีโนไทป์ เพื่อให้ทราบถึงชนิดและการกระจายตัวของยีนแคปปา-เคซีน เพื่อใช้ประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์โคนมให้ได้ลักษณะทางด้านที่ต้องการดังกล่าวข้างต้น และเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีทางด้านอณูพันธุศาสตร์ในการคัดเลือกตัวสัตว์ในลักษณะอื่นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาชนิดและจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ที่ผลิตน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม
2. เพื่อตรวจหาการกระจายตัวของชนิดและจีโนไทป์แบบต่าง ๆ ของยีนแคปปา-เคซีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

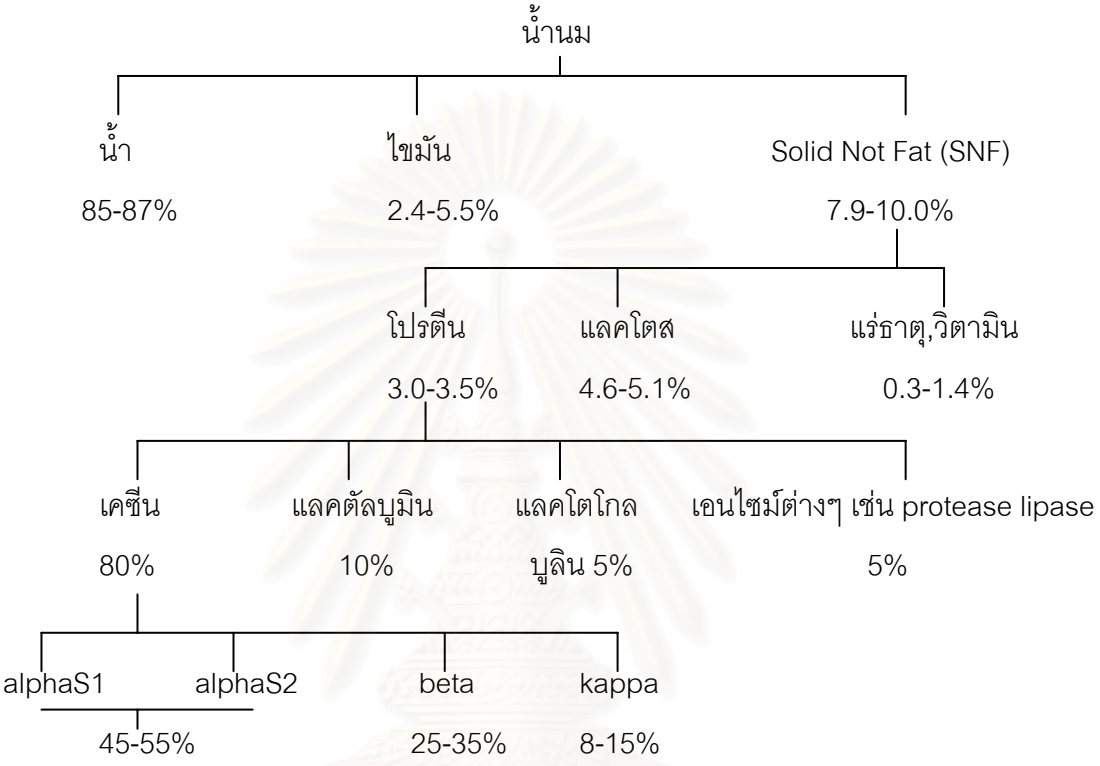
1. ทราบชนิดและความถี่ของจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนของฝูงพ่อพันธุ์โคนมที่ผลิตน้ำเชื้อเพื่อผสมเทียม
2. ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมระดับลึกของแคปปา-เคซีนของฝูงพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงลักษณะพึงประสงค์เฉพาะทางในฝูงโคนมในอนาคต
3. พัฒนาเทคนิคและวิธีการในการตรวจหาชนิดและจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนที่เหมาะสมในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

องค์ประกอบของน้ำนม



รูปที่ 1 แสดงองค์ประกอบในน้ำนม

องค์ประกอบของน้ำนม (**รูปที่** 1) ประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 85-87 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 2.4-5.5 เปอร์เซ็นต์ และในส่วนของของแข็งที่ไม่ใช่ไขมัน (solid not fat, SNF) 7.9-10.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในส่วนนี้จะมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่ระหว่าง 3.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำนมทั้งหมด นอกจากนั้นเป็นแลคโตส และส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น แร่ธาตุ วิตามิน เป็นต้น ส่วนของโปรตีนในน้ำนมประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิดคือ เคซีน (casein) ซึ่งประกอบด้วย แอลฟาเอส-เคซีน (α_s-casein) 45-55 เปอร์เซ็นต์, เบต้า-เคซีน (β-casein) 25-35 เปอร์เซ็นต์ และ แคปปา-เคซีน (κ-casein) 8-15 เปอร์เซ็นต์ ของเคซีนทั้งหมด และส่วนของโปรตีนหางนม ได้แก่ แลคตัลบูมิน (lactalbumin) และแลคโตโกลบูลิน (lactoglobulin) โดยส่วนประกอบของน้ำนมทั้งหมดจะผันแปรไปตามสายพันธุ์ของสัตว์ (**ตารางที่** 1) ฤดูกาล ระยะของการให้น้ำนม (Campo *et al.,* 1999 ; Panaiotova *et al.,* 1997 ; Rincon *et al.,* 1982)

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างขององค์ประกอบในน้ำนมของโคนมสายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์	ปริมาณไขมัน (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	ปริมาณแลคโตส (%)
Holstein	3.7%	3.2%	4.6%
Ayrshire	4.0%	3.3%	4.6%
Jersey	5.1%	3.8%	4.7%
Brown Swiss	4.0%	3.6%	5.0%
Guernsey	5.0%	3.8%	4.9%
Zebu	4.9%	3.9%	5.1%

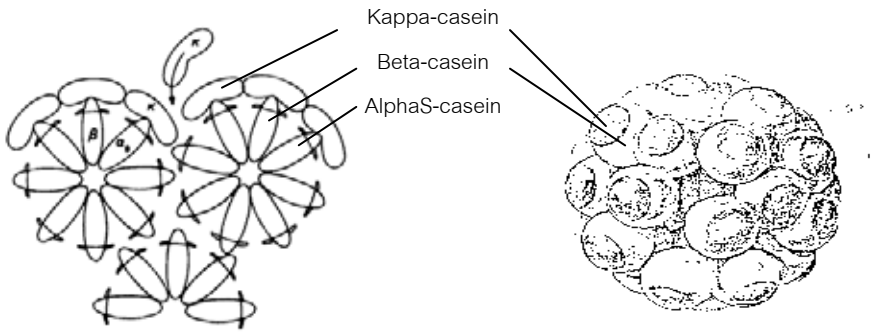
ที่มา :Jensen (1995)

โปรตีนในน้ำนม (Milk Proteins)

โปรตีนในน้ำนมที่สำคัญมีอยู่ 3 ชนิด คือ เคซีน (casein), แลคตัลบูมิน (lactalbumin) และ แลคโตโกลบูลิน (lactoglobulin) ซึ่งโปรตีนสองชนิดหลังนี้เรียกรวมว่า โปรตีนหางนม (whey proteins) โปรตีนหางนมจะได้หลังจากทำการตกตะกอนเคซีนออกไปแล้ว

โปรตีนเคซีนเป็นโปรตีนหลักประกอบอยู่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด แยกเป็นชนิดต่าง ๆ ได้ 4 ชนิด ดังนี้คือ เคซีนชนิดแอลฟาเอส1 (alphaS1-), แอลฟาเอส2 (alphaS2-), เบต้า (beta-) และ แคปปา (kappa-) ส่วนของ แอลฟาเอส1-เคซีน, แอลฟาเอส2-เคซีน และ เบต้า-เคซีน เป็นโครงสร้างที่คล้ายกัน โดยมีคุณสมบัติ คือ ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ (hydrophobic) และจะถูกล้อมรอบโดยแคปปา-เคซีน ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ดี (hydrophilic) จึงทำให้เคซีนทั้งหมดสามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำนมได้ ในรูปที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelles) ดัง**รูปที่** 2 โดยเคซีนสามารถทำให้ตกตะกอนได้ที่ pH 4.6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของไมเซลล์ (micelles) ในแบบ 2 มิติ และ แบบ 3 มิติ
ที่มา : Mangino (2001)

ลักษณะโครงสร้างระดับโปรตีนของแคปปา-เคซีน (Characteristic of Kappa-casein Protein)

โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของ แคปปา-เคซีน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 169 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight ;MW) 19007 - 19039 ขึ้นกับชนิดของแคปปา-เคซีน ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนแสดงดัง **รูปที่** 3 จากลักษณะโครงสร้างที่สาย polypeptide มี Cysteine 2 ตัว ทำให้เกิดพันธะ disulphide (S-S bond) ทำให้แคปปา-เคซีน มีลักษณะเป็น intramolecular คือการเกิดพันธะ disulphide ภายในโมเลกุลเอง และเป็น intermolecular คือการเกิดพันธะ disulphide กับ แคปปา-เคซีน หรือ แอลฟาเอส-เคซีน หรือ เบต้า-เคซีน การที่แคปปา-เคซีนสามารถแขวนลอยในน้ำนมได้เนื่องจากกรดอะมิโนตั้งแต่ลำดับที่ 117-169 เป็นส่วนที่มีประจุ (net charge= -11)หรือมีขั้ว และยังมีคาร์โบไฮเดรตซึ่งช่วยเพิ่มความเป็นขั้ว โดยความสามารถในการละลายน้ำจะขึ้นอยู่กับการมีขั้วของโมเลกุลเนื่องจาก น้ำเป็นโมเลกุลที่มีขั้วเหมือนกัน และจากการที่มีขั้วในส่วนนี้ทำให้แคปปา-เคซีนในส่วนนี้สามารถละลายน้ำได้ (hydrophilic) และจากการที่แคปปา-เคซีนมีหมู่ Phosphate เพียง 1 หรือ 2 ตัวที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 127 หรือตำแหน่งที่149 เท่านั้น ทำให้การจับตัวหรือความไวต่อแคลเซียมมีค่าต่ำ ทำให้ไมเซลล์ที่มีแคปปา-เคซีนห่อหุ้มไว้สามารถแขวนลอยได้ในน้ำในสภาพที่มีแคลเซียมอยู่ด้วย

1 11

Glu Glu Gln Asn Gln Glu Gln Pro Ile Arg **Cys** Glu Lys Asp Glu Arg Phe Phe Ser Asp

21 31

Lys Ile Ala Lys Tyr Ile Pro Ile Gln Tyr Val Leu Ser Arg Tyr Pro Ser Tyr Gly Leu

41 51

Asn Tyr Tyr Gln Gln Lys Pro Val Ala Leu Ile Asn Asn Gln Phe Lue Pro Tyr Pro Tyr

61 71

Tyr Ala Lys Pro Ala Ala Val Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Gln Trp Gln Val Leu Ser

81 91

Asp Thr Val Pro Ala Lys Ser **Cys** Gln Ala Gln Pro Thr Thr Met Ala Arg His Pro His

101 111

Pro His Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys Asn Gln Asp Lys Thr Glu Ile Pro

121 P 131

Thr Ile Asn Thr Ile Ala **Ser** Gly Glu Pro Thr Ser Thr Pro Thr Thr Glu Ala Val Glu

141 P 151

Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Asp **Ser** Pro Glu Val Ile Glu Ser Pro Pro Glu Ile Asn

161 169

Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val

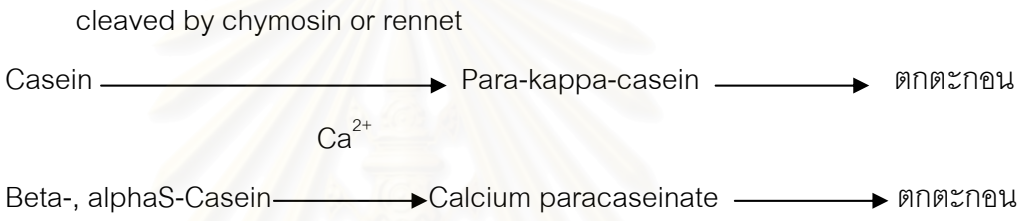
รูปที่ 3 โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของแคปปา-เคซีนชนิด A

P คือ Phosphate Group

ที่มา : Alexander *et al.* (1988)

แคปปา-เคซีนมีความสำคัญต่อขบวนการแปรรูปน้ำนมในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง โดยขั้นตอนการทำให้นมตกตะกอนจะเกี่ยวข้องกับการดึงเอาแคปปา-เคซีน ออกจากองค์ประกอบที่เป็นไมเซลล์เพื่อให้โปรตีนเคซีนชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถแขวนลอยอยู่ได้ต่อไป โดยในขบวนการทำให้เคซีนตกตะกอน (milk curd) จะใช้เอนไซม์ (enzyme) ตกตะกอน ที่เรียกว่า curding enzyme โดยProteolytic enzyme ที่นิยมใช้คือ Chymosin หรือ Rennet ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะทำการสลายพันธะระหว่าง Phenylalanine ที่ตำแหน่ง 105 และ Methionine ที่ตำแหน่ง 106 ในสาย polypeptide ได้ แคปปา-เคซีนแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็น kappa-casein

glycomacropeptide (GMP) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า caseinomacropeptide (CMP) (กรดอะมิโนลำดับที่ 106-169) ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถละลายน้ำได้ (hydrophilic) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,800 และส่วนที่เหลือของแคปปา-เคซีนโมเลกุล เรียกว่า พารา-แคปปา-เคซีน (para-kappa-casein) (กรดอะมิโนลำดับที่ 1-105) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12,271 โดยในส่วนนี้ไม่สามารถละลายน้ำได้ (hydrophobic) จึงทำให้ตกตะกอน และเมื่อ แยกส่วนของแคปปา-เคซีนที่สามารถละลายน้ำได้ออกจากเคซีนไมเซลล์แล้ว เคซีนตัวอื่น ๆ ได้แก่ แอลฟาเอส1-เคซีน, แอลฟาเอส2-เคซีน และเบต้า-เคซีน ไม่สามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำนมได้อีก จึงรวมตัวกับ Ca^{2+} ในน้ำนม ทำให้เกิดเป็นแคลเซียม-พาราเคซีนเนท (calcium paracaseinate) ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อยและแยกตัวออกมา (**รูปที่** 4)



รูปที่ 4 ขบวนการตกตะกอนของเคซีน

ลักษณะโครงสร้างระดับโมเลกุลของยีนแคปปา-เคซีน (Molecular Structure of Kappa-casein Gene)

ลักษณะของโปรตีนในน้ำนมเป็นลักษณะทางคุณภาพ (qualitative character) โดยเป็นลักษณะที่ได้มาจากอัลลีลบนจีโนม โดยยีนที่กำหนดปริมาณเคซีนและสัดส่วนของเคซีน อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ตรงตำแหน่ง q31 ถึง q33 โดยใช้วิธี *in situ* hybridisation โดยมีการเรียงตัวคือ แอลฟาเอส1-เบต้า-แอลฟาเอส2-แคปปา-เคซีน (alphaS1-beta-alphaS2-kappa-casein) โดยมีขนาดทั้งหมด 200 กิโลเบส ถึง 300 กิโลเบส

ลำดับเบสของ ยีนแอลฟาเอส1-เคซีนมีลำดับเบสทั้งหมด (complete sequence) 22069 คู่เบส โดยประกอบด้วย 19 exon และ 18 intron (Koczan *et al.,* 1991)

ลำดับเบสของ ยีนเบต้า-เคซีนมีลำดับเบสบางส่วน (partial sequence) 10338 คู่เบส โดยทำการหาลำดับเบส 9 exon และ 8 intron (Bonsing *et al.,* 1988)

ลำดับเบสของ ยีนแอลฟาเอส2-เคซีนมีลำดับเบสทั้งหมด (complete sequence) 21246 คู่เบส โดยประกอบด้วย 18 exon และ 17 intron (Groenen *et al.,* 1993)

ลำดับยีนแคปปา-เคซีนจะทำการหาในแต่ละส่วน โดย exon ที่ 1 ถึง intron ที่ 1 มีลำดับเบส 895 คู่เบส (Alexander *et al.,* 1988) exon ที่ 2 ถึง intron ที่ 2 มีลำดับเบส 720 คู่เบส (Alexander *et al.,* 1988) exon ที่ 3-5 (รวม intron ที่ 3-5) มีลำดับเบส 7595 คู่เบส (Alexander *et al.,* 1988) ไม่พบรายงานที่ทำการหาลำดับเบสทั้งหมด (complete sequence) แต่รายงานส่วนมากจะทำการหาลำดับเบสใน exon ที่ 4 ในแคปปา-เคซีนแต่ละชนิด เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลง (variation) ในส่วนนี้ (Prinzenberg *et al.,* 1996 ; Prinzenberg *et al.,* 1999)

ชนิดของแคปปา-เคซีน (Kappa-Casein Polymorphism)

จากการรวบรวมข้อมูลโดย Braunschweig (1998) ได้สรุปไว้ว่าชนิดต่าง ๆ ของแคปปา-เคซีน ที่พบในโคปัจจุบันมีรายงานไว้ 6 ชนิด โดยแยกตามความแตกต่างของกรดอะมิโนบนสายของโปรตีน ได้แก่ A, B, C, E, F และ G ไม่ปรากฏแคปปา-เคซีนชนิด D เนื่องจาก Miranda *et al.,* 1993 ได้ตรวจสอบลักษณะทางด้านชีวเคมีของแคปปา-เคซีนชนิด D และพบว่ามีคุณสมบัติเหมือนกับชนิด C จึงทำให้ปัจจุบันไม่มีการกล่าวถึงแคปปา-เคซีน ชนิด D การที่แคปปา-เคซีน มีหลายชนิด พิจารณาจากความแตกต่างของลำดับเบสตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งใน exon ที่ 4 ที่ตรวจพบ (single nucleotide polymorphism; SNP) ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ผลิตออกมา โดยได้พบว่าแคปปา-เคซีนทุกชนิดจะผันแปรไปจากแคปปา-เคซีนชนิด A ซึ่งมีลำดับเบส ดัง **รูปที่ 5** โดย exon ที่ 4 เริ่มจากลำดับเบสตำแหน่งที่ 4930 ถึง 5446 โดยครอบคลุมส่วนที่เกิดการผันแปรไปเป็นแคปปา-เคซีน ชนิดต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 ลำดับเบสของยีนแคปปา-เคซีน ชนิด A เฉพาะ exon ที่ 4
ตั้งแต่ตำแหน่ง 4930 ถึง 5446

ที่มา : Alexander *et al.* (1988)

จากโครงสร้างการเรียงตัวของเบสในแคปปา-เคซีน ชนิด A พบความแตกต่างในลำดับเบสที่ทำให้เป็นแคปปา-เคซีนชนิดอื่น ๆ ดัง **รูปที่** 6 และ **รูปที่** 7

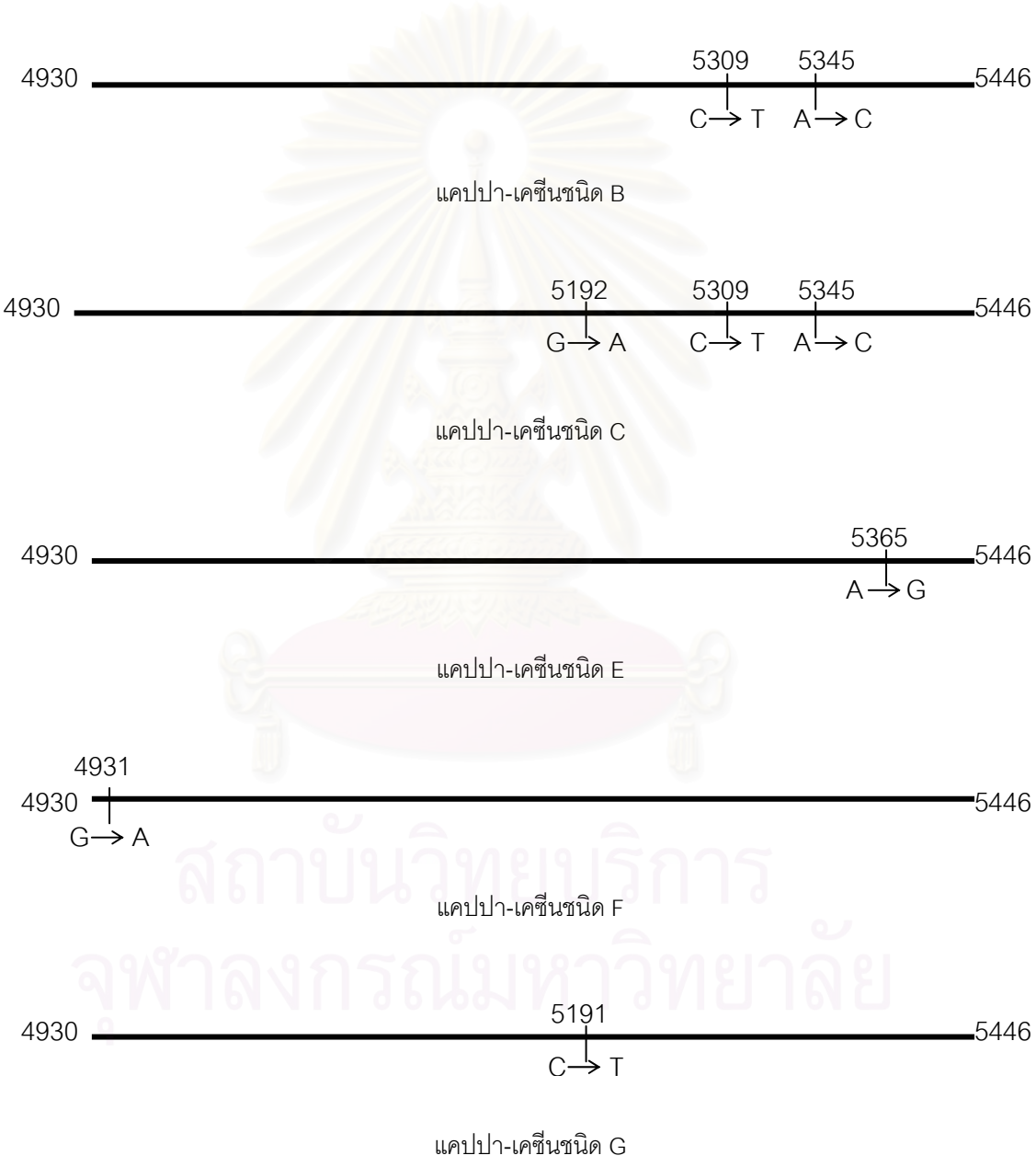
แคปปา-เคซีนชนิด B เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5309 จาก C ไปเป็น T และตำแหน่งที่ 5345 จาก A ไปเป็น C ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 136 และ 148 เปลี่ยนจาก Threonine ไปเป็น Isoleucine และจาก Aspartic acid ไปเป็น Alanine ตามลำดับ

แคปปา-เคซีน ชนิด C เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5309 จาก C ไปเป็น T และตำแหน่งที่ 5345 จาก A ไปเป็น C ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 136 และ 148 เปลี่ยนจาก Threonine ไปเป็น Isoleucine และจาก Aspartic acid ไปเป็น Alanine ตามลำดับ ซึ่งในส่วนนี้จะเหมือนกับ แคปปา-เคซีนชนิด B และมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสอีกตำแหน่งคือ ที่ตำแหน่ง 5192 จาก G ไปเป็น A ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 97 เปลี่ยนจาก Arginine ไปเป็น Histidine

แคปปา-เคซีนชนิด E เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5365 จาก A ไปเป็น G ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 155 เปลี่ยนจาก Serine ไปเป็น Glycine

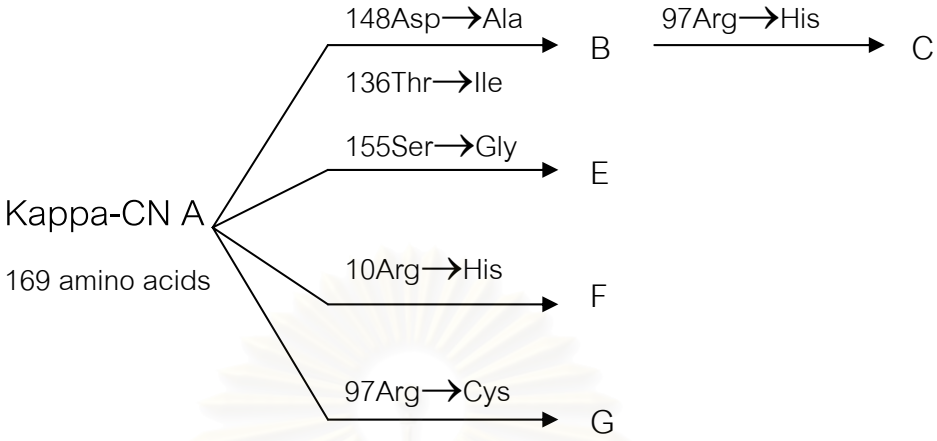
แคปปา-เคซีนชนิด F เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 4931 จาก G ไปเป็น A ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 10 เปลี่ยนจาก Arginine ไปเป็น Histidine

แคปปา-เคซีนชนิด G เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5191 จาก C ไปเป็น T ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 97 เปลี่ยนจาก Arginine ไปเป็น Cysteine



รูปที่ 6 แสดงลำดับเบสที่เปลี่ยนไปที่ตำแหน่งต่าง ๆ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของแคปปา-เคซีน เมื่อเปรียบเทียบกับแคปปา-เคซีน ชนิด A

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงชนิดของกรดอะมิโน (amino acids) ที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งต่าง ๆ แตกต่างกันไปตามชนิดของแคปปา-เคซีนเมื่อเปรียบเทียบกับแคปปา-เคซีนชนิด A

การกระจายตัวของแคปปา-เคซีน (Kappa-casein Variant Frequency Distributions))

การกระจายตัวของแคปปา-เคซีน ชนิดต่าง ๆ จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์และแหล่งที่มา โดยความถี่ของแคปปา-เคซีนชนิดต่าง ๆ ที่พบได้รายงานไว้ใน **ตารางที่** 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของแคปปา-เคซีนที่พบในโคสายพันธุ์ต่างกัน.

Breed	N	Kappa-casein						References
		A	B	C	E	F	G	
Holstein-friesian (USA)	1152	0.82	0.18		-	-	-	Eenennaam and Medrano (1991)
Holstein-friesian (USA)	3571	0.80	0.20	-	-	-	-	Hines *et al.* (1979)
Holstein-friesian (USA)	233	0.82	0.18	-	-	-	-	Bobe *et al.* (1999)
Holstein-friesian (CAN)	2045	0.74	0.26	-	-	-	-	Ng-Kwai-Hang. (1990)
Holstein-friesian (CAN)	123	0.81	0.19	-	-	-	-	Masoudi *et al.* (1994)
Holstein-friesian (ITALY)	1383	0.73	0.27	-	-	-	-	Aleandri *et al.* (1990)
Finnish Ayrshire (FIN)	20990	0.61	0.08	-	0.31	0.001	-	Ikonen (1996)
Jersey (USA)	172	0.14	0.86	-	-	-	-	Eenennaam and Medrano (1991)
Brown Swiss (USA)	50	0.33	0.67	-		-	-	Eenennaam and Medrano (1991)
Austrian-Simmental (GER)	1988	0.69	0.29	0.02	-	-	-	Ortner *et al.* (1995)
Austrian-Brown (GER)	1742	0.40	0.59	0.01	-	-	-	Ortner *et al.* (1995)
Pinzgauer (GER)	353	0.78	0.21	-	0.003	-	0.003	Erhart (1996)
Limpurger (GER)	125	0.71	0.24	0.02	0.03	-	-	Erhart (1996)
Zebu (INDIA)	614	0.69	0.31	-	-	-	-	Jairam and Nair (1983)
Sahiwal (INDIA)	19	0.67	0.33	-	-	-	-	Malik *et al.* (1994)

หมายเหตุ : ในวงเล็บเป็นแหล่งที่มาของพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยจากตารางจะเห็นได้ว่าแคปปา-เคซีน ชนิด A และ B พบในทุกสายพันธุ์ แต่มีความถี่แตกต่างกันไป เมื่อพิจารณาจากความถี่ของอัลลีลของแคปปา-เคซีนในพันธุ์ Holstein-Friesian พบว่ามีความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A ระหว่าง 0.74-0.82 และความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด B ระหว่าง 0.18-0.27 จากข้อมูลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่าแคปปา-เคซีนชนิด A เป็น อัลลีลที่พบมาก ในพันธุ์ Holstein-Friesian ในขณะที่เมื่อพิจารณาความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีนในพันธุ์ Jersey, Brown Swiss และ Austrian-Brown พบว่ามีความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีน ชนิด A คือ 0.14, 0.33 และ 0.40 ตามลำดับ ความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด B คือ 0.86, 0.67 และ 0.59 ตามลำดับ จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าแคปปา-เคซีนชนิด B เป็นอัลลีลที่พบมากในพันธุ์เหล่านี้ และเมื่อพิจารณาในโคสายพันธุ์ Zebu (*Bos indicus*) พบว่าอัลลีล A เป็นอัลลีลที่พบมากโดยมีความถี่อัลลีลระหว่าง 0.67-0.69 และมีความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด B ระหว่าง 0.31-0.33 ซึ่งมีความถี่ของอัลลีลมากกว่าในกลุ่มพันธุ์ Holstein-Friesian

แคปปา-เคซีนชนิด C พบในบางสายพันธุ์ เช่น พันธุ์ Austrian-Simmental, Austrian-Brown (Ortner *et al.,* 1995) และ Limpurger (Erhart, 1996) เป็นต้น แคปปา-เคซีนชนิด E เป็นแคปปา-เคซีนพบในบางสายพันธุ์ เช่น Prizgauer และ Limpurger (Erhart, 1996) และเป็นอัลลีลเด่นที่รองมาจากอัลลีล A ในโคพันธุ์ Finnish Ayrshire โดยพบว่ามีความถี่สูงถึง 0.31 (Ikonen, 1996) แคปปา-เคซีนชนิด F และ G พบเพียงในบางพันธุ์และมีความถี่ที่ต่ำมาก โดยพบในพันธุ์ Pinzgauer (ประเทศเยอรมัน) โดยมีความถี่อัลลีลของอัลลีล G เพียง 0.003 และ พันธุ์ Finnish Ayrshire (ประเทศฟินแลนด์) มีความถี่อัลลีลของอัลลีล F เพียง 0.001 (Erhart, 1996)

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแคปปา-เคซีนต่อผลผลิตนม (Relationship of Kappa-casein Polymorphism to Milk production)

ผลต่อปริมาณโปรตีนในน้ำนม

มีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน กับลักษณะทางด้านโปรตีนในน้ำนม พบว่ามีผู้ทำการศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น ในการศึกษาของ Ng-Kwai-Hang *et al.* (1984) ที่ทำการศึกษาในโคพันธุ์ Holstein-Friesian ในประเทศ แคนาดา พบว่าแม่โคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณโปรตีนมากกว่าแม่โคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ AA 12 กิโลกรัม และเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนมีผลต่อปริมาณโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์โปรตีนพบว่าแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนมากกว่าแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ AA โดยมากกว่า 0.13 เปอร์เซ็นต์ และนำไป

วิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนมีผลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bovenhuis *et al.* (1992) ที่ทำการศึกษาในโคพันธุ์ Holstein-Friesian ในเนเธอร์แลนด์ พบว่าแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนมสูงกว่า แคปปา-เคซีนจีโนไทป์ AA 0.08 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนมีผลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ikonen *et al.* (1999) ที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่อลักษณะโปรตีนในน้ำนม ในโคสายพันธุ์ Finnish Aryshire พบว่าแม่โคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB และจีโนไทป์ AB ให้ปริมาณโปรตีนในน้ำนมมากกว่าจีโนไทป์อื่น (AB, BE, AA, AE และ EE) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) และในการศึกษาในสายพันธุ์อื่น ๆ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดย Eenennaam and Medrano (1991) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ในโค 5 พันธุ์ที่เลี้ยงในรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา ได้แก่พันธุ์ Holstein-Friesian, Milking Shorthorn, Jersey, Brown Swiss และ Guernsey พบว่าจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนมีผลต่อปริมาณโปรตีน โดยปริมาณโปรตีนในน้ำนมของโคที่มีจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณโปรตีนมากกว่าจีโนไทป์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โปรตีนพบว่า ปริมาณโปรตีนจากโคนมที่มีจีโนไทป์ BB ให้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าจีโนไทปอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.10$)

จากงานวิจัยของ Eenennaam and Medrano (1991) พบว่าแคปปา-เคซีนชนิด B ส่งผลดีต่อปริมาณและเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนม และการที่แคปปา-เคซีนชนิด B ให้ปริมาณแคปปา-เคซีนมากกว่าชนิด A โดยให้เหตุผลที่น่าจะเป็นไปได้ว่า mRNA ที่ได้จากขบวนการ คัดลอกลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ (transcription) ของแคปปา-เคซีนอัลลีล B มีความคงทนกว่า mRNA ที่ได้จากแคปปา-เคซีนชนิด A เมื่ออยู่ในไซโตพลาสซึมจึงมีปริมาณ mRNA มากส่งผลให้การแปลงรหัสบนสาย mRNA ไปเป็นสายอะมิโนเปปไทด์ (translation) มากขึ้นด้วยจึงทำให้ได้แคปปา-เคซีนมากขึ้น นอกจากนี้ Choi *et al.* (1988) ยังพบว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนแคปปา-เคซีนชนิดต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยระบบฮอร์โมน ซึ่งควบคุมขบวนการคัดลอกลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ และยังควบคุมอัตราการแปลงรหัสบนสาย mRNA ไปเป็นสายอะมิโนเปปไทด์ ทำให้อัลลีลที่แตกต่างกันของยีนแคปปา-เคซีนให้ปริมาณแคปปา-เคซีนที่ต่างกัน

ผลต่อปริมาณไขมันในน้ำนม

ในส่วนความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแคปปา-เคซีน ต่อลักษณะไขมันในน้ำนม Ng-Kwai-Hang *et al.* (1984) พบว่าจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนไม่มีผลต่อลักษณะทางด้านปริมาณไขมันในน้ำนมรวมถึงเปอร์เซ็นต์ไขมันนม ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Bovenhuis *et al.* (1992) ที่พบว่า

จีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนส่งผลต่อปริมาณไขมันนม โดยแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณไขมันนมต่ำกว่าแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันนม ซึ่งสอดคล้องกับ Cowan *et al.* (1992) ที่พบว่าแคปปา-เคซีนชนิด B มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ไขมันลดลง อย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทางสถิติ ($p<0.01$) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณไขมันในน้ำนมทั้งหมด

ผลต่อปริมาณน้ำนม

ในส่วนความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแคปปา-เคซีน ต่อปริมาณน้ำนม Eenennaam and Medrano (1991) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ในโค 5 พันธุ์ที่เลี้ยงในรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา ได้แก่พันธุ์ Holstein-Friesian, Milking Shorthorn, Jersey, Brown Swiss และ Guernsey พบว่าแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณน้ำนมมากกว่าแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.10$) ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากระยะการให้นมครั้งแรก (first lactation) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Ng-Kwai-Hang *et al.* (1984) ที่ศึกษาในโคพันธุ์ Holstein-Friesian พบว่าจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนไม่มีผลต่อลักษณะทางด้านปริมาณน้ำนม ในขณะที่ Bovenhuis *et al.* (1992) พบว่าแม่โคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณน้ำนมน้อยกว่าแม่โคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ikonen *et al.* (1999) ที่ทำการศึกษาในโคพันธุ์ Finnish Aryshire พบว่าแม่โคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณน้ำนมน้อยกว่าแม่โคที่มีจีโนไทป์อื่น ๆ (AB, AA, AE, BE และ EE) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$)

จากการทบทวนเอกสารไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ที่ชัดเจนได้ เนื่องจากลักษณะทางด้านปริมาณน้ำนมไม่ได้ถูกควบคุมโดยยีนเพียงตัวเดียวจึงทำให้การประมาณอิทธิพลมีความแปร ปรวนสูง (FitzGerald, 1995) และ Ojala *et al.* (1997) ยังได้ให้เหตุผลว่าความแปรปรวนเป็นสาเหตุที่ทำให้การประมาณผลออกมาต่างกัน โดยความแปรปรวนนั้นเกิดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ขนาดของประชากร สายพันธุ์ของสัตว์ ความถี่ของแคปปา-เคซีนแต่ละชนิด วิธีการและความถี่ในการเก็บตัวอย่าง (เช่น การใช้ข้อมูลแบบ Test-day หรือ การใช้ข้อมูลของทั้งระยะการให้นม) รวมทั้งปัจจัยที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อลดความแปรปรวน เช่น Herd-Year-Season อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก ลำดับของระยะการให้นม somatic cell count เป็นต้น ซึ่งถ้าสามารถลดความแปรปรวนเหล่านี้ลงได้จะทำให้ประมาณค่าผลกระทบของยีนแคปปา-เคซีนต่อผลผลิตน้ำนมได้ถูกต้องมากขึ้น

ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแคปปา-เคซีนต่อการแปรรูปน้ำนม (Relationship of Kappa-Casein Polymorphism to Milk Processing)

แคปปา-เคซีนมีความสำคัญต่อคุณภาพของโปรตีนในน้ำนมที่ส่งผลต่อขบวนการแปรรูปน้ำนมไปเป็นผลิตภัณฑ์นมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการทำเนยแข็ง จากการศึกษาพบว่าชนิดของแคปปา-เคซีนมีผลต่อขบวนการทำเนยแข็งทั้งในแง่ ความเนียนของเนื้อเนยแข็ง (curd firmness) และปริมาณเนยแข็งที่ผลิตได้ กล่าวคือ ในการผลิตเนยแข็งชนิด Parmigiano-Reggiano, Svecia, Edam, Gouda, Cheddar, Mozzarella และ Tilsit น้ำนมที่ได้จากโคที่มีแคปปา-เคซีน จีโนไทป์ BB เมื่อนำมาผ่านขบวนการทำเนยแข็งจะได้เนยแข็งที่มีเนื้อแน่นหรือเนื้อเนียน (curd firmness) และให้ปริมาณเนยแข็ง (cheese yield) มากกว่า เนยแข็งที่ได้ทำจากน้ำนมของโคที่มีจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน AB และ AA ตามลำดับ (FitzGerald, 1997) ทั้งนี้ เนื่องจากแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณของแคปปา-เคซีนมากกว่า จีโนไทป์ AB และ AA ตามลำดับ และเนื่องจากการที่ปริมาณแคปปา-เคซีนเป็นตัวกำหนดขนาดของไมเซลล์ เมื่อมีปริมาณแคปปา-เคซีนมาก ขนาดของไมเซลล์จะมีขนาดเล็ก จึงทำให้หลังจากผ่านขบวนการการทำเนยแข็งแล้ว ช่องว่างระหว่างเนื้อเนยแข็งจะมีน้อย จึงทำให้เนื้อเนยแข็งมีความเนียน ซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค(Aleandri *et al.,* 1990 ; Bobe *et al.,* 1999 ; Eenennaam and Medrano, 1991)

นอกจากนี้ยังเป็นที่พบว่าแคปปา-เคซีนชนิด B มีผลต่อการคงทนต่อความร้อน เนื่องจากว่าแคปปา-เคซีนชนิด B ให้ปริมาณแคปปา-เคซีนมากทำให้ได้ไมเซลล์ที่มีขนาดเล็กทำให้ทนต่อความร้อนมากขึ้น เนื่องจากไมเซลล์ที่มีขนาดเล็ก แคปปา-เคซีนมีการยึดเกาะกับ เบต้า-เคซีน และ แอลฟา-เคซีน มากกว่าไมเซลล์ขนาดใหญ่ ทำให้ความร้อนหรือแรงที่จะทำลายพันธะในไมเซลล์ขนาดเล็กต้องใช้มากกว่าในการทำลายพันธะในไมเซลล์ขนาดใหญ่ ผลที่ได้ทำให้น้ำนมที่ได้จากแม่โคที่มีจีโนไทป์ BB เมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปน้ำนมแล้ว ให้ปริมาณเคซีนมากกว่าน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่มีจีโนไทป์ AB และ AA ตามลำดับ (FitzGerald, 1997) นอกจากนี้ Schulte-Corne *et al.* (1992) *อ้างโดย* FitzGerald (1997) ยังรายงานเพิ่มเติมว่าน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่มีแคปปา-เคซีน จีโนไทป์ BB เมื่อเข้าเครื่องแปรรูปแล้วการทำความสะอาดง่ายกว่าเนื่องจากเคซีนไมเซลล์ถูกทำลายด้วยความร้อนยากกว่าจีโนไทป์อื่น ๆ จึงทำให้เครื่องมือสกปรกน้อยกว่า ส่งผลให้ทำความสะอาดเครื่องมือได้ง่ายขึ้นทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทำความสะอาดเครื่องมือ

วิธีการจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีน (Method for Identification of Kappa-casein Variant)

มีการใช้เทคโนโลยีและวิธีการต่าง ๆ เพื่อทำการจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีน แบ่งเป็น 2 ระดับในการตรวจหา คือ ระดับโปรตีน ตัวอย่างที่ใช้ในระดับนี้คือน้ำนมจากแม่โค และระดับดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่ใช้ในระดับนี้ใช้ได้หลายชนิด เช่น เลือด น้ำเชื้อ หรือเซลล์ต่าง ๆ ที่ได้มาจากตัวโคเป็นต้น โดยมีรายละเอียดของแต่ละระดับการตรวจหา ดังนี้

การจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีนระดับโปรตีน

เป็นการตรวจหาชนิดของแคปปา-เคซีนจากฟีโนไทป์ (Phenotype) โดยใช้อิเล็คโตรโฟรีซิส ในการวิเคราะห์หาความผันแปรของแคปปา-เคซีน หลักการของอิเล็คโตรโฟรรีซิส ใช้ประโยชน์จากการที่โมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดมีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีค่าประจุสุทธิ (net charge) ไม่เท่ากัน ซึ่งเมื่อนำไปวางไว้ในสนามไฟฟ้าโดยมีเจล (starch, agarose หรือ acrylamide) เป็นตัวกลาง (support media) แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าลงไปในสนามไฟฟ้า ทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปตามคุณสมบัติ เช่น ขนาด, ประจุของโปรตีนแต่ละชนิด เช่น โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบของสนามไฟฟ้า เป็นต้น (Boyer, 1993)

Eenennam and Medrano (1991) ได้ใช้ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในการหาชนิดของ แอลฟาเอส1-, เบต้า-, แคปปา-เคซีน และ เบต้า-แลคโตโกลบูลิน โดยตัวกลางที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ Polyacrylamide Gel เพื่อใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของชนิดของโปรตีนนมต่อผลผลิตของโค 5 สายพันธุ์คือ Holstein, Brown Swiss, Guernsey, Milking Shorthorn และ Jersey ที่เป็นตัวแทนของประชากรในฝูงโคนมของรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ตัวอย่างน้ำนม 1454 ตัวที่ได้จากระยะการให้นมครั้งแรกของแม่โค

Ikonen *et al.* (1996) ได้ใช้ Isoelectric Focusing of Proteins (IEF) ใน polyacrylamide gel ในการตรวจหาชนิดของโปรตีนในน้ำนม คือ แอลฟาเอส1-, แอลฟาเอส2-, เบต้า- และ แคปปา-เคซีน เพื่อหาความถี่ของอัลลีล ในโคนมพันธุ์ Finnish Aryshire โดยใช้ตัวอย่างน้ำนมที่ได้มาจากแม่โค 20,990 ตัว โดยวิธี Isoelectric Focusing of Proteins (IEF) คือการตกตะกอนโปรตีนที่ pH ที่ทำให้ประจุรวมของโปรตีนมีค่าเท่ากับ 0 โดย pH ที่ทำให้โปรตีนมีค่าประจุรวม (net electric charge) เท่ากับศูนย์เรียกจุดนั้นว่า isoelectric point, pI (Voet and Voet J.G., 1990) เนื่องจากแคปปา-เคซีนแต่ละชนิดจะมีค่า pI ไม่เท่ากันจึงสามารถแยกแคปปา-เคซีนแต่ละชนิดออกจากกันได้

การจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีนระดับดีเอ็นเอ

การตรวจหาความผันแปรของแคปปา-เคซีน ระดับดีเอ็นเอสามารถตรวจหาได้จากเทคโนโลยีทางด้านอณูพันธุศาสตร์ในปัจจุบัน โดยวิธีที่นิยมใช้ในหลายงานวิจัยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Borroso *et al.,* 1998 ; Braunschweig, 1998 ; Cowan *et al.,* 1992 ; Mao and Bremel, 1994) โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ มีหลักการทั่วไปคือ ทำให้ผนังเซลล์ของเซลล์ที่ต้องการสกัดแตกหรือโดนทำลาย หลังจากนั้นทำการแยกโปรตีนหรือทำลายโปรตีนที่สายดีเอ็นเอพันอยู่ ในขั้นตอนนี้จะได้สายดีเอ็นเอที่ไม่มีโปรตีนอยู่ด้วย ทำการแยกสายดีเอ็นเอออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ โดยใช้การตกตะกอน หลังจากขั้นตอนนี้จะได้เฉพาะสายดีเอ็นเอเท่านั้น (Boyer, 1993) ขั้นตอนเหล่านี้เป็นหลักการทั่วไปในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ แต่สามารถดัดแปลงได้ ขึ้นอยู่กับ ชนิดและปริมาณของตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ ในการสกัดดีเอ็นเอนิยมสกัดดีเอ็นเอจากเลือด เนื่องจากในปัจจุบันมีวิธีการมาตรฐานในการสกัด และมีอุปกรณ์-สารเคมี (kit) ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากเลือดได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง เช่น Barroso *et al.* (1998), Mao and Bremel (1994) และ Prinzenberg *et al.* (1996) ที่ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดเพื่อตรวจหาชนิดของแคปปา-เคซีน แต่เนื่องจากการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดอาจส่งผลทำให้โคเกิดความเครียดและมีความยุ่งยากในการเจาะเก็บตัวอย่าง จึงมีการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนอื่น ๆ เช่น Braunschweig (1998) และ Ng-Kwai-Hang *et al.* (1991) ที่ทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนม เพื่อตรวจหาชนิดของยีนแคปปา-เคซีน

หลังจากทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วจะใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนที่ครอบคลุมยีนแคปปา-เคซีนให้มากพอต่อการวิเคราะห์ โดยในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Template) ที่ได้มาจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ, ไพรเมอร์ (Primer) เป็นสายดีเอ็นเอสั้น ๆ โดยมีความยาวประมาณ 17-30 เบส ใช้ในการจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบในส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน, Deoxynucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP และ dCTP ; dNTP) ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอ และ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการต่อสายดีเอ็นเอโดยจับเอา dNTP มาเข้าคู่ (complementary) กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ หลังจากนั้น เริ่มทำปฏิกิริยา PCR โดยประกอบไปด้วยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิขึ้นลงเพื่อสนับสนุนการเกิดปฏิกิริยาและดำเนินซ้ำวนไปเรื่อย ๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ในส่วนที่ต้องการและมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ในรูปแบบต่าง ๆ ในการตรวจหาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนได้มีการออกแบบไพรเมอร์

ต่าง ๆ กันไป โดยในรายงานของ Braunschweig (1998) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน คือ KCN 1F (Forward) และ KCN 1R (Reverse) โดยมีความยาว 25 bp และ 26 bp ตามลำดับ ส่วน Jorge (2001) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนคือ KP1 (Forward)และ KP2 (Reverse) ที่มีความยาว 39 bp และ 30 bp ตามลำดับ โดยไพรเมอร์นี้ทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในส่วนที่มีความผันแปรของชนิดของแคปปา-เคซีน หลังจากนั้นทำการจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของแคปปา-เคซีนที่ต่างกัน โดย Braunschweig (1998) ทำการหาชนิดของแคปปา-เคซีน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hinf*I, *Hin*dIII, *Mae*II และ *Hae*III ในการแยกแคปปา-เคซีนชนิด A, B, C และ E ออกจากกัน โดยใช้ Agarose Gel Electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่ง Borroso *et al.* (1998) ใช้วิธีเดียวกันแต่ใช้เอนไซม์ เพียง 3 ชนิด คือเอนไซม์ *Hinf*I, *Mae*II และ *Hae*III ในการแยกแคปปา-เคซีนชนิด A, B, C และ E ออกจากกัน โดยไม่ใช้เอนไซม์ *Hin*dIII เนื่องจากการใช้ *Hinf*I เพียงพอต่อการแยกแคปปา-เคซีนชนิด A และ B ออกจากกัน และใช้ Agarose Gel Electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีหลายรายงานที่ใช้ PCR-RFLP ในการหาชนิดของแคปปา-เคซีนเช่นกัน(Cowan *et al.,* 1992 ; Mao and Bremel, 1994)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์โคนม จำนวน 60 ตัว จากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ เป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผลิตในระหว่างปี 2542-2544 ประกอบด้วยพ่อพันธุ์โคนมพันธุ์ Holstein-Friesian และ พ่อพันธุ์โคนมที่มีสายเลือดของพันธุ์ Holstein Friesian ในระดับต่าง ๆ (ได้แก่ระดับเลือด 100 เปอร์เซ็นต์, 93.25 เปอร์เซ็นต์, 93.75 เปอร์เซ็นต์, 87.50 เปอร์เซ็นต์, 81.25 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์) โดยมีจำนวนพ่อพันธุ์ในแต่ละกลุ่มดัง **ตารางที่** 3

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการศึกษา

พันธุ์ Holstein-Friesian	ระดับเลือดของพันธุ์ Holstein-Friesian (เปอร์เซ็นต์)						รวม
	100[1]	93.75	93.25	87.50	81.25	75[2]	
4	11	9	1	20	6	9	60

แสดงหน่วยเป็น : ตัว

[1]เป็นพ่อโคที่เกิดจากการยกระดับสายเลือดจนมีระดับสายเลือดของโคพันธุ์ Holstein-Friesian เป็น 100 เปอร์เซ็นต์

[2]เป็นพ่อโคกลุ่ม TMZ (Thai Milking Zebu)

3.2 วิธีการดำเนินงาน

การหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็ง

ดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อจาก Ng-Kwai-Hang *et al.* (1991) โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

นำหลอดพลาสติกที่บรรจุด้วยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนม ที่มีปริมาณ 250 μl. (โดยประมาณ) ถ่ายใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml. โดยใช้กรรไกร หรือ มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วดูด 0.11M sodium citrate ปริมาณ 1.0 ml. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm. เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง หลังจากนั้นละลายตะกอนกลับด้วยการเติม 0.11M sodium citrate ปริมาณ 1.0 ml. ทำซ้ำอีก 1 รอบ (รวมเป็น 3 รอบ) จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยการเติม 200mM NaOH/50mM DTT ปริมาณ 250 μl. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pipette นำไป incubate ที่ 65^{O}C ใน water bath เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดย 200mM NaOH/50mM DTT เป็นสารที่ทำให้ผนังเซลล์ของตัวอสุจิแตก และมีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นทำให้เย็นลง โดยการวางบนน้ำแข็ง ประมาณ 20 นาที แล้วทำให้สารละลายเป็นกลาง เพื่อให้สายดีเอ็นเอที่ทำการสกัดได้คงอยู่โดยไม่ถูกทำลาย โดยการเติม 200mM HCl/100mM Tris-HCl ปริมาณ 250 μl. จากนั้นเก็บไว้ที่ –20^{O}C เพื่อรอดำเนินการต่อไป

3.2.2 การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากน้ำเชื้อ คำนวณได้จากค่า Optical Density (O.D.) ที่ 260 nm โดย

ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 3.2.1 ปริมาณ 30 μl. ผสมกับน้ำกลั่น 750 μl. (อัตราส่วน 1:25 หรือ 25 เท่า ให้ค่านี้เป็นค่าที่เรียกว่า dilution factor) จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ A_{260} และ A_{280} นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอในสารละลายโดยมีสูตรการหาดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอ (μg./ ml.) = 50 x ค่าที่ได้ ณ A_{260} x dilution factor

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จะนำไปใช้ประกอบการพิจารณาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในขั้นตอนการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (PCR) ในบริเวณยีนแคปปา-เคซีนต่อไป

3.2.3 การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีนแคปปา-เคซีน บริเวณ exon ที่ 4 โดยดัดแปลงวิธีการจาก Braunschweig (1998) และ Joerg (2001) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) จะครอบคลุมส่วนของเบสที่แตกต่างกันของแคปปา-เคซีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งอยู่ในบริเวณ exon ที่ 4 (exon IV) โดยปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยาจะพิจารณาเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่หาได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 โดยปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้นดังแสดงใน **ตารางที่ 4** การใช้ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วมีปริมาณมากพอในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR amplification)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (μg/ml.)	ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา (μl.)
<220	3
220-230	2
>230	1

หลังจากนั้นเติมสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 200 μl. โดยมีปริมาตรรวม 25 μl. ในปฏิกิริยาตามเข้มข้นดัง **ตารางที่ 5** แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler เพื่อทำปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีลำดับเบส และรายละเอียดของปฏิกิริยาดังแสดง ในขั้นตอนที่ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 โดยก่อนเริ่มปฏิกิริยาในช่วง PCR นั้น จะใช้เวลาในช่วงแรก (initial denaturation) โดยใช้อุณหภูมิ 95^{O}C เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเริ่มด้วยปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนที่ 3.2.3.1 หรือ 3.2.3.2 ขึ้นอยู่กับว่าต้องการวิเคราะห์หาแคปปา-เคซีนชนิดใด และหลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาในช่วง PCR แล้วจะจบด้วยขั้นตอนสุดท้าย (final extension) โดยใช้อุณหภูมิ 72^{O}C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาทั้งหมดแล้วให้เก็บผลิตภัณฑ์ PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 4^{O}C จนกว่าจะนำไปตัดโดยเอนไซม์

ตารางที่ 5 แสดงสารประกอบในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR amplification mix)

สารประกอบในปฏิกิริยา	ความเข้มข้นตั้งต้นของสารประกอบ	ปริมาณ (μl.)	ความเข้มข้นสุดท้ายของสารประกอบ
10xPCR buffer	10 เท่า	2.5	1 เท่า
dNTP's	1.25 mM	4.0	200μM
primer (forward)	20.0 μM	0.5	0.4 μM
primer (reverse)	20.0 μM	0.5	0.4 μM
sterile water	-	ปรับให้ได้ปริมาตร 25 μl.	-
Taq DNA polymerase	5U*/μl.	0.2	1U*
DNA template	-	1-3	>230 ng.
ปริมาณทั้งหมด (total reaction mix)		25.0	-

* Unit

3.2.3.1 แคปปา-เคซีน ชนิด A, B และ E

ในปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในการแยกแคปปา-เคซีน ชนิด B ออกจาก A และแยกแคปปา-เคซีนชนิด E ออกจาก A ใช้ไพรเมอร์ KCN 1F และ KCN 1R โดยมีความยาว 25 bp และ 26 bp ตามลำดับ (Braunschweig, 1998) โดยเริ่มตั้งแต่ exon ที่ 4 จนถึง intron ที่ 4 ของยีนแคปปา-เคซีน (Alexander, 1988) โดย KCN 1F เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตั้งแต่ตำแหน่งที่ 5211-5235 และ KCN 1R เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตั้งแต่ตำแหน่งที่ 5536-5561 (**รูปที่** 8) และทำปฏิกิริยา PCR 35 รอบ.

โดยรายละเอียดใน 1 รอบปฏิกิริยา มีดังนี้คือ

- denature ที่ 95^{O}C เป็นเวลา 30 วินาที
- primer anneal ที่ 60^{O}C เป็นเวลา 30 วินาที
- primer extension ที่ 72^{O}C เป็นเวลา 1 นาที

โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ KCN 1F และ KCN1R มีดังนี้

KCN 1F : 5'-ATCATTTATG GCCATTCCAC CAAAG-3'

KCN 1R : 5'-GCCCATTTCG CCTTCTCTGT AACAGA-3'

3.2.3.2 แคปปา-เคซีน ชนิด C, F และ G

ในปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในการจะแยก C ออกจาก B หรือ การแยก F และ G ออกจาก A ใช้ไพรเมอร์ KP 1 และ KP 2 โดยมีความยาว 39 bp และ 30 bp ตามลำดับ (Joerg, 2001) โดยเริ่มตั้งแต่ intron ที่ 3 จนถึง intron ที่ 4 ของยีนแคปปา-เคซีน (Alexander, 1988) โดย KP 1 เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตั้งแต่ตำแหน่งที่ 4891-4929 และ KP 2 เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอตั้งแต่ตำแหน่งที่ 5444-5473 (**รูปที่ 8**) และทำปฏิกิริยา PCR 35 รอบ.

โดยรายละเอียดใน 1 รอบปฏิกิริยา มีดังนี้คือ

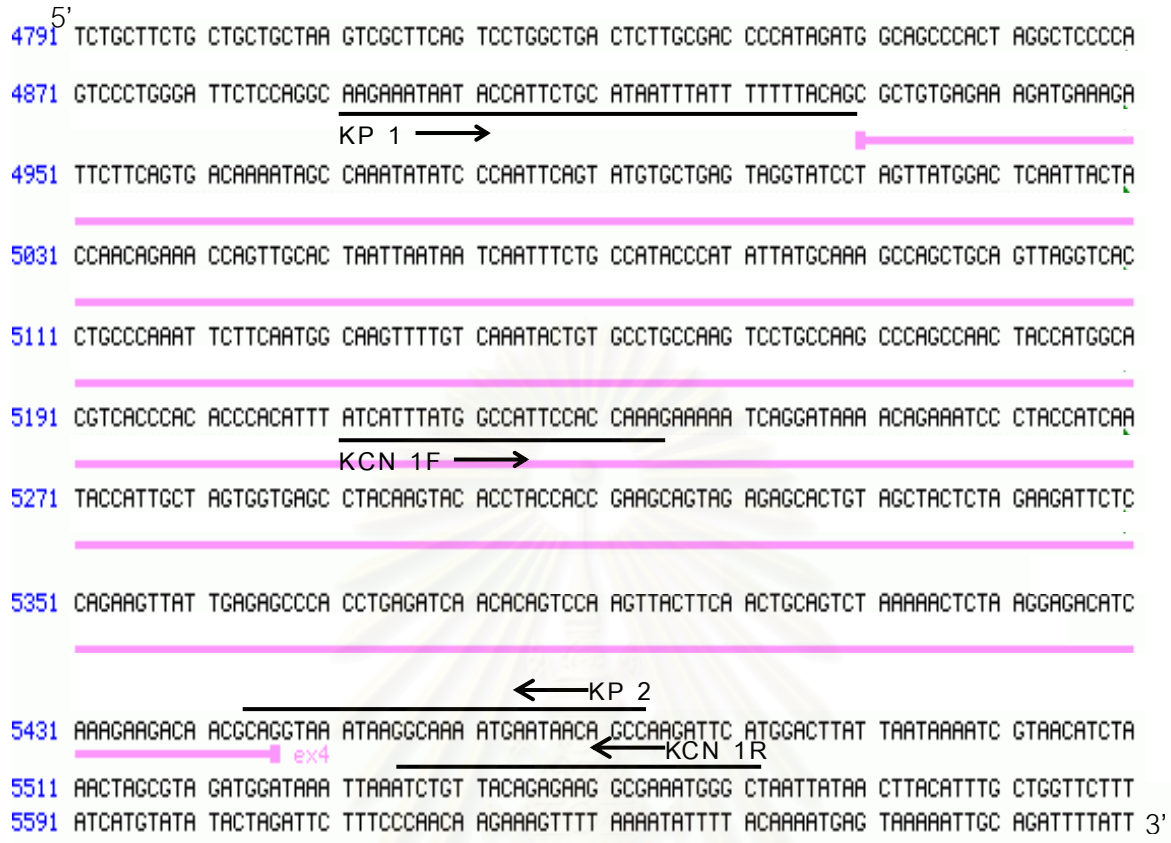
- denature ที่ 95^{O}C เป็นเวลา 30 วินาที
- primer anneal ที่ 56^{O}C เป็นเวลา 30 วินาที
- primer extension ที่ 72^{O}C เป็นเวลา 1 นาที

โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ KP1 และ KP2 มีดังนี้

KP 1 : 5'-AAGAAATAAT ACCATTCTGC ATAATTTATT TTTTTACAG-3'

KP 2 : 5'-GGCTGTTATT CATTTTGCCT TATTTACCTG-3'

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

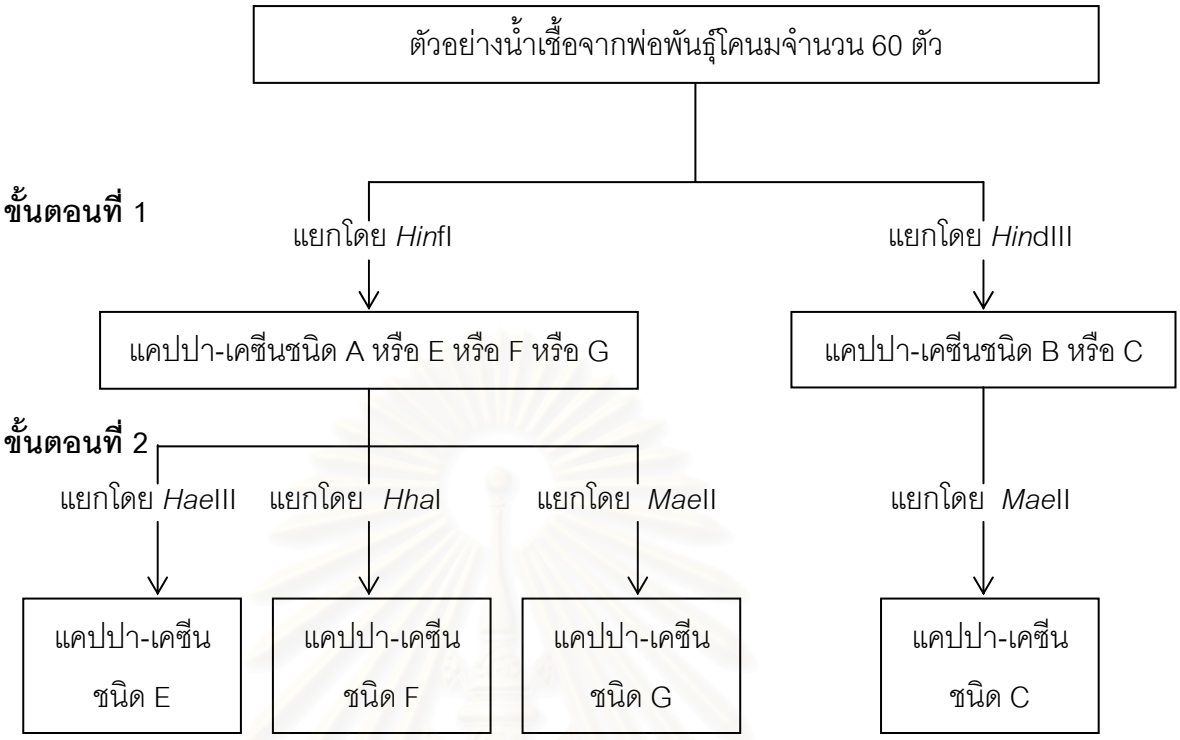


รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ KCN1F และ KCN 1R ที่จับกับสายดีเอ็นเอ
ตำแหน่งของไพรเมอร์ KP 1 และ KP 2 ที่จับกับสายดีเอ็นเอ
ex 4 คือ exon ที่ 4

3.2.4 การตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzymes) 5 ชนิด คือ *Hin*fI, *Hin*dIII, *Hpy*CH4 IV (เป็น isoschizomer ของ *Mae*II), *Hae*III และ *Hha*I

โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2.3 ปริมาณ 6.0 µl. และ เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5U เติมน้ำจนได้ปริมาตรสุดท้าย 20 µl. หลังจากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน (over-night) โดยมีแผนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดัง **รูปที่** 9



รูปที่ 9 แผนผังการวิเคราะห์หาชนิดและจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน โดยใช้วิธี PCR-RFLP

3.2.5 **การทำอิเล็คโตรโฟรีซิส โดยผ่านตัวกลางอะกาโรส** (Agarose Gel Electrophoresis)

3.2.5.1 การเตรียมแผ่นเจล *(agarose gel)*

ใช้ 2% Agarose gel โดยชั่งผง agarose 1 g. ใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) เติม0.5XTBE ปริมาณ 50 ml. และทำให้ร้อนจนกระทั่งผง agarose ละลาย โดยการนำเข้าตู้อบ microwave เป็นเวลาประมาณ 2 นาที ทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ ประมาณ 45-50^{O}C (สังเกตจากการใช้มือจับที่ขวดได้) แล้วจึงใส่ ethidium bromide (10 mg./ml.) ปริมาณ 0.5 μl. เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทใส่ในถาด (tray) ที่เตรียมไว้เพื่อทำอิเล็กโตรโฟริซิส โดยมีหวี (comb) เป็นตัวทำให้เกิดช่องหรือหลุม (well) สำหรับหยอดตัวอย่าง หลังจากนั้นทิ้งไว้จนแข็งตัวโดยสมบูรณ์

3.2.5.2 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธิอิเล็คโตรโฟรีซิส

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณ 20 μl. จากข้อ 3.10 ผสมกับ Blue/Orange 6xloading dye ปริมาณ 4 μl. (อัตราส่วน 5 ต่อ 1 ; ตัวอย่าง ต่อ 6Xloading dye) หลังจากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วใส่ลงในหลุม (well) ของแผ่นเจลที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.6.1โดยในการวิเคราะห์ทุกครั้งต้องมีการใส่ marker เพื่อเป็นตัวเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการแยก โดยในงานวิจัยนี้ใช้ 50 bp DNA ladder และ 100 bp DNA ladder หลังจากนั้นทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ของไฟฟ้า โดยในงานวิจัยนี้ใช้ความต่างศักย์ของไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ (volt) ใช้เวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที หลังจากนั้นนำไปดูการแยกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่เท่ากันจะมีความเร็วในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไม่เท่ากัน โดยสามารถดูตำแหน่งของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ภายใต้แสง Ultraviolet เนื่องจากการเรืองแสงของ ethidium bromide โดยเครื่อง utraviolet transilluminator ทำการถ่ายรูป และเก็บข้อมูลในแผ่นบันทึกข้อมูล (computer diskette)

3.3 การหาความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนและความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสม

คำนวณหาความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการศึกษา โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความถี่อัลลีล (Allelic Frequency ; AF)} = \frac{2n^{homozygote} + n^{heterozygote}}{n^{total}}$$

โดยที่ $n^{homozygote}$ คือ จำนวนพ่อโคที่มีจีโนไทป์เป็น homozygote

$n^{heterozygote}$ คือ จำนวนพ่อโคที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygote

n^{total} คือ จำนวนอัลลีลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 120

$$\text{ความถี่จีโนไทป์ (Genotypic Frequency ; GF)} = \frac{n}{n^{total}}$$

โดยที่ n คือ จำนวนพ่อโคที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการคำนวณ

n^{total} คือ จำนวนจีโนไทป์ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 60

ทำการพล๊อตกราฟเพื่อดูความถี่ของกลุ่มพันธุ์แท้ กลุ่มลูกผสม และ รวมทั้งหมด เพื่อดูความแตกต่างของแต่ละกลุ่มพันธุ์ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสม โดยพ่อโคพันธุ์ Holstein-Friesian และพ่อโคที่มีระดับเลือดของพันธุ์ Holstein-Friesian 100 เปอร์เซ็นต์เป็นกลุ่มพันธุ์แท้ และพ่อโคที่มีระดับเลือด Holstein-Friesian ที่ระดับเลือด 75, 81.25, 87.50, 93.25 และ 93.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มลูกผสม ทำการเปรียบเทียบ ความถี่ของชนิดและความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนโดยวิธี chi-square test โดยสถิติที่ใช้ทดสอบมีสูตรดังนี้

$$\chi^2 = \frac{\sum\sum (O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

โดยที่ O_{ij} (Obsereved Frequency) คือ ความถี่หรือจำนวนที่เกิดขึ้นจริง

E_{ij} (Expected Frequency) คือ ความถี่หรือจำนวนที่คาดว่าจะเกิด

และ

$$E_{ij} = \frac{\text{(ผลรวมของแถวนอนที่ i) x (ผลรวมของแถวตั้งที่ j)}}{\text{ขนาดตัวอย่างทั้งหมด}}$$

องศาอิสระ (degree of freedom) เป็น (จำนวนแถว-1) x (จำนวนสดมภ์-1)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์

4.1 จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

จากการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน จากน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการผสมเทียม จำนวน 60 ตัว โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในการจำแนกชนิดของยีนแคปปา-เคซีน ที่ปรากฏในฝูงพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้ผลการวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอนดังนี้

4.1.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดจากน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยดัดแปลงวิธีการจาก Ng-Kwai-Hang *et al.* (1991) หลังจากนั้นทำการวัดค่า Optical Density (OD) ที่ 260 nm เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่ามีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 170 μg/ml ถึง 645 μg/ml โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 290.29 μg/ml และมีค่า Ratio ของ A_{260}/A_{280} เฉลี่ยที่ 1.514

4.1.2 การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

จากการทำปฏิกิริยา PCR ที่ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนที่ครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงของชนิดของแคปปา-เคซีน โดยได้ผลิตภัณฑ์ PCR ดังนี้

4.1.2.1 แคปปา-เคซีน ชนิด A, B และ E

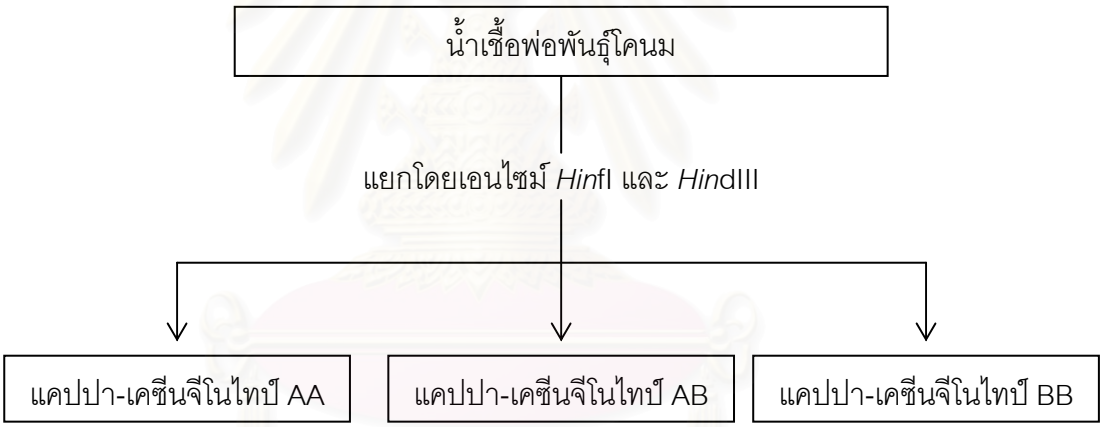
จากการทำปฏิกิริยา PCR จากไพรเมอร์ KCN 1F และ KCN 1R ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 351 bp ซึ่งครอบคลุมตำแหน่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแคปปา-เคซีน ชนิด A, B และ E (**รูปที่** 8)

4.1.2.2 แคปปา-เคซีน ชนิด C, F และ G

จากการทำปฏิกิริยา PCR จากไพรเมอร์ KP 1 และ KP 2 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 583 bp ซึ่งครอบคลุมตำแหน่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแคปปา-เคซีน ชนิด C, E, F และ G (**รูปที่** 8)

4.1.3 **ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนโดยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hin*dIII**

ทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 4.1.2.1 เป็นขั้นตอนที่ 1 ดัง**รูปที่** 10 โดยใช้เอนไซม์ *Hin*fI และ *Hin*dIII เพื่อตรวจแยกจีโนไทป์ ให้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มจีโนไทป์ AA, AB และ BB โดยมีขนาดของดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ ดังแสดงใน **ตารางที่** 6 และมีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ดัง **รูปที่** 11 และ **รูปที่** 12



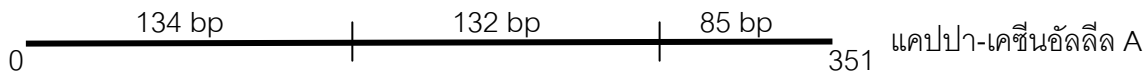
รูปที่ 10 ผลที่ได้หลังจากการแยกด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hin*dIII

ตารางที่ 6 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ*หลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hin*dIII

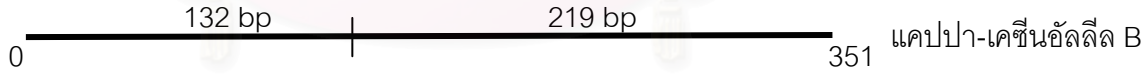
กลุ่มจีโนไทป์	*Hin*fI				*Hin*dIII		
AA	-	134	132	85	351	-	-
AB	266	134	132	85	351	219	132
BB	266	-	-	85	-	219	132

*ขนาดแสดงเป็นจำนวนคู่เบส (base pairs)

ที่มา : Alexander (1988)

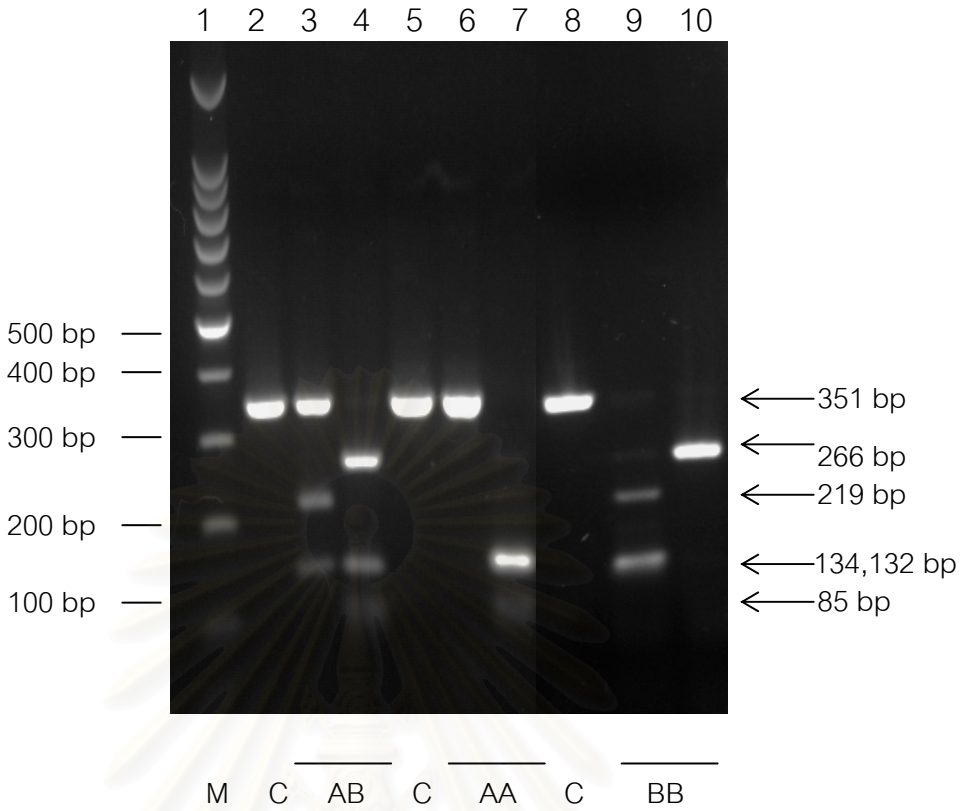


รูปที่ 11 ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI



รูปที่ 12 ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Hin*fI โดยช่องที่ 1 คือ Marker (M) ขนาด 100-bp. ช่องที่ 2, 5 และ 8 เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ (control; C). ช่องที่ 3, 6 และ 9 แสดงแถบ (band) ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hin*dIII. ช่องที่ 4, 7 และ 10 แสดงแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hin*fI. ช่องที่ 3-4 แสดงรูปแบบของจีโนไทป์กลุ่ม AB; ช่องที่ 6-7 แสดงรูปแบบของจีโนไทป์กลุ่ม AA และ ช่องที่ 9-10 แสดงรูปแบบของจีโนไทป์กลุ่ม BB ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Hin*fI ตามลำดับ

จาก**ตารางที่ 6 รูปที่ 11, 12 และ 13** จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hin*dIII สามารถแยกแคปปา-เคซีนชนิด A และ B ออกจากกันได้ โดยเอนไซม์ *Hin*fI สามารถแยกแคปปา-เคซีนชนิด A ได้โดยเอนไซม์ *Hin*fI ทำการตัดดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ 5344-5345 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อัลลีลทั้ง 2 แบบมีความแตกต่างกัน และระหว่างตำแหน่งที่ 5476-5477 (Alexander, 1988) ซึ่งทำการตัดที่ตำแหน่งนี้ทั้งแคปปา-เคซีน ชนิด A และ B. จากการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีแคปปา-เคซีนชนิด A ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 134, 132 และ 85 bp เมื่อนำมาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิสปรากฏแถบ (band) ออกเป็น 2 แถบ ดังแสดงในช่องที่ 7 ดังรูป เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 134 bp และ 132 bp มีขนาดใกล้เคียงกันมากจึงปรากฏเพียง 1 แถบ และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 85 bp เห็นไม่ชัด เนื่องจากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นมาก แต่ถ้าเป็นแคปปา-เคซีน ชนิด B เอนไซม์ *Hin*fI จะทำการตัดสายดีเอ็นเอเพียงจุดเดียวทำให้ได้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 266 และ 85 bp ดังแสดงในช่องที่ 10 ดังรูป และเอนไซม์ *Hin*dIII สามารถแยกแคปปา-เคซีนชนิด B ออกจากชนิดอื่น ๆ โดยเอนไซม์ *Hin*dIII ทำการตัดดีเอ็นเอของแคปปา-เคซีนชนิด B ระหว่างตำแหน่งที่ 5342-5343 (Alexander, 1988) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วน คือ 132 และ 219 bp เมื่อนำมาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธิอิเล็คโตรโฟรีซิสปรากฏแถบออกเป็น 2 แถบดังช่องที่ 9 ดังรูป แต่ถ้าเป็นแคปปา-เคซีน ชนิด A เอนไซม์ *Hin*dIII จะไม่ตัดสายดีเอ็นเอทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับสายดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ (control) จึงปรากฏเป็นแถบเดียวดังช่องที่ 6 ใน ดังรูป

จำนวนของจีโนไทป์ที่ทำการตรวจพบแสดงใน **ตารางที่** 7 และเมื่อนำไปคำนวณเป็นจำนวนอัลลีลจะได้ค่าดัง **ตารางที่** 8

ตารางที่ 7 จำนวนจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนแบ่งตามกลุ่มจีโนไทป์ AA, AB และ BB

กลุ่มของจีโนไทป์	พันธุ์แท้	ลูกผสม	ทั้งหมด*
AA	7	30	37
AB	6	15	21
BB	2	-	2
รวม	15	45	60

*รวมจำนวนของทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์

ตารางที่ 8 จำนวนอัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A และ B

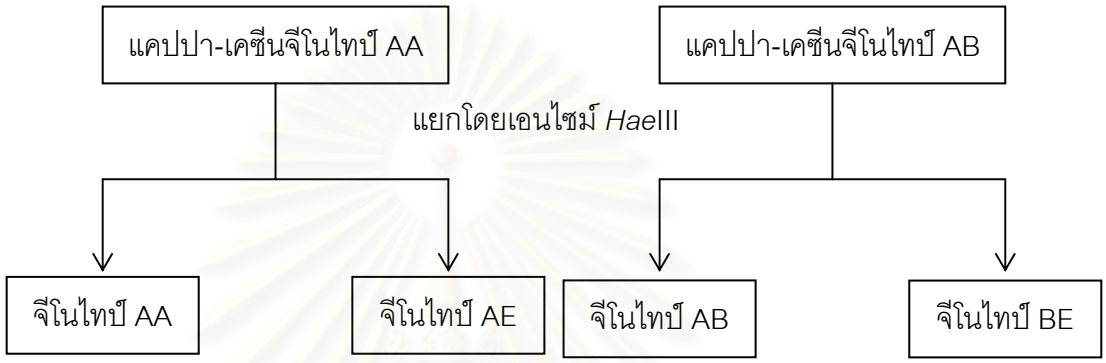
อัลลีล	พันธุ์แท้	ลูกผสม	ทั้งหมด*
A	20	75	95
B	10	15	25
รวม	30	90	120

*รวมจำนวนของทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์

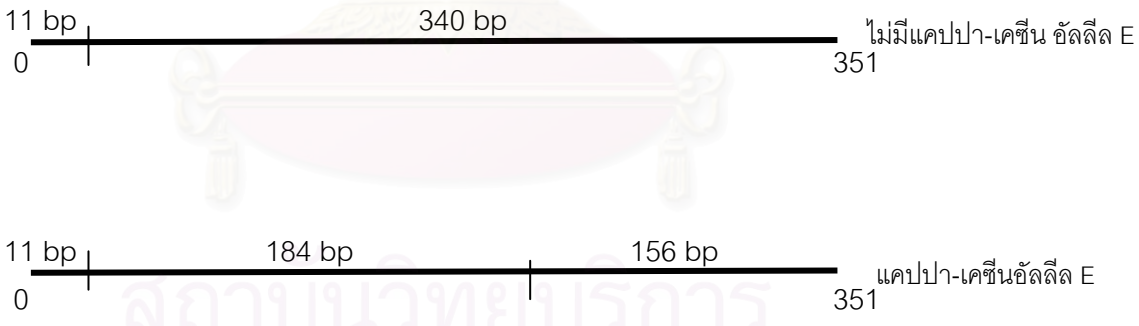
แต่เนื่องจากแคปปา-เคซีนชนิด E, F และ G ไม่สามารถแยกออกจากชนิด A ได้โดยเอนไซม์ *Hin*fI และ แคปปา-เคซีนชนิด C ไม่สามารถแยกออกจากชนิด B ได้โดยใช้เอนไซม์ *Hin*dIII จึงจำเป็นต้องตรวจหาแคปปา-เคซีนชนิด C, E, F และ G ต่อไป

4.1.4 ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนโดยเอนไซม์ *Hae*III

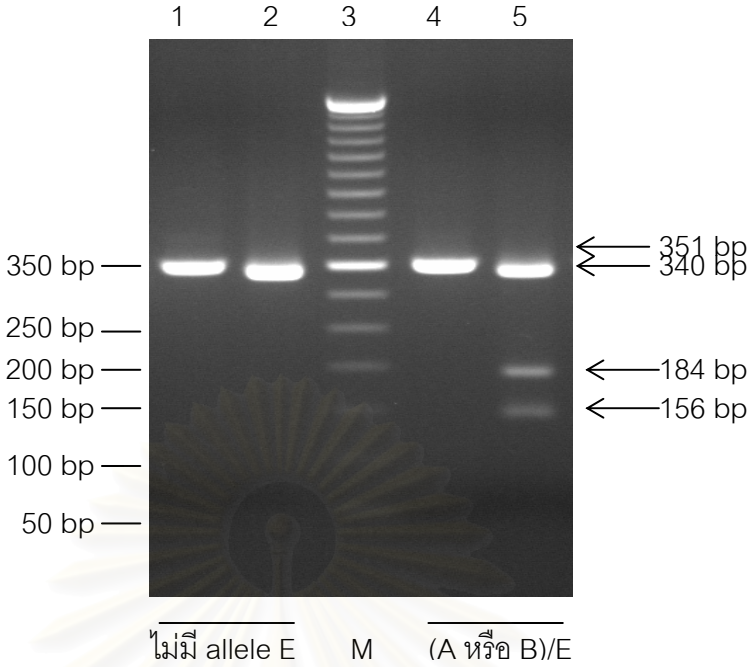
ทำการตรวจหาแคปปา-เคซีนชนิด E โดยใช้เอนไซม์ *Hae*III โดยทำในกลุ่มจีโนไทป์ AA และ AB เพื่อแยกแคปปา-เคซีนชนิด E ออกจากชนิด A ดังแสดงใน **รูปที่ 14** โดยในการวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้ สามารถจำแนกจีโนไทป์ออกเพิ่มอีก 2 แบบได้แก่ AE และ BE โดยไม่พบจีโนไทป์ EE



รูปที่ 14 ผลที่ได้หลังจากการแยกด้วยเอนไซม์ *Hae*III



รูปที่ 15 ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III



รูปที่ 16 แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III โดยช่องที่ 3 คือ Marker (M) ขนาด 50-bp. ช่องที่ 1 และ 4 เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ (control; C). ช่องที่ 2 และ 5 แสดงแถบ (band) ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hae*III โดยช่องที่ 5 มีแคปปา-เคซีนชนิด E อยู่ 1 อัลลีล

โดยในพ่อพันธุ์ที่มีแคปปา-เคซีนชนิด E จะถูกเอนไซม์ *Hae*III ตัดสายดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ 5221-5222 และระหว่างตำแหน่งที่ 5366-5367 (Alexander, 1988) และจากการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 351 bp ที่ได้มาจากข้อ 4.1.2.1 ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 11, 184 และ 156 bp (**รูปที่ 15**) เมื่อนำมาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธิอิเล็คโตรโฟริซิสปรากฏแถบออกเป็น 2 แถบ ดังช่องที่ 5 ดัง**รูปที่ 16** แต่เนื่องจากการตัดนี้เป็นการตัดสายดีเอ็นเอ 2 สายหรือเป็นการหาจีโนไทป์ เมื่ออีกสายดีเอ็นเออีกสายไม่ใช่แคปปา-เคซีนชนิด E จึงทำให้ปรากฏเป็น 3 แถบ โดยแถบที่มีขนาด 340 bp เป็นสายที่ไม่ใช่แคปปา-เคซีนชนิด E. จากการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่มีแคปปา-เคซีนชนิด E เอนไซม์ *Hae*III จะทำการตัดที่สายดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ 5221-5222 เพียงตำแหน่งเดียว ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 11 และ 340 bp เมื่อนำมาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธิอิเล็คโตรโฟรีซิสปรากฏแถบออกเพียง 1 แถบ เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 11 bp มีขนาดเล็กมากจึงไม่ปรากฏแถบให้เห็น

หลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III ตรวจพบว่าในฝูงพ่อพันธุ์โคนมที่นำมาตรวจหาชนิดของแคปปา-เคซีน มีแคปปา-เคซีนชนิด E และแสดงจำนวนของจีโนไทป์ที่ตรวจพบและคำนวณเป็นจำนวนของอัลลีลดัง **ตารางที่** 9 และ **ตารางที่** 10 ตามลำดับ

ตารางที่ 9 จำนวนจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนที่ตรวจพบหลังตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III

กลุ่มของจีโนไทป์	พันธุ์แท้	ลูกผสม	ทั้งหมด*
AA	5	25	30
AB	6	12	18
BB	2	-	2
AE	2	5	7
BE	-	3	3
รวม	15	45	60

*รวมจำนวนของทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์

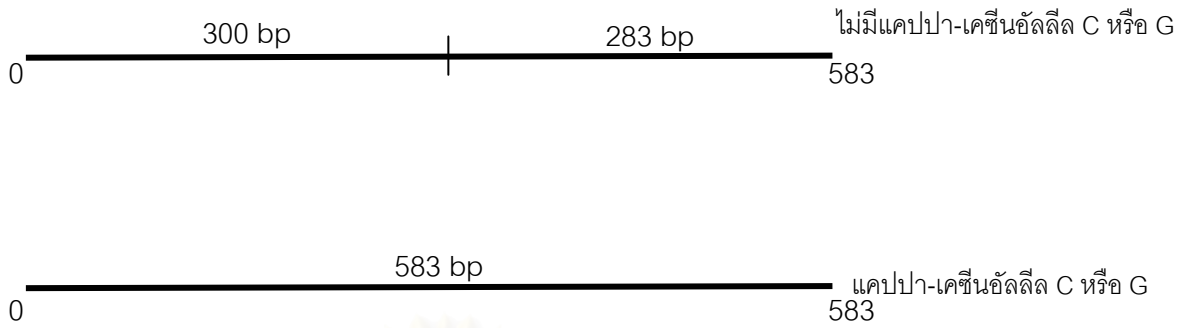
ตารางที่ 10 จำนวนอัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E

อัลลีล	พันธุ์แท้	ลูกผสม	ทั้งหมด*
A	18	67	85
B	10	15	25
E	2	8	10
รวม	30	90	120

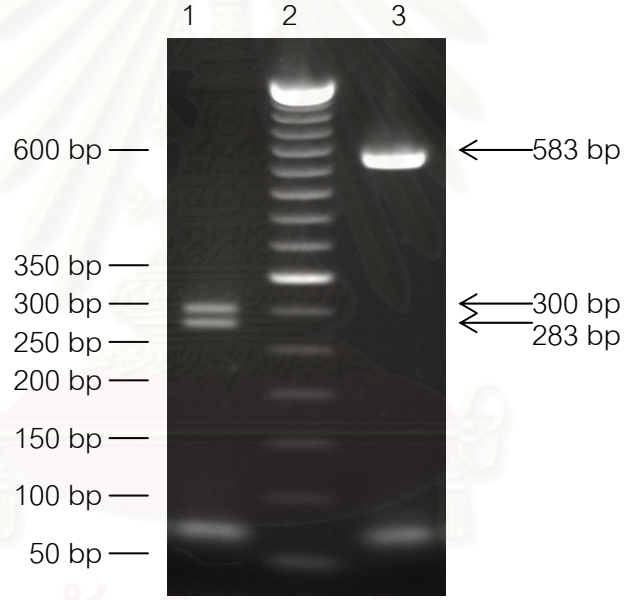
*รวมจำนวนของทั้ง 2 กลุ่มพันธุ์

4.1.5 ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนโดยเอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II)

ทำการตรวจหาแคปปา-เคซีนชนิด C และ G โดยใช้เอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II) โดยทำในกลุ่มจีโนไทป์ AA, AB และ BB เพื่อแยกแคปปา-เคซีนชนิด C ออกจากชนิด B และแยกแคปปา-เคซีนชนิด G ออกจากชนิด A โดยในพ่อพันธุ์ที่มีแคปปา-เคซีนชนิด C และ/หรือ G เอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II) จะไม่ทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 583 bp ที่ได้จากข้อ 4.1.2.2 ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ แต่ในพ่อพันธุ์ที่ไม่มีแคปปา-เคซีนชนิด C และ/หรือ G เอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II) จะตัดสายดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ 5190-5191 (Alexander, 1988) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 300 และ 283 bp (**รูปที่** 17) เมื่อนำมาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซิสปรากฏแถบออกเป็น 2 แถบ ดังแสดงในช่องที่ 1 ใน**รูปที่** 18



รูปที่ 17 ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II)



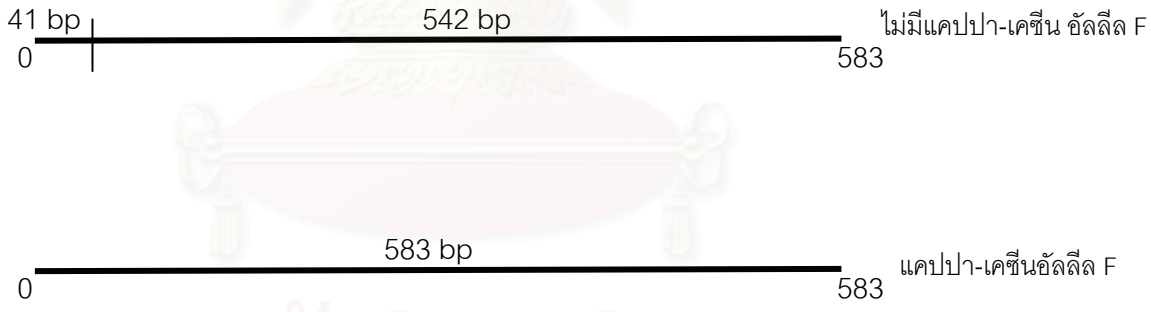
รูปที่ 18 แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II) โดยช่องที่ 2 คือ Marker (M) ขนาด 50-bp. ช่องที่ 1 แสดงแถบ (band) ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hpy*CH4 IV (*Mae*II) หรือพ่อพันธุ์ที่ไม่มีแคปปา-เคซีนชนิด C และ/หรือ G. ช่องที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ (control) หรือพ่อพันธุ์ที่มีแคปปา-เคซีนชนิด C และ/หรือ G.

จากการตรวจหาทั้งหมดไม่พบแคปปา-เคซีนชนิด C และ/หรือ G ทำให้มีจำนวนของจีโนไทป์และจำนวนของอัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน เท่ากับ **ตารางที่** 9 และ **ตารางที่** 10

4.1.6 ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนโดยเอนไซม์ *Hha*I

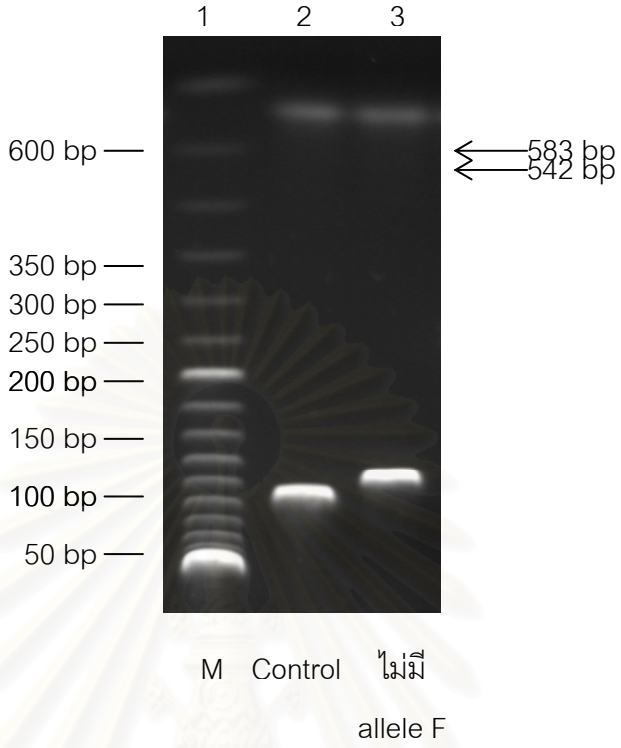
ทำการตรวจหาแคปปา-เคซีนชนิด F โดยใช้เอนไซม์ *Hha*I โดยทำในกลุ่มจีโนไทป์ AA และ AB เพื่อแยกแคปปา-เคซีนชนิด F ออกจากชนิด A โดยในพ่อพันธุ์ที่มีแคปปา-เคซีนชนิด F เอนไซม์ *Hha*I จะไม่ทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 583 bp ที่ได้จากข้อ 4.1.2.2 ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ แต่ในพ่อพันธุ์ที่ไม่มีแคปปา-เคซีนชนิด F เอนไซม์ *Hha*I จะตัดสายดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ 4931-4932 (Alexander, 1988) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 41 และ 542 bp (**รูปที่ 19**)เมื่อนำมาแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสปรากฏแถบเพียง 1 แถบ (**รูปที่ 20**) แต่จะไม่ปรากฏแถบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 41 bp เนื่องจากมีขนาดเล็กมาก

จากการตรวจหาจากกลุ่มจีโนไทป์ AA และ AB ไม่พบแคปปา-เคซีนชนิด F ทำให้มีจำนวนของจีโนไทป์และจำนวนของอัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน เท่ากับ **ตารางที่** 9 และ **ตารางที่** 10



รูปที่ 19 ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 แสดงรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I โดยช่องที่ 1 คือ Marker (M) ขนาด 50 bp. ช่องที่ 2 เป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ใด ๆ (control) หรือที่มีแคปปา-เคซีนชนิด F.ช่องที่ 3 แสดงแถบ (band) ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hha*I หรือพ่อพันธุ์ที่ไม่มีแคปปา-เคซีนชนิด F

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 **ความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน**

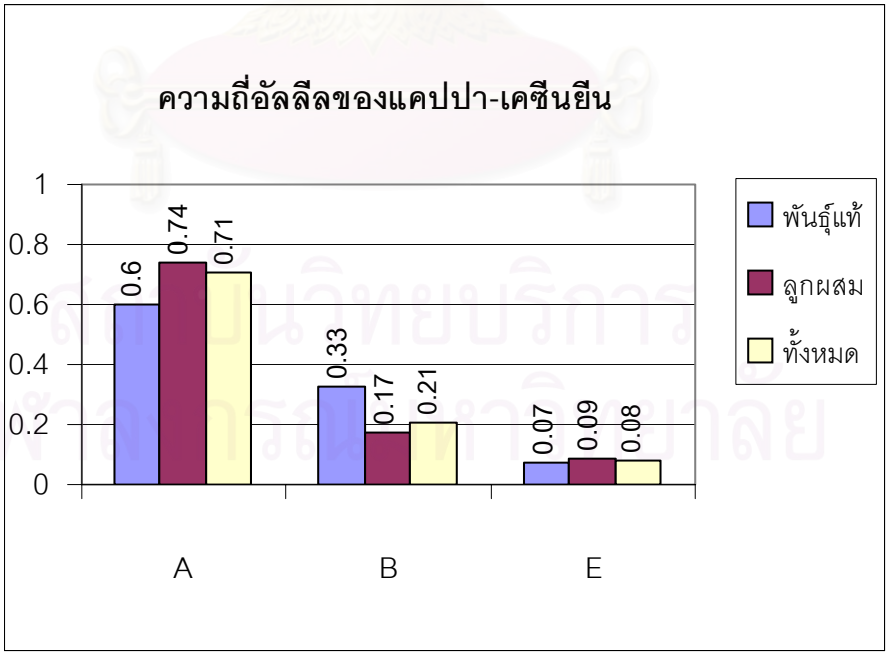
จากการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน โดยวิธี PCR-RFLP เมื่อนำจำนวนอัลลีลมาคำนวณเป็นความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน ชนิด A, B และ E ได้ผลดัง **ตารางที่ 11** และเมื่อทดสอบความแตกต่างของความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสมโดยวิธี chi-square test ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสม เมื่อนำไปพล็อตกราฟจะได้กราฟดังแสดงใน **รูปที่ 21**

ตารางที่ 11 ความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E

อัลลีล	พันธุ์แท้	ลูกผสม	ทั้งหมด*
A	0.60	0.74	0.71
B	0.33	0.17	0.21
E	0.07	0.09	0.08

χ^2 = 3.796; α=0.05, df = 2

*ความถี่อัลลีลคำนวณจากทั้งกลุ่มประชากร



รูปที่ 21 แสดงความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน

4.3 ความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

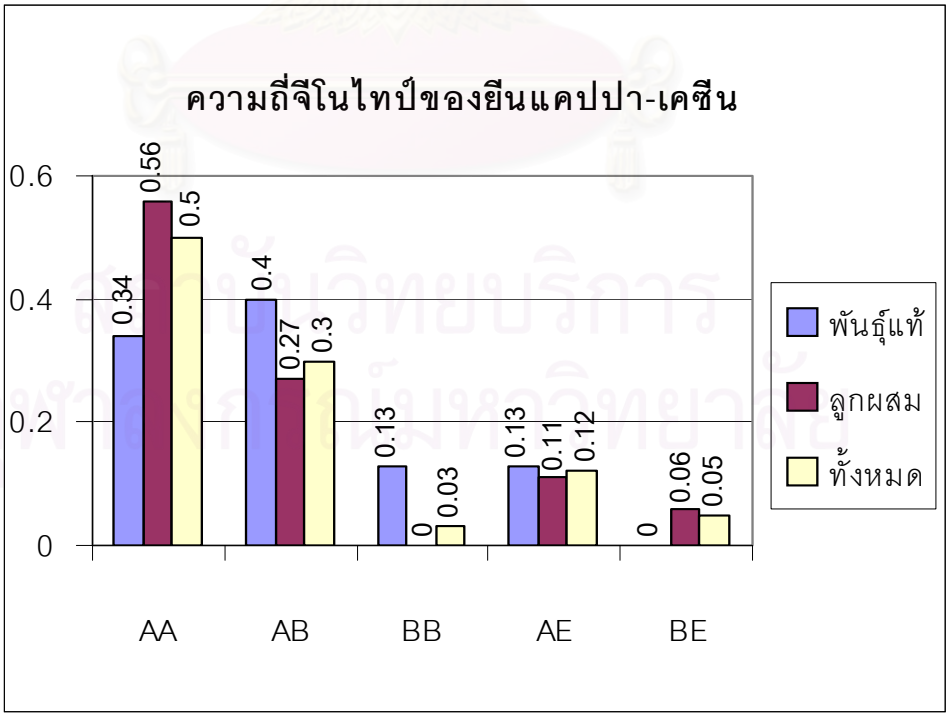
จากการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน โดยวิธี PCR-RFLP ตรวจพบจีโนไทป์ 5 แบบ คือ AA, AB, BB, AE และ BE เมื่อนำมาคำนวณเป็นความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน ได้ผลดัง **ตารางที่** 12 และเมื่อทดสอบความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์ระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสมโดยวิธี chi-square test ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสม เมื่อนำไปพล็อตกราฟจะได้กราฟดังแสดงใน **รูปที่** 22

ตารางที่ 12 ความถี่จีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมที่ทำการวิเคราะห์

กลุ่มของจีโนไทป์	พันธุ์แท้	ลูกผสม	ทั้งหมด*
AA	0.34	0.56	0.50
AB	0.40	0.27	0.30
BB	0.13	0	0.03
AE	0.13	0.11	0.12
BE	0	0.06	0.05

χ^2 = 8.825; α=0.05, df = 4

*ความถี่จีโนไทป์คำนวณจากทั้งกลุ่มประชากร



รูปที่ 22 แสดงความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการตรวจหาชนิดและจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อใช้ในการผสมเทียมของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ จำนวน 60 ตัว ได้ผลสรุปและอภิปรายผลไว้ดังนี้

5.1 วิธีการจำแนกจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน

จากการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเฉลี่ยมีค่า 290.29 μg/ml ซึ่งมากพอต่อการทำงานในปฏิกิริยา PCR และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มากพอในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป มีค่า Ratio ของ A_{260}/ A_{280} เฉลี่ยอยู่ที่ 1.514 โดยค่า Ratio นี้เป็นตัวบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีค่า Ratio ประมาณ 1.8-2.0 แต่ดีเอ็นเอที่ได้นี้พบว่ามีค่า Ratio น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีสารประกอบอื่นปนเปื้อนอยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอเนื่องจากไม่มีขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอออกมาจึงทำให้มีการปนเปื้อนของสารประกอบอื่น ๆ เช่น โปรตีน อยู่ในตัวอย่างทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์น้อย แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่เป็นปัญหาในการดำเนินงานในขั้นตอนต่อไปและสามารถวิเคราะห์ผลออกมาได้อย่างดี

ในการตรวจหาจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) พบว่าการจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ โดยใช้ไพรเมอร์ KCN1F และ KCN1R ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ในขนาด 351 bp ซึ่งในส่วนนี้จะครอบคลุมตำแหน่งที่ทำให้เกิดการผันแปรไปเป็นแคปปา-เคซีนชนิด A, B หรือ E และการจำแนกชนิดของแคปปา-เคซีนชนิด C,F และ G จะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้โดยใช้ไพรเมอร์ KP1 และ KP2 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ในขนาด 583 bp ซึ่งในส่วนนี้จะครอบคลุมตำแหน่งที่ทำให้เกิดการผันแปรไปเป็น แคปปา-เคซีนชนิด C, F หรือ G ด้วย ในการนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปใช้ในขั้นตอนต่อไปนั้นไม่ได้มีการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ ดังนั้นหลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCRแล้ว ควรนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปใช้โดยทันที เนื่องจากการเก็บผลิตภัณฑ์ PCR โดยไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์นั้น อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดนทำลายจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ในการเลือกใช้ไพรเมอร์จากการศึกษาพบว่าถ้าต้องการคัดเลือกแคปปา-เคซีนชนิด B สามารถใช้ไพรเมอร์ KCN 1F และ KCN 1R ในการทำ

ปฏิกิริยาได้ โดยสามารถใช้เอนไซม์ในการจำแนกแคปปา-เคซีนชนิด B คือ *Hin*fI หรือ *Hin*dIII และในการหาความผันแปรของแคปปา-เคซีนทุกชนิด คือ A, B, C, E, F และ G ควรใช้ไพรเมอร์ KP 1 และ KP 2 ในการจำแนกเนื่องจากครอบคลุมในส่วนของแคปปา-เคซีนชนิด C, F และ G ด้วย และเอนไซม์ที่ใช้ตัดจำเพาะจะใช้ 4 ชนิดคือ *Hin*fI หรือ *Hin*dIII, *Hpy*CH4 IV (*Mae*II), *Hae*III และ *Hha*I การแยกแคปปา-เคซีนชนิด A และ B ออกจากกันนั้นสามารถใช้เอนไซม์ *Hin*fI หรือ *Hin*dIII ก็ได้ เนื่องจากการใช้เอนไซม์ 2 ชนิดทำเพื่อเป็นการยืนยันการทำงานของเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นการแยกแคปปา-เคซีนชนิด A และ B ออกจากกันนั้นสามารถใช้เอนไซม์ตัวใดก็ได้ แต่ต้องมีการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ก่อนทำการตัดเสมอ ซึ่งสอดคล้องกับ Barroso *et al.* (1998) ที่ใช้เพียงเอนไซม์ *Hin*fI ในการแยกแคปปา-เคซีนชนิด A และ B ออกจากกัน

5.2 ชนิดและจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน

ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบแคปปา-เคซีน 3 ชนิด ได้แก่ แคปปา-เคซีน ชนิด A, B และ E โดยแคปปา-เคซีนชนิด A และ B มีกระจายในทุกสายพันธุ์ เช่น พันธุ์ Holstein-Friesian ทั้งในประเทศ สหรัฐอเมริกา(Bobe *et al.,*1999 ; Eenennaam and Medrano,1991 ; Hines *et al.,*1979) , ประเทศแคนาดา (Masoudi *et al.,* 1994 ; Ng-Kwai-Hang,1990) ซึ่งสอดคล้องกับต้นกำเนิดพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียมที่มีแหล่งกำเนิดมาจากสายพันธุ์ Holstein-Friesian ที่มาจากประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศแคนาดา นอกจากนี้ตรวจพบแคปปา-เคซีนชนิด E ในประชากรโดยพบในกลุ่มลูกผสม ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากพ่อพันธุ์โคนมที่ได้มาส่วนใหญ่มาจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งจากต่างประเทศผสมกับแม่พันธุ์พื้นเมืองในประเทศจึงทำให้พันธุ์ประวัติของพ่อโคไม่สมบูรณ์ในทางสายแม่หรือไม่มีประวัติทางสายแม่ จึงเป็นไปได้ว่าอัลลีล E ที่ปรากฏในกลุ่มลูกผสมได้มาจากทางสายแม่มากกว่าทางสายพ่อ เพราะจากการตรวจเอกสารพบว่าอัลลีล E ปรากฏเพียงในพันธุ์ Finnish Aryshire ในประเทศฟินแลนด์ (Ikonen *et al.,* 1996) และในพันธุ์เดียวกันในประเทศนอร์เวย์ (Lien *et al.,* 1997) ส่วนอัลลีล E ที่พบในกลุ่มพันธุ์แท้ พบว่ามาจากโคพันธุ์ Holstein-Friesian ที่นำเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่น โดยมีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygote ทั้ง 2 ตัวที่นำเข้ามา คือ AE ทั้งคู่ และจากการตรวจเอกสารไม่พบรายงานใดที่กล่าวถึง อัลลีล E ในพันธุ์ Holstein-Friesian จึงคาดว่าพ่อโคที่นำเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่นไม่ใช่พ่อโคพันธุ์ Holstein-Friesian แท้ ในส่วนของจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนที่ตรวจพบ พบว่ามีจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน 5 แบบ คือ AA, AB, BB, AE และ BE จากผลการศึกษาไม่พบจีโนไทป์ EE ในประชากร โดยจีโนไทป์ AA, AB และ BB ปรากฏในทุกสายพันธุ์ ทั้งใน *Bos Taurus* เช่น Holstein-Friesian

(Aleandri *et al.,* 1990 ; Bobe *et al.,* 1999 ; Eenennaam and Medrano, 1991 ; Hines *et al.,* 1979 ; Masoudi *et al.,* 1994 ; Ng-Kwai-Hang, 1990), Jersey (Eenennaam and Medrano, 1991) เป็นต้น และ ใน *Bos Indicus* เช่น พันธุ์ Sahiwal, Zebu (Jairam and Nair, 1983 ; Malik *et al.,* 1994) เป็นต้น การที่ไม่พบจีโนไทป์ EE ในประชากรนั้นอาจเนื่องมาจากต้นกำเนิดพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียมมีแหล่งกำเนิดมาจากสายพันธุ์ Holstein-Friesian ซึ่งจากการตรวจเอกสารไม่พบอัลลีล E ในสายพันธุ์นี้ แต่เมื่อนำมาผสมกับแม่โคในประเทศซึ่งมีแหล่งที่มาไม่ชัดเจน คือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจึงทำให้จีโนไทป์ที่เกิดขึ้นเป็น heterozygote ที่มีอัลลีล E ประกอบอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามโคสายพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับยีนแคปปา-เคซีนว่าส่วนใหญ่พบชนิดใดหรือมีการกระจายตัวเป็นอย่างไร

5.3 **ความถี่อัลลีลของยีนแคปปา-เคซีน**

จากการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน ทำให้ทราบถึงชนิดหรืออัลลีลของแคปปา-เคซีนที่พบในฝูงพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม โดยพบ 3 ชนิดคือ อัลลีล A, B และ E เมื่อทำการเปรียบเทียบความถี่อัลลีล (allelic frequency) ของแต่ละความถี่อัลลีลระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และลูกผสมโดยใช้ chi-square test ไม่พบความแตกต่างในทางสถิติ (P>0.05) คืออัลลีล A เป็น 0.60 ในกลุ่มพันธุ์แท้ และ 0.74 ในกลุ่มลูกผสม อัลลีล B เป็น 0.33 ในกลุ่มพันธุ์แท้ และ 0.17 ในกลุ่มลูกผสม อัลลีล E เป็น 0.07 ในกลุ่มพันธุ์แท้และ 0.09 ในกลุ่มลูกผสม (**ตารางที่ 13**) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเป้าหมายสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์โคนมมุ่งเน้นในด้านปริมาณน้ำนมเป็นหลัก แต่พบว่าแนวโน้มความถี่อัลลีล B ในกลุ่มพันธุ์แท้มากกว่ากลุ่มลูกผสม คือ 0.33 และ 0.17 ในกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสมตามลำดับ เนื่องจากเป้าหมายรองในการปรับปรุงพันธุ์โคนมจะพิจารณาถึงองค์ประกอบในน้ำนมเป็นลำดับต่อมาก็คือ ปริมาณไขมัน และปริมาณโปรตีนจึงทำให้แนวโน้มของความถี่ของอัลลีล B ในกลุ่มพันธุ์แท้มีแนวโน้มที่มากกว่าในกลุ่มลูกผสม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 จำนวนและความถี่อัลลีลของแคปปา-เคซีนชนิด A, B และ E

อัลลีล	พันธุ์แท้		ลูกผสม		ทั้งหมด[1]	
	จำนวน	AF[2]	จำนวน	AF[2]	จำนวน	AF[2]
A	18	0.60	67	0.74	85	0.71
B	10	0.33	15	0.17	25	0.21
E	2	0.07	8	0.09	10	0.08

[1]ความถี่อัลลีลคำนวณจากทั้งกลุ่มประชากร

[2]AF = ความถี่อัลลีล (allelic frequency)

และเมื่อนำจำนวนอัลลีลของกลุ่มพันธุ์แท้และกลุ่มลูกผสมมารวมกันแล้วคิดเป็นความถี่อัลลีลของทั้งประชากร พบว่ามีความถี่ 0.71 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานต่าง ๆ ที่แสดงดัง **ตารางที่** 2 พบว่าความถี่อัลลีล A มีความถี่มีค่าอยู่ระหว่าง พันธุ์ Holstein-Friesian (*Bos taurus*) และ โคซีบู (*Bos indicus)* ซึ่งมีความถี่ของอัลลีล A อยู่ในช่วงที่ 0.67-0.82 และความถี่ของอัลลีล B มีค่าความถี่ 0.21 ซึ่งเป็นความถี่ที่อยู่ระหว่างพันธุ์ Holstein-Friesian (*Bos taurus)* และโคซีบู (*Bos indicus*) ซึ่งมีช่วงความถี่ของอัลลีล B ระหว่าง 0.18-0.33 ซึ่งสอดคล้องกันกับประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่เป็นลูกผสมระหว่าง *Bos taurus* และ *Bos indicus*ทั้งความถี่อัลลีล A และ B และจากการศึกษาพบว่าอัลลีล A เป็นอัลลีลที่พบโดยส่วนมากในประชากรนี้ ตามด้วยอัลลีล B และอัลลีล E ตามลำดับ จากผลที่ได้ควรมีการคัดเลือกอัลลีล B เข้ามาในประชากรเพื่อปรับปรุงปริมาณโปรตีนและคุณภาพของโปรตีนในน้ำนมให้ดีขึ้น โดยทำการคัดเลือกพ่อโคที่มีจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนเป็น BB เข้าสู่ประชากร ซึ่งในหลายประเทศได้บรรจุจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนใน sire summary เช่น ประเทศฝรั่งเศส (www.normandegenetic.com) เป็นต้น

5.5 ความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

จากจำนวนจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีนที่พบ คำนวณเป็นความถี่จีโนไทป์ (genotypic frequency) พบว่าความถี่จีโนไทป์ AA, AB, BB, AE และ BE คือ 0.34, 0.40, 0.13, 0.13 และ 0 ตามลำดับในกลุ่มพันธุ์แท้ และ 0.56, 0.27, 0, 0.11 และ 0.06 ตามลำดับในกลุ่มลูกผสม (**ตารางที่** 14) เมื่อทำการเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์แต่ละแบบระหว่างกลุ่มพันธุ์แท้และลูกผสม โดยใช้ chi-square test ไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 14 จำนวนและความถี่จีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน แบบ AA, AB, BB, AE และ BE

จีโนไทป์	พันธุ์แท้		ลูกผสม		ทั้งหมด[1]	
	จำนวน	GF[2]	จำนวน	GF[2]	จำนวน	GF[2]
AA	5	0.34	25	0.56	30	0.50
AB	6	0.40	12	0.27	18	0.30
BB	2	0.13	-	0	2	0.03
AE	2	0.13	5	0.11	7	0.12
BE	-	0	3	0.06	3	0.05

[1]ความถี่จีโนไทป์คำนวณจากทั้งกลุ่มประชากร

[2]GF = ความถี่จีโนไทป์ (genotypic frequency)

จาก**ตารางที่ 14** พบว่าในกลุ่มของพันธุ์แท้ มีแนวโน้มการนำเข้าโคจากภายนอกสูงกว่ากลุ่มลูกผสม โดยพิจารณาจากจีโนไทป์ที่เป็น heterozygote คือ AB, AE และ BE พบว่ามีความถี่จีโนไทป์รวมกันของทั้ง 3 จีโนไทป์สูงถึง 0.53 ในขณะที่กลุ่มลูกผสมมีจีโนไทป์ที่เป็น heterozygote คือจีโนไทป์ AB, AE และ BE รวมกันมีความถี่จีโนไทป์คือ 0.43 ทำให้ทราบว่ามีการนำเข้าของโคเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในกลุ่มพันธุ์แท้สูงกว่าในลูกผสม และเมื่อดูรวมทั้งประชากรพบว่า มีจีโนไทป์ที่เป็น heterozygote คือจีโนไทป์ AB,AE และ BE รวมกันทั้ง 3 จีโนไทป์คือ 0.47 ซึ่งถือว่าสูงมาก โดยทำการเปรียบเทียบจากรายงานของ Lara *et al.* (2002) ซึ่งรายงานถึงระดับ heterozygosity ที่ได้จากความถี่จีโนไทป์ที่เป็น heterozygote ไว้ที่ 0.368 ที่แสดงให้เห็นว่าในประชากรนั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงหรือมีการนำเข้าพันธุกรรมจากภายนอกสูงนั่นเอง ซึ่งสอดคล้องจากการศึกษาในครั้งนี้ที่บ่งชี้ได้ว่าพ่อพันธุ์ในประชากรที่นำมาวิเคราะห์มีพันธุกรรมที่ได้มาจากภายนอกสูง

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนในฝูงพ่อพันธุ์โคนมโดยวิธี PCR-RFLP ทำให้ทราบถึงจีโนไทป์ของพ่อโคเป็นรายตัว ดังนั้นในการคัดเลือกพ่อโคในการผสมพันธุ์ควรคัดเลือกพ่อโคที่มีจีโนไทป์ BB หรือ AB เพื่อที่จะได้มีอัลลีล B กระจายสู่ประชากรพื้นฐานของประเทศ เพื่อเพิ่มปริมาณของโปรตีนในน้ำนม และให้คุณภาพของโปรตีนในน้ำนมเหมาะสมต่อขบวนการแปรรูปน้ำนมไปเป็นผลิตภัณฑ์นม โดยแนวโน้มในปัจจุบันพบว่ามีบริษัทเอกชนบางแห่งพิจารณาถึงองค์ประกอบในน้ำนมเพื่อให้ราคาน้ำนมดิบสูงขึ้น เพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นม และเนื่องจากปริมาณแคปปา-เคซีนเกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตเนยแข็ง (cheese) ซึ่งในปัจจุบันทาง

องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ได้เปิดช่องทางผู้ประกอบการเอกชนซื้อน้ำนมดิบเพื่อนำไปผลิตชีสมอซซาเรลลา (mozzarella cheese) ป้อนร้านพิซซ่าทั้งในและต่างประเทศ เพื่อระบายน้ำนมดิบเกษตรกรสู่ตลาด ล่าสุดโรงงานผลิตภัณฑ์นม อ.ส.ค. ภาคใต้ จ. ประจวบคีรีขันธ์ ได้ผลิตชีสให้กับร้านพิซซ่าและร้านอาหารฝรั่งในประเทศ ซึ่งจากเดิมผลิตภัณฑ์ดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศออสเตรเลีย เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหรรมอาหารในประเทศ (ศิริพร, 2545) ดังนั้นจึงเป็นแนวทางในการใช้แคปปา-เคซีนจีโนไทป์ในการปรับปรุงพันธุ์โคนมทางด้านปริมาณแคปปา-เคซีน ปริมาณโปรตีนในน้ำนม และ คุณภาพของโปรตีนในน้ำนม เพื่อเพิ่มมูลค่าของน้ำนมดิบของเกษตรกร รวมถึงเป็นแนวทางในการลดปัญหาน้ำนมดิบล้นตลาด เช่น ช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ของปี 2546 ที่มีปริมาณน้ำนมดิบล้นถึง 355.5 ตันต่อวัน จากการที่ปริมาณน้ำนมดิบไม่สามารถเข้าสู่ระบบนมโรงเรียนได้และเพื่อลดการนำเข้าของผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศที่ทำให้ประเทศต้องขาดดุลการค้า (สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี, 2546)

5.6 **ข้อเสนอแนะ**

จากการตรวจหาจีโนโทป์ของแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนม ทำให้ทราบถึงชนิดและการกระจายตัวของอัลลีลต่าง ๆ ของแคปปา-เคซีน ซึ่งการใช้ประโยชน์จะเป็นการใช้จีโนไทป์ของแคปปา-เคซีนเพื่อคัดเลือกเป็นรายตัวเพื่อที่ปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนในน้ำนมของฝูงโคนมให้เหมาะสมต่อการนำน้ำนมไปผลิตเป็นเนยแข็ง (cheese) เพื่อเพิ่มมูลค่าของน้ำนมดิบของเกษตรกร นอกจากนี้ควรมีการศึกษาต่อถึง ชนิดและความถี่ของยีนแคปปา-เคซีนของฝูงโคนมพื้นฐานในประเทศ เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปหาผลกระทบของยีนแคปปา-เคซีนต่อลักษณะต่าง ๆ ทางด้านผลผลิตนม เช่น ปริมาณนม, ไขมันนม เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สำนักพัฒนาการปศุสัตว์และถ่ายทอดเทคโนโลยี. 2546. สถานการณ์การผลิต การตลาด และแนวโน้ม, กรมปศุสัตว์. แหล่งที่มา : http://www.dld.go.th/situa/rp_dairy.html.

ศิริพร ผิวนิล. 2545. สาระจากclipping. จดหมายข่าวโคนม ปีที่ 6 ฉ. 6 :15.

ภาษาอังกฤษ

Aleandri R., L.G. Buttazzoni and J.C. Schneider. 1990. The Effect of Milk Protein Polymorphism on Milk Components and Cheese-Producing Ability. J. Dairy Sci. 73:241-255.

Alexander L.J., A.F. Stewart, A.G. Mackinlay, T.V. Kapelinskaya, S.I. Gorodetsly. 1988. Isolation and Characterization of The Bovine Kappa-casein Gene. Eur. J. Biochem. 178 : 395-401. GenBank Accession No. P02668 and X14908.

Baev A.A., I.K. Smirnov and S.I. Gorodetsky. 1987. Primary structure of bovine beta-casein cDNA. Mol. Biol. (Mosk) 21 : 214-222. GenBank Accession No.P02666.

Barroso A., S. Dunner, and J. Canon. 1998. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-casein Variants A, B, C, and E by Mean of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). J. Anim. Sci. 76 : 1535-1538.

Bobe G., D.C. Beitz, A.E. Freeman, and G.L. Lindberg. 1999. Effect of Milk Protein Genotypes on Milk Protein Composition and Its Genetic Parameter Estimates. J. Dairy. Sci. 82 : 2797-2804.

Bonsing J., J.M. Ring., A.F. Stewart. and A.G. Mackinlay. 1988. Complete Nucleotide Sequence of The Bovine Beta-casein Gene. Aust. J. Biol. Sci. 41 : 527-537. MEDLINE No. 90147279.

Boyer R.F. 1993. Modern Experimental Biochemistry (2nd edition). Hope College. California. The Benjamin/Cummings Publishing Company. 555 p.

Braunschweig M. 1998. Associations Between Casein Haplotypes and Milk Traits of Braunvieh and Fleckvieh. Ph.D. Diss. ETH No. 12731, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. 140 p.

Campo P., G. Licitra, R. Gelsomino, L. Corallo, S. Carpino and D.M. Barbano. 1999. Composition of Milk from Modicana and Other Breeds of Dairy Cattle in Sicily. Milchwissenschaft-milk science international 54 (8) : 426-430.

Choi Y.J., W.L. Keller, I.E. Berg, C.S. Park, and A.G. Mackinlay. 1988. Casein Gene Expression in Bovine Mammary Gland. J. Dairy. Sci. 71 : 2898- 2903.

Cowan C.M., M.R. Dentine and T. Coyle. 1992. Chromosome Substitution Effects Associated with k-cn and B-LG in Holstein Cattle. J. Dairy. Sci. 75 : 1097-1104.

Eenennaam A.V. and J.F. Medrano. 1991. Milk Protein Polymophisms in California Dairy Cattle. J. Dairy. Sci. 74 : 1730-1740.

Erhardt G. 1989. Kappa-casein in Dairy Cows-Evidence of Another Allele (Kappa-CnE) in Different Breeds. Journal Animal Breeding and Genetics. 106 : 225-231. (abstr.)

Erhardt G. 1996. Detection of a New Kappa-casein Variant in Milk of Pinzgauer Cattle. Ani. Gen. 27 : 105-107.

FitzGerald R.J. 1997. Chapter 10 : Exploitation of Casein Variants *in* Milk Composition, Production and Biotechnology (Ed. R.A.S. Welsh, D.J.W. Burns, S.R. Davis, A.I. Popay and C.G. Prosser). Ag Research New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Limited, Hamilton, New Zealand. 153-171.

Groenen M.A.M., R.J.M. Dijkhof., A.J.M. Verstege., J.J. van der Poel. 1993. The Complete Sequence of The Gene Encoding Bovine Alpha-s2-casein. Gene. 123 : 187-193. MEDLINE No.93154583.

Ikonen T., O. Ruottinen, G. Erhardt, and M. Ojala. 1996. Allele Frequencies of The Major Milk Protein in The Finnish Ayrshire and Detection of a new K-casein variant. Ani. Gen. 27 : 179-181.

Ikonen T., M. Ojala. And O. Ruottinen. 1999. Associations Between Milk Protein Polymorphism and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows. J. Dairy. Sci. 82 : 1026-1033.

Jensen R. G. 1995. Handbook of milk composition. USA. Academic Press. Available from : http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/milkcomp.html

Joerg H. 2001. Personal contact at hannes.joerg@inw.agrl.ethz.ch

Kappeler S. 1998. Compositional and Strutural Analysis of Camel Milk Proteins with Emphasis on Protective Proteins. Ph.D. Diss. ETH No. 12947, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. 137 p.

Koczan D., G. Hobom., H.M. Seyfert. 1991. Genomic Organization of The Bovine Alpha-S1-casein Gene. Nucleic Acids Res. 19 : 5591-5596. MEDLINE No. 92051301.

Lara M.A.C., L.T. Gama, G. Bufarah, J.R.B. Sereno, E.M.L. Celegato and U.P. de Abreu. 2002. Genetic Polymorphism at The kappa-casein Locus in Pantaneiro Cattle. Arch. Zootec. 51 : 99-105.

Leone P., V. Scaltriti., S. Dangalli., A. Caroli and G. Pagnacco. 1998. Polymorphism of bovine kappa-casein : identification of allele E in Italian Brown and Italian Friesian. Proceedings 4th National Congress Biodiversity, Alghero, Italy. (abstr.)

Lien S., J. Kantanen, I. Olsaker, L.E. Holm, E. Eythorsdottir, K. Sandberg, B. Dalsgard and S. Adalsteinsson. 1999. Comparison of Milk Protein Allele Frequencies in Nordic Cattle Breeds. Ani. Gen. 30 : 85-91. (abstr.)

Lin C.Y., A.J. McAllister, K.F. Ng-Kwai-Hang, J.F. Hayes, T.R. Batra, A.J. Lee, G.L. Roy, J.A. Vesely, J.M. Wauthy and K.A. Winter. 1989. Relationships of Milk Protein Types to Lifetime Performance. J. Dairy. Sci. 72 : 3085-3090.

Mangino M. 2001. Properties of Caseins, Alpha, Beta, Kappa ,Gamma and Micelles *in* Food Science and Nutrition 822 : Food Protein. Available from : http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/822home.html

Miranda G., P. Anglade, M.F. Mahe and G. Erhardt. 1993. Biochemical Characterization of The Bovine Genetic Kappa-casein C and E variants. Ani. Gen. 24 : 27-31. (abstr.)

Mao F.C. and R.D. Bremel. 1994. Distribution of Bovine Alpha-lactalbumin and kappa-casein Genotypes in Taiwan. Proceeding 5th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production, Ontario, Canada. 7-12 August 1994. Vol. 19 : 331-332.

Ng-Kwai-Hang K.F., J.F. Hayes, J.E. Moxley and H.G. Monardes. 1984. Association of Genetic Variants of Casein and Milk Serum Proteins with Milk, Fat and Protein Production by Dairy Cattle. J. Dairy. Sci. 67 : 835-840.

Ng-Kwai-Hang K.F., H.G. Monardes and J.F. Hayes. 1990. Association Between Genetic Polymorphism of Milk Proteins and Production Traits During Three Lactations. J. Dairy. Sci. 73 : 3414-3420.

Nicholas F.W. 1996. chapter 2: Molecular Biology *in* Introduction to Veterinary Genetics. New York, USA . Oxford University Press. 317p.

Ojala M., R.F. Thomas and J.F. Medrano. 1997. Effect of Milk Protein Genotypes on The Variation for Milk Production Traits of Holstein and Jersey Cows in California. J. Dairy. Sci. 80 : 1776-1785.

Ortner M., A. Essl. And J. Solkner. 1995. On The Importance of Various Milk Protein Genotypes in Cattle Breeding. Zuchtungskunde 67 : 353-367. (abstr.)

Panaiotova M., D. Gadzhev, G. Mihailova, T. Iliev and Y. Tsvetanova. 1997. Study of The Effects of Some Genetic and Environmental Factors on The Milk Yield and Milk Composition of Milk from The Rodopi Breed. Zhivotnovdni Nauki. Suppl : 166-172. (abstr.)

Perbal B. 1988. Chapter 9 : Separation of DNA Fragments by Electrophoresis *in* A Practical Guide to Molecular Cloning (2nd edition). John Wiley and Sons, Inc. USA. 811 p.

Prinzenberg E.M., S. Hiendleder, T. Ikonen and G. Erhardt. 1996. Molecular Genetic Characterization of New Bovine kappa-casein Alleles $CSN3^F$ and $CSN3^G$ and Genotyping by PCR-RFLP. Ani. Gen. 27 : 347-349.

Prinzenberg E.M., I. Krause., G. Erhardt G. 1999. SSCP Analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). Anim. Biotechnol. 10 : 49-62. MEDLINE No.20118591.

Rincon E.J., E.C. Schermerhorn, R.E. McDowell and B.T. McDaniel. 1982. Estimation of Genetic Effects on Milk Yield and Constituent Traits in Crossbred Dairy Cattle. J. Dairy. Sci. 65 : 848-856. (abstr.)

Stewart A.F., J. Bonsing, C.W. Beattie, F. Shah, I.M. Willis and A.G. Mackinlay. 1987. Complete Nucleotide Sequences of Bovine Alpha S2- and Beta-casein cDNAs: Comparisons with Related Sequences in Other Species. Mol. Biol. Evol. 4 : 231-241. MEDLINE No.88188989.

Stewart A.F., I.M. Willis. and A.G. Mackinlay. 1984. Nucleotide Sequences of Bovine Alpha S1- and Kappa-casein cDNAs. Nucleic Acids Res. 12 : 3895-3907. MEDLINE No.84221403.

Threadgill D.W., J.E. Womack. 1990. Genomic Analysis of The Major Bovine Milk Protein Genes. Nucleic Acids Research. 18 : 6935-6942. (abstr.)

Voet D. and J.G. Voet. 1990. Biochemistry, Chapter 5: Techniques of Protein Purification. New York, USA . John Wiley and Sons. 1223 p.

Zhou J.F., D. Zadworny and U. Kuhnlein. 1991. Frequency of Kappa-casein Alleles in The Holstein Population. J. Dairy. Sci. (Suppl. 1) 74 : 283.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก. วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

- เครื่อง Microcentrifuge รุ่น EBA 12 (Hettich, Germany)
- ชุด Gel Electrophoresis ชนิด แนวนอน ประกอบด้วย
  : Power Supply รุ่น Power Pac 300 (Bio-Rad, U.S.A.)
  : Electrophoresis System รุ่น EC370M (Minicell, U.S.A.)
  รุ่น MiniGes (Wealtec, Taiwan)
- Hotplate Stirrer รุ่น HS-101 (GEM, Thailand)
- ตู้อบ Microwave รุ่น Mo-034 (Imarflex, Thailand)
- เครื่อง pH meter รุ่น CH8603 (Mettler-Toledo, Switzerland)
- เครื่อง Spectrophotometer รุ่น GeneSys5 (Spectronic, U.S.A.)
- เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR system9600 (Perkin Elmer, U.S.A.)
- เครื่อง Utraviolet Transilluminator ประกอบด้วย
  : Photodocumentation System รุ่น Photo-Print (Vilber Lourmat, France)
  : Black and White Monitor รุ่น SSM-930CE (Sony, Korea)
  : Video Graphic Printer รุ่น UP-895MD (Sony, Japan)
- เครื่อง Vortex Mixer รุ่น Vortex Genie2 (Scientific Industres, Inc, U.S.A.)
- Water Bath รุ่น W350 (Memmert, Germany)
- ตู้แช่เย็น – 20 $^{\circ}$C รุ่น FZ-189GYN (Mirage, Thailand)
- ตู้แช่เย็น – 70 $^{\circ}$C (Revco)

วัสดุวิทยาศาสตร์

- Automatic Micropipette รุ่น Pipetman ขนาด P2, P20, P100, P1000 (Gilson Inc., France)
- Centrifuge Tube 50 มล. (Corning, Canada)
- Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มล.(Sorenson, U.S.A.)
- Parafilm (Parafilm M, U.S.A.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- PCR Tube ขนาด 0.2 มล. (Sorenson, U.S.A.)
- Pipette Tips รุ่น Diamond Tips แบบ Blue Tip, Yellow Tip และ White Tip (Gilson Inc., France)
- Water Driven Vacuum Pump (Nalgene.)

ข. สารเคมี

- ผง Agarose (USB, Spain)
- Blue/Orange 6xloading dye (Promega, U.S.A.)
- Boric acid (H_3BO_3) (M&B, England)
- 1,4 Dithiothreitol (DTT; $HSCH_2(CHOH)_2CH_2SH$) (Promega, U.S.A.)
- 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, U.S.A.)
- dNTP set 100 mM : dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)
- Ethidium bromide (Sigma, U.S.A.)
- Ethylene diaminetetra acetate (EDTA; $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2.2H_2O$) (Sigma, U.S.A.)
- Oligonucleotide Primer (Microsynth, Switzerland)
- Tris-(hydroxy methyl)-aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma, U.S.A.)
- Tri-sodium citrate dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7$*340 $2H_2O$) (Merck, Germany)

ค. เอนไซม์

- *Hae*III (10U/μl) (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)
- *Hha*I (10U/μl) (Promega, U.S.A.)
- *Hin*fI (10U/μl) (Promega, U.S.A)
- *Hin*dIII (10U/μl) (Promega, U.S.A)
- *Hpy*CH4 IV (an isoschizomer of *Mae*II) (10U/μl) (Bio-Labs Inc., New England)
- *Taq* DNA polymerase (5U/μl) (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลเฉพาะตัวของพ่อพันธุ์โคนมที่นำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

No. of Sample	semen code	ระดับเลือด (เปอร์เซ็นต์)	วันเกิด	แหล่งที่มาของพ่อ	แหล่งที่มาของปู่	หมายเหตุ
1	048HF	100	25/8/1992	USA	USA	
2	050HF	100	28/11/1992	USA	USA	
3	082HF	100	5/10/1994	USA	USA	
4	084HF	100	19/10/1994	USA	USA	
5	088HF	100	5/10/1994	USA	USA	
6	089HF	100	17/10/1994	USA	USA	
7	091HF	100	3/1/1995	USA	USA	
8	100TH199	100	8/12/1997	USA	USA	
9	100TH204	100	24/1/1998	USA	USA	
10	162HF	100	23/7/1997	USA	USA	
11	180HF	100	24/11/1997	USA	USA	
12	BILL	100	10/8/1998	-	-	นำเข้าจาก GER เลี้ยงในไทย
13	E-PRIDE	100	24/11/1997	-	-	นำเข้าจาก GER เลี้ยงในไทย
14	NICK	100	6/5/1995	-	-	นำเข้าจาก JAP เลี้ยงในไทย
15	STARWING ET	100	12/7/1995	CAN	USA	นำเข้าจาก JAP เลี้ยงในไทย
16	104HF	93.75	28/5/1995	USA	USA	
17	112HF	93.75	29/8/1995	USA	USA	
18	122HF	93.75	28/5/1996	USA	USA	
19	150HF	93.75	2/12/1996	CAN	CAN	
20	167HF	93.75	19/3/1997	USA	USA	
21	186HF	93.75	26/9/1997	USA	USA	
22	187HF	93.75	9/10/1997	USA	USA	
23	93.75TH200	93.75	16/4/1998	USA	USA	
24	93.75TH203	93.75	22/2/1998	USA	USA	
25	93.25TH221	93.25	5/9/1998	-	-	ไม่มีข้อมูล
26	070HF	87.5	8/9/1993	CAN	USA	
27	107HF	87.5	19/4/1996	USA	USA	

CAN = Canada, GER = Germany, JAP = Japan, USA = United States of America

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงข้อมูลเฉพาะตัวของพ่อพันธุ์โคนมที่นำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

No. of Sample	semen code	ระดับเลือด (เปอร์เซ็นต์)	วันเกิด	แหล่งที่มาของพ่อ	แหล่งที่มาของปู่	หมายเหตุ
28	113HF	87.5	7/3/1996	USA	USA	
29	129HF	87.5	5/10/1997	USA	USA	
30	157HF	87.5	31/7/1997	USA	USA	
31	166HF	87.5	17/3/1997	USA	USA	
32	172HF	87.5	3/11/1997	USA	USA	
33	174HF	87.5	19/11/1997	CAN	CAN	
34	177HF	87.5	3/10/1997	USA	USA	
35	184HF	87.5	18/9/1997	USA	USA	
36	190HF	87.5	25/9/1997	USA	USA	
37	194HF	87.5	28/11/1997	USA	USA	
38	87.5TH197	87.5	4/4/1998	USA	USA	
39	87.5TH201	87.5	2/5/1998	USA	USA	
40	87.5TH207	87.5	6/3/1998	USA	USA	
41	87.5TH213	87.5	21/12/1998	USA	USA	
42	87.5TH214	87.5	17/8/1998	USA	USA	
43	87.5TH215	87.5	17/9/1998	USA	USA	
44	87.5TH216	87.5	19/11/1998	USA	USA	
45	87.5TH218	87.5	27/10/1998	USA	USA	
46	115HF	81.25	25/3/1996	USA	USA	
47	144HF	81.25	29/11/1996	USA	USA	
48	81.25TH196	81.25	7/5/1998	USA	USA	
49	81.25TH209	81.25	6/12/1998	USA	USA	
50	81.25TH210	81.25	10/10/1998	USA	USA	
51	81.25TH211	81.25	19/8/1998	USA	USA	
52	124HF	75	9/6/1996	USA	USA	
53	131HF	75	20/10/1996	USA	USA	

CAN = Canada, USA = United States of America

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงข้อมูลเฉพาะตัวของพ่อพันธุ์โคนมที่นำมาวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของยีนแคปปา-เคซีน

No. of Sample	semen code	ระดับเลือด (เปอร์เซ็นต์)	วันเกิด	แหล่งที่มาของพ่อ	แหล่งที่มาของปู่	หมายเหตุ
54	TMZ 17/40	75	18/1/1996	THA	USA	
55	TMZ 352/40	75	28/8/1996	THA	USA	
56	TMZ356/41	75	23/12/1998	THA	CAN	
57	TMZ494/38	75	8/8/1995	THA	USA	
58	TMZ67/42	75	22/3/1999	THA	USA	
59	TMZ69/42	75	26/3/1999	THA	CAN	
60	TMZ914/37	75	29/12/1994	THA	USA	

CAN = Canada, THA = Thailand, USA = United States of America, TMZ=Thai Milking Zebu

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์โคนมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-RFLP

No. of Sample	semen code	**ระดับเลือด**	Genotype of Kappa-casein
1	048HF	100	AB
2	050HF	100	AA
3	082HF	100	AA
4	084HF	100	BB
5	088HF	100	AB
6	089HF	100	AB
7	091HF	100	AB
8	100TH199	100	BB
9	100TH204	100	AA
10	162HF	100	AB
11	180HF	100	AA
12	BILL	100	AB
13	E-PRIDE	100	AA
14	NICK	100	AE
15	STARWING ET	100	AE
16	104HF	93.75	AE
17	112HF	93.75	AA
18	122HF	93.75	AE
19	150HF	93.75	AA
20	167HF	93.75	BE
21	186HF	93.75	AA
22	187HF	93.75	AA
23	93.75TH200	93.75	AA
24	93.75TH203	93.75	AE
25	93.25TH221	93.25	AA
26	070HF	87.5	AB
27	107HF	87.5	AB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์โคนมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-RFLP

No. of Sample	semen code	**ระดับเลือด**	Genotype of Kappa-casein
28	113HF	87.5	AA
29	129HF	87.5	AB
30	157HF	87.5	AA
31	166HF	87.5	AA
32	172HF	87.5	AA
33	174HF	87.5	AA
34	177HF	87.5	AB
35	184HF	87.5	BE
36	190HF	87.5	AA
37	194HF	87.5	AE
38	87.5TH197	87.5	AA
39	87.5TH201	87.5	AA
40	87.5TH207	87.5	AB
41	87.5TH213	87.5	AB
42	87.5TH214	87.5	AB
43	87.5TH215	87.5	AB
44	87.5TH216	87.5	AA
45	87.5TH218	87.5	AE
46	115HF	81.25	AA
47	144HF	81.25	AA
48	81.25TH196	81.25	BE
49	81.25TH209	81.25	AA
50	81.25TH210	81.25	AB
51	81.25TH211	81.25	AB
52	124HF	75	AA
53	131HF	75	AB
54	TMZ 17/40	75	AA
55	TMZ 352/40	75	AA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์โคนมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCR-RFLP

No. of Sample	semen code	**ระดับเลือด**	Genotype of Kappa-casein
56	TMZ356/41	75	AA
57	TMZ494/38	75	AA
58	TMZ67/42	75	AA
59	TMZ69/42	75	AB
60	TMZ914/37	75	AA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริลักษณ์ เตชะนรราช เกิดวันจันทร์ที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2520 จังหวัดกรุงเทพมหานคร. สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2541 เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย