การหาความสัมพันธ์พ่อกับลูกในโคนม ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์

นางสุพิชญา เชษฐสิงห์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATERNITY TESTING IN DAIRY CATTLE BASED ON MICROSATELLITE MARKERS

Mrs. Supitchaya Chethasing

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Animal Breeding
Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาความสัมพันธ์พ่อกับลูกในโคนม ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์
โดย	นางสุพิชญา เชษฐสิงห์
สาขาวิชา	การปรับปรุงพันธุ์สัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ดวงสมร สุวัฑฒน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ สมชาย จันทร์ผ่องแสง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.นลินี อิ่มบุญตา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุพิชญา เชษฐสิงห์ : การหาความสัมพันธ์พ่อกับลูกในโคนม ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์. (PATERNITY TESTING IN DAIRY CATTLE BASED ON MICROSATELLITE MARKERS) อ.ที่ปรึกษา : รศ. สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน , 47 หน้า

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกในโคนมที่บันทึกในพันธุ์ประวัติ ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนม และเก็บตัวอย่างเลือดจากลูกสาว ที่เขตส่งเสริมการเลี้ยงโคนม อ.ส.ค. ทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 ตำแหน่งได้แก่ BM1824, ETH10, BM2113, TGLA122, TGLA227, TGLA126, SPS115, ETH152, ETH3 และ INRA023 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทำการอ่านผลด้วยวิธี polyacrylamide gel (PAGE) จากนั้นทำการตรวจสอบผลของความสัมพันธ์ และวิเคราะห์ข้อมูล ผลการศึกษาในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อโคนมกับลูกสาวในครั้งนี้ พบความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูกสาวที่ทำการตรวจสอบด้วย มาร์คเกอร์ตั้งแต่ 7-10 ตำแหน่ง จำนวน 26 คู่(พ่อกับลูกสาว) จากจำนวนที่ศึกษา 75 คู่ และประสิทธิภาพการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ในการตรวจสอบ ความสัมพันธ์พ่อกับลูก สามารถให้ความเชื่อมั่นได้อยู่ระหว่าง 88 - 98 % พบค่า PE ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.05 - 0.66 และจากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำข้อมูล หรือหลักการที่ได้ไปประยุกต์ใช้ปันข้อมูลประจำตัวสัตว์ สำหรับบันทึกในพันธุ์ประวัติเพื่อบ่งชี้ ลักษณะเฉพาะตัวของสัตว์และใช้ในการตรวจสอบข้อมูลพันธุ์ประวัติ ที่มีความไม่ชัดเจน เป็นการเพิ่มความถูกต้องของการบันทึกพันธุ์ประวัติ เพื่อเป็นการป้องกันความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นในการประมาณค่าทางพันธุกรรม ซึ่งจะส่งผลต่อความก้าวหน้าทางด้านพันธุกรรมได้

ภาควิชา สัตวบาล ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2549

##4675583631 : MAJOR ANIMAL BREEDING

KEY WORD : DAIRY CATTLE, MICROSATELLITE MARKER, PATERNITY TEST

SUPITCHAYA CHETHASING : PATERNITY TESTING IN DAIRY CATTLE BASED ON MICROSATELLITE MARKERS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. DUANGSMORN SUWATTANA, Dr. MED. VET., 47 pp.

The objective of this study was to investigate the paternity testing in dairy cattle. Genomic DNA was extracted from blood samples in the progeny of 10 sires and frozen semen samples in sires. Each PCR was performed using a microsatellite marker for 10 loci (BM1824, ETH10, BM2113, TGLA122, TGLA227, TGLA126, SPS115, ETH152, ETH3 and INRA023) as a specific primer. The PCR products were analyzed using polyacrylmide gel electrophoresis. The allele frequencies, Exclusion Probability (PE) and Combine exclusion probability (CPE) were calculated. The results showed cows that did not inherit paternity allele for at least one loci were considered not to be daughters of the sire listed. Probability of exclusion was range 0.05 - 0.66 and accurate for paternity test was ranged at 88 - 98 %. This study can contribute toward pedigree information, an adequate genetic improvement and breeding program.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Animal Husbandry..... Student's signature.....

Field of study Animal Breeding..... Advisor's signature.....

Academic year 2006.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ส.พญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ความช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ และช่วยกรุณาผลักดันการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณท่านคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวบาลทุกท่าน ที่ให้ความรู้ และให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ขอขอบคุณ น.สพ.เทอดไชย ระลึกมูล ที่ช่วยกรุณาติดต่อ ประสานงาน และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณ คุณจุฑารัตน์ จิระศุภโชค เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุ์ศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการทดลองและวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณเพื่อนร่วมรุ่นนิสิตปริญญาโท สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ กระตุ้นเตือนให้ความช่วยเหลือในด้านข่าวสารและคำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ท้ายที่สุด ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้โอกาสให้การสนับสนุนคอยให้กำลังใจอย่างดียิ่ง และเป็นแรงผลักดันที่สำคัญยิ่ง ที่ทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ญ
บทที่
1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับ.....3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
2.1 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....5
2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ.....5
2.3 ไมโครแซทเทลไลท์.....6
2.4 หลักการของเทคนิคพีซีอาร์.....8
2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....9
1. จำนวนอัลลีล.....9
2. ค่าความถี่อัลลีล.....10
2.6 PATERNITY TESTING.....10
Probability of Exclusion (PE).....10
Combine Probability of Exclusion (CPE).....11
3 วิธีการดำเนินงาน.....15
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....15
3.2 วิธีดำเนินงาน.....15
1. การสกัดดีเอ็นเอ.....15
2. การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ.....16

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3. การตรวจแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Electrophoresis.....18
3.3 การอ่านผล.....19
3.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์.....20

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....22
4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโคนม.....22
4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนม.....22
4.3 ผลการตรวจความสัมพันธ์ของอัลลีลที่พบในครอบครัวโคนม.....23
4.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ 33
1. รูปแบบอัลลีลและความถี่อัลลีลที่พบในครอบครัวพ่อพันธุ์โคนม.....33
2. การคำนวณค่า PE และค่าความเชื่อมั่น (CPE).....34

5 อภิปรายผล.....37
5.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....37
5.2 การเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....37
5.3 การตรวจสอบความสัมพันธ์ของอัลลีลที่พบในครอบครัวโคนม.....37
5.4 รูปแบบและความถี่อัลลีลที่ในประชากรโคนม.....38
5.5 การวิเคราะห์ค่า PE และ CPE ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ทำการศึกษา ...39

6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....41
6.1 สรุปผลการวิจัย.....41
6.2 ข้อเสนอแนะ.....41

รายการอ้างอิง.....42
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่.....หน้า

2.1 แสดงเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือด……7

3.1 แสดงรายละเอียดไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ ที่ใช้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ…..16

3.2 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทนิคพีซีอาร์(PCR)……..16

3.3 ส่วนประกอบของ 6% polyacrylamide gel (กระจกขนาด 8x8นิ้ว)……....19

4.1 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์H40001 กับลูก8ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง.....23

4.2 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2230 กับลูก7ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง.....24

4.3 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2238 กับลูกสาว6ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง.....25

4.4 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2227 กับลูก6ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง.....26

4.5 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2241 กับลูก9ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง.....27

4.6 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2232 กับลูก7ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 9 ตำแหน่ง.....28

4.7 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2223 กับลูก4ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 9 ตำแหน่ง.....29

สารบัญตาราง

ตารางที่.....หน้า

4.8 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2225 กับลูก9ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซท เทลไลท์ทั้ง 8 ตำแหน่ง.....30

4.9 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s2228 กับลูก2ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซท เทลไลท์ทั้ง 8 ตำแหน่ง.....31

4.10 รูปแบบจีโนไทป์(genotype)แสดงความสัมพันธุ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์s9113 กับลูก3ตัวจากการตรวจสอบความสัมพันธุ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซท เทลไลท์ทั้ง 8ตำแหน่ง.....32

4.11 แสดงรูปแบบอัลลีลและความถี่อัลลีล ที่พบในประชากรโคนมที่ศึกษาด้วย เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7-10ตำแหน่ง.....33

4.12 แสดงค่าPEของแต่ละครอบครัว และค่า CPE จากประชากรโคนมทั้ง 10 ครอบครัว ที่สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ในกระบวนการทำพีซีอาร์ จากเครื่องหมายไมโครแซท เทลไลท์ ทั้ง10 ตำแหน่ง.....34

4.13 แสดงค่าความเชื่อมั่น(CPE) ในการนำเครื่องหมาพันธุกรรมไปประยุกต์ใช้ใน การตรวจสอบความเป็นพ่อกับลูกของโคนม.....35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์โคนมนั้น สิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ความถูกต้อง และแม่นยำ ในการคัดเลือกตัวสัตว์ที่มีความสามารถทางพันธุกรรมสูงที่สุด เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกต่อไป ความถูกต้อง ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ดีเด่นเนื่องจากพันธุกรรมที่แท้จริงนั้น ย่อมทำให้แผนการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ มีความก้าวหน้าเพิ่มขึ้น สำหรับการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์โคนมที่ให้ผลผลิตสูง สามารถถ่ายทอดคุณภาพและปริมาณของผลผลิตน้ำนมไปยังรุ่นลูกได้มากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับผลการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ (breeding value) อันเป็นอิทธิพลของยีนบวกสะสม ที่บอกค่าความสามารถทางพันธุกรรมของสัตว์แต่ละตัว สำหรับการปรับปรุงพ่อพันธุ์โคนมที่ถ่ายทอดลักษณะที่แสดงออกเฉพาะเพศเมีย ซึ่งไม่สามารถวัดได้โดยตรงจากพ่อพันธุ์ จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลผลผลิตของลูกสาวในการประเมินค่าทางพันธุกรรม ดังนั้นลักษณะที่แสดงออกในลูกจะสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงกรรมพันธุ์ของพ่อได้ โดยที่การประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ในการถ่ายทอดพันธุกรรม จะขึ้นอยู่กับความถูกต้องในการบันทึกข้อมูล และความสัมพันธ์ (relationship) ระหว่างตัวสัตว์เป็นสำคัญ (Baron *et al*, 2002)

ความสัมพันธ์ทางสายเลือดเพื่อบ่งชี้ความเป็นพ่อลูกที่ถูกต้อง ที่ได้จากการศึกษาบันทึกพันธุ์ประวัติของสัตว์ จากการทดสอบ progeny test นั้น เป็นสิ่งสำคัญในการบ่งบอกถึงการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมที่ดีจากพ่อไปสู่ลูก อย่างไรก็ตาม การจดบันทึกข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง อาจส่งผลทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการประมาณค่าทางพันธุกรรมได้ โดยจะก่อให้เกิดอคติ (biased) ส่งผลกระทบต่อการประเมินค่าทางพันธุกรรม ลดความแม่นยำในการทดสอบ progeny test ทำให้ค่าอัตราพันธุกรรมที่คำนวณได้ไม่ตรงกับค่าที่เป็นจริงในตัวสัตว์ และส่งผลกระทบต่อความก้าวหน้าทางด้านพันธุกรรม ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ใช้ระยะเวลานานขึ้น (Van Vleck,1970b; Israel and Weller, 2000; Gelderman *et al*., 1986) สำหรับความผิดพลาดในการบ่งชี้พ่อพันธุ์ (paternity misidentification) นั้น สามารถก่อให้เกิดอคติ ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม โดยอคติที่เพิ่มขึ้นจะเป็นสัดส่วนตามการบันทึกที่ไม่ถูกต้องเพิ่มขึ้น (Bonos *et al*., 2001) ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพิจารณาถึง การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อสู่ลูกทั้งจากการศึกษาข้อมูลจริง และศึกษาจากข้อมูลทำการจำลองขึ้น (simulated data)ของกลุ่ม

ประชากร (Van Vleck;1970b ;Gelderman *et al*; 1986,) ทำการประมาณค่าด้วย animal model (Israel and Weller, 2000; Bonos *et al*., 2001) จากการศึกษาพบว่า ความไม่ถูกต้องของความสัมพันธ์พ่อกับลูก จะก่อให้เกิดอคติหรือความลำเอียงในการประมาณค่าอัตราพันธุกรรม การประมาณค่าการผสมพันธุ์ และส่งผลให้ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมลดลง ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ได้ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคำนึงถึงความถูกต้องของการบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติ

ปัจจุบันนี้ความก้าวหน้าทางด้านอณูพันธุศาสตร์ ได้มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวางในด้านการปรับปรุงพันธุ์โคนม เพื่อใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น การบ่งชี้ลักษณะเฉพาะตัว และบอกความสัมพันธ์ทางสายเลือด เป็นต้น สำหรับเทคนิคที่ประยุกต์ใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก (paternity testing) เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาเพื่อบอกความเป็นพ่อลูกที่แท้จริงของสัตว์ ในรูปแบบของ probability of exclusion (PE) และ Combine probability exclusion (CPE) (Jamison and Taylor, 1997) เพื่อใช้ประโยชน์ในการเพิ่มความถูกต้อง ในการบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติ ที่จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการประเมินค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม ซึ่งในการตรวจสอบนี้จะต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรม (marker) ที่มีความหลากหลายของอัลลีลสูงเพื่อที่จะบ่งชี้คุณลักษณะจำเพาะของสัตว์ได้แม่นยำขึ้น (Vankan and Faddy, 1999; Usha *et al*., 1995) เครื่องหมายพันธุกรรม ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) เป็นเครื่องหมายที่มีความเหมาะสม ในการนำไปหาความสัมพันธ์พ่อกับลูกได้ (Fries *et al*., 1990) เนื่องจาก มีความผันแปรของจำนวนซ้ำสูง หรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีล มีกระจายอยู่ทั่วไปตลอดทั้ง ยีโนม สามารถเลือกใช้ได้ทีละหลายตำแหน่งได้ ทำให้การตรวจสอบมีความละเอียดและถูกต้องมากยิ่งขึ้น (Tantz, 1993) การประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือด จึงเป็นการนำเอาความรู้ในระดับโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ อันจะส่งผลต่อการประเมินค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม และทำให้การปรับปรุงพันธุ์ไม่ตรงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ (Ron *et al*., 1996; Baron *et al*., 2002; Vissher *et al*., 2002)

การปรับปรุงพ่อพันธุ์โคนมในประเทศไทย มีการคัดเลือกและจัดลำดับพ่อพันธุ์ จากการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ โดยมีการวิเคราะห์ข้อมูลของลักษณะผลผลิตน้ำนมเป็นหลักบนพื้นฐานความร่วมมือกับเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ ปัจจุบันได้มีการพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อความถูกต้อง แม่นยำ ในการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์อยู่เสมอ เพื่อให้การปรับปรุง

พันธุ์ โคนมนั้นมีความก้าวหน้าตามวัตถุประสงค์ที่ได้วางแผนไว้ ซึ่งการพัฒนาดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับพื้นฐานของข้อมูลที่ทำการบันทึกโดยเฉพาะข้อมูลพันธุ์ประวัติ และการบันทึกข้อมูลที่ดีจะช่วยให้การประเมินพันธุ์สัตว์ถูกต้อง (มนต์ชัย, 2544) อย่างไรก็ตาม หากการบันทึกพันธุ์ประวัติที่ผิดพลาด เช่น การจดเบอร์พ่อพันธุ์ กับลูกสาวไม่ถูกต้อง หรือไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นลูกของพ่อตัวใด ก็ย่อมทำให้มีโอกาสการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ โคนมผิดพลาดได้เช่นกัน

การประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ในรูปแบบของ paternity testing ในการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์พ่อกับลูกนั้น เป็นการศึกษาในระดับโมเลกุล เพื่อบอกถึงความสัมพันธ์กันทางสายเลือดของสัตว์ที่อาศัยผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการ สำหรับช่วยเพิ่มความถูกต้อง ชัดเจนของข้อมูลความสัมพันธ์พ่อกับลูกที่ทำการบันทึกพันธุ์ประวัติ ที่น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเสริมให้การบันทึกข้อมูลมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น อันเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพ และความแม่นยำในการคัดเลือกพ่อพันธุ์โคนม

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์

2. เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์กับลูกสาว จากข้อมูลที่บันทึกพันธุ์ประวัติ ที่เข้าทดสอบ progeny test โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบประสิทธิภาพการตรวจสอบหาความสัมพันธ์พ่อกับลูก (paternity testing) ของประชากรโคนมไทย ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ได้

2. สามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการแก้ปัญหาประวัติพันธุ์สัตว์ ในภาคสนามได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และใช้ประโยชน์ในด้านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ได้อย่างน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. สามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อลูกได้ จากข้อมูลพันธุ์ประวัติของประชากรโคนมไทยได้ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ดีเด่นเนื่องจากพันธุกรรมที่แท้จริงและมีความถูกต้องย่อมให้แผนการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์สัตว์มีความก้าวหน้าเพิ่มขึ้น สำหรับการคัดเลือกและปรับปรุงพ่อพันธุ์โคนม ต้องใช้ข้อมูลของลูกสาวในการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ เพื่อเป็นการบ่งบอกถึงความสามารถในการถ่ายทอดคุณภาพและปริมาณของผลผลิตน้ำนมไปยังรุ่นลูกได้ จึงต้องอาศัยความสัมพันธ์ทางสายเลือดที่ถูกต้อง ชัดเจนจากการบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติ อย่างไรก็ตาม การบันทึกข้อมูลที่มีความคลาดเคลื่อน ไม่ถูกต้อง ของความสัมพันธ์พ่อกับลูกย่อมส่งผลต่อการประมาณค่าทางพันธุกรรมได้ จึงจำเป็นต้องนำความรู้และเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ เข้ามามีส่วนช่วยในการศึกษาวิจัย เพื่อให้การปรับปรุงพันธุ์ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการได้

2.1 **การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ DNA fingerprinting หมายถึง ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเฉพาะตัว ที่ไม่เหมือนใครและไม่มีใครเหมือน (ยกเว้นฝาแฝดแท้) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากได้รับการถ่ายถอดดีเอ็นเอมาจากพ่อครึ่งหนึ่งและจากแม่ครึ่งหนึ่ง กลายเป็นดีเอ็นเอชุดใหม่ ที่มีลักษณะเฉพาะตัวในรุ่นต่อ ๆ ไป จึงสามารถนำมาใช้เป็นตัวช่วยในการบ่งบอกลักษณะของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันได้ โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม

2.2 **เครื่องหมายดีเอ็นเอ** (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ การใช้ดีเอ็นเอ มาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบ ถึงความแตกต่างในระดับยีน หรือดีเอ็นเอของสัตว์ที่เราศึกษา เป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซม ซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ มีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้

ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์

ฟีซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมโลกุลของดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบในสัตว์ ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), Random Amplified Polymorphic (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Microsatellite เป็นต้น

2.3 MICROSATELLITE

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น repetitive DNA ซึ่งเรียงเป็นชุดมีลำดับเบสที่ซ้ำต่อเนื่องกันเป็นช่วงสั้นๆ ประมาณ 1-6 คู่เบสต่อชุด การกระจายทั่วไปตลอดยีโนม เรียก short tandem repeats (STRs) ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ เกิดขึ้นจากการเพิ่มขึ้นและลดลงของจำนวนซ้ำ โดยที่แต่ละชนิดมีจำนวนชุดที่ซ้ำแตกต่างกัน ระหว่างตัวสัตว์แต่ละตัวที่มีลักษณะ DNA polymorphism ซึ่งสัตว์แต่ละตัวนั้นจะมีลักษณะเฉพาะตัว (individual identification) จึงจัดเป็น highly polymorphism จากความรู้ที่ได้นำไปสู่วิวัฒนาการการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เพื่อบ่งชี้เอกลักษณ์เฉพาะตัว (person identification) และนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือด (paternity testing) ในสัตว์(Glowatzki et al,1995; Vankan and Faddy, 1999, Luis and Dempster,1987) จากการค้นพบเทคนิคพีซีอาร์ที่เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนของลำดับเบสของดีเอ็นเอ ได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาพื้นฐานทางพันธุกรรม และ การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์สัตว์ในระดับโมเลกุล ซึ่งมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำและความน่าเชื่อถือสูง (Vankan and Faddy,1999)

เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายที่มีคุณสมบัติดีกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมอื่น ๆ คือ มีความผันแปรของจำนวนซ้ำสูง หรือมีความหลากหลายของจำนวนอัลลีล (polymorphism) และมีการกระจายอยู่ทั่ว ๆ ไปทั้งยีโนม สามารถเลือกใช้ความแตกต่างได้ทีละหลายตำแหน่ง ทำให้การตรวจมีความละเอียดและถูกต้องมากขึ้น และ อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์แบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ซึ่งตัวอย่างสามารถที่จะเลือกใช้เลือด เส้นขน น้ำเชื้อหรือตัวอย่างอื่น ตรวจสอบได้และได้คำตอบที่ง่ายต่อการอธิบายและชี้แจง (Visscher *et al*.,2002)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้มีการศึกษาที่แตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากร ตามที่ International Society of

Animal Genetic (ISAG) ได้ให้คำแนะนำถึงเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็นสากล (international marker set) สำหรับใช้ตรวจสอบในโคที่สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 30 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือด

Marker number	Marker	Chromosome	Primer sequences (5' - 3')	Reference
1	INRA063 (D18S5)	18	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	Vaiman et al.1994
2	INRA005 (D12S4)	12	CAATCTGCATGAAGTATAAATAT CTTCAGGCATACCCTACACC	Vaiman et al.1994
3	ETH225 (D9S1)	9	GATCACCTTGCCACTATTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	Steffen et al.(1993)
4	ILSTS005 (D10S25)	10	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	Brezinsky et al.(1993a)
5	HEL5 (D21S15)	21	GCAGGATCACTTGTTAGGGA AGACGTTAGTGTACATTAAC	Kaukinen and Varvio(1993)
6	HEL1 (D15S10)	15	CAACAGCTATTTAACAAGGA AGGCTACAGTCCATGGGATT	Kaukinen and Varvio(1993)
7	INRA035 (D16S11)	16	ATCCTTTGCAGCCTCCACATTG TTGTGCTTTATGACACTATCCG	Vaiman et al.1994
8	ETH152 (D5S1)	5	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	Steffen et al.(1993)
9	INRA023 (D3S10)	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC	Vaiman et al.1994
10	ETH10 (D5S3)	5	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	Solinas Toldo et al. (1993)
11	HEL9 (D8S4)	8	CCCATTCAGTCTTCAGAGGT CACATCCATGTTCTCACCAC	Kaukinen&Varvio(1993)
12	CSSM66 (D14S31)	14	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	Barendse et al.(1994)
13	INRA032 (D11S9)	11	AAACTGTATTCTCTAATAGCTAC GCAAGACATATCTCCATTCCTTT	Solinas Toldo *et al.* (1993)
14	ETH3 (D19S2)	19	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	Solinas Toldo *et al.* (1993)
15	BM2113 (D2S26)	2	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	Bishop and Kappes(1994)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Marker number	Marker	Chromosome	Primer sequences (5' - 3')	Reference
16	BM1824 (D1S34)	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAACTGCTTCCTTG	Bishop and Kappes(1994)
17	HEL13 (D11S15)	11	TAAGGACTTGAGATAAGGAG CCATCTACCTCCATCTTAAC	Kaukinen and Varvio(1993)
18	INRA037 (D10S12)	11	GATCCTGCTTATATTTAACCAC AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC	Vaiman *et al*.1994
19	BM1818 (D23S21)	23	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	Bishop and Kappes (1994)
20	ILSTS006 (D7S8)	7	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG ACACGGAAGCGATCTAAACG	Brezinsky *et al*.(1993b)
21	MM12 (D9S20)	9	CAAGACAGGTGTTTCAATCT ATCGACTCTGGGGATGATGT	Mommens *et al*. (1994)
22	CSRM60 (D10S5)	10	AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	Moore et al. (1994)
23	ETH185 (D17S1)	17	TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC GCACCCCAACGAAAGCTCCCAG	Steffen et al.(1993)
24	HAUT24 (D22S26)	22	CTCTCTGCCTTTGTCCCTGT AATACACTTTAGGAGAAAAATA	Harlizius(commpers.)
25	HAUT27 (D26S21)	26	TTTTATGTTCATTTTTTGACTGG AACTGCTGAAATCTCCATCTTA	Harlizius(commpers.)
26	TGLA227 (D18S1)	18	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	Georges and Massey (1992)
27	TGLA126 (D20S1)	20	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	Georges and Massey (1992)
28	TGLA122 (D21S6)	21	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	Georges and Massey (1992)
29	TGLA53 (D16S3)	16	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	Georges and Massey (1992)
30	SPS115 (D15)	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG AACGAGTGTCCTAGTTTGGCTGTG	Moore and Byrne (1993)

2.4 หลักการของเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

เทคนิคพีซีอาร์หรือPolymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง *(in vitro)* ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่สกัดจากตัวอย่างและ PCR mixer ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟส (dNTPs) พีซีอาร์

บัฟเฟอร์(PCR buffer) แมกนีเซียมคลอไรด์ และ ไพร์เมอร์ (primer) (นิวคลีไทด์สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเป็นคู่สมกับปลายด้าน 3' ของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์) ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ การทำงานของปฏิกิริยาในแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนซึ่งควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ

1. Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อน อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะอยู่ที่ประมาณ 94-97 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นตอนการให้ไพร์เมอร์เข้าจับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายในดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นสายเดี่ยวซึ่งมีลำดับคู่สมกันในอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ทั่วไปควรจะต่ำกว่าอุณหภูมิการแยกตัว (melting temperature,Tm) ของไพร์เมอร์ 3-5 องศาเซลเซียส

3. Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพร์เมอร์โดยการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลาย 3' ของไพร์เมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะในขั้นตอนนี้จะอยู่ที่ 72-78 องศาเซลเซียส

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ผลหรือการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์เพื่อประมาณค่าความแปรผันทางพันธุกรรม สามารถวัดได้จาก

จำนวนอัลลีล (number of allele)

ลักษณะจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จะทำการเก็บข้อมูลด้วยตาเปล่าเพื่อวิเคราะห์หาพารามิเตอร์ทุกตัวต่อไป แถบดีเอ็นเอที่ขึ้น 2 แถบเป็นจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซโกต (heterozygote) เช่นเดียวกับที่จีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต(homozygote) ก็จะแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น (Sukamol et al.,1996) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นของอัลลีลแต่ละอัลลีลจะถูกระบุขนาดและทำการเปรียบเทียบกันในแต่ละครอบครัว เพื่อนับจำนวนอัลลีลที่เกิดขึ้น ณ ไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่งนั้น ๆ

ความถี่อัลลีล (allele frequency)

ความถี่อัลลีลในกลุ่มประชากรหนึ่ง ๆ สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$AF = \frac{2n^{homozygote} + n^{heterozygote}}{2n^{total}}$$ .....(Nei *et al.,* 1978)

โดยที่ $n^{homozygote}$ คือ จำนวนโคที่จีโนไทป์เป็น homozygote

$n^{heterozygote}$ คือ จำนวนโคที่จีโนไทป์เป็น heterozygote

n^{total} คือ จำนวนโคตัวอย่างทั้งหมด

2.6 PATERNITY TESTING

Parternity testing เป็นเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ ที่ศึกษาในระดับโมเลกุล ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก โดยอาศัยหลักการพิสูจน์ความน่าจะเป็นของความเกี่ยวข้องกันระหว่างอัลลีลของพ่อและอัลลีลของลูกจากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ในการตรวจสอบ (Jamieson and Taylor,1997; Ron *et al*., 1996) และเมื่อผ่านกระบวนการจากห้องปฏิบัติการแล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ ในรูปแบบ Probability of Exclusion (PE)และ Combine Probability of Exclusion (CPE) เพื่อบอกความสัมพันธ์พ่อกับลูกเป็นค่าความเชื่อมั่น โดยที่ค่า PE และค่า CPE ที่ได้ควรจะมีค่าสูงเข้าใกล้ 1 ซึ่งเป็นผลมาจากการคัดเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ที่มีความหลากหลายสูงและเป็นอิสระต่อกัน

Probability of Exclusion (PE)

Probability of Exclusion(PE) หรือExclusion Probability(EP) เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณหาความน่าจะเป็นของสัตว์แต่ละคู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด ในการตรวจสอบของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง กล่าวคือ เป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการบ่งชี้หรือแยกพ่อที่ไม่มีความสัมพันธ์กับลูกออกมา เพื่อให้สามารถทราบถึงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างพ่อกับลูก มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 (Jamieson and Taylor, 1997; Ron et al.,1996; Baron *et al*., 2002) ค่า PE ที่จะนำมาใช้ ควรจะมีค่าเท่ากับ 0.99 หรือสูงกว่า จะให้

ความน่าเชื่อมั่นสูงประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ถ้าค่า PE ที่ได้ค่าต่ำกว่า 0.90 จะให้ความน่าเชื่อมั่นที่ต่ำกว่าในการนำเครื่องหมายพันธุกรรมนั้นมาใช้ตรวจสอบ (Vankan and Faddy,1999)

ซึ่งค่าตัวเลขที่ได้จากการบ่งชี้ที่เกิดขึ้นจะมีความถูกต้อง แม่นยำ มากน้อยเพียงใดนั้น จะขึ้นอยู่กับความถี่ และการกระจายตัวของอัลลีลในแต่ละประชากร และจำนวนอัลลีลที่พบในแต่ละตำแหน่ง โดยที่ค่า PE ที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นค่าที่บอกความสัมพันธ์เฉพาะพ่อกับลูก ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง และจะพิจารณาเฉพาะอัลลีลของพ่อเท่านั้น จึงคำนวณได้จากสูตร.(Ron et al.,1996) ดังนี้

$$PE = (1 - p)^2$$

โดยที่ p คือ ผลรวมความถี่อัลลีลของพ่อทั้ง 2 อัลลีล

Combine Probability of Exclusion (CPE)

Combine Probability of Exclusion (CPE) หรือ Combine Exclusion Probability (CEP) เป็นค่าที่บอกความเชื่อมั่นในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก ที่ได้จากการคำนวณหาความน่าจะเป็นของสัตว์แต่ละตัวที่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์หลายๆ ตำแหน่งในการศึกษาพร้อมกัน โดยที่แต่ละตำแหน่งเป็นอิสระต่อกัน (independent) ซึ่งค่าที่ได้ควรจะเข้าใกล้ 1 มากที่สุด (Jamison and Taylor, 1996; Ron *et al*, 1996; Baron *et al*, 2002) ซึ่งค่านี้จะสูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับค่า PE แต่ละตำแหน่งที่นำมาศึกษาและสูตรการคำนวณ เป็นดังนี้

$$CPE = 1 - \prod^{n} (1-PE_i) \quad \text{.....(Ron et al.,1996)}$$

โดยที่ $\prod$ คือ ผลคูณของค่า PE ที่ได้แต่ละตำแหน่งจำนวน n ตำแหน่ง,

n คือ จำนวนของ marker

PE_i คือ PE สำหรับโลกัสที่ i

ปัจจุบันการใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยีสำหรับ paternity testing เริ่มมีความสำคัญและ เป็นที่สนใจมากยิ่งขึ้นในห้องปฏิบัติการ ซึ่งแต่ละห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะมีการพัฒนาค่า CPE โดย

การเพิ่มตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ในการหาคำตอบของความสัมพันธ์ทางสายเลือดของสัตว์ (Luis and Dempster 1987) ซึ่งประสิทธิภาพของแต่ละตำแหน่ง ขึ้นอยู่กับจำนวน ของอัลลีลที่พบ และความถี่อัลลีล นอกจากนี้ในการทดสอบพันธุ์ประวัติโดยการตรวจสอบความสัมพันธ์ที่พบนั้นต้องมีความแม่นยำ และน่าเชื่อถือ และมีความเชื่อมั่นสูงโดยดูจากค่า CPE เพื่อความถูกต้องในการนำไปใช้ (Vankan and Faddy,1999)

สำหรับจำนวนของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการนำมาใช้ในเทคนิค paternity testing นั้น จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตำแหน่ง ซึ่ง Usha และคณะ (1995) และ Heyen และ คณะ (1997) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางสายเลือดด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดไมโครแซทเทลไลท์ โดยให้คำแนะนำในการตรวจสอบความสัมพันธ์ว่าควรจะใช้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ อย่างน้อย 5 ตำแหน่งในการตรวจวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดแต่ละครั้ง จะทำให้ได้ค่าความเชื่อมั่นสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Spelman (1997) ได้ให้คำแนะนำว่าเพื่อเพิ่มความแม่นยำ และน่าเชื่อถือยิ่งขึ้นในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูก ควรใช้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ อย่างน้อย 10 ตำแหน่ง จะได้ค่าความเชื่อมั่นสูง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคำแนะนำของ International Society of Animal Genitic (ISAG) ได้ให้คำแนะนำถึงจำนวนของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ว่าควรจะใช้จำนวน 12-14 ตำแหน่งในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดจากจำนวนทั้งหมดที่แนะนำไว้ 30 ตำแหน่ง

การประยุกต์ใช้ค่า PE และ CPE บอกค่าความเชื่อมั่นใน paternity testing ได้มีการศึกษาในประชากรโคนมในต่างประเทศที่แตกต่างกันไป ดังนี้

Ron และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาในโคนมอิสราเอล ถึงผลของความไม่ถูกต้องของความสัมพันธ์พ่อกับลูก ที่มีผลกระทบต่อความก้าวหน้าทางพันธุกรรม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลล์จำนวน 12 ตำแหน่ง ในการ ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูก ของพ่อพันธุ์ที่เข้าทดสอบ progeny test (พ่อพันธุ์ 4 ตัวกับลูกทั้งหมด 173 ตัว) มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 12 อัลลีลและความถี่อัลลีลพบอยู่ระหว่าง 0.01 – 0.58 ทำให้ทราบอัตราความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูกเป็น 5.2 เปอร์เซนต์ ได้ค่าความเชื่อมั่น 85 – 99 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการศึกษาผลของการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกเพื่อประกอบการคัดเลือกพ่อพันธุ์ พบว่าจะมีการลงทุนค่าใช้จ่ายสูงในระยะแรกของการจัดพันธุ์ประวัติที่ตรวจสอบในระดับโมเลกุล แต่ส่งผลให้รายได้เพิ่มขึ้นคุ้มค่าต่อการลงทุนเมื่อระยะเวลา 10 ปีขึ้นไป

Visscher และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาความผิดพลาดของการบันทึกพันธุ์ประวัติที่มีผลต่อการคัดเลือกสัตว์ ในกลุ่มประชากรโคนมของประเทศอังกฤษโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 ตำแหน่ง มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 5-16 อัลลีล พบค่า PE มีค่าระหว่าง0.02 – 0.52 ที่ค่าความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราความผิดพลาด ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ มีอิทธิพลมากต่อประสิทธิภาพการทดสอบ progeny testing ส่งผลต่อการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ และ ได้ทำนายถึงผลตอบสนองต่อการคัดเลือกจะลดลงประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ จากอัตราความผิดพลาด ที่เกิดขึ้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อรุ่น

Baron และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์และลูกสาว ถึงผลของความผิดพลาดของความสัมพันธ์พ่อกับลูกที่เกิดขึ้น ที่มีต่อการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์และการจัดลำดับพ่อพันธุ์ที่เข้าทดสอบ progeny test ในโคพันธุ์ Gir โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่งในการตรวจสอบพ่อพันธุ์ 9 ตัวและลูกสาว 74 ตัว (พ่อ 1 ตัว ต่อ ลูกสาว 6-9 ตัว) มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 7-13 อัลลีล ความถี่อัลลีลที่พบมีค่าตั้งแต่ 0.007 – 0.460 พบค่า PE อยู่ระหว่าง 0.01-0.92 และพบค่า CPE ตั้งแต่ 0.87 - 0.99 พบอัตราความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูก 36 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่าความไม่ถูกต้องของความสัมพันธ์พ่อกับลูกส่งผลต่อการจัดลำดับพ่อพันธุ์ที่เข้าทดสอบ progeny test

Rogeio and Lopes (2002) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูกของโคนมพันธุ์ Gir ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 9 ตำแหน่ง มีจำนวนความถี่อัลลีล 3-12 อัลลีล พบค่า PE ตั้งแต่ 0.189 – 0.629 และพบค่า CPE ที่ได้ 0.989 พบอัตราความไม่ถูกต้องของความสัมพันธ์พ่อกับลูก 27.5 เปอร์เซ็นต์ ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า การตรวจสอบความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูกสามารถประยุกต์ใช้ได้ในการคัดเลือกพันธุ์สัตว์ที่ใช้ในการทดสอบ progeny test ได้

Weller และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความไม่ถูกต้องของการบันทึกพันธุ์ประวัติพ่อพันธุ์ โดยได้ทำการศึกษาในพ่อพันธุ์โคนม 11 ตัว ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 104 ตำแหน่ง โดยบอกความไม่สัมพันธ์กันอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง ได้ค่าความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลักษณะที่ทำให้การบันทึกพ่อพันธุ์ไม่ถูกต้อง เกิดจาก นักผสมเทียมบันทึกข้อมูลผิดพลาด โดยน่าจะเขียนเบอร์หลอดน้ำเชื้อไม่ถูกต้อง รวมถึงการผสมเทียมหลายครั้งด้วยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ต่างกัน เป็นต้น ซึ่งพบอัตราความไม่ถูกต้อง 20 เปอร์เซ็นต์ และได้ปรับแก้โดยการจัดระดับนักผสม

เทียม ควบคุมคุณภาพ ทำให้ลดอัตราความไม่ถูกต้องได้มากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มความก้าวทางด้านพันธุกรรมอย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์

Sanders และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาความไม่ถูกต้องระหว่างพ่อกับลูกที่มีผลต่อความก้าวหน้าทางด้านพันธุกรรม ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 16 ตำแหน่ง มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 8 - 12 อัลลีล พบค่า PE ตั้งแต่ 0.13 – 0.44 และค่า CPE ที่ได้มีค่า 0.999 พบอัตราความไม่ถูกต้อง 7 เปอร์เซ็นต์และได้ทำการจำลองข้อมูลขึ้นมาในการศึกษาถึงข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง(wrong information sire; WSI) และข้อมูลที่ขาดหายไป (missing information sire; MIS) พบว่ามีผลต่อความก้าวหน้าทางด้านพันธุกรรมมาก โดยเฉพาะการทดสอบ progeny test ที่มีจำนวนลูกต่อพ่อจำนวนน้อย และในลักษณะที่มีค่าอัตราพันธุกรรมที่ต่ำ โดยให้ความเห็นว่า ข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง (WIS) จะให้ผลเสียต่อการตอบสนองต่อการคัดเลือกมากยิ่งกว่าข้อมูลที่ขาดหายไป (MIS)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

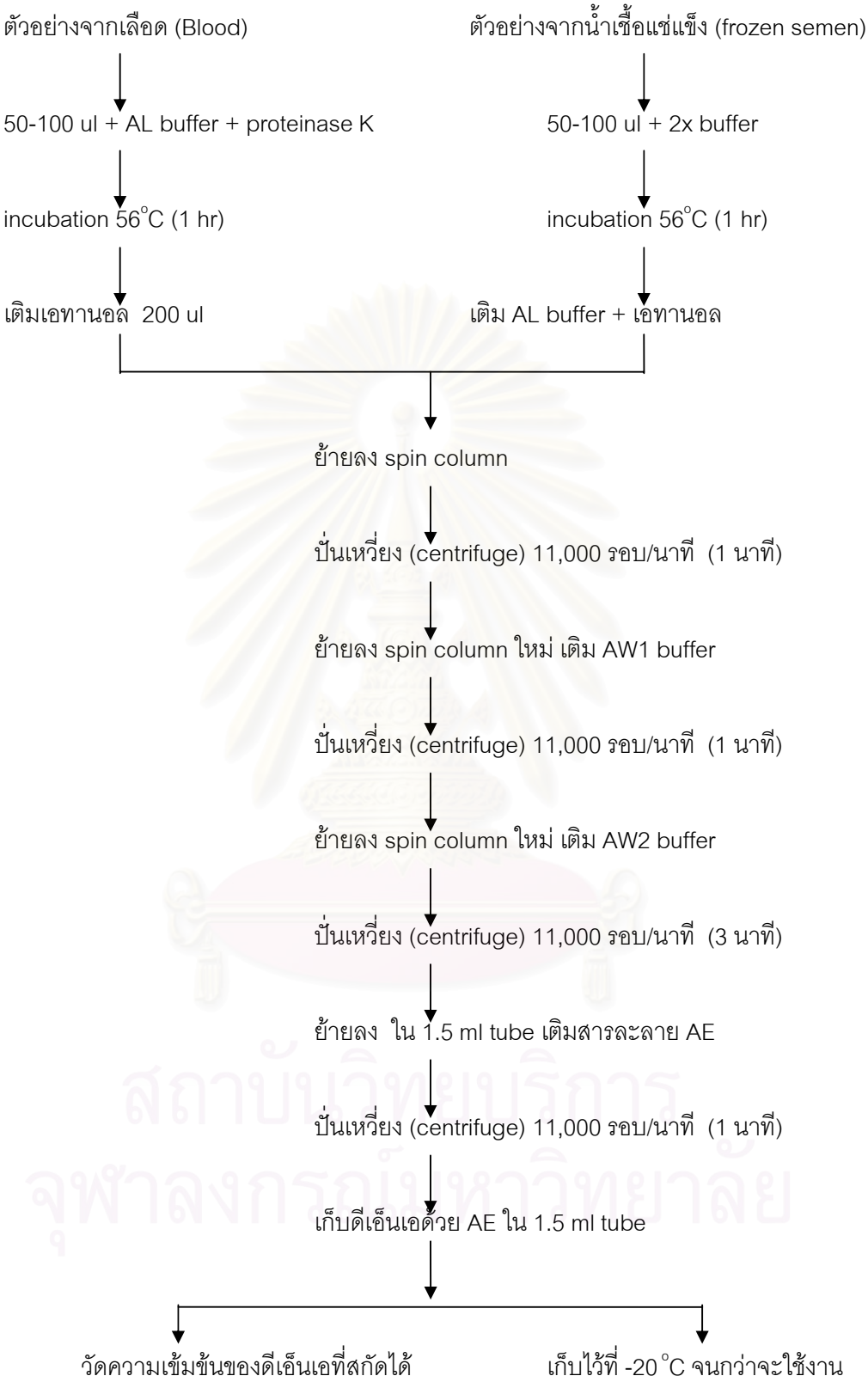
ตัวอย่างในครั้งนี้ได้มาจากพ่อพันธุ์โคนม จำนวน 10 ตัว จากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) และลูกสาวจำนวน 61 ตัวที่เกิดจากพ่อพันธุ์ทั้ง 10 ตัวตามบันทึกพันธุ์ประวัติ ในสัดส่วนอัตราการเลือกพ่อพันธุ์ 1 ตัวต่อลูกสาว 2-9 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์โคนมจำนวน 10 ตัว และตัวอย่างเลือดจากลูกสาว 61 ตัว โดยเจาะเลือดปริมาณ 3-5 มิลลิลิตร (มล.) ใส่หลอดสุญญากาศที่เคลือบสารป้องกันการแข็งตัว (EDTA) เก็บตัวอย่างไว้ในตู้ -20 °C เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

3.2 วิธีการดำเนินงาน

1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็ง

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป สำหรับตัวอย่างเลือด (QIAamp DNA Minikit) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณ 50 มล. ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. เติม สารละลาย 2x buffer เพื่อทำลายผนังเซลล์ย่อยโปรตีนต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย AL และเอทานอล ทำการล้างเพื่อให้ดีเอ็นเอสะอาดขึ้น ทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ด้วย spin column ดีเอ็นเอจะถูกดูดซับไว้ที่ silica – gel membrane โดยที่โปรตีน และสิ่งปนเปื้อนอื่น จะถูกชะล้างออกไปด้วย buffer AW1/AW2 แล้วจึงทำการชะล้างดีเอ็นเอออกจาก membrane เพื่อเก็บไว้ด้วย buffer AE ดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นนำไปตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอ หรือเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้งาน ดังแผนภูมิที่ 3.1



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภูมิที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด และน้ำเชื้อแช่แข็ง (QIAamp DNA mini kit)

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป สำหรับตัวอย่างเลือด (QIAamp DNA Minikit) โดยใส่เลือดปริมาตร 50-100 มล. ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. เติมสารละลาย QIAGEN Proteinase และสารละลาย buffer AL เพื่อทำลายผนังเซลล์และย่อยโปรตีนต่างๆ ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 19-20 ชั่วโมง จากนั้นเติมด้วยเอทานอล เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่สะอาดขึ้น ทำการปั่นเหวี่ยง โดยใช้ spin column จะทำให้ดีเอ็นเอถูกดูดซับไว้ที่ siliga–gel membrane ในขณะที่โปรตีนและสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ จะถูกชะล้างออกไปด้วย buffer AW1/AW2 จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ใน buffer AE ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน ดังแผนภูมิที่ 3.1

การตรวจสอบความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ทำได้ โดยใช้ 2% Agarose Gel electrophoresis เป็นวิธีการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับ เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

2. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยกระบวนการพีซีอาร์ (PCR)

การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ (Microsatellite primer) จำนวน 10 คู่ ที่ได้รายงานไว้แล้วถึงการนำไปใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ทางสายเลือด ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ชนิดไดนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งต่างๆ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ รายละเอียดดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดไมโครแซทเทลไลท์ ไพร์เมอร์ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

Locus name	location	T_a(°C)*	Allele size (bp)
ETH10	Chromosome 5	58	207-231
BM1824	Chromosome 1	58	178-190
ETH 152	Chromosome 5	55	191-207
ETH 3	Chromosome 19	55	103-133
TGLA 122	Chromosome 21	55	138-184

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

Locus name	location	T_a(^{o}C)*	Allele size (bp)
TGLA 2113	Chromosome 2	55	122-156
TGLA 126	Chromosome 20	55	155-131
TGLA 227	Chromosome 18	55	75-105
SPS 115	Chromosome 15	58	234-258
INTRA 023	Chromosome 3	55	195-225

T_a หมายถึง annealing temperature ในขั้นตอนพีซีอาร์

ที่มา: ISAG (http:www.isag.org.uk)

ในการเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จะใช้ดีเอ็นเอ ต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากโคนมตัวอย่าง ปริมาณ 2 มล. และส่วนประกอบต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

สารเคมี	ปริมาตร (มล)
- 10xPCR buffer	2.5
- dNTP's (1.25 mM)	4.0
- forward primer (20 mM)	0.5
- reverse primer (20 mM)	0.5
- T*aq* DNA polymerase (2.5 unit/100 ul)	1.0
- DNA template	2.0
- Sterile H_2O	15.0
ปริมาตรรวม	25.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยทุกขั้นตอนในการเตรียมสารละลาย ต้องทำในถาดน้ำแข็งก่อน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ในกระบวนการพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ ดังนี้

1. ขั้นตอนแรก Pre-PCR เป็นขั้นตอนการเตรียมสารละลายก่อนการทำพีซีอาร์ ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที
2. ขั้นตอนพีซีอาร์ จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย ขั้นตอน
   - DNA denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
   - primer annealing ที่อุณหภูมิ T_a °C ของไพร์เมอร์แต่ละคู่เป็นเวลา 30 วินาที
   - primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที
3. ขั้นตอน Post-PCR เป็นการหยุดปฏิกิริยาของพีซีอาร์ที่ อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเก็บ PCR Product ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ 20 °C จนกว่าจะใช้งานต่อไป

3. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยอิเลคโตโฟริซีส (Gel Eletrophoresis)

การตรวจสอบขนาด PCR Product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะตรวจด้วย 2% agarose gel โดยขั้นตอนดังนี้ คือ ชั่ง agarose 1 กรัม ละลายใน buffer 0.5x TBE เติม ethidium bromide (10 mg/ml) ปริมาณ 0.5 มล. จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ปริมาณ 10 ul ผสมด้วย Blue/0range 6x loading dye ปริมาณ 2 มล. (อัตราส่วน 5:1) หยอดลงหลุม gel พร้อมด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบแถบที่ดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วงใด มีปริมาณดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มด้วยกระบวนการพีซีอาร์ มากน้อยเพียงใด ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) ทำการถ่ายรูปและบันทึกข้อมูลที่ได้ และ PCR product ที่เหลือนำไปตรวจสอบต่อไป ด้วย 6% polyacrylamide gel

การตรวจสอบแถบดีเอ็นด้วย 6% polyacrylamide gel

การตรวจสอบดีเอ็นเอ ด้วย 6% polyacrylamide gel เพื่อทราบขนาดของดีเอ็นเอที่เกิดจากเครื่องหมายไมโครแซทเทไลท์ โดยเตรียมส่วนประกอบของสารละลายต่างๆ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของ 6% polyacrylamide gel (กระจกขนาด 8x8 นิ้ว)

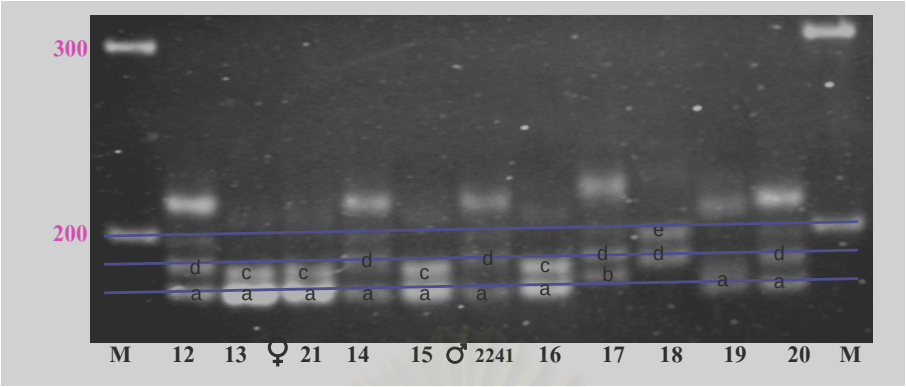
สารเคมี	ปริมาตร
50x TAE buffer	800 ml
40% Acrylamide gel	6 µl
25% APS (Ammoniumpersulfate)*	1,280 µl
TEMED	32 µl
Sterile H_2O	Up to 40 ml

* การเตรียม APS ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการใช้งาน

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ ประกอบชุดกระจกที่ใช้ในการ run polyacrylamide gel โดยทำการเช็ดกระจกให้สะอาดด้วยเอทานอลก่อน จากนั้นนำส่วนผสมของสารละลายในตารางที่ 3.3 ค่อย ๆ เทลงในช่องว่างของกระจกโดยไม่ให้มีฟองอากาศ ใส่หวีเพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับหยอดตัวอย่าง ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ถอดหวีออกจากเจล ทิ้งไว้ประมาณ 40 นาทีเพื่อให้เจลแข็งตัว ก่อนประกอบชุดอุปกรณ์ทั้งหมดเพื่อทำการหยอด PCR product ปริมาณ 15 µl ผสมกับ blue-orange loading dye for PAGE ปริมาณ 3 µl เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp และ 50 bp ทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ประมาณ 300 นาที หรือที่ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ ประมาณ 800 นาที จากนั้นนำเจล ไปย้อมด้วย Ethidium bromide เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างสีย้อมด้วยน้ำสะอาดประมาณ 30 นาที นำไปตรวจดูตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต ทำการถ่ายรูปและบันทึกข้อมูลไว้ เพื่อนำไปใช้อ่านแปลผลและวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมต่อไป

3.3 การอ่านผล

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นพิจารณาจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์หนึ่ง ๆ โดยเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันตั้งแต่สั้นที่สุดไปจนถึงยาวที่สุดของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตัว ใช้แทนสัญลักษณ์ด้วยอักษร a,b,c,d,e,g และ f ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงอัลลีลแต่ละตัวของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นั้น ๆ แล้วพิจารณาจีโนไทป์ของพ่อว่ามีรูปแบบใด จากนั้นตรวจสอบจีโนไทป์ของลูกที่มีอัลลีลสอดคล้องกับพ่อ หรือไม่สอดคล้องกับพ่อ สรุปผลความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนั้น ดังตัวอย่างรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงการอ่านรูปแบบอัลลัลที่เกิดขึ้น ในครอบครัวพ่อพันธุ์ s2241 โดยที่พ่อมีอัลลีลรูปแบบเป็น ad และอัลลีลของลูก จะมีอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งจากพ่อ แสดงถึงความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูกกัน

3.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์

1. จำนวนและรูปแบบอัลลีล ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ในแต่ละตำแหน่งที่ทำการศึกษาในประชากรตัวอย่าง

2. การหาความถี่ของอัลลีล (allele frequency; AF) ของไมโครแซทเทลล์ มาร์คเกอร์แต่ละตำแหน่ง (Nei et al., 1978) ดังนี้

$$AF = \frac{2n^{homozygote} + n^{heterozygote}}{2n^{total}} \qquad \text{.....(1)}$$

โดยที่ $n^{homozygote}$ คือ จำนวนโคที่จีโนไทป์เป็น homozygote

$n^{heterozygote}$ คือ จำนวนโคที่จีโนไทป์เป็น heterozygote

n^{total} คือ จำนวนโคตัวอย่างทั้งหมด

3. การหาค่า probability of exclusion(PE) เพื่อหาความน่าจะเป็นของการบอกความไม่สัมพันธ์พ่อกับลูกที่ใช้ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 1 ตำแหน่ง ในการตรวจสอบเนื่องจากเป็นการศึกษาเพียงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูกสาวที่เข้าทดสอบ progeny test (Ron et al., 1996) สูตรการวิเคราะห์จึงเป็น ดังนี้

$$PE = (1 - p)^2 \quad \text{.....(2)}$$

โดยที่ p คือ ผลรวมความถี่อัลลีลของพ่อทั้ง 2 อัลลีล

4. การหาค่าความเชื่อมั่น combine probability of exclusion (CPE) เป็นการคำนวณหาค่าความเชื่อมั่นในการบอกความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก โดยใช้จำนวนไมโครแซทเทลไลท์หลาย ๆ ตำแหน่งร่วมกัน ในการตรวจสอบ (Ron et al.,1996)

$$CPE = 1- \prod^{n} (1-PEi) \quad \text{.....(3)}$$

โดยที่ $\prod$ คือ ผลคูณของค่า PE ที่จำนวน n ตำแหน่ง,

n คือ จำนวนของไมโครแซทเทลไลท์

PEi คือ PE สำหรับโลกัสที่ i

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

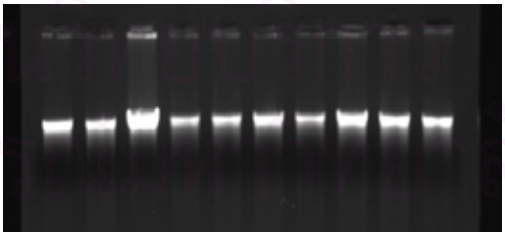
4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโคนม

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของลูกที่เกิดจากพ่อพันธุ์ทั้ง 10 ครอบครัว พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี และมีปริมาณมากเพียงพอต่อการศึกษาในลำดับต่อไป โดยการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel (ดังรูปที่ 4.1)

รูปที่ 4.1 ปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วย 2% agarose gel ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดลูกโคนม

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนม

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมทั้ง 10 ตัว พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีและมีปริมาณที่มากเพียงพอต่อการนำไปศึกษาในขั้นต่อไปได้ จากการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel (ดังรูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนม

4.3 ผลการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกที่พบในครอบครัวโคนม

จากศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง ของพ่อพันธุ์โคนมและลูก 10 ครอบครัว พบว่าในแต่ละตำแหน่งมีความสามารถในการตรวจสอบความสัมพันธ์ที่แตกต่างกัน โดยพิจารณารูปแบบอัลลีลของพ่อที่ปรากฏในจีโนไทป์ของลูก และผลการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูก เป็นดังนี้คือ

ความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูกในครอบครัว H40001 จากการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่ามี 3 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน คือหมายเลข 22, 24,และ 26 จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ BM1824, INRA 023, TGLA 122,และ TGLA 126 โดยสังเกตจากความไม่เกี่ยวข้องกันระหว่างอัลลีลพ่อกับลูกอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 รูปแบบจีโนไทป์(genotype) แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ H40001 กับลูก 8 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์								
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม							
	H40001	22	23	24	25	26	27	28	29
BM1824	ad	cd	aa	be*	be	be*	ad	ad	bd
ETH10	cd	bd	bd	ad	ad	ce	ce	ad	bd
TGLA122	bd	ac*	bd	bb	bd	bd	cd	bc	bc
INRA023	ce	cd	bd	bd*	ac	ce	ce	ce	ce
BM2113	ab	bc	bc	ab	ab	bc	bc	bc	ac
ETH152	ac	ac	ab	ab	ab	ac	ab	ac	ac
SPSS115	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	bc
TGLA227	bd	bd	bc	ad	bd	cd	ad	bd	bd
ETH3	cc	cd	bc	ab	bc	ab	bc	cd	cd
TGLA126	ac	bd*	cd	bc*	bd	bd*	bc	bc	bc
ความสัมพันธ์พ่อ - ลูก [/1]		ไม่มี	มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	มี	มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์พ่อ - ลูก : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนม กับลูกในครอบครัว s2230 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่า มีจำนวน 3 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ หมายเลข ,71, 73 และ 78 จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ETH 10, TGLA 122 และ ETH 152 ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2230 กับลูก 7 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์							
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม						
	s2230	68	70	71	73	75	78	90
BM1824	ad	ad	ad	ad	aa	de	cd	ad
ETH10	bd	bd	bd	ac*	bd	bd	bc	bc
TGLA122	ac	ac	bc	bd*	aa	aa	bc*	bc
INRA023	bc	cc	bb	bb	bd	bb	cd	bd
BM2113	ab	bc	bc	bc	ac	bc	ab	ab
ETH152	ac	ce	bc	bc	bd*	bc	bd*	bc
SPS115	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
TGLA227	bc	bc	ab	bc	bc	bc	ac	ab
ETH3	de	de	ad	ce	ad	ce	ce	de
TGLA126	bc	bc	ac	ac	be	bb	bc	bc
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		มี	มี	ไม่มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก

..... ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนม กับลูกในครอบครัว s2238 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่า มีจำนวน 3 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือหมายเลข 38, 46 และ 48 จากเครื่องหมาย TGLA 122 และ INRA 023 ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 รูปแบบจีโนไทป์แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อ s2238 กับลูก 6 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์						
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม					
	s2238	38	45	46	47	48	51
BM1824	cd	ac	ad	ad	bc	ac	ac
ETH10	ac	ad	ad	ac	ac	ac	ac
TGLA122	ac	bb	bc	bd*	bb	bd*	bb
INRA023	cf	be*	bf	bf	af	cf	bf
BM2113	ab	bc	bc	ab	ab	bc	bc
ETH152	bc	ab	bc	bc	bc	ac	be
SPS 115	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac
TGLA227	bc	ac	bc	bc	bc	bb	bc
ETH3	bd	ac	bd	bd	bd	bd	ac
TGLA126	ab	bc	ab	aa	aa	bc	bc
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		ไม่มี	มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์พ่อ - ลูก : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์กับลูกในครอบครัว s2227 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่า มีจำนวน 1 คู่ที่ไม่มีสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ คู่ลูกหมายเลข 69 จากเครื่องหมาย ETH 10 และ INRA 023 ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2227 กับลูก 6 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูก ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์						
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม					
	s2227	69	74	43	72	77	87
BM1824	bd	ad	bd	ad	ad	ad	cd
ETH10	ab	ac*	bd	ab	bd	bd	ad
TGLA122	ab	ac	aa	ac	ac	ab	bc
INRA023	bd	ac*	bd	bd	bb	ad	bd
BM2113	bd	bd	ab	ab	cd	bd	cd
ETH152	ab	ac	ac	bc	bc	ab	ab
SPS115	ac	aa	ac	ac	bc	ac	bc
TGLA227	cd	be	aa	ac	ac	cd	cd
ETH3	ac	cc	bc	bc	ab	ac	ac
TGLA126	ac	aa	ac	ac	ac	ac	ac
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		ไม่มี	มี	มี	มี	มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก: มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
..... ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกในครอบครัว s2241 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่า มีจำนวน 9 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ คู่ลูกหมายเลข 12,13,14, 15, 16,17, 18, 19 และ 20 จากเครื่องหมาย BM1824, ETH 10, TGLA 122, INRA 023 และ TGLA 227 ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2241 กับลูก 9 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์									
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม								
	S2241	12	13	14	15	16	17	18	19	20
BM1824	ad	ad	ac	ad	ac	ac	be*	df	aa	ad
ETH10	cf	be*	cg	dg*	cf	dg*	cf	ad*	cf	cg
TGLA122	bc	bd	bb	bd	ad*	bd	be	be	dd*	cd
INRA023	cf	bg*	ab*	cf	bd*	cf	dg*	cf	cf	be*
BM2113	ac	bc	cd	bc	bc	bc	cd	cd	cd	ac
ETH152	bc	bc	bc	bc	ac	bc	bc	bc	bc	bc
SPS115	ac	ac	ac	bc	ac	ac	ac	ac	bc	ac
TGLA227	ad	ac	de	dd	de	de	be*	bd	ee*	fg*
ETH3	ab	bc	bc	bc	ab	ab	bc	ab	ab	bc
TGLA126	bc	bc	bc	ac	ac	ab	ab	bc	bc	bc
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี

[/1] ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกในครอบครัว s2232 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 9 ตำแหน่ง พบว่ามีจำนวน 1 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ คู่ลูกหมายเลข 81 จากเครื่องหมาย SPS115 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2232 กับลูก 7 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อลูก ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 9 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์							
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม						
	s2232	44	43	76	79	81	84	86
BM1824	ad	Aa	ac	ad	ac	ad	bd	ad
ETH10	ad	Bd	ac	bd	bd	bd	ad	ad
TGLA122	ce	Ce	ce	bc	cc	ae	ce	bc
INRA023	bd	Cd	bd	bb	bd	bc	bd	bd
BM2113	cd	Cd	bc	ac	ac	ac	cd	cd
ETH152[/2]	-	-	-	-	-	-	-	-
SPSS115	ac	Ac	cc	ac	ac	bb*	ac	ac
TGLA227	cd	Ac	ac	cd	cd	ac	cd	cd
ETH3	bd	Bc	ad	ad	bc	bb	bd	bd
TGLA126	ac	Ab	ac	bc	bc	ac	ac	ac
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		มี	มี	มี	มี	ไม่มี	มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์ : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

[/2] เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกในครอบครัว s2223 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 9 ตำแหน่ง พบว่ามีจำนวน 1 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ คู่ลูกหมายเลข 88 จากเครื่องหมาย INRA 023 ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2223 กับลูก 4 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 9 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์				
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม			
	s2223	42	83	88	80
BM1824	ab	bd	bd	bb	ac
ETH10	ab	bc	bc	ac	ab
TGLA122	bd	bb	bd	bd	bb
INRA023	aa	ab	ad	cd*	ad
BM2113	bc	ab	bc	bc	ac
ETH152	bd	bd	bd	cd	ab
SPS115	ac	ab	bc	ac	ac
TGLA227[/2]	-	-	-	-	-
ETH3	ac	ac	ac	bc	bc
TGLA126	ac	ac	bc	ab	ab
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]	มี	มี	ไม่มี	มี	

[/1] ความสัมพันธ์ : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

[/2] เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกในครอบครัว s2225 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 8 ตำแหน่งพบว่ามีจำนวน 1 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ คู่ลูกหมายเลข 5 จากเครื่องหมาย ETH10 ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2225 กับลูก 9 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 8 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์									
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม								
	2225	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BM1824	bd	ad	cd	bd	bd	bd	cd	de	de	de
ETH10	bd	bc	bd	bd	bd	ac*	bd	bd	bd	bd
TGLA122	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc	bc
INRA023	bd	cd	bd	bd	ad	bd	cd	bd	bd	bd
BM2113	ab	bc	ab	bb	ab	bc	bc	bc	bc	ab
ETH152[/2]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPS115	ac	ac	ac	ac	ac	ac	bc	bc	ac	ac
TGLA227[/2]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETH3	ab	ab	aa	ab	aa	ab	ab	bc	ab	ab
TGLA126	de	de	de	ad	be	de	de	de	de	de
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		มี	มี	มี	มี	ไม่มี	มี	มี	มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์ : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

[/2] เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกในครอบครัว s2228 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูกด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 8 ตำแหน่ง พบว่ามีความสัมพันธ์กันทุกตำแหน่ง ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s2228 กับลูก 2 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 8 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์		
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม	
	s2228	30	89
BM1824	bc	bc	ce
ETH10	ab	ac	ac
TGLA122	bc	bc	ac
INRA023	ac	ac	bc
BM2113	bd	ab	bd
ETH152	ab	ab	ab
SPSS115[/2]	-	-	-
TGLA227[/2]	-	-	-
ETH3	ab	bb	bc
TGLA126	ac	bc	ab
ความสัมพันธ์ พ่อ-ลูก[/1]		มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์ : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

[/2] เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกในครอบครัว s9113 โดยการตรวจสอบการถ่ายทอดอัลลีลของพ่อครึ่งหนึ่งมาสู่ลูก ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง พบว่ามีจำนวน 1 คู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน โดยบ่งบอกความไม่เป็นพ่อกับลูกกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง คือ คู่ลูกหมายเลข 35 จากเครื่องหมาย TGLA 122 ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 รูปแบบจีโนไทป์ที่แสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดของพ่อพันธุ์ s9113 กับลูก3 ตัว จากการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อลูกด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 8 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย	รูปแบบจีโนไทป์			
	พ่อพันธุ์	ลูกโคนม		
	s9113	35	60	55
BM1824	ad	bd	bd	bd
ETH10	ac	ab	ac	ac
TGLA122	cd	ab*	bc	cd
INRA023	ac	bc	ac	ac
BM2113	ab	bc	bc	ab
ETH152	bc	ab	bc	bc
SPSS115[/2]	-	-	-	-
TGLA227[/2]	-	-	-	-
ETH3[/2]	-	-	-	-
TGLA126	ac	ac	ac	ac
ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก[/1]		ไม่มี	มี	มี

[/1] ความสัมพันธ์ : มี หมายถึง โอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก
ไม่มี หมายถึง ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อลูกกัน

[/2] เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้

* อัลลีลของลูกไม่สอดคล้องกับอัลลีลของพ่อ

ตารางที่ 4.11 แสดงจำนวนลูกและเปอร์เซ็นต์ของความสัมพันธ์พ่อกับลูกที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่งในครอบครัวโคนม

เบอร์พ่อ	จำนวนลูก(ตัว)	จำนวนลูกที่มีความสัมพันธ์(ตัว) (%)	
		เป็นพ่อกับลูก	ไม่เป็นพ่อกับลูก
H40001	8	5(62)	3(37)
S2230	7	4(57)	3(42)
s2238	6	3(50)	3(50)
s2227	6	5(83)	1(16)
S2241	9	0(0)	9(100)
S2232	7	5(85)	1(14)
S2223	4	3(75)	1(25)
S2225	9	8(88)	1(11)
S2228	2	2(100)	0(0)
S9113	3	3(100)	0(0)
รวม	61	37(63)	22(36)

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์

1. รูปแบบอัลลีลและความถี่อัลลีลที่พบในครอบครัวพ่อพันธุ์โคนม

จากการศึกษารูปแบบ และจำนวนอัลลีลที่พบทั้งพ่อพันธุ์โคนมและลูกในเขตการเลี้ยงโคนม อ.ส.ค. ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง พบรูปแบบอัลลีลที่กระจายตัวจากอัลลีล a ถึงอัลลีล g สามารถนำมาคำนวณหาความถี่อัลลีลในแต่ละตำแหน่งดังแสดงรายละเอียดตารางที่ 4.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 แสดงรูปแบบอัลลีลและความถี่อัลลีล ที่พบในประชากรโคนมที่ศึกษา ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์	จำนวนตัวอย่าง	รูปแบบอัลลีล/ความถี่อัลลีล							
		a	b	c	d	e	f	g	รวม
BM1824	77	0.318	0.176	0.157	0.289	0.06			1.00
ETH10	75	0.204	0.247	0.213	0.250	0.014	0.010	0.053	1.00
TGLA122	74	0.138	0.388	0.291	0.144	0.034			1.00
INRA023	74	0.148	0.250	0.210	0.108	0.234	0.040	0.007	1.00
BM2113	81	0.196	0.389	0.347	0.066				1.00
ETH152	68	0.269	0.328	0.347	0.044	0.007			1.00
SPS 115	74	0.398	0.201	0.399					1.00
TGLA227	63	0.115	0.298	0.286	0.194	0.085	0.010	0.010	1.00
ETH3	75	0.202	0.320	0.280	0.157	0.040			1.00
TGLA126	81	0.224	0.258	0.333	0.074	0.037			1.00

2. การคำนวณหาค่า PE และค่าความเชื่อมั่น(CPE)

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมกับลูกสาว จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์ ที่บ่งบอกความสัมพันธ์ทางสายเลือด เพื่อดูประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ และพบว่ามีค่าความเชื่อมั่นที่แตกต่างกันไปในแต่ละตำแหน่งทั้ง 10 ตำแหน่ง ดังแสดงในตาราง 4.12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 แสดงค่า PE ของแต่ละครอบครัว และ ค่า CPE จากประชากรโคนมทั้ง 10 ครอบครัว ที่สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ในกระบวนการทำพีซีอาร์ จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง

ไมโครแซทเทลไลท์	PE										Mean (±SD)
	S2241	S2230	S2227	S2225	S2238	H40001	S2232	S2223	S9113	S2228	
BM1824	0.15	0.15	0.29	0.29	0.31	0.15	0.15	0.26	0.32	0.45	0.25 (±.09)
ETH10	0.54	0.53	0.53	0.53	0.34	0.58	0.58	0.30	0.34	0.30	0.46 (±.12)
TGLA122	0.33	0.33	0.33	0.10	0.23	0.10	0.46	0.10	0.10	0.25	0.22 (±.13)
ETH152	0.11	0.15	0.15	-	0.11	0.29	-	0.39	0.15	0.10	0.18 (±.10)
INTRA023	0.41	0.29	0.29	0.41	0.41	0.31	0.41	0.49	0.41	0.41	0.39 (±.05)
TGLA227	0.48	0.17	0.27	-	0.17	0.17	0.27	-	-	-	0.26 (±.10)
ETH3	0.23	0.65	0.65	0.23	0.27	0.28	0.19	0.27	-	0.28	0.29 (±.12)
BM2113	0.17	0.17	0.29	0.17	0.17	0.17	0.29	0.05	0.29	0.29	0.21 (±.07)
TGLA126	0.26	0.17	0.19	0.79	0.27	0.19	0.19	0.19	0.16	0.17	0.26 (±.17)
SPS115	0.16	0.16	0.41	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	-	-	0.12 (±.12)
CPE	0.98	0.97	0.98	0.97	0.94	0.94	0.98	0.93	0.88	0.93	
จำนวนเครื่องหมาย	10	10	10	8	10	10	9	9	7	8	

การตรวจสอบประสิทธิภาพการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นพ่อกับลูก จำนวนครอบครัวที่ศึกษาทั้งหมด 75 คู่ พบจำนวนคู่ที่ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก 22 คู่ จากเครื่องหมาย 10 ตำแหน่ง มีค่าความเชื่อมั่นเป็นช่วงระหว่าง 93-98 เปอร์เซ็นต์ จำนวนคู่ที่ไม่มีความเป็นพ่อกับลูกจากเครื่องหมาย 9 ตำแหน่งพบ 25 คู่ มีค่าความเชื่อมั่นเป็น 93-97 เปอร์เซ็นต์ จำนวนคู่ที่ไม่มีความเป็นพ่อกับลูกจากเครื่องหมาย 8 ตำแหน่ง พบ 26 คู่ มีค่าความเชื่อมั่นเป็นช่วงระหว่าง 93-98 % และไม่พบจำนวนคู่ที่ไม่มีความเป็นพ่อกับลูกจากเครื่องหมาย 7 ตำแหน่ง โดยมีค่าความเชื่อมั่นเป็น 88 % ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าความเชื่อมั่น(CPE) ในการนำเครื่องหมายพันธุกรรมไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกของโคนม

จำนวนเครื่องหมายที่ใช้	จำนวนครอบครัวที่ใช้ศึกษา(คู่)	ความสัมพันธ์(คู่)		ค่าความเชื่อมั่น * CPE(%)
		ไม่เป็นพ่อกับลูก	เป็นพ่อกับลูก	
10	49	22	27	94-98
9	60	25	35	93-98
8	72	26	46	93-97
7	79	30	49	88

* ค่าความเชื่อมั่นของความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผล

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถใช้ได้ดีมีปริมาณเพียงพอที่ทำการศึกษา ทั้งตัวอย่างจากเลือด และตัวอย่างจากน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ในการศึกษา มีการปรับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ที่มีขั้นตอนที่แตกต่างกันกับตัวอย่างจากเลือดในขั้นตอนการย่อยผนังเซลล์ และใช้เวลาในสกัดดีเอ็นเอ ประมาณ 2 ชั่วโมง เป็นการง่าย สะดวกและรวดเร็วในการที่จะนำดีเอ็นเอไปใช้ในการศึกษาต่อไป

5.2 การเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่งสามารถนำมาศึกษาในกลุ่มตัวอย่างโคนม อ.ส.ค จ.สระบุรี สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ให้ความหลากหลายสูง แต่ในบางตำแหน่งไม่สามารถอ่านผลได้และแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบางส่วนไม่ได้มีลักษณะเป็น single band แต่เป็นลักษณะแถบดีเอ็นเอหลายแถบติดกัน ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นนี้เรียกว่า stutter band การเกิดแถบดีเอ็นเอลักษณะเช่นนี้ เป็นลักษณะที่พบโดยทั่วไปจากการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ (ปิยะมาศ,2542) โดยอาจมีผลมาจากการทำงานผิดพลาดของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรช ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในไมโครแซทเทลไลท์ที่เป็น dinucleotide และจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย 6% acrylamide gel พบว่าสามารถตรวจนับแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ แต่การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในแผ่นเจลบางครั้งจะเคลื่อนไปไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่เอียง ซึ่งการอ่านแถบดีเอ็นเอ จึงต้องใช้ความรอบคอบในการอ่านผลและแปลผล ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

5.3 ผลการตรวจสอบความสัมพันธ์ของอัลลีลที่พบในครอบครัวโคนม

ผลการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูก (paternity testing) 10 ครอบครัว จากการศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่งในตารางที่4.11 พบความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อ

กับลูก โดยเมื่อแยกพิจารณาเป็นครอบครัวพบว่ามีอัตราความไม่สัมพันธ์กันตั้งแต่ 0 เปอร์เซ็นต์ในครอบครัว s2228 และ s9113 จนถึง 50 เปอร์เซ็นต์ในครอบครัว s2238 และ เป็นที่น่าสังเกตว่าพ่อ s2241 มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่ตรวจสอบไม่สอดคล้องกับลูกตัวใดเลยในกลุ่มคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการบันทึกพันธุ์ประวัติของพ่อผิดพลาดไปในช่วงทำการผสมพันธุ์ได้ โดยที่อัตราความไม่ถูกต้องของประชากรที่ทำการศึกษาครั้งนี้ 36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Baron และคณะ (2002) ที่ได้ทำการศึกษาในโคนมด้วยไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 6 ตำแหน่ง พบอัตราความไม่ถูกต้อง 36 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ขณะที่การศึกษาของ Ron และคณะ(1996) ได้ทำการศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 12 ตำแหน่ง พบอัตราความไม่สัมพันธ์กัน 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูกที่แตกต่างกันนี้ อาจเนื่องมาจากตัวอย่างประชากรที่นำมาศึกษามีจำนวนและแหล่งที่มาแตกต่างกัน

ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าผลบางส่วนที่ตรวจสอบไม่สอดคล้องกับข้อมูลพันธุ์ประวัติแสดงให้เห็นความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการบันทึกพันธุ์ประวัติที่ไม่ถูกต้องได้ ซึ่งโอกาสของความผิดพลาดที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจาก การไม่บันทึกข้อมูลทันที ทำให้หลงลืมได้ขณะทำการบันทึกในพันธุ์ประวัติ หรือ เกิดความสับสนในการบันทึกเมื่อมีจำนวนโคนมที่ดูแลมากขึ้นและใช้ลักษณะการจำก่อนการบันทึก หรือการใช้ชื่อเรียกแทนการใช้เบอร์หู เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ จึงควรตระหนักถึงความสำคัญของการบันทึกพันธุ์ประวัติซึ่งจะเป็นผลต่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

5.4 รูปแบบและความถี่อัลลีลที่พบในประชากรโคนม

การกระจายตัวของอัลลีลที่พบในเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง ในประชากรโคนม ที่ทำการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความหลากหลายของรูปแบบอัลลีล 3-4 รูปแบบที่พบเป็นส่วนใหญ่ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทุกตัวที่นำไปใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีความหลากหลายที่ไม่สูงมากนัก โดยค่าความหลากหลายของเครื่องหมายที่นิยมใช้ควรอยู่ระหว่าง 6 – 8 อัลลีล และมีความถี่ของการกระจายตัวดี ดังรายงานของ Ron และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 12 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลทสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 6 - 11 อัลลีล จากรายงานของ Vissher และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาในโคนมประเทศอังกฤษด้วยไมโครแซทเทลล์ 10 ตำแหน่งพบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 5 - 16 อัลลีล ขณะที่ Baron และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาในโคพันธุ์ Gir ด้วยไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 6 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลทุก ๆ ตำแหน่งอยู่ในช่วง 7 – 13 อัลลีล และจากรายงานการศึกษาของ Sander และคณะ (2006) ได้

ทำการศึกษาในโคนมพันธุ์ Angeln โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 16 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลของทุกๆ ตำแหน่งอยู่ในช่วง 8-12 อัลลีล

ดังนั้น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้รับคำแนะนำจาก ISAG ที่มีความเหมาะสมในการใช้กับโคยุโรปได้ดี จะเห็นว่ามีประสิทธิภาพปานกลางเมื่อนำมาใช้ในโคนมประเทศไทย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์โคนมที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในฝูงลดลง

5.5 การวิเคราะห์ค่า PE และ CPE ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ทำการศึกษา

จากตารางที่ 4.12 พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ETH 10 เป็นเครื่องหมายที่แสดงค่า PE มากที่สุดแสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายตำแหน่งนี้ในการนำไปใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกที่ให้ความถูกต้องมากที่สุด และเรียงลำดับไปจนถึงเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดดังนี้ INRA023, ETH3, TGLA122, TGLA126, BM1824, BM2113, TGLA122, ETH152 และ SPS115 (ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามหากนำเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดมาวิเคราะห์พร้อมกันพบว่าจำนวน 10 ตำแหน่งให้ค่าความเชื่อมั่นในการบ่งบอกความสัมพันธ์พ่อกับลูกได้ระหว่าง 94-98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์พร้อมกัน 9 ตำแหน่งให้ค่าความเชื่อมั่นในการบ่งบอกความสัมพันธ์พ่อกับลูก 93-98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์พร้อมกัน 8 ตำแหน่งให้ค่าความเชื่อมั่นในการบ่งบอกความสัมพันธ์พ่อกับลูก 93-97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์พร้อมกัน 7 ตำแหน่งให้ค่าความเชื่อมั่นในการบ่งบอกความสัมพันธ์พ่อกับลูก 88 เปอร์เซ็นต์ ดังรายงานของ Ron และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 12 ตำแหน่งให้ค่า CPE 0.99 Visscher และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่งให้ค่า CPE 0.99 ขณะที่ Baron และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่งให้ค่า CPE เพียง 0.84 – 0.98 จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายพันธุกรรมยิ่งใช้จำนวนมากค่า CPE ยิ่งเข้าใกล้ 1 และทำให้ค่าความเชื่อมั่นสูงในการบอกความสัมพันธ์พ่อกับลูก และจากการวิเคราะห์ข้อมูลครอบครัวพ่อพันธุ์ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลล์ไลท์ จำนวน10 ตำแหน่ง จากจำนวน 75 คู่ (ตารางที่ 4.13) พบว่าการใช้จำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มากขึ้นทำให้การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกที่ไม่ถูกต้องลดน้อยลง ดังเช่นผลการใช้จำนวนเครื่องหมาย 7 ตำแหน่ง พบความไม่สัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก 30 คู่ และเมื่อใช้จำนวนเครื่องหมาย 10 ตำแหน่งพบความไม่สัมพันธ์เป็นพ่อกับลูก 22 คู่ และสำหรับการตรวจพบโอกาสที่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อกับลูกที่เครื่องหมาย 7 – 10 ตำแหน่งนั้นแสดงแนวโน้มว่ายิ่งจำนวนเครื่องหมายมากขึ้นค่าความถูก

ต้องในการตรวจความสัมพันธ์พ่อกับลูกยิ่งเพิ่มขึ้น ซึ่งสนับสนุนได้ด้วยค่า CPE ที่เพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

การใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 10 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 7 อัลลีล และในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกในครั้งนี้ พบค่า PE ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.041-0.790 และให้ค่าความเชื่อมั่น(CPE) ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อกับลูก อยู่ระหว่าง 88- 98 % แสดงว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง มีประสิทธิภาพในการตรวจความสัมพันธ์พ่อกับลูกได้ และ จำนวนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นชุดตรวจสอบได้ จำนวนตั้งแต่ 8 - 10 ตำแหน่งจากค่าความเชื่อมั่นที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ ตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป

การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูกในครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 10 ตำแหน่ง พบว่าเครื่องหมายทุกตำแหน่งสามารถตรวจสอบความไม่สัมพันธ์กันระหว่างพ่อกับลูก จำนวน 26 คู่ จากจำนวนที่ศึกษาทั้งหมด 75 คู่

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 ตำแหน่ง และวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบข้อมูลพันธุ์ประวัติในกลุ่มประชากรอื่นๆ ที่มีความไม่ชัดเจนหรือที่สงสัยว่าอาจมีการบันทึกพันธุ์ประวัติที่ผิดพลาด เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อกับลูก และเพิ่มความถูกต้องในการบันทึกพันธุ์ประวัตินำไปสู่การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ในมาร์คเกอร์ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ และไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลในการศึกษารูปแบบอัลลีลที่ครบถ้วน แม่นยำ น่าเชื่อถือ และมีจำนวนตัวอย่างที่มากเพียงพอ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาต่อไปได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ปิยมาส การสมดี. 2542. ความแปรผันทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง *Gallus gallus domesticus* ของไทยโดยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 94 หน้า.

มนต์ชัย ดวงจินดา. 2544. รายงานการประชุมวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ครั้งที่ 4 "วิจัยได้-ใช้ได้จริง" คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.13-14 ธันวาคม 2544.119 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Banos, G., Wiggaus, G.R. and Powell, R.L. 2001. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. Journal of Dairy Science. 84: 2523-2529

Barendse, W.and Armitage, S.M. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome Nature Genetics. 6: 227-235.

Baron, E.E., Martinez, M.L., Verneque, R.S. and Coutinho, L.L. 2002. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. Genetic and Molecular Biology. 25; 4 : 389-394.

Bishop, M.D. and Kappes, S.M. 1994. A genetic linkage map for cattle. Genetics. 136: 619-639.

Brezinsky, L.S., Kemp, J. and Teale, A.J. 1993a. ILSTS005: a polymorphic bovine microsatellite. Animal Genetics. 24:73.

Brezinsky, L.S., Kemp, J. and Teale, A.J. 1993b. ILSTS006: a polymorphic bovine microsatellite. Animal Genetics. 24:75.

Dodds, K.G., Tate, M.L., McEwan, J.C., and Crawford, A.M. 1996. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. Theor. App. Genet. 92: 966-975.

Baron E.E., Mario L. Martinez, Rui S. Verneque and Luiz L. Coutinho. 2002. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. Genetics and Molecular Biology. 25,4: 389-394.

ต้นฉบับไม่มีหน้านี้
NO THIS PAGE IN ORIGINAL

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fires, R., Eggen B., A. and Stranzinger, G. 1990.The bovine genome contains polymorphic microsatellite . Genetics. 8: 403-406.

Gelderman, H., Picper, U. and Weber, W.E. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. J. Animal. Sci. 63: 1759-1768.

Glowatzki Mullis, M.L., Gaillard, C., Wigger, G. and Fries, R. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. Animal Genetics. 26: 7-12.

Georges, M. and Massey, J.M.. (1992). Polymorphic DNA markers in Bovidae Patent WO 92/13102(1992)

Heyen, D.W., Beever, J.E., Da, Y., Evert, R.E., Green, C., Bates, S. R. E., Ziegle, J. S. and Lewin, H.A.1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semi-automated parentage testing. Animal Genetic. 28: 21-27.

Israel, C. and Weller, J.I. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding values in dairy cattle populations. Journal Dairy Science. 83: 181-187.

International Society of Animal Genetics Comparison Test Cattle 1997/1998.Information on DNA Typing, from Reporting Laboratory. Aus., Avekland, New Zealand: ISAG Laboratory Code.

Jamieson, A., St. and Taylor, C. S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Animal Genetics. 28: 397-400.

Kaukinen, J. and Varvio, S.L. 1993. Eight polymorphic bovine microsatellites. Animal Genetics. 24: 148..

Luis, E.J. and Dempster, E.R. 1987. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. Biometrics. 43: 805-811.

Moore, S.S. and Byrne, K.. (1993). Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin

independent adenylcyclase locus Animal Genetics 24 150.

Nei, M. 1978.Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.Genetics.89:583-590.

Rogeio, A. C.. and Catalina, R. L.. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paterrnity frequency in a population of Gyr breed bovines. Brazilian . Veterinariy Reseach of.Animimal.Science 39; 3: 197-206.

Ron, M., Blanc, Y. and Weller, J.I. 1996. Misidentification rate in Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. Journal Dairy Science. 79: 676-681.

Ron, M., Blanc, Y., Band, M., Ezra, E. and Weller, J.I. 1996. Misidentification rate in the Israel dairy cattle population and its implications of genetic improvement. Journal of Dairy Science. 79: 676-681.

Sanders, K., Bennewitz, J. and Kalm, E. 2006. Wrong and Missing Sire Information Affects Genetic Gain in the Angeln Dairy Cattle Population. Journal of Dairy Science. 89:315-321.

Spelman, R. and Garrick, D. 1997. Utiltsation of marker assisted selection in a commercial dairy cow population. Livestock Production Science. 47: 139-147.

Solinas Toldo S., Fries R. et al. (1993) Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes Mammalian Genome 4 720-727

Steffen P., Eggen A. et al. (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in

cattle Animal Genetics 24 121-124

Tautz, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. EXS.67: 21-28.

Usha, A.P., Simpson, S.P. and Williams, J.L.1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. Animal Genetics. 26: 155-161.

Vaiman D., Mercier D. et al. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterisation, synteny mapping, and polymorphism.

Van Vleck, L.D. 1970b. Misidentification in Estimating the Paternal Sib Correlation. Journal of Dairy Science. 53:1697-1702.

Vankan, D.R. and Faddy M.J. 1999. Estimation of the efficiency and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple sire matings. Animal Genetics.30: 355-361.

Visscher, P.M., Woolliams, J.A., Smith, D.T. and Williamst, J.L. 2002. Estimation of pedigree errors in UK dairy population using microsatellite markers in the impact on selection. Journal of Dairy Science. 85: 2368-2375

Weller, J.I., Feldmesser, E., Golik, M., Tager-Cohen, I., Domochovsky, R., Alus, E. Ezra O. and Ron, M. 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. Journal of Dairy Science. 87: 2627-2640.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสุพิชญา เชษฐสิงห์ เกิดเมื่อวันศุกร์ที่ 13 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2513 ภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี พ.ศ. 2536 ปัจจุบันรับราชการที่ โครงการการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก ภายใต้ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย