

ความหลากหลายของจีนแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมไทย

ศิริลักษณ์ เตชะนรราช¹ ชาตรี คติวรเวช¹ มีนา สาริกะภูติ²
อยุธยา หรินทรานนท์³ ดวงสมร สุวัทนา^{1*}

Abstract

Sirilux Techanoraraj¹ Chatree Khatiworavage¹ Meena Sarikaputi² Ayuth Harintaranont³ Duangsmorn Suwattana^{1*}

POLYMORPHISM OF THE KAPPA-CASEIN GENE IN DAIRY SIRES IN THAILAND

Fifteen purebred (Holstein-Friesian) sires and 45 crossbred (75% up-grade Holstein-Friesian) sires from the Division of Artificial Insemination (AI), Department of Livestock Development were genotyped for the kappa-casein gene by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The allele A, B and E were found and the allelic frequencies were 0.6, 0.33 and 0.07 in the purebred sires and 0.74, 0.17 and 0.09 in the crossbred sires. The genotypes composed of AA, AB, BB, AE and BE and the genotypic frequencies were 0.34, 0.4, 0.13, 0.13 and 0 in the purebred sires and 0.56, 0.27, 0, 0.11 and 0.06 in the crossbred sires. The Kappa-casein genotype “EE” was not found in this study. The differentiation for allelic and genotypic frequencies between the purebred and the crossbred sires was not significant. Various alleles of the kappa-casein gene and their ratio were revealed. The allele “B” found in this herd will be useful for a sire selection program in the future.

Keywords : kappa-casein, genotype, dairy sires, PCR-RFLP

¹Department of Animal Husbandry, ²Department of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Prathumwan, Bangkok 10330

³Division of Artificial Insemination (AI), Department of Livestock Development, Prathumwan, Bangkok 10330

*Corresponding author

¹ภาควิชาสัตวบาล ²ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

³กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

ศิริลักษณ์ เตะชนรรราช¹ ชาตรี คติวรเวช¹ มินา สาริกะภูติ² อยุทธิ์ หรินทรานนท์³ ดวงสมร สุวัทนา^{1*}

ความหลากหลายของจีนแคปปา-เคซีนในพ่อพันธุ์โคนมไทย

การตรวจหาความหลากหลายของจีนแคปปา-เคซีน ซึ่งเป็นจีนที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง โดยใช้ น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์จำนวน 60 ตัว แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ Holstein-Friesian จำนวน 15 ตัว และกลุ่มพ่อโคลูกผสมที่มีสายเลือดของพันธุ์ Holstein-Friesian ในระดับเลือดร้อยละ 75 ขึ้นไป จำนวน 45 ตัว ทำการตรวจสอบโดยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ผลการศึกษาสามารถตรวจพบจีนแคปปา-เคซีนทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ A, B และ E ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ได้แก่ 0.6, 0.33 และ 0.07 และในกลุ่มพ่อโคลูกผสมได้แก่ 0.74, 0.17 และ 0.09 ตามลำดับ ตรวจพบจีโนไทป์ทั้งสิ้น 5 แบบคือ AA, AB, BB, AE และ BE โดยมีค่าความถี่จีโนไทป์ในกลุ่มพ่อโคพันธุ์แท้ คือ 0.34, 0.4, 0.13, 0.13 และ 0 และในกลุ่มพ่อโคลูกผสมคือ 0.56, 0.27, 0, 0.11 และ 0.06 ตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบจีโนไทป์ EE เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ในพ่อโคทั้งสองกลุ่มพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษานี้ทำให้ทราบชนิดและสัดส่วนของอัลลีลต่างๆ ของจีนแคปปา-เคซีนในฝูงพ่อพันธุ์โคนม การพบอัลลีล B ในฝูงโคจะเป็นประโยชน์ในการนำไปจัดทำแผนการคัดเลือกพ่อพันธุ์โคนมตามเป้าหมายเฉพาะได้ต่อไป

คำสำคัญ : แคปปา-เคซีน จีโนไทป์ พ่อพันธุ์โคนม พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

บทนำ

แคปปา-เคซีน (κ-casein) เป็นองค์ประกอบของโปรตีนชนิดหนึ่งในน้ำนมในสัดส่วนประมาณร้อยละ 8-15 ของโปรตีนทั้งหมด (Rincon et al., 1982) แม้จะพบอยู่ในสัดส่วนที่น้อย แต่เป็นโปรตีนชนิดเดียวที่สามารถรวมตัวกับน้ำ ทำให้องค์ประกอบโปรตีนแขวนลอยอยู่ในน้ำนมในรูปของไมเซลล์ได้ ปริมาณแคปปา-เคซีนเป็นลักษณะทางคุณภาพ คือควบคุมโดยจีนเพียงตำแหน่งเดียว (single locus) โดยชนิดของอัลลีลของจีนแคปปา-เคซีนที่แตกต่างกันจะมีอิทธิพลต่อปริมาณแคปปา-เคซีนในน้ำนมและส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในน้ำนม (Eenennaam and Medrano, 1991; Lin et al., 1989) โดยพบว่า น้ำนมที่ได้จากโคที่มีแคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB เมื่อนำมาผ่านกระบวนการทำเนยแข็งจะได้เนยแข็งที่มีเนื้อแน่นเนียนและให้ปริมาณเนยแข็งมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเนยแข็งที่ทำจากน้ำนมของโคที่มีจีโนไทป์ของแคปปา-เคซีน AB และ AA ตามลำดับ (FitzGerald, 1997) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณแคปปา-เคซีนเป็นตัวกำหนดขนาดของไมเซลล์ แคปปา-เคซีนจีโนไทป์ BB ซึ่งให้ปริมาณของแคปปา-เคซีนมากกว่าจีโนไทป์ AB และ AA

ตามลำดับ จะทำให้ขนาดของไมเซลล์มีขนาดเล็กกว่าไมเซลล์ที่ได้จากจีโนไทป์อื่นๆ เมื่อผ่านขบวนการทำเนยแข็งทำให้ช่องว่างระหว่างเนื้อเนยแข็งเกิดน้อยลง เนื้อเนยแข็งจึงมีความเนียนมากขึ้น ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาด (Aleandri et al., 1990; Bobe et al., 1999; Eenennaam and Medrano, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าแคปปา-เคซีนชนิด B มีผลต่อการคงทนต่อความร้อน เนื่องจากไมเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะทนต่อความร้อนได้มากขึ้น เพราะการยึดเกาะกันของเคซีนดีขึ้น ทำให้ความร้อนหรือแรงที่จะทำให้ทำลายพันธะในไมเซลล์ขนาดเล็กต้องใช้มากกว่าในการทำลายพันธะในไมเซลล์ขนาดใหญ่ ดังนั้นน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่มีจีโนไทป์ BB เมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปน้ำนมแล้วจะให้ปริมาณเคซีนมากกว่าน้ำนมที่ได้จากแม่โคที่มีจีโนไทป์ AB และ AA ตามลำดับ (FitzGerald, 1997) อัลลีลชนิดต่างๆ ของแคปปา-เคซีนที่พบในโคมีรายงานไว้ 6 ชนิด (Braunschweig, 1998) ตามความแตกต่างของกรดอะมิโนบนสายของโปรตีน ได้แก่ A, B, C (เป็นตัวเดียวกับชนิด D), E, F และ G (Miranda et al., 1993; Prinzenberg et al., 1996) การแบ่งแคปปา-เคซีนออกเป็นหลายชนิดพิจารณาจากความแตกต่างของลำดับเบสในตำแหน่งต่างๆ ของ exon

ที่ 4 บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ซึ่งมีลักษณะเป็น single nucleotide polymorphism (SNP) และพบว่าแคปป์-เคซินทุกชนิดผันแปรมาจากแคปป์-เคซินชนิด A ทั้งสิ้น โดยการกระจายตัวของแคปป์-เคซินแต่ละชนิดแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของโค แคปป์-เคซินชนิด A และ B พบได้ในโคทุกสายพันธุ์ในความถี่ที่แตกต่างกันไป เช่น โคพันธุ์ Holstein-Friesian พบความถี่อัลลีลชนิด A ระหว่าง 0.74-0.82 และความถี่อัลลีลชนิด B ระหว่าง 0.18-0.27 ส่วนโคสายพันธุ์ Zebu (*Bos indicus*) พบความถี่อัลลีล A ระหว่าง 0.67-0.69 และมีความถี่อัลลีลชนิด B ระหว่าง 0.31-0.33 โคพันธุ์ Jersey, Brown Swiss และ Austrian-Brown มีความถี่อัลลีลชนิด A ระหว่าง 0.14-0.40 และความถี่อัลลีลชนิด B ระหว่าง 0.59-0.86 เป็นต้น ส่วนอัลลีลชนิดอื่นๆ พบได้น้อยและพบในบางสายพันธุ์เท่านั้น เช่นแคปป์-เคซินชนิด C พบในพันธุ์ Austrian-Simmental, Austrian-Brown และ Limpurger แคปป์-เคซินชนิด E พบในพันธุ์ Prizgauer และ Limpurger แคปป์-เคซินชนิด F พบในพันธุ์ Finnish Ayrshire และแคปป์-เคซินชนิด G พบในพันธุ์ Pinzgauer โดยมีความถี่อัลลีลที่ต่ำมากคือ 0.001-0.003 เท่านั้น (Erhardt, 1996; Lara et al., 2002)

ปริมาณแคปป์-เคซินถูกควบคุมโดยจีนแคปป์-เคซิน ดังนั้นจึงสามารถใช้จีนแคปป์-เคซินเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ในการปรับปรุงลักษณะทางด้านปริมาณและคุณภาพของโปรตีนในน้ำนมได้ โดยสามารถคัดเลือกพันธุกรรมที่ต้องการได้ตั้งแต่ตัวอ่อนยังน้อย อีกทั้งมีความแม่นยำสูง ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการปรับปรุงพันธุ์ ปัจจุบันการตรวจหาชนิดของจีนแคปป์-เคซินในระดับดีเอ็นเอนิยมใช้วิธี Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Barroso et al., 1998; Braunschweig, 1998; Cowan et al., 1992) วัตถุประสงค์ของรายงานนี้เพื่อ ตรวจสอบความหลากหลายตรวจหาชนิดและจีโนไทป์ของแคปป์-เคซินในพ่พันธุ์โคนมไทยที่ใช้ในการผสมเทียมให้แก่เกษตรกรทั่วไป และเพื่อตรวจหาสัดส่วนของจีนแคปป์-เคซินชนิด B ที่จะสามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงลักษณะพึงประสงค์เฉพาะทางในฝูงโคนมในอนาคตได้ และเพื่อพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาจีนแคปป์-เคซินของโคนมในประเทศไทย

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่พันธุ์โคนมจำนวน 60 ตัว จากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่พันธุ์โคนมของกองผสมเทียมกรมปศุสัตว์ เป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผลิตในระหว่างปี 2542-2544 ประกอบด้วยพ่พันธุ์โคนมพันธุ์ Holstein-Friesian และพ่พันธุ์โคนมที่มีสายเลือดของพันธุ์ Holstein Friesian ในระดับต่างๆ (ตารางที่ 1)

วิธีการ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็ง (ดัดแปลงจาก Ng-Kwai-Hang et al., 1990) โดยการนำน้ำเชื้อจากหลอดบรรจุปริมาณ 250 ไมโครลิตร (โดยประมาณ) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เติมน้ำ 0.11M sodium citrate ปริมาณ 1.0 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 19,000 g เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายทิ้ง แล้วทำซ้ำ 3 รอบ จากนั้นดูดสารละลายทิ้งแล้วเติมน้ำ 200mM NaOH/50mM DTT (1,4 Dithiothreitol) ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นทำให้เย็นลงโดยวางบนน้ำแข็งประมาณ 20 นาที แล้วเติมน้ำ 200mM HCl/100mM Tris-HCl ปริมาณ 250 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C. นำสารบางส่วนมาหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของจีนแคปป์-เคซินบริเวณ exon ที่ 4 ซึ่งครอบคลุมส่วนของเบสที่แตกต่างกันของแคปป์-เคซินชนิดต่างๆ โดยปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยามีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 200 ไมโครกรัม/มล. ส่วนปฏิกิริยา PCR มีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ คือ ส่วนผสมของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Template) ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างปริมาณ 1-3 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.4 (M จำนวน 2 ชุด ได้แก่ KCN1F (5'-ATC ATT TAT GGC CAT TCC ACC AAA G-3') และ KCN1R (5'-GCC CAT TTC GCC TTC TCT GTA ACA GA-3') หรือ KP1 (5'-AAG AAA TAA TAC CAT TCT GCA TAA TTT ATT TTT TTA CAG-3') และ KP2 (5'-GGC TGT TAT TCA TTT TGC CTT ATT TAC CTG-3'), 200 mM dNTP (Deoxynucleotide triphosphate), 10xREDTaq PCR Reaction Buffer (Sigma) 1 เท่า, 1.5 mM MgCl₂ และ REDTaq DNA polymerase (Sigma) 0.5 Units/ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25

ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง thermal cycler รอบแรก (initial denaturation) ใช้อุณหภูมิที่ 95°C. เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยา PCR 35 รอบดังนี้คือ denature ที่ 95°C. เป็นเวลา 30 วินาที anneal ที่ 56°C. เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72°C. เป็นเวลา 1 นาที จบด้วยรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°C. เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำการตรวจสอบลำดับเบส (DNA sequencing) และนำไปทำการจำแนกชนิดของแคปป์-เคซินด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzymes) 5 ชนิด ได้แก่ *HindIII*, *HinfI*, *HaeIII*, *HpyCH4 IV* (เป็น isoschizomer ของ *MaeII*) และ *HhaI* โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ความเข้มข้นประมาณ 200 ไมโครกรัม/มล. และเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 Units เติมน้ำจนได้ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 3 ชม. หรือทิ้งไว้ข้ามคืน การตรวจหาชนิดของจีนแคปป์-เคซินโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (รูปที่ 1) แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ KCN1F และ KCN1R มีขนาด 351 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *HinfI* จะสามารถแยกแคปป์-เคซินชนิดต่างๆ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของแคปป์-เคซินชนิด B และ C และกลุ่มที่ 2 ได้แก่แคปป์-เคซินชนิด A, E, F และ G

ขั้นตอนที่ 2 เมื่อทำการแยกกลุ่มได้แล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เพื่อทำการแยกแคปป์-เคซินชนิด C ออกจาก B และแยกแคปป์-เคซินชนิด E, F และ G ออกจากชนิด A ดังนี้ การตรวจหาแคปป์-เคซินชนิด E จะทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ KCN1F และ KCN1R ขนาด 351 คู่เบสด้วยเอนไซม์ *HaeIII* ในการตรวจหาแคปป์-เคซินชนิด C และชนิด G จะทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 583 คู่เบสที่ได้จากไพรเมอร์ KP1 และ KP2 ด้วยเอนไซม์ *HpyCH4 IV* (*MaeII*) และในการตรวจหาแคปป์-เคซินชนิด F จะทำการตัดผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 583 คู่เบสที่ได้จากไพรเมอร์ KP1 และ KP2 ด้วยเอนไซม์ *HhaI*

นำผลการวิเคราะห์ไปทำการคำนวณหาค่าความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์โดยวิธี chi-square test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบางส่วนได้นำไปทำการตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) เพื่อยืนยันชนิดของดีเอ็นเอ

ผล

จากการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่ามีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 170-645 ไมโครกรัม/มล. โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 290.29 ไมโครกรัม/มล. และมีค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} เฉลี่ยที่ 1.514 ซึ่งสามารถนำไปตรวจหาจีนแคปป์-เคซินได้ดี เนื่องจากว่าจีนส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่ำกว่า 100 คู่เบส จะเห็นแถบดีเอ็นเอได้ไม่ชัดเจน การอ่านผลจึงพิจารณาขนาดดีเอ็นเอที่มากกว่า 100 คู่เบสขึ้นไป สำหรับผลการตรวจลำดับเบสของจีนส่วนดีเอ็นเอที่ผลิตได้ มีลำดับเบสตรงกับจีนแคปป์-เคซินครอบครัวบริเวณ exon 4 ตามต้องการ

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ KCN1F-KCN1R มีขนาดประมาณ 351 คู่เบส เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆ ได้ผลดังนี้

จากตัวอย่างที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 219 และ 132 คู่เบส (รูปที่ 2: ช่อง 9) และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* พบแถบดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาดประมาณ 266 คู่เบส แสดงว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างนี้มีอัลลีลแบบ B และ/หรือ C (รูปที่ 2: ช่องที่ 10) ส่วนตัวอย่างที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* พบแถบดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาดประมาณ 351 คู่เบส (รูปที่ 2: ช่อง 6) และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 132-134 คู่เบส แสดงว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างนี้มีอัลลีลแบบ A, E, F และ/หรือ G (รูปที่ 2: ช่องที่ 7) นอกจากนี้พบว่า ตัวอย่างที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* พบแถบดีเอ็นเอ 3 ชิ้นขนาดประมาณ 351, 219 และ 132 คู่เบส (รูปที่ 2: ช่อง 3) และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 266 และ 132-134 คู่เบส แสดงว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างนี้มีอัลลีลทั้งแบบกลุ่ม A และกลุ่ม B (รูปที่ 2: ช่องที่ 4)

เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 184 และ 156 คู่เบส แสดงว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างนี้มีอัลลีลแบบ E ส่วนอัลลีลแบบอื่นๆ เอนไซม์ *HaeIII* จะไม่สามารถตัดได้ จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบบางตัวอย่างมีอัลลีลแบบ E อยู่ร่วมกับอัลลีลอื่นๆ ทำให้พบแถบดีเอ็นเอ 3 แถบขนาดประมาณ 351, 184 และ 156 คู่เบส (รูปที่ 3: ช่อง 5)

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ KP1-KP2 มีขนาดประมาณ 583 คู่เบส เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ต่างๆ ได้ผลดังนี้

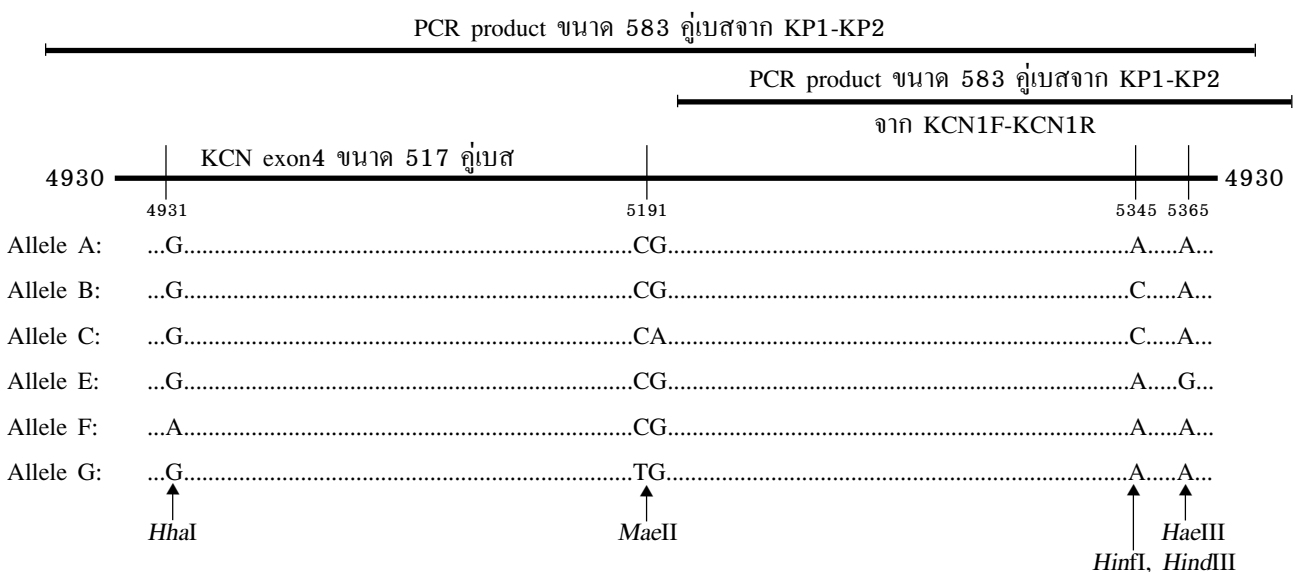
เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HpyCH4 IV* (*MaeII*) พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 300 และ 283 คู่เบส (รูปที่ 4: ช่อง 1) แสดงว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างไม่มีอัลลีลแบบ C และ/

หรือ G จากผลการศึกษานี้พบตัวอย่างทั้งหมดสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *HpyCH4 IV* (*MaeII*)

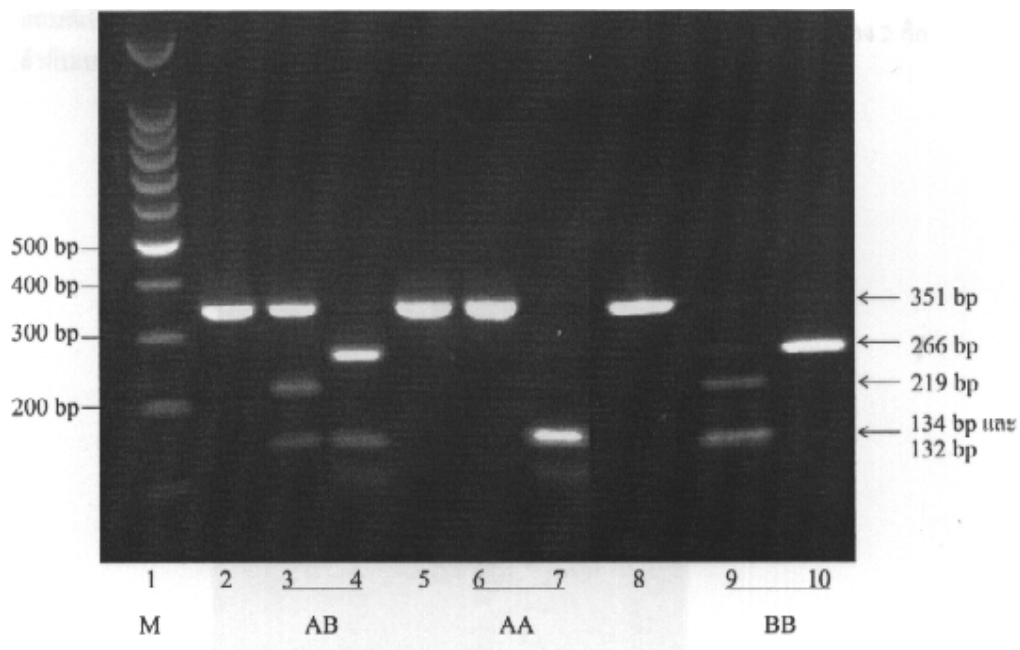
เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HhaI* พบแถบดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาดประมาณ 542 คู่เบส (รูปที่ 5: ช่อง 3) แสดงว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างไม่มีอัลลีลแบบ F จากผลการศึกษานี้พบตัวอย่างทั้งหมดสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *HhaI*

สามารถสรุปผลจีโนไทป์ของจีนแคปปา-เคซีนในตัวอย่างทั้งหมดได้ดังนี้ ตรวจพบแคปปา-เคซีนชนิดต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ A, B และ E (ตารางที่ 2) ซึ่งพบว่าอัลลีล A เป็นอัลลีลที่พบมากที่สุด (0.71; จากโค 85/120 ตัว) ตามด้วยอัลลีล B (0.21; จากโค 25/120 ตัว) และอัลลีล E (0.8; จากโค 10/120 ตัว) ตามลำดับ รูปแบบของจีโนไทป์พบได้ 5

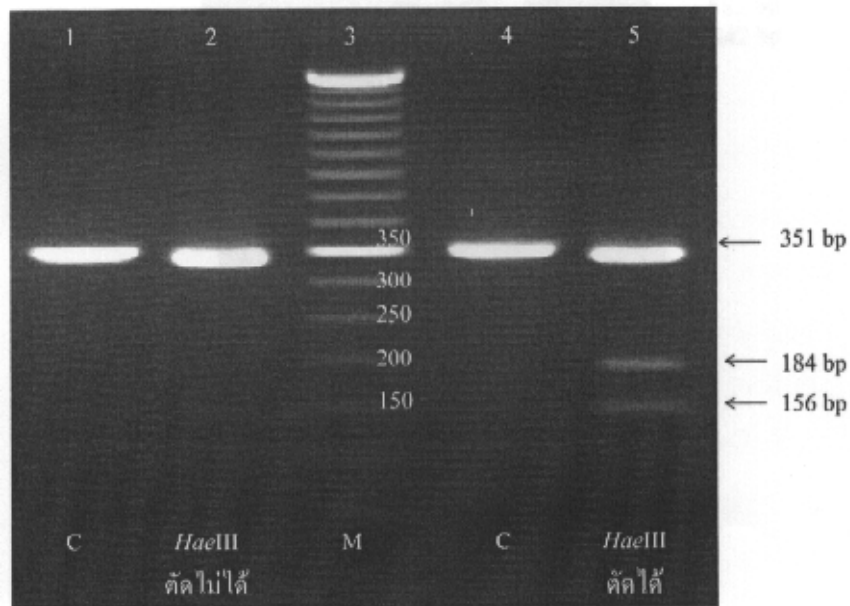
รูปที่ 1 แสดงขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR จากไพรเมอร์ KP1-KP2 และ KCN1F-KCN1R เปรียบเทียบกับแคปปา-เคซีน Exon 4 ในตำแหน่งต่างๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงของเบสและบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ



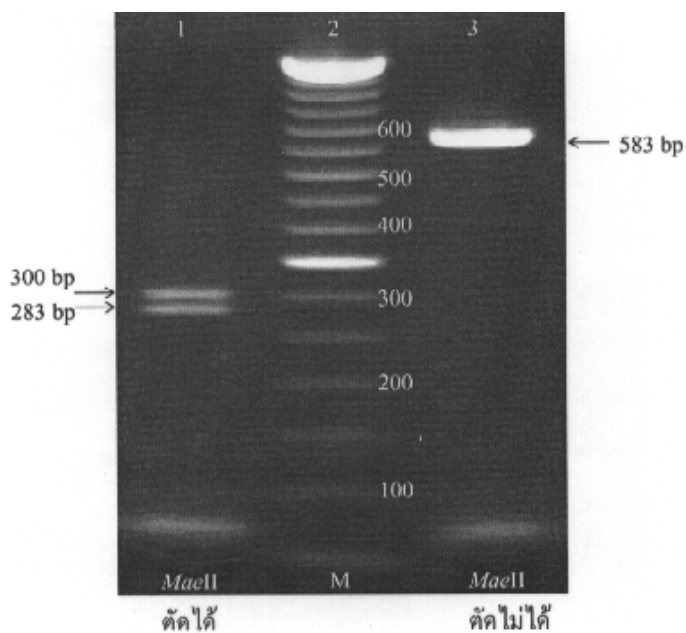
รูปที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *HinfI* ตามลำดับ โดยช่อง 3-4 เป็นตัวอย่างที่มีอัลลีลแบบ AB; ช่อง 6-7 เป็นตัวอย่างที่มีอัลลีลแบบ AA และช่อง 9-10 เป็นตัวอย่างที่มีอัลลีลแบบ BB ส่วนช่อง 2, 5 และ 8 เป็นตัวควบคุม (ไม่ได้ใส่เอนไซม์) และช่อง 1 เป็นลำดับเบสมาตรฐาน (M) ขนาด 100 คู่เบส



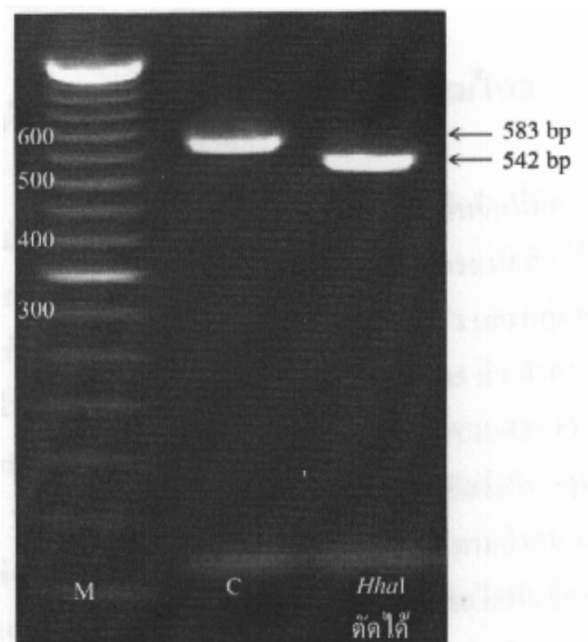
รูปที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III (ช่อง 2 และ 5) เปรียบเทียบกับช่อง 1 และ 4 ที่เป็นตัวควบคุม (C) โดยช่อง 5 แสดงตัวอย่างที่มีอัลลีลแบบ E ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 156 และ 184 คู่เบส ส่วนช่อง 3 เป็นลำดับเบสมาตรฐาน (M) ขนาด 50 คู่เบส



รูปที่ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Mae*II โดยช่อง 1 เป็นตัวอย่างที่ตัดได้ จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 283 และ 300 คู่เบส เปรียบเทียบกับช่องที่ 3 ที่เป็นตัวควบคุม ส่วนช่อง 2 คือ ลำดับเบสมาตรฐาน (M) ขนาด 50 คู่เบส



รูปที่ 5 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I ได้ดีเอ็นเอขนาด 542 คู่เบส เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (C) โดยช่องแรก คือ ลำดับเบสมาตรฐาน (M) ขนาด 50 คู่เบส



ตารางที่ 1 แสดงจำนวนพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการศึกษา

พันธุ์ Holstein-Friesian	ระดับเลือดของพันธุ์ Holstein-Friesian (ร้อยละ)						รวม
	100 ¹	93.75	93.25	87.50	81.25	75 ²	
4	11	9	1	20	6	9	60

¹เกิดจากการยกระดืบสายเลือดจนมีระดับสายเลือดของโคพันธุ์ Holstein-Friesian เป็น 100%

²พ่อโคกลุ่ม Thai Milking Zebu (TMZ)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโค (n) ความถี่จีโนไทป์ (genotypic frequency) และความถี่อัลลีล (allelic frequency) ของแคปปา-เคซีน ในโคพันธุ์แท้และโคลูกผสม

ชนิดของ จีโนไทป์	ความถี่จีโนไทป์ (n:ตัว)			ชนิดของ อัลลีล	ความถี่อัลลีล (n:ตัว)		
	โคพันธุ์แท้	โคลูกผสม	โคทั้งหมด		โคพันธุ์แท้	โคลูกผสม	โคทั้งหมด
AA	0.34(5)	0.56(25)	0.50(30)	A	0.60(18)	0.74(67)	0.71(85)
AB	0.40(6)	0.27(12)	0.30(18)	B	0.33(10)	0.17(15)	0.21(25)
BB	0.13(2)	0(0)	0.03(2)	E	0.07(2)	0.09(8)	0.08(10)
AE	0.13(2)	0.11(5)	0.12(7)				
BE	0(0)	0.06(3)	0.05(3)				
รวม (n)	15	45	60	รวม (n)	30	90	120

แบบ คือ AA (0.50;จากโค 30/60 ตัว), AB (0.30;จากโค 18/60 ตัว), BB (0.03;จากโค 2/60 ตัว), AE (0.12;จากโค 7/60 ตัว) และ BE (0.05;จากโค 3/60 ตัว) แต่ตรวจไม่พบ จีโนไทป์ EE เลย ความแตกต่างของอัลลีลและจีโนไทป์ ระหว่างกลุ่มโคพันธุ์แท้และกลุ่มโคลูกผสมจากการคำนวณ และเปรียบเทียบความถี่อัลลีล (allelic frequency) พบว่า อัลลีล A มีค่า 0.60 และ 0.74; อัลลีล B มีค่า 0.33 และ 0.17; และอัลลีล E มีค่า 0.07 และ 0.09 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างโคทั้งสองกลุ่ม การคำนวณและเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ (genotypic frequency) ระหว่างกลุ่มโคทั้งสองกลุ่มพบว่า ความถี่จีโนไทป์ AA, AB, BB, AE และ BE ได้แก่ 0.34, 0.40, 0.13, 0.13 และ 0 ตามลำดับในกลุ่มโคพันธุ์แท้ และ 0.56, 0.27, 0, 0.11 และ 0.06 ตามลำดับในกลุ่มโคลูกผสม ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นกัน

ในการพิจารณาจีโนไทป์ต่างๆ ที่มีอัลลีล B ประกอบอยู่ ได้แก่ AB, BB และ BE ในกลุ่มโคพันธุ์แท้พบว่า มีความถี่จีโนไทป์รวมกันเท่ากับ 0.53 (ร้อยละ 53) และมีความถี่อัลลีล B เท่ากับ 0.33 (ร้อยละ 33) ในขณะที่กลุ่มโค

ลูกผสมมีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.33 (ร้อยละ 33) และความถี่อัลลีล B เท่ากับ 0.17 (17) ส่วนในภาพรวมของตัวอย่างโคทั้งหมด (60 ตัว) เมื่อพิจารณาจีโนไทป์ต่างๆ ที่มีอัลลีล B ประกอบอยู่แล้ว พบว่ามีความถี่จีโนไทป์ 0.38 (ร้อยละ 38) และมีความถี่อัลลีล B เท่ากับ 0.21 (ร้อยละ 21)

วิจารณ์

จากการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเฉลี่ยมีค่า 290.29 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งมากพอต่อการทำงานในปฏิกิริยา PCR และผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มากพอในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนค่าอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 1.514 ในขณะที่ดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.8 แสดงว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอในการศึกษานี้จะมีสารประกอบอื่นปนเปื้อนอยู่ด้วย ทั้งนี้เพราะไม่มีขั้นตอนเพิ่มเติมที่จะทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบปัญหาในการดำเนินงานในขั้นตอนต่อไปและสามารถวิเคราะห์ผลออกมาได้อย่างดี จึงนับว่าเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกรวดเร็วและประหยัด

การใช้ไพรเมอร์ KCN 1F และ KCN 1R ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 351 คู่เบสและตรวจหาความผันแปรของ แคปป์-เคซินได้ 3 ชนิด คือชนิด A, B และ E ส่วนการใช้ไพรเมอร์ KP1 และ KP2 ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาด 583 คู่เบส ซึ่งจะครอบคลุมบริเวณของแคปป์-เคซิน exon 4 ได้ทั้งหมด (Braunschweig, 1998) ดังนั้นไพรเมอร์คู่นี้จะเป็นตัวเลือกที่เหมาะสม เพราะสามารถใช้ในการตรวจสอบชนิดของแคปป์-เคซินได้ทุกชนิด นอกจากนี้การตรวจหาแคปป์-เคซินชนิด A และ B อาจใช้เอนไซม์ *HinfI* หรือ *HindIII* อย่างใดอย่างหนึ่งได้ เมื่อสามารถระบุกลุ่มของแคปป์-เคซินได้แล้ว ควรใช้เอนไซม์ชนิดอื่นๆ ทำการตรวจสอบโดยละเอียดต่อไป อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์ *HinfI* และ *HindIII* ตรวจสอบพร้อมกันจะเป็นการช่วยยืนยันผลการตรวจสอบให้แม่นยำขึ้น แต่ไม่ควรสรุปผลจากการตรวจสอบด้วยเอนไซม์เพียงสองตัวนี้เท่านั้น โดยเฉพาะแคปป์-เคซินชนิด A ซึ่งจะให้ผลการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ *HinfI* และ *HindIII* เช่นเดียวกับแคปป์-เคซินชนิด E, F และ G หากไม่ทำการตรวจสอบด้วยเอนไซม์อื่นๆ จะไม่สามารถมั่นใจได้ว่าเป็นแคปป์-เคซินชนิด A จริง ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ตัดจำเพาะควรใช้ทั้ง 5 ชนิด คือ *HinfI*, *HindIII*, *HpyCH4 IV* (*MaeII*), *HaeIII* และ *HhaI* และควรมีการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ก่อนทำการใช้เสมอ (Barroso et al., 1998)

ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบแคปป์-เคซิน 3 ชนิด ได้แก่ แคปป์-เคซินชนิด A, B และ E โดยแคปป์-เคซินชนิด A และ B มีค่าความถี่อัลลีลและจีโนไทป์สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้มีผู้รายงานไว้ในโคพันธุ์ Holstein-Friesian (Bobe et al., 1999; Eenennaam and Medrano, 1991; Ng-Kwai-Hang et al., 1990) และสอดคล้องกับประวัติพันธุ์พ่อพันธุ์โคนมที่ศึกษาในครั้งนี้ซึ่งมีสายเลือดโคพันธุ์ Holstein-Friesian ทุกตัว ส่วนการตรวจพบแคปป์-เคซินชนิด E ในกลุ่มโคที่ทำการศึกษานี้ น่าจะได้รับมาจากทางสายแม่ซึ่งมีสายเลือดโคพื้นเมืองเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากแคปป์-เคซินชนิด E มีรายงานตรวจพบในพันธุ์ Finnish Ayrshire ในประเทศฟินแลนด์ (Ikonen et al., 1996) และพันธุ์เดียวกันในประเทศนอร์เวย์ (Lien et al., 1999) เท่านั้น ไม่เคยมีรายงานพบในโคพันธุ์ Holstein-Friesian แต่ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาจีโนไทป์ของจีนแคปป์-เคซินในโคพื้นเมืองไทยไว้เช่นกัน ในส่วนของจีโนไทป์ของแคปป์-เคซินที่ตรวจพบมี 5 แบบ คือ AA, AB, BB, AE และ BE และไม่มีพบจีโนไทป์ EE เลย โดยจีโนไทป์ AA, AB และ BB มีรายงานตรวจพบในโคหลายสายพันธุ์ทั้งใน *Bos taurus* เช่น

พันธุ์ Holstein-Friesian, Jersey (Aleandri et al., 1990; Bobe et al., 1999; Eenennaam and Medrano, 1991; Ng-Kwai-Hang et al., 1990) และใน *Bos indicus* เช่นพันธุ์ Sahiwal, Zebu (Jairam and Nair, 1983; Malik et al., 1994) เป็นต้น

จากการวิเคราะห์ผลของความสัมพันธ์จีโนไทป์ที่มีอัลลีล B (AB, BB และ BE) และความถี่อัลลีล B พบว่าในโคพันธุ์แท้จะมีค่าความถี่สูงกว่าในโคลูกผสม แสดงให้เห็นว่า หากมีฝูงโคนมที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเป้าหมายที่จะพัฒนาแคปป์-เคซินชนิด B ในฝูงให้มากขึ้น เพื่อต้องการนํ้านมคุณภาพเหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์เนยแข็ง น่าจะเลือกใช้นํ้าเชื้อจากกลุ่มโคพันธุ์แท้มากกว่านํ้าเชื้อจากโคลูกผสม อย่างไรก็ตามจะเห็นว่านํ้าเชื้อพ่อโคชุดนี้ในภาพรวมมีศักยภาพในการพัฒนาตามเป้าหมายดังกล่าวอยู่ในระดับดี เนื่องจากมีนํ้าเชื้อพ่อโคร้อยละ 38 (23 ตัวจากนํ้าเชื้อ 60 ตัวอย่าง) ที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงลักษณะที่ต้องการดังกล่าวได้ ซึ่งในหลายประเทศที่ผลิตเนยแข็งคุณภาพเยี่ยมได้ให้ความสำคัญและบรรจุจีโนไทป์ของแคปป์-เคซินในพันธุ์ประวัติของพ่อพันธุ์ด้วย เช่น ฝรั่งเศสและสวิตเซอร์แลนด์ เป็นต้น

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของแคปป์-เคซินในฝูงพ่อพันธุ์โคนมโดยวิธี PCR-RFLP ทำให้สามารถทราบถึงจีโนไทป์ของพ่อโคเป็นรายตัว เพื่อประกอบในการคัดเลือกโคที่มีจีโนไทป์ BB หรือ AB ขึ้นเป็นพ่อพันธุ์ เพื่อที่จะได้มีอัลลีล B กระจ่ายสู่ฝูงโคนมมากขึ้น ปัจจุบันทางองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ได้เปิดช่องทางให้ผู้ประกอบการเอกชนซื้อนํ้านมดิบสำหรับนำไปผลิตชีสมอซซาเรลลา (mozzarella cheese) ป้อนร้านพิซซ่าทั้งในและต่างประเทศ เพื่อระบายนํ้านมดิบของเกษตรกรผู้ตลาด นอกจากนี้โรงงานผลิตภัณฑ์นม อ.ส.ค. ภาคใต้ จ.ประจวบคีรีขันธ์ ได้ทำการผลิตชีสส่งร้านพิซซ่าและร้านอาหารฝรั่งในประเทศ ซึ่งจากเดิมผลิตภัณฑ์ดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นแนวโน้มในการนำแคปป์-เคซินขึ้นมาใช้เป็นตัวชี้วัดในการปรับปรุงพันธุ์โคนมเพื่อให้ได้นํ้านมที่มีคุณภาพตามวัตถุประสงค์เฉพาะดังกล่าวน่าจะมีมากขึ้น เกษตรกรที่สามารถปรับปรุงพันธุ์ฝูงโคเข้าสู่เป้าหมายนี้ได้ น่าจะช่วยเพิ่มมูลค่าของนํ้านมดิบที่ผลิตได้ และช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เนยแข็งจากต่างประเทศได้

สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบชนิดและสัดส่วนของอัลลีลชนิดต่างๆ ในฝูงพ่อพันธุ์โคนม ซึ่งให้บริการผสมเทียม

ให้กับแม่โคของเกษตรกรทั่วไป นอกจากนี้การตรวจพบ
แคปป์-เคซีนชนิด B ในคลั่งน้ำเชื้อของกองผสมเทียม กรม
ปศุสัตว์แสดงถึงศักยภาพของหน่วยงานในการจัดทำโปรแกรม
การปรับปรุงพันธุ์โคนมไทย ให้แก่ฝูงโคนมของเกษตรกรที่
ต้องการพัฒนาคุณภาพของน้ำนม เพื่อการผลิตเนยแข็งคุณภาพ
ระดับเยี่ยม ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าการผลิต โดยการประยุกต์
ใช้แคปป์-เคซีนเป็นดัชนีชี้วัดทางพันธุกรรมตัวหนึ่งใน
โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณจุฑารัตน์ จิระศุภโชค เจ้าหน้าที่ห้อง
ปฏิบัติการเซลล์พันธุศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทย์-
ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวก
ในการทำงาน งานนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนวิจัยจาก
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา
2544

เอกสารอ้างอิง

Aleandri, R., Buttazzoni, L.G. and Schneider, J.C. 1990.
The effect of milk protein polymorphism on milk
components and cheese-producing ability. *J. Dairy
Sci.* 73 (2): 241-255.

Barroso, A., Dunner, S. and Canon, J. 1998. Technical
note: detection of bovine kappa-casein variants
A, B, C, and E by mean of polymerase chain
reaction-single strand conformation polymorphism
(PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76 (6): 1535-1538.

Bobe, G., Beitz, D.C., Freeman, A.E. and Lindberg, G.L.
1999. Effect of milk protein genotypes on milk
protein composition and its genetic parameter
estimates. *J. Dairy. Sci.* 82 (12): 2797-2804.

Braunschweig, M. 1998. Associations between casein
haplotypes and milk traits of braunvieh and fleckvieh.
Ph.D. Diss. ETH No. 12731, Swiss Federal Institute
of Technology, Zurich, Switzerland. 140 p.

Cowan, C.M., Dentine, M.R. and Coyle, T. 1992.
Chromosome substitution effects associated with
K-CN and B-LG in holstein cattle. *J. Dairy. Sci.* 75
(4): 1097-1104.

Eenennaam, A.V. and Medrano, J.F. 1991. Milk protein
polymorphisms in California dairy cattle. *J. Dairy. Sci.*
74 (5): 1730-1740.

Erhardt, G. 1996. Detection of a new kappa-casein
variant in milk of Pinzgauer cattle. *Ani. Gen.* 27 (2):
105-107.

FitzGerald, R.J. 1997. Exploitation of casein variants. In:
Milk Composition, Production and Biotechnology.
R.A.S. Welsh, D.J.W. Burns, S.R. Davis, A.I. Popay
and Prosser C.G. (ed.). New York: CAB International.
153-171.

Ikonen, T., Ruottinen, O., Erhardt, G. and Ojala, M. 1996.
Allele frequencies of the major milk protein in the
Finnish Ayrshire and detection of a new K-casein
vvariant. *Ani. Gen.* 27 (3): 179-181.

Jairam, B.T. and Nair. P.G. 1983. Genetic polymorphism
of milk proteins and economic characters in dairy
animals. *Indian J. Ani. Sci.* 53 (1): 1-8.

Lara, M.A.C., Gama, L.T., Bufarah, G., Sereno, J.R.B.,
Celegato, E.M.L. and de Abreu, U.P. 2002. Genetic
polymorphism at the kappa-casein locus in
Pantaneiro cattle. *Arch. Zootec.* 51 (193): 99-105.

Lien, S., Kantanen, J., Olsaker, I., Holm, L.E., Eythorsdottir,
E., Sandberg, K., Dalsgard B. and Adalsteinsson, S.
1999. Comparison of milk protein allele frequencies
in Nordic cattle breeds. *Ani. Gen.* 30 (2): 85-91.

Lin, C.Y., McAllister, A.J., Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes,
J.F., Batra, T.R., Lee, A.J., Roy, G.L., Vesely, J.A.,
Wauthy, J.M. and Winter, K.A. 1989. Relationships
of milk protein types to lifetime performance. *J. Dairy.
Sci.* 72 (11): 3085-3090.

Malik, S., Kumar, S. and Rani, R. 2000. K-casein and
B-casein alleles in crossbred and zebu cattle from
India using polymerase chain reaction and sequence-
specific oligonucleotide probes. *J. Dairy Res.* 67 (2):
295-300.

Miranda, G., Anglade P., Mahe, M.F. and Erhardt, G. 1993.
Biochemical characterization of the bovine genetic
kappa-casein C and E variants. *Ani. Gen.* 24 (1):
27-31.

Ng-Kwai-Hang, K.F., Monardes, H.G. and Hayes, J.F.
1990. Association between genetic polymorphism of
milk proteins and production traits during three
lactations. *J. Dairy. Sci.* 73 (12): 3414-3420.

Prinzenberg, E.M., Hiendleder, S., Ikonen, T. and Erhardt,
G. 1996. Molecular genetic characterization of new
bovine kappa-casein alleles CSN3F and CSN3G and
genotyping by PCR-RFLP. *Ani. Gen.* 27 (5): 347-349.

Rincon, E.J., Schermerhorn, E.C., McDowell, R.E. and
McDaniel, B.T. 1982. Estimation of genetic effects
on milk yield and constituent traits in crossbred
dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 65 : 848-856.