# อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในโคนมลูกผสม

นางสาวช่อทิพ อรุณเดชาชัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN : 974-17-3683-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# EFFECTS OF BETA AND KAPPA CASEIN AS CANDIDATE GENES ON MILK PRODUCTION TRAITS IN CROSSBRED DAIRY CATTLE

MissChortip Aroondechachai

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science in Animal Breeding
Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN : 974-17-3683-5

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในโคนมลูกผสม |
| โดย | นางสาวช่อทิพ อรุณเดชาชัย |
| ภาควิชา | สัตวบาล |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา |

---

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ วิวัฒน์ ชวนะนิกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ส.พญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ สิริพลวัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่อทิพ อรุณเดชาชัย : อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในโคนมลูกผสม. (EFFECTS OF BETA AND KAPPA CASEIN AS CANDIDATE GENES ON MILK PRODUCTION TRAITS IN CROSSBRED DAIRY CATTLE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน, ผศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา, 68 หน้า. ISBN : 974-17-3683-5

การประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในฐานะของ ยีนแคนดิเดท ที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ในโคนมลูกผสมจำนวน 87 ตัว ที่มีบันทึกการให้ผลผลิตน้ำนมแล้วอย่างน้อย 1 ลำดับการให้นม จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองด้วยวิธี ASPCR และ PCR-RFLP ตามลำดับ พบอัลลีลของยีนเบต้าเคซีนทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ $A^1$ $A^2$ และ B มีความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.30 0.61 และ 0.09 ตามลำดับ มีความถี่จีโนไทป์ของ $A^1A^1$ $A^1A^2$ $A^2A^2$ $A^2B$ และ $A^1B$ หรือ BB เท่ากับ 0.06 0.41 0.36 0.11 และ 0.06 ตามลำดับ ยีนแคปป้าเคซีนพบอัลลีลทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ A B และ E มีความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.72 0.26 และ 0.02 ตามลำดับ มีความถี่จีโนไทป์ของ AA AB AE BB และ EE เท่ากับ 0.50 0.40 0.03 0.06 และ 0.01 ตามลำดับ การประมาณค่าอิทธิพลของยีนทั้งสองโดยใช้โมเดลของสัตว์แต่ละตัว (animal model) ด้วย***โมเดล 1(a-b)*** โดยพิจารณายีนทีละตำแหน่ง (single-gene) พบว่ายีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^1$ และ $A^1A^2$ มีผลให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงสุด ยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AA มีผลให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงสุด AE ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุด แต่ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนต่ำสุดเช่นกัน และ***โมเดล 2*** โดยพิจารณาการทำงานของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนร่วมกัน พบว่าจีโนไทป์ $A^1A^1$-AB $A^1A^2$-AA และ $A^1A^1$-AA มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงสุด จีโนไทป์ $A^1A^2$-AE มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุด อิทธิพลของการทำงานร่วมกันระหว่างยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนมีความสำคัญต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม กลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนน้อยจึงทำให้อิทธิพลที่ได้ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประชากรที่จำนวนมากขึ้นและมีข้อมูลพันธุ์ประวัติเชื่อมโยงกัน เพื่อสามารถประมาณค่าอิทธิพลของแต่ละจีโนไทป์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

ภาควิชาสัตวบาล ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##4375554131 : MAJOR ANIMAL BREEDING

KEY WORD : CANDIDATE GENE / BETA-CASEIN / KAPPA-CASEIN / MILK PRODUCTION TRAITS / CROSSBRED DAIRY CATTLE

CHORTIP AROONDECHACHAI : EFFECTS OF BETA AND KAPPA CASEIN AS CANDIDATE GENES ON MILK PRODUCTION TRAITS IN CROSSBRED DAIRY CATTLE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHANCHARAT REODECHA, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. DUANGSMORN SUWATTANA, DR. MED. VET., ASST. PROF. MONCHAI DUANGJINDA, Ph.D., 68 pp. ISBN : 974-17-3683-5.

The objective of this study was to estimate effects of beta and kappa casein as candidate genes on milk yield, protein yield and protein percentage of 87 crossbred dairy cattle with production records. The investigation on beta and kappa casein genotypes were by allele-specific polymerase chain reaction (ASPCR) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), respectively. Alleles of beta casein were $A^1$ $A^2$ and B with allele frequencies of 0.30, 0.61 and 0.09, respectively. Beta casein genotypes were $A^1A^1$ $A^1A^2$ $A^2A^2$ $A^2B$ and $A^1B$ or BB with genotype frequencies of 0.06, 0.41, 0.36, 0.11 and 0.06, respectively. Alleles of kappa casein were A B and E with allele frequencies of 0.72, 0.26 and 0.02, respectively. Kappa casein genotypes were AA AB AE BB and BE with genotype frequencies of 0.50, 0.40, 0.03, 0.06 and 0.01, respectively. Effects of beta and kappa casein genotypes on milk production records were investigated using animal models. Single gene analyses by model1a-b for beta and kappa casein genotype showed that cows with $A^1A^1$ and $A^1A^2$ beta casein genotypes produced highest milk and protein yield. Milk and protein production were highest for the kappa casein AA genotype, and protein percentage was highest for the EE genotype. Multigene analyses by model2 showed that $A^1A^1$-AB, $A^1A^2$-AA and $A^1A^1$-AA genotypes were associated with the highest milk and protein production, and $A^1A^2$-AE genotype was associated with the highest protein percentage. These observations implied that the interaction between the beta and kappa casein loci may be the important factors affecting milk production. A small set of cow data on milk production made this study results inconclusive. Further studies should be conducted in an experimental data to identify the real effects of particular genotypes.

| | |
|---|---|
| Department Animal Husbandry | Student's signature ..... |
| Field of study Animal Breeding | Advisor's signature ..... |
| Academic year 2003 | Coadvisor's signature ..... |
| | Coadvisor's signature ..... |

# กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน และ ผศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวบาลทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าของฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในเขตจังหวัดราชบุรี และเจ้าหน้าที่ภายในฟาร์มที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านข้อมูลและการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจารย์เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาล หน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวกด้านการวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก ในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2545 ทุนอุดหนุนบัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนการศึกษาวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัว โดยเฉพาะคุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย และน้องๆ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาเสมอมา

ความช่วยเหลือและกำลังใจจากทุกๆ คน ทั้งที่ได้กล่าวมาแล้วและไม่ได้กล่าวถึงไว้ ณ ที่นี้ นับได้ว่ามีส่วนสำคัญที่ทำให้การทำงานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณทุกๆ ท่านด้วยใจไว้ ณ ที่นี้

นางสาวช่อทิพ อรุณเดชาชัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

**หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ฎ

**บทที่**

1. บทนำ.....1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
แนวคิดและทฤษฎี.....4
2.1 การใช้ MAS ในการปรับปรุงลักษณะปริมาณ.....5
2.2 การศึกษา candidate gene ในโคนม.....7
2.3 โปรตีนในน้ำนมและตำแหน่งนของยีนที่ควบคุมลักษณะเคซีนในน้ำนม.....8
2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะเคซีนในน้ำนม.....10
2.5 โมเดลทางสถิติที่ใช้ในการทดสอบ.....17
2.6 อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม.....18

3. วิธีดำเนินการวิจัย.....20
3.1 กลุ่มตัวอย่างประชากรและข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา.....20
3.2 โครงสร้างของข้อมูล.....20
3.3 การจัดการและการเตรียมข้อมูล.....21
ข้อมูลพันธุ์ประวัติ.....21
ข้อมูลผลผลิต.....21
ข้อมูลจีโนไทป์ของยีน.....22

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น.....26
การจำแนกอิทธิพลของปัจจัยคงที่.....26
การตรวจสอบการกระจายของข้อมูล.....28
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์.....28
องค์ประกอบของยีนในประชากร.....28
การประมาณค่าอิทธิพลของยีน.....29

4. ผลการวิเคราะห์และวิจารณ์ผล .....31
4.1 ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม.....31
4.2 จีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน.....31
4.3 ความถี่ยีนและความถี่จีโนไทป์ในประชากร.....33
4.4 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม.....34

5. สรุปผลการวิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ.....43
5.1 จีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน.....43
5.2 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน.....43
5.3 ข้อเสนอแนะ.....44

รายการอ้างอิง.....46

ภาคผนวก.....51

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....68

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**

2.1 แสดงความหลากหลายของอัลลีลของยีนเคซีนแต่ละชนิด.....10
2.2 แสดงความถี่ของยีนเคซีนชนิดแอลฟา-เอส1 ที่พบในโคนมพันธุ์ต่างๆ.....11
2.3 แสดงความถี่ของยีนเคซีนชนิดเบต้าที่พบในโคนมพันธุ์ต่างๆ.....15
2.4 แสดงความถี่ของยีนเคซีนชนิดเบต้าที่พบในโคนมพันธุ์ต่างๆ.....16
3.1 จำนวนข้อมูลจำแนกตามลักษณะที่ทำการศึกษา.....22
3.2 แสดงสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ของยีนแคปป้าเคซีน ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (RFLP).....26
3.3 จำแนกกลุ่มพันธุ์ตามระดับเลือดและจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์.....27
3.4 แสดงจำนวนข้อมูลแยกตามลำดับการให้นม.....27
4.1 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; S.D.) ค่าต่ำสุด (minimum) และค่าสูงสุด (maximum) โดยจำแนกตามลักษณะที่ศึกษา.....31
4.2 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR.....32
4.3 ขนาด (bp) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ หลังจากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด (*Hin*fI *Hin*dIII *Mae*II *Hae*III และ *Hha*I).....32
4.4 แสดงจำนวนแม่โคนมที่มีจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนแบบต่างๆ และความถี่จีโนไทป์ (*genotype frequency*) ที่พบในประชากร.....33
4.5 แสดงความถี่อัลลีล (allele frequency) ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่พบในประชากร.....33
4.6 องค์ประกอบของความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วม ค่าอัตราพันธุกรรมโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ($h^2$) และค่า log likelihood แต่ละโมเดลที่วิเคราะห์ของลักษณะปริมาณน้ำนม.....34
4.7 องค์ประกอบของความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วม ค่าอัตราพันธุกรรมโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ($h^2$) และค่า log likelihood แต่ละโมเดลที่วิเคราะห์ของลักษณะปริมาณโปรตีน.....35
4.8 องค์ประกอบของความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วม ค่าอัตราพันธุกรรมโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ($h^2$) และค่า log likelihood แต่ละโมเดลที่วิเคราะห์ของลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีน.....35
4.9 แสดงอิทธิพลของยีนเบต้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม.....36
4.10 แสดงอิทธิพลของยีนแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม .....37
4.11 แสดงอิทธิพลร่วมของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม.....38

**ตารางภาคผนวกที่** **หน้า**

1 แสดงข้อมูลรายตัวของแม่โคนมที่ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนด้วยวิธี ASPCR และ PCR/RFLP ตามลำดับ.....54



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญรูป

**รูปที่** **หน้า**

2.1 แสดงความแตกต่างของชนิดเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีนแตกต่างกันไปในบางตำแหน่งของยีนเบต้าเคซีน……12
2.2 แสดงความแตกต่างของชนิดเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีนแตกต่างกันไปในบางตำแหน่งของยีนแคปป้าเคซีน……13
4.1 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม……...40
4.2 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณโปรตีน……...41
4.3 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีน……..42

**รูปภาคผนวกที่**

1 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^1A^1$……58
2 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^1A^2$……59
3 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^2A^2$……..……60
4 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^2B$……61
5 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^1B$/BB……..62
6 แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AA……63
7 แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AB……....64
8 แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AE……65
9 แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ BB……...66
10 แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ BE……67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

# บทนำ

## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การปรับปรุงพันธุ์โคนม จะต้องมีการกำหนดเป้าหมายในการปรับปรุงพันธุ์ (breeding goal) ที่ชัดเจน เพื่อให้สามารถกำหนดแผนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding plan) ซึ่งประกอบไปด้วยระบบการคัดเลือกพันธุ์ (selection system) และระบบการผสมพันธุ์ (mating system) ที่ถูกต้องและเหมาะสมกับเป้าหมายที่กำหนดไว้ เพื่อให้เกิดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมในลักษณะที่ต้อง การคัดเลือกและปรับปรุง ทั้งนี้เป้าหมายในการคัดเลือกและปรับปรุงส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (economic traits) ได้แก่ ปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนม ลักษณะเหล่านี้นอกจากจะเกี่ยวข้องโดยตรงต่อราคาน้ำนมดิบที่เกษตรกรขายได้แล้ว ยังเป็นตัวที่แสดงถึงคุณค่าทางโภชนาการที่ผู้บริโภคจะได้รับจากน้ำนมอีกด้วย โดยเฉพาะปริมาณของโปรตีนในน้ำนม ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำนม

ลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจเหล่านี้เป็นลักษณะปริมาณ (quantitative traits) ซึ่งลักษณะที่ตรวจวัดไม่สามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มได้ชัดเจน ความแปรปรวนของลักษณะเหล่านี้ได้รับอิทธิพลมาจากพันธุกรรมซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากคู่ (polygenes) ยีนแต่ละคู่มีอิทธิพลต่อลักษณะน้อย และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของลักษณะมาก แต่อย่างไรก็ตามอิทธิพลเนื่องจากพันธุกรรม หรือยีนเท่านั้นที่จะสามารถถ่ายทอดจากสัตว์รุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ จึงมีการประมาณค่าการผสมพันธุ์ (breeding value) ของลักษณะเพื่อใช้ในการคัดเลือกสัตว์ภายในฝูง ตลอดจนการใช้ดัชนีการคัดเลือก (selection index) มาช่วยในการคัดเลือกสัตว์ แม้ว่าวิธีการคัดเลือกโดยใช้หลักการทาง quantitative genetics นี้จะค่อนข้างประสบความสำเร็จ แต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น หากเป็นลักษณะที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่ำ ลักษณะที่แสดงออกในเพศเท่านั้น หรือลักษณะที่แสดงออกในช่วงปลายของชีวิต จะต้องใช้เวลานานและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูมาก และในการจำแนกการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะปรากฏไปในทิศทางที่ต้องการนั้นต้องใช้ระยะเวลานานและมีต้นทุนสูง

การคัดเลือกโดยใช้ marker assisted selection (MAS) ซึ่งเป็นการคัดเลือกสัตว์จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) สามารถใช้ในการตรวจสอบลักษณะปริมาณได้รวดเร็วกว่าการดูจากลักษณะปรากฏ (phenotype) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการจำแนกยีนหลักๆ ที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ ทำให้สามารถใช้ในการคัดเลือกในระดับยีนได้โดยใช้ระยะเวลาสั้น และลดต้นทุนในการเลี้ยงดูสัตว์ ดังนั้นการนำเอาเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) มาใช้ในการกำหนดเครื่องหมายพันธุกรรม เพื่อศึกษาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเหล่านี้ หรือ quantitative trait loci (QTL) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้การใช้ MAS เพื่อให้เกิดความเหมาะสมและความก้าวหน้าทางพันธุกรรมในลักษณะที่ต้องการศึกษาในประชากรใดๆ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษา ประการแรกคือ ขนาดของอิทธิพลของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ต่อลักษณะ เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ดีจะต้องมีอิทธิพลโดยตรงต่อลักษณะ ประการที่สองคือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) และความถี่ของอัลลีลต่างๆ ของเครื่องหมายพันธุกรรม ตลอดจนประการที่สามคือสัดส่วนและโอกาสที่สัตว์จะสามารถถ่ายทอดอัลลีลนั้นๆ ในประชากรได้ (Kinghorn *et al*., 1999)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับ candidate gene ซึ่งเป็นยีนที่คาดว่าจะมีอิทธิพลสำคัญต่อการควบคุมลักษณะที่ทำการศึกษา เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดเลือกสัตว์ โดยทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และอิทธิพลของยีนเหล่านั้นต่อลักษณะ ในโคนมมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนเคซีนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน ในฐานะของ candidate gene ที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (milk production traits) ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนมกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากยีนทั้งสองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรต่างๆ คือ ยีนแต่ละตัวจะมีหลายอัลลีลในประชากร และมีรายงานถึงอิทธิพลของยีนแต่ละชนิดต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม แม้ว่าผลการศึกษาที่ได้จะขัดแย้งกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Bovenhuis *et al*. (1992) และ Ng-Kwai-Hang *et al*. (1990) รายงานว่าจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีนมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนม และปริมาณโปรตีน ในขณะที่รายงานของ Van Eenennaam and Medrano (1991) ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว การศึกษาของ Aleandri *et al*. (1990) รายงานว่ายีนแคปป้าเคซีนอัลลีล BB มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนมสูงสุด สอดคล้องกับรายงานของ Bovenhuis *et al*. (1992) ในขณะที่รายงานของ Lien *et al*. (1995) ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว

ทั้งนี้เนื่องจากยีนเคซีนเหล่านี้ พบตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ลำดับที่พบอยู่บน 200 ถึง 300 กิโลเบสของดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงเกิดอิทธิพลเนื่องมาจากตำแหน่งของยีนที่อยู่ติดกันและมีการถ่ายทอดไปด้วยกัน (linked loci) ทำให้เกิด genetic linkage ระหว่างกัน มากกว่าอิทธิพลของอัลลีลของยีนใดยีนหนึ่ง (Mercier และ Vilotte, 1993) จึงทำให้การประมาณค่าอิทธิพลของยีนแต่ละชนิดต่อลักษณะมีความผันแปรในแต่ละประชากร ดังนั้นการศึกษาอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนทั้งสองต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม จึงควรศึกษาในรูปแบบของการทำงานร่วมกันของยีน (multigene) มากกว่าการศึกษาเพียงยีนเดียว (single gene) (Bovenhuis *et al*., 1992 ; Ikonen *et al*., 2001) เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะ

การศึกษาครั้งนี้ มีเป้าหมายในการตรวจสอบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่พบในประชากรโคนมลูกผสม ภายใต้สภาพแวดล้อมของประเทศไทย และเชื่อมโยงอิทธิพลของยีนทั้งสองที่มีต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานส่วนหนึ่งในการศึกษายีนทั้งสองในฐานะของเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่ใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โคนมต่อไป เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือก เนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากพันธุกรรมโดยตรง วัตถุประสงค์ของการวิจัย ประกอบด้วย

1. เพื่อหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในโคนมลูกผสม
2. เพื่อประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในโคนมลูกผสม

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย**

1. ทราบรูปแบบของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในประชากรที่ทำการศึกษา
2. ทราบความถี่จีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลต่างๆ ที่พบในประชากรที่ทำการศึกษา
3. ทราบอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน ที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมของประชากรที่ทำการศึกษา
4. ทราบค่าการผสมพันธุ์ (breeding value) ของโคนม จากโมเดลที่มีการปรับด้วยด้วยอิทธิพลของ candidate gene

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## แนวคิดและทฤษฎี

ลักษณะปรากฏ (phenotype) ที่สัตว์แสดงออกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามการควบคุมของยีนดังนี้ ***ลักษณะคุณภาพ*** (qualitative trait) หมายถึง ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนน้อยคู่ และสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของลักษณะน้อย ซึ่งการแสดงออกของลักษณะสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ได้ชัดเจน เช่น การมีเขาหรือไม่มีเขา สีขนต่างๆ เป็นต้น และ ***ลักษณะปริมาณ*** (quantitative trait) หมายถึง ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากคู่ (polygene) และสิ่งแวดล้อมยังมีอิทธิพลต่อความแปรปรวนของลักษณะมาก การแสดงออกของลักษณะสามารถชั่ง ตวง วัดได้ และมีความผันแปรแบบต่อเนื่อง (continuous) ไม่สามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มๆ ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้มีสมมติฐานของการกระจายข้อมูลลักษณะปรากฏในประชากรเป็นแบบปกติ (normal distribution) เนื่องจากการถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากคู่ดังกล่าว (จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ, 2534; สมเกียรติ สายธนู, 2537)

ลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (economic trait) ในโคนม เช่น ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนม ส่วนใหญ่เป็นลักษณะปริมาณ ซึ่งความแปรปรวนของลักษณะปรากฏที่วัดได้มีอิทธิพลมาจากพันธุกรรม (genetic) หรือยีนที่ถ่ายทอดมาจากพ่อแม่ และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่สัตว์ได้รับ เช่น อาหาร การเลี้ยงดู สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น เขียนเป็นสมการได้ดังนี้ (Falconer and Mackay,1996)

$$P = G + E \qquad \text{.....(2.1)}$$

เมื่อ P = ลักษณะปรากฏที่ตรวจวัดได้
G = พันธุกรรมของสัตว์
E = สภาพแวดล้อมที่สัตว์ได้รับ

จากสมการ *(2.1)* อิทธิพลเนื่องจากสิ่งแวดล้อมนั้นไม่สามารถถ่ายทอดได้ ในขณะที่อิทธิพลจากพันธุกรรมเท่านั้นที่สามารถถ่ายทอดจากสัตว์รุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้ โดยลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจส่วนใหญ่ได้รับอิทธิพลมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมต่างๆ (Sivarajasingam, *et al*., 1998) ได้แก่

1. ยีนหลายตำแหน่ง (polygenic)
2. ยีนแต่ละตำแหน่งมี 2 อัลลีล หรือมากกว่า (polymorphism)
3. ความถี่ของอัลลีลแตกต่างกันในแต่ละตำแหน่ง
4. ตำแหน่งต่างๆ ของยีนอาจเชื่อม (linked) หรือไม่เชื่อมกัน (unlinked)
5. แต่ละอัลลีลเป็นสาเหตุในการแสดงออกสุดท้ายของลักษณะ (additive effects)
6. บางอัลลีลมีอิทธิพลต่อลักษณะมากกว่าอัลลีลอื่นๆ
7. มีปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน (dominance, codominance)
8. มีปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนที่อยู่ต่างตำแหน่งกัน (epitasis)
9. ความแปรปรวนของโครโมโซม (ploidy และ aberations)

ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์สำหรับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ ที่ผ่านมา เพื่อให้ได้โคนมที่มีพันธุกรรมตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ จึงได้นำเอาวิธีการต่างๆ มาใช้ในการทดสอบลักษณะโดยใช้ข้อมูลจากลักษณะปรากฏที่สังเกตได้ ในการประมาณค่าการผสมพันธุ์ (estimated breeding values ; EBV) ของโคนมแต่ละตัว เพื่อนำมาใช้ในการพิจารณาจัดอันดับและคัดเลือกโคนมภายในฝูง เนื่องจากไม่สามารถรู้คุณค่าการผสมพันธุ์ที่แท้จริง (true breeding values ; TBV) ของสัตว์ได้ ซึ่งการคัดเลือกด้วยวิธีนี้ใช้เวลานานและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูโคนมมาก ปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) เข้ามาช่วยในการคัดเลือกสัตว์ โดยเฉพาะในลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ เนื่องจากมีประสิทธิภาพ ความแม่นยำ และความน่าเชื่อถือสูง ตลอดจนทำให้ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูโคนมลงไปได้มาก

## 2.1 การใช้ MAS ในการปรับปรุงลักษณะปริมาณ

การคัดเลือกโดยใช้ marker assisted selection (MAS) เป็นการคัดเลือกสัตว์จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) โดยนำเอาความรู้และเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้ในการศึกษาตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะปริมาณ หรือ quantitative trait loci (QTL) และค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับยีนที่มีอิทธิพลต่อลักษณะเหล่านี้ ดังนั้นการคัดเลือกโคนมโดยใช้ MAS จึงเป็นการคัดเลือกจากพันธุกรรมหรือยีนโดยตรง เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือกโคนมที่มีพันธุกรรมตรงตามความต้องการ ตลอดจนช่วยลด generation interval และเพิ่มความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย

เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้เพื่อบ่งชี้ QTL สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักๆ ดังนี้ (วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, 2544; Israel and Weller, 1998; Kinghorn *et al*.,1999)

1. วิธีของ positional genetic หรือ *indirectly marked genes* เป็นการหา QTL โดยศึกษา polymorphism ของ marker loci และการถ่ายทอดไปด้วยกันกับลักษณะนั้นๆ ผ่านทางความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic linkage) ซึ่ง marker loci ที่ศึกษาเป็นลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ไม่รู้ต้นกำเนิดและหน้าที่ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีลำดับเบสเกิดซ้ำๆ กัน (tendem repeat) โดยไม่มีเบสอื่นมาคั่นกลาง ได้แก่ satellite minisatellite microsatellite เป็นต้น

2. วิธีของ candidate gene หรือ *directly marked genes* โดยทำการศึกษา polymorphism ของยีนซึ่งคาดว่าจะมีอิทธิพลสำคัญต่อลักษณะที่สนใจ

ในการวิเคราะห์อิทธิพลของ candidate gene สามารถพิจารณาได้ง่ายกว่าการวิเคราะห์โดยวิธีของ positional genetic เนื่องจากในการบ่งชี้ QTL นั้นต้องมี linkage disequilibrium ระหว่าง genetic marker และ QTL (*linkage disequilibrium คือสภาวะที่ไม่สมดุลของความถี่ของยีนหลายตำแหน่ง (multiplelocus) ที่มี linkage กัน (Falconer and Mackay, 1996)*) ซึ่งการวิเคราะห์ linked QTL ต้องอาศัยการวิเคราะห์ภายในครอบครัว (within families) ร่วมกับการวิเคราะห์ข้ามครอบครัว (across families) และการใช้วิธีของ positional genetic ประมาณค่าอิทธิพลของ QTL มักจะมีอคติ (bias) เกิดขึ้นได้ง่าย หากเลือกตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมได้ไม่ครอบคลุม ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ ในโคนมมักเป็นลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตน้ำนม ซึ่งมียีนจำนวนมากที่มีอิทธิพลต่อการควบคุมลักษณะโดยไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม ส่วนการใช้วิธีของ candidate gene เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมนั้นอาศัยหลักการประเมินอิทธิพลของแต่ละอัลลีลของยีนนั้นๆ ว่ามีความสัมพันธ์ต่อลักษณะการให้ผลผลิตของโคนม อย่างไรและเนื่องจากโคนมที่ใช้ในการประเมินอาจมาจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน มีพื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) แตกต่างกัน การใช้ข้อมูลของยีนนั้นๆ ในฐานะ candidate gene ที่เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมจำเป็นต้องใช้วิธีการทางสถิติที่ถูกต้อง เพื่อช่วยให้การประเมินอิทธิพลมีความแม่นยำ สามารถใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โคนมได้

## 2.2 การศึกษา candidate gene ในโคนม

ปัจจุบันได้มีผู้ทำการศึกษาถึง candidate gene หรือยีนที่คาดว่าจะมีอิทธิพลสำคัญต่อลักษณะที่สนใจในโคนมกันอย่างกว้างขวาง เช่น ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ความต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ เป็นต้น ซึ่งลักษณะเหล่านี้มักเป็นลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการคัดเลือกและปรับปรุง สำหรับประเทศไทยนั้นเป้าหมายในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โคนมส่วนใหญ่มุ่งเน้นในลักษณะของปริมาณน้ำนม เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศ และปริมาณน้ำนม ยังจัดเป็นลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่เกี่ยวข้องกับผลตอบแทนหลักที่เกษตรกรจะได้รับจากการขายน้ำนมดิบ นอกจากนี้องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำนม โดยเฉพาะปริมาณและเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนม จัดเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญซึ่งจะแสดงถึงคุณค่าทางโภชนาการที่ผู้บริโภคจะได้รับจากน้ำนม และยังมีความสำคัญต่อกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากน้ำนมอีกด้วย

ดังนั้นสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ candidate gene ที่คาดว่ามีอิทธิพลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (milk production traits) ในโคนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนม ซึ่งสอดคล้องกับเป้าหมายในการปรับปรุงพันธุ์โคนมของประเทศไทย พบว่ามีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีนเคซีนชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการแปรรหัสของโปรตีนเคซีนในน้ำนม ในฐานะของ candidate gene ที่คาดว่ามีอิทธิพลสำคัญต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมกันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ เช่น แคนาดา ฟินแลนด์ สวิสเซอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา เป็นต้น (Bovenhuis *et al*., 1992; Braunschweig *et al*., 2000; Ikonen *et al*., 1999b; Lin *et al*.,1986; Lin *et al*.,1992; Ojala *et al*., 1997; Ron *et al*., 1994; Sabour *et al*., 1996) โดยทำการศึกษาในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) และอิทธิพลของยีนเคซีนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนซึ่งมีรายงานถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และบางอัลลีลมีอิทธิพลสำคัญต่อลักษณะ เช่น ยีนเบต้าเคซีน อัลลีล $A^2$ ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงสุด ยีนแคปป้าเคซีนอัลลีล B ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่ายีนแคปป้าเคซีนมีอิทธิพลสำคัญต่อกระบวนการผลิตเนยแข็งอีกด้วย (Choi and Ng-Kwai-Hang., 2003; Ikonen *et al*., 1996; Marziali and Ng-Kwai-Hang., 1986)

## 2.3 โปรตีนในน้ำนมและตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเคซีนในน้ำนม

**(milk proteins and milk casein loci)**

น้ำนมโคจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีสารอาหารหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะโปรตีนซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่ผู้บริโภคจะได้รับจากน้ำนม และยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำนมอีกด้วย น้ำนมโคมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบประมาณ 3 – 3.5 เปอร์เซ็นต์ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

***กลุ่มของเคซีนทั้งหมด*** (whole casein, CN) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่พบในน้ำนม คิดเป็นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ประกอบด้วยเคซีนหลัก 4 ชนิด (Braunschweig et al., 2000) ได้แก่ *แอลฟา-เอส1* (alpha-S1-CN) *แอลฟาเอส2* (alpha-S2-CN) *เบต้า* (beta-CN) และ*แคปป้า* (kappa-CN) ในส่วนของเคซีนชนิดแอลฟา-เอส1 แอลฟาเอส2 และ เบต้า มีโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน คือ ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ (hydrophobic) และจะถูกล้อมรอบด้วยเคซีนชนิดแคปป้า ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 117-169 เป็นส่วนที่มีประจุหรือมีขั้วจึงสามารถรวมตัวกับน้ำได้ดี (hydrophilic) เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำขึ้นอยู่กับการมีขั้วของโมเลกุลนั่นเอง และการที่มีหมู่ฟอสเฟตเพียง 1 หรือ 2 ตัว ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 127 หรือ 149 เท่านั้น ทำให้ความสามารถในการจับตัวหรือความไวต่อแคลเซียม (calcium) ต่ำ ดังนั้นโครงสร้างเคซีนทั้งหมดที่อยู่ในรูปของไมเซลล์ (micelles) จึงสามารถแขวนลอยอยู่ในน้ำนมในสภาพที่มีแคลซียมได้

***กลุ่มของโปรตีนในหางนม*** (whey protein) โปรตีนส่วนนี้จะได้หลังจากทำการตกตะกอนโปรตีนเคซีนออกไปแล้ว คิดสัดส่วนเป็นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ได้แก่ แอลฟาแลคตัลบูมิน (alpha-lactalbumin) และ เบต้าแลคโตโกลบูลิน (beta-lactoglobulin)

ทั้งนี้ยีนที่ควบคุมการแปรรหัสของโปรตีนเคซีนทั้ง 4 ชนิด (แอลฟา-เอส1 แอลฟา-เอส2 เบต้า และแคปป้า) ได้แก่ CASAS1 CASAS2 CASB CASK ตามลำดับ ตำแหน่งของยีนดังกล่าวพบอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ที่ตำแหน่ง q31 ถึง 33 มีขนาดประมาณ 200 ถึง 300 kb โดยมีรายละเอียดและการเรียงตัวของยีนดังนี้ CASAS1 - CASB - CASAS2 - CASK (Threadgill and Womack, 1990)

ยีนเคซีนชนิดแอลฟา-เอส1 (CASAS1) มีลำดับเบสทั้งหมด 22069 คู่เบส ประกอบด้วย 19 exon และ 18 intron (Koczan *et al*., 1991)

ยีนเคซีนชนิดเบต้า (CASB) มีลำดับเบสทั้งหมด 10338 คู่เบส ประกอบด้วย 9 exon และ 8 intron (Bonsing *et al*., 1988)

ยีนเคซีนชนิดแอลฟา-เอส2 (CASAS2) มีลำดับเบสทั้งหมด 21246 คู่เบส ประกอบด้วย 18 exon และ 17 intron (Groenen *et al*., 1993)

ยีนเคซีนชนิดแคปป้า (CASK) มีลำดับเบสทั้งหมด (complete sequence) 22069 คู่เบส ประกอบด้วย 19 exon และ 18 intron (Prinzenberg *et al*., 1999)

จากกฎของเมนเดลซึ่งว่าด้วยการเข้าคู่อย่างอิสระของยีน (Law of independent assortment) มีความหมายคือ อัลลีลของแต่ละยีนที่มีตำแหน่งตรงกันของโครโมโซมคู่ homologous กันนั้นย่อมเข้าสู่เซลล์สืบพันธุ์หรือแกมีท (gamete) เดียวกันกับอัลลีลของยีนอีกคู่หนึ่งได้อย่างอิสระ ซึ่งยีนที่มีตำแหน่งอยู่ต่างโครโมโซมกันจะเป็นไปตามกฎนี้ แต่ถ้ายีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันหรือที่เรียกว่ามี linkage group เดียวกันแล้วนั้น ย่อมมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันในแกมีทเดียวกัน โดยกลุ่มของยีนที่มี linkage group เดียวกันนี้อาจมีโอกาสแยกจากกันได้บ้าง โดยกระบวนการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ระหว่างโครโมโซมคู่ homologous ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่มีการแบ่งแบบไมโอซีส และความยากง่ายของการเคลื่อนย้ายชุดของยีนออกจากกัน ยังขึ้นกับระยะทางระหว่างยีนด้วย (อมรา คัมภิรานนท์, 2540) ในปี 1973 มีการค้นพบหลักฐานของความสัมพันธ์ของยีนเคซีนชนิด แอลฟา-เอส1-เบต้า-แคปป้า (Mercier and Vilotte, 1993) โดยดูจากความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเคซีน ซึ่งแสดงการถ่ายทอดของยีนจากพ่อแม่ไปสู่ลูกในการทดสอบตามกฎของเมนเดล การเข้าคู่ของยีนทั้ง 4 ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล เนื่องจากการมี genetic linkage ระหว่างยีนที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกัน ทำให้เกิดความไม่สมดุล (disequilibrium) Bovenhuis *et al*., 1992; Ojala *et al*., 1997; Braunschweig *et al*., 2000; Ikonen *et al*., 2001 รายงานว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลต่างๆ ของยีนเคซีนและลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม เป็นอิทธิพลเนื่องมาจากตำแหน่งของยีนที่อยู่ติดกันและมีการถ่ายทอดไปด้วยกัน มากกว่าอิทธิพลของอัลลีลเอง โดยมีอิทธิพลของยีนเป็นแบบ codominant ทำให้สามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาความถี่ และผลเนื่องจากความแปรปรวนของอัลลีลเหล่านี้ในประชากรได้ ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนเคซีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม จึงควรศึกษาในรูปแบบของการทำงานร่วมกันของยีนมากกว่าอิทธิพลของยีนใดเพียงยีนเดียว

## 2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะเคซีนในน้ำนม

(genetic polymorphism of milk casein loci)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน หรือ genetic polymorphism หมายถึงการที่ยีนมีรูปแบบทางพันธุกรรมมากกว่า 1 รูปแบบ หรือมีความผันแปรของอัลลีลหลายแบบในแต่ละตำแหน่ง สุมณฑา พรหมบุญ (2539) อธิบายไว้ว่า การกำหนดให้มี polymorphism หมายถึง ตำแหน่งของยีน (locus) ที่ไม่มีความถี่ของอัลลีลชนิดใดชนิดหนึ่งสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (หรืออาจกำหนดไว้เพียง 95 เปอร์เซ็นต์) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเคซีนทั้ง 4 ชนิด รายงานว่ามีความหลากหลายของรูปแบบอัลลีลที่พบ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ณ ตำแหน่งนั้นบนสายโปรตีน ดังแสดงใน***ตารางที่ 2.1*** ทั้งนี้รูปแบบของอัลลีลที่พบในโคนม *Bos indicus* และ *Bos taurus* ไม่แตกต่างกัน (Aschaffenburg *et al*., 1968)

***ตารางที่ 2.1*** แสดงความหลากหลายของอัลลีลของยีนเคซีนแต่ละชนิด

| ชนิดของเคซีน | รูปแบบของอัลลีล |
|---|---|
| แอลฟา-เอส1 | A B C |
| แอลฟา-เอส2 | A D |
| เบต้า | $A^1$ $A^2$ $A^3$ B C E F |
| แคปป้า | A B C E F G |

***ที่มา*** : Braunschweig *et al*., 2000 ; Dong and Ng-Kwia-Hang., 1998 ; Mahe *et al*., 1999 ; Prinzenberg *et al*., 1999

***ยีนแอลฟา-เอส1*** พบอัลลีล B เป็นอัลลีลพื้นฐาน (common allele) ในประชากรต่างๆ มีความถี่ของแต่ละอัลลีลในโคนมพันธุ์ต่างๆ ดังนี้

*พันธุ์ Holstein* พบอัลลีล B มีความถี่ตั้งแต่ 0.93-0.99 อัลลีล A มีรายงานเพียง 2 ประชากรพบความถี่เท่ากับ 0.003 (ไม่พบในพันธุ์อื่น) และอัลลีล C มีความถี่ตั้งแต่ 0.007-0.070

*พันธุ์ Jersey* พบอัลลีล B มีความถี่ 0.62 และ 0.68 และอัลลีล C พบความถี่ 0.32 และ 0.38

*พันธุ์ Brown Swiss* พันธุ์ *Guernsey* พบอัลลีล B มีความถี่ 0.86 และ 0.88 และอัลลีล C มีความถี่ 0.14 และ 0.12 ตามลำดับ

*พันธุ์ Milking Shorthorn* และ *พันธุ์ Ayshire* ซึ่งจัดเป็น monomorphic พบความถี่ของอัลลีล B เท่ากับ 1 และ 0.997 และพบความถี่ของอัลลีล C เท่ากับ 0 และ 0.003 ตามลำดับ

โคนมลูกผสมระหว่าง *Holstein* และ *Ayshire* พบอัลลีล B และ C มีความถี่ 0.978 และ 0.022 ตามลำดับ ดังแสดงใน***ตารางที่ 2.2***

***ตารางที่ 2.2*** แสดงความถี่ของยีนเคซีนชนิดแอลฟา-เอส1 ที่พบในโคนมพันธุ์ต่างๆ

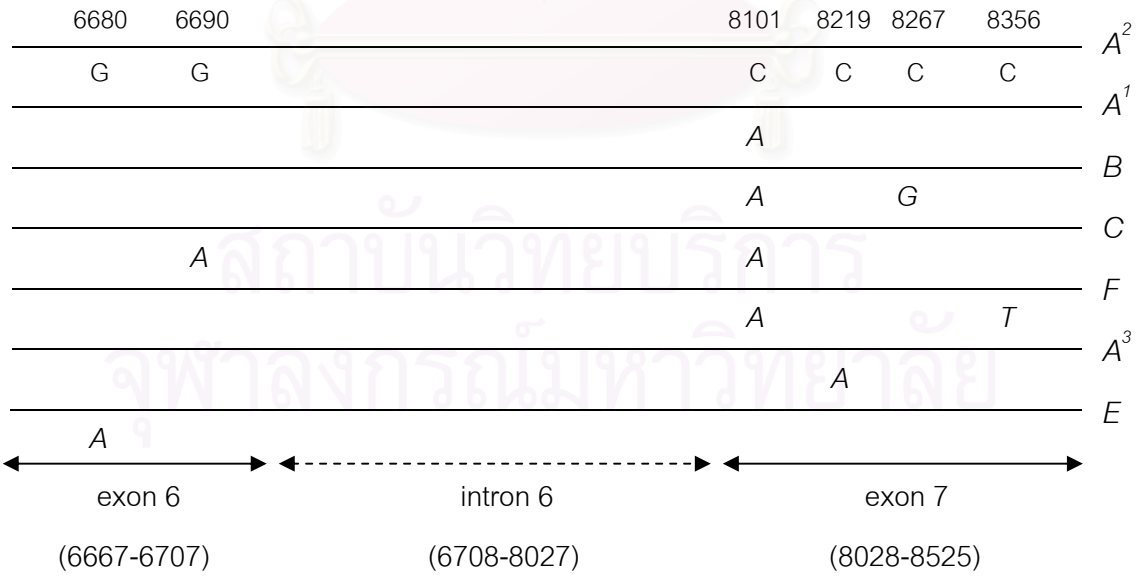
| พันธุ์ | จำนวน | อัลลีล | | | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|
| | | A | B | C | |
| Holstein | 2045 | 0.003 | 0.970 | 0.027 | Ng-Kwia-Hang *et al*., (1984) |
| | 916 | 0.003 | 0.990 | 0.007 | Ojala *et al*., (1997) |
| | 372 | - | 0.930 | 0.070 | Lin *et al*., (1989) |
| | 1152 | - | 0.990 | 0.010 | Van Eenennaam และ Medrano (1991) |
| Jersey | 116 | - | 0.620 | 0.380 | Ojala *et al*., (1997) |
| | 172 | - | 0.680 | 0.320 | Van Eenennaam และ Medrano (1991) |
| Brown Swiss | 50 | - | 0.860 | 0.140 | Van Eenennaam และ Medrano (1991) |
| Guernsey | 40 | - | 0.880 | 0.120 | Van Eenennaam และ Medrano (1991) |
| Milking Shorthorn | 40 | - | 1.000 | - | Van Eenennaam และ Medrano (1991) |
| Ayshire | 156 | - | 0.997 | 0.003 | Lin *et al*., (1989) |
| Cross-breds (Holstein. Ayshire) | 361 | - | 0.978 | 0.022 | Lin *et al*., (1989) |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ยีนแอลฟา-เอส2*** จากรายงานของ Bovenhuis *et al*., (1992) และ Braunschweig *et al*., (2000) รายงานว่ามีรูปแบบของอัลลีลเป็น monomorphic ของอัลลีล A ในโคนมทุกพันธุ์ ยกเว้นอัลลีล D จากรายงานของ Ikonen *et al*., (1996) ซึ่งพบในความถี่ต่ำมากเท่ากับ 0.009 ในพันธุ์ Finnish Ayshire

ส่วนยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน มีรายงานว่าพบ genetic polymorphism หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทั้งสองสูง นั่นคือ การที่ยีนเคซีนแต่ละชนิดมีหลายอัลลีล โดยที่อัลลีลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนมีความผันแปรเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงชนิดเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอ ที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีนของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน แตกต่างกันไปในบางตำแหน่งดังแสดงใน***รูปที่ 2.1*** และ ***2.2*** ตามลำดับ

***ยีนเบต้า*** โดยเปรียบเทียบกับอัลลีล $A^2$ ซึ่งเป็นอัลลีลพื้นฐาน พบว่า *อัลลีล* $A^1$ *B C และ F* เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 8101 จากเบส C เปลี่ยนเป็น A และนอกจากนั้น *อัลลีล B* ยังพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 8267 จากเบส C เป็น G *อัลลีล C* เปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง 6690 จากเบส G เป็น A และ*อัลลีล F* เปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง 8356 จากเบส C เป็น T ส่วน*อัลลีล* $A^3$ พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 8219 เปลี่ยนจาก C เป็น A และ*อัลลีล E* พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 6680 เปลี่ยนจาก G เป็น A




***รูปที่ 2.1*** แสดงความแตกต่างของชนิดเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีนแตกต่างกันไปในบางตำแหน่งของยีนเบต้าเคซีน

ทั้งนี้ความหลากหลายของยีน และความถี่ของอัลลีลต่างๆ ที่พบจะแตกต่างกันออกไปในโคนมแต่ละพันธุ์และแต่ละประชากรดังนี้ รูปแบบของอัลลีลที่พบในปัจจุบัน ได้แก่ $A^1$ $A^2$ $A^3$ B C E และ F มีรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีอัลลีล $A^2$ ซึ่งเป็นอัลลีลพื้นฐาน โดยพบว่าในโคพันธุ์ต่างๆ มีความถี่ของแต่ละอัลลีลในประชากรดังนี้

*พันธุ์ Holstein* พบความถี่ของอัลลีล $A^1$ ตั้งแต่ 0.43-0.55 อัลลีล $A^2$ พบความถี่ตั้งแต่ 0.39-0.55 อัลลีล B พบความถี่ 0.02 และ 0.03 อัลลีล $A^3$ มีเพียง 1 รายงานความถี่เท่ากับ 0.03

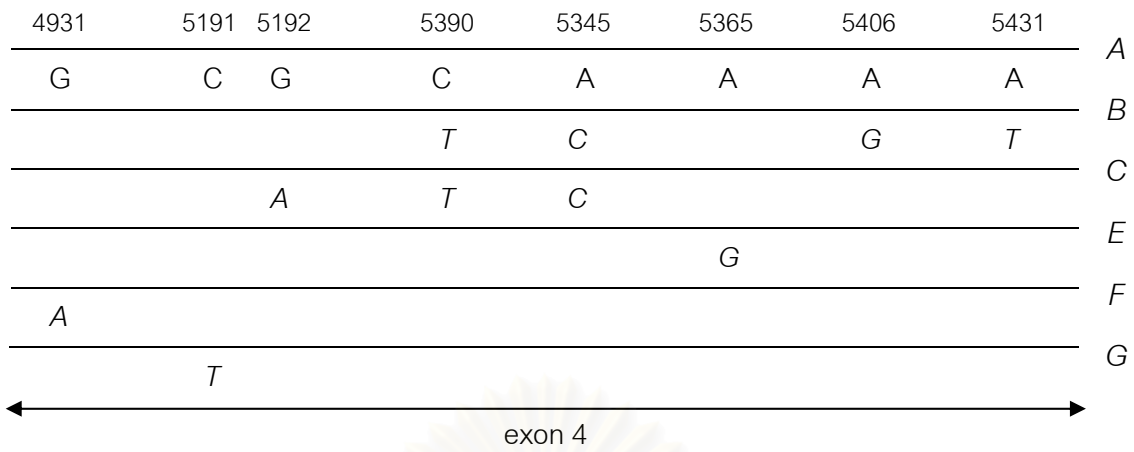
*พันธุ์ Jersey* พบอัลลีล $A^1$ พบความถี่ 0.07 และ 0.17 อัลลีล $A^2$ พบความถี่ 0.58 และ 0.50 อัลลีล B พบความถี่ 0.33 และ 0.35 ไม่พบอัลลีล $A^3$ และ C

*พันธุ์ Brown Swiss พันธุ์ Red Danish พันธุ์ Milking Shorthorn* และ*พันธุ์ Finnish Ayshire* พบความถี่ของอัลลีล $A^1$ ตั้งแต่ 0.18-0.71 อัลลีล $A^2$ มีความถี่ตั้งแต่ 0.23-0.66 และอัลลีล B พบความถี่ตั้งแต่ 0.001-0.16 ไม่พบอัลลีล $A^3$ และ C

*พันธุ์ Guernsey* พบความถี่ของอัลลีล $A^2$ และ C เท่ากับ 0.96 และ 0.04 ตามลำดับ และไม่พบอัลลีล $A^1$ $A^3$ และ B

*พันธุ์ Sahiwal* พบความถี่ของอัลลีล $A^2$ $A^3$ และ B เท่ากับ 0.52 0.22 และ 0.04 ตามลำดับ ดังแสดงใน***ตารางที่ 2.3***

***ยีนแคปป้า*** เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล A ซึ่งเป็นอัลลีลพื้นฐาน พบว่า *อัลลีล B และ C* เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5390 จากเบส C เป็น T และที่ตำแหน่ง 5345 เปลี่ยนจากเบส A เป็น C นอกจากนั้น *อัลลีล B* ยังพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 5406 เปลี่ยนจาก A เป็น G และตำแหน่งที่ 5413 เปลี่ยนจาก A เป็น T *ส่วนอัลลีล C* ที่ตำแหน่ง 5192 เปลี่ยนจาก G เป็น A *ส่วนอัลลีล E* ที่ตำแหน่ง 5365 เปลี่ยนจากเบส A เป็น G *อัลลีล F* ที่ตำแหน่ง 4931 เปลี่ยนจาก G เป็น A และ*อัลลีล G* ที่ตำแหน่ง 5191 เปลี่ยนจากเบส C เป็น T




***รูปที่ 2.2*** แสดงความแตกต่างของชนิดเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีนแตกต่างกันไปในบางตำแหน่งของยีนแคปป้าเคซีน

รูปแบบของอัลลีลที่พบ ได้แก่ A B C E F และ G มีรายงานการศึกษาความถี่ในประชากรต่างๆ พบว่ามีความถี่ของแต่ละอัลลีลในประชากรดังนี้

*พันธุ์ Holstein* พบความถี่ของอัลลีล A ตั้งแต่ 0.82-0.89 อัลลีล B พบความถี่ตั้งแต่ 0.11-0.18

*พันธุ์ Jersey* พบความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.14-0.31 และอัลลีล B มีความถี่เท่ากับ 0.69-0.86

*พันธุ์ Brown Swiss พันธุ์ Red Danish พันธุ์ Guernsey* และ*พันธุ์ Milking Shorthorn* พบความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.33 0.81 0.73 และ 0.89 ตามลำดับ และพบความถี่ของอัลลีล B เท่ากับ 0.67 0.19 0.27 และ 0.11 ตามลำดับ

*พันธุ์ Finnish Ayshire* พบความถี่ของอัลลีล A B E และ F เท่ากับ 0.612 0.081 0.307 และน้อยกว่า 0.001 ตามลำดับ

*พันธุ์ Sahiwal* และโคนมลูกผสมระหว่าง *Holstein Friesian Jersey* และ *Hariana* พบความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.65 และ 0.40 ตามลำดับ และพบความถี่ของอัลลีล B เท่ากับ 0.35 และ 0.60 ตามลำดับ ดังแสดงใน***ตารางที่ 2.4***

***ตารางที่ 2.3*** แสดงความถี่ของยีนเคซีนชนิดเบต้าที่พบในโคนมพันธุ์ต่างๆ

| พันธุ์ | จำนวน | อัลลีล | | | | | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $A^1$ | $A^2$ | $A^3$ | B | C | |
| Holstein | 223 | 0.55 | 0.39 | 0.03 | 0.03 | - | Bech and Kristiansen (1990) |
| | 1152 | 0.43 | 0.55 | - | 0.02 | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| | 566 | 0.48 | 0.52 | - | - | - | Sabour *et al*., (1996) |
| Jersey | 157 | 0.07 | 0.58 | - | 0.35 | - | Bech and Kristiansen (1990) |
| | 172 | 0.17 | 0.50 | - | 0.33 | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Brown Swiss | 50 | 0.18 | 0.66 | - | 0.16 | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Red Danish | 169 | 0.71 | 0.23 | - | 0.06 | - | Bech and Kristiansen (1990) |
| Guernsey | 40 | - | 0.96 | - | - | 0.04 | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Milking Shorthorn | 40 | 0.49 | 0.49 | - | 0.02 | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Finnish Ayshire | 20990 | 0.509 | 0.490 | - | 0.001 | - | Ikonen *et al*., (1996) |
| Sahiwal | 23 | - | 0.52 | 0.22 | 0.26 | - | Malik *et al*., (1998) |
| Cross-breds[1] | 14 | - | 0.61 | - | 0.39 | - | Malik *et al*., (1998) |

[1] (Cross-breds : 1/2 Holstein Friesian.1/4Jersey.1/4Hariana)

***ตารางที่ 2.4*** แสดงความถี่ของยีนเคซีนชนิดเบต้าที่พบในโคนมพันธุ์ต่างๆ

| พันธุ์ | จำนวน | อัลลีล | | | | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A | B | E | F | |
| Holstein | 223 | 0.85 | 0.15 | - | - | Bech and Kristiansen (1990) |
| | 1152 | 0.82 | 0.18 | - | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| | 566 | 0.86 | 0.14 | - | - | Sabour *et al*., (1996) |
| | 915[2] | 0.82 | 0.18 | - | - | Famula and Medrano (1994) |
| | 200[3] | 0.86 | 0.14 | - | - | Famula and Medrano (1994) |
| | 112 | 0.89 | 0.11 | - | - | Ron *et al*., (1994) |
| Jersey | 157 | 0.31 | 0.69 | - | - | Bech and Kristiansen (1990) |
| | 172 | 0.14 | 0.86 | - | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Brown Swiss | 50 | 0.33 | 0.67 | - | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Red Danish | 169 | 0.81 | 0.19 | - | - | Bech and Kristiansen (1990) |
| Guernsey | 40 | 0.73 | 0.27 | - | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Milking Shorthorn | 40 | 0.89 | 0.11 | - | - | Van Eenennaam and Medrano (1991) |
| Finnish Ayshire | 20990 | 0.612 | 0.081 | 0.307 | <0.001 | Ikonen *et al*., (1996) |
| Sahiwal | 23 | 0.65 | 0.35 | - | - | Malik *et al*., (1998) |
| Cross-breds[1] | 11 | 0.40 | 0.60 | - | - | Malik *et al*., (1998) |

[1] (Cross-breds : 1/2 Holstein Friesian.1/4Jersey.1/4Hariana)

[2] cows

[3] bulls

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 2.5 โมเดลทางสถิติที่ใช้ในการทดสอบ

การศึกษาและเปรียบเทียบโมเดลที่ใช้ในการวิเคราะห์อิทธิพลของจีโนไทป์แบบต่างๆ ของยีน เพื่อให้ได้ค่าประมาณที่ถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือมากที่สุด Kennedy *et al*. (1991) ได้ศึกษาการประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์แบบต่างๆ ด้วยวิธี ordinary least squares (OLS) โดยให้จีโนไทป์ของสัตว์เป็นปัจจัยคงที่ ทำการเปรียบเทียบกับวิธี mixed model (MM) โดยให้จีโนไทป์ของสัตว์เป็นปัจจัยคงที่เช่นเดียวกัน และมีอิทธิพลแบบบวกสะสมเนื่องจากตัวสัตว์เป็นปัจจัยสุ่ม รายงานว่าการประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์แบบต่างๆ ด้วยวิธี OLS จะมีค่าประมาณสูงกว่าค่าจริง (overestimated) ที่กำหนดไว้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) ในวิธี OLS มีแนวโน้มที่สูงกว่าวิธี MM ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Famula and Medrano (1994) ทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบการวิเคราะห์อิทธิพลของจีโนไทป์แบบต่างๆ ด้วยวิธี least squares กับ mixed model ในการประมาณค่าความแตกต่างของจีโนไทป์ของยีนเคซีนในน้ำนม ค่าประมาณที่ได้จากวิธี least squares จะมีค่าสูงกว่าความจริง เนื่องจากค่าประมาณที่ได้เป็นผลเนื่องจากจีโนไทป์ของเคซีน และอิทธิพลเนื่องจากยีนหลายตำแหน่งของสัตว์ ในการประมาณค่าด้วยวิธี mixed model จะช่วยลดอคติที่เกิดขึ้นได้ด้วยการปรับค่าอิทธิพลเนื่องจากยีนหลายตำแหน่งของสัตว์เป็นปัจจัยสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์ และใช้เมตริกซ์ความสัมพันธ์เนื่องจากตัวสัตว์ (relationship matrix) ในโมเดล จึงทำให้ค่าประมาณที่ได้ถูกต้องมากขึ้น (Bobe *et al*., 1999)

ในปัจจุบันการประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมจึงนิยมใช้การประมาณค่าด้วยวิธี mixed model

Ojala *et al*., (1997) ได้เสนอโมเดลที่ใช้ในการประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนจากตัวสัตว์โดยตรงดังนี้

$$\boldsymbol{y} = \boldsymbol{Xb} + \boldsymbol{Qg} + \boldsymbol{Za} + \boldsymbol{e}$$

โดยที่

| | | |
|---|---|---|
| $\boldsymbol{y}$ | = | เวคเตอร์ของค่าสังเกต (observation) |
| $\boldsymbol{X}$ | = | เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลคงที่ $\boldsymbol{b}$ |
| $\boldsymbol{b}$ | = | เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่ |
| $\boldsymbol{Q}$ | = | เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลคงที่ $\boldsymbol{g}$ |
| $\boldsymbol{g}$ | = | เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจากจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีนและแคปป้าเคซีน |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$\boldsymbol{Z}$ = เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลสุ่ม $\boldsymbol{a}$

$\boldsymbol{a}$ = เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์

$\boldsymbol{e}$ = เวคเตอร์ของความคลาดเคลื่อน (error)

โดยมีความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วมดังนี้

$$Var\begin{bmatrix}\mathbf{a}\\ \mathbf{e}\end{bmatrix}=\begin{bmatrix}A\sigma_a^2 & 0\\ 0 & I\sigma_e^2\end{bmatrix}$$

โดยที่

$A$ = เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์

$I$ = identity matrix

$\sigma_a^2$ = ความแปรปรวนเนื่องจากตัวสัตว์

$\sigma_e^2$ = ความแปรปรวนเนื่องจากความคลาดเคลื่อน

## 2.6 อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม

(effects of beta and kappa casein genes on milk production traits)

การศึกษาอิทธิพลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเบต้า และแคปป้าเคซีนอัลลีลต่างๆ ที่มีต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ซึ่งเป็นลักษณะปริมาณจึงถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากคู่และมีความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไม่สูงนัก ผลที่ได้จากการศึกษามีแนวโน้มที่ค่อนข้างขัดแย้งกันดังนี้

***ยีนเบต้าเคซีน*** การศึกษาของ Lin *et al*. (1989) และ Ng-Kwai-Hang *et al*. (1990) และ Bovenhuis *et al*. (1992) และ Ikonen *et al*. (1999) รายงานว่าอัลลีล $A^2A^2$ มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนม และปริมาณโปรตีน สูงกว่าจีโนไทป์ $A^1A^1$ ขัดแย้งกับรายงานของ Van Eenennaam and Medrano (1991) ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว

***ยีนแคปป้าเคซีน*** การศึกษาของ Lin *et al*. (1989) พบว่ายีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน มากกว่าจีโนไทป์ AA ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Van Eenennaam and Medrano (1991) ขัดแย้งกับการศึกษาของ Bovenhuis *et al*.

(1992) พบว่าจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณน้ำนมต่ำกว่าจีโนไทป์ AA แต่ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Falaki *et al*. (1997) รายงานว่าจีโนไทป์ AA ให้ปริมาณน้ำนมมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ AB แต่จีโนไทป์ BB ให้ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ AB และ AA ตามลำดับ

ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งของยีนเคซีนทั้งสองอยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน จึงเกิดอิทธิพลจากตำแหน่งของยีนที่อยู่ติดกันหรือ genetic linkage ระหว่างกันมากกว่าอิทธิพลของอัลลีลของยีนใดยีนหนึ่ง ทำให้การประมาณค่าอิทธิพลของยีนแต่ละชนิดต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมเกิดความผันแปรทั้งขนาดและทิศทางของอิทธิพลในแต่ละประชากร (Cowan *et al*., 1992) ดังนั้น การศึกษาอิทธิพลของยีนทั้งสองต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม จึงควรศึกษาในรูปแบบของการทำงานร่วมกันของยีน (multigene) มากกว่าการศึกษาเพียงยีนเดียว (single gene) เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะ (Bovenhuis *et al*., 1992; Ojala *et al*.,1997; Braunschweig *et al*., 2000)

การศึกษาอิทธิพลร่วมของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน Ojala *et al*. (1997) ทำการศึกษาในโคพันธุ์ Holstein รายงานว่ายีนเบต้าและแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^2$-AB ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$-AA $A^1A^1$-AB ตามลำดับ ดังนั้นจึงไม่ใช่เพียงยีนเบต้าเคซีนอัลลีล $A^2$ หรือแคปป้าเคซีนอัลลีล B เท่านั้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำนมและโปรตีน แต่อิทธิพลที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างอัลลีล ของยีนทั้งสอง หรือ epistasis effects ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Velmala *et al*., (1995) Braunschweig *et al*. (2000) และ Ikonen *et al*. (2001) รายงานว่ารูปแบบของ haplotype ของแม่มีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีน และเคซีน ของลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่ารูปแบบของ haplotype $A^2B$ ทำให้ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 กลุ่มตัวอย่างประชากรและข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ทำการสุ่มแม่โคนมลูกผสมระดับเลือดต่างๆ ระหว่างโคพันธุ์ยุโรป *(Bos taurus)* ได้แก่ โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน (Holstein Friesian) บราวน์สวิส (Brown Swiss) และเจอร์ซี่ (Jersey) และโคพันธุ์พื้นเมือง (*Bos indicus*) ได้แก่ ซาฮิวาล จากฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในเขตจังหวัดราชบุรี ที่มีการบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติและลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมรายตัว ได้แก่ ปริมาณน้ำนม โปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนของแม่โคนมที่ให้น้ำนมสมบูรณ์ (complete lactation) โดยเจ้าหน้าที่ของฟาร์มจะทำการชั่งน้ำหนักน้ำนม และสุ่มเก็บตัวอย่างรายตัวไปทดสอบเพื่อทำการตรวจวัดองค์ประกอบในน้ำนมภายในห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมราชบุรี โดยเครื่อง Milko Scan เดือนละครั้งติดต่อกันไปตลอดระยะเวลาการให้น้ำนมของแม่โคนม บันทึกแต่ละครั้งในวันทดสอบจะเป็นผลรวมของการชั่งน้ำหนักน้ำนม และสุ่มเก็บตัวอย่างในตอนเย็นและเช้าของวันถัดไป ดังนั้นในแต่ละระยะของการให้น้ำนมสมบูรณ์ของแม่โคแต่ละตัว จะมีบันทึกผลผลิตน้ำนมในวันทดสอบเฉลี่ยประมาณ 7-10 บันทึก จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดแม่โคนมเพื่อนำมาตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 3.2 โครงสร้างของข้อมูล (data structure)

ข้อมูลที่ใช้ประกอบด้วย 2 แฟ้มข้อมูล ดังนี้

1. *แฟ้มข้อมูลพันธุ์ประวัติ* (pedigree file) ประกอบด้วย
    - 1.1 หมายเลขประจำตัวโคนม (animal ID)
    - 1.2 หมายเลขพ่อพันธุ์โคนม
    - 1.3 หมายเลขแม่พันธุ์โคนม
    - 1.4 วัน เดือน ปี ที่เกิดของโคนมแต่ละตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. *แฟ้มข้อมูลผลผลิต* (production file) ประกอบด้วย

2.1 หมายเลขประจำตัวโคนม
2.2 พันธุ์ /กลุ่มพันธุ์และระดับสายเลือด
2.3 วัน เดือน ปี ที่คลอดลูก
2.4 ลำดับที่ของการให้นม (lactation number)
2.5 อายุเมื่อให้ลูก (age at calving)
2.6 ข้อมูลลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (ปริมาณน้ำนมปรับที่ 305 วัน ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน)
2.7 ข้อมูลจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน

## 3.3 การจัดการและการเตรียมข้อมูล (data editing and manipulation)

ข้อมูลทั้งหมดของโคนมในฟาร์มถูกบันทึกด้วยโปรแกรม The Dairy CHAMP™ Pastoral Program ซึ่งเป็นโปรแกรมสำเร็จรูปในการจัดการฟาร์มโคนม โดยจะสุ่มเลือกแม่โคนมที่มีชีวิตอยู่ภายในฟาร์ม ณ ปัจจุบัน และมีการบันทึกข้อมูลการให้ผลผลิตน้ำนมแล้วอย่างน้อย 1 ลำดับการให้นม ได้จำนวนทั้งหมด 87 ตัว ทำการเลือกเฉพาะข้อมูลพันธุ์ประวัติ และบันทึกลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมของแม่โคนมที่ได้ทำการสุ่มตัวอย่าง จากนั้นจึงทำการแปลงแฟ้มข้อมูลดังกล่าวให้เป็นแฟ้มตัวอักษร ดังนั้นลักษณะโครงสร้างของข้อมูลที่ได้รับจากฟาร์มจึงอยู่ในรูปของแฟ้มตัวอักษรหรือ text file ซึ่งมีรายละเอียดของข้อมูลดังนี้

***3.3.1 ข้อมูลพันธุ์ประวัติ*** ที่นำมาวิเคราะห์ครั้งนี้จะใช้ข้อมูลพันธุ์ประวัติเฉพาะของแม่โคนมที่ได้ทำการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน

***3.3.2 ข้อมูลผลผลิต*** ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมของแม่โคนมที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย ปริมาณน้ำนมปรับที่ 305 วัน ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนม ทำการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ซึ่งโดยทั่วไปการกระจายขององค์ประกอบเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนมอยู่ในช่วง 2.0-4.5 เปอร์เซ็นต์ (ประวีร์ และคณะ, 2546) ข้อมูลที่ไม่ได้อยู่ในช่วงดังกล่าวซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดเนื่องจากการตรวจวัดและการบันทึก ในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นจำนวนของข้อมูลที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้โดยจำแนกตามลักษณะที่ศึกษาดังแสดงใน***ตารางที่ 3.1***

***ตารางที่ 3.1*** จำนวนข้อมูลจำแนกตามลักษณะที่ทำการศึกษา

| ลักษณะที่ทำการศึกษา | จำนวนข้อมูล |
|---|---|
| ปริมาณน้ำนมปรับที่ 305 วัน | 175 |
| ปริมาณโปรตีน | 174 |
| เปอร์เซ็นต์โปรตีน | 180 |

เมื่อได้รายละเอียดของข้อมูลพันธุ์ประวัติ และบันทึกผลผลิตน้ำนมของแม่โคนมที่ทำการสุ่มเลือกแล้ว จากจึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดของแม่โคนมดังกล่าว เพื่อนำมาตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในห้องปฏิบัติการต่อไป เพื่อให้ได้ ***ข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคนม***

**การตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน**

เก็บตัวอย่างเลือดจากแม่โคนมทั้งหมด 87 ตัว เพื่อใช้ในการหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน โดยเจาะจากเส้นเลือดดำที่โคนหางใส่หลอดสูญญากาศที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัว (EDTA) ด้วยวิธีการเก็บที่ปลอดเชื้อจำนวน 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้แช่เย็นที่ -20 °C จนกว่าจะทำการล้างเซลล์

อุ่นเลือดที่เก็บไว้ให้ละลายด้วยอุณหภูมิห้อง เทใส่หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการล้างโดยเติม 10 m*M* NaCl/EDTA ให้ได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (แบ่งเติมครั้งละครึ่ง เขย่าแรงๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี) เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว ทำให้ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งไป ทำซ้ำประมาณ 3-6 ครั้ง จนกว่าได้สารละลายใสและเซลล์ค่อนข้างขาวดี เก็บเซลล์ไว้ในตู้แช่เย็นที่ 4 °C หรือ -20 °C เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (QIAamp® DNA Blood MiniKit) เริ่มจากการทำลายผนังเซลล์และย่อยโปรตีนต่างๆ ด้วย QIAGEN Protease และ buffer AL ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงทำการล้างเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สะอาดขึ้น ในขั้นตอนนี้ทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) โดยใช้ spin column จะทำให้ดีเอ็นเอถูกดูดซับไว้ที่ silica-gel membrane แต่โปรตีนและสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกชะล้างออกไปด้วย wash buffers AW1/AW2 แล้วจึงทำการชะล้างดีเอ็นเอออกจาก membrane ด้วย buffer AE จากนั้นจึงเก็บดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่สกัดได้ใน buffer AE ไว้ในตู้แช่เย็น -20 °C จนกว่าจะใช้งาน

### *การวิเคราะห์ด้วยวิธี ASPCR และ PCR/RFLP*

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน เป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอ ที่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนในสายโปรตีนแตกต่างกันไปในบางตำแหน่งของแต่ละอัลลีล การตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนโดยการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธี allele-specific polymerase chain reaction (ASPCR) และ polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) (ดัดแปลงจาก Braunschweig, M ; 1998) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนทั้งสองตามลำดับ

### *การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี ASPCR*

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี ASPCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีน ในวิธีการนี้ลำดับเบสบนสาย specific primers (oligonucleotides) ที่ใช้จะมีความจำเพาะสูง จึงทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (PCR-product) ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งเบสที่ผันแปรของแต่ละอัลลีล ซึ่งบนลำดับเบสของสายนิวคลิโอไทด์นี้ได้แสดงตำแหน่งเบสที่เกิดความผันแปรของแต่ละอัลลีลไว้โดยอักษร***ตัวเอน*** โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของแม่โคนมจำนวน 1 µl และสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา ประกอบด้วย 10XPCR-buffer 2.5 µl, dNTP's (1.25 m*M*) 4µl, forward primer/specific primer (20 m*M*) อย่างละ 0.5 µl, 0.5 U *Taq* DNA polymerase 0.5 µl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย sterile water ให้ได้ 25 µl ทั้งนี้ปริมาตรของดีเอ็นเอต้นแบบอาจปรับเปลี่ยนได้ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94 $^{o}$C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ มีรายละเอียดใน 1 รอบปฏิกิริยา ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 $^{o}$C เป็นเวลา 30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 62 $^{o}$C เป็นเวลา 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 $^{o}$C เป็นเวลา 60 วินาที และจบด้วยขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 $^{o}$C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วเก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{o}$C จนกว่าจะใช้งานต่อไป

***ขั้นตอนที่ 1 :*** ทำการแบ่งกลุ่มระหว่างยีนเบต้าเคซีนอัลลีล $A^1$ B C F (**กลุ่ม I**) และ $A^2$ $A^3$ E (**กลุ่ม II**) โดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 296 bp (จากบริเวณ intron VI ถึง exon VII ของยีนเบต้าเคซีน) โดยใช้ allele-specific primers ที่มีลำดับเบสดังนี้

**forward primer :**

*BCN* 1 5'-TGA AGA AAG TGG GTT AAT GAG AAA TCC T-3'

**reverse primers :**

*BCN* 3 ($A^1$ B C F-specific) 5'-TTT GTG GGA GGC TGT TA***T***-3'

*BCN* 2 ($A^2$ , $A^3$ , E-specific) 5'-TTT GTG GGA GGC TGT TA***G***-3'

***ขั้นตอนที่ 2*** : สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ***กลุ่ม I*** จะทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 462 และ 551 bp (จากบริเวณ intron VI ถึง exon VII ของยีนเบต้าเคซีน) และ 270 bp (จากบริเวณ intron IV ถึง exon VI ของยีนเบต้าเคซีน) โดยใช้ *BCN B* *BCN F* และ *BCN C* ตามลำดับ

**forward primer 1 :**

*BCN 1* 5'-TGA AGA AAG TGG GTT AAT GAG AAA TCC T-3'

**reverse primers 1 :**

*BCN B* (B-specific) 5'-GTG AGA GTC AGG CTC TG***C***-3'

*BCN F* (F-specific) 5'-GAA ACA TGA CAG TTG GA***A***-3'

**forward primer 2 :**

*BCNI5* 5'-ATC AAA TGA GCT GTC CAT ATT AAT CTA TT-3'

**reverse primers 2 :**

*BCN C* (C-specific) 5'-CTC TGT TTG CTG CTG TT***T***-3'

***ขั้นตอนที่ 3*** : สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อกลุ่ม II ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 414 bp (จากบริเวณ intron VI ถึง exon VII ของยีนเบต้าเคซีน) และ 267 bp (จากบริเวณ intron IV ถึง exon VI ของยีนเบต้าเคซีน) โดยใช้ allele-specific primers ที่มีลำดับเบสดังนี้

**forward primer 1 :**

*BCN 1* 5'-TGA AGA AAG TGG GTT AAT GAG AAA TCC T-3'

**reverse primers 1 :**

*BCN A*$^3$ ($A^3$-specific) 5'-GGG AAG GGC ATT TCT TT***T***-3'

**forward primer 2 :**

*BCNI5* 5'-ATC AAA TGA GCT GTC CAT ATT AAT CTA TT-3'

**reverse primers 2 :**

*BCN E* (E-specific) 5'-TGT TTG CTG CTG TTC CT***T***-3'

*BCN I5* (forward primer) 5'-ATC AAA TGA GCT GTC CAT ATT ATT CTA TT-3'

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอตามที่ต้องการแล้ว ทำการแยกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีน โดยใช้ PCR product 15 µl ผสมให้เข้ากันกับ Blue/Orange 6Xloading dye 3 µl หยอดลงในหลุมบนแผ่น agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ (volt) ประมาณ 1 ชั่วโมง นำ agarose gel ที่ได้ไปดูการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ทำการถ่ายรูปและบันทึกภาพลงบนแผ่นบันทึกข้อมูล (diskette)

***การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR/RFLP***

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR/RFLP เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการหาจีโนไทป์ของยีนแคปป้าเคซีน โดยทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วย primers *KP1* และ *KP2* จะได้ชิ้นส่วนขนาด 583 bp ครอบคลุมยีนแคปป้าเคซีนบริเวณ exon IV ทั้งหมด ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดความผันแปร (mutation) ในตำแหน่งต่างๆ ของอัลลีล

**forward primer :**

*KP 1* 5'-AAG AAA TAA TAC CAT TCT GCA TAA TTT ATT TTT TTA CAG-3'

**reverse primers :**

*KP 2* 5'-GGC TGT TAT TCA TTT TGC CTT ATT TAC CTG-3'

โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 1 µl และสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10XPCR-buffer 2.5 µl, dNTP's (1.25 m*M*) 4 µl, primers *KP 1/KP 2* (20 µM) อย่างละ 0.5 µl, 0.5 U *Taq* DNA polymerase 0.5 µl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย sterile water ให้ได้ 25 µl โดยใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเริ่มปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) โดยทำปฏิกิริยา 35 รอบ มีรายละเอียดใน 1 รอบปฏิกิริยา ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที และจบด้วยขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วเก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

หลังจากได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอครอบคลุมบริเวณที่ต้องการแล้ว ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ชนิดต่างๆ ดังนี้

***Hin*dIII** (A↓AGCTT)

***Hin*fI** (G↓ANTC)

***Mae*II** (A↓CGT)

***Hae*III** (GG↓CC)

***Hh*aI** (GCG↓C)

โดยมีสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการตัดดังแสดงใน ***ตารางที่ 3.2*** แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

***ตารางที่ 3.2*** แสดงสารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ของยีนแคปป้าเคซีน ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (RFLP)

| Reaction mix | *Hin*fI | *Hin*dIII | *Mae*II | *Hae*III | *Hha*I |
|---|---|---|---|---|---|
| 10XBuffer | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| BSA (promega®) | - | 0.2 | - | - | 0.2 |
| Sterile $H_2O$ | 9.5 | 9.3 | 9.5 | 9.5 | 9.3 |
| Enzyme | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| PCR product | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| Total Mix (µl) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

ทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ เพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปป้าเคซีน โดยผสมให้เข้ากันกับ Blue/Orange 6Xloading dye 3 µl หยอดลงในหลุมบนแผ่น agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ประมาณ 1 ชั่วโมง นำ agarose gel ที่ได้ไปตรวจดูการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ทำการถ่ายรูปและบันทึกลงบนแผ่นบันทึกข้อมูล ยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ต่างๆ เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดจะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก

## 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น

***3.4.1 การจำแนกอิทธิพลของปัจจัยคงที่*** ประกอบด้วย

***3.4.1.1 อิทธิพลของอายุที่แม่โคนมคลอดลูก*** จากข้อมูลที่ทำการศึกษาอายุที่แม่โคนมคลอดลูก ตั้งแต่อายุ 24 เดือน ถึง อายุ 109 เดือน

***3.4.1.2 อิทธิพลของปีที่แม่โคนมคลอดลูก*** เริ่มตั่งแต่ ปี พ.ศ. 2539 (1996) ถึงปี พ.ศ. 2546 (2003)

***3.4.1.3 อิทธิพลของฤดูกาลที่แม่โคนมคลอดลูก*** แบ่งออกเป็น 3 ฤดูกาล ตามกรมอุตุนิยมวิทยา เช่นเดียวกับการศึกษาของ ชาตรี คติวรเวช (2543) ดังนี้

*ฤดูกาลที่ 1* เดือนมีนาคม ถึง เดือนพฤษภาคม

*ฤดูกาลที่ 2* เดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาตม

*ฤดูกาลที่ 3* เดือนพฤศจิกายน ถึง เดือนกุมภาพันธ์

***3.4.1.4 อิทธิพลของกลุ่มพันธุ์*** ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โคนมลูกผสมระหว่างพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน บราวน์สวิส เจอร์ซี่ และซาฮิวาล โดยทำการจำแนกกลุ่มพันธุ์ตามระดับสายเลือดโคพันธุ์ยุโรป ดัดแปลงจากการศึกษาของ เทียมพบ ก้านเหลือง (2541) โดยรวมโคนมที่มีระดับสายเลือดโคยุโรปตั้งแต่ 62.50 เปอร์เซ็นต์ลงมาจัดไว้เป็นกลุ่มเดียวกัน ดังแสดงใน***ตารางที่ 3.3***

***ตารางที่ 3.3*** จำแนกกลุ่มพันธุ์ตามระดับเลือดและจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์

| กลุ่มพันธุ์ | ระดับเลือดโคยุโรป (เปอร์เซ็นต์) | จำนวนข้อมูล |
|---|---|---|
| 1 | มากกว่า 87.5 | 101 |
| 2 | 75.00 – น้อยกว่า 87.5 | 50 |
| 3 | 62.50 – น้อยกว่า 75.00 | 15 |
| 4 | น้อยกว่า 62.50 | 27 |
| *รวม* | | *193* |

***3.4.1.5 อิทธิพลของลำดับการให้นม*** การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยข้อมูลการให้ผลผลิตน้ำนมจากลำดับการให้นมที่ 1 ถึง 6 ดังแสดงใน***ตารางที่ 3.4***

***ตารางที่ 3.4*** แสดงจำนวนข้อมูลแยกตามลำดับการให้นม

| ลำดับการให้นม | จำนวนข้อมูล |
|---|---|
| 1 | 84 |
| 2 | 62 |
| 3 | 35 |
| 4 | 11 |
| 5 | 5 |
| 6 | 3 |
| *รวม* | *200* |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***3.4.2 การตรวจสอบการกระจายของข้อมูล*** ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้เป็นข้อมูลที่เก็บมาจากภาคสนาม (field data) ก่อนทำการวิเคราะห์จึงต้องตรวจสอบการกระจายของข้อมูลด้วยชุดคำสั่ง PROC UNIVARIATE NORMAL PLOT ในโปรแกรมสำเร็จรูป SAS for WINDOWS version 6.02 (SAS, 1998) พบว่าลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนมปรับที่ 305 วัน ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกสุ่มตัวอย่างมาจากประชากรที่มีการกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโมเดลผสมเชิงเส้นตรง โดยใช้โมเดลของสัตว์แต่ละตัว (animal model) และทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของความแปรปรวนด้วยวิธี Restricted Maximum Likelihood (REML) ซึ่งมีข้อกำหนด (assumption) ให้การกระจายของข้อมูลที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เป็นแบบปกติ (normal distribution) แล้วจึงวิเคราะห์อิทธิพลของยีนที่มีผลต่อลักษณะด้วยวิธี Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) (Henderson, 1984)

## 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์

### *3.5.1 หาองค์ประกอบของยีนในประชากร*

***ความถี่จีโนไทป์*** *(genotype frequency)*

$$= \frac{\text{จำนวนสัตว์ที่มีจีโนไทป์ที่กำหนด}}{\text{จำนวนสัตว์ทั้งหมด}}$$

***ความถี่อัลลีล*** *(allele frequency)*

$$= \frac{\text{จำนวนของอัลลีลของยีนที่กำหนด}}{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### *3.5.2 การประมาณค่าอิทธิพลของยีน*

**โมเดลที่ใช้ในการศึกษา**

โมเดลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบถึงความสำคัญในการพิจารณาอิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม โดยพิจารณาดังนี้

***โมเดลที่ 1 : ศึกษาอิทธิพลของยีน 1 ตำแหน่ง*** *(single gene)*

เพื่อศึกษาอิทธิพลของจีโนไทป์แบบต่างๆ ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน โดยพิจารณาอิทธิพลของยีนแต่ละตำแหน่งแยกกันดังโมเดล *(1a)* ศึกษาอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีนซึ่งพบ 5 แบบ ดังนี้ $A^1A^1$ $A^1A^2$ $A^2A^2$ $A^2B$ และ $A^1B/BB$ และโมเดล *(1b)* เพื่อศึกษาอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนแคปป้า เคซีนซึ่งพบ 5 แบบดังนี้ AA AB AE BB และ BE

$$\boldsymbol{y} = \boldsymbol{Xb} + \boldsymbol{Qg} + \boldsymbol{Za} + \boldsymbol{Wp} + \boldsymbol{e} \qquad \textit{(1a-b)}$$

โดยที่

| | | |
|---|---|---|
| $\boldsymbol{y}$ | = | เวคเตอร์ของค่าสังเกต |
| $\boldsymbol{X}$ | = | เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลคงที่ $\boldsymbol{b}$ |
| $\boldsymbol{b}$ | = | เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจาก |
| $\boldsymbol{Q}$ | = | เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลคงที่ $\boldsymbol{g}$ |
| $\boldsymbol{g}$ | = | เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจากจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีน *(1a)* และแคปป้าเคซีน *(1b)* |
| $\boldsymbol{Z}$ | = | เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลสุ่ม $\boldsymbol{a}$ |
| $\boldsymbol{a}$ | = | เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์ |
| $\boldsymbol{W}$ | = | เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมถาวร |
| $\boldsymbol{p}$ | = | เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจากสิ่งแวดล้อมถาวร |
| $\boldsymbol{e}$ | = | เวคเตอร์ของความคลาดเคลื่อน (error) |

โดยมีความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วมดังนี้

$$Var\begin{bmatrix}\mathbf{a}\\ \mathbf{e}\end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

***โมเดลที่ 2 : ศึกษาอิทธิพลของยีนร่วมกัน 2 ตำแหน่ง (multigene)***

เพื่อศึกษาอิทธิพลที่เกิดขึ้นเนื่องจากการรวมกันของจีโนไทป์ต่างๆ ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน เปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์ไขมัน โดยพิจารณาจีโนไทป์ของยีนทั้งสองตำแหน่งไปพร้อมๆ กัน ดังโมเดล *(2)* ซึ่งรูปแบบการรวมกันของจีโนไทป์ของยีนทั้งสองที่พบในประชากรมีทั้งหมด 15 แบบ ดังแสดงในตารางที่ เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีนทั้งสองต่อลักษณะ

$$\boldsymbol{y = Xb + Qg^{*} + Za + Wp + e} \qquad \textit{(2)}$$

โดยที่

$\boldsymbol{Q}$ = เมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับอิทธิพลคงที่ $\boldsymbol{g^{*}}$

$\boldsymbol{g^{*}}$ = เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจากการรวมกันของจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีนและแคปป้าเคซีน

และมีข้อกำหนดอื่นๆ เป็นไปตามโมเดล *(1a-b)*

วิเคราะห์หาองค์ประกอบความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วม (variance and covariance component estimation) ของลักษณะที่ทำการศึกษา เพื่อนำไปใช้ในการประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์แบบต่างๆ ของยีนทั้งสองต่อลักษณะ โดยจะใช้วิธีการวิเคราะห์ครั้งละลักษณะ (univariate analysis) ในประมาณค่าอิทธิพลของยีนทั้งสองด้วยโมเดล *(1a-b)* และ *(2)* เพื่อเปรียบเทียบถึงความสำคัญในการพิจารณาอิทธิพลของยีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป DR-BLUP Version 1.0, 2003 (Duangjinda *etal*., 2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

# ผลการวิเคราะห์และวิจารณ์ผล

## 4.1 ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (milk production traits)

ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ ปริมาณน้ำนมปรับที่ 305 วัน ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ในการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำนมเท่ากับ 3776.48 ±1052.86 กิโลกรัม ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนเท่ากับ 113.10 ±27.24 กิโลกรัม และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์โปรตีนเท่ากับ 3.21 ±0.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.1***

***ตารางที่ 4.1*** แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; S.D.) ค่าต่ำสุด (minimum) และค่าสูงสุด (maximum) โดยจำแนกตามลักษณะที่ศึกษา

| ลักษณะ | ค่าเฉลี่ย | S.D. | ค่าต่ำสุด | ค่าสูงสุด |
|---|---|---|---|---|
| ปริมาณน้ำนมปรับที่ 305 วัน | 3776.48 | 1052.86 | 853.00 | 6536.00 |
| ปริมาณโปรตีน | 113.10 | 27.24 | 39.00 | 185.00 |
| เปอร์เซ็นต์โปรตีน | 3.21 | 0.37 | 2.20 | 4.30 |

## 4.2 จีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน (genotype of beta and kappa casein genes)

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในประชากรโคนมที่ทำการศึกษาจำนวน 87 ตัว โดยวิธีการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ พบว่า

***ยีนเบต้าเคซีน*** การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จากดีเอ็นเอต้นแบบด้วย specific primers แต่ละคู่ จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กัน ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.2*** ทำให้สามารถจำแนกยีนเบต้าเคซีนได้เป็นจีโนไทป์ต่างๆ ที่พบในประชากร ดังนี้ $A^1A^1$ $A^1A^2$ $A^2A^2$ $A^2B$ และ $A^1B$ หรือ BB ดังแสดงใน***รูปภาคผนวกที่ 1-5***

***ยีนแคปป้าเคซีน*** จากการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 583 bp แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Hin*fI *Hin*dIII *Mae*II *Hae*III และ *Hha*I ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดต่างๆ กัน ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.3*** ทำให้สามารถจำแนกได้ว่ายีนแคปป้าเคซีนมีจีโนไทป์ต่างๆ ที่พบในประชากร ดังนี้ AA AB AE BB และ BE ดังแสดงใน***รูปภาคผนวกที่ 6-10*** แต่ไม่พบจีโนไทป์

EE ในประชากรที่ทำการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ ศิริลักษณ์ เตชะนรราช (2545) ทำการศึกษาจีโนไทป์ของแคปป้าเคซีนในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม จำนวน 60 ซึ่งแสดงการกระจายตัวของจีโนไทป์แบบต่างๆ ในทิศทางเดียวกัน

***ยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน*** เมื่อพิจารณายีนทั้งสองร่วมกันพบรูปแบบจีโนไทป์ทั้งหมด 15 แบบ ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.4***

***ตารางที่ 4.2*** ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR

| คู่ primers | *BCN 1* *BCN 2* | *BCN 1* *BCN 3* | *BCN 1* *BCN B* | *BCN I5* *BCN C* | *BCN 1* *BCN F* | *BCN 1* *BCN A*$^{3}$ | *BCN I5* *BCN E* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ขนาด (bp) / จีโนไทป์ | 296 | 296 | 462 | 270 | 551 | 414 | 267 |
| $A^1A^1$ | - | + | - | - | - | - | - |
| $A^1A^2$ | + | + | - | - | - | - | - |
| $A^2A^2$ | + | - | * | * | * | - | - |
| $A^2B$ | + | + | + | * | * | - | - |
| $A^1B$ หรือ BB | - | + | + | - | - | * | * |

* ไม่ต้องเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

***ตารางที่ 4.3*** ขนาด (bp) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ หลังจากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด (*Hin*fI *Hin*dIII *Mae*II *Hae*III และ *Hha*I)

| เอนไซม์ / จีโนไทป์ | *Hin*fI | *Hin*dIII | *Mae*II | *Hae*III | *Hha*I |
|---|---|---|---|---|---|
| AA | 59, 69, 129, 326 | 583 | 300, 283 | 252, 331 | 41, 542 |
| AB | 59, 69, 129, 326 | 131, 452 | 300, 283 | 252, 331 | 41, 542 |
| AE | 59, 69, 129, 326 | 583 | 300, 283 | 107, 145, 331 | 41, 542 |
| BB | 59, 69, 455 | 131, 452 | 300, 283 | * | * |
| BE | 59, 69, 129, 326 | 131, 452 | 300, 283 | 107, 145, 331 | 41, 542 |

* จีโนไทป์ BB ไม่ต้องตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III และ *Hha*I

### 4.3 **ความถี่ยีนและความถี่จีโนไทป์ของประชากร** (gene and genotype frequency)

ประชากรที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ายีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^2$ และ $A^2A^2$ และยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AA และ AB มีความถี่มากที่สุดในประชากรที่ทำการศึกษา สำหรับการรวมกันของยีนทั้งสอง พบว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$-AA $A^2A^2$-AA มีความถี่มากที่สุด ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.4*** และมีความถี่ของยีนเบต้าเคซีนอัลลีล $A^2$ และยีนแคปป้าเคซีนอัลลีล A สูงถึง 0.61 และ 0.72 ตามลำดับ เป็นอัลลีลพื้นฐาน (common allele) ของประชากรที่ทำการศึกษาดังแสดงใน***ตารางที่ 4.5*** ซึ่งสอดคล้องกับรายงานใน***ตารางที่ 2.3*** และ ***2.4***

***ตารางที่ 4.4*** แสดงจำนวนแม่โคนมที่มีจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนแบบต่างๆ และความถี่จีโนไทป์ (*genotype frequency*) ที่พบในประชากร

| Genotype / ***B-CN*** | ***K-CN*** AA | AB | AE | BB | BE | *Total* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $A^1A^1$ | 2 | 2 | 1 | - | - | 5 *(0.06)* |
| $A^1A^2$ | 19 | 12 | 2 | 2 | 1 | 36 *(0.41)* |
| $A^2A^2$ | 18 | 13 | - | - | - | 31 *(0.36)* |
| $A^2B$ | 5 | 4 | - | 1 | - | 10 *(0.11)* |
| $A^1B$ หรือ BB | - | 4 | - | 1 | - | 5 *(0.06)* |
| *Total* | 44 *(0.50)* | 35 *(0.40)* | 3 *(0.03)* | 5 *(0.06)* | 1 *(0.01)* | 87 *(1.00)* |

***ตารางที่ 4.5*** แสดงความถี่อัลลีล (allele frequency) ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่พบในประชากร

| Gene/allele | Frequency | |
|---|---|---|
| ***B-CN*** | เมื่อกลุ่ม $A^1B$ หรือ BB เป็นอัลลีล $A^1$ | เมื่อกลุ่ม $A^1B$ หรือ BB เป็นอัลลีล B |
| $A^1$ | 0.30 | 0.27 |
| $A^2$ | 0.61 | 0.61 |
| B | 0.09 | 0.11 |
| *Total* | *1* | *1* |
| ***K-CN*** | | |
| A | 0.72 | |
| B | 0.26 | |
| E | 0.02 | |
| *Total* | *1* | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 4.4 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม

### *ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของความแปรปรวน*

องค์ประกอบของความแปรปรวนในแต่ละโมเดลประกอบด้วย ค่าความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ( $\sigma_a^2$ ) ค่าความแปรปรวนเนื่องจากสภาพแวดล้อมถาวร ( $\sigma_{pe}^2$ ) ค่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน ($\sigma_e^2$) และค่าความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ ($\sigma_p^2$) ซึ่งค่าเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับโมเดลที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. องค์ประกอบของความแปรปรวนสำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม มีค่าความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์อยู่ในช่วง 517,370 กิโลกรัม$^2$ (*โมเดล 1a*) ถึง 540,090 กิโลกรัม$^2$ (*โมเดล 1b*) โดยมีค่าอัตราพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.51 ถึง 0.54 ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.6***

***ตารางที่ 4.6*** ค่าประมาณองค์ประกอบของความแปรปรวน ค่าอัตราพันธุกรรมโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ($h^2$) และค่า log likelihood แต่ละโมเดลที่วิเคราะห์ของลักษณะปริมาณน้ำนม

| องค์ประกอบ | โมเดล 1a | โมเดล 1b | โมเดล 2 |
|---|---|---|---|
| $\sigma_a^2$ | 517370 | 540090 | 532480 |
| $\sigma_{pe}^2$ | 96103 | 56040 | 96138 |
| $\sigma_e^2$ | 388160 | 387630 | 392810 |
| $\sigma_p^2$ | 1001630 | 983756 | 1021430 |
| $h^2$ | 0.51 | 0.54 | 0.52 |
| -2LogL | 2148 | 2143 | 2008 |

$\sigma_a^2$ ความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์

$\sigma_{pe}^2$ ความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมถาวร

$\sigma_e^2$ ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

$\sigma_p^2$ ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ

2. องค์ประกอบของความแปรปรวนสำหรับลักษณะปริมาณโปรตีน มีค่าความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์อยู่ในช่วง 297.02 กิโลกรัม$^2$ (*โมเดล 1b*) ถึง 307.90 กิโลกรัม$^2$ (*โมเดล 2*) โดยมีค่าอัตราพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.43 ถึง 0.44 ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.7***

***ตารางที่ 4.7*** ค่าประมาณองค์ประกอบของความแปรปรวน ค่าอัตราพันธุกรรมโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ($h^2$) และค่า log likelihood แต่ละโมเดลที่วิเคราะห์ของลักษณะปริมาณโปรตีน

| องค์ประกอบ | โมเดล 1a | โมเดล 1b | โมเดล 2 |
|---|---|---|---|
| $\sigma_a^2$ | 301.78 | 297.02 | 307.90 |
| $\sigma_{pe}^2$ | 27.95 | 26.88 | 38.86 |
| $\sigma_e^2$ | 351.69 | 350.44 | 355.83 |
| $\sigma_p^2$ | 681.42 | 674.34 | 702.58 |
| $h^2$ | 0.44 | 0.44 | 0.43 |
| -2LogL | 1114 | 1111 | 1049 |

$\sigma_a^2$ ความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์

$\sigma_{pe}^2$ ความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมถาวร

$\sigma_e^2$ ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

$\sigma_p^2$ ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ

3. องค์ประกอบของความแปรปรวนสำหรับลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีน มีค่าความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์อยู่ในช่วง 3.02 เปอร์เซ็นต์$^2$ (*โมเดล 1b*) ถึง 3.33 เปอร์เซ็นต์$^2$ (*โมเดล 1a*) โดยมีค่าอัตราพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.21 ถึง 0.22 ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.8***

***ตารางที่ 4.8*** ค่าประมาณองค์ประกอบของความแปรปรวน ค่าอัตราพันธุกรรมโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์ ($h^2$) และค่า log likelihood แต่ละโมเดลที่วิเคราะห์ของลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีน

| องค์ประกอบ | โมเดล 1a | โมเดล 1b | โมเดล 2 |
|---|---|---|---|
| $\sigma_a^2$ | 3.33 | 3.02 | 3.13 |
| $\sigma_e^2$ | 11.34 | 11.30 | 11.42 |
| $\sigma_p^2$ | 14.68 | 14.32 | 14.56 |
| $h^2$ | 0.22 | 0.21 | 0.21 |
| -2LogL | 612 | 607 | 583 |

$\sigma_a^2$ ความแปรปรวนโดยตรงเนื่องจากตัวสัตว์

$\sigma_e^2$ ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

$\sigma_p^2$ ความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ผลการวิเคราะห์หาอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน***

*1. **เมื่อพิจารณายีนทีละตำแหน่ง** (single-gene)*

***ยีนเบต้าเคซีน*** การประมาณค่าอิทธิพลของยีนเบต้าเคซีนจากโมเดล ***(1a)*** ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.9*** พบว่าจีโนไทป์ $A^1A^1$ และ $A^1A^2$ มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนม และปริมาณโปรตีน สูงสุด จีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุด แต่ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนต่ำสุด

***ตารางที่ 4.9*** แสดงอิทธิพลของยีนเบต้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม

| จีโนไทป์ | ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม | | |
|---|---|---|---|
| | ปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม) | ปริมาณโปรตีน (กิโลกรัม) | เปอร์เซ็นต์โปรตีน (เปอร์เซ็นต์) |
| $A^1A^1$ | 0.80 | 3.40 | -1.17 |
| $A^1A^2$ | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| $A^2A^2$ | -20.45 | -1.97 | -0.73 |
| $A^2B$ | -14.10 | -3.86 | -0.58 |
| $A^1B$ หรือ BB | -724.16 | -18.25 | 0.97 |

จาก***ตารางที่ 4.9*** แสดงอิทธิพลของยีนเบต้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน ขัดแย้งกับการศึกษาของ Ikonen *et al*. (1999) และ Van Eenennaam and Medrano (1991) รายงานว่าจีโนไทป์ $A^2A^2$ ให้ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีนสูงสุด แต่มีแนวโน้มสอดคล้องกับการศึกษาของ Bovenhuis *et al*. (1992) รายงานว่าจีโนไทป์ $A^1B$ และ BB ให้ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีนต่ำสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ยีนแคปป้าเคซีน*** การประมาณค่าอิทธิพลของยีนแคปป้าเคซีนจากโมเดล ***(1b)*** ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.10*** พบว่าจีโนไทป์ AA มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนมและโปรตีนสูงสุด จีโนไทป์ AE มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุด แต่ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนต่ำสุด

***ตารางที่ 4.10*** แสดงอิทธิพลของยีนแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม

| จีโนไทป์ | ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม | | |
|---|---|---|---|
| | ปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม) | ปริมาณโปรตีน (กิโลกรัม) | เปอร์เซ็นต์โปรตีน (เปอร์เซ็นต์) |
| AA | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| AB | -173.65 | -2.63 | 0.03 |
| AE | -1279.88 | -29.29 | 0.41 |
| BB | -629.88 | -17.82 | 0.12 |
| BE | -579.49 | -11.29 | -0.14 |

จาก***ตารางที่ 4.10*** แสดงอิทธิพลของยีนแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีน สอดคล้องกับการศึกษาของ Bovenhuis *et al*. (1992) และ Van Eenennaam and Medrano (1991) รายงานว่าจีโนไทป์ BB ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนต่ำกว่าจีโนไทป์ AA และ AB แต่ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงกว่าจีโนไทป์ AB และ AA ตามลำดับ แต่อิทธิพลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ขัดแย้งกับรายงานของ Ikonen *et al*. (1999) รายงานว่าจีโนไทป์ BB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ AB BE AA AE และ EE ตามลำดับ

### *2. เมื่อพิจารณายีนรวมกัน 2 ตำแหน่ง (polygene)*

***ยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน*** การประมาณค่าอิทธิพลของการทำงานร่วมกันระหว่างยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนจากโมเดล ***(2)*** ดังแสดงใน***ตารางที่ 4.11*** พบว่าจีโนไทป์ $A^1A^1$-AB $A^1A^2$-AA และ $A^1A^1$-AA มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงสุด ตามลำดับ จีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB-BB และ $A^1A^2$-AE มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุด แต่จีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB-AB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนต่ำสุด

***ตารางที่ 4.11*** แสดงอิทธิพลร่วมของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม

| จีโนไทป์ | ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม | | |
|---|---|---|---|
| | ปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม) | ปริมาณโปรตีน (กิโลกรัม) | เปอร์เซ็นต์โปรตีน (เปอร์เซ็นต์) |
| $A^1A^1$-AA | -74.49 | 5.18 | -0.186 |
| $A^1A^1$-AB | 19.64 | 2.00 | -0.190 |
| $A^1A^1$-AE | -531.25 | -11.73 | 0.161 |
| $A^1A^2$-AA | 0.00 | 0.00 | 0.000 |
| $A^1A^2$-AB | -121.83 | -1.96 | 0.034 |
| $A^1A^2$-AE | -1767.34 | -42.43 | 0.445 |
| $A^1A^2$-BB | -476.68 | -16.57 | -0.160 |
| $A^1A^2$-BE | -891.24 | -21.63 | -0.098 |
| $A^2A^2$-AA | -180.25 | -8.14 | -0.039 |
| $A^2A^2$-AB | -288.74 | -9.14 | -0.017 |
| $A^2$B-AA | -633.83 | -17.98 | 0.025 |
| $A^2$B-AB | -990.40 | -20.12 | 0.179 |
| $A^2$B-BB | -1568.94 | -47.38 | 0.254 |
| $A^1$B หรือ BB -AB | -142.54 | -4.98 | -0.194 |
| $A^1$B หรือ BB -BB | -628.03 | -15.81 | 0.461 |

จาก***ตารางที่ 4.11*** แสดงอิทธิพลร่วมของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน มีแนวโน้มขัดแย้งกับการศึกษาของ Ikonen *et al*. (1999) รายงานว่าจีโนไทป์ $A^2A^2$-AB $A^2A^2$-AA และ $A^1A^2$-AE ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงสุด จีโนไทป์ $A^1A^2$-AB และ $A^1A^1$-AB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนมสูงสุด และการศึกษาของ Ojala *et al*. (1997) รายงานว่ายีนเบต้าและแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^2$-AB ให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนสูงกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$-AA $A^1A^1$-AB ตามลำดับ

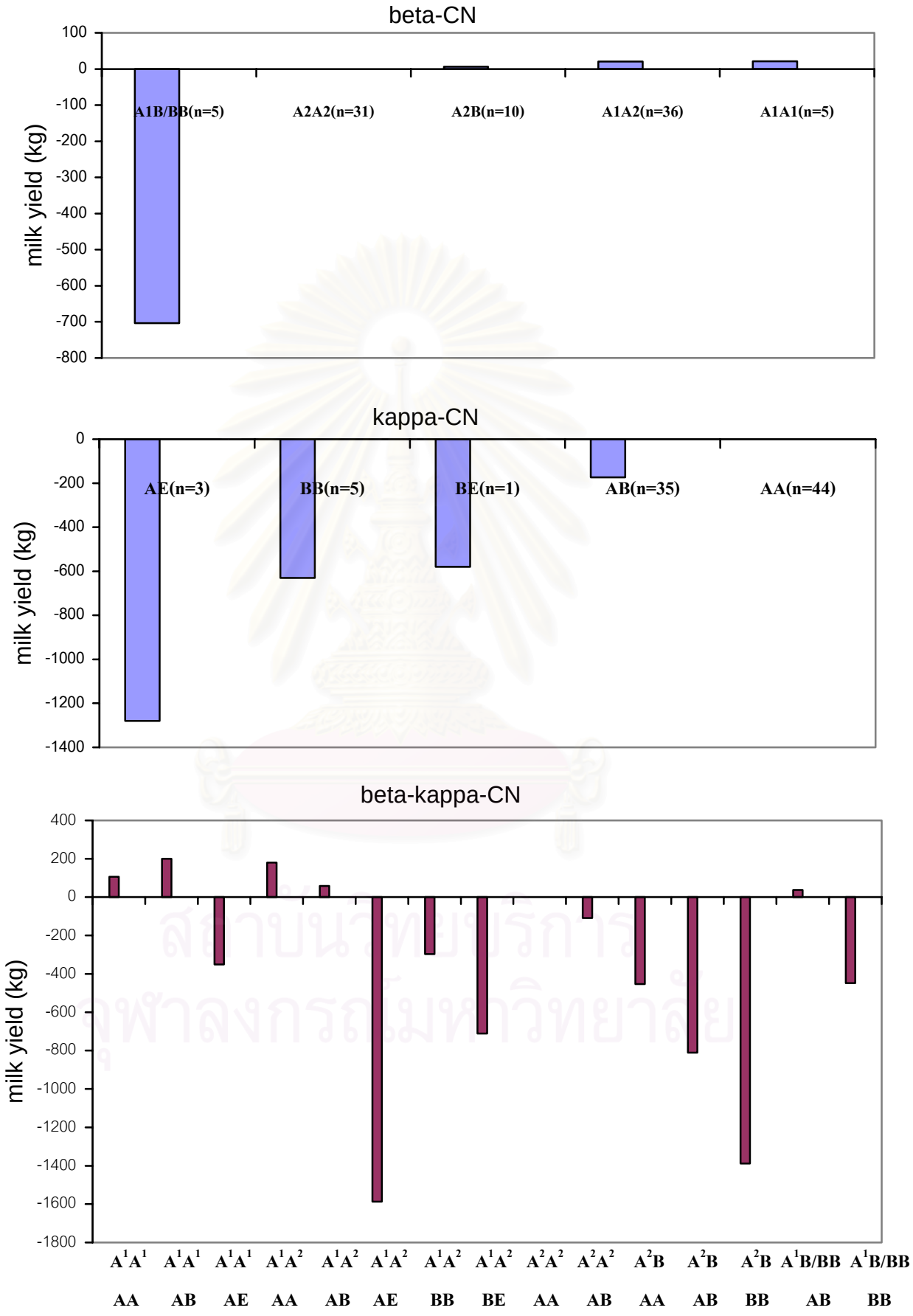
อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า การประมาณค่าอิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่ได้จากทั้งสองโมเดล (***โมเดล (1)*** และ ***โมเดล (2)***) มีแนวโน้มที่ไม่สอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจาก

1. การที่มีจำนวนของข้อมูลในแต่ละรูปแบบจีโนไทป์ไม่เท่ากัน (unbalanced data) และจำนวนของข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ค่อนข้างน้อย จึงทำให้บางจีโนไทป์พบข้อมูลน้อยมาก เช่น $A^1A^1$-AE $A^1A^2$-BE $A^2$B-BB และ $A^1$B หรือ BB -BB มีข้อมูลเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น

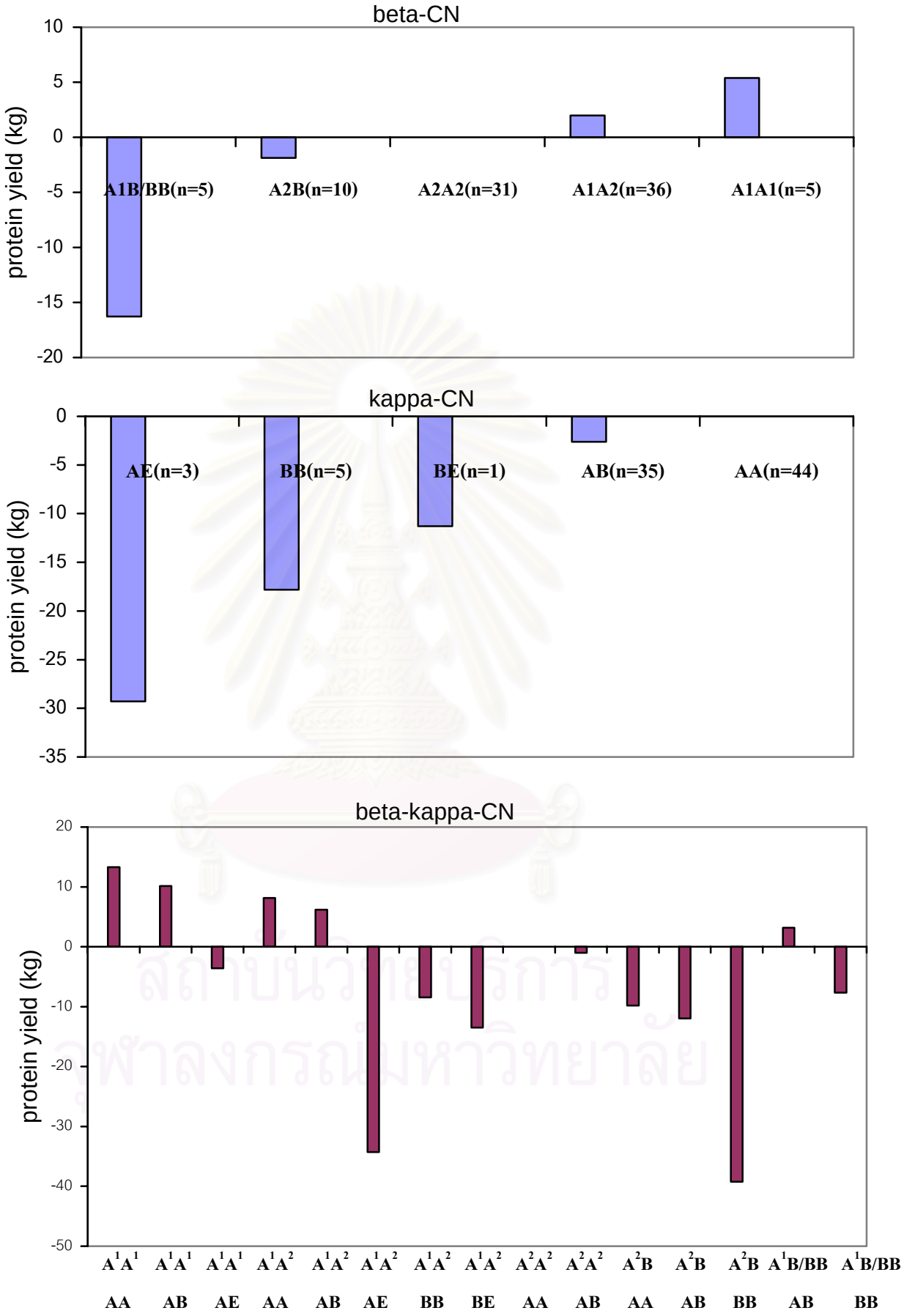
2. อิทธิพลของการทำงานร่วมกันระหว่างจีโนไทป์ของยีนทั้งสอง (interaction effect) ต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมดังใน***รูปที่ 4.1 4.2 และ 4.3*** แสดงอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่า การทำงานร่วมกันระหว่างจีโนไทป์ของยีนทั้งสองต่อลักษณะปริมาณน้ำนม แม้ว่ายีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^1$ และยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AA ต่างก็มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนมสูงสุด แต่เมื่อพิจารณาอิทธิพลของยีนทั้งสองร่วมกัน พบว่าจีโนไทป์ $A^1A^1$-AB ให้ปริมาณน้ำนมมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ $A^1A^2$-AA $A^1A^1$-AA และ $A^1A^2$-AB ตามลำดับ ดังนั้นจึงไม่ใช่เพียงอิทธิพลของยีนเบต้าเคซีนอัลลีล $A^1$ หรือยีนแคปป้าเคซีนอัลลีล A เท่านั้นที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะปริมาณน้ำนมสูงสุด แต่อิทธิพลที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างอัลลีลของยีนทั้งสอง เช่นเดียวกับ ลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำนม ยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1$B หรือ BB และยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AE ต่างก็มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงสุด แต่เมื่อพิจารณาอิทธิพลของยีนทั้งสองร่วมกัน พบว่าจีโนไทป์ $A^1$B หรือ BB -BB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ $A^1A^2$-AE $A^2$B-BB และ $A^2$B-AB ตามลำดับ แต่จีโนไทป์ $A^1$B หรือ BB -AB กลับให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนต่ำที่สุด

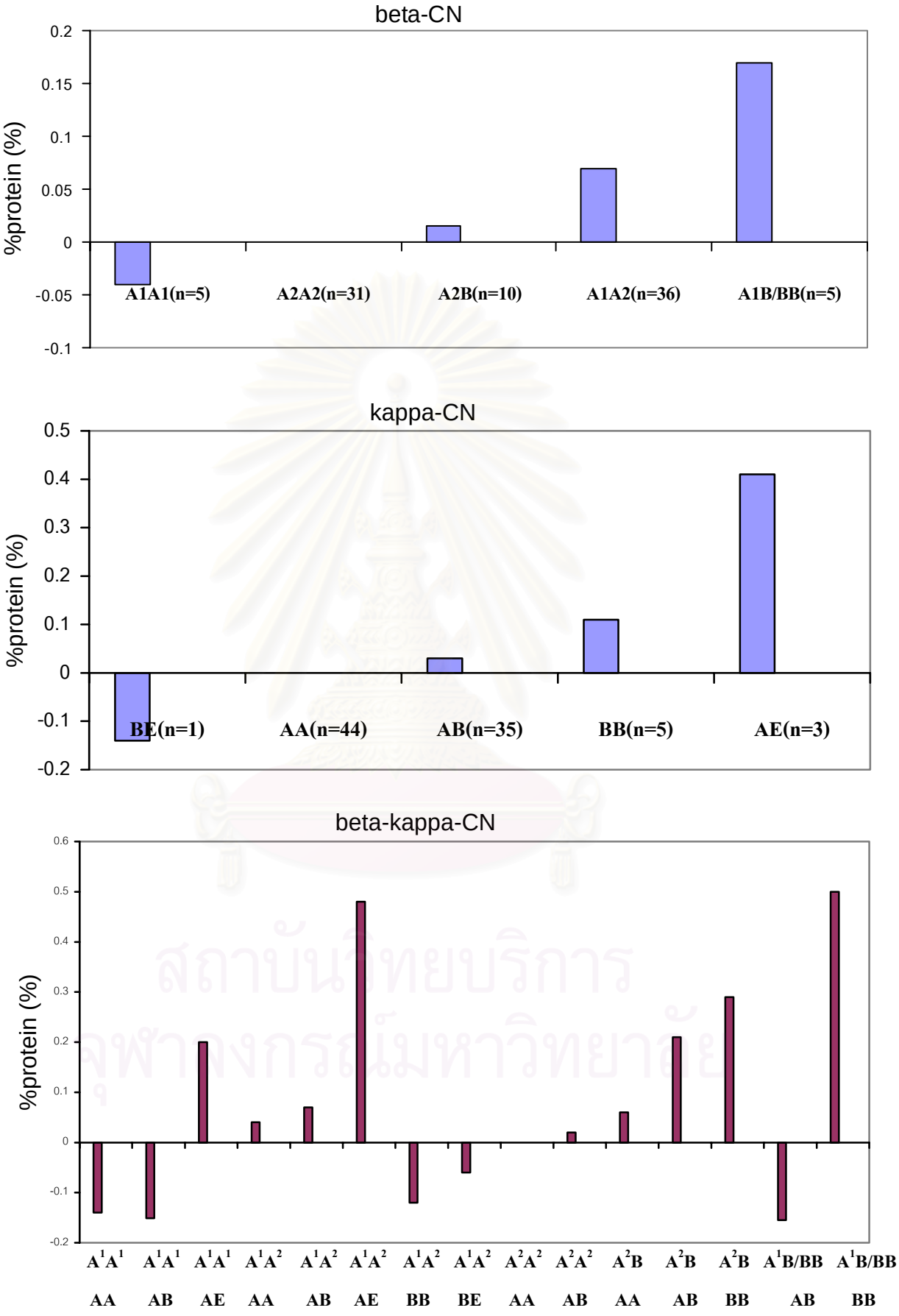
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




***รูปที่ 4.1*** อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม)




***รูปที่ 4.2*** อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะปริมาณโปรตีน (กิโลกรัม)




***รูปที่ 4.3*** อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)

# บทที่ 5

# สรุปผลการวิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ

## 5.1 จีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน

ในประชากรโคนมลูกผสมที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ จำนวน 87 ตัว พบจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนดังนี้

***ยีนเบต้าเคซีน*** พบจีโนไทป์ทั้งหมด 5 แบบ ได้แก่ $A^1A^1$ $A^1A^2$ $A^2A^2$ $A^2B$ และ $A^1B$/BB โดยมีอัลลีล $A^2$ เป็นอัลลีลพื้นฐานที่พบมากที่สุดในประชากร มีความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.61

***ยีนแคปป้าเคซีน*** พบจีโนไทป์ทั้งหมด 5 แบบ ได้แก่ AA AB AE BB และ BE โดยมีอัลลีล A เป็นอัลลีลพื้นฐานที่พบมากที่สุดในประชากร มีความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.72

## 5.2 อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม

ประชากรโคนมลูกผสมที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนมีอิทธิพลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ปริมาณโปรตีน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน และอาจมีอิทธิพลเนื่องจากปฏิกิริยาร่วม (interaction effect) ระหว่างยีนทั้งสอง ดังนี้

***ปริมาณน้ำนม***

ยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^1$ และ $A^1A^2$ ให้ปริมาณน้ำนมสูงที่สุดตามลำดับ และจีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB ให้ปริมาณน้ำนมต่ำที่สุด (ต่ำกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$ ถึง 724.16 กิโลกรัม) แต่เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนทั้งสองพบว่าจีโนไทป์ $A^2B$ ให้ปริมาณน้ำนมต่ำเสมอเมื่ออยู่ร่วมกับยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ต่างๆ

ยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AA ให้ปริมาณน้ำนมสูงที่สุด และจีโนไทป์ AE ให้ปริมาณน้ำนมต่ำที่สุด (ต่ำกว่าจีโนไทป์ AA ถึง 1279.88 กิโลกรัม) แต่เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนทั้งสองพบว่าจีโนไทป์ AE และ BB ให้ปริมาณน้ำนมต่ำเสมอเมื่ออยู่ร่วมกับยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ต่างๆ

***ปริมาณโปรตีน***

ยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^1$ ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (สูงกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$ 3.40 กิโลกรัม) และจีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB ให้ปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด (ต่ำกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$ ถึง 18.25 กิโลกรัม)

ยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AA ให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุด และจีโนไทป์ AE ให้ปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด (ต่ำกว่าจีโนไทป์ AA 29.29 กิโลกรัม)

แต่เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนทั้งสองพบว่ายีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^2B$ และยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AE และ BB ให้ปริมาณโปรตีนต่ำเสมอเช่นเดียวกับปริมาณน้ำนม

***เปอร์เซ็นต์โปรตีน***

ยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงที่สุด (สูงกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$ 0.97 เปอร์เซ็นต์) และจีโนไทป์ $A^1A^1$ ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนต่ำที่สุด (ต่ำกว่าจีโนไทป์ $A^1A^2$ ถึง 1.17 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนทั้งสองพบว่า $A^2B$ ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงเสมอเมื่ออยู่ร่วมกับยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ต่างๆ

ยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AE ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงที่สุด (สูงกว่าจีโนไทป์ AA 0.41 เปอร์เซ็นต์) และจีโนไทป์ BE ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนต่ำที่สุด (ต่ำกว่าจีโนไทป์ AA 0.14 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนทั้งสองพบว่า AE ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงเสมอเมื่ออยู่ร่วมกับยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ต่างๆ

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

***แนวทางการใช้ MAS ในการปรับปรุงลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม***

จากการศึกษาอิทธิพลของยีนยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนในครั้งนี้ มีแนวทางในการนำไปใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อช่วยในการคัดเลือกโคนมสำหรับลักษณะต่างๆ ดังนี้

ควรพิจารณาคัดเลือกโคนมโดยดูจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนทั้งสองที่มีต่อลักษณะ เช่น ยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^1A^1$ และปฏิกิริยาร่วมกับยีนแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AA และ AB ให้ปริมาณน้ำนมสูงแต่ปฏิกิริยาร่วมกับจีโนไทป์ AE กลับให้ปริมาณน้ำนมต่ำ ยกเว้นยีนเบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^2B$ และแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AE และ BB จะให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณโปรตีนต่ำเสมอ แต่เบต้าเคซีนจีโนไทป์ $A^2B$ และแคปป้าเคซีนจีโนไทป์ AE กลับให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงเสมอด้วยเช่นกัน

***แนวทางการศึกษาเพิ่มเติม***

การหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน และการประมาณค่าอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนทั้งสองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นจุดเริ่มต้นในการเชื่อมโยงความรู้ด้านพันธุศาสตร์ปริมาณและการใช้เทคโนโลยีด้านพันธุ์ศาสตร์โมเลกุลเข้าด้วยกัน โดยมองยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน ในฐานะของ candidate gene ที่คาดว่าจะมีอิทธิพลสำคัญต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โคนม ซึ่งข้อมูลต่างๆ ที่ได้มายังไม่ใช่ผลสรุปจากตัวแทนโคนมของประเทศ เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลสุ่มจากประชากรโคนมลูกผสมฝูงหนึ่งในประเทศไทยซึ่งมีจำนวนเพียง 87 ตัว เท่านั้น จึงนับได้ว่าเป็นจำนวนที่น้อยมากสำหรับการศึกษาในด้านนี้ ตลอดจนยังมีข้อจำกัดต่างๆ ในรายละเอียดของตัวโคนมอยู่มาก เช่น พันธุ์ประวัติและความสัมพันธ์ (genetic linkage) ของโคนมในฝูงที่ทำการศึกษา ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาด้านนี้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมจากการศึกษาครั้งนี้ เพื่อให้ได้ข้อสรุปชัดเจนขึ้น ดังนี้

1. ***ประชากรโคนม*** ควรทำการศึกษาอิทธิพลของยีนในจำนวนประชากรที่มากขึ้น เพื่อให้มีตัวแทนในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์เพียงพอ ทำให้สามารถประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะต่างๆ ได้อย่างแม่นยำมากขึ้น ตลอดจนได้ข้อสรุปที่ถูกต้องจากกลุ่มตัวอย่างที่สามารถเป็นตัวแทนของประชากรก่อนนำความสัมพันธ์ที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกโคนมประชากรนั้นๆ

2. ***ความสัมพันธ์ของโคนมในประชากร*** ทำการศึกษาในประชากรโคนมที่มีความสัมพันธ์กัน เพื่อให้สามารถศึกษาอิทธิพลของยีนในรูปแบบของ haplotype และความสามารถในการถ่ายทอดของยีนจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งได้

3. ***ลักษณะ*** ควรมีการศึกษาอิทธิพลของยีนต่อลักษณะที่มีความสำคัญอื่นๆ ในโคนมเพิ่มเติม เนื่องจากยีนอาจมีอิทธิพลต่อลักษณะมากกว่า 1 ลักษณะ (pleiotropy) การคัดเลือกจากจีโนไทป์ของยีนเหล่านี้จึงอาจมีผลกระทบต่อลักษณะอื่นๆ ในโคนมด้วย

4. ***ยีนอื่นๆ*** ควรมีการศึกษาและตรวจสอบชนิดและอิทธิพลของยีนอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียง เช่น ยีนแอลฟาเอส1 เนื่องจากเป็นยีนที่อยู่บริเวณใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน

# รายการอ้างอิง

## ภาษาไทย


จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ. 2534. เรื่องควรรู้เกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. ภาควิชาสัตวบาล, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 123 หน้า.

ชาตรี คติวรเวช. 2543. การประมาณค่าอิทธิพลโดยตรงและอิทธิพลทางพันธุกรรมของแม่สำหรับลักษณะผลผลิตในโคนมลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 102 หน้า.

เทียมพบ ก้านเหลือง. 2541. การประเมินค่าการผสมพันธุ์พ่อพันธุ์โคนมภายใต้สภาพแวดล้อมประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 134 หน้า.

ประวีร์ วิชชุลตา, ณิฐิมา เฉลิมแสน, สุทธิศักดิ์ แก้วแกมจันทร์. 2546. สถานภาพองค์ประกอบน้ำนมดิบในประเทศไทย. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการโคนมน้ำนมโคคุณภาพสู่ผู้บริโภค. 23-24 มกราคม 2546 โรงแรมเจริญธานี ปริ๊นเซส ขอนแก่น. หน้า 7-13.

วรวิทย์ สิริพลวัฒน์. 2544. เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ปีก. การประชุมวิชาการการขยายปรับปรุงพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ในสัตว์ประจำปี 2544. 26-27 กรกฎาคม 2544 ห้องประชุมอาคารสถาบัน 3 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. I18-I21.

ศิริลักษณ์ เตชะนรราช. 2545. การศึกษาจีโนไทป์ของแคปป้า-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม. วิทยานิพนธ์ปริญญาปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 63 หน้า.

สมเกียรติ สายธนู. 2537. หลักการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 34 หน้า.

สุมณฑา พรหมบุญ. 2539. พันธุศาสตร์ประชากรและวิวัฒนาการ. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 194 หน้า.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 253 หน้า.

**ภาษาอังกฤษ**

Aleandri, R., L. G. Buttazzoni, J. C. Schneider, A. Caroli, and R. Davoli. 1990. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. J. Dairy Sci. 73:241

Aschaffenburg, R., A. Sen, and M. P. Thompson. 1968. Genetic variants of casein in Indian and African Zebu cattle. Comp. Biochem. Physiol. 25:177-184.

Bech, A., and K. R. Kristiansen. 1990. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. J. Dairy Res. 57:53-62.

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.

Bovenhuis, H., J.A.M. Van Arendonk, and S. korver. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. J. Dairy Sci. 75:2549.

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

Choi, J. W. and Ng-Kwai-Hang, K. F. 2003. Effects of genetic variants of K-casein and B-lactoglobulin and heat treatment on coagulating properties of milk. Asian-Aust.J.Anim.Sci. 16:1212-1217.

Cowan, C. M., M. R. Dentine, and T. Colye. 1992. Chromosome substitution effects associated with *K* –casein and *B* –lactoglobulin in Holstein cattle. J. Dairy Sci. 75:1097-1104.

Dong, C., and Ng-Kwai-Hang, K. F. 1998. Characterization of a non – electrophoretic genetic variant of beta-casein by peptide mapping and mass spectrometric analysis. Int. Dairy J. Abstr. 8(12) 967-972.

Duangjinda, M., I. Misztal, S. Tsuruta, and T. Druet. 2003. DR-BLUP 1.0. Genetic evaluation program.

Falaki, M., A. Prandi, C. Corradini, M. Sneyers, N. Gengler, S. Massart, U. Fazzini, A. Burny, D. Portetelle, and R. Renaville. 1997. Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in Simmental cattle. J. Dairy Res. 64:47-56.

Falconer, D. S., and T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th ed. Longman House, Jarlow, Eng. 464 pp.

Famula, T. R., and J. F. Medrano. 1994. Estimation of genotype effects for milk proteins with animal and sire trandmitting ability models. J. Dairy Sci. 77:3153-3162.

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.

Henderson, C. R. 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

Ikonen, T., O. Ruottinen, G. Erhardt, and M. Ojala. 1996. Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new *K*-casein variant. Anim. Genet. 27:179-181.

Ikonen, T., K. Ahlfors, R. Kempe, M. Ojala, and O. Ruottinen. 1999a. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. J. Dairy Sci. 82:205-214.

Ikonen, T., M. Ojala, and O. Ruottinen. 1999b. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. J. Dairy Sci. 82:1026-1033.

Ikonen, T., H. Bovenhuis, M. Ojala, O. Ruottinen, and M. Georges. 2001. Association between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayshire cows. J. Dairy Sci. 84:507-514.

Israel, C., and J. I. Weller. 1998. Estimation of candidate gene effect in dairy cattle populations. J. Dairy Sci. 81:1653-1662.

Kennedy, B. W., M. Quinton, and J. A. M. Vrendonk. 1991. Estimation of effects of single genes on quantitative traits. J. Anim. Sci. 70:2000-2012.

Kinghorn, B., J. van der Werf, and M. Ryan. 1999. Animal breeding use of new technologies. The Post Graduate Foundation in Veterianarian Science of the University of Sydney. 308 pp.

Koczan, D., G. Hobom., and H. M. Seyfert. 1991. Genomic organization of the bovine alpha-S1-casein gene. Nucleic Acids Res. 19:5591-5596. Medline No. 92051301.

Lin, C. Y., A. J. McAllister, K. F. Ng-Kwai-Hang, and J. F. Hayes. 1986. Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. J. Dairy Sci. 69:704-712.

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.

Lin, C. Y., M. P. Sabour, and A. J. Lee. 1992. Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: a review. Animal Breeding Abstracts. 60:1-10.

Mahe, M. F., G. Miranda, R. Queval, A. Bado, P. S. Zafindrajaona, and F. Grosclaude. 1999. Genetic polymorphism of milk proteins in African Bos taurus and Bos indicus populations. Genet.Sel.Evol. Abstr. 31:(3)239-253.

Malik, S., N. S. Sidhu, B. P. Singh, S. Singh, and R. Rani. 1998. A study of kappa and beta casein alleles in cross-bred and Zebu cattle from India using polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). Proc. 6th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Armidale, New South Wales, Australia 26:381-384.

Marziali, A. S., and K. F. Ng-Kwai-Hang. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yielding capacity. J. Dairy Sci. 69:1193-1201.

Mercier, J., and J. Vilotte. 1993. Structure and function of milk protein genes. J. Dairy Sci. 76:3079-3098.

Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, and H.G. Monardes. 1984. Associations of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. J. Dairy Sci. 67:835.

Ng-Kwai-Hang, K. F., H.G. Monardes, and J. F. Hayes. 1990. Associations between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. J. Dairy Sci. 73:3414.

Ojala, M., T. R. Famula, and J. F. Medrano. 1997. Effects of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. J. Dairy Sci. 80:1776-1785.

Prinzenberg, E. M., I. Krause, and G. Erhardt. 1999. SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to know protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, $A^1$). Anim.Biotechnol. 10:49-62. Medline No. 20118591.

Ron, M., O. Yoffe, E. Ezra, J. F. Medrano, and J. I. Weller. 1994. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. J. Dairy Sci. 77:1106-1113.

Sabour, M. P., C. Y. Lin, A. J. Lee, and A. J. McAllister. 1996. Associations between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits. J. Dairy Sci. 79:1050-1056.

SAS. 1998. SAS User's Guide. Version 6.12 SAS. Institue. Cary, NC.

Sivarajasingam, S., Kinghorn, and J. van der werf. 1998. Animal breeding and genetics for the tropics. University of New England Armidale, NSW, Australia.

Threadgill, D. W., and J. E. Womack. 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. Nucleic Acids Res. 23: 6935-6942. Medline No. 1979856.

Van Eenennaam, A. L., and J. F. Medrano. 1991. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous *K* –casein cows. J. Dairy Sci. 74:1491-1496.

Van Eenennaam, A. L., and J. F. Medrano. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. J. Dairy Sci. 74:1730-1742.

Velmala, R., J. Vilkki, K. Elo, and A. Maki-Tanila. 1995. Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. Anim. Genet. 26:419-425.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

### *การเก็บตัวอย่างเลือด และสกัดดีเอ็นเอ*

1. เข็มและหลอดสุญญากาศ (vacutainer)® ที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัว (EDTA)
2. NaCl/EDTA 10 m*M* 4 °C
3. QIAamp® DNA Blood MiniKit (QIAGEN®, Germany)
4. หลอดพลาสติกสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร
5. Microcentrifuge รุ่น EBA 12 (Hettich, Germany)
6. Vortex Mixer รุ่น Vortex Genie2 (Scientific Industres, Inc, U.S.A.)

### *การตรวจหาจีโนไทป์ด้วยวิธี ASPCR และ PCR/RFLP*

1. Taq DNA polymerase (5U/µl) และ 10xPCR buffer (MBI Fermentas, U.S.A.)
2. dNTP's 100 mM (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)
3. Oligonucleotide Primers (Microsynth, Switzerland)
4. เอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่

   *Hae*III (10U/µl) (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)

   *Hha*I (10U/µl) (Promega, U.S.A.)

   *Hin*dIII (10U/µl) (Promega, U.S.A.)

   *Hin*fI (10U/µl) (NEB, U.S.A.)

   *Hpy*CH4 IV (isoschizomer of MaeII) (10U/µl) (NEB,U.S.A.)
5. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น GeneAmp PCR system9600 (Perkin Elmer, U.S.A.)
6. Agarose gel สำหรับอิเล็กโตรโฟลิซิส (USB, Spain)
7. 0.5XTBE
8. Blue/Orange 6Xloading dye (Promega, U.S.A.)
9. ชุด Gel Electrophoresis ชนิดแนวนอน ประกอบด้วย

   Power Supply รุ่น 300 Plus (Wealtec, Taiwan)

   Gel Electrophoresis System รุ่น miniGes (Wealtec, Taiwan)

12. Ethidium bromide (Sigma, U.S.A.)
13. 50 และ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, U.S.A.)
14. 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)
15. Diskette และ Sony B/W Printing Paper



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ตารางภาคผนวกที่ 1*** แสดงข้อมูลรายตัวของแม่โคนมที่ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนด้วยวิธี ASPCR และ PCR/RFLP ตามลำดับ

| ลำดับ | หมายเลขประจำตัวโคนม | จีโนไทป์ | |
|---|---|---|---|
| | | ยีนเบต้าเคซีน | ยีนแคปป้าเคซีน |
| 1 | J125 | $A^2A^2$ | AA |
| 2 | J132 | $A^1A^2$ | AE |
| 3 | J133 | $A^2A^2$ | AA |
| 4 | J139 | $A^1A^2$ | AA |
| 5 | J140 | $A^1A^2$ | AA |
| 6 | 32 | $A^1A^2$ | AB |
| 7 | 51 | $A^1A^2$ | AB |
| 8 | 87 | $A^1A^2$ | AA |
| 9 | 031 | $A^1A^2$ | AE |
| 10 | 039 | $A^2A^2$ | AB |
| 11 | 048 | $A^2A^2$ | AB |
| 12 | 052 | $A^1A^2$ | BB |
| 13 | 362 | $A^2A^2$ | AA |
| 14 | 630 | $A^2A^2$ | AB |
| 15 | 635 | $A^2A^2$ | AA |
| 16 | 723 | $A^2B$ | AB |
| 17 | 759 | $A^2A^2$ | AB |
| 18 | 779 | $A^2A^2$ | AA |
| 19 | 820 | $A^2B$ | BB |
| 20 | 843 | $A^2A^2$ | AB |
| 21 | 846 | $A^2B$ | AA |
| 22 | 865 | $A^2B$ | AA |
| 23 | 873 | $A^1A^2$ | AA |
| 24 | 3904 | $A^1B$ หรือ BB | AB |
| 25 | 3910 | $A^1A^2$ | AA |
| 26 | 3916 | $A^1A^2$ | AA |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)*** แสดงข้อมูลรายตัวของแม่โคนมที่ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนด้วยวิธี ASPCR PCR/RFLP ตามลำดับ

| ลำดับ | หมายเลขประจำตัวโคนม | จีโนไทป์ | |
|---|---|---|---|
| | | ยีนเบต้าเคซีน | ยีนแคปป้าเคซีน |
| 27 | 3926 | $A^2A^2$ | AA |
| 28 | 3943 | $A^2A^2$ | AA |
| 29 | 3950 | $A^2A^2$ | AA |
| 30 | 3951 | $A^2B$ | AB |
| 31 | 3963 | $A^1A^2$ | AB |
| 32 | 3965 | $A^1A^2$ | BE |
| 33 | 4005 | $A^1A^2$ | AA |
| 34 | 4011 | $A^2A^2$ | AA |
| 35 | 4013 | $A^2B$ | AB |
| 36 | 4014 | $A^1A^1$ | AB |
| 37 | 4015 | $A^1A^2$ | AB |
| 38 | 4017 | $A^1B$ หรือ BB | AB |
| 39 | 4020 | $A^2A^2$ | AB |
| 40 | 4027 | $A^2B$ | AB |
| 41 | 4033 | $A^1A^2$ | BB |
| 42 | 4042 | $A^1A^2$ | AB |
| 43 | 4044 | $A^2B$ | AA |
| 44 | 4052 | $A^1B$ หรือ BB | BB |
| 45 | 4054 | $A^2B$ | AA |
| 46 | 4057 | $A^2A^2$ | AB |
| 47 | 4060 | $A^2A^2$ | AA |
| 48 | 4102 | $A^2A^2$ | AA |
| 49 | 4106 | $A^2B$ | AA |
| 50 | 4107 | $A^1A^2$ | AA |
| 51 | 4108 | $A^1A^2$ | AA |
| 52 | 4111 | $A^1A^2$ | AA |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)*** แสดงข้อมูลรายตัวของแม่โคนมที่ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนด้วยวิธี ASPCR PCR/RFLP ตามลำดับ

| ลำดับ | หมายเลขประจำตัวโคนม | จีโนไทป์ | |
|---|---|---|---|
| | | ยีนเบต้าเคซีน | ยีนแคปป้าเคซีน |
| 53 | 4114 | $A^1A^2$ | AA |
| 54 | 4115 | $A^2A^2$ | AB |
| 55 | 4121 | $A^1A^2$ | AA |
| 56 | 4127 | $A^2A^2$ | AB |
| 57 | 4137 | $A^1A^2$ | AA |
| 58 | 4146 | $A^2A^2$ | AA |
| 59 | 4155 | $A^2A^2$ | AA |
| 60 | 4156 | $A^1A^2$ | AB |
| 61 | 4158 | $A^1A^2$ | AB |
| 62 | 4160 | $A^1A^1$ | AA |
| 63 | 4161 | $A^2A^2$ | AB |
| 64 | 4163 | $A^2A^2$ | AA |
| 65 | 4168 | $A^1A^2$ | AA |
| 66 | 4171 | $A^1A^2$ | AB |
| 67 | 4172 | $A^1A^2$ | AB |
| 68 | 4201 | $A^1A^2$ | AA |
| 69 | 4202 | $A^1A^2$ | AB |
| 70 | 4204 | $A^1A^1$ | AE |
| 71 | 4205 | $A^2A^2$ | AB |
| 72 | 4214 | $A^2A^2$ | AB |
| 73 | 4220 | $A^1A^2$ | AB |
| 74 | 4221 | $A^2A^2$ | AB |
| 75 | 4225 | $A^2A^2$ | AA |
| 76 | 4236 | $A^1A^1$ | AB |
| 77 | 4237 | $A^1$B หรือ BB | AB |
| 78 | 4261 | $A^1$B หรือ BB | AB |

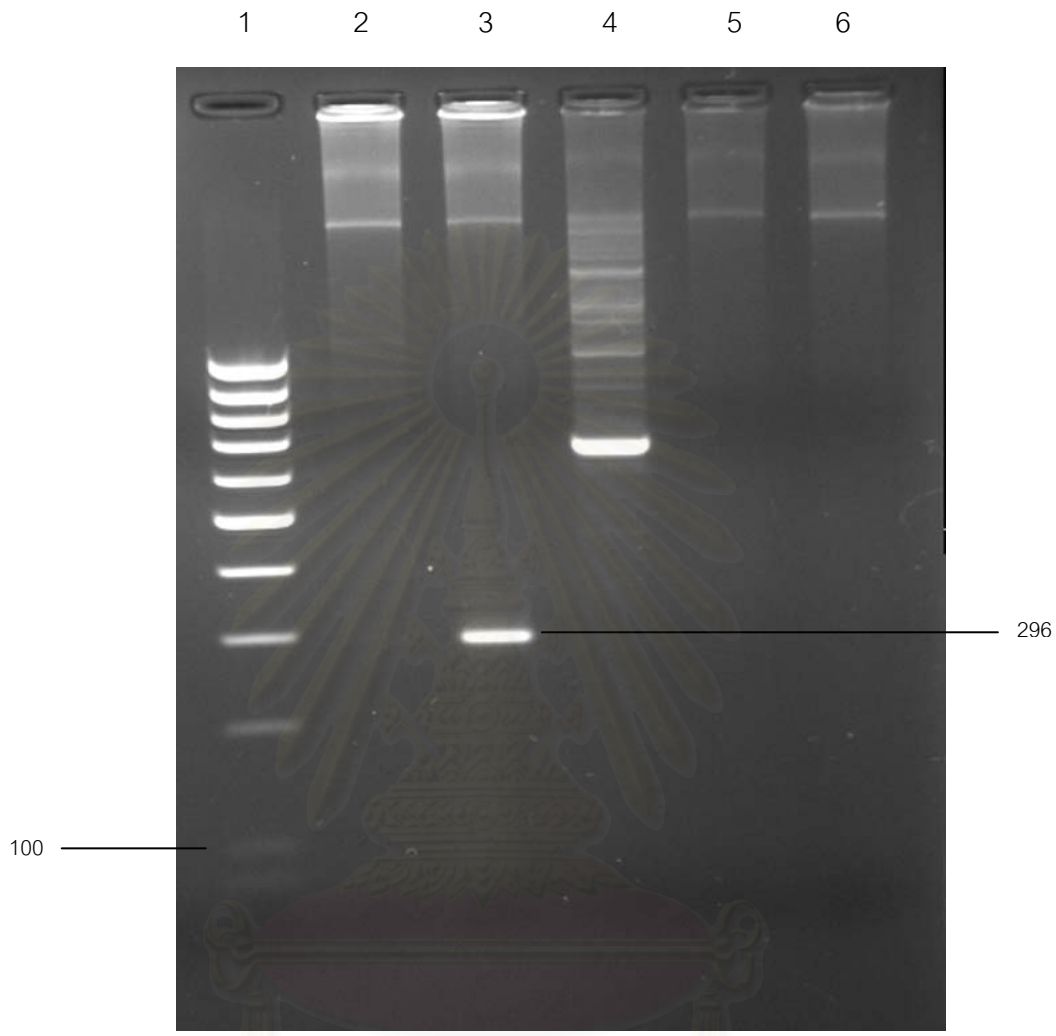
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

***ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)*** แสดงข้อมูลรายตัวของแม่โคนมที่ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนด้วยวิธี ASPCR PCR/RFLP ตามลำดับ

| ลำดับ | หมายเลขประจำตัวโคนม | จีโนไทป์ | |
|---|---|---|---|
| | | ยีนเบต้าเคซีน | ยีนแคปป้าเคซีน |
| 79 | 4271 | $A^1A^2$ | AA |
| 80 | 4273 | $A^1A^2$ | AA |
| 81 | 4276 | $A^1A^2$ | AA |
| 82 | 4285 | $A^1A^2$ | AA |
| 83 | 4288 | $A^2A^2$ | AA |
| 84 | 4339 | $A^1A^1$ | AA |
| 85 | 4348 | $A^2A^2$ | AA |
| 86 | 7103 | $A^2A^2$ | AA |
| 87 | 7104 | $A^1A^2$ | AB |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนเบต้าเคซีน***




***รูปภาคผนวกที่ 1*** แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^1A^1$ (2%agarose gel)

lene 1 : marker 100 bp

lene 2 : primers BCN*1*-BCN*2* (-)

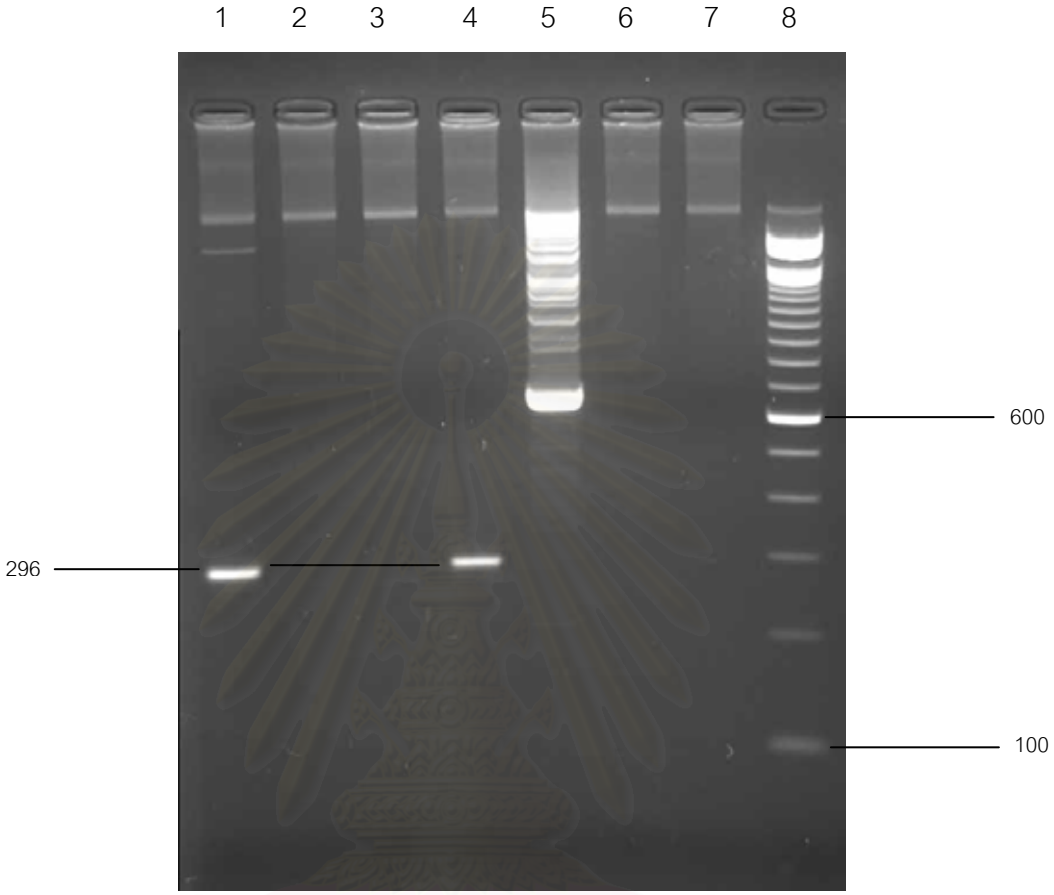
lene 3 : primers BCN*1*-BCN*3* (+)

lene 4 : primers BCN*1*-BCN *B* (-)

lene 5 : primers BCN *I5*-BCN *C* (-)

lene 6 : primers BCN*1*-BCN *F* (-)

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของยีน*เบต้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 2*** แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^1A^2$ (2%agarose gel)

lene 1 : primers BCN*1*-BCN*2* (+)

lene 2 : primers BCN*1*-BCN $A^3$ (-)

lene 3 : primers BCN*1*-BCN *E* (-)

lene 4 : primers BCN*1*-BCN*3* (+)

lene 5 : primers BCN*1*-BCN *B* (-)

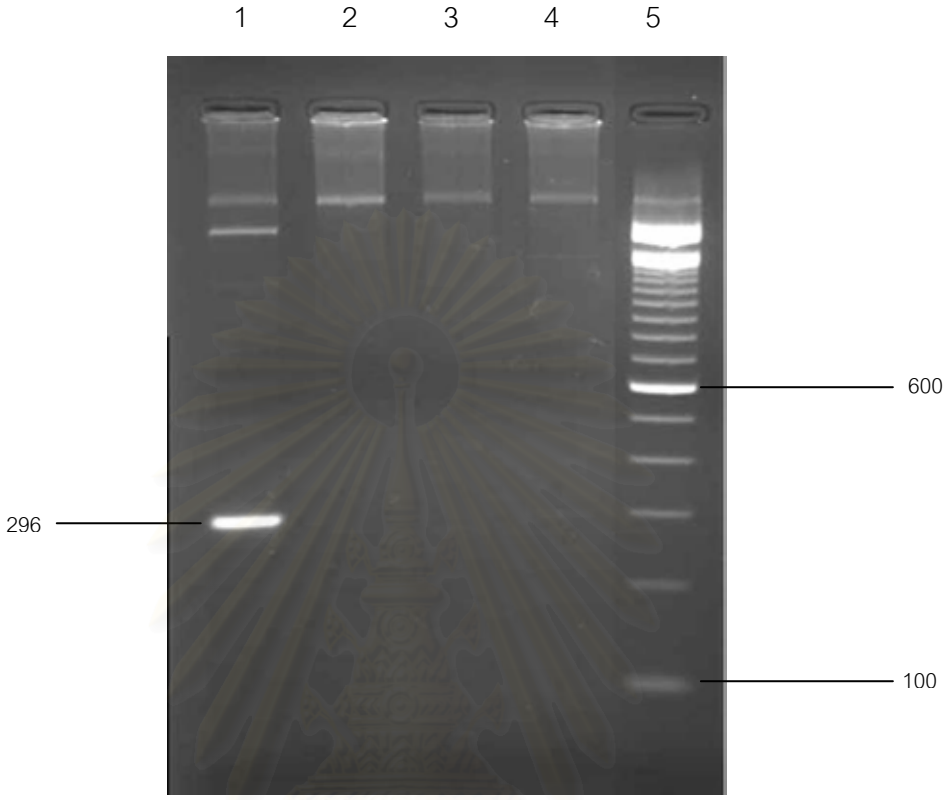
lene 6 : primers BCN *I5*-BCN *C* (-)

lene 7 : primers BCN*1*-BCN *F* (-)

lene 8 : marker 100 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนเบต้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 3*** แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^2A^2$ (2%agarose gel)

lene 1 : primers BCN*1*-BCN*2* (+)

lene 2 : primers BCN*1*-BCN $A^3$ (-)

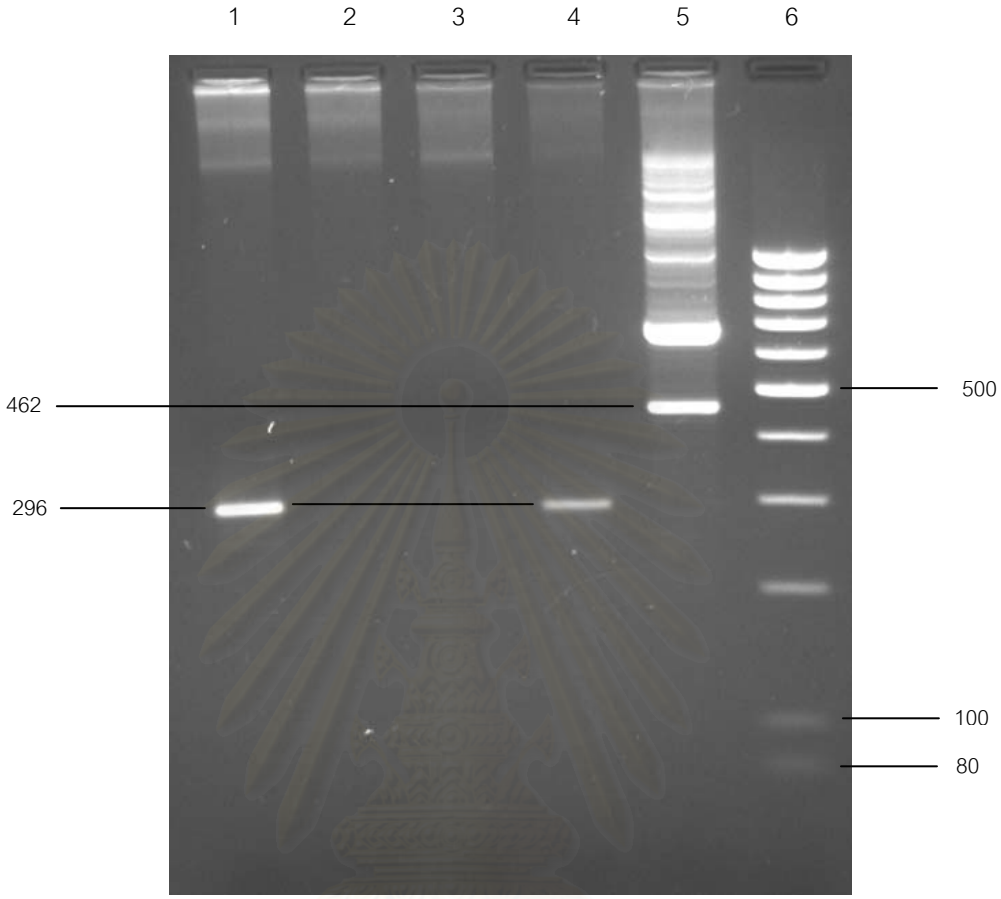
lene 3 : primers BCN*1*-BCN *E* (-)

lene 4 : primers BCN*1*-BCN*3* (-)

lene 5 : marker 100 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนเบต้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 4*** แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^2B$ (2%agarose gel)

lene 1 : primers BCN*1*-BCN*2* (+)

lene 2 : primers BCN*1*-BCN $A^3$ (-)

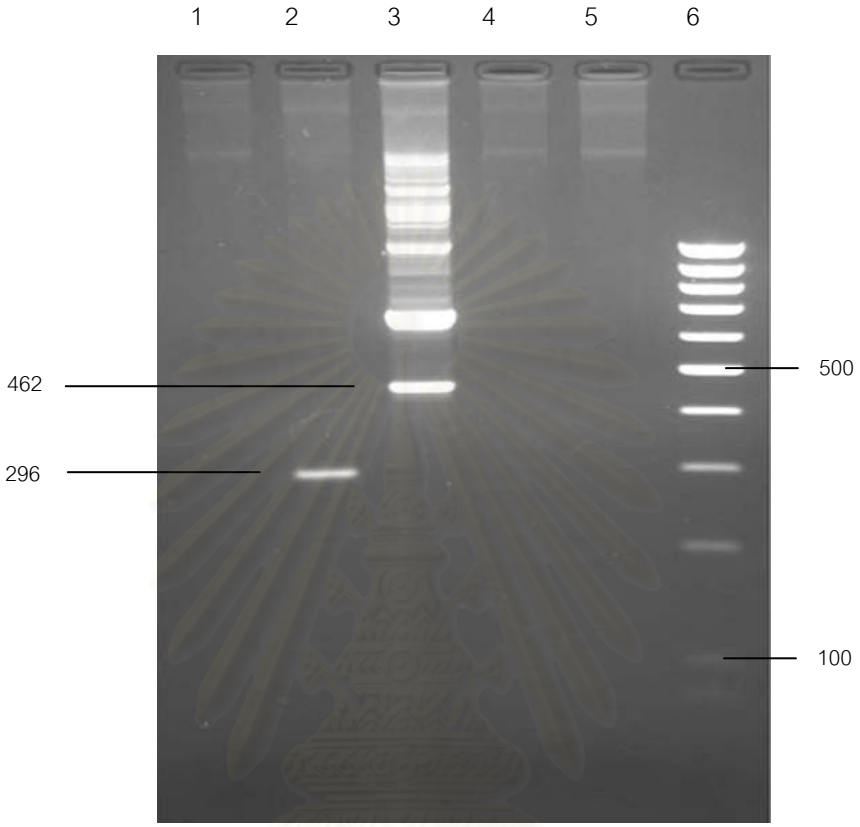
lene 3 : primers BCN*1*-BCN *E* (-)

lene 4 : primers BCN*1*-BCN*3* (+)

lene 5 : primers BCN*1*-BCN *B* (+)

lene 6 : marker 100 bp

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนเบต้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 5*** แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี ASPCR จีโนไทป์ $A^1B$ หรือ BB (2%agarose gel)

lene 1 : primers BCN*1*-BCN*2* (-)

lene 2 : primers BCN*1*-BCN $A^3$ (+)

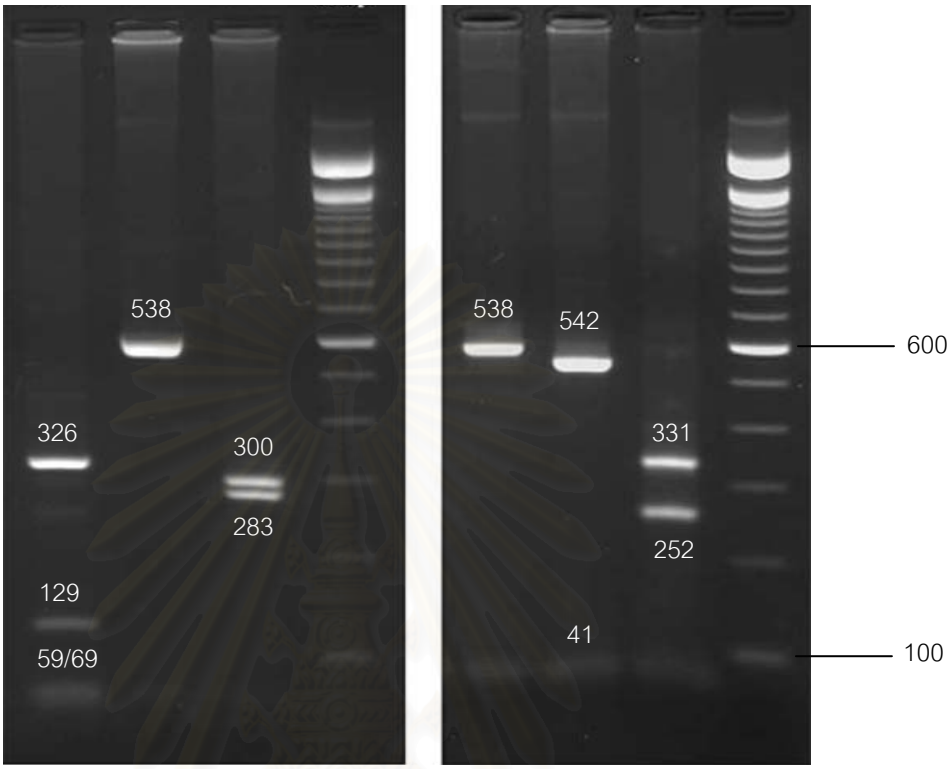
lene 3 : primers BCN*1*-BCN *E* (+)

lene 4 : primers BCN*1*-BCN*3* (-)

lene 5 : primers BCN*1*-BCN *B* (-)

lene 6 : marker 100 bp

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนแคปป้าเคซีน***




***รูปภาคผนวกที่ 6*** แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AA (2%agarose gel)

lene 1 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI (+)

lene 2 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (-)

lene 3 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Mae*II (+)

lene 4 : marker 100 bp

lene 5 : PCR Product 583 bp

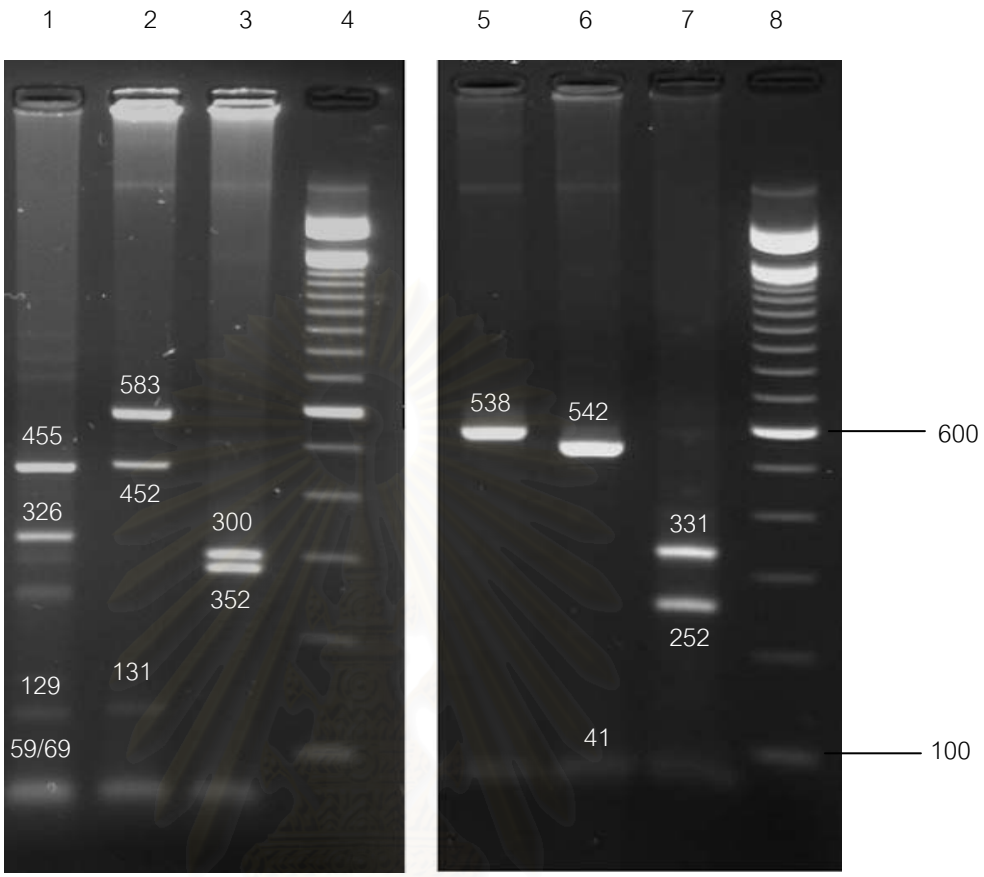
lene 6 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I (+)

lene 7 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III (-)

lene 8 : marker 100 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนแคปป้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 7*** แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AB (2%agarose gel)

lene 1 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI (+/-)

lene 2 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (+/-)

lene 3 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Mae*II (+)

lene 4 : marker 100 bp

lene 5 : PCR Product 583 bp

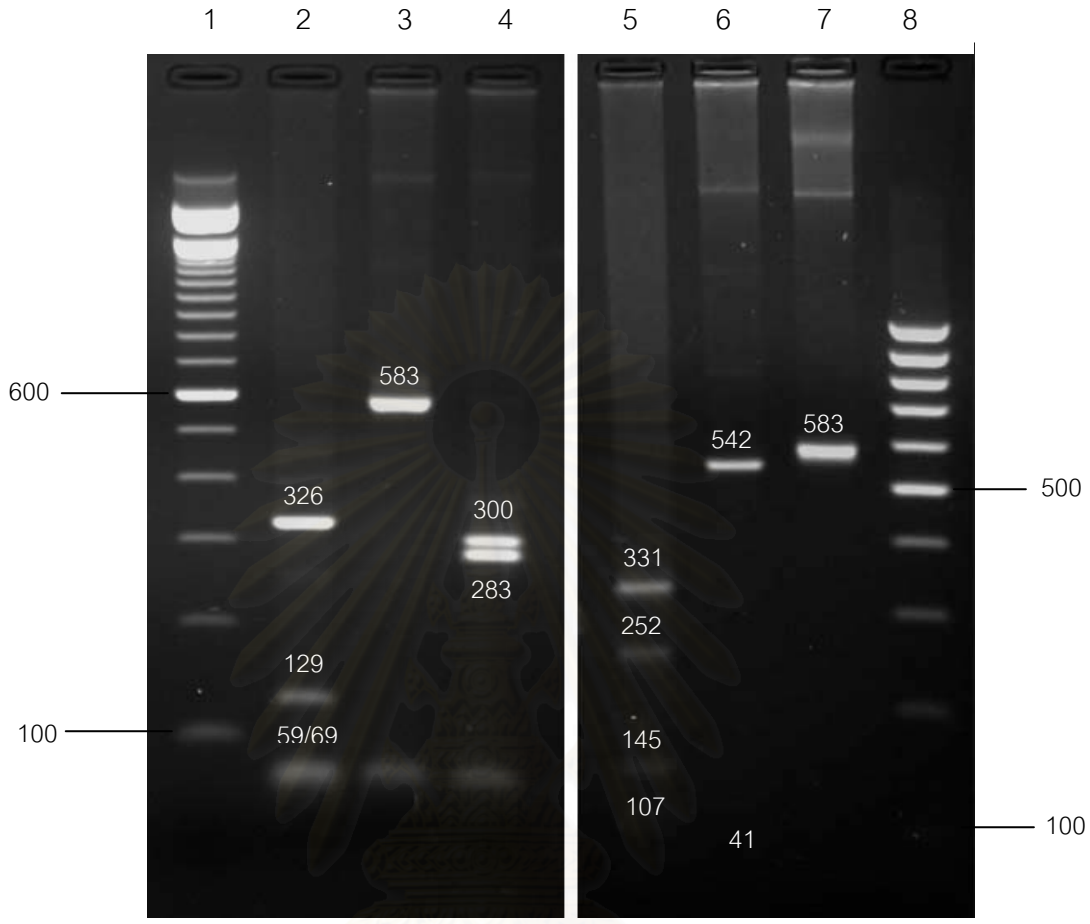
lene 6 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I (+)

lene 7 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III (-)

lene 8 : marker 100 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนแคปป้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 8*** แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AE (2%agarose gel)

lene 1 : marker 100 bp

lene 2 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI (+)

lene 3 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (-)

lene 4 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Mae*II (+)

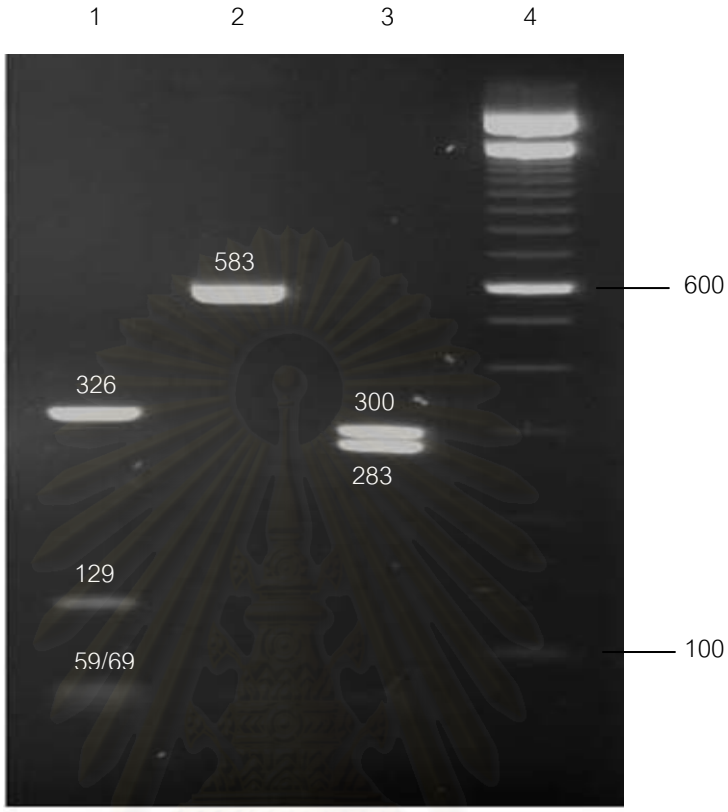
lene 5 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III (+/-)

lene 6 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I (+)

lene 7 : PCR Product 583 bp

lene 8 : marker 100 bp

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนแคปป้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 9*** แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ BB(2%agarose gel)

lene 1 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI (-)

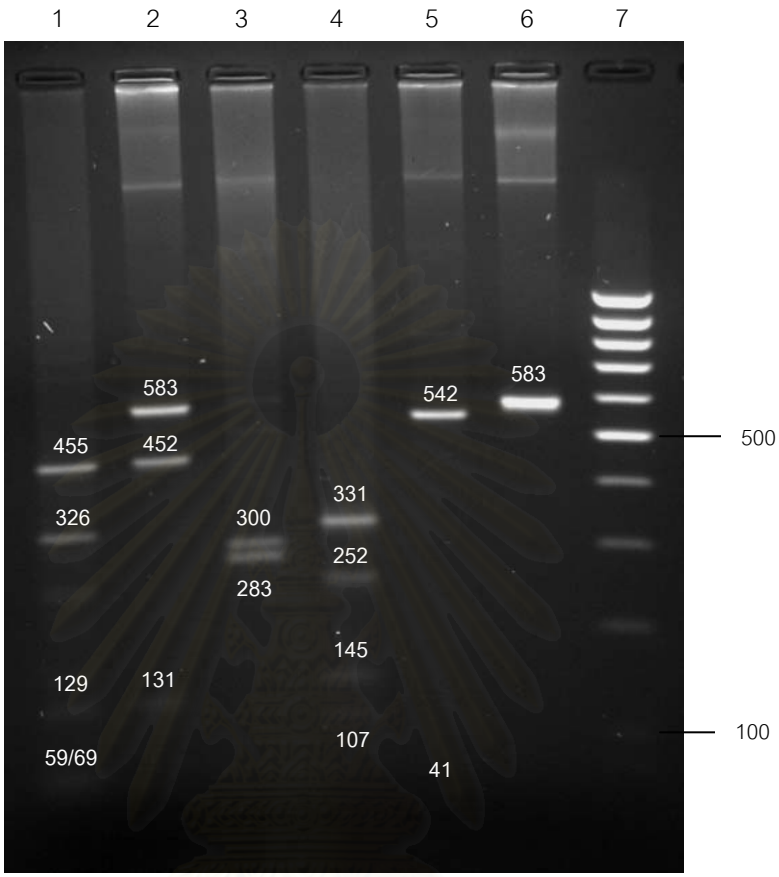
lene 2 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (+)

lene 3 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Mae*II (+)

lene 4 : marker 100 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตัวอย่างการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของ*ยีนแคปป้าเคซีน* (ต่อ)**




***รูปภาคผนวกที่ 10*** แสดงผลที่ได้จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ด้วยเอ็นไซม์ต่างๆ จีโนไทป์ AE(2%agarose gel)

lene 1 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI (+/-)

lene 2 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII (+/-)

lene 3 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Mae*II (+)

lene 4 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III (+/-)

lene 5 : ตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I (+)

lene 6 : PCR Product 583 bp

lene 7 : marker 100 bp

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ประวัติผู้เขียน

นางสาวช่อทิพ อรุณเดชาชัย เกิดเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ. 2519 ที่จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ในสาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2543 และได้รับทุนโครงการพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ประจำปี 2545 ของทบวงมหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย