



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์สัตว์)  
ปริญญา

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์

สัตว์บาล

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปปาเคซีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม  
ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

Effect of Beta and Kappa Casein Gene on Milk Yield and Milk Composition  
in Various Percentage of Crossbred Holstein

นามผู้วิจัย นายพนันต์ รังสะกินนิน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( อาจารย์อมรรัตน์ โมพี, ปร.ค. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เลอชาติ บุญเอก, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสกสม อตมางกูร, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม  
ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

Effect of Beta and Kappa Casein Gene on Milk Yield and Milk Composition  
in Various Percentage of Crossbred Holstein

โดย

นายพนันต์ รังสะกินนิน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์สัตว์)

พ.ศ. 2553

นพรัตน์ รังสะกินนิน 2553: อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปปาเคซีนต่อปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนม ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์สัตว์) สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์  
ภาควิชาสัตวบาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์อ้อมรรรัตน์ โมฬี, ปร.ค. 75 หน้า

การศึกษาครั้งนี้มี 3 วัตถุประสงค์หลัก คือ 1) ศึกษารูปแบบ ความถี่ของอัลลีล จีโนไทป์และรูปแบบ ร่วมกันของยีนเบต้าและแคปปาเคซีน ความสัมพันธ์ linkage disequilibrium (LD) ระหว่างยีน 2 ตำแหน่ง และ ความแตกต่างของความถี่ยีนระหว่างกลุ่มตัวอย่างในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มระดับสายเลือด ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ 1 ( $\leq 87.5\%HF$ ) จำนวน 89 ตัว และกลุ่มตัวอย่างที่ 2 ( $> 87.5\%HF$ ) จำนวน 142 ตัว 2) ศึกษา ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และรูปแบบร่วมกันของยีนเบต้าและแคปปาเคซีนกับกลุ่มระดับสายเลือด และ 3) ศึกษาอิทธิพลของรูปแบบอัลลีล จีโนไทป์ และรูปแบบร่วมกันของ 2 กลุ่มตัวอย่างต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและ องค์ประกอบน้ำนม โดยการศึกษาในรูปแบบยีนเบต้าและแคปปาเคซีน ใช้วิธี AS-PCR และ PCR-RFLP ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่า ยีนเบต้าเคซีนพบ 3 อัลลีล คือ  $A^1$ ,  $A^2$  และ B พบ 5 จีโนไทป์ คือ  $A^1A^1$ ,  $A^1A^2$ ,  $A^1B$ ,  $A^2A^2$  และ  $A^2B$  โดยอัลลีล  $A^2$  และจีโนไทป์  $A^1A^2$  เป็นรูปแบบที่มีความถี่สูงสุดของทั้ง 2 กลุ่ม ยีนแคป ปาเคซีนในกลุ่ม 1 พบ 3 อัลลีล คือ A, B และ E พบ 5 จีโนไทป์ คือ AA, AB, AE, BB และ BE ขณะที่กลุ่ม 2 พบ 3 อัลลีลและ 4 จีโนไทป์ (ไม่พบ BB) โดยอัลลีล A และจีโนไทป์ AA เป็นรูปแบบที่มีความถี่สูงสุดของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง สำหรับรูปแบบร่วมกันของยีนทั้ง 2 พบรูปแบบ  $A^1A^2AA$  มากที่สุดของทั้ง 2 กลุ่ม ความถี่ยีนและ จีโนไทป์ของยีน 2 ตำแหน่งในทั้ง 2 กลุ่มพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) การทดสอบ LD ระหว่างยีน 2 ตำแหน่งของทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ายีนทั้ง 2 ไม่มีอิสระต่อกัน ( $P < 0.0001$ ) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง พบว่า รูปแบบร่วมกันของยีนทั้ง 2 มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญในทางลบกับเปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบน้ำนม โดยเฉพาะเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนมและเปอร์เซ็นต์โปรตีน ซึ่งเป็นลักษณะที่ เราสนใจ จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า 1) กลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันไม่ได้ทำให้รูปแบบยีนและ ความถี่ของยีนในแต่ละตำแหน่งเปลี่ยนแปลงไป 2) จากการพบความสัมพันธ์ LD ดังนั้นการศึกษอิทธิพลจาก รูปแบบร่วมกันของยีนทั้ง 2 ต่อลักษณะที่สนใจจึงเหมาะสมที่สุด 3) การพบอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญในทางลบ ของรูปแบบร่วมกันของยีนทั้ง 2 ต่อลักษณะที่สนใจ ดังนั้นศักยภาพของรูปแบบร่วมกันของยีนทั้ง 2 กับการ นำไปใช้เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกยังไม่สามารถทำได้ 4) ควรทำการศึกษาเกี่ยวกับโคนมในแต่ละระดับ สายเลือด เนื่องจากผลของอิทธิพลที่ได้ อาจมีความแตกต่างกันเมื่อ โคนมมีระดับสายเลือดต่างกัน

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Noppanan Rungsakinnin 2010: Effect of Beta and Kappa Casein Gene on Milk Yield and Milk Composition in Various Percentage of Crossbred Holstein. Master of Science (Animal Breeding), Major Field: Animal Breeding, Department of Animal Science.  
Thesis Advisor: Mrs.Amonrat Molee, Ph.D. 75 pages.

There were 3 objectives of this study: 1) study the polymorphism, the frequency of alleles, genotypes and composite genotypes of  $\beta$  and  $\kappa$ -casein gene, linkage disequilibrium (LD) and the frequency difference of allele and genotype for 2 loci between 2 groups in crossbred Holstein, G1 ( $\leq 87.5\%HF$ ) 89 cows and G2 ( $>87.5\%HF$ ) 142 cows 2) study the relationship between genotype, composite genotype with %breed groups of Holstein and 3) study the effect of allele, genotype and composite genotype of both groups on milk yield and milk composition. Allele-specific PCR (ASPCR) and PCR-RFLP technique were used to classify the difference genotype of  $\beta$  and  $\kappa$ -casein gene, respectively.

$\beta$ -casein gene, 3 alleles ( $A^1$ ,  $A^2$  and B) and 5 genotypes ( $A^1A^1$ ,  $A^1A^2$ ,  $A^1B$ ,  $A^2A^2$  and  $A^2B$ ) were found. Allele  $A^2$  and genotype  $A^1A^2$  were the most frequencies in both groups.  $\kappa$ -casein gene, 3 alleles (A, B and E) and 5 genotypes (AA, AB, AE, BB and BE) were found in the G1, 3 alleles and 4 genotypes in G2 which BB genotype was absence. The frequency of allele A and genotype AA were the most found in both groups. The frequency of composite genotype  $A^1A^2AA$  was the most found in both groups. There were non-significant difference of frequency of both groups ( $P > 0.05$ ). Very highly significant LD were found between 2 loci ( $P < 0.0001$ ) in both groups. Significant negative effect of composite genotype on % milk composition in both groups, particularly in %SNF and %Protein which were the interesting traits. This results concluded that 1) the different % of Holstein levels did not effect on the casein gene polymorphism and frequency, 2) strong LD between 2 locus were found, the composite genotype was the suitable from to study the effect on interesting traits, 3) negative effect of composite genotype on interesting traits were found, the potential of these gene as genetic marker did not clear in this study, 4) the different percentages of Holstein showed the different significant effect, therefore, the further study should be considered.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อมรรัตน์ โมฬี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เลอชาติ บุญเอก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. มนต์ชัย ดวงจินดา และรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนแนวทางการดำเนินชีวิต

ขอขอบคุณ สำนักงานสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุน การวิจัย ที่สนับสนุนเงินวิจัยเพื่อใช้ในการศึกษาค้นคว้า ขอบขอบคุณ คุณอนุชา หงษ์ทอง ผู้จัดการไร้ ไร่ไชยสาส์นฟาร์ม และฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์โคนมสำหรับการ เก็บตัวอย่างเลือดและข้อมูลในการทำวิจัย ขอบขอบคุณศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยี- ชีวภาพสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลของไร่ไชยสาส์นฟาร์ม ที่เก็บบันทึกจากหน่วยงานของ ท่านเพื่อให้การวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยสมบูรณ์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัย ขอบขอบคุณ คุณสุภาวดี ใจประสพ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการปฏิบัติงานด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้การอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ขอบขอบคุณ ที่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อจรรยา และคุณแม่ลัดดา รั้งสะกินนิน ที่ให้การอบรม สั่งสอน ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษามาโดยตลอด และเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งในการทำ วิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นพนันต์ รั้งสะกินนิน

มกราคม 2553

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
ผลและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	62
สรุป	62
ข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	65
ภาคผนวก	72
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	75

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของ SNF	5
2	ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะปริมาณไขมัน (FY) ปริมาณโปรตีน (PY) ปริมาณของแข็งไมรวมไขมัน (SNFY) และปริมาณเคซีน (CY)	7
3	ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีน (PP) เปอร์เซ็นต์ไขมัน (FP) เปอร์เซ็นต์ของแข็งไมรวมไขมัน (SNFP) และเปอร์เซ็นต์เคซีน (CP)	8
4	ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะปริมาณน้ำนม (MY) ปริมาณไขมัน (FY) ปริมาณโปรตีน (PY) ปริมาณของแข็งไมรวมไขมัน (SNFY) ปริมาณเคซีน (CY) และปริมาณแลคโตส (LY)	9
5	ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะปริมาณน้ำนม (MY) เปอร์เซ็นต์โปรตีน (PP) เปอร์เซ็นต์ไขมัน (FP) เปอร์เซ็นต์ของแข็งไมรวมไขมัน (SNFP) เปอร์เซ็นต์เคซีน (CP) และเปอร์เซ็นต์แลคโตส (LP)	9
6	ความหลากหลายของอัลลีลของยีนแอลฟาเอส 1 เคซีน ( $\alpha_{s1}$ -casein) แอลฟาเอส 2 เคซีน ( $\alpha_{s2}$ -casein) เบต้าเคซีน ( $\beta$ -casein) และ แคลป้าเคซีน ( $\kappa$ -casein)	15
7	ความถี่อัลลีลของเบต้าเคซีนที่พบในโคสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน	18
8	ความถี่อัลลีลของแคลป้าเคซีนที่พบในโคสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน	19
9	อิทธิพลของ $\beta$ -casein genotype ที่มีต่อลักษณะต่างๆ ของผลผลิตน้ำนม	20
10	อิทธิพลของ $\kappa$ -casein genotype ที่มีต่อลักษณะต่าง ๆ ของผลผลิตน้ำนม	21
11	อิทธิพลของ composite genotype ที่มีต่อลักษณะต่าง ๆ ของผลผลิตน้ำนม	22
12	สารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ของยีนแคลป้าเคซีน ( $\kappa$ -casein) ด้วยวิธี PCR-RFLP	29
13	ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ของกลุ่มตัวอย่างที่ 1 (G1) และกลุ่มตัวอย่างที่ 2 (G2)	37

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างลักษณะต่างๆของผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม	38
15	ความถี่ gene, genotype และ P-value ของความแตกต่างของความถี่ gene และ genotype ของยีน $\beta$ -casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ 2 กลุ่ม คือ G1 ( $\leq 87.5\%$ HF) และ G2 ( $> 87.5\%$ HF)	50
16	ความถี่ gene, genotype และ P-value ของความแตกต่างของความถี่ gene และ genotype ของยีน $\kappa$ -casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ 2 กลุ่ม คือ G1 ( $\leq 87.5\%$ HF) และ G2 ( $> 87.5\%$ HF)	50
17	ความถี่ composite genotype ระหว่างยีน $\beta$ และ $\kappa$ casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ 2 กลุ่ม คือ G1 ( $\leq 87.5\%$ HF) และ G2 ( $> 87.5\%$ HF)	51
18	ค่าอิทธิพลและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE.) ของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆของ ยีนเบต้าเคซีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม	56
19	ค่าอิทธิพลและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE.) ของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆของ ยีนแคปปาเคซีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม	58
20	ค่าอิทธิพลและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE.) ของ composite genotype รูปแบบต่างๆต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม	60
<b>ตารางผนวกที่</b>		
1	จำนวนรูปแบบ allele ต่างๆ ของยีน $\beta$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	73
2	จำนวนรูปแบบ allele ต่างๆ ของยีน $\kappa$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	73
3	จำนวนรูปแบบ genotype ต่างๆ ของยีน $\beta$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	73
4	จำนวนรูปแบบ genotype ต่างๆ ของยีน $\kappa$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง	74

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สัดส่วนของส่วนประกอบหลักในน้ำนมโค	4
2	โครงสร้างของเคซีน ไมเซลล์ (casein micelle structure)	11
3	ขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนนมและการขนส่งโปรตีนในเซลล์ก่อก้อนสร้างน้ำนม	13
4	Amino acid sequence of bovine $\beta$ -casein	16
5	Amino acid sequence of bovine $\kappa$ -casein	17
6	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	40
7	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	40
8	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A <sup>1</sup> B	41
9	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	41
10	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A <sup>2</sup> B	42
11	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype AA	43
12	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype AB	44
13	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype AE	45
14	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype BB	46
15	รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype BE	47

อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปปาเคซีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม  
ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

Effect of Beta and Kappa Casein Gene on Milk Yield and Milk Composition  
in Various Percentage of Crossbred Holstein

คำนำ

ปัญหาของการผลิตน้ำนมดิบของประเทศไทย คือ น้ำนมดิบมีเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม หรือ %SNF (solid not fat) ต่ำ มีผลทำให้เกษตรกรถูกตัดราคาเมื่อมีค่าต่ำกว่ามาตรฐาน และพบว่า %SNF นั้นเป็นลักษณะที่มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับเปอร์เซ็นต์โปรตีน (%Protein) ดังนั้นถ้าสามารถเพิ่ม %Protein ได้ จะสามารถเพิ่ม %SNF ได้เช่นกัน ซึ่งโปรตีนในน้ำนมโคประกอบไปด้วยโปรตีนหลักอยู่ 6 ชนิดที่ถูกควบคุมการสร้างจากยีนเหล่านี้คือ  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin และ  $\beta$ -lactoglobulin (Heck *et al.*, 2009) และเนื่องจากยีนเคซีนเป็นโปรตีนที่พบว่ามีสัดส่วนมากที่สุดประมาณ 80% ของโปรตีนทั้งหมด ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษากลุ่มของยีนเคซีน

ยีนเคซีนเป็นกลุ่มยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 (BTA6 q31-33) ประกอบด้วยยีน 4 ชนิด คือ ยีน  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein และ  $\kappa$ -casein (Mercier and Viloite, 1993; Lien *et al.*, 1999; Jann *et al.*, 2004) โดยยีนทั้ง 4 ชนิดนี้มีความใกล้ชิดกันมากบนโครโมโซม (closely linked) และมีความสัมพันธ์ linkage disequilibrium กัน และจากการศึกษาพบว่า ยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein เป็นยีนที่มีรูปแบบที่หลากหลาย (polymorphism) (Han *et al.*, 2000; Jann *et al.*, 2004; Prinzenberg *et al.*, 2008) และมีบทบาทอย่างมีนัยสำคัญต่อ %Protein ในน้ำนม ในขณะที่ยีน  $\alpha_{s1}$  และ  $\alpha_{s2}$ -casein เป็นยีนมีความหลากหลายของรูปแบบยีนที่ต่ำ โดยเฉพาะยีน  $\alpha_{s2}$ -casein บางการศึกษาไม่พบความหลากหลายของรูปแบบยีน (Heck *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein สำหรับการศึกษานี้ จากการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของยีนดังกล่าวต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบในน้ำนม พบว่า ในประชากรโคนมที่แตกต่างกัน แต่ละรูปแบบของยีนดังกล่าวก็มีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำนมและ %Protein ในน้ำนมที่แตกต่างกันด้วย จากที่กล่าวมา จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสำหรับประชากรโคนมในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือด

แตกต่างกัน รูปแบบและอิทธิพลของยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ที่มีผลต่อระดับปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำมนั้น จะมีความแตกต่างกันในโคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ที่แตกต่างกัน ด้วยหรือไม่ เพราะที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาใดที่มีการแบ่งกลุ่มระดับสายเลือด โดยเฉพาะการศึกษาในประชากรที่เป็นโคนมลูกผสม

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า ยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein เป็นยีนที่มีศักยภาพในการที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็น genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกโคนมให้มีผลผลิตน้ำนมและ %SNF ที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ในการประยุกต์เป็น genetic marker จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการศึกษารูปแบบยีน ความถี่ยีน ความแตกต่างของความถี่ยีนระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ในโคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ที่แตกต่างกันและ linkage disequilibrium ของยีนทั้งสองตำแหน่งนี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลอธิบายสภาพของยีนนี้ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง รวมถึงศึกษาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein กับ %SNF ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบอื่นๆ ในน้ำนม ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน เพื่อใช้กำหนดแนวทางในการวางแผนการคัดเลือกโคนมในประเทศต่อไปในอนาคต

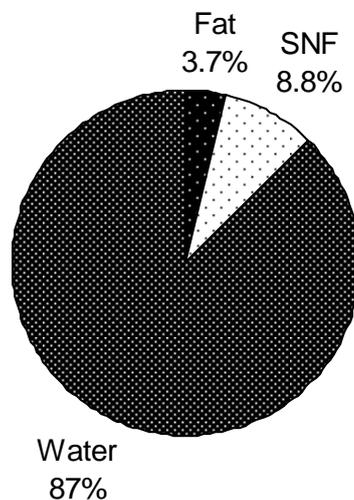
## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษารูปแบบ ความถี่ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ความแตกต่างของความถี่ยีนระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ระหว่างยีน 2 ตำแหน่งในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน
2. เพื่อหาความสัมพันธ์ของ genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein กับกลุ่มระดับสายเลือดของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์
3. เพื่อศึกษาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ต่อลักษณะเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม เปอร์เซ็นต์โปรตีน ปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมอื่นๆ ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

## การตรวจเอกสาร

### องค์ประกอบของน้ำนมโค (The gross composition of cow's milk)

น้ำนมโคประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญหลักๆ คือ น้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในน้ำนมประมาณ 87% ไขมันประมาณ 3.7% นอกจากนี้ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม (SNF) ประมาณ 8.8% (ภาพที่ 1) ในส่วนที่เป็น SNF นี้ ประกอบด้วยส่วนประกอบหลักที่สำคัญคือ น้ำตาลแลคโตสประมาณ 4.6% และโปรตีนนมประมาณ 3.25% นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแร่ธาตุ วิตามินและเอนไซม์ต่างๆ ในส่วนของแร่ธาตุนั้นประกอบด้วยแร่ธาตุที่สำคัญ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม โซเดียม สังกะสีและทองแดง เป็นต้น วิตามิน ก็ประกอบด้วยวิตามิน A, B-complex, C และ D และเอนไซม์ประกอบด้วย peroxidase, phosphatase และ lipase เป็นต้น (James and Ferguson, 2000) ซึ่งจากข้อมูลจะเห็นว่าในส่วนของ SNF นั้นมีโปรตีนและน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลัก



ภาพที่ 1 สัดส่วนของส่วนประกอบหลักในน้ำนมโค

ที่มา: James and Ferguson (2000)

### ส่วนประกอบของของแข็งที่ไม่ใช่ไขมันนม (SNF)

จากที่กล่าวข้างต้นเห็นได้ว่า ส่วนที่เป็น SNF ในน้ำนม นั้น นอกจากที่เป็นน้ำตาลแลคโตส ประมาณ 4.6% ที่เหลือเป็นส่วนของโปรตีนนมเกือบทั้งหมด โปรตีนนมที่เป็นส่วนประกอบหลัก ในน้ำนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โปรตีนเคซีน (casein) และโปรตีนหางนม (whey protein) (ชวนิศนดากร, 2534; Edgar, 1998) โดยปริมาณของโปรตีนและส่วนประกอบอื่นๆ ของ SNF ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ SNF

ส่วนประกอบของ SNF	สัดส่วนต่อน้ำนมทั้งหมด (%)		
	References		
	A	B	C
Protein	3.25	3.5	3.0-3.6
Casein	77.1	79	80
- $\alpha_{s1}$ -casein	30.6	45	(45
- $\alpha_{s2}$ -casein	8	8	-55)
- $\beta$ -casein	28.4	23	23-35
- $\kappa$ -casein	10.1	3	8-15
Whey protein	19.2	13.6	13.6
- $\alpha$ -lactalbumin	3.7	2	2-5
- $\beta$ -lactoglobulin	9.8	7	7-12
- bovine serum protein	1.2	0.7	0.7-1.3
- immunoglobulin	2.1	1.9	1.9-3.3
- protease peptone	2.4	2	2-6
Lactose	4.6	4.1	-
Vitamin	0.12	1.7	-
Mineral	0.65	-	0.87

### ตารางที่ 1 (ต่อ)

ส่วนประกอบของ SNF	สัดส่วนต่อปริมาณทั้งหมด (%)		
	References		
	A	B	C
Acid	0.18	-	-
Ash	-	0.7	-

หมายเหตุ A = Goff (2007), B = Fennema *et al.* (1998), C = Edgar (1998)

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า เคซีน (casein) เป็นโปรตีนที่มีสัดส่วนมากที่สุด นอกจากนี้ จากค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและค่าสหสัมพันธ์ทางลักษณะปรากฏระหว่าง Casein, Protein และ SNF ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3 พบว่ามีความสัมพันธ์กันสูงมาก

จากตารางที่ 2, 3, 4, และ 5 จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ด้านปริมาณน้ำนมและปริมาณองค์ประกอบน้ำนมจะมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม แต่อย่างไรก็ตามด้านปริมาณน้ำนมและปริมาณองค์ประกอบน้ำมนั้น มีความสัมพันธ์กันในทิศทางลบกับเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม ดังนั้นในการปรับปรุงลักษณะใดลักษณะหนึ่งให้ดีขึ้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึงผลกระทบที่จะมีต่อลักษณะอื่นๆ ด้วยเสมอ

ตารางที่ 2 ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะปริมาณไขมัน (FY) ปริมาณโปรตีน (PY) ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมัน (SNFY) และปริมาณเคซีน (CY)

References	PY*FY		PY*SNFY		PY*CY		FY*SNFY		FY*CY	
	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$
วีริษา (2545)	0.88	0.91	0.97	0.98	-	-	0.88	0.93	-	-
Hayes <i>et al.</i> (1984)	-	-	-	-	0.91	0.95	-	-	0.82	0.61
Keown (2006)	-	0.80	-	0.90	-	-	-	0.80	-	-

ตารางที่ 3 ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_g$ ) ของลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีน (PP) เปอร์เซ็นต์ไขมัน (FP) เปอร์เซ็นต์ของแข็งไม่รวมไขมัน (SNFP) และเปอร์เซ็นต์เคซีน (CP)

References	PP*FP		PP*SNFP		PP*CP		CP*SNFP		FP*SNFP		FP*CP	
	$r_p$	$r_g$	$r_p$	$r_g$	$r_p$	$r_g$	$r_p$	$r_g$	$r_p$	$r_g$	$r_p$	$r_g$
วริษา (2545)	0.3	0.54	0.44	0.84	-	-	-	-	0.35	0.33	-	-
Tyler (1958)	0.42	0.48	0.81	0.94	0.93	0.96	0.87	0.82	0.4	0.46	0.43	0.56
Hayes <i>et al.</i> (1984)	-	-	-	-	0.52	0.96	-	-	-	-	0.34	0.51
Hurley (2007)	-	0.55	-	0.81	-	-	-	-	-	0.4	-	-

**ตารางที่ 4** ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะปริมาณ  
 น้ำนม (MY) ปริมาณไขมัน (FY) ปริมาณโปรตีน (PY) ปริมาณของแข็งไมรวมไขมัน  
 (SNFY) ปริมาณเคซีน (CY) และ ปริมาณแลคโตส (LY)

References	MY*FY		MY*PY		MY*SNFY		MY*CY		MY*LY	
	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$
วริษา (2545)	0.85	0.93	0.94	0.94	0.95	0.89	-	-	0.98	0.98
Hayes <i>et al.</i> (1984)	-	-	-	-	-	-	0.87	0.80	-	-
Keown (2006)	-	0.75	-	0.90	-	0.95	-	-	-	-

**ตารางที่ 5** ค่า phenotypic correlation ( $r_p$ ) และ genetic correlation ( $r_G$ ) ของลักษณะปริมาณ  
 น้ำนม (MY) เปอร์เซ็นต์โปรตีน (PP) เปอร์เซ็นต์ไขมัน (FP) เปอร์เซ็นต์ของแข็งไมรวม  
 ไขมัน (SNFP) เปอร์เซ็นต์เคซีน (CP) และเปอร์เซ็นต์แลคโตส (LP)

References	MY*FP		MY*PP		MY*SNFP		MY*CP		MY*LP	
	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$	$r_p$	$r_G$
วริษา (2545)	-0.31	-0.45	-0.16	-0.007	-0.18	-0.20	-	-	-0.02	-0.26
Tyler (1958)	-0.14	-0.01	-0.26	0.22	-0.18	-0.02	-0.20	0.05	0.08	-0.16
Hayes <i>et al.</i> , (1984)	-	-	-	-	-	-	-0.46	-0.76	-	-
Keown (2006)	-	-0.35	-	-0.30	-	-0.20	-	-	-	-
Hurley (2007)	-	-0.30	-	-0.30	-	-0.10	-	-	-	-

## โปรตีนนม (milk proteins)

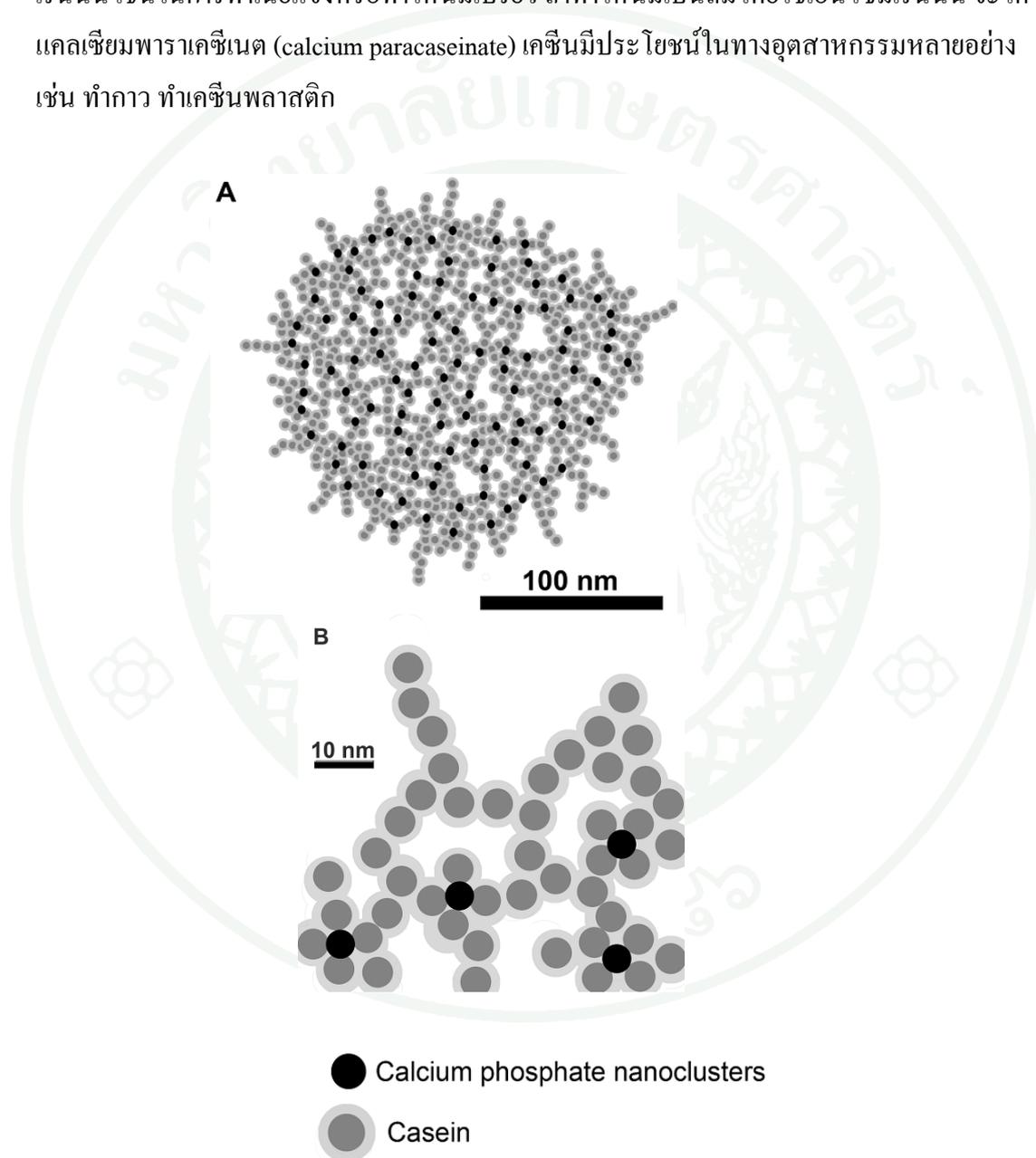
โปรตีนเป็นสารรวมของกรดอะมิโนหลายชนิด โปรตีนของน้ำนมเป็นโปรตีนที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการมากเป็นพิเศษ น้ำนมมีโปรตีนประมาณร้อยละ 3.8 หรือประมาณร้อยละ 30 ของวัตถุแห้งทั้งหมดของน้ำนม โปรตีนนมที่สำคัญในน้ำนมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โปรตีนเคซีน (casein) และโปรตีนหางนม (whey protein) ประกอบด้วย แลกตัลบูมิน ( $\alpha$ -lactalbumin) และ โกลบูลิน ( $\beta$ -lactoglobulin) (ชวานิศนดากร, 2534; Edgar, 1998)

แลกตัลบูมิน ( $\alpha$ -lactalbumin) พบว่ามีอยู่ประมาณ 2-5% ของโปรตีนนม น้ำหนักโมเลกุล 14,000-15,100 ดาลตัน (วรรณณา และ วิบูลย์ศักดิ์, 2531; Edgar, 1998) มีอยู่ในน้ำนมประมาณร้อยละ 0.5 อยู่ในรูปสารแขวนลอย แต่ไม่ตกตะกอนโดยกรดเหมือนเคซีน แต่ถ้าได้รับความร้อนเกิน 71°C lactalbumin จะลอยเป็นฟอสฟอรัสขาวบนผิวนมและจะแข็งตัว ถ้านำน้มนมมาต้มให้ร้อนจะมีฟอสฟอรัสของ lactalbumin เกิดขึ้น (ชวานิศนดากร, 2534)

โกลบูลิน ( $\beta$ -lactoglobulin) พบว่ามีอยู่ประมาณ 7-12% ของโปรตีนนม น้ำหนักโมเลกุล 18,300-36,000 ดาลตัน (วรรณณา และ วิบูลย์ศักดิ์, 2531; Edgar, 1998) มีจำนวนน้อยมากเพียงร้อยละ 0.1 ในน้ำนม โกลบูลินอยู่ในรูปสารละลายและพบมากในน้ำนมเหลืองขณะที่โคคลอดลูกใหม่ ๆ ซึ่งเป็นตัวโปรตีนที่มีหน้าที่ในการต้านทานเชื้อโรคให้แก่ลูกโค เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) (ชวานิศนดากร, 2534)

เคซีน (casein) เป็นโปรตีนหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งในน้ำนมซึ่งมีประมาณ 80% ของโปรตีนทั้งหมด (Fox and McSweeney, 1998; Edgar, 1998) เคซีนประกอบด้วย  $\alpha_s$ -casein ประมาณ 45-55% น้ำหนักโมเลกุล 22,500-23,000 ดาลตัน,  $\beta$ -casein ประมาณ 25-35% น้ำหนักโมเลกุล 24,000 ดาลตัน และ  $\kappa$ -casein ประมาณ 8.0-15% น้ำหนักโมเลกุล 19,000-21,000 ดาลตัน (วรรณณา และ วิบูลย์ศักดิ์, 2531; Edgar, 1998) โดยเคซีนชนิด  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein และ  $\beta$ -casein จะอยู่ในรูปโครงสร้างที่คล้ายกัน คือ มีคุณสมบัติที่ไม่สามารถรวมกับน้ำได้ (hydrophobic) ซึ่งถูกล้อมรอบโดย  $\kappa$ -casein ที่มีคุณสมบัติรวมตัวกับน้ำได้ดี (hydrophilic) จึงทำให้เคซีนทั้งหมดอยู่ในรูปของสารแขวนลอยที่เรียกว่า เคซีนไมเซลล์ (casein micellels) (McMahon and Oommen, 2008) ดังแสดงในภาพที่ 2

น้ำนมมีเคซีนประมาณร้อยละ 3 และพบว่าในธรรมชาติมีเคซีนในน้ำนมเพียงแห่งเดียว  
 อย่างไรก็ตาม ปริมาณของเคซีนในน้ำมนั้นมีความแปรปรวนแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ  
 เช่น พันธุ์โคนม ช่วงและระยะเวลาของการให้น้ำนม (ชวนิศนคกร, 2534) เคซีนจะแยกออกจาก  
 น้ำนมได้โดยการทำน้ำนมให้เป็นลิมหรือตกตะกอน โดยผสมกรดลงในน้ำนมหรือโดยใช้เอนไซม์  
 เรนิน เช่นในการทำเนยแข็งหรือทำให้นมเปรี้ยว ถ้าทำให้นมเป็นลิมโดยใช้เอนไซม์เรนิน จะได้  
 แคลเซียมพาราเคซีเนต (calcium paracaseinate) เคซีนมีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมหลายอย่าง  
 เช่น ทำกาว ทำเคซีนพลาสติก



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเคซีนไมเซลล์ (casein micelle structure)

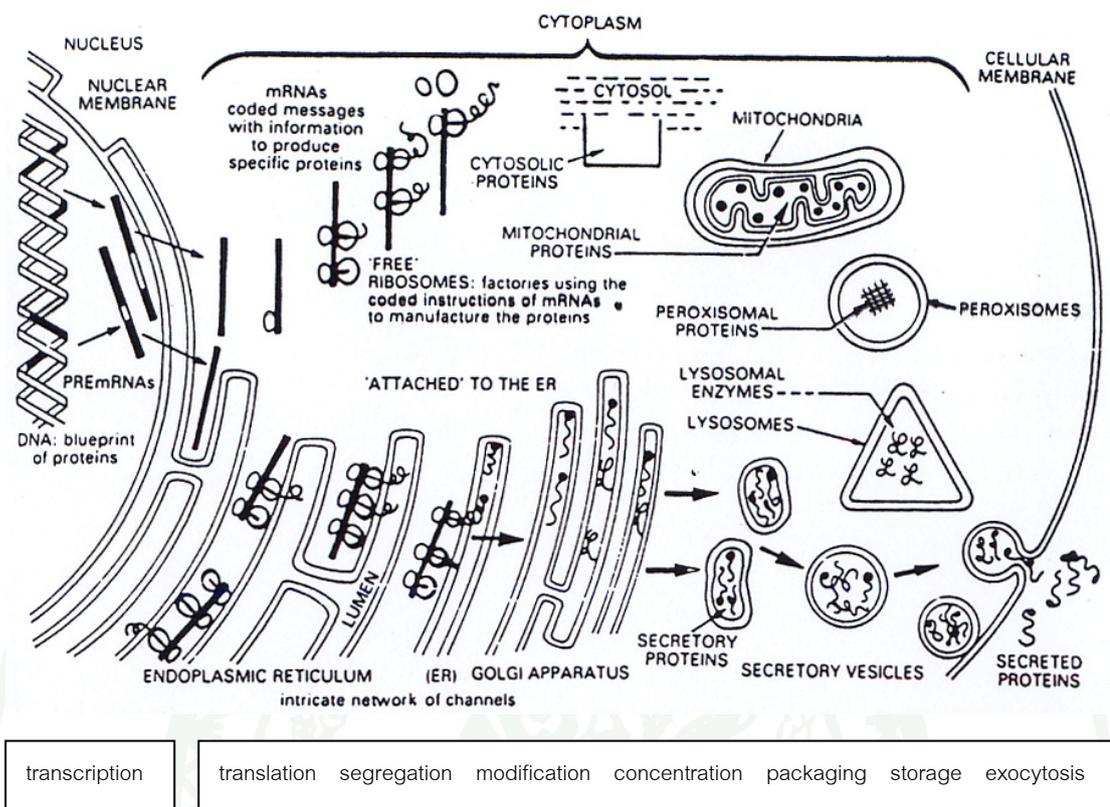
ที่มา: McMahon and Oommen (2008)

จากภาพที่ 2 แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของเคซีนไมเซลล์ (casein micelle structure) โดยภาพ A จะแสดง micelle หนึ่ง micelle ที่สมบูรณ์ที่ประกอบไปด้วย  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein และ  $\beta$ -casein ที่จับตัวกันอยู่ด้านใน โครงสร้างมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ซึ่งถูกล้อมรอบโดย  $\kappa$ -casein ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic ส่วนภาพ B แสดงภาพขยายภายใน micelle โดย  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein และ  $\beta$ -casein จะจับตัวอยู่กับ calcium phosphate ส่วน  $\kappa$ -casein ที่หุ้มอยู่ภายนอกจะไม่จับตัวอยู่กับ calcium phosphate หรือจับกันน้อยมาก เพราะมีหมู่ของ phosphate residues เพียง 1 หรือ 2 ตัวเท่านั้น จึงทำให้ casein micelle แขนงลอยอยู่ได้ในน้ำนมที่มีส่วนประกอบของแคลเซียม

### การสร้างโปรตีนในน้ำนม

จากที่ได้กล่าวข้างต้น โปรตีนในน้ำนมโคประกอบไปด้วยโปรตีนหลักอยู่ 6 ชนิดที่ถูกควบคุมการสร้างโปรตีนจากยีนเหล่านี้คือ  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\kappa$ -casein,  $\alpha$ -lactalbumin และ  $\beta$ -lactoglobulin (Heck *et al.*, 2009) และเนื่องด้วยเคซีนเป็นโปรตีนที่พบว่ามีสัดส่วนมากที่สุดประมาณ 80% ของโปรตีนทั้งหมด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษากลุ่มของเคซีน โปรตีนทุกชนิดสังเคราะห์ขึ้นจากกรดอะมิโนในน้ำเลือด การสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นในเซลล์ก่อกำเนิดน้ำนม (secretory cell) โปรตีนที่สร้างขึ้นนี้ไม่ปรากฏว่าพบในที่อื่นในธรรมชาติ โปรตีนเคซีนในน้ำนมอยู่ในรูปเม็ดเล็กๆ เรียกว่า protein micelle กระจายอยู่สม่ำเสมอในน้ำนม โดยมี  $\kappa$ -casein เป็นตัวรักษาเคซีนให้คงอยู่ในรูปเม็ดไม่ให้จับกันเป็นก้อน (ชวนิศนดากร, 2534; วิโรจน์, 2546)

กรดอะมิโนในเลือดที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ จะเข้ามายังส่วนของ endoplasmic reticulum ของ secretory cell สารที่ได้จะส่งผ่านไป golgi apparatus โดยมี mRNA และ rRNA ช่วยในการสร้างเฉพาะชนิดของโปรตีนใน ribosome และโปรตีนที่สร้างทั้งหมดจะถูกเก็บรวมเป็นถุงที่เรียกว่า micelles จากนั้นจะเคลื่อนที่จากกลางเซลล์ไปยังผิวเซลล์ secretory cell ถุงนี้จะแตกออกปลดปล่อยให้โปรตีนนมไหลเข้าไปในกระเปาะเก็บนมและรวมกับส่วนประกอบอื่นๆ ของน้ำนม (ชวนิศนดากร, 2534; วิโรจน์, 2546) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนและการขนส่งโปรตีนในเซลล์ก่อกันสร้างน้ำนม  
ที่มา: Fox and McSweeney (1998)

### ยีนเคซีน (casein gene)

ตำแหน่งของยีนเคซีนในโคมนอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 (BTA6 q31-33) ประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนในน้ำนมอยู่ 4 ชนิด โดยยีนทั้ง 4 ชนิดนี้มีความใกล้เคียงกันมากบนโครโมโซม (closely linked) คือ  $\alpha_{s1}$ -casein gene,  $\beta$ -casein gene,  $\alpha_{s2}$ -casein gene และ  $\kappa$ -casein gene กลุ่มหรือ cluster ของยีนนี้มีความยาวประมาณ 200-250 Kb (Jann *et al.*, 2004; Lien *et al.*, 1999; Mercier and Viloite, 1993) โดยตำแหน่งของยีนเหล่านี้มีอิทธิพลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม การต่อต้านยับยั้งแบคทีเรียและความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะเหล่านี้ไปยังรุ่นลูกได้ (Jann *et al.*, 2004) นอกจากนี้ความหลากหลายของยีนเคซีนของยีนแต่ละตำแหน่ง โดยเฉพาะ  $\beta$ -casein และ  $\kappa$ -casein ที่ถูกพบรูปแบบของยีนที่มีความหลากหลายสูง และด้วยความหลากหลายนี้เองทำให้นักวิจัยหลายคณะหันมาให้ความสนใจและศึกษาอิทธิพลของรูปแบบยีนต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมกันมากขึ้น เช่นการศึกษาอิทธิพลจากรูปแบบ genotype (ช่อทิพ, 2546; Bovenhuis

*et al.*, 1992; Ikonen *et al.*, 1999; Kucerova *et al.*, 2006) จากรูปแบบ composite genotype (ช่อทิพ, 2546; Comin *et al.*, 2008; Ikonen *et al.*, 1999) และจากรูปแบบ haplotype (Ikonen *et al.*, 2001; Caroli *et al.*, 2004; Boettcher *et al.*, 2004) เป็นต้น ในขณะที่ยีน  $\alpha_{s1}$  และ  $\alpha_{s2}$ -casein เป็นยีนมีความหลากหลายของรูปแบบยีนที่ต่ำ โดยเฉพาะยีน  $\alpha_{s2}$ -casein บางการศึกษาไม่พบความหลากหลายของรูปแบบยีน (Heck *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein สำหรับการศึกษานี้

### ความหลากหลายของยีนเบต้าและแคปปาเคซีน

ความหลากหลายของรูปแบบของยีน (polymorphism) คือ การที่ยีนยีนหนึ่งมีรูปแบบหรืออัลลีลมากในประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยอย่างน้อยต้องมีอัลลีลสองอัลลีลที่แตกต่างกันในกลุ่มประชากร ซึ่งเกิดจากโครโมโซมที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกันในกระบวนการไมโอซิส ตลอดจนการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ความหลากหลายของอัลลีลของยีน  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\beta$ -casein และ  $\kappa$ -casein ดังตารางที่ 6 อัลลีลที่พบของแต่ละ loci ที่มีความแตกต่างกันเกิดจากการเปลี่ยนแปลง (point mutation) ของกรดอะมิโน (ภาพที่ 4 และ 5) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสบางตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอ

ตารางที่ 6 ความหลากหลายของอัลลีลของยีนแอลฟาเอส 1 เคซีน ( $\alpha_{s1}$ -casein) แอลฟาเอส 2 เคซีน ( $\alpha_{s2}$ -casein) เบต้าเคซีน ( $\beta$ -casein) และ แคลปป้าเคซีน ( $\kappa$ -casein)

ชนิดของยีนเคซีน	รูปแบบอัลลีล (alleles)	References
$\alpha_{s1}$ -casein	B, C	(Jann <i>et al.</i> , 2004)
	A, B, C, D, E	(Eigel <i>et al.</i> , 1984)
$\alpha_{s2}$ -casein	A, B, C, D	(Ibeagha-Awemu <i>et al.</i> , 2007; Eigel <i>et al.</i> , 1984)
	A, D	(Jann <i>et al.</i> , 2004)
$\beta$ -casein	A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> , A <sup>3</sup> , B	(Hallen <i>et al.</i> , 2008; Lien <i>et al.</i> , 1999)
	A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> , A <sup>3</sup> , B, C, I	(Jann <i>et al.</i> , 2004)
	A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> , A <sup>3</sup> , B, C, I	(Jann <i>et al.</i> , 2002)
	A <sup>1</sup> , A <sup>2</sup> , A <sup>3</sup> , B, C, D, E, H	(Han <i>et al.</i> , 2000)
$\kappa$ -casein	A, B, C, E, F, G, H, I, A <sup>I</sup>	(Prinzenberg <i>et al.</i> , 2008)
	A, A <sub>1</sub> , B, C, E, F, G, H, I	(Jann <i>et al.</i> , 2004)
		(Prinzenberg <i>et al.</i> , 1999)
	A, B, C, E, F, G	(Barroso <i>et al.</i> , 1998)

จากตารางที่ 6 พบว่า ในแต่ละตำแหน่งของยีนเคซีนนั้น มีรูปแบบอัลลีลต่างๆ แตกต่างกันไปในแต่ละคนที่ทำการศึกษา ซึ่งนอกจากจะแสดงให้เห็นว่า ยีนเคซีนในแต่ละตำแหน่งมีความหลากหลายของรูปแบบแล้ว ยังแสดงให้เห็นอีกว่า ในประชากรโคนมที่แตกต่ากัน มีโอกาสที่จะพบรูปแบบอัลลีลที่แตกต่ากันด้วย จึงเป็นที่น่าสนใจว่า ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ในประเทศไทยจะพบรูปแบบอัลลีลใดบ้าง เหมือนหรือแตกต่างจากจากประชากรโคนมอื่นๆ ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้หรือไม่

H. Arg-Glu –Leu-Glu-Glu-Leu-Asn –Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser<sup>P</sup>-Leu-Ser<sup>P</sup> -Ser<sup>P</sup> -Ser<sup>P</sup> –Glu-  
 ↓  
 (Variant C)\*\* Lys (Variant D)  
 Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser-Glu- Lys - Gln- Gln- Gln-40  
 Ser<sup>P</sup> ↓ Glu (Variants A, B) \*  
 Lys (Variant E)

Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-60  
 (Variants A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>) \*  
 Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Lue-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-80  
 His (Variants C, A<sup>1</sup>, B) \*\*

Pro-Val-Val-Val-Pro-pro-phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-100  
 (Variants A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, B, C) \*  
 Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-120  
 Gln (Variant A<sup>3</sup>) \*\*

(Variants A,C) \*  
 Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-140  
 Arg (Variant B) \*\*

Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-160  
 Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-180  
 Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-200  
 Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-209. OH

#### ภาพที่ 4 Amino acid sequence of bovine $\beta$ -casein

หมายเหตุ ( ) = Eigel *et al.* (1984), (\*) = Fox and McSweeney (1998),  
 (\*\*\*) = Eigel *et al.* (1984), Fox and McSweeney (1998)

จากภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า  $\beta$ -casein ชนิด allele A<sup>1</sup> เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 67 เปลี่ยนจาก Proline ไปเป็น Histidine ชนิด allele A<sup>2</sup> ตำแหน่งที่ 67 เป็นกรดอะมิโน Proline ชนิด allele A<sup>3</sup> เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 106 เปลี่ยนจาก Histidine ไปเป็น Glutamine ชนิด allele B เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 37, 67 และ 122 เปลี่ยนจาก Lysine ไปเป็น Glutamic acid, จาก Proline ไปเป็น Histidine และจาก Serine ไปเป็น Arginine ตามลำดับ ชนิด allele C เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 35 และ 67 เปลี่ยนจาก Serine ไปเป็น Serine ที่มีหมู่ Phosphate และจาก Proline ไปเป็น Histidine ตามลำดับ ชนิด allele D เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 18 เปลี่ยน

จาก Serine ที่มีหมู่ Phosphate ไปเป็น Lysine และชนิด allele E เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 36 เปลี่ยนจาก Glutamic acid ไปเป็น Lysine

Pyro-Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-20

Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-40

Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-60

Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-80

Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His-100

Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-120  
(Variant B)

Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-<sup>Ile</sup>-Glu-Ala-Val-Glu-140  
<sup>Thr</sup> (Variant A) \*

(Variant B)  
Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-<sup>Ala</sup>-Ser<sup>P</sup>-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-<sup>Ser</sup>-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-160  
<sup>Asp</sup> (Variant A) \* <sup>Gly</sup> (Variant E) \*\*

Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val-169. OH

#### ภาพที่ 5 Amino acid sequence of bovine $\kappa$ -casein

หมายเหตุ ( ) = Eigel *et al.* (1984), ( )\* = Eigel *et al.* (1984), Fox and McSweeney (1998),  
( )\*\* = Erhardt (1989)

จากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่า  $\kappa$ -casein ชนิด allele A เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 136 และ 148 เปลี่ยนจาก Isoleucine ไปเป็น Threonine และจาก Alanine ไปเป็น Aspartic acid ตามลำดับ ชนิด allele B กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 136 และ 148 เปลี่ยนจาก Threonine ไปเป็น Isoleucine และจาก Aspartic acid ไปเป็น Alanine ตามลำดับ ชนิด allele E กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 155 เปลี่ยนจาก Serine ไปเป็น Glycine

จากการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของรูปแบบของยีน  $\beta$ -casein และ  $\kappa$ -casein ดังที่ได้กล่าวข้างต้นว่า ยีนเคซีนแต่ละชนิดนั้นมีความหลากหลายของอัลลีล เนื่องจากพันธุโคและแหล่งที่ทำการศึกษาของกลุ่มประชากร โคที่แตกต่างกัน และยังพบอีกว่าการกระจายตัวของยีนเคซีนแต่ละชนิดนั้นมีความถี่อัลลีล (allele frequencies) ที่แตกต่างกันด้วยดังแสดงในตารางที่ 7, 8

ตารางที่ 7 ความถี่อัลลีลของเบต้าเคซีนที่พบในโคสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

Breeds	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	B	C	D	E	H	I	References
Czech Fleckvieh	0.177	0.809	0.006	0.008	-	-	-	-	-	Kucerova <i>et al.</i> (2006)
Anatolian Black	0.04	0.79	-	0.11	0.04	-	-	-	0.01	Jann <i>et al.</i> (2004)
Belgian Blue, Mixed	0.35	0.41	0.03	0.12	0.09	-	-	-	-	
British Friesian	0.64	0.26	0.05	0.05	-	-	-	-	-	
Istrian	0.37	0.51	0.01	0.1	0.01	-	-	-	-	
Jersey	0.17	0.6	-	0.18	-	-	-	-	0.06	
Piemontese	0.24	0.42	-	0.24	0.05	-	-	-	0.04	
Finnish Holstein-Friesian	0.43	0.52	-	0.04	-	-	-	-	-	Lien <i>et al.</i> (1999)
Finnish Ayrshire	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	

หมายเหตุ - ไม่พบการรายงานความถี่อัลลีล

ตารางที่ 8 ความถี่อัลลีลของแคปป์เคซีนที่พบโคสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน

breed	A	A1	B	C	E	F	G	H	I	references
Nelore	0.130	0.152	0.109	-	-	-	-	0.609	-	(Ibeagha-Awemu et al., 2007)
Piemontese	0.450	-	0.470	-	-	-	-	0.080	-	
Turkish Gray Steppe	0.417	-	0.240	-	-	-	-	0.344	-	
Britidh Friesian	0.838	-	0.162	-	-	-	-	-	-	
Polish Red	0.595	-	0.333	0.024	-	-	-	0.048	-	
Czech Fleckvieh	0.598	-	0.378	-	0.024	-	-	-	-	(Kucerova et al., 2006)
Menorquina	0.25	-	0.61	0.10	-	-	-	-	0.04	(Jann et al., 2004)
Finnish Ayrshire	0.598	-	0.076	-	0.326	-	-	-	-	(Lien et al., 1999)
Finnish Holstein-Friesian	0.744	-	0.140	-	0.116	-	-	-	-	

หมายเหตุ - ไม่พบการรายงานความถี่อัลลีล

อิทธิพลของรูปแบบ  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein genotype และรูปแบบร่วมกันของ  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein genotype (composite genotype) ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

จากการรวบรวมเอกสารของนักวิจัยหลายคนพบว่าอิทธิพลของรูปแบบ  $\beta$ -casein genotype,  $\kappa$ -casein genotype และ composite genotype ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในแต่ละรูปแบบของยีนแต่ละตำแหน่ง ให้อิทธิพลในทิศทางที่เหมือนกันและแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมีรูปแบบที่เหมือนกัน ก็ยังพบว่าให้ผลของอิทธิพลที่แตกต่างกันด้วย ดังแสดงในตารางที่ 9, 10 และ 11

ตารางที่ 9 อิทธิพลของ  $\beta$ -casein genotype ที่มีต่อลักษณะต่างๆ ของผลผลิตน้ำนม

References (Breed)	Genotype	Milk Yield	Protein Yield	Fat Yield	%Protein	%Fat
Bovenhuis <i>et al.</i> , (1992) (Holstein-Friesian)	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	+49.00	+1.55	-0.37	-0.00	-0.04
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	+21.00	+0.98	+0.45	+0.01	-0.00
	A <sup>1</sup> B	-115.00	-2.70	-5.47	+0.04	+0.03
	A <sup>2</sup> B	-5.00	+1.50	-1.80	+0.02	-0.03
	BB	-320.00	-8.34	-10.00	+0.05	+0.08
	A <sup>1</sup> A <sup>3</sup>	+74.00	+5.71	+0.15	+0.05	-0.05
	A <sup>2</sup> A <sup>3</sup>	-48.00	-1.03	-8.53	+0.06	-0.05
Kucerova <i>et al.</i> , (2006) (Czech Fleckvieh)	A <sup>3</sup> B	+222.00	+9.36	+5.53	+0.03	-0.09
	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	+27.40	+1.45	+0.04	+0.01	-0.025
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	-80.70	-0.64	-1.46	+0.028	+0.028
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	-52.70	-0.81	-0.73	+0.018	+0.021
	A <sup>2</sup> A <sup>3</sup>	+8.20	+1.66	+1.24	+0.039	-0.002
A <sup>2</sup> B	-271.30	-8.15	-11.40	+0.013	-0.011	

ตารางที่ 9 (ต่อ)

References (Breed)	Genotype	Milk Yield	Protein Yield	Fat Yield	%Protein	%Fat
ช่อทิพ (2546) (Crossbred)	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	+0.80	+3.40	-	-1.17	-
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	0.00	0.00	-	0.00	-
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	-20.45	-1.97	-	-0.73	-
	A <sup>2</sup> B	-14.10	-3.86	-	-0.58	-
	A <sup>1</sup> B	-724.16	-18.25	-	+0.97	-
Ikonen <i>et al.</i> (1999) (Finnish Ayrshire)	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	-193.00	-7.40	-2.10	-0.02	+0.12
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	-86.00	-3.40	-0.30	-0.01	+0.06
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 10 อิทธิพลของ  $\kappa$ -casein genotype ที่มีต่อลักษณะต่างๆ ของผลผลิตน้ำนม

References (Breed)	Genotype	Milk Yield	Protein Yield	Fat Yield	%Protein	%Fat
Bovenhuis <i>et al.</i> , (1992) (Holstein-Friesian)	AA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	AB	-51.00	+0.32	-2.05	+0.03	+0.01
	BB	-173.00	-1.23	-5.28	+0.08	+0.05
Kucerova <i>et al.</i> , (2006) (Czech Fleckvieh)	AA	-113.30	-2.31	-3.15	+0.02	+0.02
	AB	-62.60	-0.45	-1.84	+0.02	+0.003
	AE	-92.00	-1.62	-3.56	+0.01	-0.008
	BB	-102.10	-2.22	-3.67	+0.04	+0.007
	BE	+0.90	+0.11	-0.07	+0.02	0.011

ตารางที่ 10 (ต่อ)

References (Breed)	Genotype	Milk Yield	Protein Yield	Fat Yield	%Protein	%Fat
ช่อทิพ (2546) (Crossbred)	AA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	AB	-173.65	-2.63	-	+0.03	-
	AE	-1279.8	-29.29	-	+0.41	-
	BB	-629.88	-17.82	-	+0.12	-
	BE	-579.49	-11.29	-	-0.40	-
Ikonen <i>et al.</i> (1999) (Finnish Ayrshire)	AA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	AB	-20.00	+1.10	-0.80	+0.03	+0.00
	AE	+59.00	+0.90	+1.30	-0.02	-0.02
	BB	-54.00	+0.40	-1.40	+0.04	+0.03
	BE	+73.00	+2.20	+3.60	+0.01	+0.01
	EE	+82.00	+0.60	+1.80	-0.03	-0.03

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 11 อิทธิพลของ composite genotype ที่มีต่อลักษณะต่าง ๆ ของผลผลิตน้ำนม

References (Breed)	Genotype	Milk Yield	Protein Yield	Fat Yield	%Protein	%Fat
ช่อทิพ (2546) (Crossbred)	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA	0.00	0.00	-	0.00	-
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB	-121.83	-1.96	-	+0.034	-
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AA	-180.25	-8.14	-	-0.039	-
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AB	-288.74	-9.14	-	-0.017	-
	A <sup>2</sup> BAA	-633.83	-17.98	-	+0.025	-
	A <sup>2</sup> BAB	-990.40	-20.12	-	+0.179	-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

References (Breed)	Genotype	Milk Yield	Protein Yield	Fat Yield	%Protein	%Fat
Comin <i>et al.</i> , (2008) (Italian Holstein)	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA	+0.00	+0.00	-	-	-
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB	+0.63	+0.06	-	-	-
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AE	-0.18	+0.00	-	-	-
	A2A2AA	0.00	0.00	-	-	-
	A2A2AB	-1.18	+0.00	-	-	-
	A2BAB	-0.95	-0.04	-	-	-
Ikonen <i>et al.</i> (1999) (Finnish Ayrshire)	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> AE	-152.00	-7.30	-1.50	-0.04	+0.10
	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> BE	-104.00	-4.40	+2.50	-0.01	+0.13
	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> EE	-100.00	-6.40	-0.00	-0.05	+0.09
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA	-76.00	-3.20	+0.30	-0.01	+0.07
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB	-127.00	-2.90	-2.10	+0.02	+0.06
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AE	-12.00	-2.00	+0.40	-0.02	+0.04
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AB	+103.00	+3.20	+2.60	-0.01	-0.03

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีข้อมูล

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น ในเรื่องของความหลากหลายของรูปแบบของยีน (polymorphism) ความถี่ยีนและอิทธิพลของรูปแบบยีน  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein และ composite genotype จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่าโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่เป็นพันธุ์เดียวกันนั้น การมีระดับสายเลือดแตกต่างกัน จะพบรูปแบบของยีน ความถี่ยีนในแต่ละรูปแบบและอิทธิพลของยีนในแต่ละตำแหน่งแตกต่างกันด้วยหรือไม่ เพื่อใช้ในการพิจารณาเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ในประเทศไทย และความเป็นไปได้ในการที่จะนำมาประยุกต์ใช้เป็น genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกโคนมในอนาคต ให้มีปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมที่สูงขึ้นและได้มาตรฐาน

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. สัตว์ทดลอง

ศึกษาในแม่โคนมรีดนมลูกผสมโฮลสไตน์ จำนวนทั้งหมด 231 ตัว จากไซยาสันฟาร์ม ซึ่งเป็นฟาร์มโคนมแห่งหนึ่งในเขตจังหวัดสระบุรี จำนวน 121 ตัว และจากฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 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  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction) โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Geneaid Biotech Ltd.) ในขั้นตอนต่อไป

### 3. การสกัดดีเอ็นเอ

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

3.1 ขั้นตอน RBC Lysis นำเลือดจากหลอดสุญญากาศที่มีส่วนประกอบของ EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด ที่เก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเลือดจะ

เปลี่ยนสภาพจากที่แข็งตัวกลายเป็นของเหลว ดูดตัวอย่างเลือดด้วย micropipet ปริมาณ  $300 \mu\text{l}$  ลงใน microcentrifuge tube (1.5 ml) ใส่ RBC Lysis Buffer 3 เท่าของตัวอย่างเลือด ( $900 \mu\text{l}$ ) ผสมให้เข้ากัน incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไป Centrifuge นาน 2 นาที ที่  $10,000 \text{ rpm}$  ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ใส่  $100 \mu\text{l}$  RBC Lysis Buffer อีกครั้ง

3.2 ขั้นตอน Cell Lysis ใส่ Proteinase K  $20 \mu\text{l}$  ( $10\text{-}20 \text{ mg/ml}$ ) และ vortex เบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที ใส่  $200 \mu\text{l}$  GB Buffer และผสมกันด้วยเครื่อง Vortex นำไป Incubate 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $60^\circ\text{C}$  จนกระทั่งตัวอย่างย่อย ทุกๆ 3 นาทีให้ทำการกลับหลอดไปมา ในระหว่างนี้ นำ Elution Buffer ไปอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ  $60^\circ\text{C}$  เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA Elution ( $100 \mu\text{l}$  ต่อ 1 ตัวอย่าง)

3.3 ขั้นตอน DNA Binding ใส่ Ethanol  $200 \mu\text{l}$  และ Vortexing 10 วินาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน GD column ที่วางอยู่บน collection tube (2 ml) นำไป Centrifuge  $13,000 \text{ rpm}$  นาน 5 นาที

3.4 ขั้นตอน Wash ใส่  $400 \mu\text{l}$  W1 Buffer ลงใน GD column นำไป Centrifuge  $13,000 \text{ rpm}$  นาน 30 วินาที ที่สารละลายที่ทำการล้างออกไปที่อยู่ใน collection tube (2 ml) ใส่  $600 \mu\text{l}$  Wash Buffer (ethanol added) ลงใน GD column นำไป Centrifuge  $13,000 \text{ rpm}$  นาน 30 วินาที ที่สารละลายที่ทำการล้างออกไปที่อยู่ใน collection tube (2 ml) และนำไป Centrifuge  $13,000 \text{ rpm}$  นาน 3 นาทีอีกครั้งเพื่อให้แห้งและเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.5 ขั้นตอน DNA Elution นำ GD column ใส่ลงใน microcentrifuge tube (1.5 ml) ใหม่ ใส่  $100 \mu\text{l}$  Elution Buffer ที่เตรียมไว้ลงใน GD column ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที นำไป Centrifuge  $13,000 \text{ rpm}$  นาน 3 วินาที และจะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (purified DNA) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ (Genomic DNA) ไว้ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่  $-20^\circ\text{C}$

หลังจากทำการสกัดเรียบร้อยแล้ว นำไปตรวจสอบคุณภาพ ปริมาณและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV และทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer (optical-density,  $260 \text{ nm}$  and  $280 \text{ nm}$ ) เพื่อทำการปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเป็น  $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$  สำหรับ

ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่  $-20^{\circ}\text{C}$  รอทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ในขั้นตอนต่อไป

#### 4. การวิเคราะห์หารูปแบบจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน

การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีน เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบมีความแตกต่างกัน คือ การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีนเบต้าเคซีนจะใช้เทคนิค allelic specific-PCR (AS-PCR) และ การตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีนแคปป้าเคซีนจะใช้เทคนิค PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ซึ่งงานวิจัยนี้อ้างอิงและประยุกต์ใช้วิธีการของ ช่อทิพ (2546) และตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์จากการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ดังต่อไปนี้

##### 4.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเบต้าเคซีน ( $\beta$ -casein) ด้วยวิธี AS-PCR

ในวิธีการนี้ลำดับเบสบนสาย specific primers (oligonucleotides) ที่ใช้จะมี ความจำเพาะสูง จะทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (PCR-product) ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งเบสที่ ผันแปรของแต่ละ allele ซึ่งลำดับเบสของสายนิวคลีโอไทด์นี้ ได้แสดงตำแหน่งเบสที่เกิดความผันแปรของแต่ละ allele ไว้โดยอักษรตัวเอนบนสาย specific primers โดยมีวิธีการดังนี้ ใช้ DNA template ปริมาณ  $1\ \mu\text{l}$ , Go Taq<sup>®</sup> Green Master Mix, 2x (Promega) ซึ่งประกอบด้วย reaction buffer (pH 8.5),  $400\ \mu\text{M}$  dATP,  $400\ \mu\text{M}$  dGTP,  $400\ \mu\text{M}$  dCTP,  $400\ \mu\text{M}$  dTTP,  $3\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  และ dye ใช้ปริมาณ  $12.5\ \mu\text{l}$ , forward primer/specific primer ( $20\ \mu\text{M}$ )  $0.5\ \mu\text{l}$  และ reverse primer/specific primer ( $20\ \mu\text{M}$ )  $0.5\ \mu\text{l}$  และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย Nuclease-Free Water (Promega) ให้ได้  $25\ \mu\text{l}$  ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ  $94^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ รายละเอียดในปฏิกิริยา 1 รอบดังนี้ จะเริ่มที่อุณหภูมิ  $94^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ  $62^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที (กรณีคู่ของ forward primer: *BCN1* กับ reverse primer: *BCN3* Primer annealing ที่อุณหภูมิ  $56^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 วินาที) และ Primer extension ที่อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 วินาที และจบด้วยขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ  $72^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 7 นาที หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุด นำ PCR-product ปริมาณ  $8\ \mu\text{l}$  ไปตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis, 100 volt, 30 นาที

เทียบกับ 100 bp DNA ladder (Fermentas) ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV ทำการบันทึกภาพลงบนแผ่นบันทึก

ขั้นตอนที่ 1 ทำการแบ่งกลุ่มระหว่างยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A<sup>1</sup>, B, C, F และ ยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, E 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<sup>1</sup>, B, C, F-specific) 5' -TTT GTG GGA GGC TGT TAT-3'

*BCN 2* (A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, E -specific) 5' -TTT GTG GGA GGC TGT TAG-3'

ขั้นตอนที่ 2 สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อกลุ่มยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A<sup>1</sup>, B, C, F จะทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 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 GAA-3'

Forward primer 2:

*BCN 15* 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 TTT-3'

ขั้นตอนที่ 3 สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อกลุ่มยีนเบต้าเคซีนอัลลีล A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup>, E จะทำการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 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 I*    5' -TGA AGA AAG TGG GTT AAT GAG AAA TCC T -3'

Reverse primers 1:

*BCN A<sup>3</sup>* (A<sup>3</sup>-specific)                      5' -GGG AAG GGC ATT TCT TTT-3'

Forward primer 2:

*BCN I5*    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 CTT -3'

#### 4.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนแคปป้าเคซีน ( $\kappa$ -casein) ด้วยวิธี PCR-RFLP

ทำการเพิ่มขึ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วย 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  $\mu$ l, Go Taq® Green Master Mix, 2x (Promega) ซึ่งประกอบด้วย reaction buffer (pH 8.5), 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> และ dye ใช้ปริมาณ 12.5  $\mu$ l, forward primer: *KP1* (20  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l และ reverse primer: *KP2* (20  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ l และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วย Nuclease-Free Water (Promega) ให้ได้ 25  $\mu$ l ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ รายละเอียดในปฏิกิริยา 1 รอบดังนี้ 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 12 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

ตารางที่ 12 สารประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 583 bp ของยีนเคปปีเคซีน ( $\kappa$ -casein) ด้วยวิธี PCR-RFLP

Reaction Mix	<i>Hinf</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hpy</i> CH4IV	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> 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( $\mu$ l)	20	20	20	20	20

*Hinf*I (10U/  $\mu$ l) (Promega, U.S.A.)

Recognition Sequence 5' ...G<sup>∇</sup>ANTC...3'  
3' ...CTNA<sub>Δ</sub>G...5'

*Hind*III (10U/  $\mu$ l) (Promega, U.S.A.)

Recognition Sequence 5' ...A<sup>∇</sup>AGCTT...3'  
3' ...TTCGA<sub>Δ</sub>A...5'

*Hpy*CH4IV (isoschizomer of *Mae*II) (10U/  $\mu$ l) (NEB, U.S.A.)

Recognition Sequence 5' ...A<sup>∇</sup>CGT...3'  
3' ...TGC<sub>Δ</sub>A...5'

*Hae*III (10U/  $\mu$ l) (Promega, U.S.A.)

Recognition Sequence 5' ...GG<sup>∇</sup>CC...3'  
3' ...CC<sub>Δ</sub>GG...5'

*Hha*I (10U/  $\mu$ l) (NEB, U.S.A.)

Recognition Sequence 5' ...GCG<sup>∇</sup>C...3'  
3' ...C<sub>Δ</sub>GCG...5'

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

## 5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.1 ตรวจสอบการกระจายของข้อมูลและตรวจสอบข้อมูลที่มีความผิดปกติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 2002) วิธี PROC UNIVARIATE

5.2 หาค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างลักษณะต่างๆ ดังข้อมูลที่มีการบันทึกลักษณะการให้ผลผลิตรายตัว ได้แก่ ปริมาณน้ำนม (MY, kg) เปอร์เซ็นต์โปรตีน (%Protein) เปอร์เซ็นต์ไขมันนม (%Fat) เปอร์เซ็นต์แลคโตส (%Lactose) เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมัน (%SNF) เปอร์เซ็นต์เนื้อมรวม (%TS) ปริมาณโปรตีน (Protein, g) ปริมาณไขมัน (Fat, g) ปริมาณแลคโตส (Lactose, g) ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมัน (SNF, g) และปริมาณเนื้อมรวม (TS, g) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 2002) วิธี PROC CORR

5.3 หาค่าความถี่ allele, genotype, composite genotype และ ความแตกต่างของความถี่ allele และ genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003) ดังสมการที่ (1), (2), (3) และ (4) ตามลำดับ

$$\text{ความถี่ allele } A = \frac{\sum A1}{\sum A1 + \sum A2 + \dots + \sum a} \quad (1) \quad (\text{Khan and Singh, 2002})$$

$$\text{ความถี่ของ genotype} = \frac{Ng}{N} \quad (2) \quad (\text{สมชัย และ พิระศักดิ์, 2546})$$

เมื่อ  $Ng$  คือจำนวนสัตว์ที่มี genotype นั้นๆ และ  $N$  คือจำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ศึกษา

$$\text{ความถี่ของ composite genotype} = \frac{Ncg}{N} \quad (3)$$

เมื่อ  $Ncg$  คือจำนวนสัตว์ที่มี composite genotype นั้นๆ และ  $N$  คือจำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ศึกษา

สำหรับการวิเคราะห์หาความแตกต่างของความถี่ allele และ genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ โคนมในแต่ละกลุ่มตัวอย่างมีสัดส่วนของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆ เท่าๆ กันหรือไม่ โดย null hypothesis คือ โคนมในแต่ละกลุ่มตัวอย่างมีสัดส่วนของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆ เท่าๆ กัน โดยการตรวจสอบด้วยวิธีไคสแควร์ ดังสมการต่อไปนี้

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad (4) \quad (\text{จริญ, 2540})$$

เมื่อ  $O_i$  เป็นจำนวนของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆ ที่เกิดขึ้นจริง ส่วน  $E_i$  เป็นจำนวนของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆ ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$E_i = \frac{(\text{ผลรวมของแถวบน}) \times (\text{ผลรวมของแถวตั้ง})}{\text{ผลรวมทั้งหมด}}$$

โดยมีองศาความเป็นอิสระ (d.f.) เป็น (จำนวนแถวบน-1) x (จำนวนแถวตั้ง-1) ซึ่งค่าต่างๆ ที่ใช้ในการคำนวณค่าไคสแควร์ ดังแสดงในตารางผนวกที่ 1, 2, 3 และ 4

5.4 หาค่าความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ระหว่างยีน 2 ตำแหน่งในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และความแตกต่างของความถี่ allele และ genotype ระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003)

5.5 หาค่าความสัมพันธ์ของกลุ่มระดับสายเลือด กับรูปแบบ genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein โดยใช้วิธี PROC LOGISTIC ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 2002) ดังสมการที่ (5) และ (6) ตามลำดับ

$$\ln\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \varepsilon \quad (5)$$

โดยกำหนดให้

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

$\beta_0$  = จุดตัดแกน Y (intercept)

$\beta_1$  = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของ genotype หรือ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein

$X_1$  = ตัวแปรคัมมีของการปรากฏ genotype หรือ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein

$\varepsilon$  = ความคลาดเคลื่อน (residual effect)

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

$$\hat{p}_i = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_1)}} \quad (6)$$

โดยกำหนดให้

$\beta_0$  = ค่าประมาณของ intercept

$\beta_1$  = ค่าประมาณของ regression coefficient ของ genotype หรือ composite genotype

$X_1$  = ตัวแปรคัมมีของการปรากฏ genotype หรือ composite genotype

5.6 หาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม (รูปแบบที่มีความถี่ต่ำกว่า 0.05 ไม่ได้นำมาร่วมศึกษาอิทธิพลในครั้งนี้) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS, 2002) วิธี PROC GLM ดังสมการที่ (7)

ในการศึกษาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein กับลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสม ไฮลสไต้นที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน โดยทำการประมาณค่าและทดสอบนัยสำคัญทางสถิติของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein กับลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ด้วยวิธี ordinary least square (OLS) ซึ่งเป็นรูปแบบของสมการเส้นตรง (linear model) (Kaps and Lamberson, 2004)

$$y = X_1\beta_1 + X_2\beta_2 + \varepsilon \quad (7)$$

โดยกำหนดให้

$y$  = เป็นเวกเตอร์ของค่าสังเกต คือ ลักษณะปริมาณน้ำนมหรือลักษณะองค์ประกอบน้ำนมต่างๆ

$\beta_1$  = เป็นเวกเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจาก ฝูง-ปี-ฤดูกาล, อิทธิพลคงที่เนื่องจากลำดับครั้งของการให้นม และอิทธิพลของจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอด

$\beta_2$  = เป็นเวกเตอร์ของอิทธิพลคงที่เนื่องจากรูปแบบ allele, genotype ของยีนแต่ละตำแหน่ง และ composite genotype

$X_1$  = เป็น incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่  $\beta_1$  ในแต่ละค่าสังเกต

$X_2$  = เป็น incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่  $\beta_2$  ในแต่ละค่าสังเกต

$\varepsilon$  = เป็นเวกเตอร์ของความคลาดเคลื่อน

นอกจากการศึกษาอิทธิพลของรูปแบบ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ดังที่กล่าวข้างต้นนั้น และเป็นไปตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 3 ของการศึกษานี้ แต่อย่างไรก็ตามสำหรับข้อมูลที่มีอยู่สามารถที่จะหาความสัมพันธ์ของ %Protein และ %SNF ที่ผ่านมาตรฐานกับรูปแบบ composite genotype ได้ และเป็นประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ โดยใช้วิธี PROC LOGISTIC เช่นเดียวกันดังสมการที่ (5) และ (6) ตามลำดับ แต่มีการกำหนดความหมายของตัวแปรที่ต่างกันดังนี้

โดยสมการที่ (5) กำหนดให้

$p_i$  = ความน่าจะเป็นของ %Protein และ %SNF ที่ผ่านมาตรฐานที่จะพบรูปแบบ composite genotype โดยกำหนดให้ %Protein (ตั้งแต่ 3.00% ขึ้นไป) และ %SNF (ตั้งแต่ 8.25% ขึ้นไป) ที่ผ่านมาตรฐาน (สุณิรัตน์ และคณะ, 2549) เป็น 1 และ %Protein และ %SNF ที่ต่ำกว่ามาตรฐานเป็น 0

$\beta_0$  = จุดตัดแกน Y (intercept)

$\beta_1$  = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของ composite genotype, กลุ่มระดับสายเลือด, ฝูง-ปี-ฤดูกาล, ลำดับครั้งของการให้นมและจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอด

$X_1$  = ตัวแปรคัมมีของการปรากฏรูปแบบ composite genotype, กลุ่มระดับสายเลือด, ฝูง-ปี-ฤดูกาล, ลำดับครั้งของการให้นมและจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอด

$\varepsilon$  = ความคลาดเคลื่อน (residual effect)

ความน่าจะเป็นของ %Protein และ %SNF ที่ผ่านมาตรฐานที่จะพบรูปแบบ composite genotype ( $\hat{p}_i$ ) คำนวณได้โดยสมการที่ (6) ซึ่งกำหนดให้ตัวแปรต่างๆ มีความหมายดังนี้

$\beta_0$  = ค่าประมาณของ intercept

$\beta_1$  = ค่าประมาณของ regression coefficient ของ composite genotype, กลุ่มระดับสายเลือด, ฝูง-ปี-ฤดูกาล, ลำดับครั้งของการให้นมและจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอด

$X_1$  = ตัวแปรคัมมีของการปรากฏรูปแบบ composite genotype, กลุ่มระดับสายเลือด, ฝูง-ปี-ฤดูกาล, ลำดับครั้งของการให้นมและจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอด

### สถานที่ทำการทดลอง

1. ไร่ไชยสาส์นฟาร์ม อำเภอวิหารแดง จังหวัดสระบุรี
2. ฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา
3. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

### ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มต้นการทดลองเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551  
สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน พ.ศ. 2552

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบรูปแบบ ความถี่ และอิทธิพลของ allele, genotype และ composite genotype ของ ยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรหลักของโคนมในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มความถี่ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ที่มีอิทธิพลต่อ %SNF ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมสูงที่สุด
2. ทราบความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง ของกลุ่มตัวอย่างที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษารูปแบบของอิทธิพลของยีนทั้ง 2 รวมถึงแนวทางในการประยุกต์ใช้เป็น genetic marker ต่อไปในอนาคต
3. ทราบความสัมพันธ์ของ allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein กับระดับสายเลือดของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่แตกต่างกัน เพื่อกำหนดทิศทางการเพิ่มระดับสายเลือดให้มี allele, genotype และ composite genotype ของยีน  $\beta$ ,  $\kappa$ -casein ที่ส่งผลต่อ %SNF ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมสูงที่สุด
4. ทราบถึงรูปแบบ composite genotype ที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อลักษณะ %SNF ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบในน้ำนมอื่นๆ เพื่อใช้ในการพัฒนาเป็น genetic marker ต่อไปในอนาคต

## ผลและวิจารณ์

### 1. ข้อมูลลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมที่ทำการศึกษา

ลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ เป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับบันทึกรายตัวของแม่โครีคนม ณ วันทดสอบทั้งหมด 231 ตัว และทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของทุกลักษณะ โดยแสดงจำนวนข้อมูล ณ วันทดสอบ (N) ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ของแต่ละลักษณะที่ทำการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) ของกลุ่มตัวอย่างที่ 1 (G1) และกลุ่มตัวอย่างที่ 2 (G2)

Traits	G1				G2			
	N	mean	SD.	%CV.	N	mean	SD.	%CV.
MY, kg	1118	10.45	3.86	36.98	865	10.29	3.96	38.51
%Fat	1104	3.69	0.69	18.85	856	3.69	0.61	16.60
Fat, g	1104	377.38	131.54	34.86	856	373.30	133.70	35.81
%Protein	1116	3.13	0.38	12.03	865	2.89	0.34	11.88
Protein, g	1116	322.22	111.89	34.72	865	293.18	108.61	37.04
%Lactose	1118	4.69	0.34	7.33	862	4.53	0.38	8.46
Lactose, g	1118	491.60	189.94	38.64	862	463.67	176.55	38.08
%SNF	1104	8.50	0.48	5.69	856	8.21	0.46	5.59
SNF, g	1104	887.46	232.02	36.40	856	841.81	313.58	37.25
%TS	1118	12.22	1.00	8.25	865	11.93	0.91	7.63
TS, g	1118	1264.70	441.85	34.94	865	1214.35	437.00	35.99

หมายเหตุ MY = milk yield, SNF = solid not fat, TS = total solid, g = gram, kg = kilogram

ตารางที่ 14 ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างลักษณะต่างๆของผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

	MY, kg	%Fat	Fat, g	%Protein	Protein, g	%Lactose	Lactose, g	%SNF	SNF, g	%TS	TS, g
MY, kg	1	-0.33	0.87	-0.29	0.94	-0.001*	0.97	-0.20	0.99	-0.33	0.98
%Fat		1	0.14	0.41	-0.21	-0.02*	-0.32	0.32	-0.28	0.87	-0.16
Fat, g			1	-0.12	0.87	-0.01*	0.85	-0.06	0.88	0.07	0.94
%Protein				1	0.03*	0.07	-0.26	0.76	-0.18	0.68	-0.16
Protein, g					1	0.04*	0.92	0.06	0.97	-0.11	0.97
%Lactose						1	0.21	0.58	0.09	0.28	0.07
Lactose, g							1	-0.07	0.98	-0.26	0.97
%SNF								1	-0.04*	0.75	-0.05
SNF, g									1	-0.22	0.99
%TS										1	-0.13
TS, g											1

หมายเหตุ \* พบความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P>0.05$ )

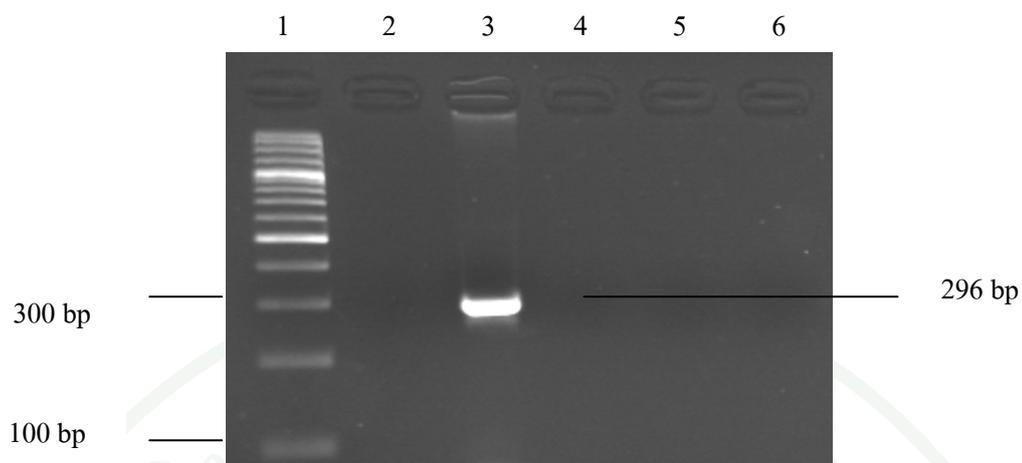
## 2. สหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างลักษณะต่างๆของปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

จากตารางที่ 14 แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าลักษณะ %Protein มีความสัมพันธ์กันสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะ %SNF ดังนั้นการปรับปรุงลักษณะ%Protein ย่อมส่งผลให้ลักษณะ %SNF สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตามจากตารางจะเห็นได้ว่า %SNF มีความสัมพันธ์ทางลบกับลักษณะ MY และลักษณะองค์ประกอบในน้ำนมลักษณะอื่นๆด้วย เช่นลักษณะปริมาณ Fat (g) ดังนั้นในการพิจารณาจะปรับปรุงพันธุกรรมโคนมเพื่อให้มี %SNF สูงขึ้นจำเป็นต้องให้ความสำคัญระมัดระวังเพื่อให้กระทบต่อลักษณะดังกล่าวน้อยที่สุด และสำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผลของค่าสหสัมพันธ์ สามารถใช้ประกอบการพิจารณาเลือกรูปแบบของยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein เพื่อเสนอเป็น genetic marker ที่มีผลกระทบต่อลักษณะ MY และลักษณะอื่นๆ น้อยที่สุดด้วย

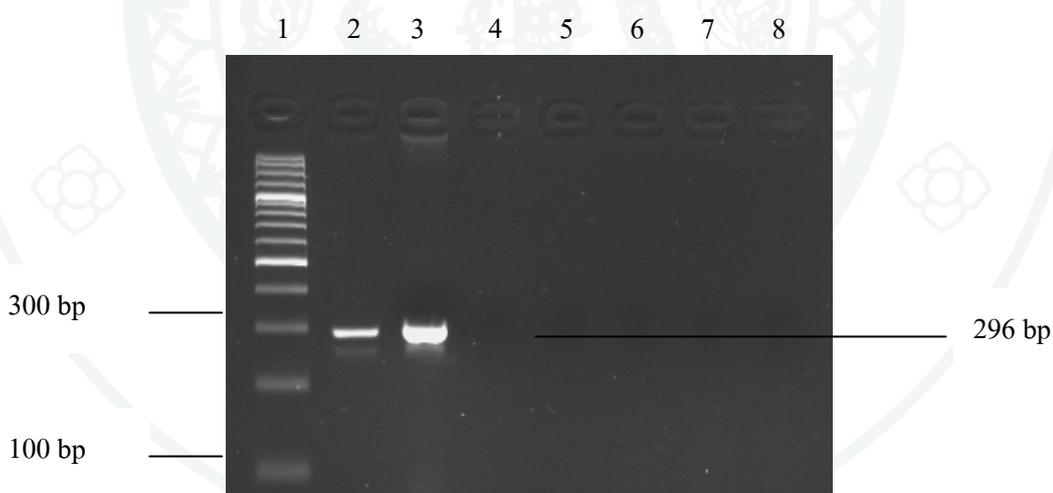
## 3. รูปแบบ gene หรือ allele, genotype และ composite genotype ของยีน $\beta$ -casein และ $\kappa$ -casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

จากการศึกษารูปแบบ allele ของยีน  $\beta$ -casein พบ 3 รูปแบบคือ  $A^1$ ,  $A^2$  และ B ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในกลุ่ม *Bos taurus* (Ikonen et al., 1999; Caroli et al., 2008; Comin et al., 2008) *Bos indicus* (Jann et al., 2004) และ *Bos taurus* x *Bos indicus* (ช่อทิพ, 2546) ซึ่งพบว่ารูปแบบ allele ทั้ง 3 รูปแบบเป็นรูปแบบพื้นฐานที่สามารถพบได้ทั้งโคนมในกลุ่ม *Bos taurus*, *Bos indicus* และ *Bos taurus* x *Bos indicus* อย่างไรก็ตามรูปแบบ allele อื่นเช่น  $A^3$  และ C สามารถพบได้ในบางสายพันธุ์

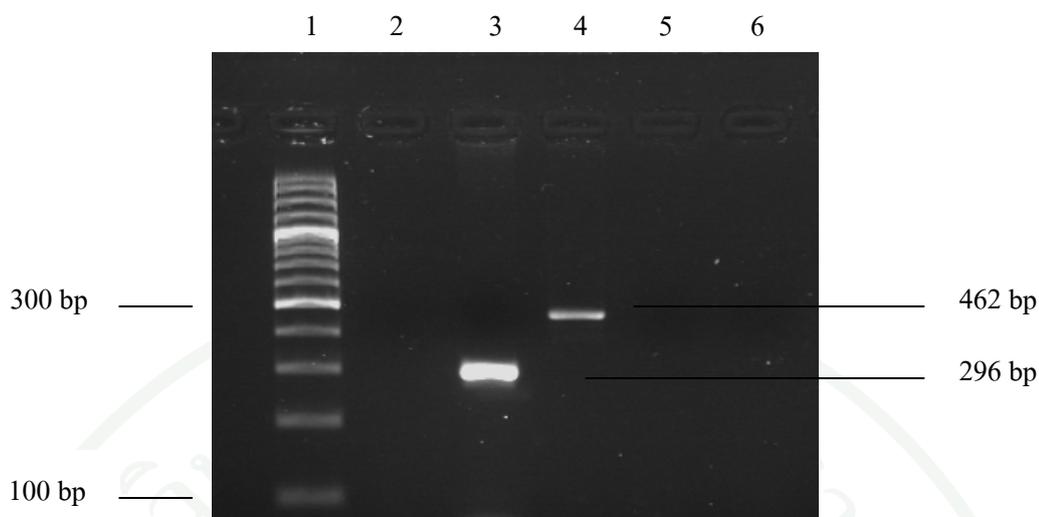
ในส่วนของรูปแบบ genotype พบ ทั้งหมด 5 รูปแบบคือ  $A^1A^1$ ,  $A^1A^2$ ,  $A^1B$ ,  $A^2A^2$  และ  $A^2B$  (ภาพที่ 6-10) ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง โดยกล่าวได้ว่า พันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์จากกลุ่มตัวอย่างของประเทศไทยที่ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ สามารถพบรูปแบบเหล่านี้ได้แม้ว่าจะเป็นกลุ่มตัวอย่างโคนมที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน ซึ่งให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับช่อทิพ (2546) ที่ทำการศึกษาในโคนมลูกผสม อาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มโคนมลูกผสมที่นิยมเลี้ยงกันอยู่ในประเทศไทยจะมีความหลากหลายของรูปแบบเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามโคนมลูกผสมในประเทศไทยไม่ได้เกิดจากการผสมกับพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียนเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีโคหลายสายพันธุ์ที่นำมาผสมกับโคพื้นเมืองเพื่อสร้างโคนมลูกผสม อาจทำให้เราสามารถพบรูปแบบ genotype อื่นๆ เช่นที่พบจากการศึกษาของ Comin et al. (2008) โดยพบรูปแบบ  $A^2A^3$  ซึ่งไม่พบในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้



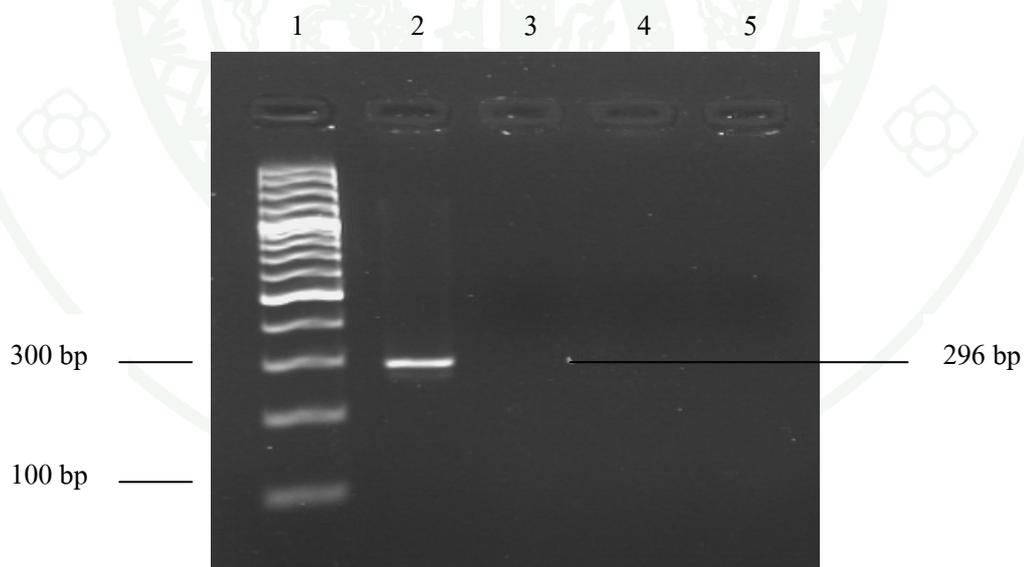
**ภาพที่ 6** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>, lane 1: marker 100 bp,  
 lane 2: คู่ primer BCN1/ BCN2 (-), lane 3: คู่ primer BCN1/BCN3 (+) 296 bp,  
 lane 4: คู่ primer BCN1/ BCNB (-), lane 5: คู่ primer BCNI5/ BCNC (-)  
 และ lane 6: คู่ primer BCN1/ BCNF (-)



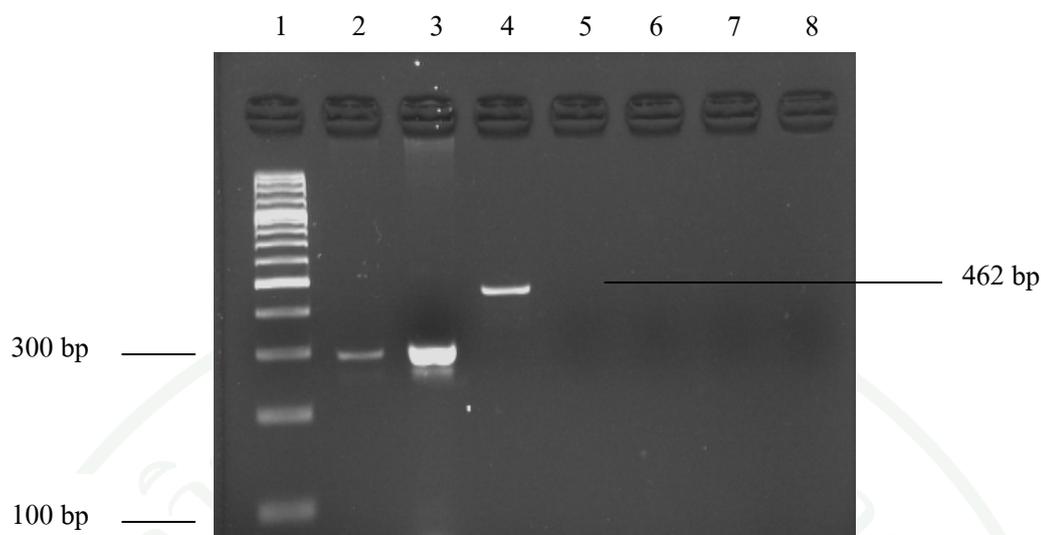
**ภาพที่ 7** รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A<sup>1</sup>A<sup>2</sup>, lane 1: marker 100 bp,  
 lane 2: คู่ primer BCN1/ BCN2 (+) 296 bp, lane 3: คู่ primer BCN1/ BCN3 (+) 296 bp,  
 lane 4: คู่ primer BCN1/ BCNB (-), lane 5: คู่ primer BCNI5/ BCNC (-),  
 lane 6: คู่ primer BCN1/ BCNF(-), lane 7: คู่ primer BCN1/ BCNA<sup>3</sup> (-)  
 และ lane 8: คู่ primer BCNI5/ BCNE (-)



ภาพที่ 8 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A<sup>1</sup>B, lane 1: marker 100 bp, lane 2: คู่ primer BCN1/ BCN2 (-), lane 3: คู่ primer BCN1/ BCN3 (+) 296 bp, lane 4: คู่ primer BCN1/ BCNB (+) 462 bp, lane 5: คู่ primer BCNI5/ BCNC (-) และ lane 6: คู่ primer BCN1/ BCNF (-)



ภาพที่ 9 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A<sup>2</sup>A<sup>2</sup>, lane 1: marker 100 bp, lane 2: คู่ primer BCN1/ BCN2 (+) 296 bp, lane 3: คู่ primer BCN1/ BCN3 (-), lane 4: คู่ primer BCN1/ BCNA<sup>3</sup> (-) และ lane 5: คู่ primer BCNI5/ BCNE (-)

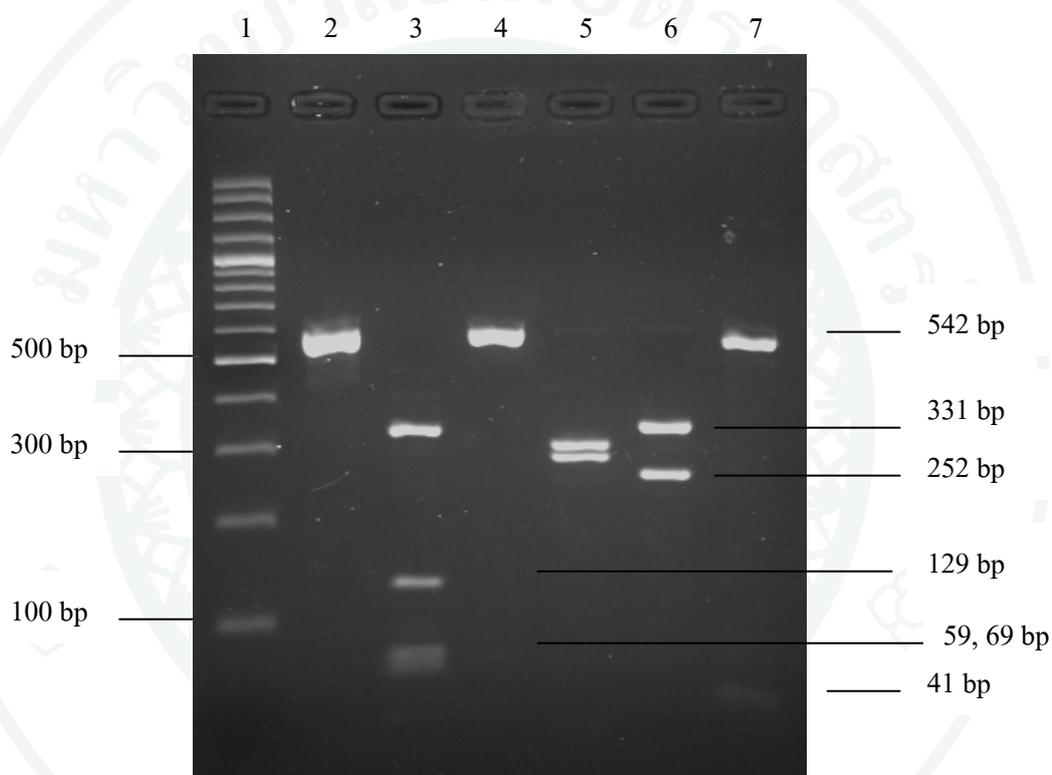


ภาพที่ 10 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype A<sup>2</sup>B

- lane 1: marker 100 bp,
- lane 2: คู่ primer BCN1/ BCN2 (+) 296 bp
- lane 3: คู่ primer BCN1/ BCN3 (+) 296 bp
- lane 4: คู่ primer BCN1/ BCNB (+) 462 bp
- lane 5: คู่ primer BCNI5/ BCNC (-)
- lane 6: คู่ primer BCN1/ BCNF(-)
- lane 7: คู่ primer BCN1/ BCNA<sup>3</sup> (-)
- lane 8: คู่ primer BCNI5/ BCNE (-)

ในส่วนของยีน  $\kappa$ -casein พบรูปแบบของ allele ทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ A, B และ E ของ ทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง และพบรูปแบบ genotype 5 รูปแบบในกลุ่มตัวอย่างที่ 1 คือ AA, AB, AE, BB และ BE (ภาพที่ 11-15) สำหรับในกลุ่มตัวอย่างที่ 2 พบเพียง 4 รูปแบบ ซึ่งไม่พบรูปแบบ BB ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากประชากรโคนมที่ศึกษามีการผสมพันธุ์กันไม่เป็นไปอย่างสุ่ม ซึ่งไม่เป็นไปตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก หรือเนื่องจากการถูกคัดทิ้งออกจากฝูง โดย genotype ทั้ง 5 รูปแบบที่พบนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ ช่อทิพ (2546) ที่ศึกษาในโคนมลูกผสม แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของรูปแบบ genotype เหล่านี้ยังคงเป็นเช่นเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า ทั้งรูปแบบ genotype AA, AB และรูปแบบ allele A และ B เป็นรูปแบบ พื้นฐานเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของนักวิจัยหลายคนซึ่งสามารถพบได้ทั้งในโคนมกลุ่ม *Bos taurus* (Bobe *et al.*, 1999; Ikonen *et al.*, 1999; Tsiaras *et al.*, 2005; Caroli *et al.*, 2008; Comin *et al.*, 2008) กลุ่ม *Bos indicus* (Jann *et al.*, 2004;

Rohallah *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2008) และกลุ่ม *Bos taurus* x *Bos indicus* (ช่อทิพ, 2546; Patel *et al.*, 2007) และจากการตรวจเอกสารเหล่านี้ยังพบอีกว่ารูปแบบ allele E พบได้ในบางสายพันธุ์ของโคนมกลุ่ม *Bos taurus* และ *Bos taurus* x *Bos indicus* ซึ่งยังไม่พบการศึกษาว่า allele E ปรากฏในโคนมกลุ่ม *Bos indicus* แสดงว่าในปัจจุบันรูปแบบ allele E พบเฉพาะในกลุ่ม *Bos taurus* เท่านั้น อย่างไรก็ตามโคพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่จัดอยู่ในกลุ่มโค *Bos indicus* ยังไม่มีการศึกษาเช่นกัน ดังนั้นหากทำการศึกษาอาจทำให้พบรูปแบบ allele E ได้



ภาพที่ 11 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype AA

lane 1: marker 100 bp

lane 2: 583 bp

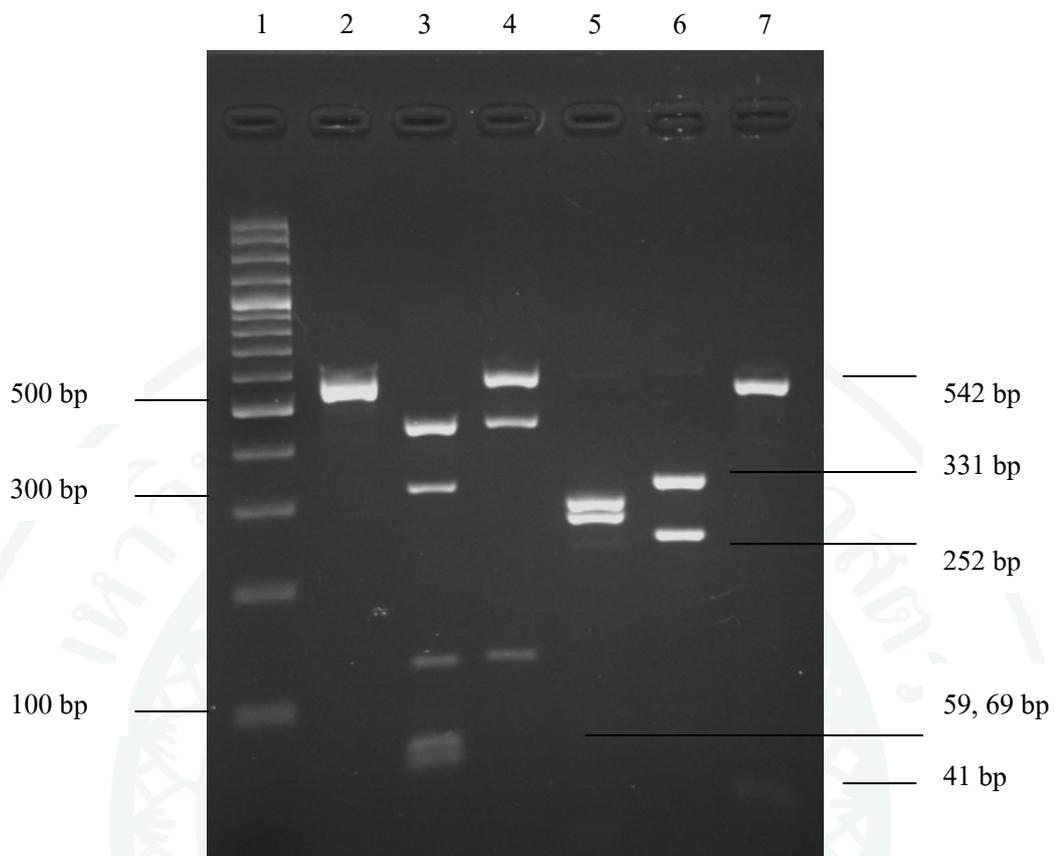
lane 3: *Hin*I 59, 69, 129, 326 bp

lane 4: *Hind*III 583 bp

lane 5: *Hpy*CH4IV 300, 283 bp

lane 6: *Hae*III 252, 331 bp

lane 7: *Hha*I 41, 542 bp



ภาพที่ 12 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype AB

lane 1: marker 100 bp

lane 2: 583 bp

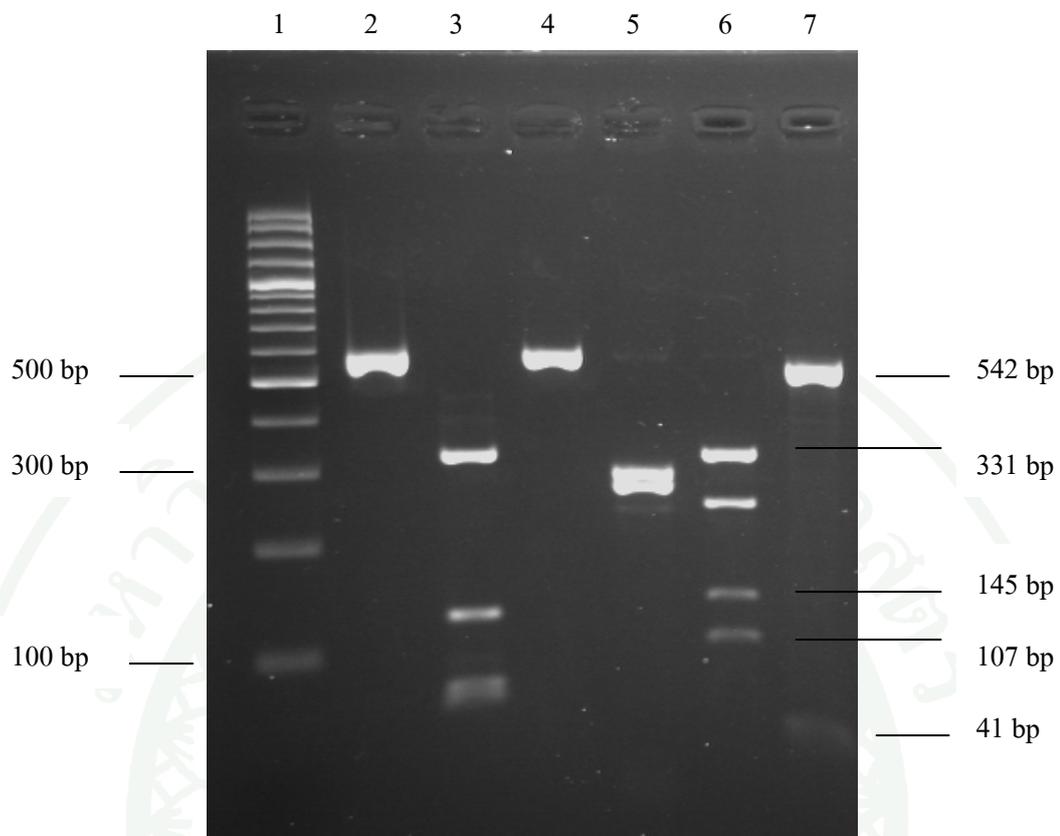
lane 3: *Hinf*I 59, 69, 129, 326 bp

lane 4: *Hind*III 131, 452 bp

lane 5: *Hpy*CH4IV 300, 283 bp

lane 6: *Hae*III 252, 331 bp

lane 7: *Hha*I 41, 542 bp



ภาพที่ 13 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype AE

lane 1: marker 100 bp

lane 2: 583 bp

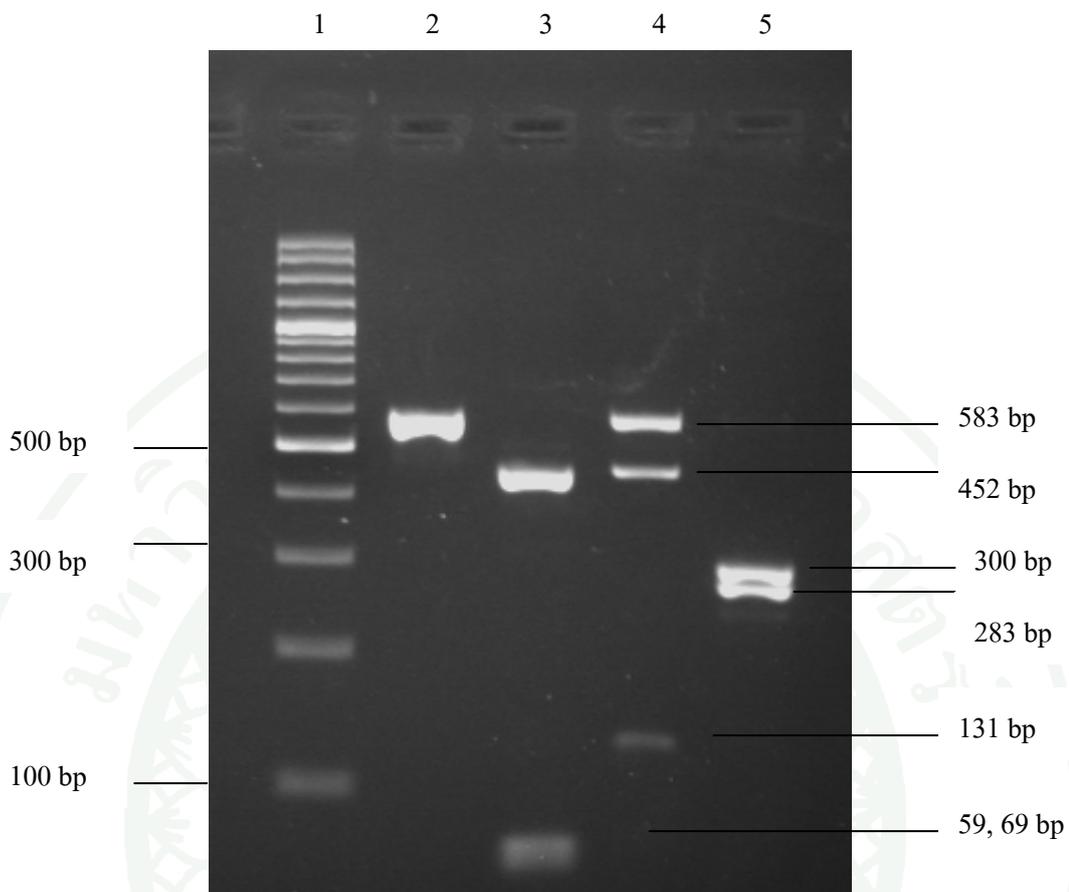
lane 3: *Hinf*I 59, 69, 129, 326 bp

lane 4: *Hind*III 583 bp

lane 5: *Hpy*CH4IV 300, 283 bp

lane 6: *Hae*III 107, 145, 331 bp

lane 7: *Hha*I 41, 542 bp



ภาพที่ 14 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype BB (ไม่ต้องตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III และ *Hha*I)

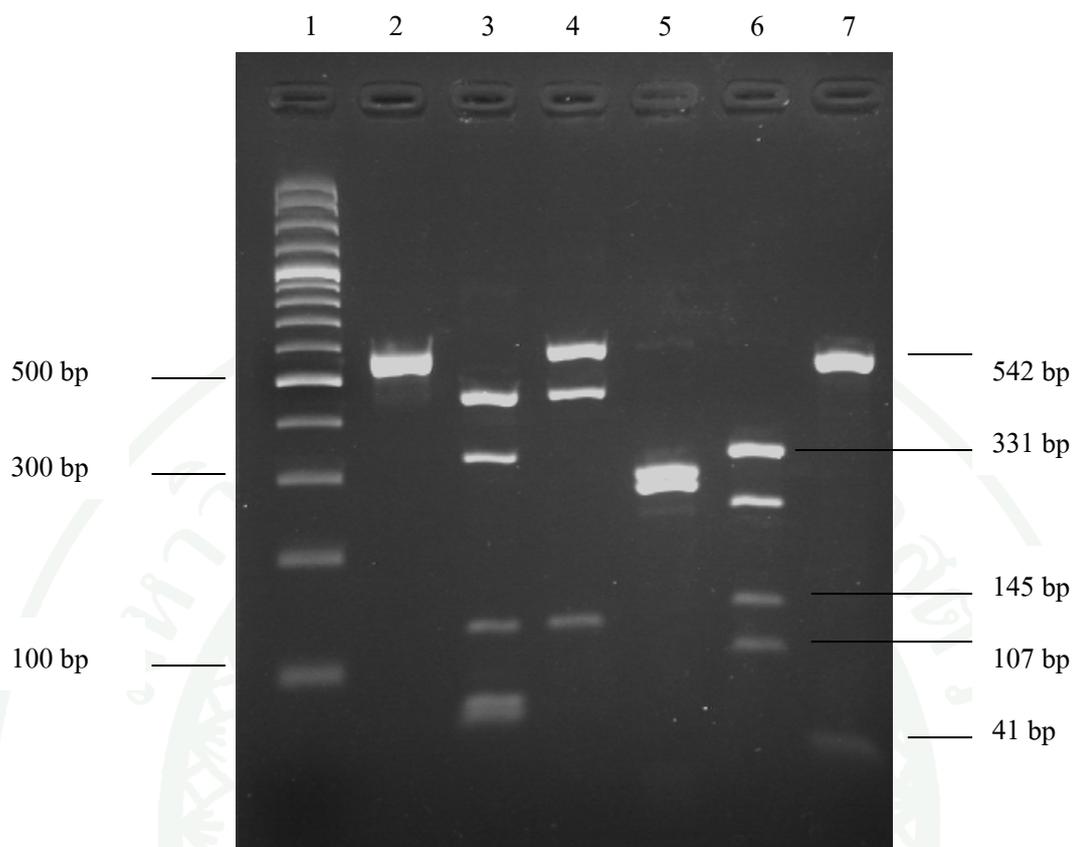
lane 1: marker 100 bp

lane 2: 583 bp

lane 3: *Hinf*I 59, 69, 455 bp

lane 4: *Hind*III 131, 452 bp

lane 5: *Hpy*CH4IV 300, 283 bp



ภาพที่ 15 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Genotype BE

lane 1: marker 100 bp, lane 2: 583 bp

lane 3: *Hinf*I 59, 69, 129, 326 bp

lane 4: *Hind*III 131, 452 bp

lane 5: *Hpy*CH4IV 300, 283 bp

lane 6: *Hae*III 107, 145, 331 bp

lane 7: *Hha*I 41, 542 bp

ในด้านรูปแบบ composite genotype ของยีน 2 ตำแหน่งนั้นพบรูปแบบที่หลากหลายมาก ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มระดับสายเลือด พบรูปแบบ composite genotype ที่ต่างกันซึ่งเกิดจากความถี่ของยีนแต่ละตำแหน่งต่างกัน โอกาสที่จะเกิดรูปแบบร่วมกันของยีน 2 ตำแหน่งนี้จึงแตกต่างกันไปด้วย ดังแสดงในตารางที่ 17

#### 4. ความถี่ gene หรือ allele, genotype และ composite genotype ของ $\beta$ -casein gene และ $\kappa$ -casein gene ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

##### 4.1 ความถี่ allele, genotype ของยีน $\beta$ -casein

จากการศึกษาพบว่า กลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกันของทั้ง 2 กลุ่ม พบความถี่ allele  $A^2$  และ genotype  $A^1A^2$  สูงที่สุด (ตารางที่ 15) ซึ่งผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับ ซ่อทิพ (2546) (*Bos taurus* x *Bos indicus*) Jann *et al.* (2004) (*Bos indicus*) Caroli *et al.* (2008); Comin *et al.* (2008) (*Bos taurus*) ส่วนการศึกษาของ Ikonen *et al.* (1999) (*Bos taurus*) แม้ว่าผลการศึกษาจะไม่เหมือนกับการศึกษาครั้งนี้แต่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย กล่าวคือ รูปแบบ allele  $A^1$  เป็นรูปแบบที่มีความถี่สูงสุด แต่ก็มีค่าสูงกว่ารูปแบบ allele  $A^2$  เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่ายีนตำแหน่งนี้มี allele  $A^2$  และ genotype  $A^1A^2$  เป็น allele และ genotype พื้นฐานที่มีความถี่สูงที่สุดทั้งโคนมกลุ่ม *Bos Taurus*, *Bos indicus* และ *Bos taurus* x *Bos indicus*

##### 4.2 ความถี่ allele, genotype ของยีน $\kappa$ -casein

จากการศึกษาพบว่าทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ มีความถี่ allele A สูงที่สุดและความถี่ genotype AA สูงที่สุดในขณะที่ genotype AE, BB และ BE เป็นกลุ่มที่มีความถี่ต่ำ (ตารางที่ 16) ข้อมูลนี้สามารถบอกได้ว่าโคนมลูกผสมโฮลสไตน์แม้ว่าจะมีระดับสายเลือดที่ต่างกันก็ไม่ได้ทำให้ความถี่ยีนเปลี่ยนแปลงทิศทางไป ความถี่ allele A ที่สูงที่สุดนี้ให้ผลสอดคล้องกับ ซ่อทิพ (2546); Patel *et al.* (2007); Azevedo *et al.* (2008) (*Bos taurus* x *Bos indicus*) Bobe *et al.* (1999); Ikonen *et al.* (1999); Tsiaras *et al.* (2005); Comin *et al.* (2008) (*Bos taurus*) Azevedo *et al.* (2008) (*Bos indicus*) ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ารูปแบบ allele A เป็น allele พื้นฐานที่พบความถี่สูงที่สุดได้ทั้งโคนมกลุ่ม *Bos taurus*, *Bos indicus* และ *Bos taurus* x *Bos indicus* อย่างไรก็ตามยังพบอีกว่าในกลุ่มของ *Bos indicus* และ *Bos taurus* x *Bos indicus* มีความถี่ genotype AB สูงที่สุดเช่นกันในบางสายพันธุ์ เช่น จากการรายงานของ Rohallah *et al.* (2007); Azevedo *et al.* (2008) ที่ทำการศึกษาใน *Bos indicus* และจากการศึกษาของ Patel *et al.* (2007) ที่ศึกษาใน *Bos taurus* x *Bos indicus* ส่วนใน *Bos taurus* ไม่พบการรายงานว่า genotype AB มีความถี่สูงสุด

#### 4.3 ความถี่ composite genotype ของยีน $\beta$ และ $\kappa$ -casein

ความถี่ของ composite genotype ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง พบรูปแบบ  $A^1A^2AA$  มีความถี่สูงที่สุด (ตารางที่ 17) สอดคล้องกับการศึกษาของ ซ่อทิว (2546) แต่ตรงข้ามกับการศึกษาของ Ikonen *et al.* (1999) และ Comin *et al.* (2008) เนื่องจากรูปแบบของ allele หรือ genotype ของยีนทั้ง 2 ตำแหน่งพบรูปแบบและความถี่ยีนที่แตกต่างกันย่อมทำให้เกิดรูปแบบของ composite genotype ที่หลากหลายและมีความถี่ที่แตกต่างกัน

#### 4.4 ความถี่ของ allele และ genotype ที่เปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญของความถี่ allele และ genotype ของยีน 2 ตำแหน่งในทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน (ตารางที่ 15 และ 16) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มระดับสายเลือดที่สูงขึ้นนั้นไม่ได้ทำให้รูปแบบและความถี่ของยีนในแต่ละตำแหน่งเปลี่ยนแปลงไป

ถึงแม้จะพบว่าการมีรูปแบบยีนที่เหมือนกันและมีความถี่ยีนที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งในกลุ่มโค *Bos taurus*, *Bos indicus* และ *Bos taurus* x *Bos indicus* ก็ตาม ไม่จำเป็นว่าจะต้องมีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำนมที่เหมือนกัน เพราะในแต่ละกลุ่มหรือสายพันธุ์ที่ต่างกัน อาจมีชุดยีนหรือ โครงสร้างของยีนที่ต่างกันด้วยนอกจากยีนตำแหน่งที่ทำการศึกษารั้งนี้และมีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำนมได้เช่นกัน จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่กลุ่มตัวอย่าง โคนมลูกผสม โฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดที่แตกต่างกัน โดยการเพิ่มสายเลือดของพันธุ์โฮลสไตน์ที่สูงขึ้นนั้น แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างของรูปแบบและความถี่ยีนก็ตาม โครงสร้างยีนหรือชุดยีนของพันธุ์โฮลสไตน์ที่มีเปอร์เซ็นต์เลือดที่สูงขึ้นนั้นอาจส่งผลให้รูปแบบยีนที่เหมือนกันของยีน 2 ตำแหน่งนี้มีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำนมที่แตกต่างกันได้

ตารางที่ 15 ความถี่ gene, genotype และ P-value ของความแตกต่างของความถี่ gene และ genotype ของยีน  $\beta$ -casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ 2 กลุ่ม คือ G1 ( $\leq 87.5\%$  HF) และ G2 ( $> 87.5\%$  HF)

Breed groups	Genotypic frequency					Gene frequency		
	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	A <sup>1</sup> B	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	A <sup>2</sup> B	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	B
G1 (n = 89)	0.056 (5)	0.528 (47)	0.034 (3)	0.315 (28)	0.067 (6)	0.337	0.612	0.051
G2 (n = 142)	0.056 (8)	0.606 (86)	0.007 (1)	0.268 (38)	0.063 (9)	0.363	0.602	0.035
P-value	0.6508 (S.E.= 0.0003)					0.5978 (S.E.= 0.0002)		

ตารางที่ 16 ความถี่ gene, genotype และ P-value ของความแตกต่างของความถี่ gene และ genotype ของยีน  $\kappa$ -casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ 2 กลุ่ม คือ G1 ( $\leq 87.5\%$  HF) และ G2 ( $> 87.5\%$  HF)

Breed groups	Genotypic frequency					Gene frequency		
	AA	AB	AE	BB	BE	A	B	E
G1 (n = 89)	0.584 (52)	0.359 (32)	0.023 (2)	0.023 (2)	0.011 (1)	0.775	0.208	0.017
G2 (n = 142)	0.563 (80)	0.338 (48)	0.078 (11)	- (0)	0.021 (3)	0.771	0.180	0.049
P-value	0.1634 (S.E.= 0.0002)					0.1157 (S.E.= 0.0002)		

ตารางที่ 17 ความถี่ composite genotype ระหว่างยีน  $\beta$  และ  $\kappa$  casein ของกลุ่มตัวอย่างโคนม  
ลูกผสมโฮลสไตน์ 2 กลุ่ม คือ G1 ( $\leq 87.5\%HF$ ) และ G2 ( $> 87.5\% HF$ )

$\beta$ - $\kappa$ genotype	Frequency	$\beta$ - $\kappa$ genotype	Frequency
G1 (n = 89)		G2 (n = 142)	
A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> AA (n=2)	0.023	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> AA (n=5)	0.035
A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> AB (n=1)	0.011	-	-
A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> AE (n=1)	0.011	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> AE (n=1)	0.007
A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> BE (n=1)	0.011	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup> BE (n=2)	0.014
A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA (n=31)	0.348	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA (n=54)	0.380
A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB (n=15)	0.169	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB (n=21)	0.148
A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AE (n=1)	0.011	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AE (n=10)	0.070
-	-	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> BE (n=1)	0.007
A <sup>1</sup> BAB (n=1)	0.011	A <sup>1</sup> BAB (n=1)	0.007
A <sup>1</sup> BBB (n=2)	0.023	-	-
A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AA (n=19)	0.214	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AA (n=21)	0.148
A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AB (n=9)	0.101	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AB (n=17)	0.120
A <sup>2</sup> BAB (n=6)	0.067	A <sup>2</sup> BAB (n=9)	0.064
Total	1	Total	1

5. ความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ระหว่างตำแหน่งของยีน  $\beta$ -casein และ  $\kappa$  casein ของ  
กลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

ผลการทดสอบความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ระหว่างตำแหน่งของยีน  $\beta$ -casein และ  $\kappa$ -casein พบว่า มี linkage disequilibrium อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.0001$ ) ในโคนมทั้ง 2 กลุ่ม ตัวอย่าง ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบของยีนต่อลักษณะที่สนใจจึงควรพิจารณา ยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ควบคู่กันไป

## 6. ความสัมพันธ์ของระดับสายเลือดของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์กับรูปแบบ genotype และ composite genotype ของยีน $\beta$ และ $\kappa$ -casein

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของกลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกัน 2 กลุ่ม กับรูปแบบ genotype และ composite genotype ของยีนทั้งสองนั้น ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลในเรื่องการเปรียบเทียบความถี่ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าในแต่ละกลุ่มระดับสายเลือดมีโอกาสที่จะพบได้ทุกรูปแบบ genotype และ composite genotype

## 7. อิทธิพลของรูปแบบของยีน $\beta$ และ $\kappa$ -casein ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมของกลุ่มโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน

เนื่องจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ linkage disequilibrium พบว่ายีนทั้ง 2 ตำแหน่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการศึกษาอิทธิพลที่มีต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำมนั้น ควรศึกษาในรูปแบบของ composite genotype อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังคงมีการวิเคราะห์ค่าอิทธิพลของ allele และ genotype ทั้งนี้เพื่อความเข้าใจในบทบาทของรูปแบบ allele และ genotype ต่างๆต่ออิทธิพลของรูปแบบ composite genotype

### 7.1 อิทธิพลของ allele รูปแบบต่างๆ ของยีน $\beta$ และ $\kappa$ -casein

จากการศึกษาผลของ allele effect ของยีน  $\beta$ -casein (ตารางที่ 18) พบรูปแบบ allele ทั้งหมดของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง มีทิศทางของอิทธิพลไปในทางบวกและในทางลบเหมือนกัน ซึ่งปรากฏผลเช่นเดียวกันกับยีน  $\kappa$ -casein (ตารางที่ 19) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอิทธิพลของ allele รูปแบบต่างๆ พร้อมๆ กับอิทธิพลของ genotype (ตารางที่ 18, 19) จะเห็นว่า อิทธิพลของ allele ไม่สอดคล้องกับอิทธิพลของ genotype กล่าวคือ allele effect ที่เป็นรูปแบบเดียวกันเมื่อเข้าสู่อยู่ในสภาพ genotype แล้วควรจะมีอิทธิพลในทิศทางเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ในตำแหน่งของยีน  $\beta$ -casein (ตารางที่ 18) รูปแบบ  $A^1$  ในทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง พบอิทธิพลในทางบวกกับ MY และทุกลักษณะของปริมาณองค์ประกอบน้ำนม แต่เมื่อเข้าสู่อยู่ในสภาพ genotype ที่มีรูปแบบเป็น  $A^1A^1$  กลับให้อิทธิพลที่เป็นลบ หรือในกรณีของรูปแบบ  $A^2$  ในกลุ่มตัวอย่างที่ 1 พบอิทธิพลในทางบวกกับปริมาณ Fat (g) เมื่ออยู่ในรูปแบบ  $A^2A^2$  กลับให้อิทธิพลเป็นลบ ส่วนในตำแหน่งของยีน

$\kappa$ -casein ก็เช่นกัน (ตารางที่ 19) รูปแบบ A ในกลุ่มตัวอย่างที่ 1 พบอิทธิพลในทางบวกกับ %SNF เมื่ออยู่ในรูปแบบ AA กลับให้อิทธิพลเป็นลบ หรืออีกกรณีหนึ่งรูปแบบ A และ B ในกลุ่มตัวอย่างที่ 1 พบว่าทั้ง 2 รูปแบบมีอิทธิพลในทางบวกกับลักษณะ %SNF และปริมาณ Lactose (g) เมื่ออยู่ในรูปแบบ AB กลับให้อิทธิพลในทางลบ ผลการศึกษา allele effect ที่พบความผิดปกติเช่นนี้พบได้เช่นเดียวกันจากการศึกษาของ Ojala *et al.*, 1997 และ Ikonen *et al.*, 1999 ดังนั้นการศึกษา allele effect ในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลแสดงให้เห็นว่า การพิจารณาอิทธิพลของ allele ในรูปแบบต่างๆ ของยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ใช้ในการคัดเลือกนั้นยังไม่เหมาะสม เนื่องจากอาจให้ผลที่ผิดพลาดได้

จากที่กล่าวข้างต้นถึงการพบความสัมพันธ์ linkage disequilibrium ระหว่างยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง ดังนั้นจะไม่ขอก้าวในประเด็นของอิทธิพลของรูปแบบ genotype ต่างๆ ของยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม แต่จะใช้ในการอธิบายผลของ epistasis effect ระหว่างยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ที่จะนำไปสู่การแสดงอิทธิพลของรูปแบบ composite genotype ต่างๆ ในลำดับต่อไป

## 7.2 อิทธิพลของ composite genotype รูปแบบต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบทิศทางของอิทธิพลของ composite genotype รูปแบบต่างๆ ต่อลักษณะที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 20) ระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง พบว่า composite genotype รูปแบบ  $A^1A^2AA$  และ  $A^2A^2AA$  มีทิศทางของอิทธิพลไปในทางเดียวกันของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง ในขณะที่รูปแบบ  $A^1A^2AB$  และ  $A^2A^2AB$  นั้น จะให้ทิศทางของอิทธิพลที่แตกต่างกันในบางลักษณะ

สำหรับในประเด็นของการพบอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มในแต่ละรูปแบบ composite genotype จะเห็นได้ว่ามีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่แตกต่างกันระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง และยังพบอีกว่าการมีอิทธิพลในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเกิดขึ้นกับลักษณะ MY และทุกลักษณะของปริมาณองค์ประกอบน้ำนมเท่านั้น ในขณะที่การมีอิทธิพลในทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเกิดขึ้นกับลักษณะเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนมเท่านั้นเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำนมและปริมาณองค์ประกอบน้ำนมที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ลักษณะเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนมลดลงซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่างๆ ดังการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 14)

ทั้งในประเด็นทิศทางของอิทธิพลและการมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละรูปแบบ composite genotype ที่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกันระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง ผลที่ปรากฏเช่นนี้สามารถกล่าวได้ว่า กลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันจากการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตัวอย่างส่งผลต่อทิศทางของอิทธิพลและการมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นกลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและควรคำนึงถึง จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เกิดแนวคิดว่าหากทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของรูปแบบยีนต่างๆ ต่อลักษณะที่สนใจหรือนำไปสู่การประยุกต์ใช้เป็น genetic marker นั้น เมื่อทำการศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างโคนมที่เป็นลูกผสมควรตระหนักถึงกลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันด้วย

การศึกษอิทธิพลของยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ต่อลักษณะ MY และองค์ประกอบน้ำนม ในครั้งนี้ ในด้านของการที่จะนำรูปแบบ composite genotype ไปใช้เป็น genetic marker ในการคัดเลือก เพื่อแก้ปัญหาหน้ามดิมมี %SNF ต่ำ โดยการที่จะเพิ่ม %Protein ด้วยศักยภาพของยีน 2 ตำแหน่งนี้ แต่กลับพบว่าในแต่ละรูปแบบของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 20) มีอิทธิพลไปในทิศทางลบกับ %Protein ซึ่งพบได้กับรูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$  (ยกเว้นกลุ่มตัวอย่างที่ 1) และ  $A^2A^2AA$  ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง หรือหากมีอิทธิพลไปในทิศทางบวกก็พบขนาดของอิทธิพลที่ต่ำมาก (+0.01 ถึง +0.08) และไม่พบการมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบได้กับรูปแบบ  $A^1A^2AB$  ของกลุ่มตัวอย่างที่ 2 และรูปแบบ  $A^2A^2AB$  ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ ซ่อทิว (2546) ที่ใช้กลุ่มตัวอย่างของโคนมลูกผสมเช่นกัน ก็พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันดังนี้คือ รูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$ ,  $A^2A^2AA$  และ  $A^2A^2AB$  มีขนาดของอิทธิพลเท่ากับ 0.00, +0.034, -0.039 และ -0.017 ตามลำดับ และการศึกษาของ Ikonen *et al.* (1999) ก็พบว่าให้ผลที่สอดคล้องเช่นกันคือ รูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$ ,  $A^2A^2AA$  และ  $A^2A^2AB$  มีขนาดของอิทธิพลเท่ากับ -0.01, +0.02, 0.00 และ -0.01 ตามลำดับ และที่เห็นได้ชัดกับการศึกษาครั้งนี้ถึงอิทธิพลต่อ %SNF คือ การพบว่าในทุก รูปแบบ composite genotype นั้นมีอิทธิพลไปในทิศทางลบทั้งหมดของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยคิดว่าการนำรูปแบบ composite genotype ไปใช้เป็น genetic marker ในการคัดเลือก เพื่อแก้ปัญหา %SNF ต่ำ โดยการที่จะเพิ่ม %Protein ด้วยศักยภาพของยีน 2 ตำแหน่งนี้ ยังไม่สามารถทำได้

ผลการศึกษาเพิ่มเติมในด้านความสัมพันธ์ของ %Protein และ %SNF ที่ผ่านมาตรฐาน กับรูปแบบ composite genotype นั้น พบว่ารูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$  และ  $A^2A^2AB$  มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับ %Protein และ %SNF ที่ผ่านมาตรฐาน

เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามค่าประมาณและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่ได้ของรูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$  และ  $A^2A^2AB$  ของ %Protein ที่ผ่านมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ -0.47 (0.09), -0.26 (0.12) และ 0.42 (0.16) ตามลำดับ และค่าประมาณที่ได้ของรูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$  และ  $A^2A^2AB$  ของ %SNF ที่ผ่านมาตรฐานมีค่าเท่ากับ -0.44 (0.09), -0.28 (0.12) และ 0.34 (0.16) ตามลำดับ ซึ่งมีทิศทางที่สอดคล้องกับค่าประมาณโดยวิธี ordinary least square (OLS) ดังแสดงในตารางที่ 20 ถึงแม้ว่าจะพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ %Protein และ %SNF ที่ผ่านมาตรฐาน กับรูปแบบ composite genotype แต่พบว่าค่าประมาณที่ได้เป็นลบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มระดับสายเลือด, ฟุง-ปี-ฤดูกาล, ลำดับครั้งที่ให้นมและจำนวนวันที่ให้นมหลังคลอดมีผลต่อการทำให้ %Protein และ %SNF มีค่าที่ผ่านมาตรฐานด้วยเช่นกัน

#### 8. อิทธิพลของการข่มกันระหว่างยีนที่อยู่ต่างตำแหน่ง (epistasis effect) หรืออิทธิพลร่วมระหว่างยีน (gene interaction) ต่างตำแหน่ง

จากการศึกษาครั้งนี้ ในด้านของอิทธิพลของการข่มกันระหว่างยีนที่อยู่ต่างตำแหน่ง (epistasis effect) หรืออิทธิพลร่วมระหว่างยีน (gene interaction) ต่างตำแหน่ง โดยภาพรวมจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า รูปแบบ genotype  $A^1A^2$  และ  $A^2A^2$  ของตำแหน่งยีน  $\beta$ -casein (ตารางที่ 18) มีอิทธิพลในทิศทางลบกับเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนมของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง ในขณะที่รูปแบบ genotype AA และ AB ของตำแหน่งยีน  $\kappa$ -casein (ตารางที่ 19) มีอิทธิพลโดยรวมในทิศทางบวกกับเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนมของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง เมื่อรูปแบบยีนของทั้ง 2 ตำแหน่ง มีปฏิกริยาร่วมกัน ซึ่งทำให้พบว่ารูปแบบ  $A^1A^2AA$ ,  $A^1A^2AB$ ,  $A^2A^2AA$  และ  $A^2A^2AB$  ที่เป็นรูปแบบของ composite genotype นั้น (ตารางที่ 20) ให้ผลของอิทธิพลไปในทิศทางลบของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างเช่นกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่า ตำแหน่งของยีน  $\beta$ -casein สามารถข่มการแสดงออกของตำแหน่งยีน  $\kappa$ -casein ได้

**ตารางที่ 18** ค่าอิทธิพลและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE.) ของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆของ ยีนเบต้าเคซีนต่อปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนม

Traits	Allele effect						Genotype effect					
	A <sup>1</sup>		A <sup>2</sup>		B	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>		A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>		A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>		A <sup>2</sup> B
	G1	G2	G1	G2	G1, G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1, G2
MY, kg	0.68 *	0.99 *	0.84 **	0.87	0.00	-1.20 *	-0.72	0.56	1.37 **	0.35	0.81	0.00
SE.	(0.30)	(0.46)	(0.29)	(0.45)		(0.58)	(0.81)	(0.43)	(0.49)	(0.45)	(0.53)	
%Fat	-0.26 ***	-0.19 **	-0.24 ***	-0.15 *	0.00	-0.58 ***	-0.35 *	-0.23 **	-0.25 **	-0.28 **	-0.15	0.00
SE.	(0.06)	(0.08)	(0.06)	(0.08)		(0.12)	(0.13)	(0.09)	(0.08)	(0.09)	(0.09)	
%Protein	-0.10 **	-0.16 ***	-0.07 *	-0.12 **	0.00	-0.33 ***	-0.14 *	-0.04	-0.15 ***	-0.01	-0.01	0.00
SE.	(0.03)	(0.04)	(0.03)	(0.04)		(0.06)	(0.07)	(0.04)	(0.04)	(0.05)	(0.05)	
%Lactose	-0.08 **	-0.02	-0.06 *	-0.03	0.00	-0.11	0.13	-0.18 ***	-0.01	-0.16 ***	-0.04	0.00
SE.	(0.03)	(0.05)	(0.03)	(0.05)		(0.06)	(0.08)	(0.04)	(0.05)	(0.04)	(0.05)	
%SNF	-0.16 ***	-0.23 ***	-0.12 **	-0.19 ***	0.00	-0.37 ***	-0.15	-0.23 ***	-0.20 ***	-0.14 *	-0.09	0.00
SE.	(0.04)	(0.06)	(0.04)	(0.06)		(0.08)	(0.10)	(0.06)	(0.06)	(0.06)	(0.07)	
%TS	-0.42 ***	-0.40 ***	-0.37 ***	-0.32 **	0.00	-1.00 ***	-0.49 *	-0.48 ***	-0.43 ***	-0.47 ***	-0.20	0.00
SE.	(0.09)	(0.11)	(0.09)	(0.11)		(0.17)	(0.20)	(0.13)	(0.12)	(0.13)	(0.13)	

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Traits	Allele effect						Genotype effect					
	A <sup>1</sup>		A <sup>2</sup>		B	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>		A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>		A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>		A <sup>2</sup> B
	G1	G2	G1	G2	G1, G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1, G2
Fat, g	3.27	21.85	9.95	21.83	0.00	-87.33 ***	-48.44	2.90	31.76	-8.50	24.64	0.00
SE.	(11.20)	(16.13)	(10.83)	(15.95)		(21.65)	(28.87)	(15.97)	(17.49)	(16.92)	(18.98)	
Protein, g	10.47	17.26	17.47 *	16.37	0.00	-64.43 ***	-23.06	11.34	30.78 *	8.32	26.90	0.00
SE.	(9.09)	(13.49)	(8.77)	(13.34)		(17.50)	(23.99)	(12.84)	(14.53)	(13.60)	(15.71)	
Lactose, g	24.88	49.07 *	34.20 *	41.61 *	0.00	-68.13 *	-8.37	7.88	69.40 **	0.60	40.35	0.00
SE.	(14.69)	(20.66)	(14.18)	(20.43)		(28.44)	(36.55)	(20.86)	(22.14)	(22.08)	(23.96)	
SNF, g	40.59	67.97	58.25 *	60.77	0.00	-135.83 **	-56.14	21.64	104.64 **	10.53	72.92	0.00
SE.	(25.63)	(37.43)	(24.77)	(37.02)		(49.46)	(66.37)	(36.46)	(40.20)	(38.64)	(43.62)	
TS, g	45.60	89.20	69.38 *	80.56	0.00	-221.53 **	-105.25	27.60	134.85 *	4.59	89.29	0.00
SE.	(35.25)	(52.21)	(34.04)	(51.63)		(68.17)	(92.80)	(50.00)	(56.21)	(52.92)	(60.76)	

หมายเหตุ \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001), G1 = กลุ่มตัวอย่างที่ 1, G2 = กลุ่มตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ 19 ค่าอิทธิพลและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE.) ของ allele และ genotype รูปแบบต่างๆของ ยีนแคปป์าเคซีนต่อปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนม

Traits	Allele effect					Genotype effect				
	A		B		E	AA		AB		AE
	G1	G2	G1	G2	G1, G2	G1	G2	G1	G2	G1, G2
MY, kg	1.04 *	0.45	0.40	-0.45	0.00	0.99	0.75	0.33	-0.77	0.00
SE.	(0.50)	(0.40)	(0.52)	(0.43)		(0.57)	(0.46)	(0.59)	(0.48)	
%Fat	0.37 ***	0.06	0.50 ***	0.11	0.00	0.24 *	0.11	0.41 ***	0.16 *	0.00
SE.	(0.10)	(0.07)	(0.11)	(0.07)		(0.12)	(0.08)	(0.12)	(0.08)	
%Protein	0.17 ***	0.06	0.24 ***	0.10 **	0.00	0.05	0.08	0.16 **	0.13 **	0.00
SE.	(0.05)	(0.04)	(0.05)	(0.04)		(0.06)	(0.04)	(0.06)	(0.04)	
%Lactose	-0.08	-0.02	-0.10	0.02	0.00	-0.09	-0.02	-0.14 *	0.04	0.00
SE.	(0.05)	(0.04)	(0.05)	(0.04)		(0.06)	(0.05)	(0.06)	(0.05)	
%SNF	0.02	0.08	0.06	0.15 **	0.00	-0.13	0.09	-0.07	0.19 ***	0.00
SE.	(0.07)	(0.05)	(0.08)	(0.05)		(0.08)	(0.06)	(0.08)	(0.06)	
%TS	0.42 **	0.17	0.59 ***	0.29 **	0.00	0.13	0.24 *	0.38 *	0.38 **	0.00
SE.	(0.15)	(0.10)	(0.15)	(0.11)		(0.17)	(0.12)	(0.17)	(0.12)	

ตารางที่ 19 (ต่อ)

Traits	Allele effect						Genotype effect			
	A		B		E	AA		AB		AE
	G1	G2	G1	G2	G1, G2	G1	G2	G1	G2	G1, G2
Fat, g	72.80 ***	22.35	63.24 **	-4.16	0.00	62.73 **	35.41 *	56.33 **	-11.29	0.00
SE.	(18.76)	(14.35)	(19.32)	(15.26)		(21.23)	(16.47)	(21.72)	(16.97)	
Protein, g	47.44 **	20.25	35.72 *	-0.82	0.00	35.18 *	31.51 *	27.67	-6.21	0.00
SE.	(15.35)	(11.93)	(15.81)	(12.67)		(17.38)	(13.72)	(17.78)	(14.13)	
Lactose, g	39.92	22.00	7.06	-15.70	0.00	37.64	37.54	-1.09	-27.26	0.00
SE.	(24.42)	(18.22)	(25.15)	(19.35)		(27.93)	(20.93)	(28.57)	(21.54)	
SNF, g	84.06 *	51.87	33.07	-14.94	0.00	67.75	80.08 *	14.49	-35.30	0.00
SE.	(42.59)	(33.06)	(43.87)	(35.15)		(48.51)	(37.95)	(49.64)	(39.11)	
TS, g	159.6 **	71.61	101.05	-20.09	0.00	131.73	112.48 *	75.70	-46.96	0.00
SE.	(59.16)	(46.25)	(60.93)	(49.12)		(67.28)	(53.01)	(68.84)	(54.55)	

หมายเหตุ \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001), G1 = กลุ่มตัวอย่างที่ 1, G2 = กลุ่มตัวอย่างที่ 2

ตารางที่ 20 ค่าอิทธิพลและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE.) ของ composite genotype รูปแบบต่างๆต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

Traits	Composite genotype effect									
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA		A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB		A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AA		A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AB		A <sup>2</sup> BAB	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1, G2	
MY, kg	0.73	1.90 ***	0.08	0.61	0.70	2.10 ***	-0.47	-0.36	0.00	
SE.	(0.44)	(0.05)	(0.86)	(0.53)	(0.49)	(0.57)	(0.54)	(0.58)		
%Fat	-0.27 **	-0.24 **	-0.07	-0.27 **	-0.29 **	-0.19	-0.22 *	-0.12	0.00	
SE.	(0.09)	(0.09)	(0.10)	(0.09)	(0.10)	(0.10)	(0.11)	(0.10)		
%Protein	-0.07	-0.15 **	0.04	-0.15 **	-0.46	-0.01	0.08	0.01	0.00	
SE.	(0.05)	(0.04)	(0.05)	(0.05)	(0.05)	(0.05)	(0.06)	(0.05)		
%Lactose	-0.17 ***	-0.03	-0.27 ***	0.03	-0.19 ***	-0.09	-0.14 **	0.01	0.00	
SE.	(0.04)	(0.05)	(0.05)	(0.05)	(0.05)	(0.06)	(0.05)	(0.06)		
%SNF	-0.22 ***	-0.20 **	-0.22 **	-0.16 *	-0.19 **	-0.14	-0.03	-0.03	0.00	
SE.	(0.06)	(0.06)	(0.07)	(0.07)	(0.07)	(0.07)	(0.08)	(0.07)		
%TS	-0.52 ***	-0.42 ***	-0.30 *	-0.41 **	-0.53 ***	-0.28	-0.29	-0.11	0.00	
SE.	(0.13)	(0.13)	(0.14)	(0.14)	(0.14)	(0.15)	(0.16)	(0.15)		

ตารางที่ 20 (ต่อ)

Traits	Composite genotype effect									
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AA		A <sup>1</sup> A <sup>2</sup> AB		A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AA		A <sup>2</sup> A <sup>2</sup> AB		A <sup>2</sup> BAB	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1, G2	
Fat, g	4.42	51.32 **	5.56	4.04	3.14	61.79 **	-31.77	-7.75	0.00	
SE.	(16.51)	(17.87)	(18.53)	(19.10)	(18.27)	(20.55)	(20.29)	(20.98)		
Protein, g	13.54	46.63 **	7.90	10.59	16.18	60.25 ***	-7.24	-2.03	0.00	
SE.	(13.34)	(14.84)	(14.97)	(15.87)	(14.73)	(16.99)	(16.40)	(17.30)		
Lactose, g	18.04	92.28 ***	-25.09	38.73	16.24	93.26 ***	-39.07	-6.36	0.00	
SE.	(21.46)	(22.58)	(24.10)	(24.15)	(23.70)	(25.91)	(26.40)	(26.38)		
SNF, g	35.66	150.22 **	-20.01	44.82	38.44	170.25 **	-54.23	-12.08	0.00	
SE.	(37.62)	(41.01)	(42.22)	(43.85)	(41.62)	(47.16)	(46.24)	(48.16)		
TS, g	42.05	197.10 **	-8.92	52.09	40.97	223.55 **	-77.08	-28.32	0.00	
SE.	(51.74)	(57.33)	(58.09)	(61.31)	(57.16)	(65.65)	(63.66)	(66.82)		

หมายเหตุ \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01), \*\*\* (P < 0.001), G1 = กลุ่มตัวอย่างที่ 1, G2 = กลุ่มตัวอย่างที่ 2

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

จากผลการศึกษาที่กล่าวมา สามารถสรุปเป็นประเด็นหลักๆ ได้ดังต่อไปนี้

1. รูปแบบและความถี่ของยีนในรูปแบบต่างๆ เมื่อโคนมมีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า กลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ของประเทศไทยที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน พบรูปแบบยีนที่เหมือนกันและมีความถี่ยีนที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง จึงสรุปได้ว่ากลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันหรือการเพิ่มระดับสายเลือดที่สูงขึ้นนั้น ไม่ได้ทำให้รูปแบบและความถี่ของยีนในแต่ละตำแหน่งเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลให้ทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน มีโอกาสที่จะพบได้ทุกรูปแบบ genotype และ composite genotype ที่เหมือนกันของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง ดังนั้นรูปแบบ allele และ genotype ที่คาดว่าจะจะเป็นรูปแบบพื้นฐานของโคนมลูกผสมพื้นเมืองโฮลสไตน์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของประเทศ ควรมีรูปแบบดังนี้ ยีน  $\beta$ -casein พบ 3 allele ได้แก่  $A^1$ ,  $A^2$  และ B พบ 5 genotype ได้แก่  $A^1A^1$ ,  $A^1A^2$ ,  $A^1B$ ,  $A^2A^2$  และ  $A^2B$  สำหรับยีน  $\kappa$ -casein พบ 3 allele ได้แก่ A, B และ E พบ 5 genotype ได้แก่ AA, AB, AE, BB และ BE

2. ความสัมพันธ์ linkage disequilibrium จากการศึกษาพบความสัมพันธ์ linkage disequilibrium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.0001$ ) ระหว่างยีนทั้ง 2 ตำแหน่งของโคนมทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง ดังนั้นการศึกษานี้จึงให้ความสำคัญต่อการพิจารณาอิทธิพลในรูปแบบของ composite genotype ต่อการพัฒนา genetic marker สำหรับการคัดเลือก และในอนาคตจากการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลและสัญญาณที่สำคัญว่า ในการศึกษาอิทธิพลของยีนโดยมีเป้าหมายที่จะประยุกต์ใช้เป็น genetic marker นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้ความสำคัญกับความสัมพันธ์ linkage disequilibrium เนื่องจากการพบความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้ ยีนแต่ละตำแหน่งที่ทำการศึกษาก็จะสามารถถ่ายทอดไปด้วยกันได้ หากพิจารณาเพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง โดยไม่คำนึงถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว ยีนอีกตำแหน่งหนึ่งอาจมีอิทธิพลร่วมกันในทางลบต่อลักษณะที่สนใจ ซึ่งอาจเกิดผลเสียได้

3. ความแตกต่างของระดับสายเลือดต่ออิทธิพลของยีนที่มีต่อลักษณะที่สนใจ พบว่ากลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันจากการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตัวอย่าง ส่งผลต่อทิศทางของอิทธิพลและ

การมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแตกต่างกัน ดังนั้น หากทำการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของรูปแบบยีนต่างๆ ต่อลักษณะที่สนใจกับตัวอย่างประชากร โคนมที่เป็นลูกผสม ควรตระหนักถึงกลุ่มระดับสายเลือดที่แตกต่างกันด้วย และการประยุกต์ใช้ genetic marker สำหรับการคัดเลือกนั้น จะต้องชัดเจนว่าจะใช้ยีนรูปแบบใดกับระดับสายเลือดใด

4. การศึกษาอิทธิพลที่มีนัยสำคัญต่อลักษณะต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้เป็น genetic marker จากการศึกษาครั้งนี้ โดยภาพรวมเห็นได้ชัดว่าอิทธิพลในทุกรูปแบบ composite genotype นั้น มีอิทธิพลไปในทิศทางลบกับลักษณะ %Protein และ %SNF ของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง ดังนั้นการนำรูปแบบ composite genotype ไปใช้เป็น genetic marker สำหรับการคัดเลือกเพื่อแก้ปัญหา %SNF ต่ำ โดยการที่จะเพิ่ม %Protein ด้วยศักยภาพของยีน 2 ตำแหน่งนี้ยังไม่สามารถทำได้

### ข้อเสนอแนะ

จากข้อสรุปดังกล่าว ทำให้ได้ข้อเสนอแนะหรือแนวทางในการทำงานวิจัยต่อไป โดยมีประเด็นที่สำคัญดังนี้

1. จากการศึกษาที่พบว่า กลุ่มระดับสายเลือดโฮลสไตน์ที่แตกต่างกัน มีผลต่ออิทธิพลของยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein ที่มีต่อลักษณะต่างๆ ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ระดับสายเลือดที่แตกต่างกันมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป ทั้งในการศึกษาเกี่ยวกับยีนเคซีน รวมถึงยีนตำแหน่งอื่นๆ โดยมีเป้าหมายเพื่อศึกษาศักยภาพของการเป็น genetic marker สำหรับช่วยคัดเลือกโคนมของประเทศ ดังนั้นควรทำการศึกษาเกี่ยวกับโคนมในแต่ละระดับสายเลือด เนื่องจากผลที่ได้ อาจมีความแตกต่างกันเมื่อ โคนมมีระดับสายเลือดต่างกัน

2. ควรทำการศึกษาตำแหน่งอื่นๆ ที่คาดว่าจะมีผลต่อลักษณะที่เราสนใจ เช่นยีน  $\alpha_{s1}$ -casein และ  $\alpha_{s2}$ -casein เนื่องจากเป็นยีนที่มีความใกล้ชิดกันมากบนโครโมโซม และการทดสอบอิทธิพลร่วมกัน เพื่อเป็นการศึกษาและพัฒนาขั้นเหล่านี้ไปเป็น genetic marker สำหรับการคัดเลือก

3. เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ยีน  $\beta$  และ  $\kappa$ -casein เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์ linkage disequilibrium การประยุกต์ใช้ยีนดังกล่าวควรพิจารณาในรูปแบบของ composite genotype ดังนั้น

การพิจารณาชื่อ-ขายน้าเชื้อ โดยพิจารณาจากรูปแบบ genotype ของยีน  $\kappa$ -casein เพียงตำแหน่งเดียว จึงไม่เหมาะสม

4. จากผลการศึกษาอิทธิพลของ allele ต่อลักษณะที่สนใจ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลที่ได้มีความผิดพลาด อันเกิดจากวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ ไม่สามารถแยกอิทธิพลแต่ละ allele ได้อย่างชัดเจน จึงเกิดอิทธิพลพัวพัน (confound effect) ดังนั้นในการศึกษาศักยภาพของยีนตำแหน่งต่างๆ เพื่อประยุกต์เป็น genetic marker โดยเฉพาะกรณีที่เป็นยีนเพียงตำแหน่งเดียว และการใช้รูปแบบของ allele เพื่อเป็น genetic marker นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องระมัดระวังในการสรุปผล เพราะมีความเป็นไปได้สูงมากที่อาจเกิด confound effect ดังนั้นเพื่อความรอบคอบ การพิจารณาผลร่วมกันระหว่างอิทธิพลของ allele และ genotype จึงเป็นแนวทางที่แนะนำ

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จรรย์ จันทลักษณ์. 2540. สถิติ วิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 7. สำนักพิมพ์  
ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ชวนิศนดากร วรวรรณ. 2534. การเลี้ยงโคนม. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด,  
กรุงเทพฯ.
- ช่อทิพ อรุณเดชาชัย. 2546. อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปปาเคซีนที่มีผลต่อลักษณะการให้ผลผลิต  
น้ำนมในโคลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรรณมา ตั้งเจริญชัย และ วิบูลย์ศักดิ์ กาวิลละ. 2531. นมและผลิตภัณฑ์นม. โอ. เอส. พรินติ้งเฮาส์,  
กรุงเทพฯ.
- วริษา สันทวีวรกุล. 2545. การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะการให้น้ำนม  
ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเซียนโดยใช้ **Multiple-Trait Model** และ **Random  
Regression Test Day Model** ด้วยวิธี **Restricted Maximum Likelihood (REML)**.  
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2546. โคนม. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- สุณิรัตน์ เขียมละมัย, สิ้นชัย เรืองไพบูลย์, อุดุลย์ วังตาล, จิตศักดิ์ ไชยพาน และ นลอง วชิราภากร.  
2549. บทวิเคราะห์อุตสาหกรรมโคนมไทย กับการแข่งขันในอนาคตและการปรับตัวของ  
เกษตรกร. หจก. ขอนแก่นการพิมพ์, ขอนแก่น.
- สมชัย จันท์สว่าง และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2546. พันธุศาสตร์ประชากร. สำนักพิมพ์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Azevedo, A.L.S., C.S. Nascimento, R.S. Steinberg, M.R.S. Carvalho, M.G.C.D. Peixoto, R.L. Teodoro, R.S. Verneque, S.E.F. Guimaraes and M.A. Machado. 2008. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. **Genet. Mol. Res.** 7(3): 623- 630.
- Barroso, A., S. Dunner and J. Canon. 1998. Technical note: detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **J. Anim. Sci.** 76: 1535-1538.
- Bobé, 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.
- Boettcher, P.J., A. Caroli, A. Stella, S. Chessa, E. Budelli, F. Canavesi, S. Ghiroldi and G. Pagnacco. 2004. Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss Cattle. **J. Dairy Sci.** 87: 4311–4317.
- Bovenhuis, H., J.A.M. Arendonk and S. Korver. 1992. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. **J. Dairy Sci.** 75: 2549–2559.
- Caroli, A., S. Chessa, P. Bolla, E. Budelli and G.C. Gandini. 2004. Genetic structure of milk protein polymorphisms and effects on milk production traits in a local dairy cattle. **J. Anim. Breed. Genet.** 121: 119–127.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, F. Chiatti, D. Rignanese, B. Melendez, R. Rizzi and G. Ceriotti. 2008. Short communication: Carora cattle show high variability in  $\alpha_s1$ -casein. **J. Dairy Sci.** 91: 354-359.

- Comin, A., M. Cassandro, S. Chessa, M. Ojala, R. Dal Zotto, M. De Marchi, P. Carnier and L. Gallo. 2008. Effect of composite  $\beta$  and  $\kappa$ -casein genotype on milk coagulation, quality and yield traits in Italian Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 91: 4022-4027.
- Edgar, S. 1998. **Milk and dairy product technology**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Eigel, W. N., J.E. Butler, C.A. Ernstrom, H.M. Ferrell, V.R. Harwalkar, R. Jenness and R.M. Whitney. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. **J. Dairy Sci.** 67: 1599-1631.
- Erhardt, G. 1989.  $\kappa$ -caseins in bovine milk. Evidence of a further allele ( $\kappa$ -CN-E) in different breeds. **J. Anim. Breed. Genet.** 106: 225-231.
- Fennema, O.R., M. Karel, G.W. Sanderson, S.R. Tennenbaum, P.W. Wageningen and J.R. Whitaker. 1998. **Milk and Dairy Product Technology**. Marcel Dekker, Inc., The United States of America.
- Fox, P.F. and P.L.H. McSweeney. 1998. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Thomson Science, London.
- Goff, H.D. 2007. **What's in Raw Milk**. Available Source: [http://www.raw-milk-facts.com/what\\_is\\_in\\_raw\\_milk.html](http://www.raw-milk-facts.com/what_is_in_raw_milk.html), July 25, 2007.
- Han, S.K., Y.C. Shin and H.D. Byun. 2000. Biochemical, molecular and physiological characterization of a new beta-casein variant detected in Korean cattle. **Anim. Genet.** 31: 49-51.
- Hallen, E., A. Wedholm, A. Andren and A. Lunden. 2008. Effect of  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. **J. Anim. Breed. Genet.** 125: 119-129.

- Hancock, J. 1954. **Monocytic twins in cattle. Advances in Genet. Vol. 6.** Academic Press, N. Y.
- Hayes, J.F., K.F. Ng-Kwai-Hang and J.E. Moxley. 1984. Heritability of milk casein and genetic and phenotypic correlations with production traits. **J. Dairy Sci.** 67: 841-846.
- Heck, J.M.L., A. Schennink, H.J.F.V. Valenberg, H. Bovenhuis, M.H.P.W. Visker, J.A.M.V. Arendonk and A.C.M.V. Hooijdonk. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. **J. Dairy Sci.** 92: 1192–1202.
- Hurley, W.L. 2007. **Other Factors Affecting Milk Yield and Composition.** Available Source: <http://classes.ansci.uiuc.edu/ansc438/lactation/Otherfactors.html>, December 2, 2008.
- Ibeagha-Awemu, E.M., E.M. Prinzenberg, O.C. Jann, G. Lu'hken, A.E. Ibeagha, X. Zhao and G. Erhardt. 2007. Molecular characterization of bovine CSN1S2\*B and extensive distribution of Zebu-specific milk protein alleles in European Cattle. **J. Dairy Sci.** 90: 3522–3529.
- Ikonen, T., M. Ojala and O. Ruottinen. 1999. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. **J. Dairy Sci.** 82: 1026–1033.
- \_\_\_\_\_, H. Bovenhuis, M. Ojala, O. Ruottinen and M. Georges. 2001. Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. **J. Dairy Sci.** 84: 507–514.
- James, D. and M.S. Ferguson. 2000. **Milk Protein.** Center For Animal Holstein and Productivity School of Veterinary Medicine. University of Pennsylvania, Pennsylvania.

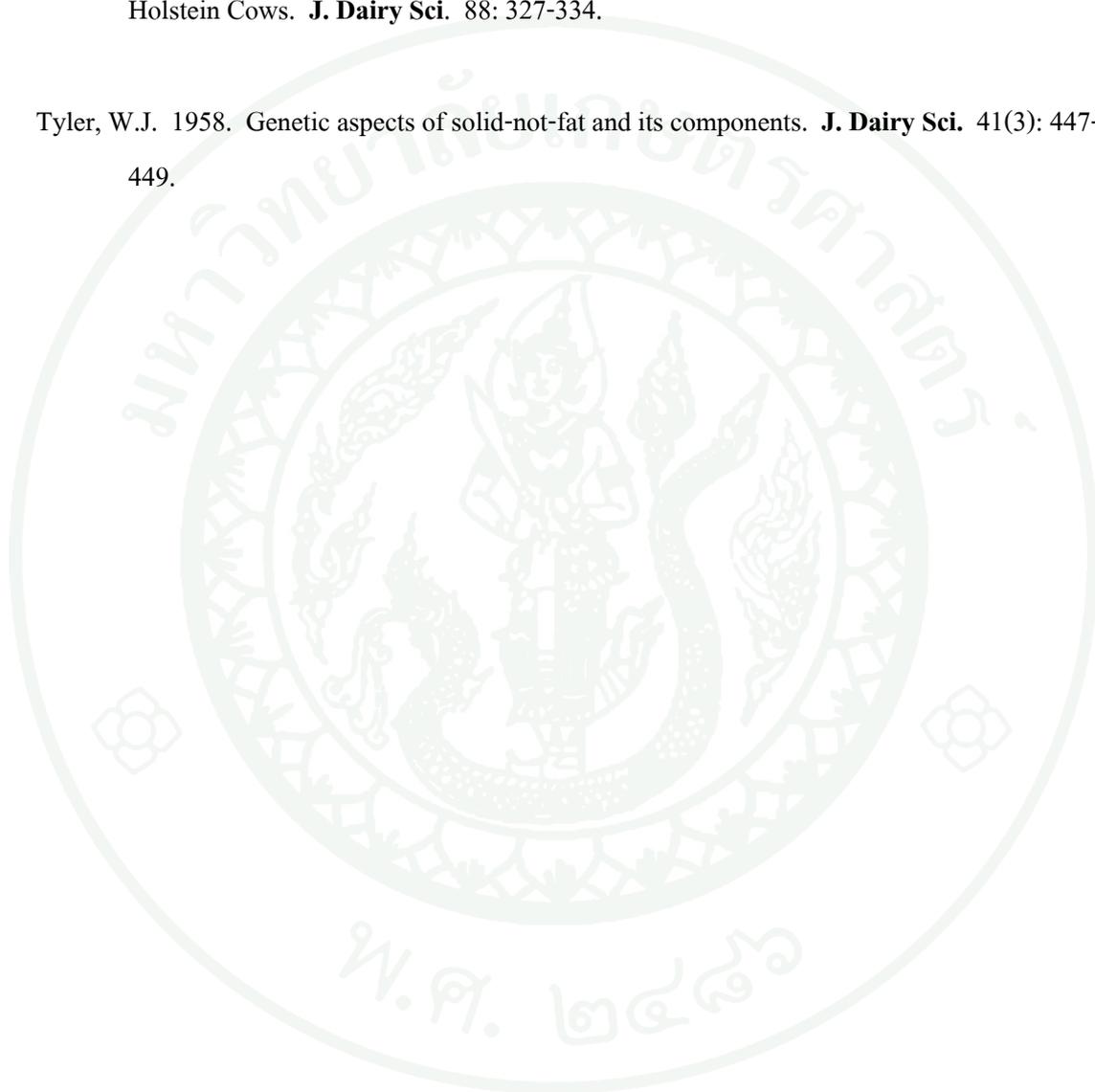
- Jann, O.C., G. Ceriotti, A. Caroli and G. Ehardt. 2002. A new variant in exon VII of bovine b-casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. **J. Anim. Breed. Genet.** 119: 65–68.
- \_\_\_\_\_, E.M. Ibeagha-Awemu, C. Ozbeyaz, P. Zaragoza, J.L. Williams, P. Ajmone-Marsan, J.A. Lenstra, K. Moazami-Goudarzi and G. Erardt. 2004. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. **Genet. Sel. Evol.** 36: 243-257.
- Kaps, M. and W. Lamberson. 2004. **Biostatistics for animal science.** CABI Publishing, U.S.A.
- Keown, J.F. 2006. **How are Milk Components Related?.** Available Source: <http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/live/g1674/build/g1674.pdf>, December 17, 2008.
- Khan, F.H. and A. Singh. 2002. **Principles of Genetics & Animal Breeding.** Jaypee Brothes Medical Publishsher (P) Ltd., New Delhi.
- Kucerova, J., A. Matejicek, O.M. Jandurova, P. Sørensen, E. Nemcova, M. Štípkova, T. Kott, J. Bouška and J. Frelich. 2006. Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. **Czech J. Anim. Sci.** 51: 241-247.
- Lien, S., J. Kantanen, I. Olsaker, L.E. Holm, E. Eythorsdottir, K. Sandberg, B. Dalsgard and S. Adalsteinsson. 1999. Comparision of milk protein allele frequencies in Nordic cattle breeds. **Anim. Genet.** 30: 85-91.
- McMahon, D.J. and B.S. Oommen. 2008. Supramolecular structure of the casein micelle. **J. Dairy Sci.** 91: 1709–1721.

- Mercier, J.C. and J.L. Viloite. 1993. Structure and function of milk protein genes. **J. Dairy Sci.** 76: 3079-3098.
- Ojala, M., T.R. Famula and J.F. Medrano. 1997. Effect of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. **J. Dairy Sci.** 80: 1776–1785.
- Patel, R.K., J.B. Chauhan, K.M. Singh and K.J. Soni. 2007. Allelic frequency of kappa-casein and beta-lactoglobulin in Indian Crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*) Dairy Bulls. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 31(6): 399-402.
- Prinzenberg, E.M., I. Krause and G. Erhardt. 1999. SSCP analysis at the bovine *CSN3* locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphism (H, I, A<sup>1</sup>). **Anim. Biotechnol.** 10: 49-62.
- \_\_\_\_\_, H. Jianlin, and G. Erhardt. 2008. Genetic variation in the  $\kappa$ -casein gene (*CSN3*) of Chinese Yak (*Bos grunniens*) and phylogenetic analysis of *CSN3* sequences in the Genus *Bos*. **J. Dairy Sci.** 91: 1198-1203.
- Raymond, M. and F. Rousset. 2003. Genepop 3.4., an updated version of Genepop V.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.** 86: 248-249.
- Robertson, A., R. Waite, and J.C.D. White. 1956. Variations in the chemical composition of milk with particular reference to the solids-not-fat. II. The effect of heredity. **J. Dairy. Research.** 23: 82.
- Rohallah, A., M.A. Mohammadreza and M.B. Shahin. 2007. Kappa-casein gene study in Iranian Sistani Cattle Breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. **Pak. J. Biol. Sci.** 10(23): 4291-4294.

SAS. 2002. **The SAS System for Windows: version 9.0.** SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Tsiaras, A.M., G.G. Bargouli, G. Banos and C.M. Boscos. 2005. effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein Cows. **J. Dairy Sci.** 88: 327-334.

Tyler, W.J. 1958. Genetic aspects of solid-not-fat and its components. **J. Dairy Sci.** 41(3): 447-449.





ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนรูปแบบ allele ต่างๆ ของยีน  $\beta$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

รูปแบบ allele	กลุ่มตัวอย่างที่ 1	กลุ่มตัวอย่างที่ 2	รวม
A <sup>1</sup>	60	103	163
A <sup>2</sup>	109	171	280
B	9	10	19
รวม	178	284	462

ตารางผนวกที่ 2 จำนวนรูปแบบ allele ต่างๆ ของยีน  $\kappa$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

รูปแบบ allele	กลุ่มตัวอย่างที่ 1	กลุ่มตัวอย่างที่ 2	รวม
A	138	219	357
B	37	51	88
E	3	14	17
รวม	178	284	462

ตารางผนวกที่ 3 จำนวนรูปแบบ genotype ต่างๆ ของยีน  $\beta$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

รูปแบบ genotype	กลุ่มตัวอย่างที่ 1	กลุ่มตัวอย่างที่ 2	รวม
A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	5	8	13
A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	47	86	133
A <sup>1</sup> B	3	1	4
A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	28	38	66
A <sup>2</sup> B	6	9	15
รวม	89	142	231

ตารางผนวกที่ 4 จำนวนรูปแบบ genotype ต่างๆ ของยีน  $\kappa$ -casein ที่พบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

รูปแบบ genotype	กลุ่มตัวอย่างที่ 1	กลุ่มตัวอย่างที่ 2	รวม
AA	52	80	132
AB	32	48	80
AE	2	11	13
BB	2	0	2
BE	1	3	4
รวม	89	142	231

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายพนันต์ รังสะกินนิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	ตราด
ประวัติการศึกษา	วท.บ. เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2549

