วิธีทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

ศึกษาในแม่โคนมรีดนมลูกผสมโฮลสไตน์ จำนวนทั้งหมด 231 ตัว จากไชยสาส์นฟาร์ม ซึ่งเป็นฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในเขตจังหวัดสระบุรี จำนวน 121 ตัว และจากฟาร์มโคนม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 110 ตัว โดยจำนวนทั้งหมด 231 ตัว แบ่งเป็นระดับสายเลือดที่แตกต่างกัน 2 กลุ่มระดับสายเลือด คือระดับสายเลือด $\leq$ 87.5 %HF เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ 1 (G1) จำนวน 89 ตัว และระดับสายเลือด > 87.5 %HF เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ 2 (G2) จำนวน 142 ตัว ที่มีการบันทึกข้อมูลลักษณะการให้ผลผลิตรายตัว ได้แก่ ปริมาณน้ำนม (MY, kg) เปอร์เซ็นต์โปรตีน (%Protein) เปอร์เซ็นต์ไขมันนม (%Fat) เปอร์เซ็นต์แลคโตส (%Lactose) เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม (%SNF) เปอร์เซ็นต์เนื้อนมรวม (%TS) ปริมาณโปรตีน (Protein, g) ปริมาณไขมันนม (Fat, g) ปริมาณแลคโตส (Lactose, g) ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม (SNF, g) และปริมาณเนื้อนมรวม (TS, g)

2. การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 (1.5 นิ้ว) เจาะที่เส้นเลือดดำบริเวณโคนหางปริมาณ 10 ml บรรจุในหลอดสุญญากาศที่มีส่วนประกอบของ EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และเก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20^{o}C เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction) โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Geneaid Biotech Ltd.) ในขั้นตอนต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Genomic DNA Mini Kit Protocal-Blood) มีทั้งหมด 5 ขั้นตอนดังนี้

3.1 ขั้นตอน RBC Lysis นำเลือดจากหลอดสุญญากาศที่มีส่วนประกอบของEDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ที่เก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 ^{o}C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเลือดจะเปลี่ยนสภาพจากที่แข็งตัวกลายเป็นของเหลว ดูดตัวอย่างเลือดด้วย micropipet ปริมาณ 300 μ l ใส่ลงใน microcentrifuge tube (1.5 ml) ใส่ RBC Lysis Buffer 3 เท่าของตัวอย่างเลือด (900 μl) ผสมให้เข้ากัน incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไป Centrifuge นาน 2 นาที ที่ 10,000 rpm ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ใส่ 100 μl RBC Lysis Buffer อีกครั้ง

3.2 ขั้นตอน Cell Lysis ใส่ Proteinase K 20 μl (10-20 mg/ml) และ vortex เบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที ใส่ 200 μl GB Buffer และผสมกันด้วยเครื่อง Vortex นำไป Incubate 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60^{o}C จนกระทั่งตัวอย่างย่อย ทุกๆ 3 นาทีให้ทำการกลับหลอดไปมา ในระหว่างนี้ นำ Elution

Buffer ไปอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA Elution (100 μl ต่อ 1 ตัวอย่าง)

3.3 ขั้นตอน DNA Binding ใส่ Ethanol 200 μl และ Vortexing 10 วินาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน GD column ที่วางอยู่บน collection tube (2 ml) นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 5 นาที

3.4 ขั้นตอน Wash ใส่ 400 μl W1 Buffer ลงใน GD column นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ทำการล้างออกไปที่อยู่ใน collection tube (2 ml) ใส่ 600 μl Wash Buffer (ethanol added) ลงใน GD column นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ทำการล้างออกไปที่อยู่ใน collection tube (2 ml) และนำไป Centrifuge 13,000 rpmนาน 3 นาทีอีกครั้งเพื่อให้แห้งและเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.5 ขั้นตอน DNA Elution นำ GD column ใส่ลงใน microcentrifuge tube (1.5 ml) ใหม่ ใส่ 100 μl Elution Buffer ที่เตรียมไว้ลงใน GD column ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 3 วินาที และจะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (purified DNA) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ (Genomic DNA) ไว้ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20 °C

หลังจากทำการสกัดเรียบร้อยแล้ว นำไปตรวจสอบคุณภาพ ปริมาณและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV และทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer (optical-density, 260 nm and 280 nm) เพื่อทำการปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเป็น 10 ng/μl สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20°C รอทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ในขั้นตอนต่อไป

4. การวิเคราะห์หารูปแบบจีโนไทป์ของยีน $\beta, k, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$

การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ ของยีน $\beta, k, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ ใช้เทคนิคที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษาจีโนไทป์ของยีน β-casein ด้วยวิธี AS-PCR

ในวิธีการนี้ลำดับเบสบนสาย specific primers (oligonucleotides) ที่ใช้จะมีความจำเพาะสูง จะทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (PCR-product) ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งเบสที่ผันแปรของแต่ละ allele ซึ่งลำดับเบสของสายนิวคลีโอไทด์นี้ ได้แสดงตำแหน่งเบสที่เกิดความผันแปรของแต่ละ allele ไว้โดยอักษรตัวเอนบนสาย specific primers โดยมีวิธีการดังนี้ ใช้ DNA template ปริมาณ 1 μl, Go Taq® Green Master Mix, 2x (Promega) ซึ่งประกอบด้วย reaction buffer (pH 8.5), 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP,

400 μM dTTP, 3 mM $MgCl_2$ และ dye ใช้ปริมาณ 12.5 μl, forward primer/specific primer (20 μM) 0.5 μl และ reverse primer/specific primer (20 μM) 0.5 μl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย Nuclease-Free Water (Promega) ให้ได้ 25 μl ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ รายละเอียดในปฏิกิริยา 1 รอบดังนี้ จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 62°C เป็นเวลา 30 วินาที (กรณีคู่ของ forward primer: *BCN1* กับ reverse primer: *BCN3* Primer annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 วินาที) และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และจบด้วยขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุด นำ PCR-product ปริมาณ 8 μl ไปตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis, 100 volt, 30 นาทีเทียบกับ 100 bp DNA ladder (Fermentas) ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV ทำการบันทึกภาพลงบนแผ่นบันทึก

ขั้นตอนที่ 1 ทำการแบ่งกลุ่มระหว่างยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A^1, B, C, F และ ยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A^2, A^3, E โดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอขนาด 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 สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อกลุ่มยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A^1, B, C, F จะทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอนเอขนาด 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 TGC-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 สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อกลุ่มยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A^2 , A^3, E จะทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอนเอขนาด 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′

4.2 การศึกษาจีโนไทป์ของยีน κ-casein ด้วยวิธี PCR-RFLP

ทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอนเอด้วย primer *KP1* และ *KP2* จะได้ชิ้นส่วนขนาด 583 bp ครอบคลุมยีนแคปป้าเคซีนบริเวณ exon IV ทั้งหมด ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดความผันแปรในตำแหน่งต่างๆ ของ allele

Forward primer:

KP1 5′-AAG AAA TAA TAC CAT TCT GCA TAA TTT ATT TTT TTA CAG -3′

Reverse primers:

KP2 5′-GGC TGT TAT TCA TTT TGC CTT ATT TAC CTG-3′

ใช้ DNA template ปริมาณ 1 μl ,Go Taq® Green Master Mix, 2x (Promega) ซึ่งประกอบด้วย reaction buffer (pH 8.5), 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3 mM $MgCl_2$ และ dye ใช้ปริมาณ 12.5 μl , forward primer: *KP1* (20 μM) 0.5 μl และ reverse primer: *KP2* (20 μM) 0.5 μl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย Nuclease-Free Water (Promega) ให้ได้ 25 μl ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ รายละเอียดในปฏิกิริยา 1 รอบ ดังนี้ จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และจบด้วยขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วทำการเก็บ PCR-product ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

หลังจากได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอครอบคลุมบริเวณที่ต้องการแล้ว ทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 5 ชนิดและสารประกอบต่างๆดังตารางที่ 1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

ตารางที่ 1 สารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ของยีน κ-casein) ด้วยวิธี PCR-RFLP

Reaction Mix	*Hinf*I	*Hind*III	*HpyCH4*IV	*Hae*III	*Hha*I
10X Buffer	2	2	2	2	2
Acetylated BSA	0.2	0.2	-	0.2	0.2
Sterile water	9.3	9.3	9.5	9.3	9.3
Restriction Enzyme	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PCR product	8	8	8	8	8
Total Mix(μl)	20	20	20	20	20

*Hinf*I (10U/μl) (Promega, U.S.A.)

Recognition Sequence 5′ ...G$^{\nabla}$ANTC... 3′

3′ ...CTNA$_{\Delta}$G... 5′

*Hind*III (10U/μl) (Promega, U.S.A.)

Recognition Sequence 5′ ...A$^{\nabla}$AGCTT... 3′

3′ ...TTCGA$_{\Delta}$A... 5′

*HpyCH4*IV (isoschizomer of *Mae*II) (10U/μl) (NEB, U.S.A.)

Recognition Sequence 5′ ...A$^{\nabla}$CGT... 3′

3′ ...TGC$_{\Delta}$A... 5′

*Hae*III (10U/μl) (Promega, U.S.A.)

Recognition Sequence 5′ ...GG$^{\nabla}$CC... 3′

3′ ...CC$_{\Delta}$GG... 5′

*Hha*I (10U/μl) (NEB, U.S.A.)

Recognition Sequence 5′ ...GCG$^{\nabla}$C... 3′

3′ ...C$_{\Delta}$GCG... 5′

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 29 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 246742
เลขเรียกหนังสือ

นำ PCR-product ที่ตัดแล้วปริมาณ 3 μl ไปตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis, 100 volt, 45 นาที เทียบกับ 100 bp DNA ladder (Fermentas) ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV ทำการบันทึกภาพลงบนแผ่นบันทึก

4.3 การศึกษาจีโนไทป์ของยีน αs_1-casein ด้วยวิธี PCR-RFLP

โดยใช้ genomic DNA เข้มข้น 50 ng 1 µl เติมส่วนประกอบ reaction contained 2.5 µl of a 10-fold concentrated PCR buffer, 25 mM of $MgCl_2$ 1 µl, 10 mM of deoxynucleotide-triphosphate 0.5 µl, 10 pmol of each primer 1 µl, *Taq* polymerase 5UI 0.2 µl และ dH2O 17.8 µl โดยใช้ annealing temperature 35X: 94°c 30 วินาที, 59°c 30 วินาที, 72°c 30 วินาที โดยใช้ primer

forward primer, 5´- TGCATGTTCTCATAATAACC - 3´

reverse primer, 5´- GAAGAAGCAGCAAGCTGG - 3´

จากนั้นตัดด้วยเอนไซต์ตัดจำเพาะ เติม *MaeIII* 0.4 µl เติมส่วนประกอบ buffer 1.6 µl และ PCR product 8 µl นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 55°c เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 2 % ยีนแอลฟาเอส 1-เคซีน มีรูปแบบจีโนไทป์จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ BB, BC และ CC ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างได้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความแตกต่างของชิ้นส่วนยีนแอลฟาเอส 1-เคซีน ที่ตัดด้วย *MaeIII*

	จีโนไทป์			
	BB	BC	CC	Uncut
310 bp		———	———	———
214 bp	———	———		
96 bp	———	———		

4.4 การศึกษาจีโนไทป์ของยีน αs_2-casein ด้วยวิธี PCR-RFLP

โดยใช้ genomic DNA เข้มข้น 50 ng 1 µl เติมส่วนประกอบ reaction contained 2.5 µl of a 10-fold concentrated PCR buffer, 25 mM of $MgCl_2$ 1 µl, 10 mM of deoxynucleotide-triphosphate 0.5 µl, 10 pmol of each primer 1 µl, *Taq* polymerase 5UI 0.2 µl และ dH_2O 17.8 µl โดยใช้ annealing temperature 30X: denaturation 94°c 30 วินาที,

annealing อัลลีล B 59°c อัลลีล C 53.7 °c และอัลลีล D 60.5 °c 30 วินาที, elongation 72°c 30 วินาที โดยใช้ primer สำหรับศึกษา allele B, C, และ D ดังนี้

Primers สำหรับ allele B

forward primer, 5´CCTAAAAGTCTCTTGCCATC 3´

reverse primer, 5´ACAGTTCTAGACTCACTGGAGA 3´

Primers สำหรับ allele C

forward primer, 5´AGAGCCATTTTTGAGCCACA 3´

reverse primer, 5´CTGGGAATCAAATGTGTTAG 3´

Primers สำหรับ allele D

forward primer, 5´AAAACAAGCAGCCAAGAAGC 3´

reverse primer, 5´TTCCCAGTCTCCCCAGTATG 3´

จากนั้นตัดด้วยเอนไซต์ตัดจำเพาะ เติม *MboII* 0.6 µl (allele B), *Nla*IV (allele *C*) และ *Mnl*I (allele *D*) เติมส่วนประกอบ buffer 1.4 µl และ PCR product 8 µl นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°c เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 2% ความแตกต่างของ allele A, B, C, และ D แสดงในตารางที่ 3, 4, และ ตารางที่ 5

ตารางที่ 3 ความแตกต่างของชิ้นส่วนยีนแอลฟาเอส 2-เคซีน ที่ตัดด้วย *MboII* สำหรับศึกษารูปแบบ allele B

	อัลลีล				
	A	B	C	D	Uncut
253 bp	———		———	———	———
127,126 bp		═══			

ตารางที่ 4 ความแตกต่างของชิ้นส่วนยีนแอลฟาเอส 2-เคซีน ที่ตัดด้วย *Nla*IV สำหรับศึกษารูปแบบ allele C

	อัลลีล				
	A	B	C	D	Uncut
459 bp	———	———		———	———
248 bp			———		
211 bp			———		

ตารางที่ 5 ความแตกต่างของชิ้นส่วนยีนแอลฟาเอส 2-เคซีน ที่ตัดด้วย *Mnl*I สำหรับศึกษารูปแบบ allele D

	อัลลีล				
	A	B	C	D	Uncut
356 bp				———	———
196 bp	———	———	———		
160 bp	———	———	———		

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.1 หาความถี่ allele, genotype, composite genotype และ ความแตกต่างของความถี่ allele และ genotype ของยีน $\beta, \kappa, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง G1 และ G2 โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003)

5.2 หาความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ของยีนทั้ง 4 ตำแหน่งในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และความแตกต่างของความถี่ allele และ genotype ระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003)

5.3 หาความสัมพันธ์ของกลุ่มระดับสายเลือด กับรูปแบบ genotype และ composite genotype ของยีน $\beta, \kappa, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ โดยใช้วิธี PROC LOGISTIC ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 2002) ดังสมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \varepsilon \qquad (1)$$

โดยกำหนดให้

p_i = ความน่าจะเป็น (probability) ของกลุ่มระดับสายเลือดที่จะพบรูปแบบ genotype หรือ composite genotype ต่างๆ ของยีน $\beta, \kappa, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ โดยกำหนดให้กลุ่มระดับสายเลือด ≤ 87.5%HF เป็น 1 และกลุ่มระดับสายเลือด > 87.5%HF เป็น 0

β_0 = จุดตัดแกน Y (intercept)

β_1 = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของ genotype หรือ composite genotype ของยีน β, κ-casein

X_1 = ตัวแปรดัมมี่ของการปรากฏ genotype หรือ composite genotype ของยีน β, κ-casein

ε = ความคลาดเคลื่อน (residual effect)

ความน่าจะเป็นของระดับสายเลือดที่จะพบรูปแบบ genotype หรือ composite genotype ต่างๆ ของยีน β, κ-casein ($\hat{p}_i$) คำนวณได้โดย

$$\hat{p}_i = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_1)}} \qquad (2)$$

โดยกำหนดให้

β_0 = ค่าประมาณของ intercept

β_1 = ค่าประมาณของ regression coefficient ของ genotype หรือ composite genotype

X_1 = ตัวแปรดัมมี่ของการปรากฏ genotype หรือ composite genotype

5.4 หาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน $\beta, \kappa, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม (รูปแบบที่มีความถี่ต่ำกว่า 0.05 ไม่ได้นำมาร่วมศึกษาอิทธิพลในครั้งนี้) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 2002) วิธี PROC GLM ดังสมการที่ (3)

ในการศึกษาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน $\beta, \kappa, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ กับลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน โดยทำการประมาณค่าและทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน $\beta, \kappa, \alpha s_1, \alpha s_2 - casein$ กับลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ด้วยวิธี ordinary least square (OLS) โดยมีตัวแบบดังนี้

$$y = X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + \varepsilon \qquad (3)$$

โดยกำหนดให้

y = เป็นเวคเตอร์ของค่าสังเกต คือ ลักษณะปริมาณน้ำนมหรือลักษณะองค์ประกอบน้ำนมต่างๆ

β_1 = เป็นเวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจาก ฝูง-ปี-ฤดูกาล, อิทธิพลคงที่เนื่องจากลำดับครั้งของการให้นม และอิทธิพลของจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอด

β_2 = เป็นเวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจากรูปแบบ allele, genotype ของยีนแต่ละตำแหน่ง และ composite genotype

X_1 = เป็น incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ β_1 ในแต่ละค่าสังเกต

X_2 = เป็น incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ β_2 ในแต่ละค่าสังเกต

ε = เป็นเวคเตอร์ของความคลาดเคลื่อน