

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ระหว่างโคพื้นเมืองไทย (NT) และโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน (HF) สามารถแบ่งการรายงานผลทดลองออกเป็น 3 ส่วน คือ

#### 1. ผลการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณยีน HSP70-2 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ HP1-HP10 ปรากฏ PCR product ที่มีขนาดต่างๆ ในโคทั้งสองพันธุ์ จากแต่ละไพรเมอร์ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.1 (ภาพตัวอย่างของ PCR product บริเวณต่างๆ จาก 10 ไพรเมอร์ แสดงภาพภาคผนวก (ข) ที่ 1-10) สอดคล้องงานวิจัยของอุมาพร (2548) ที่ศึกษาความหลากหลายของยีน HSP70-2 ในโคพื้นเมืองไทย และโคนมลูกผสม (โคลูกผสมพื้นเมือง 50% และโคลูกผสมพื้นเมือง 3.12%) บริเวณ 5' flanking region รวมถึง coding sequence จากตำแหน่งเบสที่ 40-731 และ coding sequence จากตำแหน่งเบสที่ 1071-1733 โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบความหลากหลายเบื้องต้น พบแถบ DNA ขนาด 692 และ 663 คู่เบส ตามลำดับในโคทุกตัวที่ทดลอง การใช้เทคนิค PCR ในการทดลองเบื้องต้นนี้เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบต่อยีน HSP70-2 โดยสังเกตจากขนาดของ PCR product ที่ได้ ทำให้ทราบว่าแถบ DNA เป้าหมายในทุกตัวอย่างของแต่ละไพรเมอร์ที่ทำการศึกษามีขนาดเท่ากัน ตรงตามขนาดที่กำหนด และปราศจากการปนเปื้อนหรือปรากฏแถบ DNA บริเวณอื่น อีกทั้งยังเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย เพื่อนำไปวิเคราะห์ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

สุรินทร์ (2540) กล่าวว่าความแตกต่างของเบสบางตำแหน่งหรือตำแหน่งเดียวภายในเส้น DNA สายเดี่ยวไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการจัดเรียงตัวของ DNA สายคู่ ทำให้แถบ DNA ที่ได้เท่ากัน ดังนั้น การที่ผล PCR product ของยีน HSP70-2 ในการศึกษาครั้งนี้ปรากฏแถบ DNA ของโคสองสายพันธุ์เท่ากันในทุกไพรเมอร์ที่ศึกษา ไม่อาจระบุได้ว่าการจัดเรียงตัวของยีน HSP70-2 เหมือนกัน เพราะอาจเป็นไปได้ว่ามีความแตกต่างระหว่างเบสเกิดขึ้นที่เส้น DNA สายเดี่ยว ซึ่งหากพบปรากฏการณ์ดังกล่าว อาจมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนได้

ตารางที่ 4.1 บริเวณศึกษาของยีน HSP70-2 ขนาด PCR product และ จำนวนรูปแบบที่พบจากวิธี SSCP ในแต่ละไพรเมอร์

ไพรเมอร์	บริเวณศึกษาของยีน HSP70-2	ขนาด PCR product (bp) NT และ HF	จำนวนรูปแบบจากวิธี SSCP		
			All (32)	NT	HF
HP1	5'flanking region รวมถึง coding sequence ส่วนต้น	517	6	4	2
HP2	coding sequence	230	4	4	1
HP3	coding sequence	247	2	2	1
HP4	coding sequence	271	1	1	1
HP5	coding sequence	253	2	1	1
HP6	coding sequence	646	1	1	1
HP7	coding sequence	260	2	2	2
HP8	coding sequence	271	4	2	2
HP9	coding sequence ส่วนปลาย รวมถึง 3'flanking region ส่วนต้น	290	8	7	1
HP10	3'flanking region	238	2	1	1

หมายเหตุ NT คือ โคนพื้นเมืองไทย, HF คือ โคนโฮลสไตน์ฟรีเซียน

## 2. ผลการตรวจสอบความหลากหลายของ DNA ด้วยวิธี SSCP

นำ PCR product มาตรวจสอบความหลากหลายของยีนด้วยวิธี SSCP พบรูปแบบ SSCP ของยีน HSP70-2 ในโคทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกันในแต่ละบริเวณที่ศึกษาทั้งหมด 32 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยมีการกระจายตัวของรูปแบบต่าง ๆ และความถี่ที่พบจากรูปแบบในแต่ละไพรเมอร์ในโคแต่ละพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เปรี่เซ็นต์การกระจายตัวของรูปแบบ SSCP จากยีน HSP70-2 ในโคพื้นเมืองไทย (NT) และโคไฮลัสไต้นฟริเซี่ยน (HF)

โปรแกรม	สายพันธุ์โค	เปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของรูปแบบ SSCP (จำนวนโคที่พบ)										P value
		รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3	รูปแบบที่ 4	รูปแบบที่ 5	รูปแบบที่ 6	รูปแบบที่ 7	รูปแบบที่ 8			
HP1	NT	41.43 (29)	35.71 (25)	20.00 (14)	2.86 (2)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.001*
	HF	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	63.46 (33)	36.54 (19)					
HP2	NT	68.57 (48)	20.00 (14)	8.57 (6)	2.86 (2)							0.001*
	HF	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	100.00 (52)							
HP3	NT	51.43 (36)	48.57 (34)									0.001*
	HF	100.00 (52)	0.00 (0)									
HP4	NT	100.00 (70)										-
	HF	100.00 (52)										
HP5	NT	100.00 (70)	0.00 (0)									0.001*
	HF	0.00 (0)	100.00 (52)									
HP6	NT	100.00 (70)										-
	HF	100.00 (52)										
HP7	NT	90.00 (63)	10.00 (7)									0.370
	HF	84.62 (44)	15.38 (8)									
HP8	NT	17.14 (12)	82.86 (58)	0.00 (0)	0.00 (0)							0.018*
	HF	0.00 (0)	0.00 (0)	7.69 (4)	92.31 (48)							
HP9	NT	47.14 (33)	12.86 (9)	11.43 (8)	8.57 (6)	2.86 (2)	14.29 (10)	2.86 (2)	0.00 (0)	0.00 (0)		0.001*
	HF	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.00 (0)	100.00 (52)			0.001*
HP10	NT	100.00 (70)	0.00 (0)									
	HF	0.00 (0)	100.00 (52)									

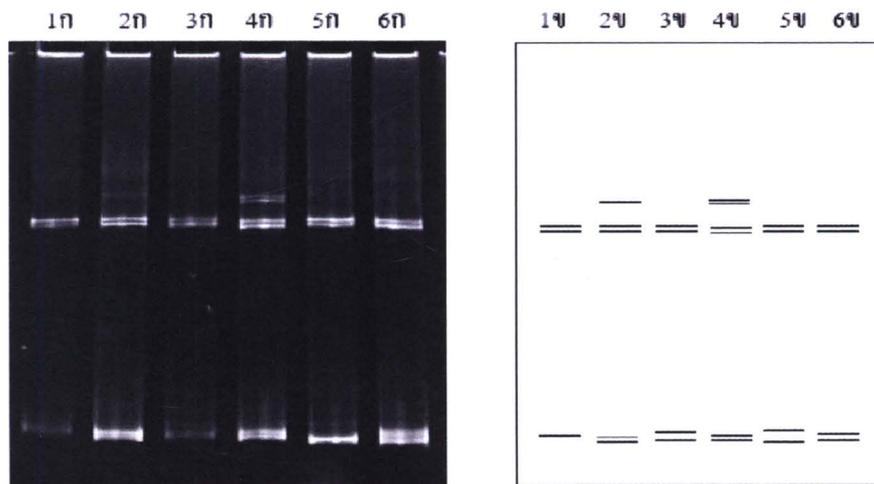
หมายเหตุ \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



## 2.1 ผลการทำ SSCP ยีน HSP70-2 บริเวณ 5'flanking region รวมถึง coding sequence

### ส่วนต้น

ตรวจหาความหลากหลายของ PCR product จากไพรเมอร์ HP1 ด้วยวิธี SSCP พบรูปแบบ SSCP 6 รูปแบบ โดยโคพื้นเมืองไทยพบ 4 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1, 2, 3 และ 4 ส่วนโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน พบ 2 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 5 และ 6 (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP1 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และ

ภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วย

เลนที่ 1 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย เลนที่ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคพื้นเมืองไทย

เลนที่ 3 (ก,ข) รูปแบบที่ 3 ในโคพื้นเมืองไทย เลนที่ 4 (ก,ข) รูปแบบที่ 4 ในโคพื้นเมืองไทย

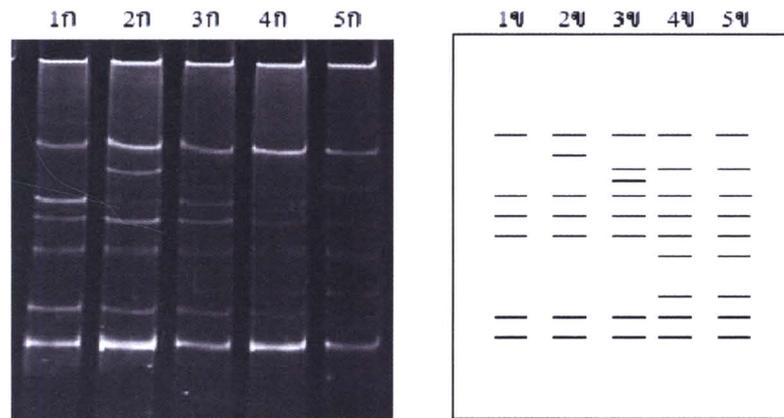
เลนที่ 5 (ก,ข) รูปแบบที่ 5 ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

เลนที่ 6 (ก,ข) รูปแบบที่ 6 ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

## 2.2 ผลการทำ SSCP ยีน HSP70-2 บริเวณ coding sequence

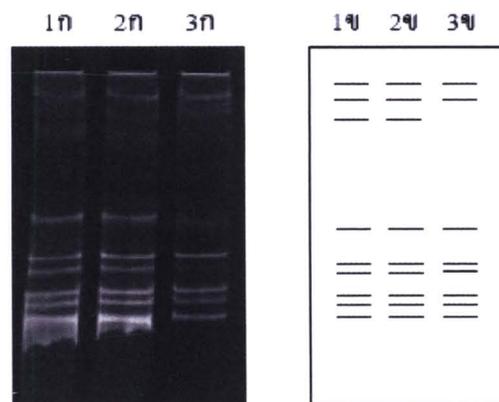
ตรวจหาความหลากหลายของ PCR product จากไพรเมอร์ HP2 HP3, HP4, HP5, HP6, HP7 และ HP8 ด้วยวิธี SSCP ปรากฏผลดังนี้

2.2.1 ไพรเมอร์ HP2 พบรูปแบบ SSCP 4 รูปแบบ โคพื้นเมืองไทยพบ 4 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1, 2, 3 และ 4 ส่วนโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนพบ 1 รูปแบบ ซึ่งมีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 4 (ภาพที่ 4.2)



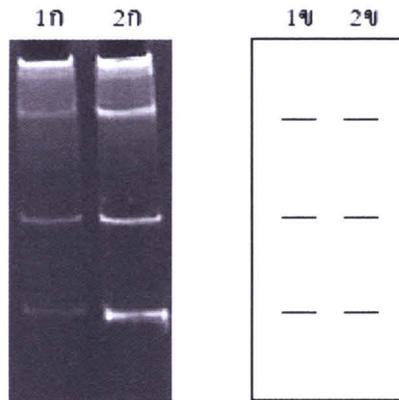
**ภาพที่ 4.2** รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP2 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วย  
 เลนที่ 1(ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย เลนที่ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคพื้นเมืองไทย  
 เลนที่ 3 (ก,ข) รูปแบบที่ 3 ในโคพื้นเมืองไทย  
 เลนที่ 4 และ 5 (ก,ข) รูปแบบที่ 4 ในโคพื้นเมืองไทย และ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนตามลำดับ

2.2.2 ไพรเมอร์ HP3 พบรูปแบบ SSCP 2 รูปแบบ โคพื้นเมืองไทยพบ 2 รูปแบบ มีการกระจายในรูปแบบที่ 1 และ 2 โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนพบ 1 รูปแบบและมีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1 (ภาพที่ 4.3)



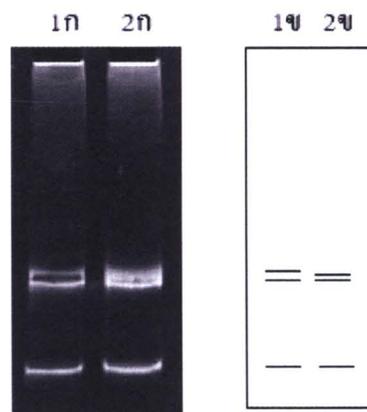
**ภาพที่ 4.3** รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP3 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วย  
 เลนที่ 1, 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย และ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ตามลำดับ  
 เลนที่ 3 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคพื้นเมืองไทย

2.2.3 ไพรเมอร์ HP4 พบรูปแบบ SSCP 1 รูปแบบ ซึ่งมีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1 ทั้งในโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน (ภาพที่ 4.4)



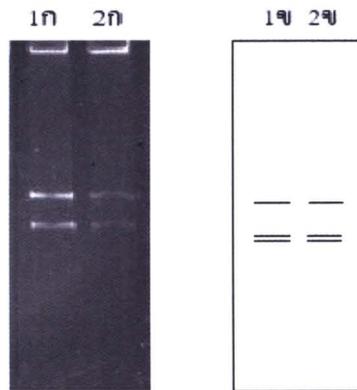
ภาพที่ 4.4 รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP4 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วยเลนที่ 1, 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมือง และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ตามลำดับ

2.2.4 ไพรเมอร์ HP5 พบรูปแบบ SSCP 2 รูปแบบ โคพื้นเมืองไทยพบ 1 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1 โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนพบ 1 รูปแบบเช่นกัน แต่มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 2 (ภาพที่ 4.5)



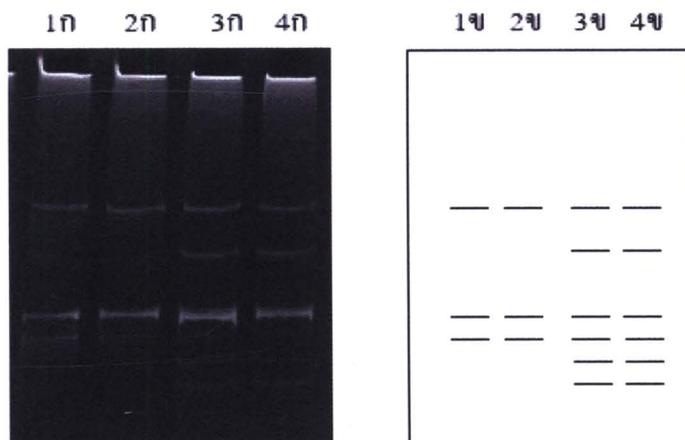
ภาพที่ 4.5 รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP5 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วยเลนที่ 1 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย เลนที่ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

2.2.5 ไพรเมอร์ HP6 พบรูปแบบ SSCP 1 รูปแบบ ซึ่งมีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1 ทั้งในโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน (ภาพที่ 4.6)



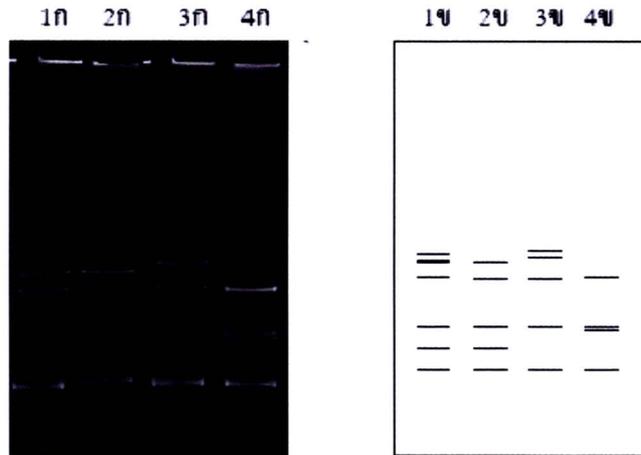
ภาพที่ 4.6 รูปแบบ SSCP ไพรเมอร์ HP6 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และ ภาพจำลองเจด (ภาพ ข) ประกอบด้วย เลนที่ 1 และ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนตามลำดับ

2.2.6 ไพรเมอร์ HP7 พบรูปแบบ SSCP 2 รูปแบบ โคพื้นเมืองไทยพบ 2 รูปแบบ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนพบ 2 รูปแบบ โดยมีการกระจายตัวของรูปแบบที่ 1 และ 2 ในโคทั้งสองสายพันธุ์ (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP7 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และ ภาพจำลองเจด (ภาพ ข) ประกอบด้วย เลนที่ 1 และ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนตามลำดับ เลนที่ 3 และ 4 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคพื้นเมืองไทย และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนตามลำดับ

2.2.6 ไพรเมอร์ HP8 พบรูปแบบ SSCP 4 รูปแบบ โคพื้นเมืองไทยพบ 2 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1 และ 2 ส่วนโคโฮลสไตน์พีรีเซียนพบ 2 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 3 และ 4 (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP8 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และ

ภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วย

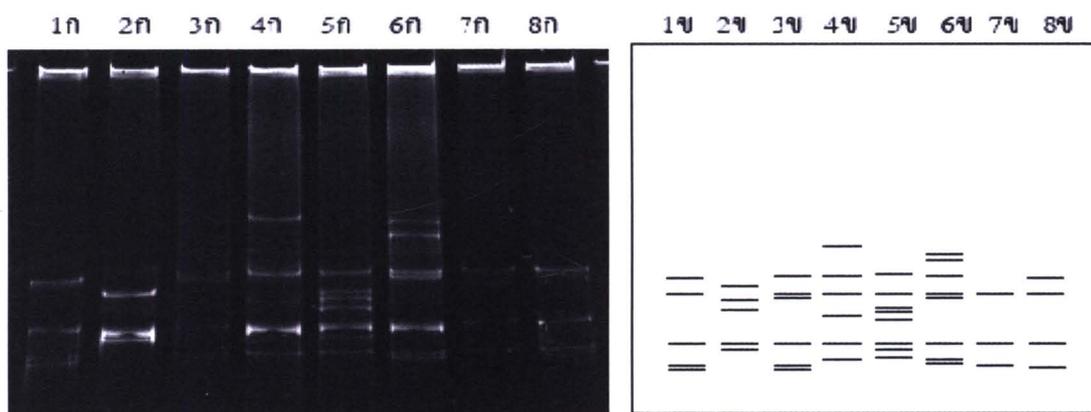
เลนที่ 1 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย เลนที่ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคพื้นเมืองไทย

เลนที่ 3 (ก,ข) รูปแบบที่ 3 ในโคโฮลสไตน์พีรีเซียน

เลนที่ 4 (ก,ข) รูปแบบที่ 4 ในโคโฮลสไตน์พีรีเซียน

## 2.3 ผลการทำ SSCP ยีน HSP70-2 บริเวณ coding sequence ส่วนปลาย รวมถึง 3'flanking region

ตรวจหาความแตกต่างของ PCR product จากไพรเมอร์ HP9 ด้วยวิธี SSCP พบรูปแบบ SSCP 8 รูปแบบ โคพื้นเมืองไทย 7 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ส่วน โคโฮลสไตน์ ฟรีเซียน พบ 1 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 8 เท่านั้น (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP9 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และ

ภาพจำลองเจด (ภาพ ข) ประกอบด้วย

เลนที่ 1 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคพื้นเมืองไทย      เลนที่ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคพื้นเมืองไทย

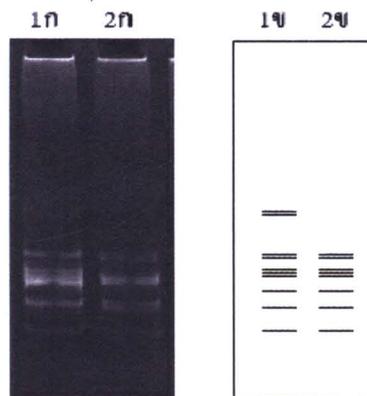
เลนที่ 3 (ก,ข) รูปแบบที่ 3 ในโคพื้นเมืองไทย      เลนที่ 4 (ก,ข) รูปแบบที่ 4 ในโคพื้นเมืองไทย

เลนที่ 5 (ก,ข) รูปแบบที่ 5 ในโคพื้นเมืองไทย      เลนที่ 6 (ก,ข) รูปแบบที่ 6 ในโคพื้นเมืองไทย

เลนที่ 7 (ก,ข) รูปแบบที่ 7 ในโคพื้นเมืองไทย      เลนที่ 8 (ก,ข) รูปแบบที่ 8 ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

## 2.4 ผลการทำ SSCP ยีน HSP70-2 บริเวณ 3'flanking region

ตรวจหาความแตกต่างของ PCR product จากไพรเมอร์ HP10 ด้วยวิธี SSCP พบรูปแบบ SSCP 2 รูปแบบ โคนพื้นที่เมืองไทยพบ 1 รูปแบบ มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 1 โคลอสสไตน์ฟรีเซียน พบ 1 รูปแบบเช่นกัน แต่มีการกระจายตัวในรูปแบบที่ 2 (ภาพที่ 4.10)



**ภาพที่ 4.10** รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ HP10 จากภาพถ่าย polyacrylamide gel (ภาพ ก) และภาพจำลองเจล (ภาพ ข) ประกอบด้วย  
เลนที่ 1 (ก,ข) รูปแบบที่ 1 ในโคนพื้นที่เมืองไทย เลนที่ 2 (ก,ข) รูปแบบที่ 2 ในโคลอสสไตน์ฟรีเซียน

ผลของรูปแบบ SSCP ในบริเวณ 5'flanking region ที่ครอบคลุมบริเวณศึกษาในไพรเมอร์ HP1 พบ ความหลากหลายของรูปแบบ SSCP ในโคนพื้นที่เมืองไทยและโคลอสสไตน์ฟรีเซียนจำนวน 6 รูปแบบ สอดคล้องกับการรายงานของอุมพร (2548) พบความหลากหลายของยีน HSP70-2 2 บริเวณ คือบริเวณ 5'flanking region ของ HSP70-2 ในโค 3 กลุ่ม (โคนพื้นที่เมือง, โคนมลูกผสมพื้นเมือง 50% และ โคนมลูกผสมพื้นเมือง 3.12%) จำนวน 5 รูปแบบ ซึ่งจำนวนของรูปแบบน้อยกว่าผลการศึกษานี้ สำหรับบริเวณ coding sequence ของ HSP 70-2 พบรูปแบบของ SSCP เพียง 1 รูปแบบในโคทั้ง 3 กลุ่ม ขัดแย้งกับงานทดลองครั้งนี้ในบริเวณ ศึกษาเดียวกัน ซึ่งครอบคลุมบริเวณไพรเมอร์ HP5-HP6 ของการศึกษานี้ โดยไพรเมอร์ HP5 พบจำนวนรูปแบบ SSCP 2 รูปแบบ อาจเนื่องจากจำนวนของโคที่ใช้การทดลองในครั้งนี้มีจำนวนมากกว่าและสายพันธุ์โคที่ศึกษาแตกต่างกัน คือ พันธุ์พื้นเมืองไทยอีสาน และโคลอสสไตน์ฟรีเซียนระดับสายเลือด 100 จึงทำให้ได้จำนวนรูปแบบ SSCP มากกว่าในบริเวณศึกษาเดียวกัน เมื่อพิจารณา รูปแบบ SSCP ในโคสองสายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ HP1, HP5, HP8, HP9 และ HP10 มีรูปแบบ

เฉพาะในโคพันธุโคพันธุหนึ่งเท่านั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้รูปแบบ SSCP ในไพรเมอร์ดังกล่าวมาใช้ในการแยกความแตกต่างของยีน HSP70-2 ในโคแต่ละสายพันธุ์

เมื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของโคและความถี่ที่พบจากรูปแบบของแต่ละไพรเมอร์พบว่าสายพันธุ์โคมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ต่อรูปแบบที่เกิดจากไพรเมอร์ HP1, HP2, HP3, HP5, HP8, HP9 และ HP10 (ตารางที่ 4.2)

หากพิจารณาผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าไพรเมอร์ที่มีผลการทดลองของรูปแบบ SSCP สอดคล้องกับ ผลความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์โคและความถี่จากรูปแบบและอาจเป็นไพรเมอร์ที่ใช้แยกความแตกต่างของยีน HSP70-2 ระหว่างโคสองสายพันธุ์ คือ HP1, HP5, HP8, HP9 และ HP10 ซึ่งครอบคลุมบริเวณต่างๆ ตลอดยีน (5'flanking region, coding sequence และ 3'flanking region) โดยเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นกรดอะมิโนเพื่อผลิตเป็นโปรตีน และควบคุมกระบวนการ post-transcription ที่ส่งผลต่อปริมาณการผลิตโปรตีน การคัดลอก mRNA การขดม้วนตัวของโปรตีนกลุ่มน้ำหนัก 70 kDa ทำให้ปริมาณและการทำงานของโปรตีนกลุ่มนี้ในโคสองสายพันธุ์ต่างกัน (Adamowicz et al., 2005 และ อมรา, 2546)

การตรวจสอบความหลากหลายและจุดกลายพันธุ์ภายในยีน HSP70-2 ด้วยเทคนิค PCR-SSCP เป็นเพียง การตรวจสอบเบื้องต้น ไม่สามารถระบุได้ว่าความแตกต่างเกิดขึ้นที่ตำแหน่งใดมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นอย่างไร ดังนั้นจึงสุ่มตัวอย่างจากรูปแบบ SSCP ที่ปรากฏในแต่ละไพรเมอร์จากโคทั้งสองสายพันธุ์ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน เพื่อหาตำแหน่งที่แตกต่างของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ และพิจารณาความแตกต่างที่พบซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกต่อความร้อนของโคทั้งสองสายพันธุ์ในการศึกษาขั้นต่อไป

### 3. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 (DNA sequencing)

จัดกลุ่มตัวอย่าง PCR product จากรูปแบบ SSCP ในโคพื้นเมืองไทยและโฮลสไตน์ฟรีเซียน ได้จำนวน 32 รูปแบบ หรือ 32 กลุ่ม จากนั้นสุ่มตัวอย่างของแต่ละกลุ่มรูปแบบ SSCP รูปแบบละ 1 ตัวอย่าง/สายพันธุ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำมาจัดเรียงลำดับตามรูปแบบ SSCP ของแต่ละไพรเมอร์ในโคแต่ละตัว ซึ่งให้ผลดังต่อไปนี้

#### 3.1 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากรูปแบบ SSCP ในแต่ละไพรเมอร์/สายพันธุ์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากรูปแบบ SSCP ในแต่ละไพรเมอร์ที่ส่งวิเคราะห์จัดเรียงตามไพรเมอร์ในแต่ละรูปแบบ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ประกอบด้วย เส้นลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ forward primer เป็นต้นแบบ และเส้นลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ reverse primer เป็นต้นแบบ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างเดียวกันทั้ง 2 เส้นมาเปรียบเทียบกับโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2, Bioedit และ ClustalW2 เพื่อประเมินความเหมือน แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเส้นที่คู่กันร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบจากบริเวณที่ศึกษา เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่นำมาเปรียบเทียบกับพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้หลังจากจัดกลุ่มแล้วมีจำนวนกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับกลุ่มรูปแบบ SSCP ที่ปรากฏ และกลุ่มรูปแบบ SSCP ที่พบมากกว่า 1 รูปแบบในแต่ละไพรเมอร์ จะพบตำแหน่งเบสที่เกิดจุดกลายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.3 – 4.10

ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HPI

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส																
	51	59	65	67	79	84	87	165	253	309	317	320	383	396	465	472	481
รูปแบบที่ 1	A	C	C	C	C	A	A	A	C	G	A	G	-	T	C	S	Y
รูปแบบที่ 2	A	C	C	C	A	G	A	-	C	G	A	G	G	T	-	T	G
รูปแบบที่ 3	A	C	C	C	A	G	T	-	A	G	C	T	G	C	-	T	G
รูปแบบที่ 4	A	C	C	C	A	G	A	-	C	A	C	G	G	C	-	T	G
รูปแบบที่ 5	A	C	C	C	A	G	A	-	C	G	A	G	G	T	-	T	G
รูปแบบที่ 6	K	W	G	R	C	A	A	-	C	G	A	G	G	T	-	T	G

หมายเหตุ K = G หรือ T, W = A หรือ T, R = A หรือ G, S = C หรือ G และ Y = C หรือ T

ตารางที่ 4.4 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HP2

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส	
	92	122
รูปแบบที่ 1	A	G
รูปแบบที่ 2	G	C
รูปแบบที่ 3	G	G
รูปแบบที่ 4	G	A

ตารางที่ 4.5 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HP3

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส	
	137	
รูปแบบที่ 1	G	
รูปแบบที่ 2	A	

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HP5

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส	
	227	
รูปแบบที่ 1	M	
รูปแบบที่ 2	G	

หมายเหตุ M = A หรือ C

ตารางที่ 4.7 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HP7

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส	
	179	
รูปแบบที่ 1	G	
รูปแบบที่ 2	A	

ตารางที่ 4.8 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HP8

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส										
	25	33	34	47	53	100	109	115	133	215	232
รูปแบบที่ 1	C	A	G	A	A	G	C	A	T	G	C
รูปแบบที่ 2	C	A	G	A	A	G	C	G	G	G	C
รูปแบบที่ 3	A	Y	W	T	G	T	C	G	T	T	A
รูปแบบที่ 4	C	A	G	A	A	G	T	G	G	G	C

หมายเหตุ Y = C หรือ T, และ W = A หรือ T

ตารางที่ 4.9 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไฟรเมอร์ HP9

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส																			
	27	28	33	40	43	48	49	51	72	118	129	185	198	222	235	236	237	248	258	262
รูปแบบที่ 1	A	C	G	C	C	G	G	C	G	T	A	C	G	C	-	G	A	T	T	G
รูปแบบที่ 2	A	C	G	C	C	G	G	C	C	T	A	A	G	T	C	T	G	T	T	A
รูปแบบที่ 3	A	C	G	C	C	G	G	C	G	T	A	C	G	T	C	G	A	T	T	G
รูปแบบที่ 4	A	C	G	C	C	G	G	C	G	T	A	C	G	T	T	-	G	T	T	A
รูปแบบที่ 5	A	K	G	R	K	C	G	G	G	T	A	C	A	C	C	G	T	M	R	G
รูปแบบที่ 6	S	C	Y	C	K	G	C	C	G	T	Y	C	G	T	T	-	G	T	T	G
รูปแบบที่ 7	A	C	G	C	C	G	G	C	G	T	A	C	G	T	C	G	T	T	T	G
รูปแบบที่ 8	A	C	G	C	C	G	G	C	G	C	A	C	G	T	C	G	A	T	T	G

หมายเหตุ S = C หรือ G, K = G หรือ T, Y = C หรือ T, R = A หรือ G และ M = A หรือ C

ตารางที่ 4.10 ตำแหน่งเบสที่แตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละรูปแบบจากไพรเมอร์ HP10

รูปแบบ SSCP	ตำแหน่งเบส		
	31	32	73
รูปแบบที่ 1	K	Y	G
รูปแบบที่ 2	C	G	T

หมายเหตุ K = G หรือ T และ Y = C หรือ T

### 3.2 ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษายีน HSP70-2 ในโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการจัดเรียงตามรูปแบบ SSCP ในแต่ละไพรเมอร์ของโคแต่ละสายพันธุ์ มาจัดเรียงในโคแต่ละตัว ตามกลุ่มรูปแบบ SSCP (ตารางภาคผนวก ข ที่ 2 และ 3) แล้วตรวจสอบ ความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างโคที่ศึกษาทั้งหมด 122 ตัว มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bos taurus* HSP70-2 gene (GenBank accession number BTU02892) (Grosz, 1993) ประมาณ 96%-98% เมื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคทั้งสองสายพันธุ์ด้วยวิธี Multiple alignment nucleotide จากโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2, BioEdit และ ClustalW2 พบว่ายีน HSP70-2 ในโคทั้งสองสายพันธุ์มีขนาดประมาณ 2,720 bp และมีความหลากหลายในหลายตำแหน่งตลอดทั้งยีน (แสดงในแผ่น CD)

ยีน HSP70-2 ประกอบด้วย บริเวณ 5' flanking region มีขนาด 423bp พบ Invert CCAAT box (70bp-74bp และ 153bp – 157bp), Promoter (100bp – 136bp), SP1 binding site หรือ GC box (172bp – 177bp), HSE (185bp – 190bp), TATA box (192bp – 197bp) ซึ่งในโคทั้งสองสายพันธุ์พบบริเวณดังกล่าวในตำแหน่งเดียวกัน และพบจุดกลายพันธุ์ของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคทั้งสองสายพันธุ์ จำนวน 14 จุด ในตำแหน่งเบสต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.11 ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้การตอบสนอง ต่อความร้อนของโคแตกต่างกันบริเวณ 5' flanking region ของยีน HSP70-2 มีอิทธิพลต่อปริมาณการสร้างโปรตีนในเซลล์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนจำเพาะที่เรียกว่า transcription factors (TF) และเอนไซม์ที่ช่วยให้เกิดการกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) หากบริเวณดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้บริเวณเข้าจับของโปรตีนกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการตั้งต้นถ่ายถอดรหัส DNA แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณและความไวในการสังเคราะห์ mRNA HSP70 ที่แตกต่างกันด้วย (หัตถยา, 2546; Cai et al., 2005 และ Hawkins, 1985)

ตารางที่ 4.11 ตำแหน่งที่เกิดความแตกต่างของเบสในโคพื้นเมืองไทย (NT) และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน (HF) บริเวณ 5'flanking region

สาย	ตำแหน่งเบส													
พันธุ์โค	51	59	65	67	79	84	87	165	253	309	317	320	383	396
NT	A	C	C	C	A/C	G/A	A/T	A/-	C/A	G/A	A/C	G/T	-/G	T/C
HF	A/K	C/W	C/G	C/R	A/C	G/A	A	-	C	G	A	G	G	T

CTCCTGTTTC	CTCCAGCGAA	TCCTAGAAGA	GTCTGGAGAG	TTCTGGGAGG	K	W	C	R	AGAGGGCAICU	AGGGCCCTGA	70
TTGGTTCCAS	AAAGCCARGG	GGCAGGACTI	GAGGCGAARC	CCCIGGAATA	promoter	TTCCCGACCT	GGCAGCCCCA	140			
invert CCAAT											
CTGAGCTCGG	TCATTGGDTG	ACGA-GGGAA	AGGCGGGGCT	TGATGARGAA	TATAAACAC	AGAGCCGCCT	210				
invert CCAAT		R	GC box	HSE	TATA box						
GAGGAGAAAC	AGCAGCCCTG	AGAGAGCTGA	TAAACTTAC	GGCTTASTCC	GTGAGASCAG	CTTCCGCAGA	280				
CCCGCTATCT	CCAGGACCG	CCCCGAGG	CACCCACACG	TTCAGTTTC	GGGTTCCGAA	AGCCCCGAGC	350				
TTCTCGTGGC	AGATCCCTTT	CACCGATTTC	AGTTTGAAG	CTTATTTCGG	AGCCCGAAAA	GCAGGCCACC	420				
GGC							423				

ภาพที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5'flanking region ของยีน HSP70-2 แสดงบริเวณ Invert CCAAT, promoter, SP1 binding site/GC box, HSE, TATA box (ขีดเส้นใต้) และตำแหน่งที่เกิดความแตกต่างของเบสในโคทั้งสองพันธุ์ (ลำดับนิวคลีโอไทด์แถบบนคือโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ลำดับนิวคลีโอไทด์แถวล่างคือ โคพื้นเมืองไทย)

บริเวณ coding sequence ถึง 3'flanking region เริ่มตั้งแต่ตำแหน่งเบสที่ 424-2720 ซึ่งพบ ความหลากหลายตลอดทั้งยีนในโคทั้งสองสายพันธุ์ แต่ตำแหน่งที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างโคพื้นเมืองไทยกับโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนได้อย่างชัดเจน ได้แก่ ตำแหน่ง 1262 ในบริเวณไพรเมอร์ HP5 พบการแทนที่ของเบส M เป็น G และตำแหน่ง 2347 ในบริเวณไพรเมอร์ HP9 พบการแทนที่ของเบส T เป็น C ในโคพื้นเมืองไทยเป็นโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 ไพรเมอร์ครอบคลุมบริเวณ coding sequence ของยีน (ภาพที่ 4.12)



	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	1265            1275            1285            1295            1305            1315            1325
NT1	EMCAGGCTG GAGATCGACT CCGCTTCTGA GGGCATCGAC TTCTACACGT CCATCACCAG GCGGCGGTTC
NT2	EMCAGGCTG GAGATCGACT CCGCTTCTGA GGGCATCGAC TTCTACACGT CCATCACCAG GCGGCGGTTC
HF1	EMCAGGCTG GAGATCGACT CCGCTTCTGA GGGCATCGAC TTCTACACGT CCATCACCAG GCGGCGGTTC
HF2	EMCAGGCTG GAGATCGACT CCGCTTCTGA GGGCATCGAC TTCTACACGT CCATCACCAG GCGGCGGTTC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	2345            2355            2365            2375            2385            2395            2405
NT1	GGTGGATTAG GGGCOTTACT TTTTGTCTGT CTGTAGTAGA CCTATGGACT TTGGTCTTGC CCTATATTTA
NT2	GGTGGATTAG GGGCOTTACT TTTTGTCTGT CTGTAGTAGA CCTATGGACT TTGGTCTTGC CCTATATTTA
HF1	GGTGGATTAG GGGCOTTACT TTTTGTCTGT CTGTAGTAGA CCTATGGACT TTGGTCTTGC CCTATATTTA
HF2	GGTGGATTAG GGGCOTTACT TTTTGTCTGT CTGTAGTAGA CCTATGGACT TTGGTCTTGC CCTATATTTA

ภาพที่ 4.12 Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1260 ถึง 1330 และตำแหน่ง ที่ 2345 ถึง 2405 ของตัวอย่างสุ่มในโคพีนเมืองไทย (NT) 2 ตัว และ โคโฮลสไตน์พีรีเซียน (HF) 2 ตัว แสดงตำแหน่งที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ คือ ตำแหน่ง 1262 ( NT คือ M, HF คือ G) โดย  $M = A$  หรือ  $C$  และตำแหน่ง 2347 (NT คือ T, HF คือ C) (กรอบสี่เหลี่ยม)

ส่วนตำแหน่ง 2515, 2516 และ 2556 (ไพรเมอร์ HP10) (ภาพที่ 4.13) พบการแทนที่ของเบส K เป็น C, Y เป็น G และ G เป็น T ในโคพีนเมืองไทยเป็นโคโฮลสไตน์พีรีเซียน ตามลำดับ ซึ่งครอบคลุมบริเวณ 3'flanking region

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	2455            2465            2475            2485            2495            2505            2515
NT1	CCCTCTAACTA GCTCGATTTT TGTTATTTCT GTATGTTATA GTGAGTGTGT TCACOCAGAAAT GTT KY A TTT
NT2	TCTCTAACTA GCTCTGTTTT TGTTATTTCT GTATGTTATA ATGAGTGTGT TCACOCAGAAAT GTT KY A TTT
HF1	TCTCTAACTA GCTCGATTTT TGTTATTTCT GTATGTTATA GTGAGTGTGT TCACOCAGAAAT GTT CG A TTT
HF2	TCTCTAACTA GCTCGATTTT TGTTATTTCT GTATGTTATA GTGAGTGTGT TCACOCAGAAAT GTT CG A TTT
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	2525            2535            2545            2555            2565            2575            2585
NT1	TCATGCCAAGT TGGTAATAAG GATGGCTTTC CGTGGGTTT TTTTGTTTG TTTC AAGTGA GTCAACACTG
NT2	TCATGCCAAGT TGGTAATAAG GATGGCTTTC CGTGGGTTT TTTTGTTTG TTTC AAGTGA GTCAACACTG
HF1	TCATGCCAAGT TGGTAATAAG GATGGCTTTC CGTGGGTTT TTTTGTTTG TTTC AAGTGA GTCAACACTG
HF2	TCATGCCAAGT TGGTAATAAG GATGGCTTTC CGTGGGTTT TTTTGTTTG TTTC AAGTGA GTCAACACTG

ภาพที่ 4.13 Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2450 ถึง 2590 ของตัวอย่าง สุ่มในโคพีนเมืองไทย (NT) 2 ตัว และโคโฮลสไตน์พีรีเซียน (HF) 2 ตัว แสดงตำแหน่งที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ คือ ตำแหน่ง 2515-2516 (NT คือ KY, HF คือ CG), 2556 (NT คือ G, HF คือ T)(กรอบสี่เหลี่ยม) โดย  $K = G$  หรือ  $T$  และ  $Y = C$  หรือ  $T$

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากการศึกษาครั้งนี้เปรียบเทียบกับยีน HSP70-2 ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์) ด้วยวิธี Multiple alignment nucleotide จากโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2, BioEdit และ ClustalW2 (แสดงในแผ่น CD) พบความหลากหลายในหลายตำแหน่งตลอดทั้งยีน ซึ่งบางตำแหน่งพบเบสที่แตกต่างจากโคที่ใช้ในการศึกษา บางตำแหน่งพบเบสเหมือนกับกลุ่มตัวอย่างจากโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนเพียงกลุ่มเดียว บางตำแหน่งพบเบสเหมือนกับกลุ่มโคพื้นเมืองไทยเพียงกลุ่มเดียว

ดังนั้นตำแหน่งเบสที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ได้แก่ ตำแหน่ง 1262, 2347, 2515, 2516 และ 2556 ซึ่งเป็นบริเวณศึกษาในไพรเมอร์ HP5, HP9 และ HP10 สอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบ SSCP และความสัมพันธ์ของสายพันธุ์โคและความถี่รูปแบบในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ HP1, HP5, HP8, HP9 และ HP10 เป็นไพรเมอร์ที่มีรูปแบบ SSCP จำเพาะในโคสายพันธุ์โคสายพันธุ์หนึ่ง อีกทั้งสายพันธุ์โคมีอิทธิพลต่อรูปแบบที่เกิดจากไพรเมอร์ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แต่ไพรเมอร์ HP1 พบรูปแบบ SSCP ในโคพื้นเมือง 4 รูปแบบ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียน 2 รูปแบบ ส่วนไพรเมอร์ HP8 พบรูปแบบ SSCP ในโคพื้นเมืองไทย 2 รูปแบบ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียน 2 รูปแบบ เมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณไพรเมอร์ทั้งสองพบตำแหน่งเบสที่แยกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ได้ไม่ชัดเจน ส่วนไพรเมอร์ HP9 พบรูปแบบ SSCP ในโคพื้นเมืองไทย 7 รูปแบบ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์หลากหลาย แต่ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนพบรูปแบบ SSCP เพียง 1 แบบ และมีตำแหน่งเบสที่แยกความแตกต่างจากโคพื้นเมืองอย่างชัดเจน จึงกล่าวได้ว่าตำแหน่งเบสในไพรเมอร์ HP5, HP9 และ HP10 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ได้

ความแตกต่างของตำแหน่งเบสในไพรเมอร์ HP5 ซึ่งเป็นบริเวณ coding sequence มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน พบการแทนที่ของเบสที่ตำแหน่ง 1262 โดยโคพื้นเมืองไทยเป็นเบส M ซึ่งเป็นสัญลักษณ์แทนเบส A หรือ C โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนเป็นเบส G เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่าโคพื้นเมืองไทยที่ตำแหน่งเบสดังกล่าวเป็นเบส A จะได้กรดอะมิโนชนิด Thr และหากเป็นเบส C จะได้กรดอะมิโนชนิด Pro ส่วนโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนตำแหน่งเบสดังกล่าวเป็นเบส G เมื่อแปลรหัสจะได้กรดอะมิโนชนิด Ala โดยตำแหน่งเบสดังกล่าวเป็นรหัสพันธุกรรม (codon) ตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่กำหนดชนิดของกรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งนี้จึงทำให้การแปลรหัสพันธุกรรมเป็นกรดอะมิโนเปลี่ยน (missense mutation) อาจส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนและการขดม้วนตัวแตกต่างกันเป็นการกลายพันธุ์ที่แสดงผลให้เห็นความผิดปกติของโปรตีน (สุริพร, 2548; อมรธา, 2546 และ ปรีชา, 2545)

ไพรมอร์ HP9 แม้ช่วงศึกษาจะครอบคลุมบริเวณ coding sequence ส่วนปลายรวมถึง 3'flanking region ส่วนต้น แต่ความแตกต่างของตำแหน่งเบสที่พบ คือ ตำแหน่ง 2347 อยู่ในบริเวณ coding sequence ของยีน โดยโคพื้นเมืองไทยเป็นเบส T โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนเป็นเบส C เมื่อแปลรหัส เป็นกรดอะมิโน พบว่าที่ตำแหน่งเบสดังกล่าวในโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนได้ กรดอะมิโนชนิด Asp เหมือนกัน โดยตำแหน่งเบสดังกล่าวเป็นรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 3 ซึ่งเป็น ตำแหน่งที่มีผลต่อการกำหนดชนิดของกรดอะมิโนน้อยกว่า 2 ตำแหน่งแรก การเปลี่ยนแปลงของเบส ในตำแหน่งนี้ จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนของกรดอะมิโน (silent substitution) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่งเบสแต่ผลผลิตโปรตีนปกติ (สุริพร, 2548; อมรา, 2546 และ ปรีชา, 2545)

การพบความแตกต่างของตำแหน่งเบสในไพรมอร์ HP5 และ HP9 ที่มีผลต่อ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนแตกต่างกันในโคสองสายพันธุ์ ทำให้โปรตีนจากยีน HSP70-2 มีการหมุนและขดม้วนตัวของโปรตีนต่างกัน เป็นผลให้ตำแหน่งการเข้าจับกับโปรตีนชนิดอื่น เปลี่ยนแปลงไป การทำงานของโปรตีนในโคสองสายพันธุ์จึงแตกต่างกัน

ความแตกต่างของตำแหน่งเบสในไพรมอร์ HP10 ที่ตำแหน่ง 2515, 2516 และ 2556 ซึ่งเป็นบริเวณ 3'flanking region ของยีนแม้ไม่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน และปริมาณการสังเคราะห์ mRNA แต่มีอิทธิพลต่อกระบวนการ post-transcriptional gene ทำให้ การคัดลอก mRNA สมบูรณ์ยิ่งขึ้น สามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีนได้ดีและไม่ถูกทำลายโดยง่าย สอดคล้องกับงานทดลองของ Adamowicz et al. (2005) ศึกษา SNPs ใหม่บริเวณ 3'-UTR ของยีน HSP70-1 ใน *Bos taurus* และ *Bos indicus* พบว่ามีการแทรกของเบส G และเบส C หรือการแทนที่เบส U/A บางตำแหน่งเป็นผลให้ mRNA สมบูรณ์ยิ่งขึ้น แต่ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณการสังเคราะห์ mRNA HSP70

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคที่ศึกษาไปเปรียบเทียบกับยีนต้นแบบจากฐานข้อมูล พบว่า ที่ตำแหน่ง 1262, 2347, 2515, 2516 และ 2556 ของยีนต้นแบบพบเบสเหมือนกับเบสของ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ที่ใช้ในการศึกษา จึงกล่าวได้ว่ากลุ่มโคเขตหนาวอาจมีตำแหน่งเบสที่สามารถ แยกความแตกต่างจากโคพื้นเมือง ไทยได้จากตำแหน่งเบสดังกล่าวได้

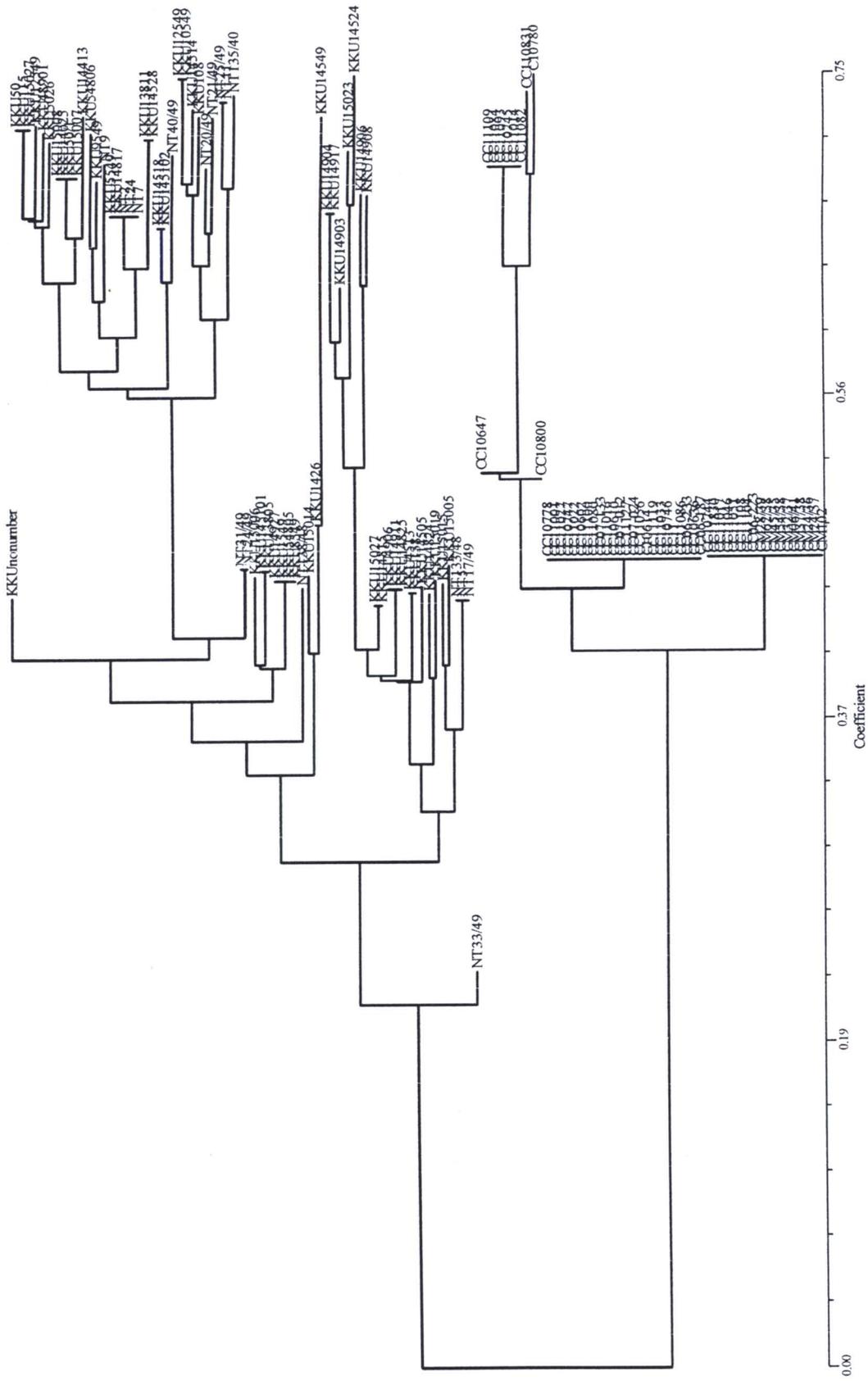
เมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70-2 ในโคทั้งสองสายพันธุ์พบความ หลากหลายตลอดทั้งยีนที่ศึกษาและพบตำแหน่งเบสที่แตกต่างกันในโคแต่ละพันธุ์ โดยบริเวณที่พบ ความหลากหลายมีอิทธิพลต่อปริมาณและความไวในการสังเคราะห์ mRNA การแปลรหัส และ กระบวนการ post-transcription ของยีน HSP70-2 ซึ่งความหลากหลายที่พบอาจจะเป็นปัจจัยที่ส่งผล ต่อการตอบสนองของยีน HSP70-2 ในโคต่างกัน และอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้โคสามารถทนร้อนใน ระดับโมเลกุลและการตอบสนองความร้อนทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน

### 3.3 การจำแนกกลุ่มด้วยค่าความต่างทางพันธุกรรมและสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

การศึกษาจำแนกกลุ่มพันธุกรรมเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน HSP70-2 ในโคสองสายพันธุ์ ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลของรูปแบบ SSCP ที่ปรากฏในแต่ละไพรเมอร์จากโคแต่ละตัว และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคแต่ละตัว ได้ผลดังต่อไปนี้

#### 3.3.1 การจำแนกกลุ่มพันธุกรรมรายตัวจากรูปแบบ SSCP โดย NTSYSpc 2.1

นำรูปแบบ PCR-SSCP ที่ปรากฏในโคทั้งสองสายพันธุ์มาแปลงข้อมูลเป็น 0 หรือ 1 (binary data) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1 โดยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining (NJ) ซึ่งค่าความเหมือนทางสถิติอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.75 สามารถจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคจากข้อมูลรูปแบบ SSCP ออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.14) ประกอบด้วยกลุ่มรูปแบบ SSCP ที่ได้จากโคพื้นเมืองไทย และกลุ่มรูปแบบ SSCP ที่ได้จากโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ซึ่งโคที่มีกลุ่มรูปแบบ SSCP คล้ายกันจะถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกัน โดยภายในกลุ่มโคพื้นเมืองไทยแบ่งกลุ่มย่อยได้ 44 กลุ่ม พบข้อมูลของโคจากหมวดโคเนื้อ และจากหน่วยบำรุงพันธุ์สัตว์บุนทรินั้นกระจายในกลุ่มต่างๆ ส่วนกลุ่มโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน แบ่งได้ 6 กลุ่ม พบว่ากลุ่ม 1 ถึง กลุ่ม 6 มีการกระจายตัวของข้อมูลโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนจากฟาร์มโชคชัยทุกกลุ่ม ส่วนข้อมูลโคจากเชียงใหม่พบการกระจายตัวของข้อมูลในกลุ่ม 6 เท่านั้น เมื่อพิจารณาจากการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมโดยใช้รูปแบบ SSCP พบว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างของยีน HSP70-2 ระหว่างสายพันธุ์โคได้ เนื่องจากในไพรเมอร์ HP1, HP5, HP8, HP9 และ HP10 มีรูปแบบ SSCP เฉพาะในสายพันธุ์โค การแทนค่าการปรากฏของรูปแบบ (แทนค่า = 1) ใน binary data พบเฉพาะในโคสายพันธุ์เดียว ส่งผลให้สามารถจัดกลุ่มพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน กลุ่มโคพื้นเมืองที่ได้แหล่งประชากรมาจากต่างถิ่นกระจายตัวในกลุ่มต่างๆ และข้อมูลจากโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนจากเชียงใหม่ แม้มีการกระจายตัวในกลุ่มที่ 6 เพียงกลุ่มเดียว แต่ก็พบการกระจายตัวของข้อมูลที่มาจากฟาร์มโชคชัย อยู่ในกลุ่มที่ 6 เช่นกัน ดังนั้นกลุ่มของโคที่มาจากต่างที่กันนั้นสามารถใช้เป็นตัวแทนของประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคอีสานและประชากรโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนในประเทศไทยได้



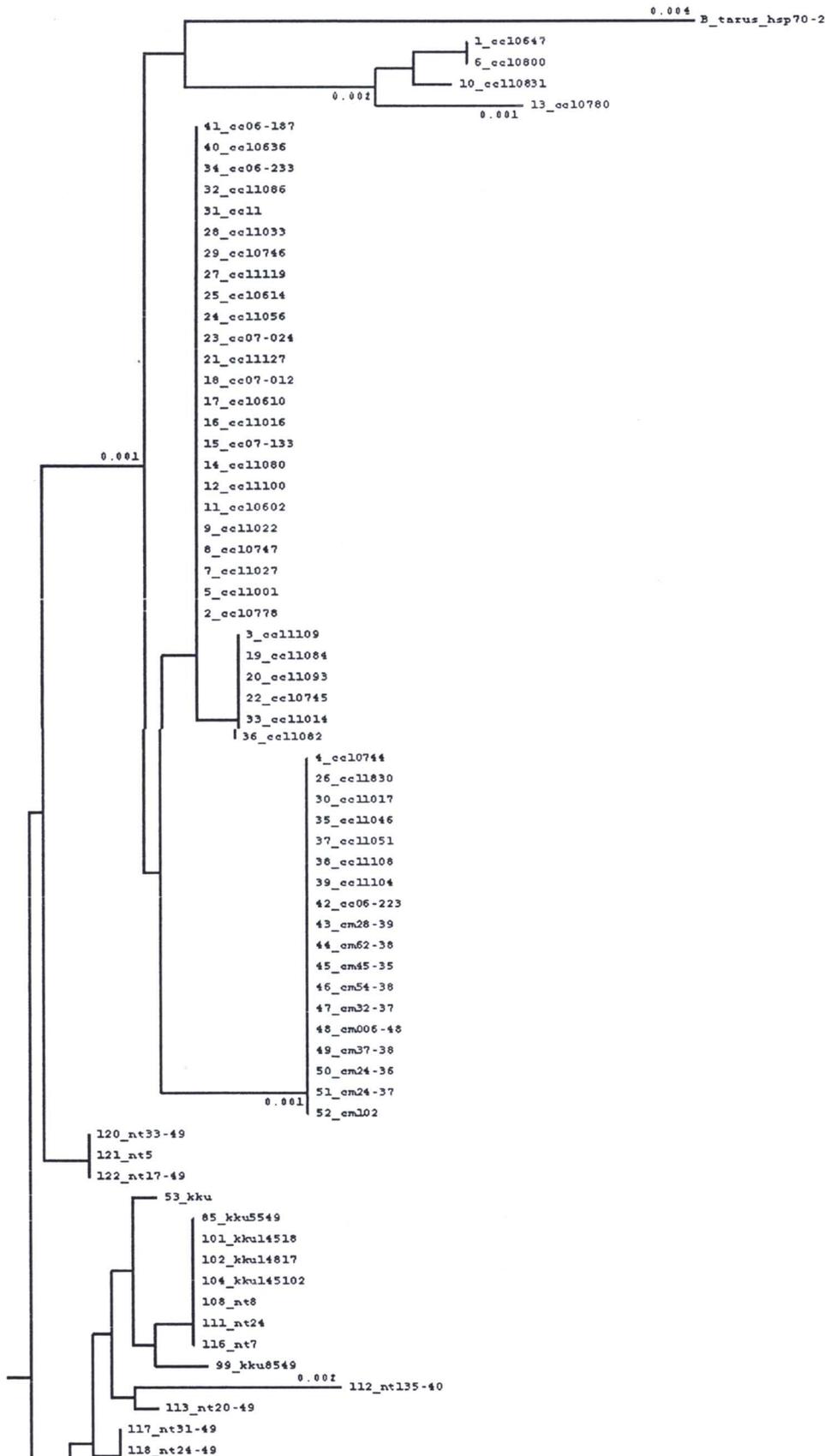
ภาพที่ 4.14 การจัดกลุ่มพันธุกรรมโครมาตจากข้อมูลรูปแบบ SSCP โดยวิธี NJ ด้วย NTSYSpc 2.1

### 3.3.2 การจำแนกกลุ่มพันธุกรรมรายตัวจากลำดับนิวคลีโอไทด์โดย DNAMAN version 5.2.2

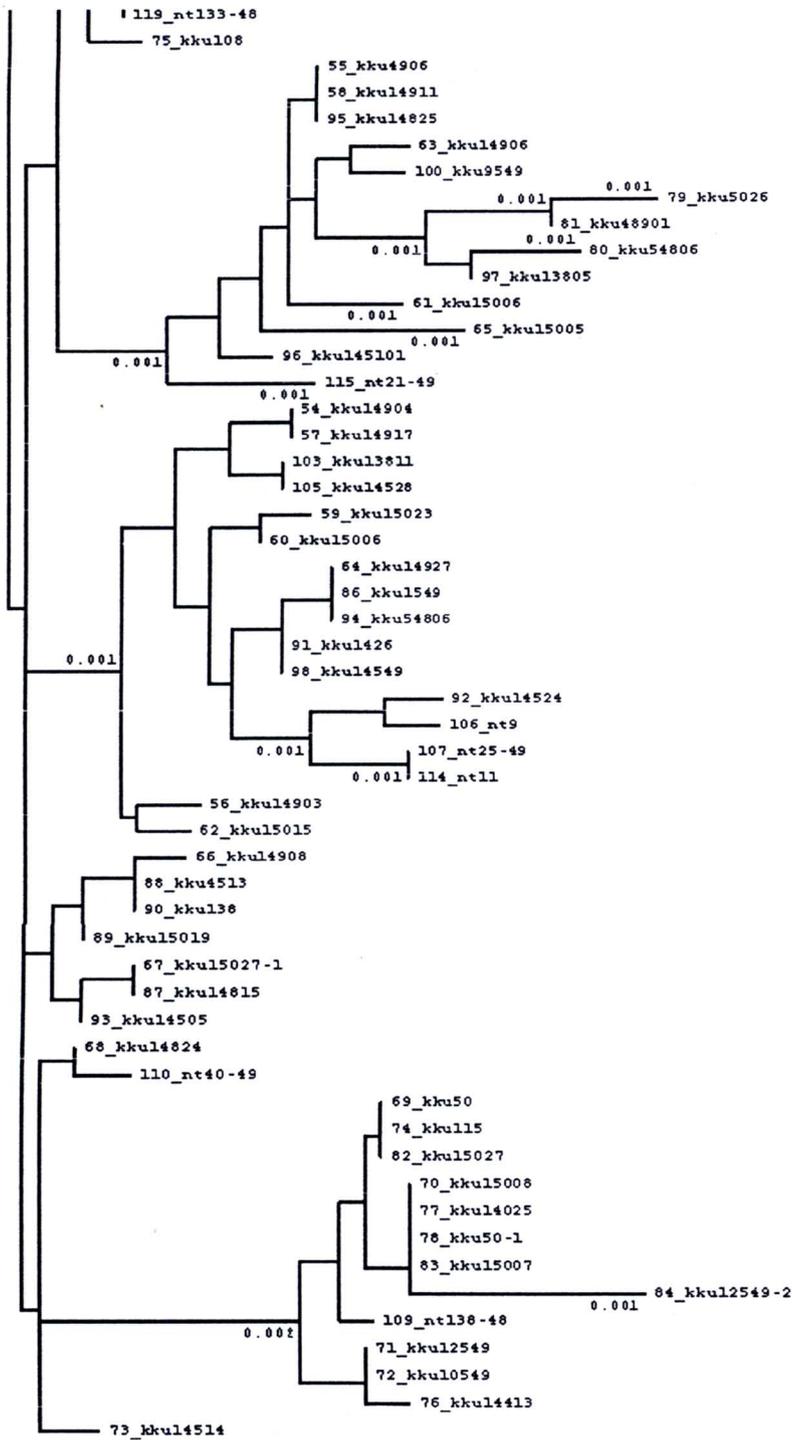
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 3.2 มาทำการวิเคราะห์ค่าความต่างทางพันธุกรรมรายตัวโดยใช้โปรแกรม DNAMAN version 5.2.2 และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining (NJ) สามารถจำแนกกลุ่มโคที่ใช้ในการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคพื้นเมืองไทย และ กลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน โดยภายในกลุ่มโคพื้นเมืองไทยสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 44 กลุ่ม ส่วนกลุ่มโคโฮลสไตน์ฟรีเชียนสามารถแบ่งได้ 6 กลุ่มเช่นเดียวกับผลของข้อ 3.1.1 โดยแต่ละเป็นกลุ่มจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันภายในกลุ่ม ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณไพรเมอร์ HP5, HP9 และ HP10 มีตำแหน่งเบสที่แยกโคทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมด้วยรูปแบบ SSCP เมื่อพิจารณาผลการศึกษากการจำแนกกลุ่มพบว่าสามารถใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นตัวแทนของข้อมูลจากรูปแบบ SSCP และใช้เป็นตัวแทนของประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคอีสานและโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน

จากนั้นนำข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างโคที่ศึกษามาสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับยีน HSP70-2 ต้นแบบ เพื่อวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bos taurus* HSP70-2 gene ในฐานข้อมูล GeneBank (ที่ใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา) สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มเช่นกัน คือ กลุ่มโคพื้นเมืองไทย และกลุ่มโคโฮลสไตน์ฟรีเชียนกับยีน HSP70-2 จากฐานข้อมูล (ภาพที่ 4.15) ซึ่งเป็นโคที่อยู่สายพันธุ์ *Bos taurus* เหมือนกัน ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกัน น่าจะมีความเกี่ยวข้องกันในทางวิวัฒนาการ โดยลำดับที่เหมือนกันมากกว่าจะมีระยะห่างทางวิวัฒนาการใกล้กันกว่าลำดับที่ต่างกัน (สุรินทร์, 2552 และ ปรีชา, 2551) สอดคล้องกับผลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70-2 จากข้อ 3.2 ในกลุ่มโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากโคโฮลสไตน์ฟรีเชียนอย่างเห็นได้ชัด จึงสามารถแยกกลุ่มกับโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน (*Bos taurus*) ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่โคโฮลสไตน์ฟรีเชียนเป็นโคในกลุ่มสายพันธุ์เดียวกันกับโคที่ใช้ยีน HSP70-2 เป็นต้นแบบในฐานข้อมูล จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้

เมื่อพิจารณาจาก Phylogenetic tree ระหว่างโคสองสายพันธุ์พบว่าโคพื้นเมืองไทยเป็นโคที่อาศัยอยู่ในสภาพอากาศร้อนมาช้านานแล้ว จึงมีวิวัฒนาการในการปรับเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ให้เหมาะสมกับตัวของสัตว์เอง เพื่อให้อยู่รอดในสภาพอากาศดังกล่าวได้ ในขณะที่โคโฮลสไตน์ฟรีเชียนมีถิ่นกำเนิดในเขตสภาพอากาศหนาวเย็น แม้จะพบโคพันธุ์นี้เกิดในประเทศเขตร้อน แต่การพัฒนาของยีน HSP70-2 ยังไม่เท่ากับโคที่อาศัยอยู่ในเขตร้อน



ภาพที่ 4.15 การจัดกลุ่มพันธุกรรมโครายตัวจากลำดับนิวคลีโอไทด์โดย DNAMAN version 5.2.2



ภาพที่ 4.15 การจัดกลุ่มพันธุกรรมโครยอตัวจากลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNAMAN version 5.2.2 (ต่อ)

### 3.3.3 การสร้างแผนภาพวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างโคที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน HSP70 ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยสุ่มตัวอย่างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กลุ่มย่อย 1 ตัวอย่าง/กลุ่มย่อย ทั้งหมด 50 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างโคที่ใช้ในการศึกษานี้กับยีน HSP70 ในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์จากกลุ่มตัวอย่างสุ่มมาเปรียบเทียบกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (*Bos taurus*, buffalo, chicken, human, pig, rat, mouse, playfish และ tilapia) ในฐานข้อมูล GenBank (accession number U02891, U02892, L10428, EU699315, AY143693, M59830, M59828, AY466608, M69100, X77207, X77208, EF100780, AB062113 และ AJ001312) ตามงานวิจัยของ Yamashita et al. (2004) และ Huang et al. (2002) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 4.16) ประกอบด้วยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Bos taurus* HSP70-1, *Bos taurus* HSP70-2, ตัวอย่างสุ่มจากการศึกษานี้, pig HSP70, buffalo HSP70, human HSP70-1, human HSP70-2, mouse HSP70, rat HSP70-1, rat HSP70-2 และ pig HSP70.2 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย playfish HSP70 และ tilapia HSP70 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Bos taurus* HSP70-3 และ chicken HSP70-2 ซึ่งจากแผนภาพ phylogenetic tree พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างสุ่มมีความคล้ายคลึงกับยีน *Bos taurus* HSP70-2 มากที่สุดเนื่องจากยีน *Bos taurus* HSP70-2 เป็นยีนต้นแบบที่ใช้ในการศึกษา จึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด รองลงมาคือยีน HSP70 ในสิ่งมีชีวิตอื่นภายในกลุ่ม เนื่องจากเป็นยีน HSP70 ในกลุ่ม inducible เหมือนกัน เมื่อร่างกายถูกกระตุ้นด้วยความร้อนจะมีการผลิตโปรตีนกลุ่มนี้อย่างรวดเร็ว เพื่อขนส่ง ป้องกัน ซ่อมแซม และรักษาสภาพโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ของระบบ MHC-linked (major histocompatibility complex-linked) ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย กระบวนการเพิ่มและแบ่งตัวของเซลล์หรือวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) และกระบวนการสร้างอสุจิใน testis ให้ทำงานเป็นปกติ จึงถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนอีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 2 เป็นยีน HSP70 inducible ที่มีบทบาทต่อระบบ MHC-linked ในสัตว์น้ำ ซึ่งมีวิวัฒนาการต่างจากสัตว์ที่อาศัยอยู่บนบก แม้ว่าการทำงานของกลุ่มยีนจะคล้ายกัน และกลุ่มที่ 3 เป็นยีน HSP70 ในกลุ่ม constitutive ซึ่งมีการสังเคราะห์ของโปรตีน HSP70 แตกต่างจากกลุ่มอื่น ทำให้ค่าความต่างทางพันธุกรรมต่างกันมาก การจัดกลุ่มของ phylogenetic tree จึงต่างกัน



### 3.4 ผลการวิเคราะห์เอนไซม์ตัดจำเพาะ

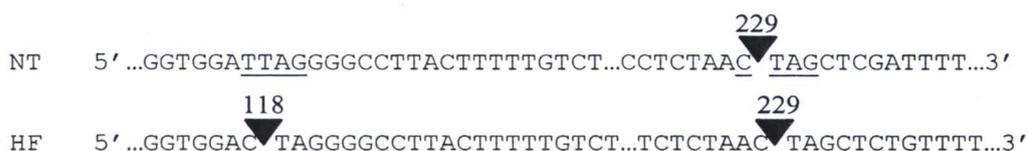
การวิเคราะห์เอนไซม์ตัดจำเพาะจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อเป็นแนวทางในการหาเอนไซม์ที่สามารถตัดบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างของโคสองสายพันธุ์ ได้ผลดังต่อไปนี้

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อ 3.3.2 มาวิเคราะห์หาเอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์ของโคพื้นเมืองไทยแตกต่างจากโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ได้แก่ ตำแหน่ง 1262, 2347, 2515, 2516 และ 2556 (ภาพที่ 4.12 และ 4.13) ด้วยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2 และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NEB cutter v2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) ทดสอบด้วยเอนไซม์ 182 ชนิด พบเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดที่สามารถตัดตำแหน่งเบสที่แยกความแตกต่างของโคสองสายพันธุ์ ได้แก่

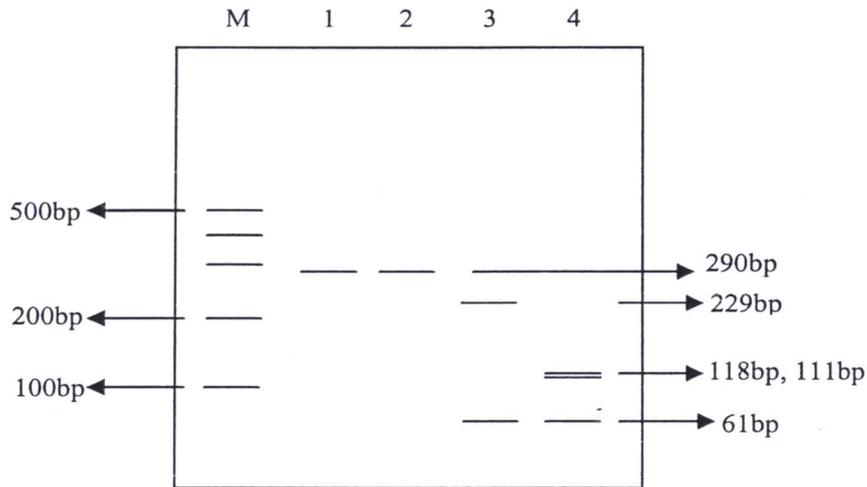
3.4.1 เอนไซม์ BfaI มีบริเวณตัดจำเพาะดังภาพที่ 4.17 สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงไพรเมอร์ HP9 (290bp) โคพื้นเมืองไทยสามารถได้ 1 ตำแหน่ง คือ 2458 (ตำแหน่งที่ 229) เมื่อตัดแล้ว จะได้ DNA 2 แแถบ โดยมีขนาด 229bp และ 61bp ส่วนตำแหน่ง 2347 (ตำแหน่งที่ 118) เป็นตำแหน่งที่พบความแตกต่างของเบสระหว่างโคสองพันธุ์ ไม่สามารถตัดได้ เนื่องจากพบเบส T ในโคพื้นเมืองไทยซึ่งไม่ตรงกับตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ BfaI ส่วนโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนสามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง คือ 2347 (ตำแหน่งที่ 118) และ 2458 (ตำแหน่งที่ 229) เมื่อตัดแล้วจะได้ DNA 3 แแถบซึ่งมีขนาด 118bp, 111bp และ 61bp ดังภาพที่ 4.18 และภาพที่ 4.19



ภาพที่ 4.17 บริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ BfaI

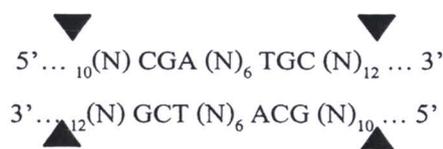


ภาพที่ 4.18 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ BfaI (ขีดเส้นใต้) ในลำดับนิวคลีโอไทด์โคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน



**ภาพที่ 4.19** ภาพจำลองเจลของการตัดด้วยเอนไซม์ BfaI โดยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2  
 เลนที่ 1 คือ PCR product ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ BfaI ในโคพื้นเมืองไทย  
 เลนที่ 2 คือ PCR product ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ BfaI ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน  
 เลนที่ 3 คือ PCR product หลังตัดด้วยเอนไซม์ BfaI ในโคพื้นเมืองไทย  
 เลนที่ 4 คือ PCR product หลังตัดด้วยเอนไซม์ BfaI ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

3.4.2 เอนไซม์ BcgI มีบริเวณตัดจำเพาะดังภาพที่ 4.20 สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงไพรเมอร์ HP10 (238bp) โดยโคพื้นเมืองไทยไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ BcgI เนื่องจากเบส CGA ของเอนไซม์เป็นตำแหน่งจำเพาะ แต่ตำแหน่งเบสของโคพื้นเมืองไทยคือ KYA ซึ่งเป็นสัญลักษณ์แทนเบส (K = G หรือ T, Y = C หรือ T) ไม่ตรงกับตำแหน่งจำเพาะของเอนไซม์ ดังนั้น DNA ที่ปรากฏจึงมี 1 แถบ มีขนาด 236bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับแถบ DNA ก่อนถูกตัดด้วยเอนไซม์ BcgI ส่วนโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนสามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง 2505 (ตำแหน่งที่ 20) และ 2539 (ตำแหน่งที่ 54) ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะของเอนไซม์ที่ครอบคลุมตำแหน่งเบส 2515 และ 2516 ซึ่งเป็นเบสที่พบความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ เมื่อตัดแล้วจะได้ DNA 3 แถบ มีขนาด 182bp, 34bp และ 20bp ดังภาพที่ 4.21 และภาพที่ 4.22

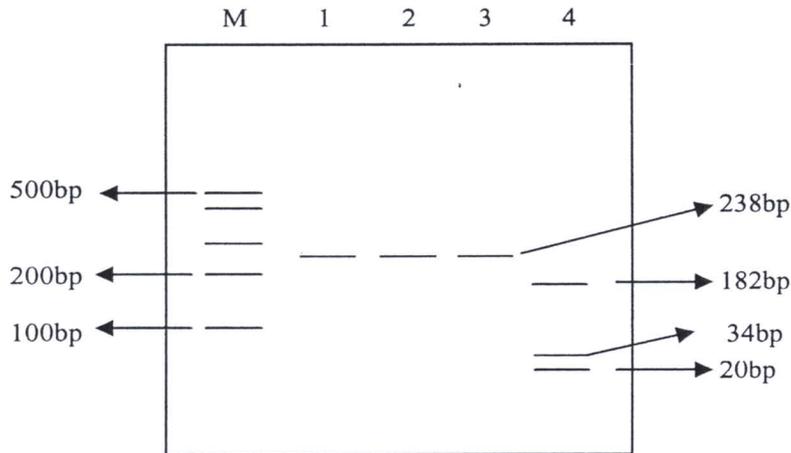


**ภาพที่ 4.20** บริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ BcgI

NT 5'...GTGAGTGTGTTCCACCAGAATGTTTT**KYA**TTTTTCAT**GC**CAAGTTGGTAATAAGGATGGCTTTC...3'

HF 5'...GTGAGTGTGTTCCAC▼CAGAATGTTTT**CGA**TTTTTCAT**GC**CAAGTTGGTAATA▼AGGATGGCTTTC...3'

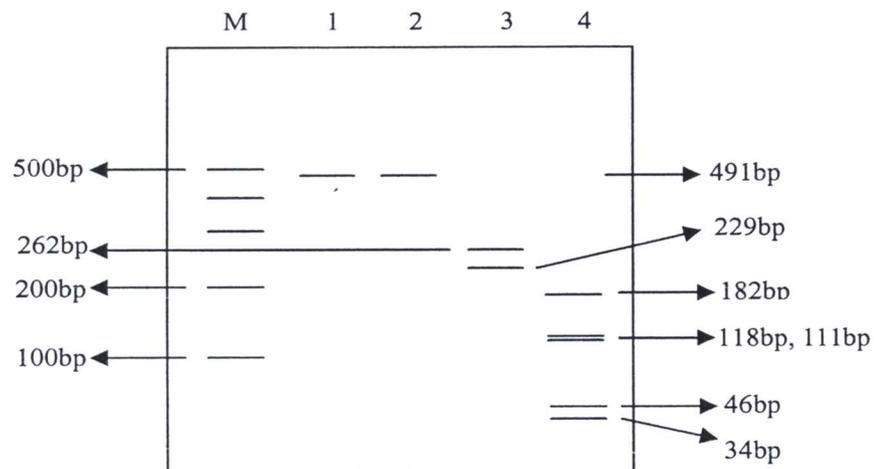
ภาพที่ 4.21 ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ BcgI (ขีดเส้นใต้) ในลำดับนิวคลีโอไทด์โคพื้นเมืองไทย และโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน



ภาพที่ 4.22 ภาพจำลองผลการตัดด้วยเอนไซม์ BcgI โดยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2  
 เลนที่ 1 คือ PCR product ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ BcgI ในโคพื้นเมืองไทย  
 เลนที่ 2 คือ PCR product ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ BcgI ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน  
 เลนที่ 3 คือ PCR product หลังตัดด้วยเอนไซม์ BcgI ในโคพื้นเมืองไทย  
 เลนที่ 4 คือ PCR product หลังตัดด้วยเอนไซม์ BcgI ในโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน

เมื่อพิจารณาจากเอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณที่ตัด พบว่าสามารถเลือกศึกษาเอนไซม์ 1 ชนิด หรือ 2 ชนิดพร้อมกันได้ การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวในการศึกษาควรเลือกช่วงไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ เอนไซม์ BfaI ควรใช้ช่วงศึกษาไพรเมอร์ HP9 หรือเอนไซม์ BcgI ควรใช้ช่วงศึกษาไพรเมอร์ HP10 ในกรณีที่ต้องการใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันควรใช้ช่วงศึกษาไพรเมอร์ HP9 ร่วมกับ HP10 ซึ่งมีขนาด 491bp โดยเอนไซม์จะตัดตำแหน่งเบสที่แยกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ได้ โดยในโคพื้นเมืองไทยสามารถตัดได้ 1 ตำแหน่งคือ 2458 (ตำแหน่งที่ 229) เมื่อตัดแล้วจะได้ DNA 2 แถบ มีขนาด 262bp และ 229bp ส่วนโคโฮลสไตน์ฟรีเซียนสามารถตัดได้ 3 ตำแหน่งคือ 2347 (ตำแหน่งที่ 118), 2458 (ตำแหน่งที่ 229), 2515 (ตำแหน่งที่ 275) และ 2516 (ตำแหน่งที่ 309) จะทำให้ได้ DNA 5 แถบ มีขนาด 182bp, 118bp, 111bp, 46bp และ 34bp ดังภาพที่ 4.23

ดังนั้นบริเวณไพรเมอร์ HP9 และ HP10 สามารถแยกความแตกต่างของโคลงสายพันธุ์ด้วยเอนไซม์ BfaI และ BcgI ได้ และอาจใช้เป็นบริเวณศึกษา marker สำหรับแยกความแตกต่างของยีน HSP70-2 ระหว่างโคพื้นเมืองไทยกับโคโฮลสไตน์พีรีเซียนได้



**ภาพที่ 4.23** ภาพจำลองเงลของการตัดด้วยเอนไซม์ BfaI และ BcgI โดยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2

เลนที่ 1 คือ PCR product ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ BfaI และ BcgI ในโคพื้นเมืองไทย

เลนที่ 2 คือ PCR product ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ BfaI และ BcgI ในโคโฮลสไตน์พีรีเซียน

เลนที่ 3 คือ PCR product หลังตัดด้วยเอนไซม์ BfaI และ BcgI ในโคพื้นเมืองไทย

เลนที่ 4 คือ PCR product หลังตัดด้วยเอนไซม์ BfaI และ BcgI ในโคโฮลสไตน์พีรีเซียน