

การใช้รากขนสัตว์แทนตัวอย่างเลือดในการตรวจหา จีโนไทป์ของยีนเคปป์าเคซีนในโคนม

ดวงสมร สุวัทฒน^{1*} ช่อทิพ อรุณเดชาชัย² จุฑารัตน์ จิระสุโขโชค¹ ชาตรี คติวรเวช¹

Abstract

Duangsmorn Suwattana^{1*} Chortip Aroondechachai² Jutarat Jeerasuppachok¹ Chatree Khatiworavage¹

THE IDENTIFICATION OF KAPPA CASEIN GENOTYPES IN THE HAIR ROOTS OF DAIRY CATTLE

Twenty-two dairy cattle, kept at the Demonstration Farm, Department of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Nakorn Pathom, were genotyped using hair roots, for the Kappa-casein gene, using a Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique. The method for obtaining total DNA was simple, requiring only the digestion of the root of the hair end in a buffer compatible with the subsequent PCR, without any prior purification or extraction step. Two types of alleles, A and B, were in the frequencies of 0.77 and 0.23, respectively. Genotypes AA, AB and BB were demonstrated with the frequencies of 13, 8 and 1 (59.1%, 36.4% and 4.55%), respectively. The results correspond to previous reports in other populations. According to the allele B findings in this herd, it reveals the possibility of a potential breeding program for the proposed trait.

Keywords : hair root, dairy cattle, genotype, Kappa-casein gene

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

²PhD. student, Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

*Corresponding author

¹ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

²นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

ดวงสมร สุวัทนา^{1*} ช่อทิพ อรุณเดชาชัย² จุฑารัตน์ จิระสุโขโชค¹ ชาตรี คติวรเวช¹

การใช้รากขนสัตว์แทนตัวอย่างเลือดในการตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีนในโคนม

การตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีน ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ในฝูงโคนม ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เลี้ยงอยู่ ณ ศูนย์ฝึกนิสิตฯ จ. นครปฐม จำนวน 22 ตัว โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากขนแทนการใช้ตัวอย่างเลือด พบว่า มีความสะดวก รวดเร็วในการเก็บและขนส่งตัวอย่าง ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากขนใช้ตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีนได้ชัดเจน โดยจำนวนรากขนที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 8-10 เส้น แต่ควรเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอในการทำ PCR ให้มากขึ้น จากผลการศึกษานี้ อัลลีลของยีนแคปปาเคซีนพบได้ 2 แบบ คือ อัลลีล A และ อัลลีล B โดยมีค่าความถี่ของอัลลีล เท่ากับ 0.77 และ 0.23 ตามลำดับ ส่วนจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีน พบได้ 3 แบบ คือ AA, AB และ BB จำนวน 13, 8 และ 1 ตัว ตามลำดับ (หรือ 59.1%, 36.4% และ 4.55% ของประชากรโคนมทั้งฝูง) สัดส่วนการกระจายตัวของอัลลีลและจีโนไทป์ของโคนมฝูงนี้พบว่า สอดคล้องกับข้อมูลในโคนมกลุ่มอื่นๆ ที่ได้เคยมีรายงานไว้ นอกจากนี้การตรวจพบอัลลีล B ในโคนมฝูงนี้ทั้งจีโนไทป์ AB และ BB แสดงให้เห็นว่า โคฝูงนี้มีศักยภาพในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เพื่อให้ได้โคที่มีพันธุกรรมซึ่งสามารถให้ผลผลิตที่มีลักษณะเฉพาะตามต้องการเพิ่มขึ้นได้

คำสำคัญ : รากขน โคนม จีโนไทป์ ยีนแคปปาเคซีน

บทนำ

แคปปาเคซีน (Kappa-casein; KCN) เป็นองค์ประกอบหนึ่งของโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำนมซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง (cheese) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphisms) ของยีนแคปปาเคซีนในประชากรโคนมอยู่ในระดับสูง โดยพบอัลลีลชนิดต่างๆ ได้แก่ A B C E F และ G ซึ่งอัลลีล A เป็นอัลลีลพื้นฐานที่พบอยู่ในประชากรโคทุกพันธุ์ในสัดส่วนที่สูงมากกว่า 60% ขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำนมที่มีองค์ประกอบมาจากอัลลีล B จะมีส่วนช่วยทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์เนยแข็งดีขึ้นได้ กล่าวคือ พันธุกรรมของโคที่มียีนแคปปาเคซีนอัลลีล B เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เมื่อนำนํมนั้นไปทำเนยแข็งจะได้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ดีมาก (Ron et al., 1994; Ikonen et al., 1999 และ 2001; Ojala et al., 1997; Sabour et al., 1996; Braunschweig, 1998; Kappeler, 1998) จากความแตกต่างที่พบนี้ส่งผลให้มีการพัฒนาโคนมสายพันธุ์ต่างๆ ในทิศทางที่ทำการคัดเลือกอัลลีล B ไว้ในฝูงพ่อ-แม่พันธุ์มากขึ้น จนกระทั่งในปัจจุบันประชากรโคนมหลายสายพันธุ์ เช่น Brown

Swiss, Limousine และ Simmental พบว่ามีอัลลีล A และอัลลีล B อยู่ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน (Braunschweig, 1998)

ในการตรวจสอบยีนแคปปาเคซีนในโคนมแต่ละตัวจะต้องใช้ดีเอ็นเอ (total DNA) ของสัตว์ตัวนั้นๆ เลือดสัตว์จัดเป็นแหล่งของตัวอย่างเซลล์ที่นิยมใช้เพื่อสกัดดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามในงานภาคสนามการเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญทำการเจาะเลือด ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษและ/หรือแรงงานคนมากในการควบคุมตัวสัตว์ จะต้องมีการประสานงานบุคคลหลายฝ่ายล่วงหน้าเป็นอย่างดีก่อนการทำงาน สัตว์เกิดความเครียดในระหว่างเก็บตัวอย่าง จำเป็นจะต้องเก็บในหลอดที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ต้องเก็บรักษาตัวอย่างในอุณหภูมิต่ำ สิ่งเหล่านี้ทำให้มีค่าใช้จ่ายหลายด้าน ดังนั้นเพื่อลดปัญหาต่างๆ ดังกล่าว การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์รากขนแทนการใช้เลือดสัตว์เพื่อใช้ในการงานด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง (Thomson et al., 1992; Uchihhi et al., 1992; Comas et al., 1996; Willemsen et al., 1999) เนื่องจากวิธีนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องคำนึงถึงเวลา สถานที่และความชำนาญในการเก็บ

ตัวอย่างนัก ประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าการเก็บตัวอย่างจากเลือด และเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง (Higuchi et al., 1988)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการศึกษาวិธีการในการปรับใช้เซลล์รากขนเป็นแหล่งสกัดดีเอ็นเอแทนตัวอย่างเลือด เพื่อให้การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลในสัตว์มีขนตอนที่ยังสะดวก ง่ายตาย และเหมาะสมกับงานภาคสนามมากยิ่งขึ้น และตรวจหาจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซินในฝูงโคนมที่เลี้ยงอยู่ ณ ภาควิชาสัตวบาล (ส่วนศูนย์ฝึกนิสิตฯ จ. นครปฐม) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์โคนมของหน่วยงานต่อไป

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

โคนมที่เลี้ยงอยู่ ณ ภาควิชาสัตวบาล (ส่วนศูนย์ฝึกนิสิตฯ จ.นครปฐม) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 22 ตัว ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ชนิดได้แก่ ตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ประมาณ 5-6 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตัวอย่างเส้นขน โดยดึงเส้นขนจากบริเวณโคนหางให้มีเซลล์รากขนติดมาด้วยเสมอ ใส่ในถุงพลาสติกสะอาด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจะใช้เฉพาะส่วนของเม็ดเลือดขาว (buffy coat) โดยทำการล้างเซลล์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ NaCl/10 มิลลิโมลาร์ EDTA แล้วจึงนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยาแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (QIAmp DNA Blood Mini Kit[®]) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือ หลังจากนั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างขน จะตัดเอาเฉพาะส่วนโคนที่เห็นรากขนชัดเจนเท่านั้น ใช้รากขนจำนวน 1-30 เส้นต่อ 1 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ วิธีการใช้น้ำยาสำเร็จรูป QiAmp DNA MiniKit for Tissue (Qiagen[®]) ทำการสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดสำเร็จรูป และวิธีการสกัดจากการใช้น้ำยาย่อยรากขนที่เตรียมเอง ซึ่งประกอบด้วย Tween 20; สารละลาย 10xPCR buffer; MgCl₂ (25 มิลลิโมลาร์); และ Proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) น้ำยาที่เตรียมได้เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส โดยการสกัดดีเอ็นเอมีขั้นตอนคือ ใส่น้ำยาย่อยรากขนประมาณ 80-100 ไมโครลิตรในแต่ละหลอดทดลอง

ที่ใส่รากขนไว้แล้ว นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาทีหรือจนกระทั่งรากขนละลายหมด จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95-97 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ปั่นที่ความเร็วไม่ต่ำกว่า 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที สารสกัดดีเอ็นเอที่ได้ทั้งสองวิธีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งนำไปตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul) จากสูตร = 50 x ค่าที่วัดได้ที่ OD₂₆₀ x dilution factor

จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือด 1 ไมโครลิตรหรือดีเอ็นเอจากเซลล์รากขนซึ่งได้ทำการปรับปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 1-16 ไมโครลิตร เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม, Taq polymerase, 10xPCR-Buffer, dNTP's (1.25 มิลลิโมลาร์), ชุดไพรเมอร์ kp1 และ kp2 (20 ไมโครโมลาร์) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนแคปปาเคซินในบริเวณที่ต้องการ (Dr. H. Joerg from ETH-Zurich, ติดต่อส่วนตัว) ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้

KP 1 : 5'-AAGAAATAATACCATCTGCATAATTTATTTTACAG-3'

KP 2 : 5'-GGCTGTTATTCATTTGCCTTATTACCTG-3'

ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ มีการปรับสภาวะต่างๆ ดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยานำไปผ่านวิธี PCR-RFLP (Mao and Bremel, 1994; Borroso et al., 1998; Braunschweig, 1998) โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากขบวนการ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ชนิดต่างๆ ได้แก่ HindIII, HinfI, MaeII, HaeIII และ HhaI แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ทำการอ่านผลที่ได้เปรียบเทียบกับผลมาตรฐานที่ได้เคยมีรายงานไว้ (ศิริลักษณ์, 2545) บันทึกและคำนวณค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ของยีนแคปปาเคซิน ดังสมการต่อไปนี้

ความถี่ของอัลลีล =

$$\frac{2 (\text{จำนวนโคที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous}) + 1 (\text{จำนวนโคที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous})}{2 (\text{จำนวนโคทั้งหมด})}$$

ผล

ปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้จากตัวอย่างเลือดและรากขน ด้วยวิธี spectrophotometer พบว่า มีค่าที่แตกต่างกันค่อนข้างกว้าง โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยน้ำยาสำเร็จรูปจากตัวอย่างเลือดจะทำให้ได้ดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 236.0-470.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในขณะที่ดีเอ็นเอจากตัวอย่างรากขนอยู่ระหว่าง 5.0-230.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรขึ้นกับจำนวนเส้นขน (ตารางที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับการสกัดรากขนด้วยการใช้น้ำยาสำเร็จรูปคือ อยู่ระหว่าง 20.0-250.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยพบว่าจำนวนรากขนที่ควรใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในโคนมเฉลี่ย 8-10 เส้นต่อหนึ่งตัวอย่างจะให้ผลดีในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการทำ PCR จะครอบคลุมบริเวณที่เกิดความผันแปร (mutation) ณ เบสตำแหน่งต่างๆ ในส่วนของยีนแคปปาเคซีนตรงบริเวณเอกซอน (exon) ที่ 4 โดยมีขนาด 583 คู่เบส จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่

ใช้ในการทำ PCR พบว่า สารสกัดดีเอ็นเอจากเลือดเพียง 1 ไมโครลิตร ให้ผลผลิต PCR จำนวนมาก ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากขนทั้งจากการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปและน้ำยาเตรียมเอง ควรใช้สารสกัดดีเอ็นเอประมาณ 5-10 ไมโครลิตรในการทำ PCR แต่ละครั้ง ซึ่งเมื่อนำผลผลิต PCR มาทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ จึงจะสามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2; รูปที่ 1-4)

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีนในโค (ตารางที่ 3) พบว่า โคนมฝูงนี้มีอัลลีลของยีนแคปปาเคซีน 2 แบบ คือ อัลลีล A และ B โดยสามารถตรวจพบจีโนไทป์ได้ 3 แบบ ได้แก่ แบบ AA, AB และ BB ที่มีการกระจายอยู่ในฝูงเป็นสัดส่วน 13 : 8 : 1 ตามลำดับ และมีค่าความถี่ของจีโนไทป์ที่พบในประชากรโคฝูงนี้ เท่ากับ 59.10%, 36.40% และ 4.55% ตามลำดับ ส่วนค่าความถี่ยีนแคปปาเคซีนของอัลลีล A และ B มีค่า 0.77 และ 0.23 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างรากขนจำนวนต่างๆ กัน

จำนวนรากขน (เส้น)	3	5	8	10	30
ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	5.0	87.5	101.3	81.3	230.0

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณ PCR product ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis

ชนิดตัวอย่าง	เลือด	รากขน**	
วิธีการ	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป	ชุดน้ำยาสำเร็จรูป	น้ำยาย่อยรากขน
PCR product* ที่ดีเอ็นเอ 1-16 ul	(+4)	(+1) - (+3)	(+1) - (+3)

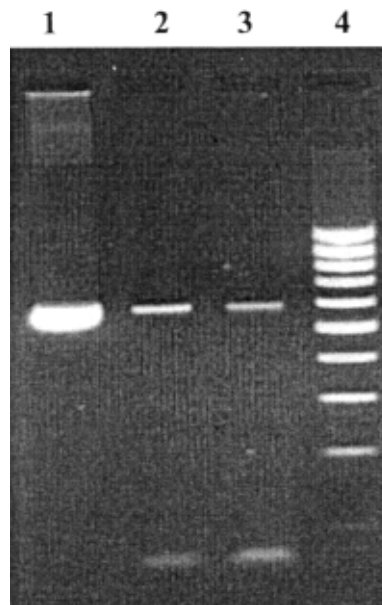
*ปริมาณ PCR product ระดับ 0 (ตรวจไม่พบเลย) ถึงระดับ +4 (มากที่สุด)

**จำนวนรากขนที่ใช้ คือ 8 เส้น

ตารางที่ 3 ความถี่ของอัลลีลและจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีนที่ตรวจพบจากตัวอย่างโค 22 ตัว

อัลลีล / จีโนไทป์	A (0.77)	B (0.23)
A	AA (13 ตัว)	AB (8 ตัว)
$A = \left[AA + \frac{1}{2} AB \right] = \left[59.10 + \frac{1}{2} (36.40) \right]$	$\left[\frac{13}{22} \right] 100 = 59.10\%$	$\left[\frac{8}{22} \right] 100 = 36.40\%$
B	BA*	BB (1 ตัว)
$B = \left[BB + \frac{1}{2} AB \right] = \left[4.55 + \frac{1}{2} (36.40) \right]$		$\left[\frac{1}{22} \right] 100 = 4.55\%$

*จีโนไทป์ BA และ AB เป็นจีโนไทป์เดียวกันและได้แสดงอยู่ในจีโนไทป์ของ AB



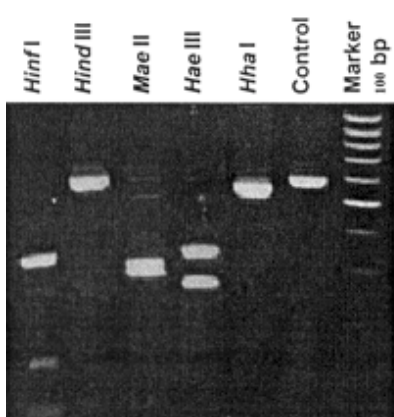
รูปที่ 1 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเลือดและรากขนสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

แถวที่ 1 ตัวอย่างเลือด

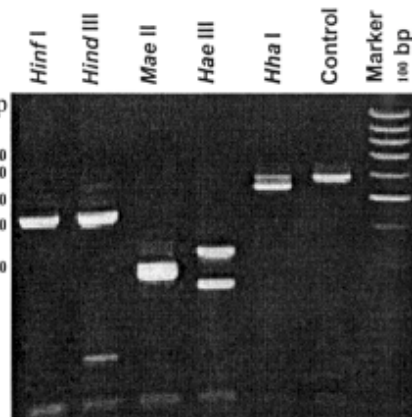
แถวที่ 2 ตัวอย่างรากขน 10 เส้น สกัดโดยน้ำยาแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป

แถวที่ 3 ตัวอย่างรากขน 10 เส้น สกัดโดยวิธีเตรียมน้ำยาสกัดเอง

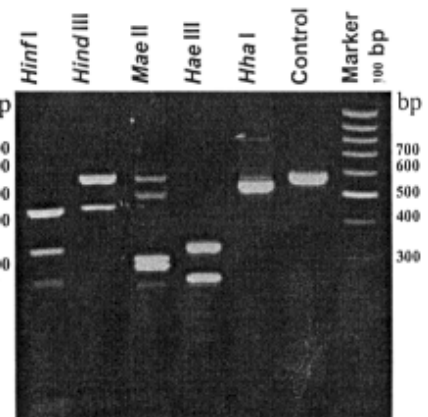
แถวที่ 4 Maker (100 bp)



รูปที่ 2 แสดงจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีนแบบ AA โดยพบว่าดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *HinfI* มีขนาด 326 คู่เบส ในขณะที่เอ็นไซม์ *HindIII* ไม่สามารถตัดได้



รูปที่ 3 แสดงจีโนไทป์ของยีนแคปปาเคซีนแบบ BB โดยพบว่าดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *HinfI* มีขนาด 455 คู่เบสและตัดด้วยเอ็นไซม์ *HindIII* ได้ขนาด 452 คู่เบส



รูปที่ 4 แสดงผลวิเคราะห์จีโนไทป์เป็นแบบ AB โดยพบว่าดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *HinfI* ได้ขนาด 326 และ 455 คู่เบสและผลการตัดด้วยเอ็นไซม์ *HindIII* ได้ดีเอ็นเอขนาด 583 และ 452 คู่เบส

รูปที่ 2-4 แสดงผลการศึกษารหัสส่วนดีเอ็นเอของยีนแคปปาเคซีนแบบ AA, BB และ AB หลักจากตัดด้วยเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ

วิจารณ์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากรากขนโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปและน้ำยาล้างรากขนที่เตรียมเอง เปรียบเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดด้วยการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปพบว่า การใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปทำได้ในเวลารวดเร็วไม่เกิน 30 นาที ขั้นตอนต่างๆไม่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายในการสกัดดีเอ็นเอประมาณ 150-200 บาทต่อตัวอย่าง ส่วนการใช้ยาล้างรากขนที่เตรียมเองใช้เวลานานกว่าชั่วโมง แต่มีค่าใช้จ่ายประมาณ 5-50 บาทต่อตัวอย่าง ดังนั้นสำหรับตัวอย่างจำนวนมาก การเตรียมยาล้างรากขนดีเอ็นเอเองจะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลงได้มาก ในด้านความสะดวก โดยปกติชุดเซลล์บริเวณโคนรากขนของโคมีขนาดเล็กมาก ในการตัดแยกรากขนเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จะต้องใช้ความประณีตและเวลาพอสมควร นอกจากนี้ในการสกัดดีเอ็นเอแต่ละครั้งควรใช้รากขนประมาณ 8-10 เส้น จึงจะเหมาะสม

ในขั้นตอนการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างรากขน พบว่าจำเป็นต้องใช้ปริมาณสารสกัดดีเอ็นเอมากเพียงพอ จึงจะให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้รับจากการสกัดรากขนต่อไมโครลิตรมีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวอย่างเลือด (ศิริลักษณ์, 2545; ช่อทิพและคณะ, 2546) ซึ่งเป็นข้อที่พึงระวังในการใช้รากขนเป็นแหล่งดีเอ็นเอ โดยทั่วไปสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากรากขน ควรเพิ่มสัดส่วนของปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นให้มากขึ้นในการนำไปใช้ทำ PCR แต่ละครั้ง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่า ตัวอย่างรากขนเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการศึกษาวิจัยได้อย่างมาก หากจำเป็นต้องทำการศึกษาสัตว์จำนวนมาก และไม่มีคามยุ่งยากในการเก็บและดูแลรักษาตัวอย่าง อีกทั้งยังให้ผลการศึกษาชัดเจนเช่นเดียวกับการใช้เลือดด้วย

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ฝูงโคทั้ง 22 ตัวมีอัลลีลของยีนแคปปาเคซีน 2 แบบ คือ อัลลีล A และ B ซึ่งเป็นอัลลีลพื้นฐานที่พบในโคทุกสายพันธุ์ (Erhardt, 1996 ; Ikonen et al., 1996) และการกระจายของจีโนไทป์ที่มีอยู่ในฝูงนี้เป็นสัดส่วนซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่เคยมีรายงานไว้แล้ว (Ng-Kwai-Hang et al., 1984 ; Zhou et al., 1991) ในส่วนของอัลลีล B ซึ่งเป็นลักษณะทางพันธุกรรมเฉพาะที่มีความ

สัมพันธ์กับชนิดของผลผลิตน้ำนมที่ต้องการอย่างใกล้ชิด ตรวจพบได้ในโคจำนวน 9 ตัว คิดเป็น 40.95% ของฝูงโค โดยพบทั้งจีโนไทป์แบบ AB และ BB แสดงถึงศักยภาพที่ดีของโคฝูงนี้ในการที่จะปรับปรุงพันธุกรรมให้ได้ฝูงโคที่ผลิตน้ำนมซึ่งเหมาะสมสำหรับการทำผลิตภัณฑ์เนยแข็งคุณภาพดีตามความต้องการของตลาด (Delacroix-Buchet et al., 1993; Morini et al., 1975) และน่าจะใช้เป็นจุดในการเพิ่มมูลค่าผลผลิตน้ำนมของฝูงโคได้อย่างยั่งยืน โดยการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกโคที่มีอัลลีล B ขึ้นทำแม่พันธุ์ทดแทนให้มากขึ้น ควบคู่ไปกับการเลือกใช้พ่อพันธุ์ที่มีอัลลีล B อยู่เช่นกัน เพื่อเร่งให้การกระจายตัวของอัลลีล B ในฝูงมีสัดส่วนที่เพิ่มเร็วขึ้น ประกอบกับการให้ความรู้ และทำความเข้าใจกับผู้ประกอบการถึงความแตกต่างของคุณภาพน้ำนมที่ใช้ทำเนยแข็ง ซึ่งปัจจุบันมีวิธีการที่สามารถตรวจสอบล่วงหน้าได้ น่าจะส่งผลให้การผลิตเนยแข็งในประเทศไทยพัฒนาขึ้นและช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้

สรุป

การปรับปรุงและพัฒนาเทคนิควิธีการเตรียมดีเอ็นเอจากการใช้ตัวอย่างจากเซลล์รากขนแทนการใช้ตัวอย่างจากเลือดภายหลังการปรับจำนวนรากขนที่ใช้และปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำ PCR ให้เหมาะสมแล้ว สามารถนำมาใช้แทนตัวอย่างจากเลือดได้ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลให้สะดวกรวดเร็ว ขนส่งและเก็บรักษาง่าย ทำให้เหมาะสมกับงานทางภาคสนามมากกว่าการเก็บตัวอย่างจากเลือด และจากการศึกษาในครั้งนี้ตรวจพบโคที่มีอัลลีล B ของยีนแคปปาเคซีนอยู่ทั้งสิ้น 9 ตัว คิดเป็น 40.95% ของฝูงโค แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่ดีในการที่จะปรับปรุงพันธุกรรมให้ได้ฝูงโคที่ผลิตน้ำนมซึ่งเหมาะสมสำหรับการทำผลิตภัณฑ์เนยแข็งคุณภาพดีตามความต้องการของตลาดในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยเงินอุดหนุน ประจำปี 2546 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- ช่อทิพ อรุณเดชาชัย จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ ดวงสมร สุวัทนา มนต์ชัย ดวงจินดา 2547 (2004) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเบต้าเคซีน และแคปปาเคซีนในโคนมลูกผสม. เวชสารสัตวแพทย์ 34(1): 57-63
- ศิริลักษณ์ เตะชนรราช 2545 (2002) การศึกษาจีโนไทป์ของแคปปาเคซีนในพ่อพันธุ์โคนมของกองผสมเทียม. วิทยานิพนธ์ปริญญาหาบัณฑิต สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 63 หน้า
- Boroso, A., Dunner, S. and Canon, J. 1998. 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: 1535-1538.
- 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.
- Comas, D., Calafell, F., Mateu, E., Perez-Lezaun, A. and Bertranpetit, J. 1996. Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of Turkey and its relationship to the European populations. Mol-Biol-Evol. Oct; 13(8): 1067-77.
- Delacroix-Buchet, A., Lefier, D. and Nuyts Petit, V. 1993. Polymorphism of K-casein from three French breeds and its coagulability. Lait. 73(1): 61-72.
- Erhardt, G. 1996 Detection of a new K-casein variant in milk of Pinzgauer cattle. Anim. Genet. 27(2): 105-107.
- Higuchi, R., von Beroldingen, C.H., Sensabaugh, G.F. and Erlich, H.A. 1988. DNA typing from single hairs. Nature 332: 543-546.
- Ikonen, T., Ruottinen, O., Erhardt, G. and Ojala, M. 1996. Allele frequencies of the major milk proteins in the Finnish Ayrshire and detection of a new K-casein variant. Anim. Genet. 27:179-181.
- Ikonen, T., Ojala, M. and Ruottinen, O. 1999. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. J. Dairy Sci. 82:1026-1033.
- Ikonen, T., Bovenhuis, H., Ojala, M., Ruottinen, O. and Georges, M. 2001. Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. J. Dairy Sci. 84: 507-514.
- Kappeler, S. 1998. Compositional and strutral analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph.D. Diss. ETH No. 12947, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. 137 p.
- Mao, F.C. and Bremel, RD. 1994. Distribution of bovine alpha-lactalbumin and kappa-casein genotypes in Taiwan. Proceeding 5th World Congress on Genetic Applie to Livestock Production, Ontario, Canada. 7-12 August 19: 331-332.
- Morini, D., Losi, G., Castagnetti, G.B., Benevelli, M., Resmini, P. and Volonterio, G. 1975. The influence of genetic variants of K-casein on the size of casein micelles. Sci. Tecn. Latt-cas. 26(6): 437-444.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Moxley, J.E. and Monarges, H.G. 1984. Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. J. Dairy Sci. 67(4): 835-840.
- Ojala, M., Thomas, R. F. and Medrano, J. F. 1997. Effect of milk protein genotypes on the variation for milk production traits of Holstein and Jersey cows in California. J. Dairy Sci. 80: 1776-1785.
- Ron, M., Yoffe, O., Ezra, E., Medrano, J.F. and Welle, J.I. 1994. Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holstein. J. Dairy Sci. 77: 1106-1113.
- Sabour, M.P., Lin, C.Y., Lee, A.J. and McAllister, A.J. 1996. Association between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits. J. Dairy Sci. 79(6): 1050-1056.

- Thomson, D.M, Brown, N.N. and Clague, A.E. 1992. Routine use of hair root or buccal swab specimens for PCR analysis: advantages over using blood. *Clin. Chim. Acta.* 207(3): 169-74.
- Uchihi, R., Tamaki, K., Kojima, T., Yamamoto, T. and Katsumata, Y. 1992. Deoxy -ribonucleic acid (DNA) typing of human leukocyte antigen (HLA)-DQA1 from single hairs in Japanese. *J. Forensic. Sci.* 37(3): 853-9.
- Willemsen, R, Anar, B., De-Diego-Otero, Y., de-Vries, B.B., Hilhorst-Hofstee, Y., Smits, A., van-Looveren, E., Willems, P.J., Galjaard, H. and Oostra, B.A. 1999. Noninvasive test for fragile X syndrome, using hair root analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 65(1): 98-103.
- Zhou, J.F., Zadworn, D. and Kuhnlein, U. 1991. Frequency of Kappa-casein Alleles in the Holstein Population. *J. Dairy. Sci. (Suppl. 1)* 74:283.