บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PRL* และทดสอบอิทธิพลของยีน *PRL* ต่อความสามารถในการให้ผลผลิตไข่ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ ประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PRL* ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ การทดลองที่ 2 การทดสอบอิทธิพลของจีโนไทป์ยีน *PRL* ต่อความสามารถในการให้ผลผลิตไข่ของเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มดำเนินการ ธันวาคม 2555 - พฤษภาคม 2557

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มสาธิตเลี้ยงสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PRL* ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์

1) สัตว์ทดลอง

สุ่มเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์สำหรับเก็บข้อมูลการให้ผลผลิตไข่ร่วมกับการตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของเป็ดไข่จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ตามคำแนะนำของ Mi Yeon Shim and Gene M. Pesti (2013) จำนวนตัวอย่างทดลองของงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ปีกควรจะใช้สัตว์ทดลองจำนวน 50 ตัว ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์จำนวน 60 ตัว ทำการศึกษา 2 ระยะการทดลอง ระยะแรกเป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PRL* ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์จำนวน 60 ตัว (กลุ่มเป้าหมาย) และระยะที่ 2 เป็นการนำผลการศึกษาในระยะแรกมาทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์ต่อผลผลิตไข่อีกครั้งโดยการเลี้ยงเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์จำนวน 60 ตัว โดยที่เป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์แต่ละตัวได้รับอาหารสำเร็จรูปประมาณ 150 กรัมต่อตัวต่อวันตามคำแนะนำของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ และได้รับน้ำอย่างเต็มที่

2) การจำแนกจีโนไทป์ของยีน Prolactin ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์

1. การเก็บตัวอย่างเลือดเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้ปีก (wing vein) ปริมาตร 500-1500 ไมโครลิตร ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 22 ที่ประกอบกับกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ขั้นตอนการ

เก็บตัวอย่างโดยการทำความสะอาดผิวหนังบริเวณเส้นเลือด wing vein ด้วยสำลีชุบ 70 % แอลกอฮอล์ และสอดเข็มเข้าเส้นเลือดเจาะเก็บตัวอย่างเลือด และย้ายตัวอย่างเลือดลงบรรจุใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 0.5 M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายในกล่องโฟมเพื่อใช้สำหรับสกัด genomic DNA ต่อไป

2. การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์

สกัด DNA จากตัวอย่างเลือดเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ ใช้อุปกรณ์และสารเคมี ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยง (micro centrifuge), microtube 1.5 มิลลิลิตร, micropipette, microtip, Water bath, 0.9% NaCl, 1% Proteinase K, 7.5M Na-acetate, 5M GuHCl, Absolute Isopropanol, 75% Ethanol, TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) มีขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอดังนี้

สกัดดีเอ็นเอมีขั้นตอนดังนี้ ดูดตัวอย่างเลือดเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ 50-100 ไมโครลิตร ใส่หลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ RO ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากันด้วยการ vortex เบาๆ จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นเติม 20% SDS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร, 1% Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, 7.5M Na-acetate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 5M GuHCl ปริมาตร 625 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex เบาๆ นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-6 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 600-700 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Absolute Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆให้สารเข้ากันจนเห็นเส้นดีเอ็นเอหรือตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอน เติม 75% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะตะกอน (ทำซ้ำอีกครั้ง) ผึ่งตะกอนให้แห้งประมาณ 30 นาที หลังตะกอนแห้งแล้วเติมสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลานาน 3-6 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 5 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ตรวจสอบคุณภาพ DNA ด้วย agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพ DNA ที่ได้โดยใช้ DNA 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับ 1X loading dye 3 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมบนแผ่น 0.8% agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกขนาด DNA ใน 0.5X TAE buffer ผ่านสนามไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำ agarose gel ไปย้อมด้วย gel star (Gelstar INC. NY) นาน 20 นาที และสังเกตแถบ DNA ที่แยกได้ภายใต้แสง UV โดยแถบ DNA ที่มีความเข้มคมชัด แสดงถึง ปริมาณ DNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ ไม่มีโปรตีนปนเปื้อน ส่วนแถบ DNA ที่ไม่มีความเข้มและแถบที่ได้ไม่ชัดเจน แสดงถึงปริมาณ genomic DNA ที่สกัดได้มีโปรตีนปนเปื้อน ซึ่งหากมีการปนเปื้อนสูงจะเริ่มขั้นตอนการสกัด genomic DNA ใหม่อีกครั้งเพื่อให้ได้ DNA ที่บริสุทธิ์หรือวัดจากเครื่อง Nanovue Plus โดยดีเอ็นเอที่มีค่า OD น้อยกว่า 1.65 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีโปรตีนปนเปื้อน OD อยู่ระหว่าง

1.65-1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ OD มากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน หากดีเอ็นเอยังไม่บริสุทธิ์อาจจะต้องสกัดดีเอ็นเอใหม่อีกครั้ง

4. การเพิ่มชิ้นส่วนยีน *PRL* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการตรวจสอบยีนไข่ดกในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ด้วยยีนโพรแลคติน (*PRL*) มีวิธีการดังนี้ นำ genomic DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มชิ้นส่วนยีนโดยใช้เทคนิค PCR ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ที่มีความเข้ม 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR-buffer 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ 0.8 ไมโครลิตร, dNTPs (1.0 mM/each) 1 ไมโครลิตร, Primer forward และ Primer reverse ของแต่ละคู่อย่างละ 1 ไมโครลิตร แสดงดังตารางที่ 3.1, 5 U/µl Taq DNA Polymerase 0.1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย sterile water ให้มีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 10 ไมโครลิตร โดยมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ รายละเอียดดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Primer annealing ของแต่ละไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.1 เป็นเวลา 30 วินาที Primer extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และ Final extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนยีนแล้วทำการเก็บรักษา PCR-Product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบชิ้นยีนที่ต้องการต่อไป

ตารางที่ 3.1 Primer sequence ของไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Region
PRL-F1	AAATTCCCTCTCACAGTTACA	5' flanking region and
PRL-R1	GATGCAGAGACAAGTTTCACC	intron 1
PRL-F2	AATCGAATGACTATGCTTGCC	exon 2
PRL-R2	TACTGAAGGGATTTTTATATG	
PRL-F3	CTTTTAGTGCTGACCATTGTT	intron 2
PRL-R3	CCCTCCGCTCTATCTCACACT	
PRL-F4	AAATAAATTCCTAGATCTCTG	exon 4 and intron 4
PRL-R4	TAACTGAATCTGAGAACTTTG	
PRL-F5	TGCAAACCATAAAAGAAAAGA	exon 5 and 3' flanking
PRL-R5	CAATGAAAAGTGGCAAAGCAA	region

ที่มา: Cui *et al.* (2011)

ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ถูกออกแบบด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Oligo 7 primer analysis software ให้มีความจำเพาะกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน PRL ในเป็ดที่มีการรายงานฐานข้อมูล GeneBank Accession no: AB158611 ด้วยการออกแบบโดย Rychlik (2007)

5. การตรวจเช็ค PCR-Product ยีน *PRL* ด้วย agarose gel electrophoresis

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนยีนที่ต้องการทำการตรวจสอบ PCR-Product ด้วย 2 % agarose gel โดยใช้ PCR-Product 2 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันกับ 1X loading dye 4 ไมโครลิตร หยอดลงหลุมบนแผ่น 2% agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่น 2% agarose gel ที่ได้ไปย้อมด้วย Gelstar (Gelstar INC.NY) นานประมาณ 5-10 นาที ทำการบันทึกภาพแถบ DNA ภายใต้แสง UV

6. การย่อย PCR-Product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

หลังจากที่ได้ PCR-product ของยีน *PRL* ทำการจำแนกความหลากหลายของยีน *PRL* ที่จำเพาะต่อไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่ ด้วยการทดสอบหาเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PRL* จากการรวบรวมเอกสารและโปรแกรมสำเร็จรูป cutter 2.0 เพื่อใช้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *PRL* ภายหลังจากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบความแปรปรวนของยีน *PRL* การย่อย PCR-Product ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ทดสอบหาเอ็นไซม์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PRL* การดำเนินการงานทดลองดำเนินตามข้อกำหนดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะของแต่ละเอ็นไซม์

7. ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *PRL* ด้วย agarose gel electrophoresis ภายหลังจากการตัดชิ้นส่วน PCR product ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนยีน *PRL* และย่อย PCR-Product ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบ PCR-Product ด้วย 2 % agarose gel โดยใช้ Enzyme-Product 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับ 1X loading dye 6 ไมโครลิตร หยอดลงหลุมบนแผ่น 2% agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่น 2% agarose gel ที่ได้ไปย้อมด้วย Gelstar (Gelstar INC.NY) ประมาณ 5-10 นาที ทำการบันทึกภาพแถบ DNA ภายใต้แสง UV

3) การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลจากการจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ของเป็ดไข่แต่ละตัวเพื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน *PRL* ในประชากรเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์และอัลลีล และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PRL* รวมถึงการทดสอบสมดุล Hardy-Weinberg equilibrium ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ ดังนี้

1. วิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของยีน *PRL*

วิเคราะห์หาความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ ยีน *PRL* ที่ตรวจพบในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ (Falconer and Mackay, 1996) ดังนี้

$$H_i = \frac{\sum n_i}{N}$$

กำหนดให้

H_i = ความถี่จีโนไทป์ที่ i

n_i = จำนวนตัวที่พบจีโนไทป์ที่ i

N = จำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษาจีโนไทป์

และ

$$Allele\ frequency = D_{ii} + \frac{1}{2}(H_{ij})$$

กำหนดให้ D_{ii} และ H_{ij} เป็นความถี่ Homozygous และ heterozygous genotype ตามลำดับ

2. การทดสอบสมดุล Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

ทดสอบสมดุล Hardy-Weinberg equilibrium ของยีน *PRL*เพื่อตรวจสอบการเกิด gene forces ที่อาจเกิดขึ้นในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์โดยทดสอบด้วย chi-square (χ^2) (Falconer and Mackey, 1996)

$$x^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

กำหนดให้

O_i = จำนวนตัวอย่างสังเกตที่มี genotype ที่ locus i

E_i = จำนวนตัวอย่างคาดหวังที่มี genotype ที่ locus i

3. การทดสอบความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ยีน *PRL* ต่อความสามารถในการให้ผลผลิตของเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์

การศึกษาทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ทดลองมีเป็ดทดลองจำนวน 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 60 ตัว คือ กลุ่มเป้าหมายและกลุ่มยืนยันผล

1) สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ที่ผลิตจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานีทั้งหมด การศึกษาในครั้งนี้ทำการทดลองจำนวน 2 กลุ่มการทดลอง โดยใช้สัตว์ทดลองระยะละ 60 ตัว ซึ่งจำนวนสัตว์อยู่ภายใต้การแนะนำของ The International Society for Animal Genetics (ISAG) formed a FAO/ISAG ในปี ค.ศ. 1995 ในกลุ่มการทดลองที่ 1 เป็นระยะตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PRL* เบื้องต้น ทำการเก็บข้อมูลกลุ่มเป้าหมายช่วงเดือนธันวาคม 2555 - พฤษภาคม 2556 และกลุ่มการทดลองที่ 2 เก็บข้อมูลกลุ่มยืนยันผลหลังจากได้ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *PRL* กับผลผลิตไข่ ทำการเก็บข้อมูลผลผลิตไข่ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2556 - กุมภาพันธ์ 2557 สัตว์ที่ทำการศึกษาถูกตรวจสอบข้อมูลจีโนไทป์ร่วมกับข้อมูลผลผลิตไข่รายตัว

2) การเก็บข้อมูลพันธุ์ประวัติและข้อมูลลักษณะปรากฏ

เก็บบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติได้แก่ หมายเลขประจำตัวสัตว์ (ID) และเก็บบันทึกข้อมูลลักษณะปรากฏ (phenotype) ได้แก่ วัน เดือน ปี ที่เกิด, วัน เดือน ปี ที่เริ่มให้ไข่, อายุที่ให้ไข่ฟองแรก (AFE) และ จำนวนไข่สะสมจนถึงอายุ 300 วัน (ฟอง)

3) วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของลักษณะการให้ผลผลิตไข่

เนื่องจากข้อมูลที่ใช้เป็นข้อมูลจริงจากฟาร์ม (field data) ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบความผิดปกติของข้อมูลก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS ตามวิธีการของมนต์ชัย (2548) เพื่อแก้ไขข้อมูลที่ผิดพลาด จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเบื้องต้นของลักษณะการให้ผลผลิตไข่ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (means), ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error), ค่าต่ำสุด (minimum) และค่าสูงสุด (maximum) ของลักษณะการให้ผลผลิตไข่

4) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง genetic marker กับลักษณะการให้ผลผลิตไข่

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง genetic marker กับลักษณะการให้ผลผลิตไข่ จะใช้ข้อมูลของลักษณะจำนวนไข่สะสมจนถึงอายุ 300 วัน (EN (300d)) ซึ่งเป็นช่วงที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด นำมาเป็นข้อมูล phenotype ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์กับฝูงที่ยังไม่มีข้อมูลพันธุ์ประวัติ และค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะการให้ผลผลิตไข่ (EBV) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของพันธุกรรมต่อลักษณะการให้ผลผลิตไข่ และในการศึกษาครั้งนี้มีการวิเคราะห์ด้วยวิธีการ General Linear Model (GLM) ซึ่งมีสมมติฐาน คือ รูปแบบจีโนไทป์มีอิทธิพลต่อลักษณะการให้ผลผลิตไข่ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์

วิธีการ General Linear Model (GLM)

เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของรูปแบบจีโนไทป์ต่อลักษณะจำนวนไข่สะสมจนถึงอายุ 300 วัน ในเป็ดไข่กากีแคมป์เบลล์ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะด้วยวิธี least significant difference โดยมีโมเดลดังนี้

$$y_{ij} = \mu + S_i + G_j + \varepsilon_{ij}$$

เมื่อ y_{ij} = ค่าสังเกต phenotype ของลักษณะผลผลิตไข่

μ = over all mean

S = อิทธิพลเนื่องจากพ่อพันธุ์

G = อิทธิพลของจีโนไทป์

ε_{ij} = ความคลาดเคลื่อน