

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์  
ในการหาความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ในสุกร



นางสาววันวิสาข์ แยมมีกลิ่น

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF THE EFFICACY OF MICROSATELLITE MARKERS  
IN PARENTAGE CONTROL IN SWINE



Miss Wanwisa Yaemmeeklin

สถาบันวิทยบริการ

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University



## 4975582231 : MAJOR ANIMAL BREEDING

KEY WORDS: MICROSATELLITE MARKER / PARENTAGE CONTROL / SWINE

WANWISA YAEMMEEKLIN: EVALUATION OF THE EFFICACY OF MICROSATELLITE MARKERS IN PARENTAGE CONTROL IN SWINE.

ADVISOR: ASSOC.PROF. DUANGSMORN SUWATTANA, D.V.M.,Ph.D., 102 pp.

The objective of this study was to evaluate the efficacy of microsatellite markers in parentage control in swine. Genomic DNA from 80 swine samples were extracted by using 16 microsatellite markers (D00768, KVL9000, NLRIP0001, S0663, S0710, S0719, S0766, SJ859, SJ923, SJ924, SJ925, SJ926, SJ927, SJ929, X53085 and X63893) in each single polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were analyzed using agarose and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The result showed that 15 microsatellite markers could be amplified except SJ925. Seven suitable microsatellite markers were selected for parentage control, followed as S0663, D00768, KVL9000, S0719, NLRIP0001, S0766 and S0710. Allelic numbers of the microsatellite markers varied from 4 to 8. The observed and expected heterozygosities were 0.3250-1.0000 and 0.5456-0.8302 respectively. The polymorphic information content (PIC) was 0.5179-0.8106 and the combined exclusion probability (CEP) was 99.46 %. The results demonstrated that the efficacy of 7 microsatellite loci was high and they can be used as a powerful tool for parentage control in swine in Thailand.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Animal Husbandry..

Field of Study : Animal Breeding...

Academic Year : 2008.....

Student's Signature: Wanwisa Yaemmeklin...

Advisor's Signature: D. Suwattana

วันวิสาข แยมมีกลิน : การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์  
ในการหาความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูกในสุกร. (EVALUATION OF THE EFFICACY OF  
MICROSATELLITE MARKERS IN PARENTAGE CONTROL IN SWINE) อ. ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก: รศ.สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัฑฒน, 102 หน้า.

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรม  
ไมโครแซทเทลไลท์ในการหาความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก จากตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรจำนวน 80  
ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 16 ตำแหน่ง ได้แก่ D00768,  
KVL9000, NLRIP0001, S0663, S0710, S0719, S0766, SJ859, SJ923, SJ924, SJ925,  
SJ926, SJ927, SJ929, X53085 และ X63893 ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี  
polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose และ  
polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ผลการศึกษาพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน  
ดีเอ็นเอได้จำนวน 15 ตำแหน่ง ยกเว้นตำแหน่ง SJ925 ทำการคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไม  
โครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ได้ทั้งสิ้นจำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ S0663, D00768,  
KVL9000, S0719, NLRIP0001, S0766 และ S0710 ซึ่งตรวจพบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 4 - 8  
อัลลีล นอกจากนี้จากการคำนวณค่า observed และ expected heterozygosity พบว่ามีค่า  
0.3250-1.0000 และ 0.5456-0.8302 ตามลำดับ ค่า polymorphic information content (PIC)  
มีค่า 0.5179-0.8106 และ ค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ผลเมื่อนำเครื่องหมายไปใช้งานร่วมกัน  
(combined exclusion probability; CEP) มีค่าเท่ากับ 99.46 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาครั้งนี้แสดง  
ให้เห็นว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง มีประสิทธิภาพในการใช้งานสูง  
และสามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูกของสุกรในประเทศไทยได้ดี

ภาควิชา สัตวบาล.....  
สาขาวิชา การปรับปรุงพันธุ์สัตว์.....  
ปีการศึกษา 2551.....

ลายมือชื่อนิสิต วันวิสาข แยมมีกลิน.....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงสมร สุวัชฌน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เป็นอย่างดีตลอดช่วงระยะเวลาในการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความรู้ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิจัยอย่างมาก ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาสัตวบาล และ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่สละเวลาให้คำแนะนำต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ สพ.ญ. ทิวากร ศิริโชคชัชวาล คุณละออ เอี่ยมสมบูรณ์ และคุณวิรัตน์ โชคนานานุกูล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างสุกรสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้ และคุณวีระ บัวผัน ที่ช่วยติดต่อประสานงาน และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง คุณจุฑารัตน์ จิระศุภโชค เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุณวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ซึ่งให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ นิสิต ปริณญาโท สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ที่ให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ .....	ฎ
บทที่	
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ความผิดพลาดของการบันทึกพันธุประวัติ .....	5
ลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิต.....	6
เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular markers) .....	10
1. เครื่องหมายโปรตีน .....	10
2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	10
การเพิ่มจำนวน Microsatellite DNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction).....	12
การวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์.....	13
1. คำนวณค่าความถี่อัลลีล .....	14
2. คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตี .....	14
3. คำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC).....	15
4. คำนวณค่า Exclusion probabilities (EP).....	16
5. คำนวณค่า Combined exclusion probability (CEP).....	17

บทที่	หน้า
การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก (Parentage Testing; Parentage Control) .....	18
การศึกษาการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในสุกร .....	19
1. ความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์.....	19
2. จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์กับการตรวจสอบ ความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก.....	20
3. การพัฒนาหาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ .....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
แหล่งที่มาของตัวอย่าง .....	23
1. กลุ่มสุกรที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด.....	23
2. กลุ่มสุกรที่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด .....	23
การเก็บตัวอย่าง .....	24
1. การเก็บตัวอย่างเลือด .....	24
2. การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ.....	24
การเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ .....	24
การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ .....	26
1. การสกัดดีเอ็นเอ .....	26
2. การตรวจสอบดีเอ็นเอ .....	29
3. การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ด้วยเทคนิค PCR .....	30
4. การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย Gel Electrophoresis.....	31
5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ Ethidium Bromide .....	34
การตรวจสอบลำดับเบส.....	34
วิธีการอ่านผลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จากแผ่นเจล .....	34
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	35



บทที่	หน้า
การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง .....	38
1. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก.....	38
2. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านการระบุตัวตนสัตว์ .....	40
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ .....	41
การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด และน้ำเชื้อของสุกร .....	41
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์.....	42
การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ด้วยเทคนิค PCR.....	42
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	51
การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง .....	56
1. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก.....	56
2. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านการระบุตัวตนสัตว์ .....	57
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการศึกษา .....	58
การสกัดดีเอ็นเอ .....	58
ความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์.....	58
ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรที่ศึกษา .....	59
ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก .....	60
การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง .....	61
บทที่ 6 สรุปผล และข้อเสนอแนะ .....	63
รายการอ้างอิง.....	65
ภาคผนวก .....	73
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	102

## สารบัญตาราง

ญ

ตาราง	หน้า
2.1 ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล ลักษณะที่สำคัญ และการประยุกต์ใช้.....	11
3.1 เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษา .....	25
3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	30
3.3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการทำ polyacrylamide gel .....	33
3.4 ความสอดคล้องของรูปแบบอัลลีลที่เหมือนกันอย่างน้อย 1 อัลลีล ในเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง แสดงถึงโอกาสของความสัมพันธ์เป็น พ่อ-ลูก.....	39
3.5 ความไม่สอดคล้องของรูปแบบอัลลีล ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง แสดงว่าไม่ใช่พ่อที่แท้จริงของลูก .....	39
3.6 โอกาสของความสัมพันธ์เป็นพ่อ-แม่-ลูก พิจารณาจากรูปแบบอัลลีลของลูก จะเหมือนพ่อหนึ่งอัลลีล และเหมือนแม่หนึ่งอัลลีล ในเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง.....	40
3.7 ความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างน้อยที่สุด ที่สามารถพบได้จากสัตว์ 2 ตัว .....	40
4.1 อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR .....	42
4.2 จำนวนอัลลีล รูปแบบอัลลีล ความถี่อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และจากทฤษฎี ( $H_{Obs}$ , $H_{Exp}$ ) ค่าไคสแควร์ (ตัวหนาแสดงความแตกต่างของค่า $H_{Obs}$ , $H_{Exp}$ ) และค่า PIC ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง .....	52
4.3 ค่า Exclusion probabilities (EP) และ Combined exclusion probability (CEP) .....	55
ตารางภาคผนวก	
1. การเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมของสัตว์ 2 ตัว ณ หนึ่งตำแหน่ง (locus) ซึ่งมีคู่ของจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งหมด 7 ประเภท .....	75
2. ค่าความน่าจะเป็นของพ่อที่ถูกแยกออก โดยพิจารณาคู่ของอัลลีลที่เกิดขึ้น ซึ่ง A และ B เป็นความถี่อัลลีลของ a และ b.....	76
3. Exclusion formulae สำหรับ 3 อัลลีลระหว่าง ( $a^2 + b^2 + c^2$ ) และ ( $a^3 + b^3 + c^3$ ) .....	78
4. ความถี่ของแต่ละ trio, transmission informativeness ของแต่ละพ่อ แม่ ( $I_{1t}$ , $I_{2t}$ ) และค่าความน่าจะเป็นของการทราบพ่อ และ แม่ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาของอัลลีลลูก ( $I_{dt}$ ) .....	80
5 การเตรียมสารละลาย Buffer X2 ในปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร หรือ 0.625 มิลลิลิตร .....	97
6 รายละเอียดข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากห้องปฏิบัติการ และข้อมูลของบันทึกพันธุประวัติจากตัวอย่างสุกรที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 80 ตัวอย่าง .....	98

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 แสดงองค์ประกอบของจีโนม .....	7
3.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด และน้ำเชื้อสุกร โดยชุดน้ำยาสกัดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAamp® DNA Blood Mini kit).....	28
4.1 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดสุกร ตรวจสอบด้วย 2 % agarose gel ....	41
4.2 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำเชื้อสุกร ตรวจสอบด้วย 2 % agarose gel ....	41
4.3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ924 (ภาพบน) และ SJ929 (ภาพล่าง).....	43
4.4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ926.....	43
4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง X63893 .....	44
4.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ927.....	44
4.7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ923.....	45
4.8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ859.....	45
4.9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง X53085 .....	46
4.10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0663 .....	46
4.11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง D00768 .....	47
4.12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง KVL9000 .....	48
4.13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0719 .....	48

ภาพประกอบ	หน้า
4.14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง NLRIP0001 .....	49
4.15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0766 .....	50
4.16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0710 .....	50
4.17 กราฟการกระจายตัวของความถี่อัลลีล ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง .....	53
4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า EP กับ จำนวนของเครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ที่เพิ่มขึ้น ทั้ง 7 ตำแหน่ง.....	56
 ภาพภาคผนวก	
1. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0663 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 37 .....	83
2. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง D00768 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 11 (Pi/1ก), 11(Pi/2ข) และ 80(80ปค) .....	85
3. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง KVL9000 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 71 (KVL1) และ 52 (KVL2) .....	86
4. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0719 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 7 .....	87
5. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง NLRIP0001 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 1.....	88
6. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0766 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 20.....	89
7. ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0710 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 16 (1H) และ 64 (2H).....	91

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีการนำเข้าสุกรพันธุ์ดีจากต่างประเทศ ทั้งการนำเข้าสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ หรือการนำเข้าน้ำเชื้อสุกร นอกจากนี้ยังมีวิธีการคัดเลือกภายในประชากร และวิธีการวางแผนผสมพันธุ์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุกรรมของสุกรภายในประเทศให้ดีขึ้น โดยการปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวจำเป็นต้องทราบพันธุประวัติของสุกรที่ถูกต้อง เพื่อให้การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมมีความแม่นยำ จึงจะส่งผลให้การปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Visscher et al., 2002; Weller et al., 2004) ในการคัดเลือกสุกรนั้น ถ้ามีการใช้ข้อมูลของสุกรที่มีพันธุประวัติที่ไม่ถูกต้อง จะทำให้ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของลักษณะที่ต้องการคัดเลือกลดลง (Banos et al., 2001) ซึ่งจากการศึกษาของ Long และคณะ (1990) พบว่าการที่พันธุประวัติของสุกรผิดพลาดไป 20 เปอร์เซ็นต์ต่อชั่วรุ่น จะทำให้ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมที่คำนวณได้โดยวิธี Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) มีค่าลดลง ซึ่งความผิดพลาดนี้ก่อให้เกิดอคติในการประมาณค่าพารามิเตอร์ โดยอคติที่เกิดขึ้นจะผันแปรโดยตรงกับจำนวนข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง (Israel and Weller, 2000; Banos et al., 2001) อย่างไรก็ตามการที่ข้อมูลพันธุประวัติอาจไม่ชัดเจนได้ เนื่องจากการจดบันทึกพันธุประวัติ หรือ การจดบันทึกเบอร์น้ำเชื้อที่ใช้ผสมไม่ถูกต้อง การย้ายฝากลูกสุกร หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการผสมพันธุ์ด้วยพ่อพันธุ์หลายตัว ทำให้ไม่สามารถระบุพ่อที่ชัดเจนของลูกสุกรได้ (Xue et al., 1998; Sherman et al., 2004; Aguilera-Reyes et al., 2006)

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางอณูพันธุศาสตร์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม (Kaul et al., 2001) ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Fang et al., 2005) การระบุตัวตน (Putnova et al., 2003; Thuy et al., 2006) และการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก (Nechtelberger et al., 2001; Putnova et al., 2003) ปัจจุบันการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก นิยมตรวจโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เนื่องจากให้ผลการตรวจที่แม่นยำกว่าการตรวจสอบจากกลุ่มเลือด เนื่องจากกลุ่มเลือดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (Henke et al., 1999) ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรมไมโคร

แซทเทลไลท์ที่มีความหลากหลายสูง ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ มาช่วยทำให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของตัวสัตว์ที่ถูกต้องแม่นยำขึ้น

การประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ โดยเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะการเรียงตัวของลำดับเบสสั้น ๆ เรียกว่า ลำดับเบสแกน (core sequence) จำนวน 1-6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส ทำการเรียงตัวซ้ำ ๆ กัน โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง (Chambers and MacAvoy, 2000) โดยการเรียงตัวของเบสลักษณะนี้สามารถพบได้ง่าย เพราะกระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีความผันแปรของจำนวนซ้ำสูง ทำให้สามารถตรวจพบรูปแบบความหลากหลายได้สูง (polymorphism) ซึ่งรูปแบบความหลากหลาย ณ ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ที่ตรวจพบเรียกว่า อัลลีล โดยจำนวน และรูปแบบของอัลลีลจะมีความแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละตัว สัตว์แต่ละกลุ่มประชากร และสัตว์ภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน (Goldstein and Pollock, 1997; Toth et al., 2000) นอกจากนี้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในสัตว์แต่ละชนิดพันธุ์จะมีความแตกต่างกันไป มีลักษณะเป็น species-specific markers จึงทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ข้ามชนิดพันธุ์ได้ (Webster and Reichart, 2005) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎของเมนเดล สามารถถ่ายทอดจากพ่อ แม่ ไปยังรุ่นลูกได้ และไม่เปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยของสิ่งแวดล้อม (Curi and Lopes, 2002) ทำให้เครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดอย่างกว้างขวาง

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอได้ง่ายด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยกำหนดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมประมาณ 200-600 คู่เบส เพื่อให้ผลผลิต PCR อ่านผลได้ชัดเจน (Saiki et al., 1988) เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีรายงานไว้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่เป็นแบบไดนิวคลีโอไทด์ คือมีลำดับเบสแกนเป็นเบสเพียง 2 ตัว ซึ่งในขั้นตอนการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอ มักจะเกิดความผิดพลาดที่เรียกว่า slippage bases ได้โดยง่าย ทำให้การอ่านผลผิดพลาดได้ (Schlotterer and Tautz, 1992) ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แบบไตรนิวคลีโอไทด์ (ลำดับเบสแกนประกอบด้วยเบส 3 ตัว) และ เตตระนิวคลีโอไทด์ (ลำดับเบสแกนประกอบด้วยเบส 4 ตัว) มีรายงานว่าพบความผิดพลาดได้น้อยลง (Schlotterer and Tautz, 1992; Lai and Sunny, 2003)

การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ลูก (Parentage control) โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานทางด้านอณูพันธุศาสตร์ของสัตว์ชนิดนั้น ๆ โดยตรง จะทำให้ผลของความสัมพันธ์ทางครอบครัวชัดเจนขึ้น และช่วยเพิ่มความถูกต้องของพันธุ์ประวัติ งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการระบุความสัมพันธ์พ่อแม่ลูก ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น โค ม้า แพะ และ สุนัข เป็นต้น ส่วนมากจะใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่มีรูปแบบเป็นไดนิวคลีโอไทด์ โดยแต่ละงานวิจัยจะใช้จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์แตกต่างกัน ตั้งแต่ 6-14 ตำแหน่ง และได้ค่าความแม่นยำอยู่ในช่วง 98.88-99.99 เปอร์เซ็นต์ (Schnabel et al., 2000; Ichikawa et al., 2001; Jakabova et al., 2002; Jimenez-Gamero et al., 2006; Lee and Cho, 2006) สำหรับในสุกรการศึกษาความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่มีรูปแบบเป็นไดนิวคลีโอไทด์ จำนวนเครื่องหมายที่ใช้ตั้งแต่ 10-15 ตำแหน่ง ให้ค่าความแม่นยำอยู่ในช่วง 95.94-99.99 เปอร์เซ็นต์ (Nechtelberger et al., 2001; Putnova et al., 2003; Rohrer et al., 2007)ซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างกันค่อนข้างกว้าง ทั้งนี้เนื่องจากความหลากหลายของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งที่แตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากร เป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพและค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ (Groenen et al., 2003)

ประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง ขึ้นอยู่กับจำนวนอัลลีล และความถี่อัลลีล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในแต่ละประชากร และจะส่งผลต่อความแม่นยำในการนำไปใช้งาน เนื่องจากจำนวนอัลลีลแสดงถึงความหลากหลายของเครื่องหมายในประชากรนั้น ๆ และสัดส่วนของความถี่อัลลีล แสดงถึงลักษณะการกระจายตัวของอัลลีล โดยจำนวนอัลลีลมาก และความถี่อัลลีลที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพที่ดีของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่ง (Khatib et al., 1994; Behl et al., 2006) นอกจากนี้ ค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ผลยังขึ้นอยู่กับจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่นำมาใช้งาน เนื่องจากจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยลดโอกาสของความผิดพลาดในการวิเคราะห์ผลลง (Glowatzki-Mullis et al., 1995; Nechtelberger et al., 2001; Jakabova et al., 2002)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการคัดเลือกและ ตรวจสอบข้อมูลความหลากหลายของ เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในฝูงสุกรของประเทศไทย เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพ ในการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง และทำการตรวจสอบ ความแม่นยำสำหรับการใช้หาความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ในสุกร

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบความหลากหลาย (polymorphism) ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ แต่ละตำแหน่งของสุกร
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ แต่ละ ตำแหน่ง
3. เพื่อศึกษาค่าความแม่นยำของชุดเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ สำหรับการ นำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ในสุกร

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทราบรูปแบบความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ แต่ละตำแหน่ง ของสุกร
2. ทราบถึงประสิทธิภาพในการใช้งาน ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง
3. ทราบค่าความแม่นยำของชุดเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ สำหรับการนำไปใช้ ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก ในสุกร ที่ต้องการยืนยันความชัดเจนของบันทึกพันธุ์ประวัติ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุกรรมของสุกร สามารถทำได้โดยใช้ข้อมูลจากลักษณะปรากฏของตัวสัตว์ และความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์ มาคำนวณค่าการผสมพันธุ์ (breeding value) โดยใช้หลักการของแบบหุ้มผสม (mixed model) ที่เรียกว่าวิธี BLUP (Henderson, 1984) ค่าการผสมพันธุ์ที่ได้จากวิธี BLUP นี้ จะมีความแม่นยำกว่าวิธีอื่นเนื่องจากการใช้ข้อมูลพันธุ์ประวัติของตัวสัตว์มาช่วยในการประเมิน (Keele et al., 1988) นอกจากนี้อาจคัดเลือกโดยใช้ดัชนีการคัดเลือก ซึ่งเป็นการรวมข้อมูลของลักษณะหลายลักษณะเข้าด้วยกัน ซึ่งจะทำให้ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมสูงสุด (Visscher and Haley, 1998) หลังจากการคัดเลือกจะต้องมีการจัดคู่ผสมพันธุ์ ในที่นี้การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายเลือดจากบันทึกพันธุ์ประวัติจะมีความสำคัญ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดเลือดชิด (inbreeding) ดังนั้นการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์สุกรจึงต้องคำนึงถึงความสำคัญของบันทึกพันธุ์ประวัติ เพื่อช่วยในการคัดเลือกมีความถูกต้องแม่นยำขึ้น ตลอดจนช่วยให้สามารถวางแผนการจับคู่ผสมได้อย่างถูกต้อง

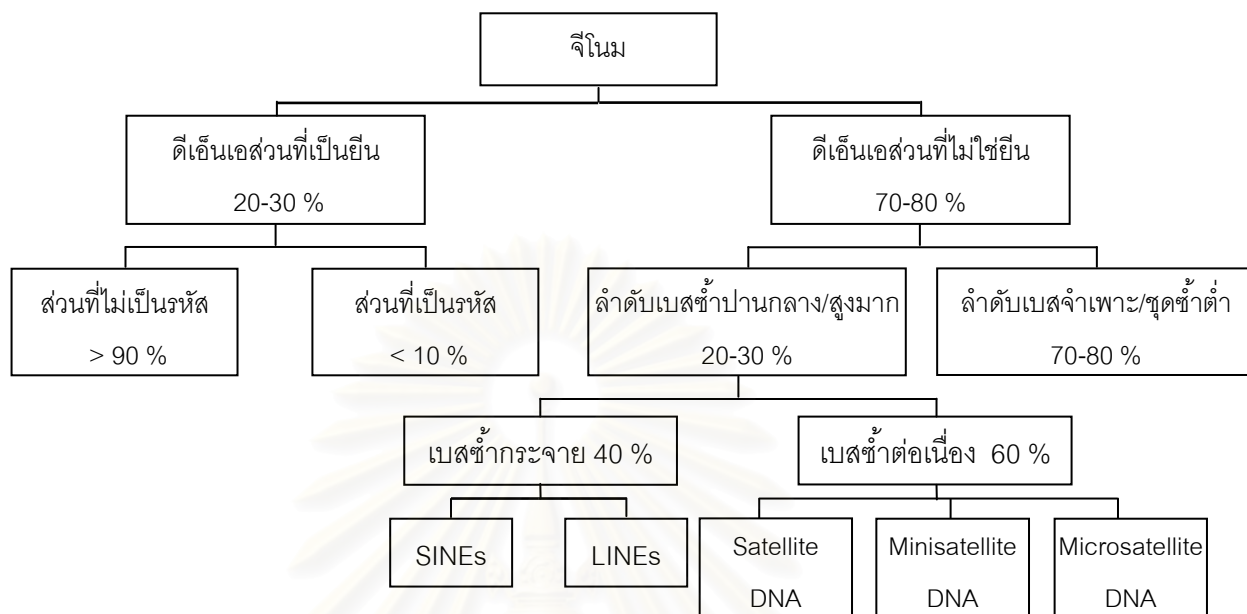
### ความผิดพลาดของการบันทึกพันธุ์ประวัติ

การรวบรวมข้อมูลสำหรับใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ต้องกระทำอย่างถูกต้อง เพื่อสามารถระบุตัวสัตว์ ทั้งพ่อ และ แม่ได้อย่างแม่นยำ ความผิดพลาดของการระบุตัวสัตว์จะนำไปสู่การคัดเลือกที่ไม่ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ และลดความก้าวหน้าทางพันธุกรรม (Banos et al., 2001) อัตราความผิดพลาดในการระบุตัวสัตว์ในฝูงปรับปรุงพันธุ์สัตว์ทุกชนิด ประมาณ 2-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราความผิดพลาดในการระบุตัวสัตว์ 20 เปอร์เซ็นต์ จะลดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมลง 4-12 เปอร์เซ็นต์ต่อชั่วรุ่นขึ้นอยู่กับลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากการศึกษาของ Juneja และ Vogel (1998) ได้รายงานไว้ในหลายประเทศมีการระบุความสัมพันธ์ผิดพลาด โดยเฉพาะการระบุความสัมพันธ์พ่อ กับ ลูก ซึ่งในฝูงการปรับปรุงพันธุ์ของสุกรอาจจะสูงได้ถึง 10-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำวิธีการตรวจกลุ่มเลือดเข้ามาใช้จะมีความผิดพลาดลดลงเหลือประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์เข้ามาใช้ในการตรวจสอบซึ่งมีความแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบจากกลุ่มเลือด และ

สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ในกรณีที่สัตว์ตาย ความผิดพลาดของการบันทึกพันธุประวัติสามารถเกิดขึ้นระหว่างการป้อนข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ เนื่องจากการอ่านข้อมูลผิดพลาด ต้นฉบับผิดพลาด ความผิดพลาดของการจดบันทึกพันธุประวัติที่ไม่ชัดเจน การเขียนเบอร์น้ำเชื้อผิดพลาด การย้ายฝากลูกสุกร หรือการผสมโดยใช้พ่อพันธุ์มากกว่า 1 ตัว (Sherman et al., 2004; Weller et al., 2004; Aguilera-Reyes et al., 2006) โดยค่าพารามิเตอร์ที่ประมาณได้จะมีอคติมากขึ้น เมื่อข้อมูลมีความผิดพลาดมากขึ้น (Visscher et al., 2002) สุกรเป็นสัตว์ที่ออกลูกเป็นครอก ดังนั้นข้อมูลของสุกรส่วนใหญ่จะมีอัตราความผิดพลาดของพันธุประวัติสูงกว่าข้อมูลโคนม (Long et al., 1990) ความถูกต้องของการบันทึกข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์แต่ละตัวทำให้การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของสัตว์แต่ละตัวมีความแม่นยำ ส่งผลให้การวางแผนปรับปรุงพันธุ์ประสบความสำเร็จ (Ron et al., 1996; Baron et al., 2002; Weller et al., 2004)

### ลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิต

จีโนม คือ ชุดของดีเอ็นเอทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในนิวเคลียสของทุก ๆ เซลล์ ซึ่งเป็นสิ่งที่กำหนด และควบคุมลักษณะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต ในจีโนมของยูคาริโอต ประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นยีน 20-30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นรหัสพันธุกรรม และไม่เป็นรหัสพันธุกรรม และอีกส่วนของจีโนม พบอยู่นอกยีนเรียกว่าดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน (extragenic DNA) ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีลำดับเบสเกิดซ้ำ ๆ กัน อาจเป็นแบบที่ชุดซ้ำแต่ละซ้ำเรียงต่อเนื่องกันไปโดยไม่มีเบสอื่นมาคั่นกลาง (tandem repeat) ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบ่งตามขนาดของชุดซ้ำ และความยาว ได้แก่ แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ หรืออาจเป็นลำดับเบสที่เกิดซ้ำ ๆ กันกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (interspersed repeats) ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่อง แต่จะกระจายอยู่เดี่ยว ๆ มีทั้งแบบสั้น (short interspersed elements; SINES) และแบบยาว (long interspersed elements; LINES) ส่วนอีกชนิดหนึ่งเป็นพวกที่มีลำดับเบสจำเพาะ ซึ่งพบเพียง 1 ครั้งต่อ 1 จีโนม เรียกว่า unique sequence ซึ่งเป็นส่วนของยีนที่นำรหัสมาเป็นโปรตีน ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของจีโนม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Winter และคณะ (2002)

โครโมโซมปกติของสุกรเลี้ยง (*Sus scrofa domestica*) ประกอบด้วยโครโมโซม 19 คู่ 38 แห่ง ( $2n=38$ ) (Schook et al., 2005) องค์ประกอบที่เป็นดิพลอยด์ประกอบด้วยโครโมโซมชนิด submetacentric จำนวน 5 คู่ subtelocentric จำนวน 2 คู่ metacentric จำนวน 5 คู่ acrocentric จำนวน 6 คู่ ซึ่งเป็นโครโมโซมร่างกาย ส่วนโครโมโซมเพศในสุกรเพศผู้เป็น XY และสุกรเพศเมียเป็น XX ซึ่ง โครโมโซม X เป็น metacentric ขนาดใกล้เคียงกับโครโมโซมคู่ที่ 9 และ Y เป็น metacentric ขนาดเล็ก (Gustavsson, 1988) ความซับซ้อนของขนาดจีโนมในสุกรมีความคล้ายคลึงกับของมนุษย์ คือ ประกอบด้วยลำดับเบส (base sequence) ประมาณ  $3 \times 10^9$  คู่เบส

ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequence) ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่ยีน อยู่บนตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้คือ เบสซ้ำต่อเนื่อง และเบสซ้ำกระจาย

## 1. เบสซ้ำต่อเนื่อง

เบสซ้ำต่อเนื่อง เป็นชุดซ้ำแต่ละซ้ำเรียงต่อเนื่องกันไปโดยไม่มีเบสอื่นมาคั่นกลาง เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างที่เกิดจากจำนวนซ้ำที่ต่างกันของเบสซ้ำแบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ได้แก่

### 1.1 แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Satellite DNA)

แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำขนาด 1-6 คู่เบส หรือหลายร้อยเบส และตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะประกอบด้วยชุดซ้ำเรียงต่อกัน 1,000-10,000,000 ครั้ง จัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสเป็นจำนวนมาก (highly repetitive DNA) ตำแหน่งของแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ มักพบอยู่ที่เดียวกับเฮเทอโรโครมาติน พบอยู่ใกล้กับเซนโทรเมียร์ และเทโลเมียร์ โดยแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับเซนโทรเมียร์มีลำดับเบสค่อนข้างเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด

### 1.2 มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Minisatellite DNA)

มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่มีหลายชุดซ้ำขนาดสั้นกว่าแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ การเรียงตัวของเบสซ้ำขนาด 9-100 คู่เบส และตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะประกอบด้วยชุดซ้ำเรียงต่อกัน 10-1,000 ครั้ง จัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสขนาดปานกลาง (moderately repetitive DNA) ในจีโนมของคนพบมินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอส่วนใหญ่อยู่ที่บริเวณเทโลเมียร์ หรือ ใกล้ ๆ กับเทโลเมียร์ และพบกระจายอยู่ทุกโครโมโซม จำนวนชุดซ้ำที่พบแตกต่างกันมาก เรียกว่า variable number tandem repeats (VNTRs)

### 1.3 ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Microsatellite DNA)

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ มีชื่อเรียกว่า Simple sequence repeats (SSRs) หรือ Short tandem repeats (STRs) หมายถึง ดีเอ็นเอที่มีลักษณะการเรียงตัวของลำดับเบสแกนที่มีขนาดประมาณ 1-6 คู่เบส (Goldstein and Pollock, 1997) โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง มีการกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนมของสัตว์ ประมาณ  $10^4$ - $10^5$  ตำแหน่ง ซึ่งจะพบเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ มีรูปแบบการซ้ำอย่างง่ายโดยรูปแบบการซ้ำส่วนใหญ่ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น  $(A)_n$ ,  $(CA)_n$ ,  $(AAAT)_n$ , และ  $(AG)_n$  เมื่อ  $(-A-)$ ,  $(-CA-)$ ,  $(-AAAT-)$  และ  $(-AG-)$  เป็นลำดับเบสแกน (core sequence) และ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยรูปแบบการซ้ำสาย

สั้นจะพบได้บ่อยมากกว่าสายยาว (สุรินทร์, 2545; Behl et al., 2002) ส่วนมากพบบริเวณส่วนของยีนที่ไม่ถอดรหัสเป็นโปรตีน (non-coding region) เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีรูปแบบเป็นไดนิวคลีโอไทด์พบในจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 30-67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยทั่วไปในจีโนมของสุกรมีรูปแบบการซ้ำเป็น  $(CA)_n$  และ  $(GT)_n$  ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 65,000-100,000 ตำแหน่ง (Wintero et al., 1992; Toth et al., 2000) โดยความผันแปรของจำนวนซ้ำสูงทั้งในระดับสัตว์แต่ละตัว สัตว์แต่ละฝูง และสัตว์แต่ละพันธุ์ ทำให้ไมโครแซทเทลไลท์ที่มีความหลากหลายสูง เหมาะที่จะใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม นอกจากนี้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอยังมีขนาดเล็กพอที่จะทำการเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนโดยวิธี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็ว (Saiki et al., 1988; Thomson et al., 1999) สามารถใช้ตัวอย่าง เลือด รากขน น้ำเชื้อ ปัสสาวะ กระดูก และเยื่อช่องปาก เป็นต้น เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR

ในขั้นตอนการทำ PCR อาจเกิดความผิดพลาดของการเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการเลื่อนของเบส (slippage base) เนื่องจากการขาดหายไป (deletions) หรือการเพิ่มจำนวน (insertions) ภายในชุดซ้ำสั้น ๆ ของลำดับเบสซ้ำที่มีเบสแกนเรียงตัวกันหลาย ๆ หน่วยซ้ำนั้นบนสายดีเอ็นเอ และอาจจะส่งผลต่อการจับคู่ของเบสที่ผิดพลาด (Chambers and MacAvoy, 2000; Oliveira et al., 2006) โดยในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูก ในสัตว์ส่วนใหญ่จะใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แบบไดนิวคลีโอไทด์ ซึ่งอาจจะแสดงผลของบางอัลลีลที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการเลื่อนของเบส ทำให้เกิดการสร้างแถบของดีเอ็นเอหลายแถบ (multiple bands) จากชุดซ้ำเดียว ส่งผลให้การอ่านผลคลาดเคลื่อน (Schlotterer and Tautz, 1992; Urquhart et al., 1995) ซึ่งการเลือกใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แบบไตรนิวคลีโอไทด์ และแบบเตตระนิวคลีโอไทด์ ที่มีการกระจายตัวในจีโนมน้อยกว่าแบบไดนิวคลีโอไทด์ มีโอกาสเกิดอัตราการเลื่อนของเบสที่น้อยกว่าไดนิวคลีโอไทด์ (Schlotterer and Tautz, 1992; Tozaki et al., 2000; Phavaphutanon, 2005)

## 2. เบสซ้ำกระจาย

เบสซ้ำกระจาย เป็นกลุ่มของเบสซ้ำ ๆ ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม โดยจะไม่พบซ้ำกันเป็นช่วงต่อเนื่อง แต่จะกระจายอยู่เดี่ยว ๆ มีทั้งแบบสั้น (SINES) มีขนาดประมาณ 130-300 คู่เบส และแบบยาว (LINES) มีขนาดประมาณ 500 เบสขึ้นไป

## เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular markers)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

### 1. เครื่องหมายโปรตีน

การตรวจสอบความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนในสิ่งมีชีวิตใช้วิธีแยกโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม ซึ่งข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์ นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ co-dominant ช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซโกต หรือเฮเทอโรไซโกตได้ แต่มีข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายทั่วทั้งจีโนม นอกจากนี้โปรตีน และไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน (สุรินทร์, 2545)

### 2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ถูกใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง หรือ สปีชีส์หนึ่ง เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดรูปแบบความหลากหลาย (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์สัตว์ได้ให้ความสนใจในการคัดเลือกสัตว์โดยวิธี marker-assisted selection (MAS) ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกสูง เนื่องจากการคัดเลือกสัตว์จากข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ที่แท้จริงของสัตว์แต่ละตัว โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ได้แก่ Microsatellite (SSRs), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ Single nucleotide polymorphisms (SNPs) เป็นต้น (Beuzen et al., 2000) ซึ่งเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอแต่ละชนิดแสดงระดับความหลากหลาย (polymorphism) แตกต่างกัน และมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานที่แตกต่างกัน

เครื่องหมายทางโมเลกุลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ชนิดที่ 1 (type I) เป็นเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับยีนซึ่งรู้หน้าที่ เช่น RFLP ส่วนชนิดที่ 2 (type II) เป็นเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่รู้หน้าที่ เช่น RAPD, AFLP และ SSRs (O'Brien, 1991) ซึ่งชนิดที่ 2 นี้เป็นเครื่องหมายที่นิยมนำมาใช้เพราะมีความหลากหลายสูง และสามารถเข้าร่วมกับปฏิกิริยา PCR เพื่อหาจีโนมไทป์ของสัตว์แต่ละตัว รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล ลักษณะที่สำคัญ และการประยุกต์ใช้

Marker type	Mode of Inheritance	Requires prior molecular information?	Type	Locus under investigation	Polymorphism	Major applications
Allozyme	Co-dominant	yes	type I	single	low	Linkage mapping, population studies
RFLP	Co-dominant	yes	type I หรือ type II	single	low	Linkage mapping
RAPD	Dominant	no	type II	multiple	medium	Fingerprinting for population studies
AFLP	Dominant	no	type II	multiple	high	Fingerprinting for population studies
SSRs	Co-dominant	yes	type II	single	high	Linkage mapping, population studies, paternity analysis
SNPs	Co-dominant	yes	type I หรือ type II	single	high	Linkage mapping, population studies

ที่มา : ดัดแปลงจาก Dodgson และคณะ (1997); Liua และ Cordes (2002)

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีคุณลักษณะที่สำคัญซึ่งมีความเหมาะสมในการเป็นเครื่องหมายทางด้านอนุพันธุศาสตร์ ดังนี้

1. แสดงระดับความหลากหลายค่อนข้างสูง เนื่องจากพบความแปรปรวนของอัลลีลสูง
2. สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของสัตว์ที่เป็นโฮโมไซโกต หรือ เฮเทอโรไซโกตได้ (co-dominant) เพราะปกติสัตว์จะมีโครโมโซม 2 ชุด ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันจึงมี 2 ชุด ซึ่งอาจเหมือนกัน หรือแตกต่างกัน
3. ง่ายต่อการวิเคราะห์ และเกิดขึ้นโดยกระจายทั่วทั้งจีโนม (Ron, 1996) ซึ่งทำให้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม
4. มีประโยชน์หลายอย่างในการประยุกต์ใช้ ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรม การทำแผนที่ยีน โครงสร้างประชากร ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ รวมถึงการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก (Glowatzki-Mullis et al., 1995)

#### การเพิ่มจำนวน Microsatellite DNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะในหลอดทดลอง โดยใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ จากสายดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันได้โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันหลายรอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (Dieffenbach et al., 1993) ดังนี้

1. ขั้นแรก Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ จากสภาพสายคู่ให้กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิสูง 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที
2. ขั้นที่สอง Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-30 เบส (oligonucleotide primers) และมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ถ้าอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไปไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี ทำให้ได้ผลผลิตน้อยมาก ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างไม่จำเพาะ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนส่วนของดีเอ็นเอในบริเวณอื่นที่ไม่ต้องการ ขั้นตอนนี้จึงต้องควบคุมอุณหภูมิให้ลดต่ำลงในระดับที่ใกล้เคียงกับ melting



temperature ( $T_m$ ) ของไพรเมอร์ (โดยทั่วไปจะต่ำกว่า  $T_m$  2 – 5 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะอยู่ในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

$$T_m (\text{°C}) = 2(\text{จำนวน A+T}) + 4(\text{จำนวน C+G}) \quad (\text{Wallace et al., 1979})$$

หมายเหตุ จำนวน A T C และ G นับได้จากชิ้นส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ของแต่ละไพรเมอร์

$T_m$  ที่เหมาะสม จะให้ปริมาณผลผลิต PCR ในปริมาณมาก

3. ขั้นที่สาม Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งมีไพรเมอร์เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72-75 องศาเซลเซียส เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด

จากขั้นตอนที่ 1-3 เป็นจำนวน PCR 1 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าทำ PCR จำนวน  $n$  รอบ จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่  $2^n$  เท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้น อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติแล้ว ผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจะต่ำกว่าค่าทางทฤษฎี เพราะการเกิดจับคู่กลับกันเองระหว่างผลผลิตที่เกิดขึ้น และความเข้มข้นของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ลดลงระหว่างการทำกระบวนการ PCR

### การวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง หลังจากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการแล้ว ก็จะทราบจำนวนอัลลีล และรูปแบบอัลลีล ซึ่งวิธีการนับจำนวนอัลลีล และรูปแบบจีโนไทป์ที่เกิดขึ้น พิจารณาจากแถบดีเอ็นเอ โดยถ้าแถบดีเอ็นเอปรากฏ 2 แถบอย่างชัดเจน แสดงว่าเป็นจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) และถ้าแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียงแถบเดียว แสดงว่าเป็นจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต (homozygote) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้

## 1. คำนวณค่าความถี่อัลลีล

การคำนวณค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ในแต่ละตำแหน่งของสุกร โดยค่าความถี่อัลลีล มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 หากประชากรใดมีความถี่อัลลีลเท่ากับ 1 หมายความว่าตำแหน่งนั้นมีอัลลีลเพียงรูปแบบเดียวในประชากร หรือ ในประชากรนั้น เกิด monomorphic นอกจากนี้ค่าที่คำนวณได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคำนวณค่าอื่น ๆ ทางพันธุศาสตร์ต่อไป ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$p = \frac{2N_{AA} + N_{Aa}}{2N} \quad (\text{Nei, 1978})$$

โดยที่  $p$  คือ ความถี่ของอัลลีล A

$N_{AA}$  คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ homozygote ของแต่ละตำแหน่ง

$N_{Aa}$  คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygote ของแต่ละตำแหน่ง

$N$  คือ จำนวนสุกรทั้งหมด

## 2. คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตี

การคำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) เพื่อวัดความหลากหลายของจำนวนอัลลีลในกลุ่มประชากร หรือ การใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่ง โดยการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าเฮเทอโรไซโกซิตีเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนของอัลลีลเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามค่าเฮเทอโรไซโกซิตียังขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของค่าความถี่อัลลีลที่แตกต่างกันอีกด้วย ซึ่งค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจะมีค่าสูงสุดเมื่อทุกอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้นมีค่าความถี่อัลลีลเท่ากัน ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

2.1 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (observed heterozygosity หรือ  $H_{Obs}$ ) คือ สัดส่วนของเฮเทอโรไซโกตจีโนไทป์เฉลี่ยต่อตำแหน่ง คำนวณได้จากข้อมูลจริง มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$H_{Obs} = \frac{\text{no. of heterozygous genotype}}{N} \quad (\text{Nei, 1978})$$

โดยที่  $H_{Obs}$  คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต  
*no. of heterozygous genotype* คือ จำนวนสุกรมที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous  
 $N$  คือ จำนวนสุกรมทั้งหมด

2.2 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี (expected heterozygosity หรือ  $H_{Exp}$ ) เป็นค่าสัดส่วนตัวอย่างที่เป็นเฮเทอโรไซโกตที่ได้จากการคำนวณโดยกำหนดว่าประชากรอยู่ในภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg สำหรับเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งในแต่ละประชากร มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$H_{Exp} = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad (\text{Nei, 1978})$$

โดยที่  $H_{Exp}$  คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี  
 $p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, k$ )  
 $k$  คือ จำนวนอัลลีล

ทำการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่าง  $H_{Obs}$  และ  $H_{Exp}$  ในเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง โดยวิธีการทดสอบไคสแควร์ (Phavaphutanon, 2005) สูตรการคำนวณดังนี้

$$\chi^2 = \left( 1 - \frac{H_{Obs}}{H_{Exp}} \right)^2 \cdot N$$

Degrees of freedom คำนวณจาก  $df = \frac{r(r-1)}{2}$

โดยที่  $N$  คือ จำนวนสุกรมทั้งหมด  
 $r$  คือ จำนวนอัลลีล

### 3. คำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC)

การคำนวณค่า PIC เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วัดความหลากหลายของชิ้นส่วนอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมนั้น ๆ ภายในประชากร เพื่อบอกถึงประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรม (Guo and Elston, 1999) ค่า PIC มีค่าตั้งแต่ 0-1 ค่านี้นั้นขึ้นอยู่กับจำนวนอัลลีล และความถี่ของอัลลีลของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$PIC = 1 - \left[ \sum_{i=1}^n p_i^2 \right] - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (\text{Botstein et al., 1980})$$

โดยที่  $PIC$  คือ ประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง  
 $p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ )  
 $p_j$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $j$  ( $j = i+1$ )  
 $n$  คือ จำนวนอัลลีล

โดยถ้า  $PIC$  มีค่ามากกว่า 0.5 แสดงว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งนั้น มีรูปแบบความหลากหลายสูง ถ้าค่า  $PIC$  อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 0.5 แสดงว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งนั้น มีรูปแบบความหลากหลายปานกลาง และถ้าค่า  $PIC$  น้อยกว่า 0.25 แสดงว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งนั้น มีรูปแบบความหลากหลายค่อนข้างต่ำ (Botstein et al., 1980 อ้างถึงโดย Xu-Xiang et al., 2006)

ค่า  $PIC$  มีการพัฒนาสำหรับการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น co-dominant เพื่อให้แน่ใจว่าการถ่ายทอดอัลลีลเป็นผลเนื่องจากพ่อ และ แม่ อย่างไรก็ตามถ้าเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีจำนวนอัลลีลน้อย จะทำให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีสูงกว่าค่า  $PIC$  และเช่นเดียวกันถ้าเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีจำนวนอัลลีลมาก จะทำให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีมีค่าใกล้เคียงกับค่า  $PIC$  และเครื่องหมายที่สามารถนำไปใช้งานได้ดี มีค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง ค่า  $PIC$  จะต่ำกว่าค่า เฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎีเสมอ

#### 4. คำนวณค่า Exclusion probability (EP)

ค่า Exclusion probability (EP) เป็นค่าพารามิเตอร์แสดงถึงค่าความน่าจะเป็น หรือค่าโอกาสที่สัตว์ 2 ตัวนั้นมีความสัมพันธ์เป็น พ่อ ลูก หรือ แม่ ลูก กันของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง เพื่อบอกค่าความแม่นยำหรือประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเครื่องหมายตำแหน่งเดียว (Jamieson and Taylor, 1997) ค่า EP มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ทั้งนี้ค่าความแม่นยำในการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก ขึ้นอยู่กับ การกระจายตัวของความถี่ของอัลลีลในแต่ละประชากร และจำนวนอัลลีล ที่ปรากฏ ณ เครื่องหมายตำแหน่งหนึ่ง ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$EP = \sum_{i=1}^n p_i(1-p_i)^2 - \sum_{i>j=1}^n (p_i p_j)^2 [4-3(p_i + p_j)]$$

(Jamieson and Taylor, 1997; Wang, 2007)

โดยที่  $EP$  คือ ความแม่นยำหรือประสิทธิภาพของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม  
 $p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ )  
 $p_j$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, n$ )  
 $n$  คือ จำนวนอัลลีล

##### 5. คำนวณค่า (Combined exclusion probability CEP)

ค่า Combined exclusion probability (CEP) เป็นค่าพารามิเตอร์แสดงถึงค่าความน่าจะเป็น หรือค่าโอกาสของความถูกต้อง ในการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก โดยการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ปกติไม่ใช่เครื่องหมายตำแหน่งเดียวในการวิเคราะห์ ต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หลายตำแหน่งร่วมกัน เพื่อให้เกิดความแม่นยำยิ่งขึ้น โดยเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งเป็นอิสระต่อกัน (Ron et al., 1996; Jamieson and Taylor, 1997) การนำเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์มาใช้งานร่วมกันควรมีค่า CEP เท่ากับ 0.99 หรือมากกว่า ค่าที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 มากที่สุด ซึ่งแสดงว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ชุดนั้นสามารถนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก มีความแม่นยำ 99 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า ส่วนค่า CEP เท่ากับ 97.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นชุดเครื่องหมายที่มีค่าความแม่นยำปานกลาง และค่า CEP เท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นชุดเครื่องหมายที่มีค่าความแม่นยำค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการเลือกจำนวนของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้สำหรับตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูกได้ ควรพิจารณาเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งที่มีค่าความแม่นยำที่สูงก่อน และค่าความแม่นยำที่รองลงมา ตามลำดับ โดยค่าความแม่นยำของเครื่องหมายควรอยู่ในช่วงระหว่าง 97.5-99.0 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Galov et al., 2005) ซึ่งค่าความแม่นยำขึ้นอยู่กับจำนวนของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และค่า EP ของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ซึ่งคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$CEP = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - EP_i) \quad (\text{Jamieson and Taylor, 1997})$$

โดยที่  $CEP$  คือ ค่าความแม่นยำของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หลายตำแหน่งที่ใช้ร่วมกันในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก

$\prod$  คือ multiplication sum

$n$  คือ จำนวนของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด

$EP_i$  คือ ความแม่นยำหรือประสิทธิภาพของเครื่องหมายตำแหน่งที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

### การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก (Parentage Testing; Parentage Control)

การตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก หมายถึง การตรวจพิสูจน์ความเป็นลูกของพ่อ (paternity testing; paternity control) หรือการตรวจพิสูจน์ความเป็นลูกของแม่ (maternity testing; maternity control) โดยมีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ หรือ แม่ จากความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม โดยความแตกต่างของจำนวนซ้ำของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เรียกว่า อัลลีล ซึ่งสัตว์แต่ละตัวจะมีอยู่อย่างมากเพียง 2 อัลลีล โดยลูกจะได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อ และ แม่อย่างละครึ่ง (Curi and Lopes, 2002) การตรวจสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ จะทำให้ผลของความสัมพันธ์ทางครอบครัวชัดเจนขึ้น (Jamieson, 1994; Jamieson and Taylor, 1997)

ความสัมพันธ์ของพ่อ แม่ ลูก ส่วนใหญ่จะอธิบายถึง ความเป็นพ่อ (paternity) หรือ ความเป็นแม่ (maternity) ซึ่งความสัมพันธ์แม่ กับ ลูก ส่วนใหญ่จะถูกต้องอยู่แล้ว เนื่องจากสังเกตทางตรงจากการคลอดลูก หรือการดูคนนมของลูก (Alexander et al., 1983 อ้างถึงโดย Dodds et al., 1996) ส่วนความสัมพันธ์พ่อ กับ ลูก จะพบความผิดพลาดมากกว่า เนื่องจากในกรณีที่พบว่ามี การผสมด้วยพ่อพันธุ์จำนวนหลายตัว (multiple sire mating) (Xue et al., 1998; Aguilera-Reyes et al., 2006) ทำให้ไม่สามารถระบุพ่อที่ชัดเจนของลูกสุกรได้ ดังนั้นการนำชุดเครื่องหมายพันธุกรรมมาตรวจสอบความสัมพันธ์ของสัตว์แต่ละตัวในกรณีของความสัมพันธ์พ่อ กับ ลูก ซึ่งถ้าผลการทดสอบพบว่า มีเครื่องหมายพันธุกรรมเพียงตำแหน่งเดียว แสดงพันธุกรรมของพ่อที่ไม่

สอดคล้องกับลูก ก็จะสามารถสรุปได้ว่าพ่อตัวนั้นไม่ใช่พ่อที่แท้จริงถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเครื่องหมายพันธุกรรมทุกตำแหน่งแสดงพันธุกรรมของพ่อที่สอดคล้องกับลูก ก็ไม่สามารถปฏิเสธพ่อตัวนี้ได้ ก็จะคำนวณหาค่าความแม่นยำจากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมชุดนี้ (Jamieson and Taylor, 1997)

## การศึกษาการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในสุกร

### 1. ความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในสุกร เพื่อหารูปแบบความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมที่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้งาน ที่ผ่านมามีการวิจัยการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แบบไดนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากสามารถพบในจีโนมได้มากกว่าแบบอื่น (Toth et al., 2000) นำมาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสุกร โดยค่าความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมใช้ควรมีจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 6-8 อัลลีล ดังรายงานของ Yue และ Wang (2003) ที่ใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 9 ตำแหน่ง ในสุกรของประเทศจีน โดยพบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 5-7 อัลลีล การศึกษาของ Behl และคณะ (2006) ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 23 ตำแหน่ง หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในประเทศอินเดีย พบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 5-11 อัลลีล และค่าเฉลี่ย PIC ของเครื่องหมายทุกตำแหน่งมีค่า 0.80 ส่วนการศึกษาของ Fan และ คณะ (2002) ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 27 ตำแหน่ง หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองจีน 7 พันธุ์ โดยพบจำนวนอัลลีล 6-12 อัลลีล นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสุกรของประเทศไทยของโดย Chaiwatanasin และคณะ (2002) ในสุกรพื้นเมืองจากทางภาคเหนือ และทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 15 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 3-15 อัลลีล ทั้งนี้ความแตกต่างของจำนวนอัลลีลนั้นเกิดขึ้นเนื่องมาจากมีการใช้จำนวน และชนิดของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีจำนวน และกลุ่มตัวอย่างของประชากรที่นำมาศึกษาจากแหล่งที่แตกต่างกัน ทำให้พบรูปแบบความหลากหลายของจำนวนอัลลีลที่แตกต่างกัน

## 2. จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์กับการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อแม่ ลูก

การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ในสุกรโดยการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อให้ข้อมูลของพันธุ์ประวัติมีความสมบูรณ์ขึ้น ยังมีการศึกษาค้นคว้าจำกัด และส่วนใหญ่ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แบบไดนิวคลีโอไทด์ เช่น การศึกษาของ Nechtelberger และคณะ (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก โดยสุ่มเลือกสุกรที่ไม่มีความสัมพันธ์กันจากสุกรทั้งหมด 150 ตัว (พันธุ์แลนด์เรซ พันธุ์เพียเทรน และพันธุ์ลาร์จไวท์) โดยใช้เครื่องหมายทั้งหมด 10 ตำแหน่ง (S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857 และ SW951) พบค่า CEP มีค่าอยู่ระหว่าง 99.18-99.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเครื่องหมาย 10 ตำแหน่งนี้ยังไม่เพียงพอกับการศึกษา จึงเพิ่มเติมเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์อีก 5 ตำแหน่ง (SW72, SW936, SW911, S0228, S0227) รวมเป็น 15 ตำแหน่ง ค่าที่คำนวณได้เพิ่มขึ้นทุกกรณี โดยค่า CEP มีค่าอยู่ระหว่าง 99.87-99.98 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าจำนวนเครื่องหมายที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลต่อประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก

อย่างไรก็ตามบางการศึกษาใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หลายตำแหน่งร่วมกัน แต่เมื่อใช้เพียง 10 ตำแหน่งก็เพียงพอแล้ว เช่นจากการศึกษาของ Fan และ คณะ (2005) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การจำแนกพันธุ์ของสุกร และความแม่นยำของประสิทธิภาพในการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก จำนวน 6 กลุ่มประชากร จำนวนสัตว์ 109 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 26 ตำแหน่ง (FAO-ISAG) ผลการวิเคราะห์พบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 4-8 อัลลีล ค่า PIC ของเครื่องหมายทุกตำแหน่งมีค่าสูงกว่า 0.5 ซึ่งแสดงว่า เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่งมีความหลากหลายสูง ค่า CEP มีค่ามากกว่า 99.99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้เพียง 10 ตำแหน่งร่วมกัน ค่า CEP ที่ได้คือ 98 เปอร์เซ็นต์

ชุดเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่ต่างกัน จะส่งผลต่อค่าความแม่นยำสำหรับการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก โดย Putnova และคณะ (2003) ทำการศึกษาการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์สำหรับการระบุตัวสัตว์ และการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก ในสุกรของประเทศ Czech จำนวน 3 พันธุ์ (Large White, Landrace และ Black



Pied Prestice) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 2 ชุด ชุดละ 10 ตำแหน่ง ซึ่งชุดแรกศึกษาโดย Putnova และคณะ (2003) มีเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ดังนี้ SW24, S0386, S0355, SW353, SW936, SW72, S0068, S0070, S0107 และ TNFB และชุดที่สองศึกษาโดย Nechtelberger และคณะ (2001) มีเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ดังนี้ S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857 และ SW951 ค่า CEP ของชุดแรก มีค่าอยู่ระหว่าง 0.9954-0.9994 ส่วนค่า CEP ของชุดที่สอง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.9927-0.9989 ซึ่งพันธุที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อค่าความแม่นยำที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ค่า CEP ที่ได้มีค่าสูง และสามารถนำไปใช้กับกลุ่มประชากรอื่นได้ ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ชุดแรกมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้งานในสุกรของประเทศ Czech

### 3. การพัฒนาหาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

การพัฒนาตรวจหาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีรูปแบบเป็นเตตรานิวคลีโอไทด์ Chen และคณะ (2005) ศึกษาลักษณะของความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีรูปแบบเป็นเตตรานิวคลีโอไทด์ (S0766) พบจำนวนอัลลีล 14 อัลลีล ในสุกร 15 พันธุ์ และค่า PIC เท่ากับ 0.86 และการศึกษาของ Chen และคณะ (2006) ศึกษาลักษณะของความหลากหลายของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่มีรูปแบบเป็นเตตรานิวคลีโอไทด์ (S0719) ในสุกรทั้งหมด 11 พันธุ์ ผลการวิเคราะห์พบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 7-15 อัลลีล ค่า PIC เท่ากับ 0.94 และมีรูปแบบจีโนไทป์ของสัตว์ 79 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบบเฮเทอโรไซโกต แสดงว่าเครื่องหมายนี้มีความหลากหลายสูง เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก และใช้ระบุตัวสัตว์

ส่วนการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก ในสุกรซึ่งศึกษาโดย Rohrer และคณะ (2007) โดยใช้เครื่องหมาย SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) 60 ตำแหน่ง และเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง ซึ่งมีรูปแบบเป็นไดนิวคลีโอไทด์ (SW21, SW818, SW1370, SW1824, SW1829, SW1891, SW1904, SW2156, SW2519 และ SW2527) การคำนวณค่าโอกาสที่สัตว์ 2 ตัวจะมีจีโนไทป์ร่วมกัน เพื่อระบุตัวตนสัตว์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง ค่าที่ได้คือ  $5.4 \times 10^{-13}$  และ เมื่อใช้เครื่องหมาย 60 SNPs ค่าที่ได้คือ  $4.55 \times 10^{-23}$  แสดงถึง

โอกาสที่สัตว์ 2 ตัวจะเหมือนกันมีค่าน้อยมากดังนั้น SNPs สามารถใช้ในการระบุตัวตนของสัตว์ ได้ดีกว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ กรณีการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ พบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 6-13 อัลลีล สำหรับการแยกสัตว์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันโดยมีเพียงตัวอย่างพ่อ หรือ ตัวอย่างแม่ กับลูกมีความถูกต้อง โดยพบ CEP มีค่าอยู่ระหว่าง 0.9313 – 0.9904 อย่างไรก็ตามการใช้ SNPs 60 ตำแหน่ง พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.9593-0.9967 จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก โดยใช้เครื่องหมาย SNPs จำเป็นต้องใช้ตำแหน่งสูงถึง 60 ตำแหน่ง ในขณะที่การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ สามารถใช้เพียง 10 ตำแหน่ง ก็แสดงประสิทธิภาพในการใช้งานใกล้เคียงกัน



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากฟาร์มสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ ที่มีการวางแผนการผสมพันธุ์ อย่างเป็นระบบ และมีการจดบันทึกพันธุ์ประวัติที่ชัดเจน ซึ่งการเก็บตัวอย่างไม่ได้คำนึงถึงเพศ และพันธุ์ของสุกร เนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ เป็นดีเอ็นเอที่ไม่เปลี่ยนแปลงไป ตามปัจจัยของสิ่งแวดล้อม โดยแบ่งกลุ่มสุกรออกเป็น 2 กลุ่มตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน ดังนี้

#### 1. กลุ่มสุกรที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด จากฟาร์มสุกร ของเอกชนจำนวน 2 แห่ง ในเขตจังหวัดราชบุรี จำนวน 20 ตัว และ 6 ตัว ตามลำดับ และ จำนวน 1 แห่ง ในเขตจังหวัดชัยนาท จำนวน 14 ตัว โดยทำการตรวจสอบบันทึกพันธุ์ประวัติ และคัดเลือก เฉพาะสุกรที่มี พ่อ และ แม่ แตกต่างกัน จำนวนเพศของตัวอย่างใกล้เคียงกัน รวมทั้งสิ้น 40 ตัว ทำ การจดบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติทั่วไปของสัตว์แต่ละตัวได้แก่ เบอร์ประจำตัวสัตว์ และเพศของสัตว์ สำหรับสุกรในกลุ่มนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มโอกาสของการตรวจพบรูปแบบความหลากหลายของ เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง ให้มีมากขึ้น

#### 2. กลุ่มสุกรที่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือด และน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากสุกรที่มีความเกี่ยวข้องกันทาง สายเลือด กล่าวคือ เป็นพ่อ-แม่-ลูกกัน จากฟาร์มสุกร ณ ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม และฟาร์มสุกรของเอกชนจังหวัดชัยนาท รวมทั้งสิ้น 40 ตัว ทำการจดบันทึกข้อมูลพันธุ์ประวัติทั่วไปของสัตว์แต่ละตัว ได้แก่ เบอร์ประจำตัวสัตว์ เพศของ สัตว์ วันที่เกิด เบอร์ประจำตัวพ่อ และเบอร์ประจำตัวแม่ สำหรับสุกรในกลุ่มนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการเปรียบเทียบผลของการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูก จากข้อมูลทางพันธุกรรมของ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ตรวจสอบได้ กับบันทึกพันธุ์ประวัติของสัตว์ นอกจากนี้ตัวอย่าง ทั้งหมดยังนำไปใช้ศึกษารูปแบบความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ แต่ละตำแหน่งด้วย โดยการเก็บตัวอย่างสุกรกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.1 กลุ่มสุกร ณ ศูนย์ฝึกนิสิต ฯ จังหวัดนครปฐม ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของแม่พันธุ์ และ เก็บน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่เหลือจากการผสมเทียมเรียบร้อยแล้ว จากนั้นเมื่อถึงกำหนดคลอดจึง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดของลูกสุกร รวมตัวอย่างสุกรทั้งสิ้น 7 ตัว ได้แก่ พ่อพันธุ์ 1 ตัวผสมพันธุ์กับ แม่พันธุ์ 2 ตัว และลูกสุกรแม่ละ 2 ตัว รวมเป็น 4 ตัว

2.2 กลุ่มสุกรจากฟาร์มเอกชน จังหวัดชัยนาท ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ สุกร 8 ตัว ตัวอย่างเลือดของแม่พันธุ์ 8 ตัว และของลูก 17 ตัว รวมทั้งสิ้น 33 ตัว

### การเก็บตัวอย่าง

#### 1. การเก็บตัวอย่างเลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรแม่พันธุ์ และลูกสุกร ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 21 เจาะเลือด จากเส้นเลือดดำบริเวณด้านหน้าหัวใจ (anterior vena cava) ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ ผสมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (ethylene diamine tetra-acetic acid; EDTA) แชน้ำแข็งไว้ ระหว่างการขนส่งเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้จนกว่าจะนำไปใช้

#### 2. การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากสุกรพ่อพันธุ์ จะเก็บน้ำเชื้อที่เหลือจากการผสมเทียม เรียบร้อยแล้ว หรือเก็บน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ จากฟาร์มสุกรโดยตรง โดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ ทั้งหมดมาตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ตัวสุกติดตะกอน และทำการดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือปริมาณประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงแบ่งเก็บใน tube เล็ก ๆ tube ละ 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาตัวอย่างน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอจนกว่าจะนำไปใช้

### การเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

ทำการคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ของสุกร จากฐานข้อมูลสากล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยพิจารณาจากรูปแบบการซ้ำของ เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์เป็นแบบไตรนิวคลีโอไทด์ หรือ เตตระนิวคลีโอไทด์ มี ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 100 คู่เบสขึ้นไปได้ทั้งสิ้น 16 ตำแหน่ง รายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษา

Locus name	Primer sequences (5'-3')	Core sequences	Size (bp.)	Tm (°C)	Accession no.
D00768	F: 5'GAC ACA GTG GAT GGC ATT TG <sup>3'</sup> R: 5'ACA TCC CTA AGG TCG TGG C <sup>3'</sup>	CT(CTTT) <sub>3</sub> C(CTTT) <sub>3</sub> C(CTTT) <sub>21</sub> T (CTTT) <sub>5</sub> TTTT (CTTT) <sub>9</sub> T(CTTT) (CT) <sub>12</sub> GT(CT) <sub>4</sub> (CTTT) <sub>5</sub> CT	345	*	D00768
KVL9000	F: 5'TGC AAA GTT TGG GAC ATC AG <sup>3'</sup> R: 5'AGG TGC TGA GGA TAC AGT GG <sup>3'</sup>	(GT) <sub>16</sub> (GATA) <sub>14</sub>	259	*	EU010405
NLRIP0001	F: 5'GAT CTC AGC TTC AAT ACC TCC <sup>3'</sup> R: 5'GAT CCT GTA TTG CTG TGG CTG <sup>3'</sup>	(TTTC)T(TTTC) <sub>2</sub> TTCC(TTTC)(TC) ) <sub>2</sub> CC(TTTC) <sub>4</sub> TATC(TTTC) <sub>4</sub> ATC(T TTC) <sub>3</sub> TATC(TTTC)TTTA(TTTC) <sub>2</sub> (CTTC) <sub>4</sub> C(TTTC) <sub>3</sub> GTTC(TTTC) <sub>2</sub>	344	*	AY740518
S0663	F: 5'TGG TTC GGG AAC ATA GGA AAAG <sup>3'</sup> R: 5'AGC TGG GTC CTC CAT ATG CTG <sup>3'</sup>	(ATAG) <sub>14</sub>	240	*	AJ544213
S0710	F: 5'CTC AGC ACC TTA CAA ACC <sup>3'</sup> R: 5'TCC CAA ACC AAT CCA CAC <sup>3'</sup>	(TAGA) <sub>2</sub> (TAAA) <sub>4</sub> AAA(TAAA) <sub>3</sub> TT(GT) <sub>9</sub>	330	58	AY253998
S0719	F: 5'TCT CCA AGT CCA GGA ACT TGC <sup>3'</sup> R: 5'TCG CCA TAC TCT TCT AAT GGC <sup>3'</sup>	(GAAA) <sub>13</sub>	600	56	AY451240
S0766	F: 5'GTG TAG ATA TGT GTC TGT ACA <sup>3'</sup> R: 5'AGA CCT CCT ATT AGA GGT GGA <sup>3'</sup>	(GAAA) <sub>4</sub> (CA) <sub>6</sub> TACACG (CA) <sub>16</sub>	620	58	AY731063
SJ859	F: 5'TCA AGA GAA AAG GAC AAA ATC <sup>3'</sup> R: 5'AT GAA GAG GTG GAG ACT GTG <sup>3'</sup>	(TTTG) <sub>3</sub>	334	56	AB248496
SJ923	F: 5'CCA AGA AAT AGC AAC AAC AA <sup>3'</sup> R: 5'AGA TGA TTT GGT TTG GTC TTA <sup>3'</sup>	(CAA) <sub>9</sub>	197	56	AB248491
SJ924	F: 5'GAT TTG TTT CCG CTG AGC CA <sup>3'</sup> R: 5'TGG GCT CAC AGG CAC AGT ATC <sup>3'</sup>	(AAC)A(AAC) <sub>6</sub>	230	56	AB248492
SJ925	F: 5'CAC AAA GGA GGA GGC TGG AAT <sup>3'</sup> R: 5'TT GCT GTG GTC TGG CGT AGG <sup>3'</sup>	(TTG) <sub>9</sub>	383	56	AB248490
SJ926	F: 5'CTA CCA CTG AGC CAC AAG AG <sup>3'</sup> R: 5'TGG TGT AGA TTT CAG ATG CTG <sup>3'</sup>	(TTA) <sub>9</sub>	241	56	AB248494
SJ927	F: 5'CTC AGT GTG GCA TTC AGG TC <sup>3'</sup> R: 5'TGA CCT ACA CCA CAG CTC ATG <sup>3'</sup>	(TTG) <sub>6</sub>	272	56	AB248493
SJ929	F: 5'ATG ACC CAG GAA CAA GGA TAG <sup>3'</sup> R: 5'TC AAA GAA ATG GGG AAA CAG <sup>3'</sup>	(TTTG)TT(TTTG) <sub>4</sub>	327	56	AB248487
X53085	F: 5'TGT TCA GTG GGT TAA GGA TCG <sup>3'</sup> R: 5'TTC CCT ACA CCC TGC CTT C <sup>3'</sup>	(GA) <sub>11</sub> (AGGA) <sub>8</sub> (AAGA) <sub>2</sub>	399	*	X53085
X63893	F: 5'GGG TCA GAC CGA CAC CAC <sup>3'</sup> R: 5'GGT CTT GCT GTT TCC GAG AC <sup>3'</sup>	(GCC) <sub>2</sub> CGC(GCC)GGCCCC (GCC) <sub>6</sub>	116	*	X63893

ที่มา : National Center for Biotechnology Information (NCBI)

: Moran (1993) ; Chen และคณะ (2006) ; Karlskov-Mortensen และคณะ (2008)

\* ยังไม่มีรายงานอุณหภูมิ (Tm) ที่เหมาะสมของคู่ primer

## การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

### 1. การสกัดดีเอ็นเอ

#### 1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (ภาพที่ 3.1)

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดสุกร ด้วยชุดน้ำยาสกัดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini kit) โดยการนำเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำเลือดละลายหมด ดูดเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube) เติมสารละลาย buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นเติมสารละลาย QIAGEN<sup>®</sup> proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อทำลายผนังเซลล์ และย่อยโปรตีนต่าง ๆ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอทานอล (96-100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วย้ายไปใส่ใน QIAamp spin column ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที silica-gel membrane จะดูดซับดีเอ็นเอไว้ จากนั้นย้ายไปใส่ใน QIAamp spin column อันใหม่ ใส่สารละลาย buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที และย้ายไปใส่ใน QIAamp spin column อันใหม่ ใส่สารละลาย buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 3 นาที เปลี่ยน QIAamp spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนนี้ buffer AW1/AW2 จะชะล้างโปรตีน และสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ออกไป สุดท้ายนำ column ย้ายไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย buffer AE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้างดีเอ็นเอให้หลุดออกจาก membrane แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้บางส่วนไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis และส่วนที่เหลือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบริการต่อไป

## 1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อ (ภาพที่ 3.1)

การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อสุกรทำโดยคุณน้ำเชื้อปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย buffer X2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ตารางภาคผนวกที่ 5) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex หลังจากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปอุ่นต่อประมาณ 30 นาที ทำการเติมเอทานอลปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วย้ายไปใส่ใน QIAamp spin column ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายไปใส่ใน QIAamp spin column อันใหม่ ใส่สารละลาย buffer AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที และย้ายไปใส่ใน QIAamp spin column อันใหม่ ใส่สารละลาย buffer AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 3 นาที เปลี่ยน QIAamp spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายนำ column ย้ายไปใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย buffer AE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และทำการปั่นเหวี่ยง 11,000 rpm. เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะล้างดีเอ็นเอให้หลุดออกจาก membrane แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้บางส่วนไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis และส่วนที่เหลือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอดำเนินการต่อไป



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด และน้ำเชื้อสุกร โดยชุดน้ำยาสกัดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini kit)



## 2. การตรวจสอบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิธี agarose gel electrophoresis และ วิธีการตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis กับ ตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการศึกษามีวิธีการดังนี้

- 1) เตรียม agarose gel 2% โดยชั่งผง agarose 1 กรัม ละลายใน 0.5X TBE buffer 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (flask)
- 2) ช้อนให้ผง agarose ละลาย โดยเข้าตู้อบ microwave 1-2 นาที
- 3) รอให้เย็นพอที่มือจับได้ จึงเติม ethidium bromide (10 mg/ml) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่าขวดเบา ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศในเนื้อเจล และให้แน่ใจว่า ethidium bromide ละลายหมด
- 4) เทลงในถาด (tray) สำหรับเตรียมเจล แล้ววางหวี (comb) สำหรับทำช่องใส่ ตัวอย่าง (wells)
- 5) รอให้เจลแข็งตัวสมบูรณ์ ใช้เวลาประมาณ 20 นาที
- 6) ดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง และวางถาดเจลลงใน chamber เเท 0.5X TBE buffer ให้ท่วมเจล
- 7) ทำการหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (อัตราส่วน DNA: loading dye; 5:1) ลงไปในช่องของเจลที่เตรียมไว้
- 8) ปรับกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ดูระยะการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจาก loading dye เมื่อ loading dye เคลื่อนมาประมาณครึ่งถาดใช้เวลาประมาณ 30 นาที
- 9) ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และทำการบันทึกผล

2.2 ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometer กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้ว พิจารณาจากแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างที่จางที่สุดถึง แถบดีเอ็นเอตัวอย่างที่หนาที่สุด ของตัวอย่างเลือด และน้ำเชื้อ อย่างละ 5 ตัวอย่าง รวมเป็น 10 ตัวอย่าง เพื่อประมาณค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ คำนวณได้จากค่า optical density (O.D.) หรือ absorbance (A.) ที่ 260 นาโนเมตรดังนี้

$$\text{ปริมาณดีเอ็นเอ (}\mu\text{g. /ml.)} = 50 \times \text{ค่าที่ได้} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 15 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นอีก 750 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:50 หรือ 50 เท่า ให้ค่านี้เป็นค่าที่เรียกว่า dilution factor) จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ค่าที่วัดได้ ได้แก่ ค่า  $A_{260}$  (ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร),  $A_{280}$  (ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร) โดยค่า  $A_{260}$  นำไปคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอในสารละลาย ตามสูตรข้างต้น และค่า  $A_{260}/A_{280}$  นำไปพิจารณาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

### 3. การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ต้องการ โดยการเตรียมส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

สารเคมี	ปริมาตร (μl.)
10x PCR buffer (1X)	2.5
dNTP's (1.25 mM)	4.0
Forward primer (20 μM)	0.5
Reverse primer (20 μM)	0.5
<i>Taq</i> DNA polymerase <sup>1</sup> (2.5 unit/100 μl)	0.2-1.0
DNA template	1.0-2.0
ปรับปริมาตรด้วย Sterile H <sub>2</sub> O ให้มีปริมาตรรวม	25

<sup>1</sup> *Taq* DNA polymerase ถ้าใช้ REDTaq™ ใช้ปริมาตร 1.0 μl. ส่วน RBC Taq™ ใช้ปริมาตร 0.2 μl.

ในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย การเติม Taq DNA polymerase จะทำเป็นขั้นตอนสุดท้าย ก่อนนำเข้าเครื่อง PCR ทำการปรับเปลี่ยนสถานะในขั้นตอนต่าง ๆ โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นมีการเปลี่ยนอุณหภูมิในรอบ ตามลำดับ ดังนี้

- ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอน annealing จะทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของ primer แต่ละคู่ ตั้งแต่อุณหภูมิ 56-60 °C (ตารางที่ 3.1) เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง โดยพิจารณาจากปริมาณของผลผลิต PCR ที่มากที่สุด ซึ่งตรวจสอบได้จาก agarose gel
- ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที

เครื่องจะทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงนี้ เป็นจำนวน 35 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที เพื่อชะลอเวลาให้ขบวนการสร้างสายดีเอ็นเอทั้งหมดเสร็จสมบูรณ์ หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วเก็บผลผลิต PCR ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปทำการตรวจสอบขั้นต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากการทำ PCR แต่ละครั้งจะได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของเครื่องหมายครั้งละ 1 ตำแหน่งเท่านั้น

การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธี PCR จะสุ่มเลือกตัวอย่างสุกรประมาณ 20 ตัว ในกลุ่มสุกรที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด เพื่อตรวจสอบรูปแบบความหลากหลายเบื้องต้นของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 16 ตำแหน่ง จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงคุณสมบัติเป็น polymorphism ที่เหมาะสมในการการศึกษาครั้งนี้ โดยมีเกณฑ์การพิจารณาคือ พบรูปแบบความหลากหลายมากกว่า 2 แบบขึ้นไปตำแหน่งหนึ่ง ๆ และสามารถแปลผลได้ชัดเจน สำหรับใช้ในการหาข้อมูลพันธุกรรมของสัตว์ทั้งหมด ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่แสดงคุณสมบัติเป็น monomorphic มีเกณฑ์การพิจารณาคือ ไม่พบรูปแบบความหลากหลาย ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะไม่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

#### 4. ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย Gel Electrophoresis

ในการศึกษาครั้งนี้ดำเนินการ 2 วิธีที่ต่อเนื่องกัน ซึ่งจะตรวจสอบโดยใช้ agarose gel และ ตรวจสอบโดยใช้ polyacrylamide gel ตามลำดับ ดังนี้

4.1 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย agarose gel เพื่อให้ทราบปริมาณผลผลิต PCR และประเมินปริมาณผลผลิต PCR ที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel ต่อไป ในขั้นตอนนี้ใช้ 2 % agarose gel เช่นเดียวกับการตรวจสอบดีเอ็นเอ ดังกล่าวข้างต้น และมีขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิต PCR ดังนี้

- 1) ทำการหยอดตัวอย่างผลผลิต PCR ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (อัตราส่วน ผลผลิต PCR: loading dye; 2:1) ลงไปในแต่ละช่องของ 2 % agarose gel ที่เตรียมไว้
- 2) ทำการหยอด DNA ladder (M) ขนาด 100 bp. ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ค) ลงไป 1 ช่อง เพื่อวัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น
- 3) ทำการประกอบเครื่อง electrophoresis ให้เรียบร้อย และตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำแผ่นเจลไปตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ทำการถ่ายภาพ และบันทึกผล

4.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel เพื่ออ่านผลชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ในแต่ละตำแหน่งซึ่งขั้นตอนในการทำ polyacrylamide gel มีขั้นตอนดังนี้

- 1) การเตรียมกระจกสำหรับเจล โดยนำแผ่นกระจกมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 % ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น
- 2) นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง สำหรับกระจกแผ่นขนาด 20 x 20 ซม. ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้าน เพื่อไม่ให้เจลรั่วออกมา ก่อนใช้คลิปหนีบอีกครั้ง
- 3) การเตรียม polyacrylamide gel ใช้เจลเข้มข้น 7 % (acrylamide : bisacrylamide = 19:1) โดยมีส่วนผสม แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.3

### ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการทำ polyacrylamide gel

สารที่ใช้	ปริมาตรที่ใช้สำหรับเตรียมเจลเข้มข้น 7 %
40% acrylamide (19:1)	7.0 ml.
50X TAE buffer	800.0 $\mu$ l
25% APS (ammonium persulfate) <sup>1</sup>	1,280 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (sterile) mixed up to	40.0 ml.
TEMED (เติมหลังสุด)	32.0 $\mu$ l

<sup>1</sup> 25 % APS ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้งานทุกครั้ง

- 4) ผสม acrylamide, TAE buffer และ 25 % APS ลงในกระบอกตวง เติมน้ำให้มีปริมาตรจนครบ 40 มล. ปิดด้วยพาราฟิน แล้วเขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
- 5) กรองด้วยกระดาษกรอง ใส่ในบีกเกอร์ แล้วเติม TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- 6) เทเจลลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หัวลงไปด้านบน แล้ววางกระดาษแนວระดับ ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที ดึงหัวออก แกะเทปกาวออก
- 7) ทำการประกอบกระจกเข้ากับเครื่อง electrophoresis ให้เรียบร้อย เติม 0.5X TBE buffer ลงในช่องด้านบน และด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ อยู่ใต้กระจก
- 8) ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล
- 9) ทำการหยอดตัวอย่างผลผลิต PCR ลงไปในช่องแต่ละช่อง โดยอัตราส่วน ผลผลิต PCR: loading dye; 5:1 ลงไปในแต่ละช่อง
- 10) ทำการหยอด DNA ladder (M) ขนาด 100 bp. ปริมาตร 3 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ค) ลงไป 1-2 ช่อง เพื่อวัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และในการทำ PAGE แต่ละกระจกต้องมีตัวอย่างที่เป็น control สำหรับทำกระจกแผ่นถัดไป เพื่อให้การอ่านผลถูกต้อง

- 11) ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง ใช้ความต่างศักย์คงที่ 100-120 โวลต์ โดยสังเกตการเคลื่อนที่ของ loading dye เกือบสุดแผ่นกระจก ใช้เวลาประมาณ 15-17 ชั่วโมง
- 12) ปิดเครื่อง นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสีเหลืองมตรง นำเจลไปย้อมสีโดยใช้ ethidium bromide

#### 5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ Ethidium bromide โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) สารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 5 mg./ml.) 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 1x TAE buffer 100 มิลลิลิตร
- 2) ย้อมแผ่นเจลที่ได้จากข้อ 4.2 นานประมาณ 45 นาที โดยวางภาดใส่เจลบนเครื่องเขย่าความเร็วต่ำเพื่อให้เจลได้สัมผัสกับ ethidium bromide ทั่วแผ่น เจล จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำสะอาด ประมาณ 30 นาที
- 3.) นำแผ่นเจลไปตรวจสอบตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ทำการถ่ายภาพ และบันทึกข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป

#### การตรวจสอบลำดับเบส

เลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ที่มีคุณสมบัติเป็น polymorphism ซึ่งเหมาะสมในการทำงานทั้งหมด โดยเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งจะพิจารณาเลือกตัวอย่าง จาก polyacrylamide gel ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน 1-2 ตัวอย่าง เพื่อให้แน่ใจว่าบริเวณที่ทำการอ่านผลจากแผ่นเจลเป็นบริเวณของไมโครแซทเทลไลท์ และเพื่อนำไปตรวจหาข้อมูลการเรียงตัวของลำดับเบสว่าเป็นดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์หรือไม่ โดยนำผลผลิต PCR ส่งตรวจด้วยวิธี DNA sequencing method ณ บริษัท ไชบีเลิส (ประเทศไทย) จำกัด

#### วิธีการอ่านผลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จากแผ่นเจล

การอ่านผลชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากรูปถ่ายที่ได้จากการตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel เพื่อระบุขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดของแต่ละตัวอย่าง โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (allele) ที่มีขนาดสั้นที่สุด ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง ใช้แทนด้วยสัญลักษณ์ a ซึ่งจะ

พบเป็นแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในระดับต่ำที่สุดบนเจล ส่วนแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในระดับสูงขึ้นไปให้สัญลักษณ์เป็น b, c, d,..., ตามลำดับขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น จดบันทึกข้อมูลจีโนไทป์ของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งของสัตว์แต่ละตัว ได้แก่ รูปแบบ และจำนวนอัลลีล ของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดจากนั้นนำข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้ มาทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ต่อไป

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. คำนวณค่าความถี่อัลลีล (allele frequency) ของข้อมูลสุกรจำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่างจากเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง ของสุกร ตามวิธีของ Nei (1978) ดังนี้

$$p = \frac{2N_{AA} + N_{Aa}}{2N}$$

โดยที่  $p$  คือ ความถี่ของอัลลีล A

$N_{AA}$  คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ homozygote ของแต่ละตำแหน่ง

$N_{Aa}$  คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygote ของแต่ละตำแหน่ง

$N$  คือ จำนวนสุกรทั้งหมด

2. คำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) ตามวิธีของ Nei (1978) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ค่า ดังนี้

2.1 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (observed heterozygosity หรือ  $H_{Obs}$ ) มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$H_{Obs} = \frac{\text{no. of heterozygous genotype}}{N}$$

โดยที่  $H_{Obs}$  คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต

no. of heterozygous genotype คือ จำนวนสุกรที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous

$N$  คือ จำนวนสุกรทั้งหมด

2.2 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (expected heterozygosity หรือ  $H_{Exp}$ ) มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$H_{Exp} = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

โดยที่  $H_{Exp}$  คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง  
 $p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, k$ )  
 $k$  คือ จำนวนอัลลีล

ทำการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่าง  $H_{Obs}$  และ  $H_{Exp}$  ในเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง โดยวิธีการทดสอบไคสแควร์ (Phavaphutanon, 2005) สูตรการคำนวณดังนี้

$$\chi^2 = \left( 1 - \frac{H_{Obs}}{H_{Exp}} \right)^2 \cdot N$$

Degrees of freedom คำนวณจาก  $df = \frac{r(r-1)}{2}$

โดยที่  $N$  คือ จำนวนสุกรทั้งหมด  
 $r$  คือ จำนวนอัลลีล

3. คำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC) ตามวิธีของ Botstein และคณะ (1980) มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$PIC = 1 - \left[ \sum_{i=1}^n p_i^2 \right] - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

โดยที่  $PIC$  คือ ประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง  
 $p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ )  
 $p_j$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $j$  ( $j = i+1$ )  
 $n$  คือ จำนวนอัลลีล

ทำการจัดเรียงลำดับค่า PIC ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จากค่าสูงสุดไปค่าต่ำสุด เพื่อสามารถประเมินประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง



4. คำนวณค่า Exclusion probabilities (EP) ตามวิธีของ Jamieson and Taylor (1997) และ Wang (2007) มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$EP = \sum_{i=1}^n p_i(1-p_i)^2 - \sum_{i>j=1}^n (p_i p_j)^2 [4 - 3(p_i + p_j)]$$

โดยที่  $EP$  คือ ความแม่นยำหรือประสิทธิภาพของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

$p_i$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ )

$p_j$  คือ ความถี่ของอัลลีลที่  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, n$ )

$n$  คือ จำนวนอัลลีล

ทำการจัดเรียงลำดับค่า EP ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จากค่าสูงสุด ไปค่าต่ำสุด เพื่อที่จะสามารถเลือกเครื่องหมายที่มีค่า EP สูงสุด และรองลงมาตามลำดับ สำหรับการนำไปใช้ร่วมกัน

5. คำนวณค่า Combined exclusion probability (CEP) ตามวิธีของ Jamieson and Taylor (1997) มีสูตรการคำนวณดังนี้

$$CEP = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - EP_i)$$

โดยที่  $CEP$  คือ ค่าความแม่นยำของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หลายตำแหน่งที่ใช้ร่วมกันในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูก

$\prod$  คือ multiplication sum

$n$  คือ จำนวนของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด

$EP_i$  คือ ความแม่นยำหรือประสิทธิภาพของเครื่องหมายตำแหน่งที่  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำค่า EP ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์มาวิเคราะห์ผลร่วมกัน โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป จนครบ 7 ตำแหน่ง โดยเลือกจากเครื่องหมายที่มีค่า EP สูงสุดก่อน ก็จะได้ค่า CEP ของการใช้เครื่องหมายทั้ง 7 ตำแหน่งร่วมกัน สำหรับการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูก ในสุกร

## การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง

ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง โดยทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก และ การระบุตัวตนสัตว์ ของสัตว์แต่ละตัวจากข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับข้อมูลบันทึกพันธุประวัติ ดังนี้

### 1. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากห้องปฏิบัติการของตัวอย่างสุกรทั้งสิ้น 40 ตัวอย่าง ที่อยู่ในกลุ่มสุกรที่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด ประกอบด้วยลูกสุกร 21 ตัว พ่อพันธุ์ 9 ตัว และแม่พันธุ์ 10 ตัว มีวิธีการวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้

1.1 เปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมดของลูก 21 ตัว กับข้อมูลพันธุกรรมของพ่อพันธุ์ทั้ง 9 ตัว โดยทำการจับคู่พ่อ-ลูกทั้งหมดจะได้ทั้งสิ้น 189 คู่ โดยมีเกณฑ์การพิจารณาโอกาสของความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูกกัน ดังนี้

- สัตว์คู่ที่มีโอกาสเป็นพ่อ-ลูกกัน จะพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง จะต้องพบรูปแบบอัลลีลที่เหมือนกันอย่างน้อย 1 อัลลีล ดังแสดงในตารางที่ 3.4
- บันทึกผล จากนั้นเปรียบเทียบความถูกต้องในการวิเคราะห์ผล กับบันทึกพันธุประวัติของลูกสุกร

1.2 เปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมดของลูก 21 ตัว กับข้อมูลพันธุกรรมของแม่พันธุ์ทั้ง 10 ตัว โดยทำการจับคู่แม่-ลูกทั้งหมดจะได้ทั้งสิ้น 210 คู่ โดยมีเกณฑ์การพิจารณาเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และทำการบันทึกผล

1.3 ในกรณีที่ข้อมูลพันธุกรรมของลูกและข้อมูลพันธุกรรมของพ่อ หรือ แม่ พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง มีรูปแบบอัลลีลของลูกแตกต่างจากพ่อหรือแม่โดยสิ้นเชิง แสดงว่าสัตว์ทั้งคู่ไม่ใช่พ่อ-ลูกหรือ แม่-ลูกกัน ดังแสดงในตารางที่ 3.5

1.4 ในกรณีที่ผลการวิเคราะห์พบว่า ลูกสุกรแสดงความสัมพันธ์กับพ่อพันธุ์สุกร และ/หรือ แม่พันธุ์สุกร มากกว่า 1 ตัว จะนำเอาข้อมูลพันธุกรรมของพ่อ-แม่-ลูกทุกตัวที่แสดงโอกาสของความสัมพันธ์กัน มาทำการวิเคราะห์ผลพร้อมกันอีกครั้งหนึ่ง โดยมีเกณฑ์การพิจารณาโอกาสของความสัมพันธ์เป็นพ่อ-แม่-ลูกกัน ดังนี้

- สัตว์คู่ที่มีโอกาสเป็นพ่อ-แม่-ลูกกัน จะพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง จะต้องพบว่ารูปแบบอัลลีลของลูก เหมือนพ่อหนึ่งอัลลีล และเหมือนแม่หนึ่งอัลลีล ดังแสดงในตารางที่ 3.6
- บันทึกผล จากนั้นเปรียบเทียบความถูกต้องในการวิเคราะห์ผล กับบันทึกพันธุประวัติของลูกสุกร

1.5 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ของลูกสุกรทั้ง 21 ตัว โดยพิจารณาข้อมูลจากบันทึกพันธุประวัติที่มีความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกับค่า Combined exclusion probability (CEP) ที่ได้จากการคำนวณตามวิธีของ Jamieson and Taylor (1997)

**ตารางที่ 3.4** ความสอดคล้องของรูปแบบอัลลีลที่เหมือนกันอย่างน้อย 1 อัลลีล ในเครื่องหมาย

พันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง แสดงถึงโอกาสของความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูก

เครื่องหมาย	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710
พ่อ	AG	EF	BE	BE	AA	CD	AA
ลูก	AA	AF	CE	BB	AA	CD	AD

**ตารางที่ 3.5** ความไม่สอดคล้องของรูปแบบอัลลีล ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง แสดงว่าไม่ใช่พ่อที่แท้จริงของลูก

เครื่องหมาย	S0663 <sup>1</sup>	D00768 <sup>2</sup>	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710
พ่อ	AD	EF	BE	BE	AA	CD	AA
ลูก	BG	BD	CE	BB	AC	CA	AA

<sup>1,2</sup> เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่งที่มีรูปแบบอัลลีลที่ไม่สอดคล้องกัน

**ตารางที่ 3.6** โอกาสของความสัมพันธ์เป็นพ่อ-แม่-ลูก พิจารณาจากรูปแบบอัลลีลของลูก จะเหมือน พ่อหนึ่งอัลลีล และเหมือนแม่หนึ่งอัลลีล ในเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทุกตำแหน่ง

เครื่องหมาย	S0663	D00768	KVL9000 <sup>1</sup>	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710 <sup>2</sup>
พ่อ	BC	DD	EF	BE	CC	AC	AA
แม่ 1	GG	BC	CE	AB	AD	AC	AB
แม่ 2	GH	CD	EF	BC	AF	AC	AC
ลูก	BG	CD	CF	BB	AC	AC	AB

<sup>1,2</sup> เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ปฏิเสธความสัมพันธ์ แม่ 2 กับ ลูก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์พ่อ-แม่-ลูกร่วมกัน

## 2. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านการระบุตัวตนสัตว์

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากห้องปฏิบัติการของตัวอย่างสุกรทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง ทำการเปรียบเทียบรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่งของสัตว์ที่ละคู่แบบพบกันหมด ได้ทั้งสิ้น 3,160 คู่  $\left( {}^nC_r = \frac{80!}{78!2!} \right)$  โดยสัตว์ที่แสดงรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกันอย่างน้อย 1 อัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งเดียว จะถือว่า สัตว์ 2 ตัวนั้น แสดงลักษณะข้อมูลพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 3.7

**ตารางที่ 3.7** ความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างน้อยที่สุด ที่สามารถพบได้จากสัตว์ 2 ตัว

เครื่องหมาย	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710
สัตว์ 1	BE	DD	F[G]	AC	EF	AC	AC
สัตว์ 2	BE	DD	[E]F	AC	EF	AC	AC

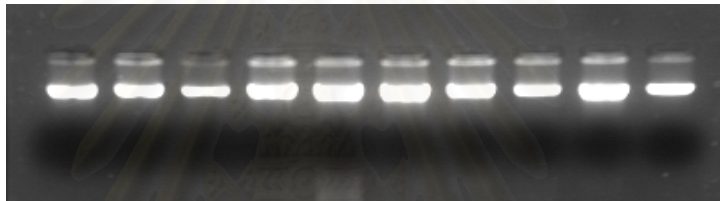
จากนั้นทำการบันทึกผล และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องในการระบุความแตกต่างของสัตว์แต่ละตัว จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ตรวจสอบ

## บทที่ 4

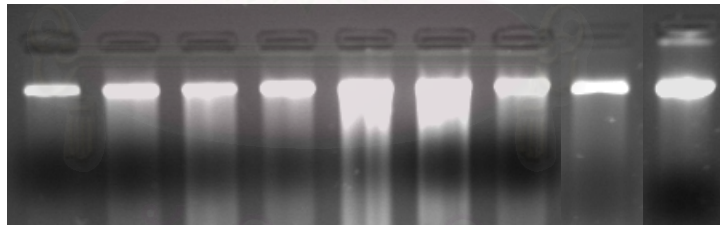
### ผลการวิเคราะห์

#### การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด และน้ำเชื้อของสุกร

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด และน้ำเชื้อของสุกรทั้งหมด พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีปริมาณมากทุกตัวอย่าง โดยพบแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบด้วย 2 % agarose gel มีลักษณะหนา ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และ 4.2 และเมื่อนำไปทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาให้ผลผลิต PCR ในปริมาณมากเช่นกัน



ภาพที่ 4.1 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดสุกร ตรวจสอบด้วย 2 % agarose gel



ภาพที่ 4.2 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำเชื้อสุกร ตรวจสอบด้วย 2 % agarose gel

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometer กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ซึ่งเลือกมาจำนวน 10 ตัวอย่าง และทำการวัดค่า Optical Density ที่ 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือด พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 95.00-157.50  $\mu\text{g./ml.}$  โดยมีค่าเฉลี่ย 120.00  $\mu\text{g./ml.}$  และมีค่าอัตราส่วนของ  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.41-1.58 โดยมีค่าเฉลี่ย 1.49 ส่วนความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำเชื้อ พบว่ามีปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 180.00-257.50  $\mu\text{g./ml.}$  โดยมีค่าเฉลี่ย 216.88  $\mu\text{g./ml.}$  และมีค่าอัตราส่วน ของ  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.60-1.74 โดยมีค่าเฉลี่ย 1.67

## อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง โดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของ primer แต่ละคู่ ตั้งแต่อุณหภูมิ 56-60 °C เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR ปริมาณมาก ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมของคู่ primer แสดงดังตารางที่ 4.1 โดยเครื่องหมายตำแหน่ง S0710 และ S0766 ให้ผลผลิต PCR ปริมาณมากทั้งอุณหภูมิ 56 และ 58 องศาเซลเซียส ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่งอื่นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแล้ว

ตารางที่ 4.1 อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR

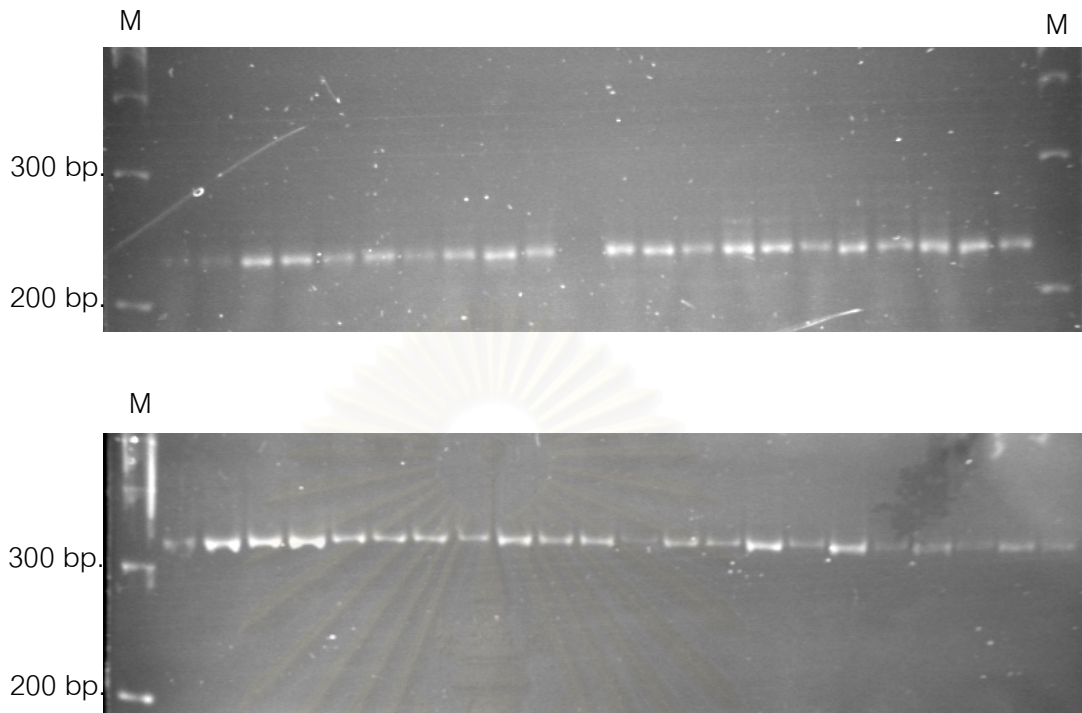
Locus name	D00768	KVL9000	NLRIP0001	S0663	S0710	S0766	X53085	X63893
Tm (°C)	58	60	56	58	56*,58	56*,58	56	56

\* อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

## การเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ด้วยเทคนิค PCR

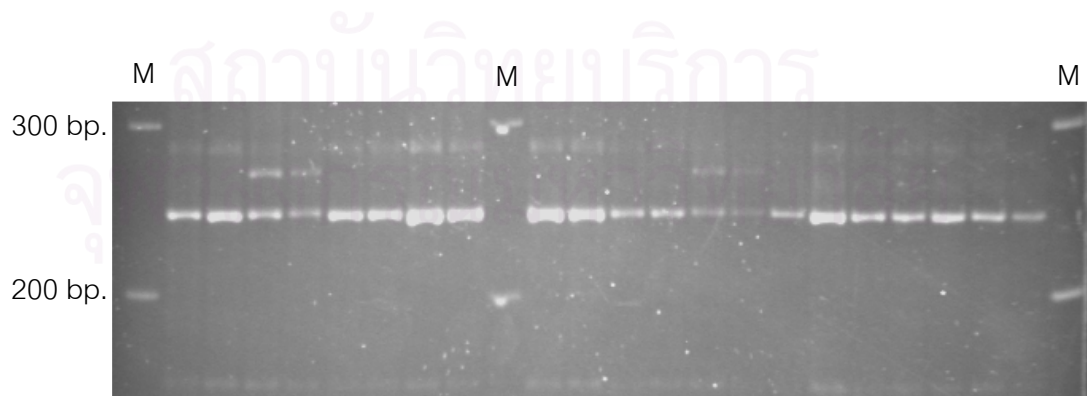
ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 16 ตำแหน่ง พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 15 ตำแหน่ง ยกเว้นตำแหน่ง SJ925 ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ แม้จะทำการปรับสภาวะต่าง ๆ แล้ว โดยพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 15 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 100-700 คู่เบส โดยแสดงรายละเอียดดังนี้

เครื่องหมายตำแหน่ง SJ924 และ SJ929 ซึ่งในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอชัดเจน จำนวน 1 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 200-250 คู่เบส และ 300-350 คู่เบส ตามลำดับ โดยเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งจะตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 4.3



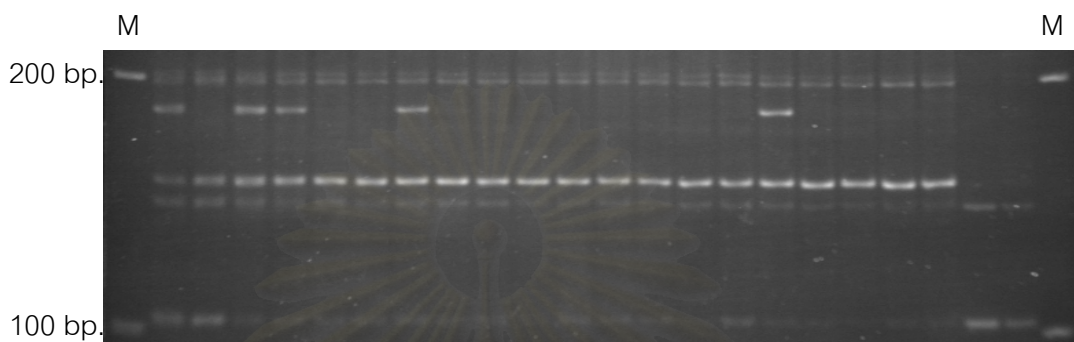
ภาพที่ 4.3 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ924 (ภาพบน) และ SJ929 (ภาพล่าง)

เครื่องหมายตำแหน่ง SJ926 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะชัดเจน และไม่ชัดเจน จำนวน 1-3 ตำแหน่ง โดยพบว่ามีรูปแบบความหลากหลายน้อยมาก ซึ่งไม่เหมาะสำหรับการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ดังแสดงในภาพที่ 4.4



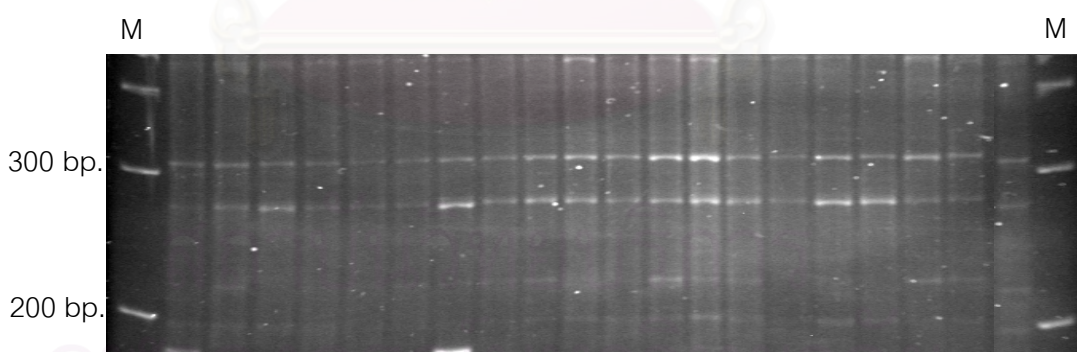
ภาพที่ 4.4 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ926

เครื่องหมายตำแหน่ง X63893 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวน 1-5 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 100-200 คู่เบส โดยแต่ละตำแหน่งไม่พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง X63893

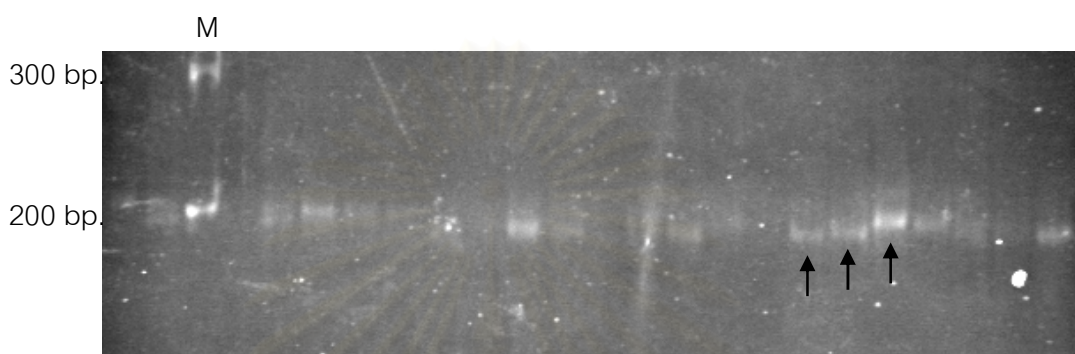
เครื่องหมายตำแหน่ง SJ927 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 2 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-300 คู่เบส โดยแต่ละตำแหน่งไม่พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ927

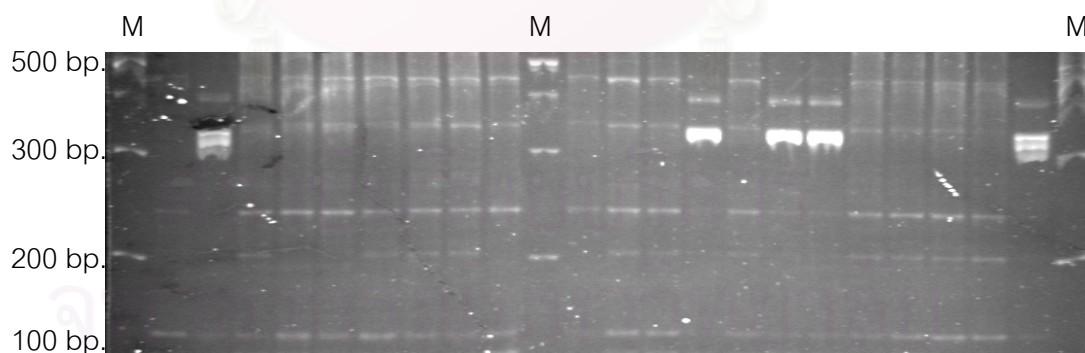


เครื่องหมายตำแหน่ง SJ923 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะไม่ชัดเจน จำนวน 1 ตำแหน่ง มีขนาดประมาณ 200 คู่เบส จากตัวอย่างทั้งหมด พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 2-3 อัลลีล มีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อย ทำให้ยากแก่การวิเคราะห์ผล ดังแสดงในภาพที่ 4.7



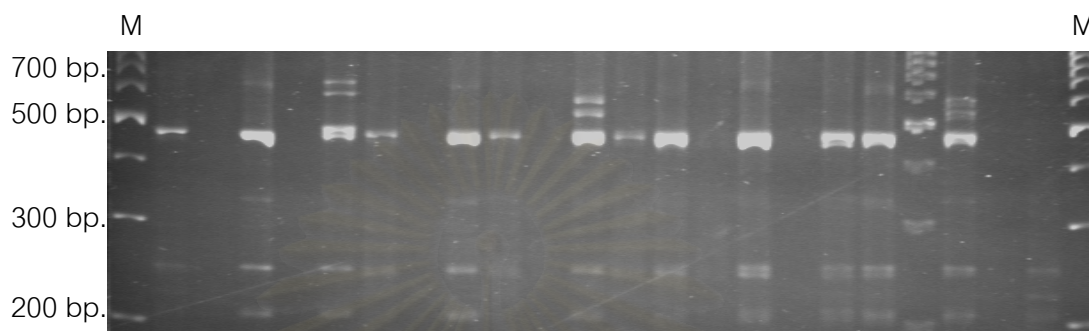
ภาพที่ 4.7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ923

เครื่องหมายตำแหน่ง SJ859 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1-6 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 100-500 คู่เบส โดยแต่ละตำแหน่งไม่พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4.8



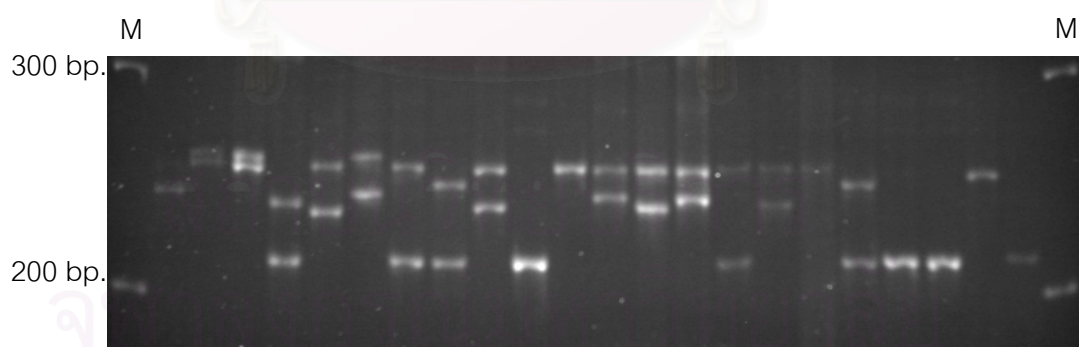
ภาพที่ 4.8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง SJ859

เครื่องหมายตำแหน่ง X53085 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวน 1-5 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 200-700 คู่เบส โดยแต่ละตำแหน่งไม่พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง X53085

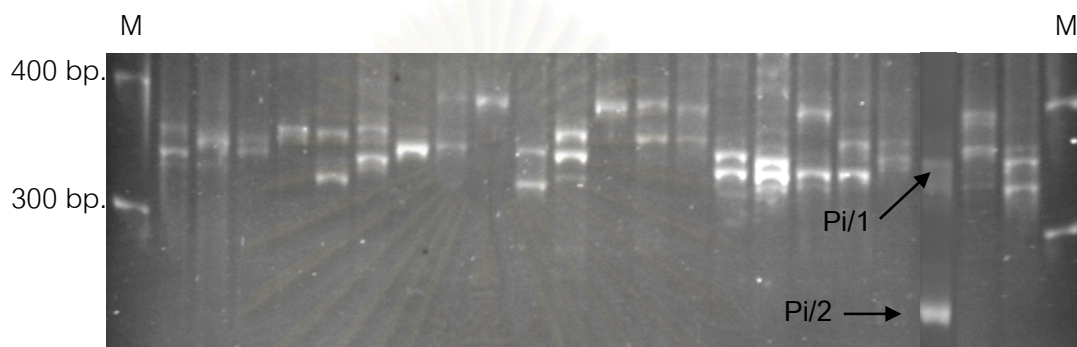
เครื่องหมายตำแหน่ง S0663 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะชัดเจนจำนวน 1-2 แถบ (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวตั้ง) และจากตัวอย่างทั้งหมด พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกันมีขนาดอยู่ระหว่าง 200-300 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.10 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 8 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



ภาพที่ 4.10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0663

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง S0663 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น ... (ATAG)<sub>n</sub> ... (ภาพภาคผนวกที่ 1)

เครื่องหมายตำแหน่ง D00768 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะชัดเจน จำนวน 1-2 แถบ (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวตั้ง) และจากตัวอย่างทั้งหมด พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกันมีขนาดอยู่ระหว่าง 300-400 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.11 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 6 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



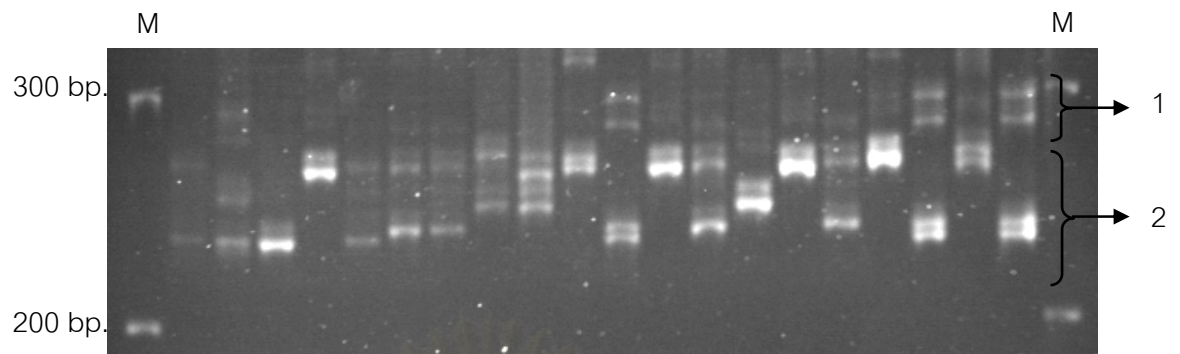
**ภาพที่ 4.11** แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม

ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง D00768

หมายเหตุ ลำดับเบสที่ตรวจสอบได้ของ pi/1(n) และ pi/2(x) แสดงในหน้า 84

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง D00768 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น ... (CTTT)<sub>n</sub>... (CT)<sub>n</sub>... (ภาพภาคผนวกที่ 2 ก และ ค)

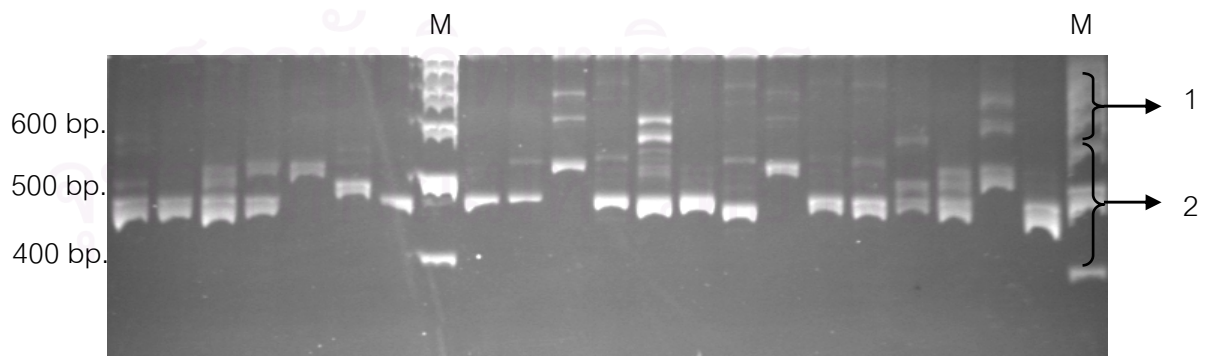
เครื่องหมายตำแหน่ง KVL9000 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวน 2 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 200-300 คู่เบส นอกจากนี้ในบางตัวอย่างยังพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะไม่ชัดเจน จำนวน 1 หรือ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากมีลักษณะจางมาก และแถบดีเอ็นเอในบางตัวอย่างมีลักษณะเป็นเงา (shadow band) แต่ไม่ส่งผลต่อการแปรผล ดังแสดงในภาพที่ 4.12 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 7 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



**ภาพที่ 4.12** แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง KVL9000

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง KVL9000 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น ... $(GT)_n$ ...  $(GATA)_n$ ... (ภาพภาคผนวกที่ 3)

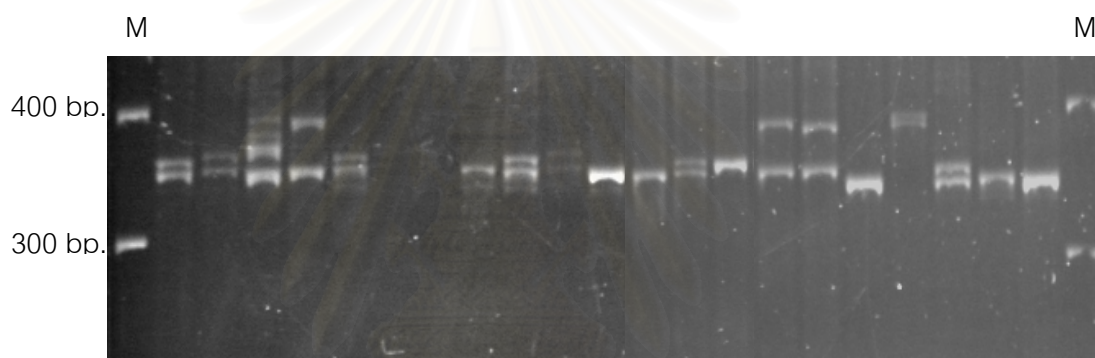
เครื่องหมายตำแหน่ง S0719 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวน 2 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-600 คู่เบส นอกจากนี้ในบางตัวอย่างยังพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะไม่ชัดเจน จำนวน 1 หรือ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากมีลักษณะจางมาก ดังแสดงในภาพที่ 4.13 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 5 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



**ภาพที่ 4.13** แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0719

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง S0719 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น ... $(GAA)_n$ ...  $(GAAA)_n$ ... (ภาพภาคผนวกที่ 4)

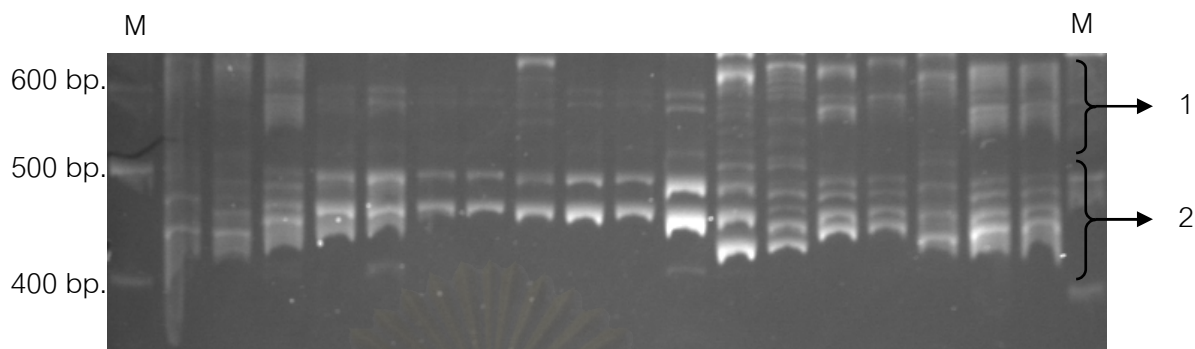
เครื่องหมายตำแหน่ง NLRIP0001 ในแต่ละตัวอย่างพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะชัดเจนจำนวน 1-2 แถบ (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวตั้ง) และจากตัวอย่างทั้งหมด พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกันมีขนาดอยู่ระหว่าง 300-400 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.14 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 6 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



ภาพที่ 4.14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง NLRIP0001

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง NLRIP0001 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น ... $(TTTC)_n$ ...  $(CTTT)_n$ ... (ภาพภาคผนวกที่ 5)

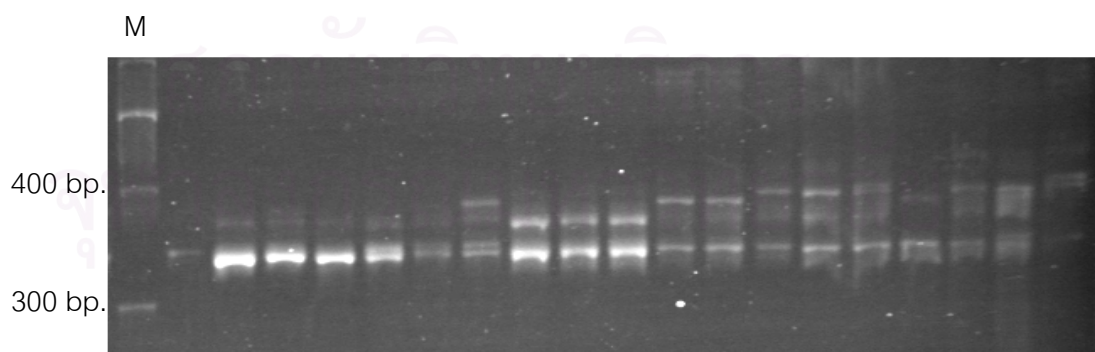
เครื่องหมายตำแหน่ง S0766 ในแต่ละตัวอย่างพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะชัดเจนจำนวน 2 ตำแหน่ง มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-600 คู่เบส นอกจากนี้ในบางตัวอย่างยังพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะไม่ชัดเจน จำนวน 1 หรือ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากมีลักษณะจางมาก ดังแสดงในภาพที่ 4.15 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 4 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



ภาพที่ 4.15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0766

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง S0766 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น ... (GA)<sub>n</sub>(GAA)<sub>n</sub>(GAAA)<sub>n</sub>...(CA)<sub>n</sub>... (ภาพภาคผนวกที่ 6)

เครื่องหมายตำแหน่ง S0710 ในแต่ละตัวอย่างตรวจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอลักษณะชัดเจน จำนวน 1-2 แถบ (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวตั้ง) และจากตัวอย่างทั้งหมด พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอแตกต่างกันมีขนาดอยู่ระหว่าง 300-400 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 4.16 หลังจากการตรวจสอบสัตว์ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง พบรูปแบบความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จำนวน 6 อัลลีล (ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแนวนอน)



ภาพที่ 4.16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0710

จากผลการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง S0710 พบว่าภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ลำดับเบสมีลักษณะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีลำดับเบสแกนเป็น...(TATC)<sub>n</sub>...(TG)<sub>n</sub>...(TA)<sub>n</sub>... (ภาพภาคผนวกที่ 7)

ทำการคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก ได้ทั้งสิ้น 7 ตำแหน่ง ได้แก่ S0663, D00768, KVL9000, S0719, NLRIP0001, S0766 และ S0710

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จากการนับจำนวนอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง ได้แก่ S0663, D00768, KVL9000, S0719, NLRIP0001, S0766 และ S0710 โดยการคำนวณค่าทางสถิติมีรายละเอียดดังนี้

1. ความถี่อัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ แต่ละตำแหน่ง

จากการคำนวณหาค่าความถี่อัลลีลพบค่าความถี่อัลลีลต่ำสุด และสูงสุด อยู่ที่เครื่องหมายตำแหน่ง S0710 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.0125 - 0.6500 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.2

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 จำนวนอัลลีล รูปแบบอัลลีล ความถี่อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และ  
จากทฤษฎี ( $H_{Obs}$ ,  $H_{Exp}$ ) ค่าไคสแควร์ (ตัวหนาแสดงความแตกต่างของค่า  $H_{Obs}$ ,  $H_{Exp}$ )  
และ ค่า PIC ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง

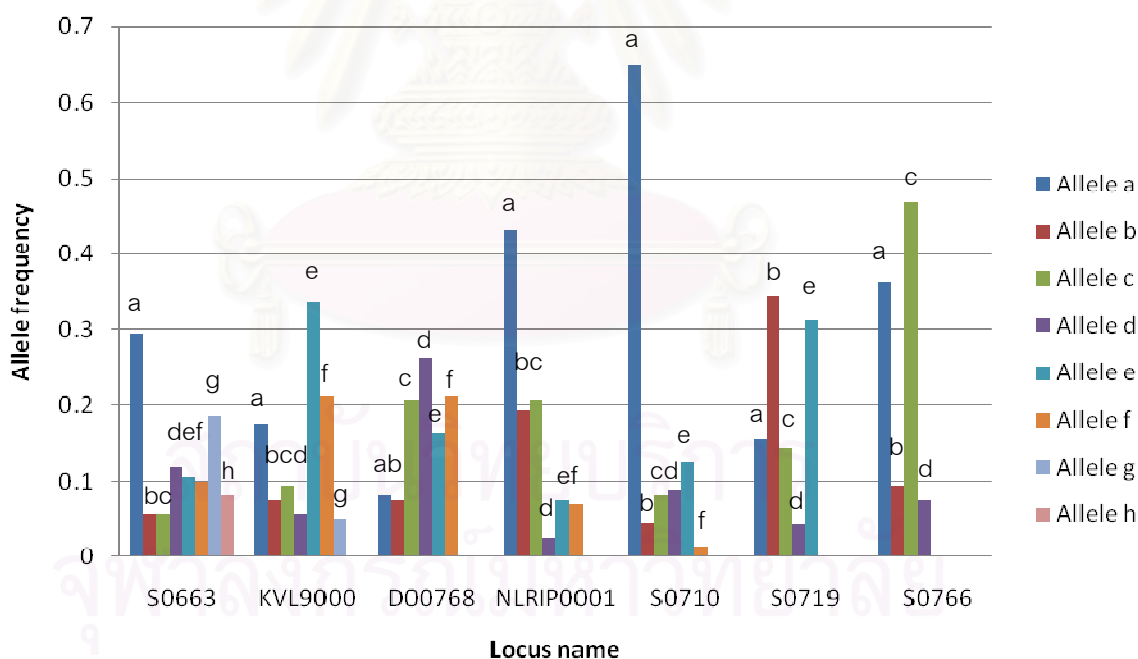
เครื่องหมาย	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710
จำนวนอัลลีล	8	6	7	5	6	4	6
รูปแบบอัลลีล	ความถี่อัลลีล (n=80)						
อัลลีล a	0.2938	0.0812	0.1750	0.1563	0.4313	0.3625	0.6500
อัลลีล b	0.0562	0.0750	0.0750	0.3438	0.1938	0.0937	0.0440
อัลลีล c	0.0562	0.2063	0.0937	0.1437	0.2062	0.4688	0.0810
อัลลีล d	0.1187	0.2625	0.0563	0.0437	0.0250	0.0750	0.0875
อัลลีล e	0.1063	0.1625	0.3375	0.3125	0.0750		0.1250
อัลลีล f	0.1000	0.2125	0.2125		0.0687		0.0125
อัลลีล g	0.1875		0.0500				
อัลลีล h	0.0813						
$H_{Obs}$	0.6375	0.7125	0.8875	<b>0.3250</b>	0.6750	<b>1.0000</b>	0.6250
$H_{Exp}$	0.8302	0.8048	0.7902	<b>0.7372</b>	0.7229	<b>0.6345</b>	0.5456
$\chi^2$	4.3101	1.0522	1.2129	<b>25.0112</b>	0.3512	<b>26.5460</b>	1.6943
PIC	0.8106	0.7760	0.7623	0.6926	0.6841	0.5665	0.5179



การกระจายตัวของความถี่อัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง พบว่าความถี่ของแต่ละอัลลีลจากเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งมีลักษณะที่แตกต่างกัน แสดงรายละเอียดดังภาพที่ 4.17 แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้

1) ลักษณะค่าความถี่อัลลีลที่มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน ได้แก่ เครื่องหมายตำแหน่ง S0663, KVL9000 และ D00768

2) ลักษณะค่าความถี่อัลลีลที่มีสัดส่วนแตกต่างกันมาก ได้แก่ เครื่องหมายตำแหน่ง NLRIP0001, S0710, S0719 และ S0766 โดยพบว่าเครื่องหมายตำแหน่ง NLRIP0001 และ S0766 มีรูปแบบอัลลีลครึ่งหนึ่ง คิดเป็นสัดส่วนถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนอัลลีลทั้งหมด ในขณะที่เครื่องหมายตำแหน่ง S0719 และ S0710 มีรูปแบบอัลลีล 2 ใน 5 อัลลีล และ 1 ใน 6 อัลลีล คิดเป็นสัดส่วนถึง 65 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนอัลลีลทั้งหมด



ภาพที่ 4.17 กราฟการกระจายตัวของความถี่อัลลีล ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง

## 2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

จากการคำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี เพื่อแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ของสุกร พบว่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต มีค่าต่ำสุดไปสูงสุด เรียงตามลำดับดังนี้ 0.3250, 0.6250, 0.6375, 0.6750, 0.7125, 0.8875 และ 1.0000 ซึ่งพบที่เครื่องหมายตำแหน่ง S0719, S0710, S0663, NLRIP0001, D00768, KVL9000 และ S0766 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี มีค่าต่ำสุดไปสูงสุด เรียงตามลำดับดังนี้ 0.5456, 0.6345, 0.7229, 0.7372, 0.7902, 0.8048 และ 0.8302 ซึ่งพบที่เครื่องหมายตำแหน่ง S0710, S0766, NLRIP0001, S0719, KVL9000, D00768 และ S0663 ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี พบว่าเครื่องหมายทั้ง 5 ตำแหน่ง ได้แก่ S0663, D00768, KVL9000, NLRIP0001 และ S0710 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นเครื่องหมายตำแหน่ง S0719 และ S0766 ที่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงถึงเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งนี้เบี่ยงเบนจากสมดุลของ Hardy-Weinberg

## 3. ประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ภายในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

จากการคำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC) เพื่อวัดประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 7 ตำแหน่งพบว่าค่า PIC มีค่าต่ำสุด ไปสูงสุด เรียงตามลำดับดังนี้ 0.5179, 0.5665, 0.6841, 0.6926, 0.7623, 0.7760, และ 0.8106

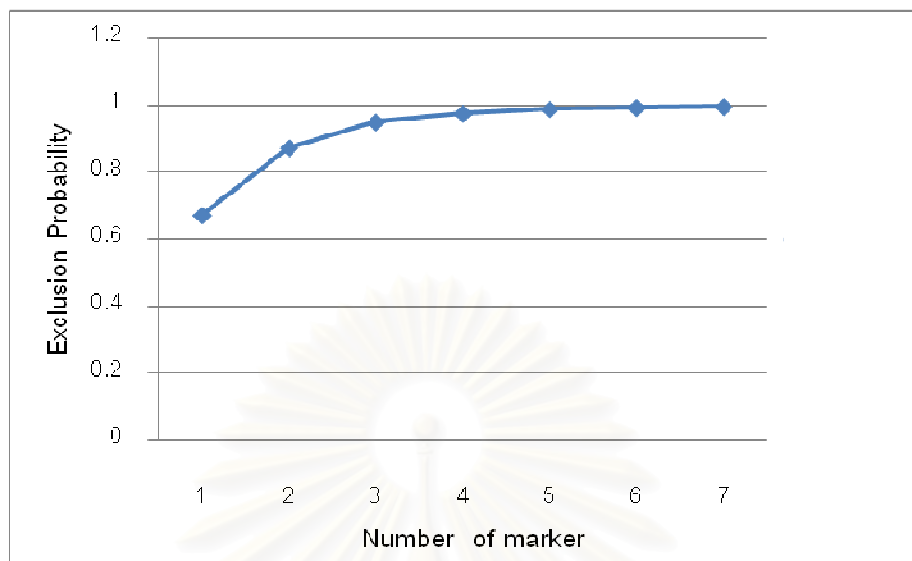
โดยสามารถจัดเรียงลำดับค่า PIC ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่งจากประสิทธิภาพที่ต่ำสุดไปสูงสุด ดังนี้ S0710, S0766, NLRIP0001, S0719, KVL9000, D00768 และ S0663 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.2

#### 4. ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก

จากการคำนวณค่า Exclusion probabilities (EP) และ Combined exclusion probability (CEP) ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง และจากการนำเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่งมาใช้ในการตรวจสอบร่วมกัน พบว่าเครื่องหมายตำแหน่ง S0710 ค่า EP มีค่าต่ำสุด (0.3443) และ เครื่องหมายตำแหน่ง S0663 ค่า EP มีค่าสูงสุด (0.6692) และ ค่า CEP จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตั้งแต่ 2 ถึง 7 ตำแหน่งขึ้นไป โดยทำการเลือกเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูงสุดก่อน และลดลงมาตามลำดับ จนครบทุกตำแหน่ง พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.8716 - 0.9946 ดังนั้นค่าความแม่นยำในการวิเคราะห์ผลมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ คิดเป็น 0.9946 หรือ 99.46 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.18 โดยจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง และ จำนวนของเครื่องหมายที่เพิ่มขึ้นที่ละตำแหน่ง ซึ่งพบค่าความแม่นยำ 99.46 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่งร่วมกัน สำหรับการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก

**ตารางที่ 4.3** ค่า Exclusion probabilities (EP) และ Combined exclusion probability (CEP) ของข้อมูลสุกรจำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง

เครื่องหมาย	Exclusion probabilities (EP)					
	2 loci	3 loci	4 loci	5 loci	6 loci	7 loci
S0663	0.6692	0.6692	0.6692	0.6692	0.6692	0.6692
D00768	0.6117	0.6117	0.6117	0.6117	0.6117	0.6117
KVL9000		0.5992	0.5992	0.5992	0.5992	0.5992
S0719			0.5009	0.5009	0.5009	0.5009
NLRIP0001				0.4991	0.4991	0.4991
S0766					0.3647	0.3647
S0710						0.3443
CEP	0.8716	0.9485	0.9743	0.9871	0.9918	0.9946



ภาพที่ 4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า EP กับ จำนวนของเครื่องหมายพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลต์ที่เพิ่มขึ้น ทั้ง 7 ตำแหน่ง

#### การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง

จากข้อมูลพันธุกรรมของตัวอย่างสัตว์ที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ โดยการนำไปใช้งานทางด้านการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก และการระบุตัวตนสัตว์ พบว่า

##### 1. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก

จากการเปรียบเทียบรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่ง ของคู่ความสัมพันธ์พ่อ-ลูก จำนวนทั้งสิ้น 189 คู่ ซึ่งมี 31 คู่ ที่แสดงความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูกกัน และมี 158 คู่ ที่ไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูกกัน และผลการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมของสัตว์ที่แสดงโอกาสของความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูกกัน และไม่มีความสัมพันธ์เป็นพ่อ-ลูกกัน ซึ่งตรงตามบันทึกพันธุ์ประวัติมีทั้งหมด 188 คู่ จาก 189 คู่

จากการเปรียบเทียบรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ทุกตำแหน่ง ของคู่ความสัมพันธ์แม่-ลูก จำนวนทั้งสิ้น 210 คู่ ซึ่งมี 39 คู่ ที่แสดงความสัมพันธ์เป็นแม่-ลูกกัน และมี 171 คู่ ที่ไม่มีความสัมพันธ์เป็นแม่-ลูกกัน และผลการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรม

ของสัตว์ที่แสดงโอกาสของความสัมพันธ์เป็นแม่-ลูกกัน และไม่มีความสัมพันธ์เป็นแม่-ลูกกัน ซึ่งตรงตามบันทึกพันธุ์ประวัติทั้งหมด 203 คู่ จาก 210 คู่

จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก จากการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ค่าความถูกต้องที่ได้ คิดเป็น 97.99 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณมาจาก  $\frac{188+203}{189+210}$  )

## 2. การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านการระบุตัวตนสัตว์

จากการเปรียบเทียบรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทุกตำแหน่ง ของสัตว์แต่ละคู่ พบข้อมูลพันธุกรรมของตัวสัตว์ทั้งสิ้น 3,160 คู่ ซึ่งมี 3,159 คู่ แสดงรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกันของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ความแตกต่างของเครื่องหมายที่พบนั้นตั้งแต่ 1-7 ตำแหน่ง และมีสัตว์ 1 คู่ ที่แสดงรูปแบบอัลลีลที่เหมือนกันทุกประการของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ดังนั้นการตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานด้านการระบุตัวตนสัตว์ ความถูกต้องในการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ระบุความแตกต่างของสัตว์แต่ละตัวได้ คิดเป็น 99.96 เปอร์เซ็นต์

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการศึกษา

#### การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 95.00-257.50  $\mu\text{g/ml}$ . ดังนั้นในขั้นตอนการทำ PCR ตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอมีลักษณะจาง จะใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR ในปริมาณมากขึ้น สำหรับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ซึ่งพิจารณาจากค่าอัตราส่วนของ  $A_{260}/A_{280}$  ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.49 -1.67 ซึ่งค่าที่ได้ต่ำกว่าปกติที่มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 (Glase, 1995) ทั้งนี้ค่าที่สูงกว่า 2.0 แสดงถึงการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ และค่าที่ต่ำกว่า 1.7 แสดงถึงการปนเปื้อนของโปรตีน (Stulnig and Amberger, 1994) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ดีตามต้องการ

#### ความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์

จากการศึกษาความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง ได้แก่ S0663, KVL9000, D00768, NLRIP0001, S0710, S0719 และ S0766 เมื่อพิจารณาถึงจำนวนอัลลีล และความถี่อัลลีล พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง S0663, KVL9000 และ D00768 มีจำนวนอัลลีล 8, 7 และ 6 อัลลีล ตามลำดับ โดยการกระจายตัวของค่าความถี่อัลลีลมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยค่า PIC มีค่าเท่ากับ 0.8106, 0.7623 และ 0.7760 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายทั้ง 3 ตำแหน่งจัดอยู่ในระดับสูง เนื่องจากค่า PIC มีค่ามากกว่า 0.5 และ ค่าเข้าใกล้ 1 มาก (Botstein et al., 1980; Glowatzki-Mullis et al., 1995; Jakabova et al., 2002) นอกจากนี้เครื่องหมายทั้ง 3 ตำแหน่ง ยังไม่เคยรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพการนำไปใช้งาน

ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง NLRIP0001, S0710, S0719 และ S0766 มีจำนวนอัลลีล 6, 6, 5 และ 4 อัลลีล ตามลำดับ โดยการกระจายตัวของค่าความถี่อัลลีล พบว่ามีความแตกต่างกันมากคือ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0125-0.6500 โดยค่า PIC มีค่าเท่ากับ 0.6841, 0.5179, 0.6926 และ 0.5665 ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายทั้ง 4 ตำแหน่ง ยังจัดอยู่ในระดับสูงเช่นกัน สำหรับเครื่องหมายตำแหน่ง NLRIP0001 ยังไม่เคยรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพการนำไปใช้งาน ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0710 และ S0766 Chen และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาพบค่า PIC มีค่าเท่ากับ 0.74 และ 0.86 ตามลำดับ นอกจากนี้ Chen และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0719 พบค่า PIC มีค่าเท่ากับ 0.94 โดยจากการศึกษาครั้งนี้พบรูปแบบความหลากหลายของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 3 ตำแหน่ง มีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Chen และ คณะ (2005;2006) ในทุกตำแหน่ง ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าค่า PIC มีค่าแตกต่างกันไปตามกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน

### ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรที่ศึกษา

จากการเปรียบเทียบค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต และ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี โดยวิธีการทดสอบไคสแควร์ พบว่าเครื่องหมายตำแหน่ง S0719 และ S0766 แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงถึงเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งนี้ เบี่ยงเบนจากสมมูลของ Hardy-Weinberg กล่าวคือ เครื่องหมายตำแหน่ง S0719 พบค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต มีค่าต่ำกว่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี ทั้งนี้จากการสังเกตพบว่ามีรูปแบบจีโนไทป์ของตัวอย่างสุกร 67.50 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็น homozygous genotype ส่วนเครื่องหมายตำแหน่ง S0766 มีลักษณะตรงกันข้ามกล่าวคือ พบค่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต มีค่าสูงกว่าค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากทฤษฎี โดยพบว่ามีรูปแบบจีโนไทป์ของตัวอย่างสุกรทั้งหมดมีลักษณะเป็น heterozygous genotype

นอกจากนี้ ค่า  $H_{Exp}$  และค่า PIC ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง แสดงแนวโน้มเพิ่มขึ้น และลดลงไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นการพิจารณาประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์หากไม่ทราบค่า PIC น่าจะพิจารณาจากค่า  $H_{Exp}$  ได้เช่นกัน จากตารางที่ 4.2 เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีประสิทธิภาพดี

ที่สุด คือ S0663 (PIC = 0.8106) จะเห็นได้ว่ามีค่า  $H_{Exp}$  สูงที่สุดเช่นกัน และในทางเดียวกัน เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด คือ S0710 (PIC = 0.5179) จะเห็นได้ว่ามีค่า  $H_{Exp}$  ต่ำที่สุดเช่นกัน อย่างไรก็ตามในกรณีที่จำนวนอัลลีลของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์มีจำนวนเท่ากัน (D00768, NPLIR0001 และ S0710) หรือมีความแตกต่างกันไม่มากนัก (S0710, S0719 และ S0766) จะเห็นได้ชัดเจนว่าการกระจายตัวของความถี่อัลลีล เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อค่า PIC และ  $H_{Exp}$  ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง ดังนั้น ในการพิจารณาประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง ปัจจัยหลักที่ควรคำนึงถึง คือ จำนวนอัลลีล และการกระจายตัวของความถี่อัลลีลควบคู่กัน ไป (Phavaphutanon, 2005; Radko and Slota, 2007)

### ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูก

ประสิทธิภาพในการนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ขึ้นอยู่กับค่า CEP โดยจะพบว่าค่า CEP มีค่าเพิ่มขึ้นตามจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้เพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่งร่วมกันค่า CEP มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 0.9946 หรือ 99.46 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่งนี้ เมื่อนำไปใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อ แม่ ลูกในสุกร มีความแม่นยำที่ 99.46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าความแม่นยำที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่าการศึกษาของ Seyedabadi และคณะ (2006) ที่ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 7 ตำแหน่ง ทำการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ในม้า พบค่า  $H_{Exp}$  มีค่าอยู่ระหว่าง 0.617 - 0.741 ค่า PIC มีค่ามากกว่า 0.5 ทุกตำแหน่ง และค่า CEP มีค่าเท่ากับ 0.973 แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่มีค่าสูงเหมาะสำหรับการนำมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก และ การระบุตัวตน และการศึกษาของ Jakabova และ คณะ (2002) ศึกษาการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 6 ตำแหน่ง ในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก ในม้า ค่า PIC มีค่าอยู่ระหว่าง 0.47-0.82 และค่า CEP มีค่าเท่ากับ 98.88 เปอร์เซ็นต์ การศึกษานี้กล่าวว่าค่า CEP ที่ได้มีค่าสูงเมื่อใช้เครื่องหมายเพียง 6 ตำแหน่ง และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Rohrer และคณะ (2007) ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 10 ตำแหน่ง ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูกในสุกร พบว่าค่า CEP มีค่าอยู่



ระหว่าง 0.9313 – 0.9904 ความแม่นยำที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ พ่อแม่ ลูกได้

ในกรณีที่ว่า CEP ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความต่ำกว่าค่า CEP จากการศึกษานี้ของ Putnova และคณะ (2003) ที่ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 ตำแหน่งในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูกในสุกร ค่า PIC มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5769-0.6824 และค่า CEP มีค่าอยู่ระหว่าง 0.9954-0.9994 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การศึกษาของ Nechtelberger และคณะ (2001) มีรายงานการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูกในสุกร จำนวนเครื่องหมายทั้งหมด 10 ตำแหน่ง CEP มีค่าอยู่ระหว่าง 99.18-99.76 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า CEP ที่ได้ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการใช้งาน ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมอีก 5 ตำแหน่ง รวมเป็น 15 ตำแหน่ง พบว่าค่า CEP ที่คำนวณได้มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 99.87-99.98 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าจำนวนเครื่องหมายที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลต่อประสิทธิภาพของเครื่องหมายในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูก

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Galov และคณะ (2005) ได้กล่าวว่าค่าความแม่นยำหรือ CEP ที่ประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เป็นค่าสถิติที่ดีสำหรับการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พบค่า CEP มีค่าเป็น 99.46 เปอร์เซ็นต์ จะแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายทั้ง 7 ตำแหน่ง ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้ร่วมกัน มีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้งานในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูกสุกรในประเทศไทยได้

### การตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ ทั้ง 7 ตำแหน่ง

จากการคำนวณ และเปรียบเทียบค่าความแม่นยำในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ ลูก หรือค่า CEP ที่ได้ตามสูตรคำนวณ พบว่ามีค่าเป็น 99.46 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การตรวจสอบจริงโดยใช้กลุ่มสุกรในการศึกษาครั้งนี้ที่มีความเกี่ยวข้องกันทางสายเลือด จำนวน 40 ตัว พบว่ามีค่าเป็น 97.99 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าจากการคำนวณตามสูตร และจากการตรวจสอบจริงมีความผิดพลาดประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากการคำนวณมีค่าสูงกว่าค่าที่ทำการตรวจสอบจริงกับกลุ่มสุกร ประมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า

เมื่อนำเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่งไปใช้งาน ค่าความแม่นยำในการตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก อาจจะมีค่าสูงกว่าความจริงเล็กน้อย

สำหรับการตรวจสอบข้อมูลพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งหมด 80 ตัวอย่าง เพื่อการระบุตัวตนพบว่า สามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างได้คิดเป็น 99.96 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากมีสุกร 2 ตัวที่แสดงข้อมูลพันธุกรรมเหมือนกันทุกประการ ดังนั้นสำหรับการนำมาใช้งานด้านการระบุตัวตน พบความผิดพลาดเพียง 0.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการใช้งานที่อยู่ในระดับสูง



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 6

### สรุปผล และข้อเสนอแนะ

1. การสกัดดีเอ็นเอ จากตัวอย่างเลือด และตัวอย่างน้ำเชื้อ สามารถทำการสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี และมีปริมาณเพียงพอนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไปได้
2. ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 16 ตำแหน่ง พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 15 ตำแหน่ง ยกเว้นตำแหน่ง SJ925 โดยพบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0663, D00768, KVL9000, S0719, NLRIP0001, S0766 และ S0710 มีคุณสมบัติเป็น polymorphism สามารถนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ พบจำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 4-8 อัลลีล
3. ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรสุกรเหล่านี้ จากการวิเคราะห์ค่า  $H_{Obs}$  และ  $H_{Exp}$  ของตัวอย่างสุกรทั้งหมด พบว่า เครื่องหมายตำแหน่ง S0719 และ S0766 มีค่า  $H_{Obs}$  และ  $H_{Exp}$  แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงถึงเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งนี้เบี่ยงเบนจากสมดุลของ Hardy-Weinberg
4. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง โดยพิจารณาจากค่า PIC พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5179 - 0.8106 ซึ่งจัดว่ามีประสิทธิภาพอยู่ในระดับสูง เรียงลำดับประสิทธิภาพของเครื่องหมายจากมากไปน้อยได้ดังนี้ S0663, D00768, KVL9000, S0719, NLRIP0001, S0766 และ S0710
5. ผลการศึกษาประสิทธิภาพ ด้านการหาความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูก โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่งร่วมกัน พบว่า ค่า CEP มีค่าเท่ากับ 0.9946 และจากการตรวจสอบจริงจากกลุ่มสุกรที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 97.99 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงค่าความแม่นยำที่ได้จากการคำนวณตามสูตร มีค่าสูงกว่าความเป็นจริงเล็กน้อย

6. ผลการศึกษาประสิทธิภาพด้านการระบุตัวตนสัตว์ การวิเคราะห์ผลแสดงความถูกต้องในการใช้ชุดเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง คิดเป็น 99.96 เปอร์เซ็นต์ โดยพบความผิดพลาดเพียง 0.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดว่าเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง เมื่อนำไปใช้งานด้านการระบุตัวตนแสดงประสิทธิภาพสูง

### ข้อเสนอแนะ

สามารถนำเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์จากการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้งานด้านการหาความสัมพันธ์พ่อ แม่ ลูกได้ เนื่องจากพบความแม่นยำ 99.46 เปอร์เซ็นต์ จัดว่ามีประสิทธิภาพดี แต่อย่างไรก็ตามถ้าต้องการเพิ่มความแม่นยำถึง 99.99 เปอร์เซ็นต์ ทำได้โดยเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานแล้ว พบว่ามีค่า PIC อยู่ในระดับสูงมาก อยู่ระหว่าง 0.8 - 0.9 เพิ่มเติมอีก 2-3 ตำแหน่ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2002 (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 32-50.

### ภาษาอังกฤษ

- Aguilera-Reyes, U., Zavala-Páramo, G., Valdez-Alarcón, J.J., Cano-Camacho, H., García-López, G.I. and Pescador-Salas, N. 2006. Multiple mating and paternity determinations in domestic swine (*Sus scrofa*). *Anim. Res.* 55(5): 409-417.
- Alexander, G., Stevens, D. and Mottershead, B. 1983. Problems in the accurate recording of lambing data. *Aust. J. Exp Agric. Anim Husband.* 23: 361-368. Cited in Dodds, K.G., Tate, M.L., McEwan, J. C. and Crawford, A.M. 1996. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. *Theor. Appl. Genet.* 92(8): 966-975.
- Banos, G., Wiggans, G.R. and Powell, R.L. 2001. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. *J. Dairy Sci.* 84(11): 2523-2529.
- 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 Gyr cattle. *Genet. Mol. Biol.* 25(4): 389-394.
- Behl, R., Sheoran, N., Behl, J., Tantia, M.S. and Vijn, R.K. 2002. Microsatellite sequences of mammals and their applications in genome analysis in pigs – A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15(12): 1822-1830.
- Behl, R., Sheoran, N., Behl, J. and Vijn, R.K. 2006. Genetic analysis of Ankamali pigs of India using microsatellite markers and their comparison with other domesticated Indian pig types. *J. Anim Breed. Genet.* 123(2): 131-135.
- Beuzen, N.D., Stear, M.J. and Chang, K.C. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Vet. J.* 160(1): 42-52.

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum Genet.* 32(3): 314–331. Cited in Xu-Xiang, O., Qi-Shun, S., Sheng-Qiang, H., Zao-Fu, D., He-Xiang, L., De-Shi, H., Sheng-Guo, T. and Shu-Guang, H. 2006. Analysis of microsatellite DNA markers of OarHH35 and BMS2508 in four goat breeds. *Chinese J. Agric. Biotech.* 3(3): 217-222.
- Chaiwatanasin, W., Chantsavang, S., Chomchai, S., Sookmanee, N. and Tabchareon, S. 2002. Genetic diversity of Native Pig in Thailand using microsatellite analysis. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 36: 133 - 137
- Chambers, G.K. and MacAvoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp. Biochem. Physiol.* 126: 455-476.
- Chen, K., Knorr, C., Bornemann-Kolatzki, K., Ren, J., Huang, L., Rohrer, G.A. and Brenig, B. 2005. Targeted oligonucleotide-mediated microsatellite identification (TOMMI) from large-insert library clones. *BMC Genetics.* 6(54): 1–8.
- Chen, K., Knorr, C., Bornemann-Kolatzki, K., Huang, L., Rohrer, G.A. and Brenig, B. 2006. Characterization of the PGK2 associated microsatellite S0719 on SSC7 suitable for parentage and QTL diagnosis. *Anim. Biotech.* 17(1): 43–49.
- Curi, R.A. and Lopes, C.R. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovines. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 39(3): 129-135.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. and Dveksler, G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 3: 30-37.
- Dodgson, J.B., Cheng, H.H. and Okimoto, R. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poult. Sci.* 76(8): 1108-1114.
- Fan, B., Chen, Y.Z., Moran, C., Zhao, S.H., Liu, B., Yu, M., Zhu, M.J., Xiong, T.A. and Li, K. 2005. Individual-breed assignment analysis in swine populations by using microsatellite markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18(11): 1529-1534.

- Fan, B., Wang, Z-G., Li, Y-J., Zhao, X-L., Liu, B., Zhao, S-H., Yu, M., Li, M-H., Chen, S-L., Xiong, T-A. and Li, K. 2002. Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Anim. Genet.* 33(6): 422–427.
- Fang, M., Hu, X., Jiang, T., Braunschweig, M., Hu, L., Du, Z., Feng, J., Zhang, Q., Wu, C. and Li, N. 2005. The phylogeny of Chinese indigenous pig breeds inferred from microsatellite markers. *Anim. Genet.* 36(7): 7–13.
- Galov, A., Byrne, K., Duras-Gomercic, M., Gomercic, T., Nushol, Z., Vincek, D., Kocijan, I., Tadic, Z., Benkovic, V., Basic, I. and Funk, S.M. 2005. Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livest. Prod. Sci.* 93(3): 277-282.
- Glasel, J.A. 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratio. *Biotechniques.* 18: 62-63.
- Glowatzki-Mullis, M.L., Gaillard, C., Wigger, G. and Fries, R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genet.* 26(1): 7-12.
- Goldstein, D.B. and Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inferences. *J. Hered.* 88(5): 335-342.
- Groenen, M.A.M., Joosten, R., Boscher, M-Y., Amigues, Y., Rattink, A., Harlizius, B., Van der Poel, J.J. and Crooijmans, R. 2003. The use of microsatellite genotyping for population studies in the pig with individual and pooled DNA samples. *Arch. Zootec.* 52: 145-155.
- Guo, X. and Elston, R.C. 1999. Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Hum. Hered.* 49(2): 112-118.
- Gustavsson, I. 1988. Standard karyotype of the domestic pig: Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig. *Hereditas.* 109(2): 151 – 157.
- Henderson, C.R. 1984. Application of linear models in animal breeding. University of Guelph, Canada.

- Henke, L., Fimmers, R., Josephi, E., Cleef, S., Dulmer, M. and Henke, J. 1999. Usefulness of conventional blood groups, DNA-minisatellites and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. *Forensic. Sci. Int.* 103: 133–142.
- Ichikawa, Y., Takagi, K., Tsumagari, S., Ishihama, K., Morita, M., Kanemaki, M., Takeishi, M. and Takahashi, H. 2001. Canine parentage testing based on microsatellite polymorphisms. *J. Vet. Med. Sci.* 63(11): 1209-1213.
- Israel, C. and Weller, J.I. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *J. Dairy Sci.* 83(1): 181-187.
- Jakabova, D., Trandzik, J., Chrastina, J., Hudecova, L., Zetochova, E., Bulla, J., Bugarsky, A., Jakab, F. and Kozlik, P. 2002. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. *Czech J. Anim. Sci.* 47(12): 497-501.
- Jamieson, A. 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim. Genet.* : 25 (Supp. 1): 37-44.
- Jamieson, A. and Taylor, S.S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.* 28(6): 397-400.
- Jiménez-Gamero, I., Dorado, G., Muñoz-Serrano, A., Analla, M. and Alonso-Moraga, A. 2006. DNA microsatellites to ascertain pedigree-recorded information in a selecting nucleus of Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Res.* 65(3): 266–273.
- Juneja, R.K. and Vogeli, P. 1998. Biochemical genetics. In: *The genetics of the pig.* M.F. Rothschild and A. Ruvinsky (eds.) UK: CABI Press. 117-119.
- Karlskov-Mortensen, P., Hu, Z. L., Reecy, J. M. and Fredholm, M. 2008. A data resource of 838 porcine microsatellite sequences with repeat motifs of three to six bases. *Anim. Genet.* 39(1): 85-86.



- Kaul, R., Singh, A., Vijn, R.K., Tantia, M.S. and Behl, R. 2001. Evaluation of the genetic variability of 13 microsatellite markers in native Indian pigs. *J. Genet.* 80(3): 149-153.
- Keele, J.W., Johnson, R.K., Young, L.D. and Socha, T.E. 1988. Comparison of methods of predicting breeding values of swine. *J. Anim. Sci.* 66: 3040-3048.
- Khatib, H., Darvasi, A., Plotski, Y. and Soller, M. 1994. Determining relative microsatellite allele frequencies in pooled DNA samples. *Genome Res.* 4(1): 13-18.
- Lai, Y. and Sunny, F. 2003. The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Mol. Biol. Evol.* 20(12): 2123-2131.
- Lee, S.Y. and Cho, G.J. 2006. Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *J. Vet. Sci.* 7(1): 63-67.
- Liua, Z.J. and Cordes, J.F. 2002. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture.* 238: 1-37.
- Long, T.E., Johnson, R.K. and Keele, J.W. 1990. Effects of errors in pedigree on three methods of estimating breeding value for litter size, backfat and average daily gain in swine. *J. Anim. Sci.* 68(12): 4069-4078.
- Moran, C. 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Heredity.* 84: 274-280.
- NCBI. 2008. "CoreNucleotide." [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Nechtelberger, D., Kaltwasser, C., Stur, I., Meyer, J-N., Brem, G., Mueller, M. and Mueller, S. 2001. DNA microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. *Anim. Biotech.* 12(2): 141-144.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 89(3): 583-590.
- O'Brien, S.J. 1991. Mammalian genome mapping: Lessons and prospects. *Curr. Opin. Genet Dev.* 1(1):105-111.

- Oliveira, E.J., Padua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R. and Carneiro-Vieira, M.L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29(2): 294-307.
- Phavaphutanon, J. 2005. Parentage testing in dogs by microsatellite markers. (Master's Thesis) Department of Agricultural Biotechnology, Graduate School, Kasetsart University. 62.
- Putnova, L., Knoll, A., Dvorak, V. and Dvorak, J. 2003. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. *Czech. J. Anim. Sci.* 48(8): 307–314.
- Radko, A. and E. Slota. 2007. Polymorphism of 11 microsatellite DNA sequences used for parentage control in Holstein-Friesian bulls of black and white variety in Poland. *Ann. Anim. Sci.* 2: 189-196.
- Rohrer, G.A., Freking, B.A. and Nonneman, D. 2007. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. *Anim. Genet.* 38(3): 253–258.
- Ron, M., Blanc, Y., Band, M., Ezra, E. and Weller, J. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *J. Dairy Sci.* 9(4): 676-681.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.
- Schlotterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl. Acids Res.* 20(2): 211-215.
- Schnabel, R.D., Ward, T.J. and Derr, J.N. 2000. Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, *Bison bison* and domestic cattle. *Anim. Genet.* 31(6): 360-366.


- Schook, L.B., Beever, J.E., Rogers, J., Humphray, S., Archibald, A., Chardon, P., Milan, D., Rohrer, G. and Eversole, K. 2005. Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. *Comp. Funct. Genom.* 6(4): 251–255.
- Seyedabadi, H., Amirinia, C., Banabazi, M.H., Emrani, H. 2006. Parentage verification of Iranian Caspian horse using microsatellites markers. *Iranian J Biotech.* 4(4): 260-264.
- Sherman, G.B., Kachman, S.D., Hungerford, L.L., Rupp, G.P., Fox, C.P., Brown, M.D., Feuz, B.M. and Holm, T.R. 2004. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage. *Anim. Genet.* 35(1): 220–226.
- Stulnig T.M. and Amberger, A. 1994. Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *Biotheniques.* 16: 403.
- Thomson, J.A., Pillotia, V., Stevensb, P., Ayresc, K.L. and Debenham, P.G. 1999. Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. *Forensic Sci. Int.* 100 (1): 1–16.
- Thuy, N.T.D., Melchinger-Wild, E., Kuss, A.W., Cuong, N.V., Bartenschlager, H. and Geldermann, H. 2006. Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *J. Anim. Sci.* 84 (10): 2601-2608.
- Tóth, G., Gáspari, Z. and Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Res.* 10(7): 967-981.
- Tozaki, T., Inoue, S., Mashima, S., Ohta, M., Miura, N. and Tomita, M. 2000. Sequence analysis of trinucleotide repeat microsatellites from an enrichment library of the equine genome. *Genome.* 43: 354-365.
- Urquhart, A., Oldroyd, N.J., Kimpton, C.P., and Gill, P. 1995. Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *Bio Techniques.* 18(1): 116-121.

- Visscher, P.M. and Haley, C.S. 1998. Strategies for marker-assisted selection in pig breeding programmes. In: Proceedings 6<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Armidale, Australia, November 18-23: 503-510.
- Visscher, P.M., Woolliams, J.A., Smith, D. and Williams, J.L. 2002. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. *J. Dairy Sci.* 85(9): 2368-2375.
- Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* 6: 3543-3557.
- Wang, J. 2007. Parentage and sibship exclusions: higher statistical power with more family members. *Heredity.* 99: 205-217.
- Webster, S. and Reichart, L. 2005. Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. *Methods Enzymol.* 395: 222-238.
- Weller, J.L., Feldmesser, E., Golik, M., Tager-Cohen, I., Domo-chovsky, R., Alus, O., Ezra, E. and Ron, M. 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. *J. Dairy Sci.* 87(8): 2627-2640.
- Winter, P.C., Hickey, G.I. and Fletcher, H.L. 2002. Genomes. In: Genetics. B.D. Hames (ed.) UK: BIOS Scientific Publishers Limited. 81-85.
- Wintero, A.K., Fredholm, M. and Thomsen, P.D. 1992. Variable (dG-dT)<sub>n</sub> (dC-dA)<sub>n</sub> sequences in the porcine genome. *Genomics.* 12(2): 281-288.
- Xue, J., Dial, G.D., Trigg, T., Davies, P. and King, V.L. 1998. Influence of mating frequency on sow reproductive performance. *J. Anim. Sci.* 76(12): 2962-2966.
- Yue, G.H. and Wang, G.L. 2003. Molecular genetic analysis of the Chinese Erhualian pig breed. *S Afr. J. Anim. Sci.* 33(3): 159-165.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

อธิบายสูตร Exclusion probabilities และ Polymorphic Information Content

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### Exclusion Probabilities หรือ Probability of exclusion (EP หรือ PE) (Jamieson, 1994)

การพิจารณาจีโนไทป์ของสัตว์ 2 ตัวเพื่อสร้างคู่ผสมพันธุ์ จากการสร้างคู่ของอัลลีล โดยสัตว์แต่ละคู่จะมีจีโนไทป์ที่เหมือนกัน หรือแตกต่างกัน เนื่องจากจากจีโนไทป์ของสัตว์แต่ละตัว อาจจะมีลักษณะอัลลีลเป็นแบบ homozygote หรือ heterozygote ดังนั้นคู่ของอัลลีลที่เป็นไปได้ทั้งหมด จากสัตว์ 2 ตัว มีทั้งหมด 7 ประเภท ซึ่งคู่ของจีโนไทป์แต่ละประเภทจะเพิ่มขึ้นเป็นแบบแผนต่อไปเรื่อยๆ เมื่อจำนวนรูปแบบอัลลีลเพิ่มขึ้น และสามารถสร้างเป็นสูตร ซึ่งรายละเอียดดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1

**ตารางภาคผนวกที่ 1** การเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมของสัตว์ 2 ตัว ณ หนึ่งตำแหน่ง (locus) ซึ่งมีคู่ของจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ทั้งหมด 7 ประเภท

ประเภท (จีโนไทป์สัตว์ 2 ตัว)	จำนวน อัลลีล	จำนวนรูปแบบอัลลีลที่เพิ่มขึ้นในประชากร				
		1	2	3	4	n
AA AA	1	1	2 <sup>a</sup>	3	4	n
AB AB	2	-	1 <sup>b</sup>	3	6	0.5n(n-1)
AA BB	2	-	2 <sup>c</sup>	6	12	n(n-1)
AA AB	2	-	4 <sup>d</sup>	12	24	2n(n-1)
AA BC	3	-	-	6	24	n(n-1)(n-2)
AB BC	3	-	-	6	24	n(n-1)(n-2)
AB CD	4	-	-	-	6	0.25n(n-1)(n-2) (n-3)
Total (pairs)		1	9	36	100	$[n+0.5n(n-1)]^2$

ที่มา : ดัดแปลงจาก Jamieson (1994)

ในกรณีที่มีจำนวนรูปแบบอัลลีล 2 อัลลีล ประเภทของจีโนไทป์ในสัตว์ 2 ตัวจะแตกต่างกัน ดังนี้

<sup>a</sup> ประเภท AA AA จะพบจีโนไทป์ได้ 2 แบบ ในประชากรคือ AA AA และ BB BB

<sup>b</sup> ประเภท AB AB จะพบจีโนไทป์ได้ 1 แบบ ในประชากรคือ AB AB

<sup>c</sup> ประเภท AA BB จะพบจีโนไทป์ได้ 2 แบบ ในประชากรคือ AA BB และ BB AA

<sup>d</sup> ประเภท AA AB จะพบจีโนไทป์ได้ 4 แบบ ในประชากรคือ AA AB, AB AA, BB BA และ BA BB

การระบุความสัมพันธ์ของพ่อ หรือ แม่ที่ผิด ซึ่งในตัวอย่างนี้ จะอธิบายถึงโอกาสของการระบุพ่อตัวที่ไม่ถูกต้องออก โดยใช้ 2 อัลลีล สำหรับตำแหน่งที่เป็น co-dominant โดยจะมีจีโนไทป์ที่เป็นไปได้ 3 รูปแบบ ซึ่งจะแสดง 9 คู่ผสมพันธุ์ที่เป็นไปได้ โดยผลรวมของความถี่อัลลีล  $(a + b)$  จะเท่ากับ 1 โดยอัลลีลจะถูกแจกแจงโดยพ่อในแต่ละคู่ผสมพันธุ์ ตามกฎการแยกตัวที่ถูกต้องของเมนเดล ซึ่งตัวอย่างในแถวแรกจะแสดงคู่ผสมพันธุ์ AA×AA โดยพ่อที่ถูกต้องจะส่งผ่าน A อย่างเดียว สำหรับในประชากรขนาดใหญ่ คาดหวังว่าจะเป็น  $a^5$  เนื่องจากผลของความถี่ของจีโนไทป์ AA×AA  $(a^2 \times a^2)$  ซึ่ง  $a$  เป็นความถี่ของอัลลีล A ในประชากร ซึ่งประกอบกับโอกาสที่บันทึกผิด  $(a^4 \times b)$  ในกรณีของ  $b$  เป็นความถี่ของอัลลีล B ในประชากร ดังนั้นสามารถเปรียบเทียบพ่อที่ถูกต้อง และพ่อที่ไม่ถูกต้องได้ เมื่อจัดลงตาราง และตรวจสอบความถูกต้อง โดยผลรวมของความน่าจะเป็นของการระบุตัวที่ไม่ใช่พ่อออก ทุก ๆ แถว ซึ่งรายละเอียดดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 2

**ตารางภาคผนวกที่ 2** ค่าความน่าจะเป็นของพ่อที่ถูกแยกออก โดยพิจารณาคู่ของอัลลีลที่เกิดขึ้น ซึ่ง A และ B เป็นความถี่อัลลีลของ a และ b

9 คู่ผสมพันธุ์ แม่×พ่อ	ลูกที่เป็นไปได้			พ่อที่ถูกผสมดีขึ้นมา		ความถี่ของการผสม ×ประเภทของน้ำเชื้อ	
	AA	AB	BB	ที่ถูกต้อง	ที่ไม่ถูกต้อง	Included sires	Excluded sires
AA×AA	1	0	0	A	B	$a^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$a^2 \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$
AA×AB	0.5	0.5	0	A	B	$a^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$a^2 \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$
AA×BB	0	1	0	B	A	$b^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$b^2 \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$
AB×AA	0.5	0.5	0	A	0.5B	$a^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$a^2 \begin{bmatrix} a^2(0.5b) \\ b^2(0.5a) \end{bmatrix}$
AB×AB	0.25	0.5	0.25	A	B	$2ab \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(0.5a+b) \end{bmatrix}$	$2ab \begin{bmatrix} a^2(0.5b) \\ b^2(0.5a) \end{bmatrix}$
AB×BB	0	0.5	0.5	0.5A	B	$b^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$b^2 \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$
BB×AA	0	1	0	A	B	$a^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$a^2 \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$
BB×AB	0	0.5	0.5	A	B	$2ab \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$2ab \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$
BB×BB	0	0	1	B	A	$b^2 \begin{bmatrix} a \\ 2ab(a+b) \\ b^2(b) \end{bmatrix}$	$b^2 \begin{bmatrix} a^2(b) \\ b^2(a) \end{bmatrix}$

โดยผลรวมของความน่าจะเป็นของการระบุตัวที่ไม่ใช่พ่อออก ทุก ๆ แถว สำหรับ 2 อัลลีล คือ  $a^4b + a^3b^2 + a^2b^3 + ab^4 + a^3b^2 + a^2b^3$  โดยผลรวมของ Excluded sires (EP<sub>2</sub>) แสดงได้ดังนี้



$$\begin{aligned}
&= a^4b + a^3b^2 + a^2b^3 + ab^4 + a^3b^2 + a^2b^3 \\
&= a^4b + 2a^3b^2 + 2a^2b^3 + ab^4 \\
&= ab(a^3 + 2a^2b + 2ab^2 + b^3) \\
&= ab[a^3 + 2ab(a+b) + b^3] \quad [\text{แต่เนื่องจาก } (a+b)=1] \\
&= ab(a^3 + 2ab + b^3) \\
&= ab[a^2(1-b) + 2ab + b^2(1-a)] \\
&= ab(1 - a^2b - b^2a) \\
&= ab[1 - ab(a+b)] \\
EP_2 &= ab(1 - ab)
\end{aligned}$$

Parentage exclusion models จะพิจารณาจำนวนอัลลีลที่เพิ่มขึ้นเป็น 3, 4 อัลลีลได้ สามารถขยายตารางภาคผนวกที่ 2 ออกไป โดยถ้ามีจำนวนคู่ผสมพันธุ์ที่เป็นไปได้เพิ่มขึ้น (บรรทัดล่างสุดของตารางภาคผนวกที่ 1) เมื่อมีจำนวน 3 อัลลีล จะมี 36 คู่ผสมพันธุ์ที่เป็นไปได้ และมีจำนวน 4 อัลลีล จะมี 100 คู่ผสมพันธุ์ที่เป็นไปได้

สูตรของการคำนวณความน่าจะเป็นของการแยกบันทึกของพ่อหรือแม่ที่ผิด เมื่อจีโนไทป์ประกอบด้วย 2, 3 และ n อัลลีล โดยทราบความถี่อัลลีล และอัลลีลถูกเลือกมาอย่างเท่ากัน ดังนั้น

$$\begin{aligned}
EP_2 &= a(1-a)^2 + b(1-b)^2 - (ab)^2[4-3(a+b)] \\
EP_3 &= a(1-a)^2 + b(1-b)^2 + c(1-c)^2 - (ab)^2[4-3(a+b)] - (ac)^2[4-3(a+c)] - (bc)^2[4-3(b+c)] \\
EP &= \sum_{i=1}^n p_i(1-p_i)^2 - \sum_{i>j=1}^n (p_i p_j)^2 [4-3(p_i + p_j)]
\end{aligned}$$

สูตรทั่วไปสำหรับการคำนวณความน่าจะเป็นในการแยกบันทึกของพ่อหรือแม่ที่ไม่ถูกต้อง สำหรับหนึ่งตำแหน่ง (locus) กับ เมื่อมี n อัลลีล แสดงดังนี้

**สูตรทั่วไป**

$$EP = \sum_{i=1}^n p_i(1-p_i)^2 - \sum_{i>j=1}^n (p_i p_j)^2 [4-3(p_i + p_j)] \quad (\text{Jamieson, 1994})$$

สูตรทั่วไปนี้จะเปลี่ยนรูปจาก  $ab(1-ab)$  ในกรณีของ 2 อัลลีล ซึ่งสูตรดังกล่าวนี้สามารถเขียน 2 terms หลังให้เหมาะสมสำหรับการคำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} 4\sum_{i>j}(p_i p_j)^2 &= 2\sum_{i,j}(p_i p_j)^2 - 2\sum_i p_i^4 \\ &= 2\left(\sum_i p_i^2\right)^2 - 2\sum_i p_i^4 \end{aligned}$$

และ

$$\begin{aligned} \sum_{i>j}(p_i^3 p_j^2 + p_i^2 p_j^3) &= \sum_{i,j} p_i^3 p_j^2 - \sum_i p_i^5 \\ &= \left(\sum_i p_i^3\right)\left(\sum_i p_i^2\right) - \sum_i p_i^5 \end{aligned}$$

สูตรที่ได้มาสูตรนี้สามารถอธิบายโดย 3 อัลลีล ซึ่งมี 9 cells ประกอบด้วย 9 terms ระหว่าง  $(a^2 + b^2 + c^2)$  และ  $(a^3 + b^3 + c^3)$  ซึ่งรายละเอียดดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 3

ตารางภาคผนวกที่ 3 Exclusion formulae สำหรับ 3 อัลลีล ระหว่าง  $(a^2 + b^2 + c^2)$  และ  $(a^3 + b^3 + c^3)$

	$a^2$	$b^2$	$c^2$
$a^3$	$a^5$	$a^3 b^2$	$a^3 c^2$
$b^3$	$b^3 a^2$	$b^5$	$b^3 c^2$
$c^3$	$c^3 a^2$	$c^3 b^2$	$c^5$

ผลรวมของ 9 cells แสดงได้ดังนี้คือ

$$\text{Above-diagonal cells: } \sum_{i>j} p_i^3 p_j^2 = a^3 b^2 + a^3 c^2 + b^3 c^2$$

$$\text{Below-diagonal cells: } \sum_{i>j} p_i^2 p_j^3 = b^3 a^2 + c^3 a^2 + c^3 b^2$$

$$\text{Diagonal cells: } \sum_i p_i^5 = a^5 + b^5 + c^5$$

สูตรสามารถแปลงโดยคำนึงถึงความถี่อัลลีล ( $p_i$ ) ซึ่งจะช่วยให้การคำนวณง่ายขึ้น แสดงได้ดังนี้

$$EP = \sum_{i=1}^n p_i - 2\sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2\sum_{i=1}^n p_i^4 - 3\sum_{i=1}^n p_i^5 - 2\left(\sum_{i=1}^n p_i^2\right)^2 + 3\sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

(Jamieson, 1994)

### ค่า Polymorphic Information Content (PIC) (Guo and Elston 1999)

ค่า PIC สามารถอธิบายโดยคำหนึ่งถึงหลักสำคัญก็คือ transmission informativeness ซึ่งก็คือโอกาสที่อัลลีลจากทั้งพ่อ และแม่จะถูกส่งผ่านไปยังลูก ข้อมูลที่ส่งผ่านของเครื่องหมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สำหรับคู่ พ่อ แม่ ลูก ซึ่งสามารถแสดง  $P(\text{in formative}|\text{trio})$  เป็น 0 หรือ 1 โดยทั่วไปค่า PIC จะอธิบายถึงค่าเฉลี่ยข้อมูลที่ส่งผ่านทั้งหมดสำหรับคู่พ่อ แม่ ลูก นั่นคือ ไม่มีเงื่อนไขที่แน่นอนที่สามารถจะสรุปถึงอัลลีลของพ่อ แม่ ที่ส่งผ่านไปยังลูก ซึ่งค่า PIC สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} PIC &= \sum_{\text{all possible trios of parent and offspring genotypes}} P(\text{trio})P(\text{in formative}|\text{trio}) \\ &= \sum_{\text{mating types}} P(\text{mating type}) \times \sum_{\text{child's genotypes}} P(\text{child's genotype}|\text{mating type})P(\text{in formative}|\text{trio}) \end{aligned}$$

ให้  $I_{it}$  เป็น transmission informativeness สำหรับ พ่อ แม่ ที่  $i$  ( $i=1,2$ ) ในกลุ่ม (trio) ที่  $t$  ( $t=1,2,\dots, n$ ) สมมติให้  $n$  เป็นจำนวนอัลลีลของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง

$$p_i \text{ เป็นความถี่ของอัลลีล } A_i$$

ชนิดของคู่ผสมพันธุ์ จีโนไทป์ของลูก ความถี่ของแต่ละ trio,  $I_{1t}$  และ  $I_{2t}$  ซึ่งรวมอยู่กับ ปริมาณของ  $I_{dt}$  ซึ่งรายละเอียดดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 4 โดยกำหนดให้  $P_i$  สำหรับ พ่อ และ แม่ที่  $i$  ( $i = 1,2$ ) ดังนี้

$$P_i = \sum_{\text{all possible trios}} P(\text{trio})I_{it}, \quad i=1,2.$$

การให้ข้อมูลใน trio สำหรับ พ่อ และ แม่ โดยพ่อ และแม่นั้น ต้องมีจีโนไทป์เป็น heterozygous ซึ่ง พ่อ แม่ และลูกนั้น ต้องไม่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous เหมือนกัน ดังนั้น

$$\begin{aligned} P_1 &= \sum_{\text{all possible trios}} P(\text{trio})I_{1t} \\ &= 1 - P(\text{Parent 1 is homozygous}) - P(\text{both parents and the child have the same heterozygous genotype}) \\ &= 1 - \sum_i p_i^2 - 2 \sum_i \sum_{j>i} p_i^2 p_j^2. \end{aligned}$$

ในทำนองเดียวกันดังนั้น

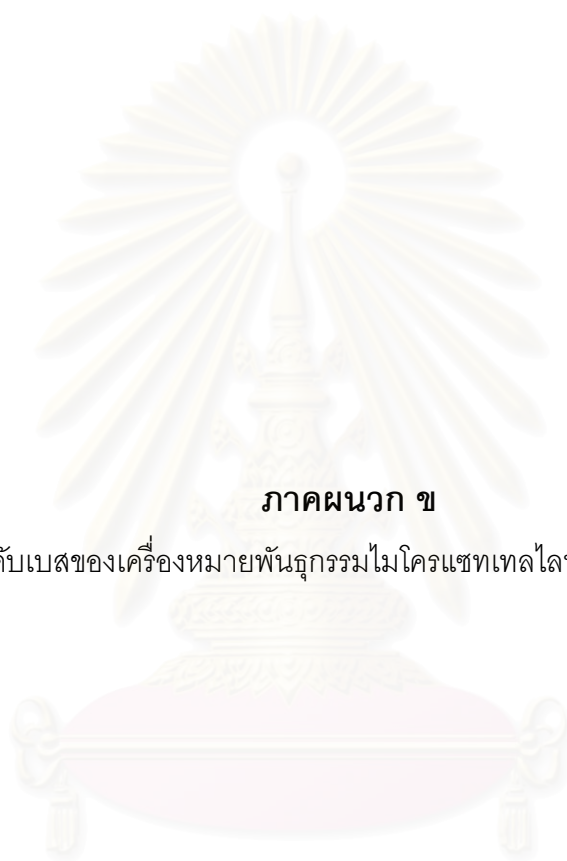
$$P_2 = P_1 = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 = PIC.$$

ตารางภาคผนวกที่ 4 ความถี่ของแต่ละ trio, transmission informativeness ของแต่ละพ่อ แม่ ( $I_{1t}, I_{2t}$ ) และความน่าจะเป็นของการทราบพ่อ และ แม่ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาของอัลลีลลูก ( $I_{dt}$ )

Mating type	Child's genotype	Frequency	$I_{1t}$	$I_{2t}$	$I_{dt}$
$AA_i \times AA_i$	$AA_i$	$p_i^4$	0	0	0
$AA_i \times AA_j$	$AA_j$	$p_i^2 p_j^2$	0	0	1
$AA_i \times AA_j$	$AA_i$	$p_i^3 p_j$	0	1	0
	$AA_j$	$p_i^3 p_j$	0	1	1
$AA_j \times AA_i$	$AA_i$	$p_i^3 p_j$	1	0	0
	$AA_j$	$p_i^3 p_j$	1	0	1
$AA_i \times AA_k$	$AA_j$	$p_i^2 p_j p_k$	0	1	1
	$AA_k$	$p_i^2 p_j p_k$	0	1	1
$AA_k \times AA_i$	$AA_j$	$p_i^2 p_j p_k$	1	0	1
	$AA_k$	$p_i^2 p_j p_k$	1	0	1
$AA_j \times AA_i$	$AA_i$	$p_i^2 p_j^2$	1	1	0
	$AA_j$	$2p_i^2 p_j^2$	0	0	0
	$AA_j$	$p_i^2 p_j^2$	1	1	0
$AA_j \times AA_k$	$AA_i$	$2p_i^2 p_j p_k$	1	1	0
	$AA_j$	$2p_i^2 p_j p_k$	1	1	1
	$AA_k$	$2p_i^2 p_j p_k$	1	1	1
	$AA_k$	$2p_i^2 p_j p_k$	1	1	1
$AA_j \times AA_l$	$AA_i$	$2p_i p_j p_k p_l$	1	1	1
	$AA_j$	$2p_i p_j p_k p_l$	1	1	1
	$AA_k$	$2p_i p_j p_k p_l$	1	1	1
	$AA_l$	$2p_i p_j p_k p_l$	1	1	1

ค่า PIC ที่อธิบายโดย Guo และ Elston (1999) มีค่าเท่ากับค่า PIC ที่ศึกษาโดย Botstein และคณะ (1980) อย่างไรก็ตามค่า PIC ดังกล่าวจะเป็นค่าสำหรับวัดความหลากหลายของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง ซึ่งค่า PIC นี้ขึ้นอยู่กับจำนวนอัลลีล และความถี่อัลลีล ของเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง โดยไม่ขึ้นกับลักษณะที่ทำการศึกษาใด ๆ

ลักษณะทางปริมาณอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับค่า PIC คือ ความน่าจะเป็นของการทราบพ่อ และ แม่ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาของอัลลีลลูก ( $P_d$ ) โดยให้  $I_{dt}$  มีความน่าจะเป็น 0 หรือ 1 ของการทราบพ่อ และ แม่ ซึ่งเป็นแหล่งที่มาของอัลลีลลูกสำหรับ trio ที่  $t$  เมื่อ  $P_d$  สามารถคำนวณได้จาก ตารางภาคผนวกที่ 4 โดยความแตกต่างระหว่าง  $P_d$  และ  $P_1$  เป็น  $(2p_i^2 p_j^2 + p_i^3 p_j + 2p_i^2 p_j p_k) - (p_i^3 p_j + 2p_i^2 p_j^2 + 2p_i^2 p_j p_k) = 0$  เป็นต้น ดังนั้น  $P_d = P_1 = PIC$  นอกจากนี้ค่า PIC ยังเท่ากับความน่าจะเป็นที่แตกต่างกันของแหล่งที่มาของอัลลีลลูก ถ้าทราบอัลลีลของ พ่อ และ แม่ ที่ส่งผ่านไปยังลูก หรือ ถ้าสามารถกำหนดแหล่งที่มาของอัลลีลลูก เมื่อนั้นจะทำให้ความสัมพันธ์ของ IBD สมบูรณ์ขึ้น ค่า PIC ที่สูงจะทำให้ทราบข้อมูลของเครื่องหมายที่ดีกว่า และ มีความน่าจะเป็นที่สูงขึ้นที่จะทำให้ความสัมพันธ์ของ IBD สมบูรณ์ขึ้น ดังนั้นค่า PIC ที่พิสูจน์ในครั้งนี่จึงเป็นเช่นเดียวกับที่อธิบายโดย Botstein และคณะ (1980)



### ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 7 ตำแหน่ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0663 ซึ่งจากการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่ามีคุณสมบัติเป็นไมโครแซทเทลไลท์ การเรียงตัวของลำดับเบสแกนเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ คือ ... $(ATAG)_{11}$ ... ดังภาพภาคผนวกที่ 1

>37\_S0663

```
CCTTCCTGAAGCATTGATATTTCTATATTAGAGAGAGATAGCAACATCATAGACCCTG
TTAAGGACATAACACAGGAGATGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAG
TAGATAGATTGATTGATTTTGTCTTTTAGGGCCACACTTGCAGCATATGGAGGACCCAGC
TAAAAGCCTTTAACTAAATGAAAGACGCCGAAGCCAGGGCGTTCTGTCGCTAAGGCAATG
CAAGCCTCGCATCTCAAGGGTGCACATCTGTAGGTCCAGTGCCTTGCTATTTTTAGAGCA
TATATCATCACTGGCGTGGAAGTGATGAAAATCGCCAAAAACACCTTCTGTGGAGCTGTG
CTATTTTTGCAGAAGTCTACTATAGACCACCCTATTGCTCCGCCAAAAAAGTGTGAGGA
GGGTTGCCCGCCAACATATAGCATACTCTCATGAGTATACTCACGTGACCAAACACTCC
AGCTTACCCCTCGCCCCAAAGACGGGCGACCGTGCACGATTTTTTCTTTCCAGCGTCC
AGAAGGAAGTAGGTATTACTTGTACTAAGTGGAGCGTCGATGTCATGTTGTCTCACCCAC
CCTCTGACACATCAAATCATCTCAGCAGAGAACAGACTGCAAAATGCTCCCTGACATACG
GCCGTTATGTGTACGGCGGGGAAGAGTGATCAGATCAACGTGTAGAGATGGGCTGGTGGC
TGGCCCATCCGAAACTAGCGCCC
```

ภาพภาคผนวกที่ 1 ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0663 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 37

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย









เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0719 ซึ่งจากการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่ามีคุณสมบัติเป็นไมโครแซทเทลไลท์ การเรียงตัวของลำดับเบสแกนเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ คือ ... $(GAA)_5$ ... $(GAAA)_5$ ... ดังภาพภาคผนวกที่ 4

>7\_S0719

```
TTATAGAACGGCTAGGAGAGAAGAAAGAAGAAGAAAAGAAAGAAGGAAGGAAGGAAAGAGG
AAGGAAGGAAAGAAGGAAGGAAGGAAGGAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGGAGGGAGGGAGG
GAGGGAGAGAAAGAAAGGAAGGAAGAGAAAAGAAAGGGAGGAAGAAGAAAGAGGGAGGAAG
AGGAAAGAGAGGGAGGAAGAAAGAAAGAGAGGGAGGGAGGAAGAAAGAAGGAGAGGGAGG
GAGGAAGGAAGAAAAGAAAGAGGGAGGGATGGAGGAAGGAAGGAAGGAACGAACGAACGA
ACTGCCAAACTATTTCCCTAACAGCTGTAGCATACCTTATTTCCCAATAACGATAAATGAG
ATGTTCTATTGCTGTGCATCTTTGACGATGCTGTCAGAATGTTGGATGTTAGCCATTAGA
AGAGTATGGCGAAGTGCATCTTTGACAAATGCTGTCAGAATGTTGGATGTTAGCCATTAAA
AGAGTATGGCGAATTGGGAATCCGTATGCTACAGCTGTTTGGAGAAATAGTTTGGCGTTC
GTTTCGTTTCGTTCCCTTCCTTCCTTCCTTCCTCCCTCTTTCTTTCTTCCTTCCTCCCTC
CCTCTCCCTTCTTTCTTCCTCCCTCCCTCTCTTTCTTTCTCCTCCCTCTCTTCTCTTCCT
CCCTCTTTCTTTCTTCCTCCCTTTCTTTCTTCCTTCCTTCCTTTCTTTCTTCTTCCTCCCTCC
CTCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTCCTTCCTTCCTTCGCTTTTCTCCTCCCTTTTCATCCGTCTCTG
TCTTTCTCTATCTGTCTTCTTCTCCGGGCCGCTCTATGCATGATGCAAGTTCTTGGACTT
GGAGAAAACCT
```

ภาพภาคผนวกที่ 4 ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0719 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 7

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง NLRIP0001 ซึ่งจากการตรวจสอบ ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่ามีคุณสมบัติเป็นไมโครแซทเทลไลท์ การเรียงตัวของลำดับเบส แทนเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ คือ ... $(TTTC)_2CC(TTTC)_{12}ATC(TTTC)_3TAT(CTTT)_2A(TTTC)_2CTT(CCTT)_3CC(TTTC)_3GTT(CTTT)_3...$  ดังภาพภาคผนวกที่ 5

>1\_NLRIP0001

```
GTGGTGAACCTGACTACTTAAATAGCTGCACAGTCATTTCCAATCACCATAGTGCTCCTT
CCTCCCTGATAATTTCTTTTCTTTCTTCCCTTCTTTCCCTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
AAAGCCCACTCATGTCATATGGAATATCCCAAGCTAGGGGTGCGCTTGGAACTACAGCT
GCCAGCCACAGCAATACAGCATCAAAATACATTTTACTCCCCACCAGGCGATGCCGTGT
TGTGGGTTTTCTATTGGAGAACTCTCCAAAGCCGCATGTTAACCTGTTAGGACTTTTT
CTATTCTCAGTTTGAATG
```

ภาพภาคผนวกที่ 5 ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง NLRIP0001 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 1

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0766 ซึ่งจากการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่ามีคุณสมบัติเป็นไมโครแซทเทลไลท์ การเรียงตัวของลำดับเบสแกนเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ คือ  $\dots(GA)_2(GAA)_2(GAAA)_2\dots(CA)_6TACACG(CA)_{16}\dots$  ดังภาพภาคผนวกที่ 6

>20\_S0766

CCATTGACACCATTAAATA GAGAGAAGAAGAAAGAAA GACACCTTCATCCTTTTTTTTCAT  
TCTCTGATCTTTCTACAATGACAGTATATAACCGTGGTAGCCAGTGACAATTAGAAACCT  
GCCATTGAGGGCTGAGAA CACACACACACA TACACG CACACACACACACACACACACAC  
ACACACACA GCATGCTCATATTTTTTCATTCACATATATTTATTGGGTGTTTACAATACA  
CCCTGTCCCTGACTTTTATTGATTTTACTTTCTAGTGGCGGAACCAAATATAAGCAGGGT  
GTCAATATATAAAAAATTTCCACATGGTAAATCCTGTGAAAAAATGACCCTTCAGAAGA  
TATCTGGAGAGACCACAGTGTGGGGAGCCCACCCAGGCCCTGCCCTCCCTCATGAAGTCC  
ACCTCTAATAGGAGATATAAACGCTAGACTACCCTTTAAATAAAAAAACAAATAAAAA  
AAAACCCCTCTTCCCTTTTTTTCTTCTCCAATCTATAAACAGAAACAATTACTAAACATG  
GGACCTTCAAAAAAATACTCCTCCAGGGGGGAAAGAAAAAGTCCCCATCCCCTTTT  
CCTACACAAATGATACCTGAGGGGGTGTAGTTTCAATTTAGAAATTTTTTTGTGTGTACAAA  
CACCCCTCGTCTCTCTTTTTTTGTTTTTTACTTTCCGGGCAGGCACAAGAGACAGGCGGG  
GGTTCTTTTTTAAATCCTTTCCCTGAAAGTCCGGGGAAATAATGATCTTTCCAATCACT  
CTTGAAAAACCCCTGGTGGGGGAGGCCGCCCGCTTCTCCTCTACTAAAATTCTTTTTTTA  
ATAAGAGAGAAATATAAATT

ภาพภาคผนวกที่ 6 ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0766 จากตัวอย่างสุกรเบอร์ 20

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0710 ซึ่งจากการตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากสัตว์ 2 ตัว คือ 1H และ 2H พบว่ามีคุณสมบัติเป็นไมโครแซทเทลไลท์ทั้งสิ้น การเรียงตัวของลำดับเบสแกนเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ คือ ... (TATC)<sub>15</sub>(TG)<sub>2</sub>... (TA)<sub>3</sub>(TATC)<sub>2</sub>(TA)<sub>4</sub>... (TA)<sub>9</sub>... และ ... (TATC)<sub>5</sub>(TG)<sub>2</sub>... (TA)<sub>5</sub>... (TAAA)<sub>4</sub> AAA (TAAA)<sub>3</sub>(TG)<sub>12</sub>... ตามลำดับ แต่เนื่องจากเป็นสัตว์คนละตัวจึงมีชุดซ้ำที่แตกต่างกัน ดังภาพภาคผนวกที่ 7

>16\_1H\_S0710

AACCGCTGGAGGGAGCAGGTTTGATTTCCTGGCCTCATCCACTGGGTTAAGGACCTGGCGT  
TGCTGTGGCTGTGGTGCATGCTGGCAGCTGCAGTCTGATGTGATCCCTAGCCTGGGAAC  
TCCATGTGCCACAGGTGCGGCCCTAAAAATATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT  
TATATATAAAAAACTAT  
GATAGATAAAAAAAAAAAGAAAGAAAA  
AAAAGGGGGGGGGTGGGTGTGTGGGTGTATAAAGGGAAGCAAAGGGGGGGGATGGGAGTGG  
GAGGGCGAGGGCTGGCGTGGGAGTGGGGGGCCGACGTTGCTCGCGTGAAACTAAGTTT  
ATGGGGGTTCTTCCCGAACGATTCAACTCAAGTCTCTTAAGTGCTCTTCGGTGACCGTCT  
AACTCTCTTTTGCTCTATTATCGCCAATCGAGGCAACAGCCCATGAACTAATCGGCCCT  
CACTGACTTGAAAGAACTAGGTAGATATTTCTCCAAGAGACGCGCCCGTCTATCTAGGCCT  
TCTGTCCCCATATCAAAACACATCAAAACAACACTACCACAAAGCGTGCAAAGACTACTC  
TACACATAACCATAACCGATGTATACTGTGTGGCGACCGAGCCCAGCCACAAAACCAGGAA  
ATGCCTGGGCCCTGTGTACCCCTGGGAACCAAGACAGAAAAAAGAACAAGATGACAAAG  
CCCTGCCCCGGCCTTGCCACTTCAGTTGTGCCATTCGGTTCTGTGGCCTCAATTGCATAGC  
GTTTAACTTAAATGTATATGATTTCCTGTAGCTGTTGCTAGCACTGCCGACTCACAACAGC  
CCCAAACCCAA

>64\_2H\_S0710

ATTAAGAGCATGTTTGATTTCCTGGCCTCATCCATTGGGTTAAGGACCTGGCGTTGCTGTG  
GCTGTGGTGCATGCTGGCAGCTGCAGTCTGATGTGATCCCTAGCCTGGGAACCTCCATGT  
GCCACAGGTGCGGCCCTAAAAATATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT  
TGTGTAATATCTAT  
ATAATGAAGTACTATAAAATATAAAATATAGATAGATAAAATAAAATAAAATAAAATAAA  
ATAAAATGTTGT  
GGTAGAAGAAAACAGAGAGGATGGGTTTGGG  
ATTGGGAGCGGGGGCGCCCGGGGGCGGGGGCGGGGTGGTTCCCGCCGGGTGGGGGGCGG  
GGAGGAATCCTGCCGCGCCTGGGTGCCCATCAGGACGGTACCCTCGGAATAACCTCCTTT  
TATCTTCGCCCAACCCGCTCATACCTACCAGGACAAGCCCCACTCGGAATGACTG  
GGCGTCCGCCGGCTCCTAACTCCGACCTCACAGTCCCGCGGAAATTCCTGCCCTCACC  
TGCCCACTGCGTCTGAGAGGTCTTACCTTGAATATTGTAGAGCGCAGCAGAATGTCCAGT

GTATAGTTGAAATTTTTAAATTTTCCACTCACACCAACACCTAACTCGTCACCTAGTCCT  
TACTGGCCTAAGTCAGAACTAGGGAACATAAAATACCCTCACACCCACTCTCCAA  
CGAAATAGCTGACCTTGAGGGCTTAGCATTTTCGTCCCGACCCACCCGCATCTCTCGCTGG  
CCAGACGACCCCGAGTCAAAAACCCACGGAATAGACCAGGCCGCAAGTCGGGAAGCAGTGT  
TTCATTCT

ภาพภาคผนวกที่ 7 ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง S0710 จาก  
ตัวอย่างสุกรเบอร์ 16 (1H) และ 64 (2H)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค

อุปกรณ์ และการจัดเตรียมสารเคมี

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

1. เครื่อง PCR SPRINT (Thermal Cycler) รุ่น GeneAmp PCR system9600 (Perkin Elmer, U.S.A.)
2. เครื่อง Vortex Mixer รุ่น Vortex Genie2 (Scientific Industries, U.S.A.)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น EBA 12 (Hettich, Germany)
4. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น MO-034 (Imarflex, Thailand)
5. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น GeneSys10 series (Spectronic, U.S.A.)
6. เครื่องเขย่า (Bio-shaker) รุ่น PSU-2T plus (Altan, A.S.)
7. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น PK-352 (Denver Instrument, U.S.A.)
8. เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate Stirrer) รุ่น HS-101 (GEM, Thailand)
9. ชุด Gel Electrophoresis ชนิดแนวนอน ประกอบด้วย
  - Power Supply รุ่น Power Pac (Bio-Rad, U.S.A.)
  - Electrophoresis System รุ่น MiniGes (Wealtec, Tiawan)
10. ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล (DOC-Print และ UV) (Vilber Lourmat, France)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) W350 (Mettler, U.S.A.)
12. ตู้แช่เย็น -20 °C รุ่น FZ-189GYN (Mirage, Thailand)

### วัสดุทางวิทยาศาสตร์

1. Automatic Micropipettes รุ่น Pipetman ขนาด P2, P10, P100, P200 และ P1000 (Gilson, France)
2. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
4. Pipette tips ขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร
5. Pipette tips ขนาด 200 ไมโครลิตร
6. Pipette tips ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
7. Parafilm (Parafilm M, U.S.A.)

สารเคมี

1. Agarose gel powder
2. Acrylamide
3. Bis-Acrylamide
4. Blue/Orange
5. dNTP set 4x25  $\mu\text{mol}$  : dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas, USA.)
6. 1,4 Dithiothreitol (DTT;  $\text{HSCH}_2(\text{CHOH})_2\text{CH}_2\text{SH}$ ) (Promega, USA.)
7. Ethylene diaminetetra acetate (EDTA;  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{NA}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma, USA.)
8. Ethanol (96-100 %)
9. Ethidium bromide (Sigma, USA.)
10. Oligonucleotide Primer
11. Glacial Acetic acid
12. Protenase K
13. Tris Base
14. *Taq* DNA polymerase
15. 25 % Ammonium persulfate (Promega, USA.)
16. TEMED ( N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Promega, USA.)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การเตรียมสารเคมีสำหรับ Electrophoresis

### 1. 40 % Acrylamide Mix (19:1) (Euro-lone)

- Acrylamide 190.00 กรัม
  - Bis-Acrylamide 10.00 กรัม
  - H<sub>2</sub>O(sterile) up to 500.00 มิลลิลิตร
- ทำการผสมกันให้ดี โดยเพิ่มอุณหภูมิขณะผสม  
กรอง 0.2 uM  
เก็บในตู้เย็น 4 °C

### 2. 25 % Ammonium persulfate (Promega, USA)

- APS 0.75 กรัม
- dH<sub>2</sub>O 3.00 มิลลิลิตร

เตรียมใหม่ก่อนใช้งานทุกครั้ง

### 3. TEMED ( N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Promega, USA)

### 4. 100 bp. DNA Ladder (Fermentas, USA)

การเตรียม 100 bp. DNA Ladder มีอัตราส่วนดังนี้

- สำหรับ agarose gel อัตราส่วน DNA Ladder: loading dye; 1:4 เมื่อผสมเรียบร้อยแล้ว นำมาใช้ในปริมาตรครั้งละ 2 ไมโครลิตร

- สำหรับ polyacrylamide gel อัตราส่วน DNA Ladder: loading dye; 1:2 เมื่อผสมเรียบร้อยแล้ว นำมาใช้ในปริมาตรครั้งละ 3 ไมโครลิตร

### 5. 50X TAE (Tris-acetate EDTA) Buffer

- Tris base 242.00 กรัม
- Glacial Acetic acid 57.10 มิลลิลิตร
- 0.5 M EDTA 100.00 มิลลิลิตร
- เติม sterile H<sub>2</sub>O จนครบ 1,000.00 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 6. 1X TAE (Tris-acetate EDTA) Buffer

- 50X TAE Buffer	60.00	มิลลิลิตร
- dH <sub>2</sub> O add to	2,940.00	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	3,000.00	มิลลิลิตร

## 7. 10X Loading dye เก็บที่ 20°C (แบ่งมาใช้เก็บที่ 4°C)

- 10 % Bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร
- 10 % Xylene cyanol	0.2	มิลลิลิตร
- 0.5 M EDTA	1.0	มิลลิลิตร
- Tris HCl pH 8.0	1.0	มิลลิลิตร
- 87 % Glycerol	11.5	มิลลิลิตร
- H <sub>2</sub> O	6.1	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	มิลลิลิตร

## 8. Ethidium bromide (ความเข้มข้น 5 mg/ml) (Sigma,USA)

- Ethidium	0.2	กรัม
- H <sub>2</sub> O	40.00	มิลลิลิตร

## 9. 5X TBE (Tris-borate EDTA) Buffer

- Tris base	53.90	กรัม
- Boric acid	27.50	กรัม
- EDTA (pH 8.3)	3.70	กรัม

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป autoclave

การเตรียมสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อสุกร

Buffer X2 ประกอบด้วยสารเคมี ดังนี้

1. 20 mM Tris.Cl, pH 8.0
2. 20 mM EDTA
3. 200 mM NaCl
4. 4 % SDS
5. 80 mM DTT (dithiothreitol) \*เตรียมก่อนใช้งานทันที
6. 12.5  $\mu$ l/ml QIAGEN<sup>®</sup> proteinase K \*นำออกมาจากช่องแช่แข็ง แล้วรอให้ละลาย

การเตรียมสารละลาย Buffer X2 ในปริมาตรต่าง ๆ เพื่อสะดวกแก่การใช้งาน ดังตาราง ภาคผนวกที่ 5 และเมื่อเตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วดูสูตรละลาย Buffer X2 ปริมาตร 200  $\mu$ l. สำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อ

**ตารางภาคผนวกที่ 5** การเตรียมสารละลาย Buffer X2 ในปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร หรือ 0.625 มิลลิลิตร

สารเคมี	เตรียมในปริมาตร	
	1.25 ml.	0.625 ml.
1. 20 mM Tris.Cl, pH 8.0	25 $\mu$ l.	12.5 $\mu$ l.
2. 20 mM EDTA	50 $\mu$ l.	25 $\mu$ l.
3. 200 mM NaCl	250 $\mu$ l.	125 $\mu$ l.
4. 4 % SDS	500 $\mu$ l.	250 $\mu$ l.
5. 80 mM DTT	100 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.
6. 12.5 $\mu$ l/ml QIAGEN <sup>®</sup> proteinase K	15.625 $\mu$ l.	7.8125 $\mu$ l.

ตารางภาคผนวกที่ 6 รายละเอียดข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากห้องปฏิบัติการ และข้อมูลของบันทึก  
พันธุ์ประวัติจากตัวอย่างสุกรที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 80 ตัวอย่าง

No. Sample	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710	เพศ	เบอร์แม่	เบอร์พ่อ	ฟาร์มที่เก็บ
1.	FF	DE	CD	DE	AF	AC	AC	ผู้	7751	1	ราชบุรี 1
2.	EH	AD	BC	AE	BE	CD	AB	เมีย	7752	2	ราชบุรี 1
3.	AA	AE	CD	AB	AB	BC	AE	ผู้	7753	3	ราชบุรี 1
4.	CG	CE	EF	EE	CD	AC	AE	เมีย	7754	4	ราชบุรี 1
5.	CG	AC	AE	CC	CC	AC	AE	ผู้	7755	5	ราชบุรี 1
6.	CG	EE	EE	CC	BB	AC	EE	เมีย	7756	6	ราชบุรี 1
7.	EH	BF	EF	BB	AB	BC	AA	ผู้	7757	7	ราชบุรี 1
8.	DG	DE	CD	BB	AC	AB	AA	เมีย	7758	8	ราชบุรี 1
9.	BB	BD	EG	AA	AD	AC	AA	เมีย	7759	9	ราชบุรี 1
10.	DG	CC	EF	BB	AB	AC	AA	ผู้	7760	10	ราชบุรี 1
11.	DG	CC	EF	BB	AB	AC	AA	เมีย	7761	11	ราชบุรี 1
12.	DG	BC	FG	BB	AC	AC	AE	ผู้	7762	12	ราชบุรี 1
13.	DD	CD	EF	AA	AA	AC	AE	ผู้	7763	13	ราชบุรี 1
14.	DD	DE	EF	AA	AB	AC	BE	เมีย	7764	14	ราชบุรี 1
15.	GH	EE	DD	BB	AB	AC	AE	ผู้	7765	15	ราชบุรี 1
16.	GH	EE	DD	BC	AA	AC	EF	เมีย	7766	16	ราชบุรี 1
17.	DG	DF	EF	AA	AF	AB	AA	เมีย	7767	17	ราชบุรี 1
18.	DD	AB	EF	AB	AF	BC	AA	ผู้	7768	18	ราชบุรี 1
19.	DH	AD	AF	BB	AA	BC	AA	เมีย	7769	19	ราชบุรี 1
20.	DG	AE	EF	BC	AA	CD	AE	ผู้	7770	20	ราชบุรี 1
21.	AD	BD	EF	BB	AE	AC	AC	เมีย	1352	35	ราชบุรี 2
22.	GH	BE	AE	AA	AB	AB	AA	เมีย	153	24	ราชบุรี 2
23.	AD	BD	EE	BB	BE	AC	AA	เมีย	216	14	ราชบุรี 2

No. Sample	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710	เพศ	เบคทีเรีย	เบคทีเรีย	ฟาร์มที่เก็บ
24.	GH	BE	AE	AA	BB	AB	AA	เมีย	234	23	ราชบุรี 2
25.	AG	BC	FG	AA	BE	AC	AC	เมีย	321	53	ราชบุรี 2
26.	DG	BD	EF	AC	AC	AC	AE	เมีย	132	42	ราชบุรี 2
27.	FF	CD	AG	AA	AB	AC	AA	เมีย	012723	164741	ชัยนาท
28.	AA	FF	EF	EE	DF	AC	AA	ผู้	11293	Netto	ชัยนาท
29.	AF	AC	AE	CD	AC	AC	AC	ผู้	5095	KrollQ	ชัยนาท
30.	EE	AF	CD	EE	CC	AC	AC	ผู้	3933	173297	ชัยนาท
31.	DG	DE	AE	DD	AA	AC	AE	ผู้	3426	Hansen	ชัยนาท
32.	AG	DD	AE	BC	AB	AC	AE	ผู้	3139	Paka	ชัยนาท
33.	AE	CE	FG	BC	EE	AC	AD	ผู้	1018	Jepp	ชัยนาท
34.	EE	AE	BC	AB	EE	AC	AB	ผู้	10054	Top	ชัยนาท
35.	FF	CD	AE	EE	AC	AC	AC	ผู้	3096	Dena	ชัยนาท
36.	AC	FF	AC	DD	AB	AC	AC	เมีย	20031	Dodo	ชัยนาท
37.	AA	FF	AB	CC	BB	AC	AC	ผู้	20036	Proffen	ชัยนาท
38.	EH	AD	AA	BB	CC	CD	AF	เมีย	20140	Rape	ชัยนาท
39.	AA	FF	AE	BB	AC	BC	AE	ผู้	20021	Issue	ชัยนาท
40.	AA	CD	EF	BB	AC	CD	AD	เมีย	300670	158063	ชัยนาท
41.	AA	DF	EF	EE	AC	AC	AA	เมีย (ลูก)	20002	Almond	ชัยนาท
42.	AA	EF	EF	CE	AC	AC	AA	ผู้ (ลูก)	20002	Almond	ชัยนาท
43.	AA	CF	EF	CE	AC	AC	AA	เมีย (แม่)	300352	471113	ชัยนาท
44.	AA	DE	EE	EE	AC	AC	AC	ผู้ (พ่อ)	018590	164106	ชัยนาท
45.	AA	FF	EF	BE	AA	AC	AE	เมีย (ลูก)	12358	Hagis	ชัยนาท
46.	AD	CF	AB	EE	AC	AC	AA	ผู้ (ลูก)	12358	Hagis	ชัยนาท
47.	AA	CF	AF	EE	AC	AC	AE	เมีย (แม่)	011634	176287	ชัยนาท
48.	AD	EF	BE	BE	AA	CD	AA	ผู้ (พ่อ)	018824	177267	ชัยนาท

No. Sample	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710	เพศ	เบคทีเรีย	เบคทีเรีย	ฟาร์มที่เก็บ
49.	AE	AF	CE	BB	AA	CD	AD	ผู้ (ลูก)	3132	Fenn	ชัยนาท
50.	AH	DF	CE	BB	AC	AC	AA	ผู้ (ลูก)	3132	Fenn	ชัยนาท
51.	AA	FF	EF	BB	AA	CD	AD	เมีย (แม่)	013339	172951	ชัยนาท
52.	EH	AD	CD	BB	AC	AC	AA	ผู้ (พ่อ)	015423	168701	ชัยนาท
53.	FF	EF	AE	EE	AB	BC	AA	เมีย (ลูก)	3565	Kold	ชัยนาท
54.	FF	EF	BE	EE	AB	BC	AE	ผู้ (ลูก)	3565	Kold	ชัยนาท
55.	FF	CE	AB	EE	AA	CD	AE	เมีย (แม่)	017028	162749	ชัยนาท
56.	FF	FF	EE	EE	BB	BC	AA	ผู้ (พ่อ)	031385	173867	ชัยนาท
57.	AG	FF	BF	EE	AB	AC	AA	เมีย (ลูก)	3198	Furos	ชัยนาท
58.	AG	DF	BE	EE	AF	AC	AD	ผู้ (ลูก)	3198	Furos	ชัยนาท
59.	AG	CF	EF	EE	AA	AC	AD	เมีย (แม่)	011313	174742	ชัยนาท
60.	GG	DF	BE	EE	BF	AC	AA	ผู้ (พ่อ)	025178	165411	ชัยนาท
61.	EE	DD	FG	CC	CF	AC	AB	เมีย (ลูก)	1941	Jarp	ชัยนาท
62.	BE	DD	FG	AC	EF	AC	AC	เมีย (ลูก)	1941	Jarp	ชัยนาท
63.	BE	DD	EF	AC	EF	AC	AC	เมีย (แม่)	000021	173288	ชัยนาท
64.	BE	DD	FG	CC	CE	AC	AB	ผู้ (พ่อ)	09280	168577	ชัยนาท
65.	AA	CC	AE	EE	BB	CD	AD	ผู้ (ลูก)	3316	Logan	ชัยนาท
66.	AG	CC	AE	EE	BB	AC	DD	เมีย (ลูก)	3316	Logan	ชัยนาท
67.	AG	CE	AE	CE	BC	CD	AD	เมีย (แม่)	020024	172951	ชัยนาท
68.	AG	CE	AB	BE	BE	AC	AD	ผู้ (พ่อ)	019735	168295	ชัยนาท
69.	CE	AF	AC	BB	AA	BC	AD	ผู้ (ลูก)	3109	Fenn	ชัยนาท
70.	AE	DD	AC	BB	AC	BC	AD	ผู้ (ลูก)	3109	Fenn	ชัยนาท
71.	AC	DF	AA	BD	AA	AB	AD	เมีย (แม่)	016241	168342	ชัยนาท
72.	EH	AD	CD	BB	AC	AC	AA	ผู้ (พ่อ)	015423	168701	ชัยนาท



No. Sample	S0663	D00768	KVL9000	S0719	NLRIP0001	S0766	S0710	เพศ	เบอร์ดรีแม่	เบอร์ดรีพ่อ	ฟาร์มที่เก็บ
72.	BH	CD	EE	BE	CF	AC	AA	ผู้ (ลูก)	50	AIDL	ศูนย์ฝึก นรฐ
73.	CH	CD	EF	CE	AC	AC	AC	ผู้ (ลูก)	50	AIDL	ศูนย์ฝึก นรฐ
74.	GH	CD	EF	BC	AF	AC	AC	เมีย (แม่)	0442	AIDL745	ศูนย์ฝึก นรฐ
75.	BC	DD	EF	BE	CC	AC	AA	ผู้ (พ่อ)	-	-	ศูนย์ฝึก นรฐ
76.	BG	CD	CF	BB	AC	AC	AB	ผู้ (ลูก)	69	AIDL	ศูนย์ฝึก นรฐ
77.	BG	BD	CF	BB	AC	AC	AA	ผู้ (ลูก)	69	AIDL	ศูนย์ฝึก นรฐ
78.	GG	BC	CE	AB	AD	AC	AB	เมีย (แม่)	0440	AIDL745	ศูนย์ฝึก นรฐ
79.	AC	CE	AE	EE	AC	CD	AE	เมีย (ลูก)	46488	Geo	ชัยนาท
80.	AF	CC	AB	AE	AA	CD	AA	ผู้ (พ่อ)	017642	170515	ชัยนาท

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว วันวิสาข์ แยมมีกลิ่น เกิดวันที่ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2527 ที่เขตหนองแขม อำเภอนองแขม จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวศาสตร์ และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปีการศึกษา 2548 จากนั้น เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย