ความสัมพันธ์ของอัลลีล Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนม

นางสาวสุภาวดี มานะไตรนนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-533-172-4

Association of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) Alleles with Occurrence of Clinical Mastitis in Dairy Cattle

Miss Supawadee Manatrinon

The Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2002

ISBN 974-533-172-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ของอัลลีล Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนม

สภามหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รศ.ดร.กนก ผลารักษ์)
ประธานกรรมการ

.....
(ผศ.น.สพ.ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์)
กรรมการ

.....
(ผศ.ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์)
กรรมการ

.....
(ผศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา)
กรรมการ

.....
(รศ.ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
กรรมการและเลขานุการ/
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....
(รศ.ดร.ทวิช จิตรสมบูรณ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

.....
(รศ.ดร.กนก ผลารักษ์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

นางสาวสุภาวดี มานะไตรนนท์ : ความสัมพันธ์ของอัลลีล Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนม
(Association of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) Alleles with Occurrence of Clinical Mastitis in Dairy Cattle)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง, 52 หน้า. ISBN 974-533-172-4

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของอัลลีลยีน Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการใช้ยีน BoLA-DRB3 เป็น Marker Assisted Selection (MAS) ในการปรับปรุงพันธุกรรมโคนมให้สามารถต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ การทดลองนี้ใช้ข้อมูลการเกิดโรคและกลุ่มตัวอย่างโคนมจำนวน 103 ตัว (มีประวัติเป็นโรคเต้านมอักเสบ 37 ตัวและไม่มีประวัติเป็นโรคเต้านมอักเสบ 66 ตัว) ซึ่งเป็นพันธุ์ผสมกับพันธุ์โฮสไตน์เฟร์เชียนที่มีระดับเลือดโฮสไตน์เฟร์เชียนมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สกัดดีเอ็นเอจากเลือดและนำดีเอ็นเอมาหาลักษณะอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 โดยวิธี nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (nested PCR-RFLP) (van Eijk et al., 1992). การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของยีนกับลักษณะการเป็นโรคหรือไม่เป็นโรคโดยใช้คำสั่ง PROC GENMOD ในโปรแกรม SAS6.12 จากการศึกษาพบว่าอัลลีล DRB3.2*8 มีโอกาสเป็นโรคเต้านมอักเสบด้วยความน่าจะเป็นต่ำสุดคือ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และอัลลีล DRB3.2*7 มีโอกาสเป็นโรคเต้านมอักเสบด้วยความน่าจะเป็นมากที่สุดคือ 75.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัลลีล DRB3.2*11, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*51, DRB3.2*23 และ DRB3.2*52 มีโอกาสเป็นโรคเต้านมอักเสบด้วยความน่าจะเป็น 22.2, 22.2, 33.3, 40.0, 50.0 และ 60.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ($p<0.01$) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนมและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็น MAS ช่วยในการปรับปรุงพันธุกรรมโคนมให้ต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์	ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ปีการศึกษา 2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

SUPAWADEE MANATRINON : ASSOCIATION OF THE BOVINE LYMPHOCYTE ANTIGEN DRB3 (BOLA-DRB3) ALLELES WITH OCCURRENCE OF CLINICAL MASTITIS IN DAIRY CATTLE : ASSIST. PROF. PONGCHAN NA LAMPANG, Ph.D. 52 PP. ISBN 974-533-172-4

The objective of this study was to evaluate potential relationships between Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 (BoLA-DRB3) alleles and clinical mastitis in dairy cattle. The BoLA-DRB3 gene was used in Marker-Assisted Selection to improve mastitis resistance in dairy cattle. Sample were collected from 103 crossbred Holsteins Fresian (>75 percent) cattle of which 37 were mastitis infected and 66 were mastitis noninfected. White blood cells were used as the source of DNA. Polymorphisms of the alleles of the BoLA-DRB3 gene were examined, using the nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (nested PCR-RFLP) technique (van Eijk et al., 1992). The relationships between BoLA-DRB3 alleles with the disease incidence were analyzed using the GENMOD procedures of SAS6.12. The result showed that DRB3.2*8 allele had the lowest mastitis incidence with probability of 12.5 percent and DRB3.2*7 allele had the highest mastitis incidence with probability of 75.0 percent. The occurrence probability of mastitis of alleles DRB3.2*11, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*51, DRB3.2*23 and DRB3.2*52 were 22.2, 22.2, 33.3, 40.0, 50.0 and 60.0 percent ($p<0.01$), respectively. In conclusion, the BoLA-DRB3 alleles have potential usefulness as MAS of mastitis occurrence in dairy cattle.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์	ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ปีการศึกษา 2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.กนก ผลารักษ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัศ-คาร์นส์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำ ช่วยเหลือ อย่างดียิ่ง ทั้งทางด้านวิชาการและด้านการดำเนินการวิจัย ตลอดจนคำแนะนำในการเขียน การตรวจแก้วิทยานิพนธ์ และสนับสนุนค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ, ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย และ ดร.ปิยดา ทิพยผ่อง ที่ให้คำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์โคนมและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณเงินสนับสนุนส่วนหนึ่งจากโครงการวิจัยและประยุกต์ใช้การแยกเพศตัวอ่อนโคนม โดยวิธี PCR-specific DNA ซึ่งเป็นโครงการวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณ คุณเพลิน เมินกระโทก, คุณสมพงษ์ ปาติตัง และคุณเกชา คูหาที่ให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ บุคลากรประจำอาคารเครื่องมือ 2 และ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ ที่อยู่ S14B ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณวริษา สินทวีวรกุลที่คอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรมและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีมาตลอดและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สุภาวดี มานะไตรนนท์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ(ภาษาไทย).....ก
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ).....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ฉ
สารบัญภาพ.....ช
บทที่
บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....2
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น.....3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....3
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....3
2. วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 โรคเต้านมอักเสบ.....4
2.2 ความสูญเสียจากการที่โคนมเป็นโรคเต้านมอักเสบ.....4
2.3 โรคเต้านมอักเสบในประเทศไทย.....5
2.4 การปรับปรุงพันธุ์สัตว์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding).....6
2.5 การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ Marker ช่วยในการคัดเลือก.....6
2.6 Major Histocompatibility Complex (MHC).....8
2.7 การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ยีน BoLA-DRB3 เป็น Marker-Assisted Selection ช่วยในการคัดเลือก.....9
3. วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 การเก็บรวบรวมข้อมูลการเป็นโรคเต้านมอักเสบของแม่โคนมที่ใช้ในการศึกษา.....12
3.2 การตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมของการเกิดโรคเต้านมอักเสบโดยเทคนิค nested PCR-RFLP.....12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.1 การเจาะเลือด....12
3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ....12
3.2.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR....13
3.2.4 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ....15
3.2.5 การทำ polyacrylamide gel electrophoresis....15
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล....16
3.3.1 การหาความถี่ยีนของประชากร....16
3.3.2 การใช้ Proc GENMOD ใน SAS6.12....16
3.4 สถานที่ทำการทดลอง....17
3.5 ระยะเวลาทำการทดลอง....17
4. ผลการทดลอง....18
4.1 ผลการทดลองที่เป็นตัวอย่างแถบดีเอ็นเอ....18
4.2 รูปแบบของอัลลีลที่พบในฝูงโคนม....20
4.3 ความถี่ยีนของอัลลีลพบในประชากรโคนม....23
4.4 การวิเคราะห์อิทธิพลของอัลลีล....26
5. วิจารณ์ผลการทดลอง....29
5.1 การกระจายตัวของยีน....29
5.2 ความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3 กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบ....29
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ....31
6.1 สรุปผลการทดลอง....31
6.2 ข้อเสนอแนะ....31
รายการอ้างอิง....33
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก แสดงคำสั่ง sas ที่ใช้ใน Proc GENMOD และการแปลงค่าประมาณ....38
ภาคผนวก ข การเรียกชื่อยีน BoLA-DRB3 ที่ถูกจำแนกด้วยวิธี nested PCR-RFLP....40
ภาคผนวก ค รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* ...42
ภาคผนวก ง แสดงรูปแบบของยีน BoLA-DRB3....48
ประวัติผู้เขียน....52

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1 ความสัมพันธ์ของอัลลีลของยีน Bovine Lymphocyte Anitigen Complex A (BoLA-A).....7

2.2 ความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3.2 กับลักษณะทางเศรษฐกิจ.....10

2.3 ความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3.2 กับโรคต่าง ๆ.....10

4.1 รูปแบบของ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* และอัลลีลที่พบและเทียบได้จากรายงานอื่น ๆ ….....…….....21

4.2 รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* และอัลลีลที่พบซึ่งไม่มีรายงานไว้ก่อน….....…….....22

4.3 ความถี่ยีนของอัลลีลที่พบในประชากรโคนมที่ศึกษา…..….....…….....23

4.4 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของอัลลีลจากการใช้ Proc GENMOD….....…….....26

4.5 ผลการวิเคราะห์อัลลีล, ค่าประมาณ, ค่าความน่าจะเป็น, ความถี่ยีน, จำนวนตัวที่เป็นเต้านมอักเสบ และจำนวนสัตว์ที่ไม่เป็นโรคเต้านมอักเสบ…….....27

5.1 อัลลีลที่ต้านทานโรคและอัลลีลที่เป็นโรคได้ง่ายในแต่ละการทดลอง…..……....30

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

4.1 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ nested PCR…..….....18

4.2 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์*BstYI*….....…19

4.3 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*…..….....19

4.4 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII*….....…20

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลกับค่าความน่าจะเป็นในการเป็นโรคเต้านมอักเสบ……...28

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเต้านมอักเสบ เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อบริเวณเต้านม ทำให้ปริมาณน้ำนมลดลง โรคเต้านมอักเสบเป็นโรคที่สร้างความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอันดับหนึ่งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม (Lin et al., 1989) ปัจจัยที่ทำให้เป็นเต้านมอักเสบมีอยู่ 3 ปัจจัย คือ ตัวแม่โคเอง, เชื้อโรค และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Mcdonald, 1979 and Suriyasathaporn *et al*., 2000) จากการศึกษาของ Lin et al., (1989) พบว่าโคนมที่ให้น้ำนมตั้งแต่แลคเตชั่นที่ 2 ขึ้นไป จะเป็นโรคเต้านมอักเสบสูงที่สุด ส่วนในแลคเตชั่นที่ 1 โคนมจะเป็นโรคเต้านมอักเสบเป็นอันดับที่ 2 รองจากปัญหาการคลอดยาก

การป้องกันไม่ให้เกิดโรคเต้านมอักเสบทำได้โดยอาศัยการจัดการที่ดีเพื่อควบคุมเชื้อโรคที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบไม่ให้แพร่กระจายจากสัตว์ตัวหนึ่งไปสู่สัตว์ตัวอื่น ๆ ได้ ซึ่งทำได้ยากมากหรืออาจทำไม่ได้เลย เพราะเชื้อโรคเหล่านี้อยู่แพร่กระจายทั่วไปภายในฟาร์ม ไม่ว่าจะอยู่ที่ตัวโคเอง, ตามพื้นดิน หรืออุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดนม ฯลฯ วิธีที่ดีในการป้องกันไม่ให้เกิดโรคเต้านมอักเสบก็คือการปรับปรุงพันธุกรรมโคนมให้ต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งสามารถทำได้โดยการคัดเลือกโดยดูจากค่า somatic cell count (SCC) แต่การคัดเลือกโดยวิธีนี้ใช้เวลานานเพราะต้องรอให้แสดงลักษณะการให้น้ำนมก่อนจึงจะทราบได้ว่าตัวไหนเป็นโรคหรือต้านทานโรค จึงมีการศึกษาเพื่อนำความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้ในการคัดเลือกสัตว์ ช่วยในการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของตัวสัตว์ได้โดยตรงเรียกว่า marker assisted selection (MAS) (Soller, 1994; Dodgson et al., 1997 and Vint, 1997) โดย marker ที่ใช้อาจจะเป็นยีนหรือเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอน (DNA fragment) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคเต้านมอักเสบ สามารถช่วยให้การคัดเลือกจากลักษณะทางพันธุกรรมของโคโดยตรง ไม่ต้องรอดูลักษณะปรากฏ (phenotype) จึงสามารถนำมาใช้ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์สัตว์ช่วยให้การคัดเลือกรวดเร็วเพราะสามารถคัดเลือกได้ตั้งแต่เมื่อสัตว์อายุยังน้อยอยู่และมีความแม่นยำ สามารถช่วยลดความเสี่ยงของโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนมได้

การต้านทานโรคในสัตว์เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ โดยยีน major histocompatibility complex (MHC) มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการต้านทานโรค (Lewin, 1989 and Shook, 1989) จากการศึกษาพบว่า bovine lymphocyte antigen DRB3

(BoLA-DRB3) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ MHC สามารถนำมาใช้เป็น MAS ในการช่วยคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของโคนมให้สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ (Mallard et al., 1995; Dietz et al., 1997a; Dietz et al., 1997b; Kelm et al., 1997; Starkenburg et al., 1997; Sharif et al., 1998a) พบว่าอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 ที่แตกต่างกันมีความสัมพันธ์กับการต้านทานโรคเต้านมอักเสบที่แตกต่างกัน จึงสามารถนำยีน BoLA-DRB3 มาประยุกต์ใช้เป็น MASในการปรับปรุงพันธุ์โคนมให้ต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบได้ ซึ่งจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) พบว่าบริเวณยีน BoLA-DRB3 เป็นบริเวณที่มี polymorphism สูง โดยมี อัลลีล ที่แตกต่างกันมากถึง 30 อัลลีล (van Eijk et al.,1992 and Gilliespie et al., 1999) Sharif et al., (1998a) ศึกษาในโคพันธุ์ Holsteins พบว่าโคที่มี อัลลีล BoLA-DRB3.2*16 สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ และโคที่มี อัลลีล BoLA-DRB3.2*23 จะเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ แต่ในทางตรงกันข้าม Dietz et al. (1997a), Kelm et al. (1997) และ Dietz et al. (1997b) กลับรายงานว่าโคที่มี อัลลีล BoLA-DRB3.2*16 มีความเสี่ยงในการเป็นโรคเต้านมอักเสบสูง นอกจากนี้ Dietz et al. (1997b) ยังรายงานอีกว่าโคที่มี อัลลีล BoLA-DRB3.2*23 มีแนวโน้มในการต้านทานโรคได้ จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่าในกลุ่มของประชากรที่แตกต่างกันจะมี อัลลีล ที่ต้านทานและ อัลลีล ที่เป็น marker ของการต้านทานโรคแตกต่างกันไป และถึงแม้จะเป็น อัลลีล เดียวกันแต่อยู่คนละประชากรกันก็ให้ผลที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การหา อัลลีล ของยีน BoLA-DRB3 ที่เป็น marker ของความสามารถต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนมของมหาวิทยาลัยสุรนารี เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อลดความเสี่ยงในการเป็นโรคเต้านมอักเสบของโคนมฝูงนี้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของอัลลีลยีน BoLA-DRB3 รูปแบบต่าง ๆ กับการแสดงอาการโรคเต้านมอักเสบ

2.เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาลักษณะพันธุกรรมของยีน BoLA-DRB3 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

ยีน BoLA-DRB3 สามารถใช้เป็น marker ของความสามารถในการต้านทานโรคเต้านมอักเสบในโคนมได้

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1. โคนมที่ต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ คือ โคนมที่ไม่แสดงอาการโรคเต้านมอักเสบ

2. โคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ คือ โคนมที่แสดงอาการโรคเต้านมอักเสบจากการดูด้วยสายตาและมีประวัติการรักษา

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาหาความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3 กับการแสดงอาการโรคเต้านมอักเสบของแม่โคนม โดยโคนมที่ใช้ในการศึกษาเป็นโคนมพันธุ์ผสมที่มีเลือด Holstein มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และทำการศึกษาภายในฟาร์มโคนมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อใช้ผลของการศึกษาที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้ยีน BoLA-DRB3 เป็น marker สำหรับช่วยในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคเต้านมอักเสบโดยลดระยะเวลาในการคัดเลือกลักษณะให้สั้นลงในโคนมที่เลี้ยงในประเทศไทย

2. เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหา อัลลีล ต่าง ๆ ของยีน BoLA-DRB3 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเต้านมอักเสบ

โรคเต้านมอักเสบ คือ การเปลี่ยนแปลงภายในเต้านมที่ขึ้นอยู่กับการระคายเคืองเต้านม ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระด้านจุลชีวะและการพบเชื้อโรค ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเต้านม น้ำนมจากโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบจะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่ในน้ำนมมากกว่ากว่าปกติ เรียกว่าเซลล์โซมาติก (somatic cell) โรคเต้านมอักเสบมี 2 แบบ คือ (1) โรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (clinical mastitis) เต้านมแม่โคจะมีอาการบวมแดง ร้อน แสดงอาการอักเสบชัดเจน เมื่อน้ำนมเปลี่ยนลักษณะเป็นตะกอน ก้อน หรือออกใส แม่โคอาจมีอาการเป็นไข้ร่วมด้วย และ (2) โรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis) เต้านมและลักษณะน้ำนมไม่แสดงอาการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ให้เห็นด้วยตาเปล่า แต่มีการติดเชื้อแฝงอยู่ในเต้านมและเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำนมมีจำนวนเพิ่มขึ้น เซลล์สร้างน้ำนมมีความเสียหาย การผลิตน้ำนมลดลงอาจพัฒนาไปสู่การเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ โดยทั่วไปเมื่อพบว่ามีแม่โคแสดงอาการเป็นโรคเต้านมอักเสบ 1 ตัว จะแสดงถึงว่าน่าจะมีแม่โคอื่น ๆ ในฝูงเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการแฝงอยู่อย่างน้อย 20-40 ตัว (สุณีรัตน์, 2544)

2.2 ความสูญเสียที่เกิดจากโคนมเป็นโรคเต้านมอักเสบ

โรคเต้านมอักเสบเป็นโรคที่เกิดขึ้นมากในโคนมและเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ โรคเต้านมอักเสบนอกจากจะมีผลต่อสุขภาพของตัวสัตว์แล้วยังมีผลเสียต่อผลผลิตปริมาณน้ำนมด้วยโดยความสูญเสียที่เกิดจากการเป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการจะทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลงไปถึง 20 เปอร์เซ็นต์ (Miller, 1973) โดยความสูญเสียที่วัดในรูปของค่า Somatic Cell Count (SCC) เป็นดังนี้ คือ ถ้าค่า SCC อยู่ในช่วง 250,000-499,000 เซลล์/มิลลิลิตร จะสูญเสียปริมาณน้ำนมไป 164 กิโลกรัมต่อตัวต่อปี, ค่า SCC ที่อยู่ในช่วง 500,000-749,000 เซลล์/มิลลิลิตร จะสูญเสียปริมาณน้ำนมไป 289 กิโลกรัมต่อตัวต่อปี, ค่า SCC ที่อยู่ในช่วง 750,000-999,000 เซลล์/มิลลิลิตร จะสูญเสียปริมาณน้ำนมไป 661 กิโลกรัมต่อตัวต่อปี และค่า SCC ที่มากกว่า 1,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร จะสูญเสียปริมาณน้ำนมไป 770 กิโลกรัมต่อตัวต่อปี (King, 1972) นอกจากนี้ผลจากการเป็นโรคเต้านมอักเสบยังทำให้คุณภาพของน้ำนมเปลี่ยนแปลงไป คือ ค่า Solid Not Fat (SNF), ไขมัน, แลคโตส, โปรตีน และเคซีนลดลงไป (Harmon, 1994) และเมื่อนำ

โรคเต้านมอักเสบมาคิดเป็นความสูญเสียทางเศรษฐกิจสามารถคิดได้ได้ดังนี้ (1) ความสูญเสียที่เกิดขึ้นจากการที่น้ำนมลดลง 69.3 เปอร์เซ็นต์ (2) น้ำนมที่ต้องทิ้งไป 11 เปอร์เซ็นต์ (3) ต้องหาโคทดแทนเร็วขึ้น 8 เปอร์เซ็นต์ (4) มูลค่าแม่โคที่ขายไปลดลง 4.9 เปอร์เซ็นต์ (5) ค่ายา 3.2 เปอร์เซ็นต์(6) ค่าบริการทางสัตวแพทย์ 1.7 เปอร์เซ็นต์ และ (7) ค่าแรงงาน 1.9 เปอร์เซ็นต์ (Blosser, 1979)

2.3 โรคเต้านมอักเสบในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนมตั้งแต่ปี พ.ศ.2510 จนถึงปี พ.ศ.2542 ทั้งหมด 11 รายงาน (จันทรจรัส และเปล่งศรี, 2542) ซึ่งเป็นรายงานที่บ่งบอกถึงสภาพการณ์ของโรคเต้านมอักเสบในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย โดย (1) เขตภาคกลางได้มีรายงานการศึกษาโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่าอาการแบ่งได้เป็นชนิดรุนแรง (acute), รุนแรงน้อย (sub acute) และชนิดเรื้อรัง (chronic) โดยชนิดรุนแรงน้อยพบมากที่สุด (ชวนิศนดากรและคณะ, 2510) (2) เขตภาคใต้ได้มีการศึกษาอยู่ 2 งานวิจัยคือ ศุภลักษณ์และคณะ (2536) ศึกษาการเกิดโรคเต้านมอักเสบในโคนมภาคใต้จำนวน 103 ตัว ในปี พ.ศ.2534 ตรวจพบโรคเต้านมอักเสบชนิดไม่แสดงอาการ 37 เปอร์เซ็นต์ และชนิดแสดงอาการ 62.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวาสนาและคณะ (2538) ศึกษาภาวะโรคเต้านมอักเสบในโคนมภาคใต้ 9 จังหวัดในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ.2536 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2537 พบโคเป็นโรคเต้านมอักเสบชนิดแสดงอาการ และไม่แสดงอาการ 1.4 เปอร์เซ็นต์ และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (3) เขตภาคเหนือ ได้มีการศึกษาโรคเต้านมอักเสบชนิดไม่แสดงอาการในโคนมของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ เชียงใหม่ โดยวิธี California Mastitis Test (CMT) ทุกเดือนติดต่อกัน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2528 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ.2532 พบว่าอัตราการเกิดโรคตลอดการศึกษา มีอยู่ถึง 33.1 เปอร์เซ็นต์ (อัมพวันและคณะ, 2537) (4) เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้มีการศึกษาภาวะของโรคเต้านมอักเสบในโคนม 1,139 ตัว ที่เลี้ยงในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 จังหวัด พบโรคเต้านมอักเสบเป็นชนิดแสดงอาการ 10.9 เปอร์เซ็นต์ ชนิดไม่แสดงอาการ 89.1 เปอร์เซ็นต์ (นิมิตและคณะ, 2537)

จากรายงานทั้งหมดข้างต้นเป็นรายงานของการศึกษาโรคเต้านมอักเสบในประเทศไทย การที่สามารถควบคุมโรคเต้านมอักเสบออกจากฝูงโคนมได้จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของฟาร์มในการผลิตน้ำนมโคได้เป็นอย่างดี การควบคุมโรคเต้านมอักเสบออกจากฝูงวิธีหนึ่งที่สามารถจะเป็นไปได้ก็คือ การปรับปรุงพันธุกรรมโคนมให้สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันอัตราการเป็นโรคเต้านมอักเสบเพิ่มมากขึ้นทุกปี สาเหตุที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มผลผลิตปริมาณน้ำนมต่อตัวต่อปีให้มากขึ้นเป็นผลทำให้อัตราการเป็นโรคเต้านมอักเสบเพิ่มขึ้นทุกปี (Shanks et al., 1978, Strandberg and Shook, 1989 and Wilton et al.,

1972) จากการศึกษาพบว่าค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic correlation) ระหว่างลักษณะปริมาณน้ำนมกับโรคเต้านมอักเสบอยู่ในช่วง –0.07 ถึง +0.33 (Shook, 1989) ค่าเฉลี่ยเท่ากับ +0.20 ซึ่งค่าสหสัมพันธ์อยู่ในช่วงบวกแสดงให้เห็นว่าเมื่อคัดเลือกโคให้มีปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้นก็จะทำให้โคมีลักษณะการเป็นโรคเต้านมอักเสบเพิ่มขึ้น

2.4 การปรับปรุงพันธุ์โคนมให้ต้านทานโรคเต้านมอักเสบโดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์โคนมให้ต้านทานโรคเต้านมอักเสบโดยวิธีดั้งเดิมที่นิยมทำกันมาก คือ วิธีทางอ้อม (indirect selection) ดูจากลักษณะค่าของ SCC โคนมที่มีค่า SCC สูงก็แสดงว่าสัตว์ตัวนั้นเป็นโรคเต้านมอักเสบอยู่ในระดับความรุนแรงที่สูงตามด้วย ซึ่งการคัดเลือกโดยดูจากค่า SCC นี้มีข้อดีกว่าการคัดเลือกโดยดูจากลักษณะการเป็นโรคเต้านมอักเสบโดยตรง เนื่องจากค่า SCC สามารถบอกว่าโคนมเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการได้ (sub clinical) ซึ่งถ้าคัดเลือกจากลักษณะการเป็นโรคเต้านมอักเสบโดยตรงก็จะคัดเลือกได้แต่โรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการเท่านั้น นอกจากนี้ค่าอัตราพันธุกรรม (heritability) ของลักษณะ SCC สูงกว่าค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (Shook and Schutz., 1994) ค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic correlation) ระหว่างลักษณะ SCC กับ ลักษณะโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ มีค่าสูงถึง 0.6-0.8 ด้วยเหตุผลทั้งหมดที่กล่าวมาจึงสามารถใช้ลักษณะ SCC มาปรับปรุงพันธุ์โคนมให้ต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้

การปรับปรุงพันธ์โคนมให้ต้านทานโรคเต้านมอักเสบจากลักษณะ SCC โดยนิยมแปลงค่า SCC ให้เป็นค่า somatic cell score (SCS) เพราะการกระจายของลักษณะ SCC เป็นกราฟเบ้ (skewness) จึงต้องทำการแปลง (transform) จากค่า SCC ให้เป็น SCS ด้วยวิธี logarithm ฐาน 2 (Ali and Shook., 1980) จะทำให้ได้การกระจายเป็นแบบปกติ (normal distribution) วิธีการแปลงนี้เป็นวิธีของ DHI Dairy Records Processing Centers ในประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งใช้วิธีนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1983 เป็นต้นมา (Shook and Schutz., 1994) โดยมีหลักการคร่าว ดังนี้ ค่า SCC เท่ากับ 100 เซลล์ต่อไมโครลิตร ให้มีค่า SCS เท่ากับ 3 ทุก ๆ 1 unit ของ SCS ที่เพิ่มหรือลด จะหมายถึงค่า SCC ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงเท่าตัว เช่น SCS เท่ากับ 2 หมายถึง SCC เท่ากับ 50, SCS เท่ากับ 4 และ 5 หมายถึง SCC เท่ากับ 200 และ 400 ตามลำดับ

2.5 การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ Marker ช่วยในการคัดเลือก (Marker-Assisted Selection)

Marker-Assisted Selection (MAS) เป็นการใช้ genetic markers ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ ๆ หรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่มีผลต่อลักษณะปรากฏของสัตว์มาใช้คัดเลือกสัตว์ให้มี

ลักษณะตามต้องการ MAS มีประโยชน์มากในการปรับปรุงลักษณะเชิงปริมาณ เช่น ลักษณะการต้านทานโรค เป็นต้น การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธี MAS เหมาะที่จะนำมาใช้กับลักษณะที่ต้องการปรับปรุงนั้นมีค่าอัตราพันธุกรรม (heritability) และความถี่ยีนในระดับต่ำ (Shook, 1989 and Russell and Thompson, 1990) เพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก ลด generation interval และประหยัดกว่าการคัดเลือกโดยวิธีแบบดั้งเดิม จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุกรรมให้สัตว์ต้านทานโรคโดยเฉพาะโรคเต้านมอักเสบซึ่งมีค่าอัตราพันธุกรรมเท่ากับ 0.15 (Uribe et al., 1995) ซึ่งต่างกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมที่จะมีประสิทธิภาพเมื่อค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะนั้น ๆ อยู่ในระดับสูง ดังนั้นวิธี MAS จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุกรรมของลักษณะที่ไม่สามารถปรับปรุงพันธุกรรมด้วยวิธีแบบดั้งเดิมได้ genetic markers ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธ์สัตว์มีอยู่หลายตัว คือ ยีน BoLA class I (Aarestrup et al., 1995, Weigel et al., 1990 and Larsen et al., 1985), ยีน BoLA class II และ microsatellite (Ashwell et al., 1996) จากการศึกษา ยีน BoLA class I พบว่าอัลลีล A11 มีความสัมพันธ์กับค่า ln SCC ที่ต่ำ (Aarestrup et al., 1995) นั่นคือมีโอกาสเป็นโรคเต้านมอักเสบน้อย ขณะที่โคที่มีอัลลีล A16 จะเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ง่าย (Larsen et al., 1985) และจากการศึกษาของ Weigel et al., (1990) พบว่าโคที่มีอัลลีล *W11* มีโอกาสเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ต่ำ และโคที่มีอัลลีล *W16* มีโอกาสเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ง่าย ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ของอัลลีลของยีน BoLA-A

อัลลีล	การเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ[1]
W19(W6)	.14 ± .21
W14(W8)	-.14 ± .22
W15(W8)	.22 ± .25
W27	-.30 ± .29
W11	-.77** ± .30
W31(W30)	.26 ± .39
W16	.40 ± .29
*W20*A	-.09 ± .15
EU28D	.28 ± .29

[1]ค่าเฉลี่ย ± S.D., ** P<.01

[1]<u>ที่มา</u> Weigel et al., (1990)

และจากการศึกษา microsatellite ทั้งหมด 20 ตัว ซึ่งกระจายอยู่บนโครโมโซม 5 แท่งคือแท่งที่ 4, 8, 13, 17 และ 23 พบ microsatellite ที่เชื่อถือได้ทางสถิติว่ามีความสัมพันธ์กับค่า SCC คือ microsatellite ที่ชื่อว่า 513 พบว่ามี polymorphism 11 อัลลีล และจากแผนที่ยีน (gene mapping)พบว่า microsatellite 513 นี้อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 23 และอยู่ใกล้กับยีน BoLA ด้วย (Ashwell et al., 1996) เป็นการสนับสนุนให้เห็นว่ากลุ่มของยีนบริเวณ BoLA นั้น สามารถนำมาใช้เป็น MAS ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ได้ ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปที่การศึกษายีน BoLA โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีน BoLA class II (BoLA DRB3.2) ซึ่งจะกล่าวโดยละเอียดต่อไป

2.6 Major Histocompatibility Complex (MHC)

ลักษณะการเป็นโรคหรือไม่เป็นโรคของสัตว์ (disease resistant) เป็นลักษณะเชิงปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ซึ่งการที่สัตว์เป็นโรคหรือไม่เป็นโรคในระดับความรุนแรงที่แตกต่างกันไปอาจเป็นผลมาจากการที่สัตว์เหล่านั้นได้รับเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่างชนิดกัน (Jain, 1979) หรือยังปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายปัจจัยที่เป็นสาเหตุ แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่สำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากันก็คือปัจจัยทางด้านพันธุกรรมซึ่งในสัตว์ก็คือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีหน้าที่ที่สำคัญในการควบคุมการติดเชื้อโดยจะมีบทบาทในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell (APC) อยู่บริเวณผิวเซลล์ ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) ในหนู MHC จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (Hood et al., 1983) ในคนจะเรียก MHC ว่า HLA จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ส่วนในโคนม MHC นี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 23 บริเวณ short arm แบ่งได้เป็น 2 class คือ Class I และ Class II molecules ซึ่งแบ่งตาม cell surface glycoprotein Class I และ Class II molecules จะแตกต่างกันที่หน้าที่ (functional) ทางชีวเคมี(biochemical) และอวัยวะที่พบเซลล์นี้อยู่ Class I molecules จะเสนอแอนติเจน (present antigen) ให้กับ CD8+ lymphocytes (predominantly cytotoxic T cells) ส่วน Class II molecules จะเสนอแอนติเจนให้กับ CD4+ lymphocytes (prodominantly T-helper cells) ในโคนม class I antigens จะถูกควบคุมด้วย BoLA-A locus (Stear et al., 1982) โดย Class II มีอย่างน้อย 12 loci แบ่งได้เป็น 2 บริเวณ คือ Class IIa และ Class IIb โดย Class IIa ประกอบไปด้วย 8 loci คือ DRA, DRB1, DRB2, DRB3, DQA, DQA2, DQB1 และ DQB2 ส่วน Class IIb ประกอบไปด้วย 4 loci คือ DYA, DYB, DIB และ DOB (Lewin.,1996) จากการศึกษาพบว่ายีนที่อยู่บริเวณหรือใกล้กับ MHC นี้จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลักษณะการต้านทานโรคและลักษณะผลผลิต (Weigel et al., 1990)

2.7 การปรับปรุงพันธุกรรมโดยใช้ยีน BoLA-DRB3.2 เป็น MAS ช่วยในการคัดเลือก

ยีน BoLA-DRB3.2 เป็นส่วนหนึ่งของ MHC ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคดังนั้นถ้าพบว่ายีน BoLA-DRB3.2 มีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ก็น่าที่จะนำมาใช้เป็น MAS ช่วนในการคัดเลือกสัตว์ให้ต้านทานโรคได้ Dietz et al. (1997a) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3.2 กับระบบภูมิคุ้มกันพบว่ามีความสัมพันธ์กันดังนี้คือ อัลลีล BoLA-DRB3.2*8 มีผลทำให้มีปริมาณเซลล์ mononuclear ลดลง แต่ปริมาณ IgM เพิ่มขึ้น อัลลีล BoLA-DRB3.2*11 มีผลทำให้มีปริมาณเซลล์ mononuclear ลดลงแต่ ปริมาณ IgG2 เพิ่มขึ้น อัลลีล BoLA-DRB3.2*24 มีผลทำให้มีปริมาณ neutrophils และ IgG2 เพิ่มขึ้น อัลลีล BoLA-DRB3.2*22 และ อัลลีล BoLA-DRB3.2*16 มีผลทำให้มีปริมาณเซลล์ mononuclear ลดลงแต่ปริมาณ IgM เพิ่มขึ้น อัลลีล BoLA-DRB3.2*26 มีผลทำให้ปริมาณ eosinophils เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณ IgG2 ลดลง อัลลีล BoLA-DRB3.2*12, BoLA-DRB3.2*3 และ BoLA-DRB3.2*28 มีผลทำให้มีปริมาณ IgG2 เพิ่มขึ้น จากความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันนี้เองจึงมีการศึกษาต่อถึงความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3.2 กับค่า SCC ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงการระดับความรุนแรงของการเป็นโรคเต้านมอักเสบ พบว่า BoLA-DRB3.2*16 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของค่า SCC (Dietz et al., 1997b) อัลลีล BoLA-DRB3.2*11, BoLA-DRB3.2*23, BoLA-DRB3.2*24, BoLA-DRB3.2*12 และ BoLA-DRB3.2*11 สัมพันธ์กับความสามารถในการต้านทานโรคเต้านมอักเสบ โดย อัลลีล BoLA-DRB3.2*23 สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้สูงสุดในกลุ่มของประชากรโคนม (Kelm et al., 1997)

การคัดเลือกโดยใช้ ยีน BoLA-DRB3.2 ยังมีข้อดีอีก 2 ประการคือ (1) ยีน BoLA-DRB3.2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะการให้ปริมาณน้ำนม ไขมันและโปรตีน พบ อัลลีล ที่มีความสัมพันธ์อยู่ 13 อัลลีลในแลคเตชั่นที่ 1 คือ อัลลีล BoLA-DRB3.2*3, BoLA-DRB3.2*7, BoLA-DRB3.2*8, BoLA-DRB3.2*9, BoLA-DRB3.2*10, BoLA-DRB3.2*11, BoLA-DRB3.2*12, BoLA-DRB3.2*16, BoLA-DRB3.2*22, BoLA-DRB3.2*23, BoLA-DRB3.2*24, BoLA-DRB3.2*26 และ BoLA-DRB3.2*27 โดยพบความสัมพันธ์กันทั้งในเชิงลบและเชิงบวก เช่น อัลลีล BoLA-DRB3.2*3 สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ แต่ก็มีผลทำให้ ปริมาณน้ำนม ไขมัน และโปรตีนลดลงไปด้วย อัลลีล BoLA-DRB3.2*7 สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ แต่กลับทำให้ปริมาณน้ำนม ไขมัน และโปรตีนเพิ่มขึ้น อัลลีล BoLA-DRB3.2*8 สามารถต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ ปริมาณน้ำนมและโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณไขมันลดลง (Sharif et al., 1998b) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3.2 กับลักษณะทางเศรษฐกิจ

อัลลีล	ปริมาณน้ำนม (กก.)	ปริมาณไขมัน(กก.)	ปริมาณโปรตีน (กก.)
ค่าเฉลี่ย (± SE)	8289±1725	307.7±67	264±52
DRB3.2*3	-8.2±170.9	7.7±7.0	1.2±5.1
DRB3.2*7	-117.4±222.7	-0.3±9.1	-2.1±6.7
DRB3.2*8	200.7*±92.1	6.95±3.8	7.8**±2.8
DRB3.2*11	35.54±100.4	5.5±4.1	3.1±3.0
DRB3.2*16	-104.3±137.1	-1.6±5.6	-3.5±4.1
DRB3.2*22	-205.5±114.6	-5.05±4.7	-6.75*±3.4
DRB3.2*23	-92.2±151.4	-4.9±6.2	-5.6±4.5

**P<.01 และ *P<.05

ที่มา Sharif et al., (1998b)

และ (2) ยีน BoLA-DRB3.2 มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคต่าง ๆ คือ โรคเต้านมอักเสบ โรครังไข่ฝ่อ โรครกค้าง และโรคไข้น้ำนม โดยอัลลีล BoLA-DRB3.2*23 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเต้านมอักเสบ โรครกค้างได้ง่าย แต่ต้านทานโรคไข้น้ำนมได้ดี อัลลีล BoLA-DRB3.2*3 สามารถต้านทานโรครกค้าง อัลลีล BoLA-DRB3.2*16 สามารถต้านทานโรครังไข่ฝ่อและโรคไข้น้ำนม อัลลีล BoLA-DRB3.2*22 สามารถต้านทานโรครังไข่ฝ่อได้ (Sharif et al., 1998a) ดังตารางที่ 2.3

ตาราง 2.3 ความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3.2 กับโรคต่าง ๆ

อัลลีล	โรคเต้านมอักเสบ	โรครังไข่ฝ่อ	โรครกค้าง	โรคไข้น้ำนม
DRB3.2*3	-	-	0.04(-)	-
DRB3.2*16	-	0.03(-)	-	0.07(-)
DRB3.2*22	-	0.03(-)	-	-
DRB3.2*23	0.023(+)	-	0.09(+)	0.08(-)

ที่มา Sharif et al., (1998a)

จากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมาสรุปได้ว่ายีน BoLA-DRB3.2 สามารถใช้เป็น MAS ได้เนื่องจาก พบว่า อัลลีล BoLA-DRB3.2 มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคเต้านมอักเสบโดยมีความสัมพันธ์กับค่า SCC (Dietz et al., 1997b) สัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Dietz et al., 1997a) นอก

จากนี้อัลลีล BoLA-DRB3.2 ยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางเศรษฐกิจ เช่น โปรตีน ปริมาณน้ำนม เป็นต้น (Starkenburg et al., 1997) และยังสัมพันธ์กับโรคอื่น ๆ อีกด้วย (Sharif et al., 1998) โดยพบว่าอัลลีลของยีน BoLA-DRB3.2 ที่ต่างกันจะมีความสามารถในการต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ในระดับที่ต่างกัน และอัลลีลของยีน BoLA-DRB3.2 ที่ต่างกันยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางเศรษฐกิจที่ระดับต่างกัน เช่น บางอัลลีลให้โปรตีนต่ำ บางอัลลีลให้โปรตีนสูง เป็นต้น นอกจากนี้อัลลีลของยีน BoLA-DRB3 ที่ต่างกันจะมีความสามารถในการต้านทานโรคใดโรคหนึ่งได้ในระดับที่ต่างกัน (Sharif et al., 1998a) จากความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3 กับลักษณะต่าง ๆ ที่รายงานมาสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้สามารถปรับปรุงพันธุกรรมโคนมให้ต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ โดยที่ไม่ทำให้สัตว์ในฝูงมีผลผลิตต่ำลง(โปรตีน ไขมัน ปริมาณน้ำนม) หรือมีโอกาสเป็นโรคใดโรคหนึ่งเพิ่มขึ้น ซึ่งถือเป็นข้อดีที่สำคัญของการประยุกต์ใช้ MAS

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บรวบรวมข้อมูลการเป็นโรคเต้านมอักเสบของแม่โคนมที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลการเป็นโรคเต้านมอักเสบของแม่โคนมที่ใช้ในการศึกษาทุกตัว โดยดูจากบันทึกของข้อมูลการรักษาโรคโรคเต้านมอักเสบ

3.1.2 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อแบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ กับกลุ่มที่ไม่เคยเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ

3.2 การตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมของการเกิดโรคโรคเต้านมอักเสบโดยเทคนิค nested PCR-RFLP

3.2.1 การเจาะเลือด

<u>อุปกรณ์</u>

1. เข็มฉีดยา
2. eppendorf 1.5 ml.

<u>สารเคมี</u>

1. 0.5M EDTA

<u>วิธีทำ</u>

1. นำหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml. ที่มี 0.5M EDTA อยู่ 10 μl. ไปเก็บตัวอย่างเลือดโค 1 ml.
2. นำเลือดไปสกัด ดีเอ็นเอ หรือเก็บไว้ที่ -20°C

3.2.2 การสกัด ดีเอ็นเอ (Starkenburg et al.,1997)

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง
2. eppendorf 1.5 ml.

<u>สารเคมี</u>

1. 0.1N NaOH

2. 2M NaCl

3. Sterile Distilled Water (SDW)

<u>วิธีทำ</u>

1. นำตัวอย่างเลือดที่เก็บตามข้อ 3.2.1 มา 250 μl. ใส่ในหลอด eppendorf แล้วเติม SDW 1 ml.

2. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 1 นาที (ทำ 2 ครั้ง)

3. ทำการละลายตะกอนด้วย 0.1N NaOH 10 μl. และ 2M NaCl 10 μl.

4. นำไปไว้ที่ 95 ^{O}C นาน 2 นาที

5. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 1 นาที

6.เก็บส่วนใสซึ่งมี ดีเอ็นเอ อยู่ แล้วเจือจาง ดีเอ็นเอ ด้วย SDW 100 μl. นำไปเก็บที่ -20°C

3.2.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี nested Polymerase Chain Reaction (PCR) (Gilliespie et al., 1999)

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่อง Thermal cycle

<u>สารเคมี</u>

1. primers 3 ตัว ได้แก่

-HLO30 (5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3')

ที่มีความเข้มข้น = 5 μM หรือ 5 mM/μl.

-HLO31 (5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGAAGCT-3')

ที่มีความเข้มข้น = 5 μM หรือ 5 mM/μl.

-HLO32 (5'-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3')

ที่มีความเข้มข้น = 5 μM หรือ 5 mM/μl.

2. 1 mM dNTP (Gibco BRL®)

3. 10X PCR buffer with $(NH4)_2SO_4$ (Fermentas)

(200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 750 mM Tris-HCl pH 8.8 at 25°C, 1เปอร์เซ็นต์ Tween 20)

4. 25 mM $MgCl_2$(Fermentas)

5. steriled H_2O

6. Taq DNA polymerase (5U/μl.) (Fermentas)

<u>วิธีทำ</u>

reaction 1 (ปริมาตรรวม 25µl.)

1.ทำการผสมส่วนผสมเหล่านี้ให้เข้ากัน

primer HLO30	1.0	µl.
primer HLO31	1.0	µl.
dNTP	2.0	µl.
10X PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	1.5	µl.
$MgCl_2$	2.0	µl.
steriled H_2O	16.9	µl.
Taq DNA polymerase	0.2	µl.
ดีเอ็นเอ	1.0	µl.

2. นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งอุณหภูมิดังนี้

95 ^{O}C	270 วินาที	
95 ^{O}C	90 วินาที	10 รอบ
65 ^{O}C	120 วินาที	
72 ^{O}C	60 วินาที	
72 ^{O}C	5 นาที	

reaction 2 (ปริมาตรรวม 25 µl.)

1.ทำการผสมส่วนผสมเหล่านี้ให้เข้ากัน

primer HLO30	1.25	µl.
primer HLO32	1.25	µl.
dNTP	2.5	µl.
10X PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	1.5	µl.
$MgCl_2$	2.5	µl.
steriled H_2O	14.8	µl.
Taq DNA polymerase	0.2	µl.
ดีเอ็นเอจาก reaction ที่ 1	1.0	µl.

2. นำเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งอุณหภูมิดังนี้

95 ^{O}C	90 วินาที
65 ^{O}C	30 วินาที

72 ^{O}C 60 วินาที

ทำทั้งหมด 35 รอบ แล้วตามด้วย 72 ^{O}C 5 นาที

3.2.4 การตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

<u>อุปกรณ์</u>

1. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
2. eppendorf 1.5 ml.

<u>สารเคมี</u>

1. เอนไซม์ *Rsa I*, *HaeIII* และ *BstYI* (Fermentas)
2. reaction buffer (Fermentas)

<u>วิธีทำ</u>

1. แบ่ง PCR-product จากขั้นตอนที่ 3.2.3 ออกมาใส่หลอด eppendorf 3 หลอด ๆ ละ 5 μl.

2. แต่ละหลอดใส่เอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ *Rsa I*, *HaeIII* และ *BstYI* โดยใส่หลอดละ10 U และใส่ 10X reaction buffer หลอดละ 1 μl. แล้วเติมน้ำให้ได้ 10 μl.

3. หลอดที่ใส่ *Rsa I* และ *HaeIII* นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C ส่วนหลอดที่ใส่ *BstYI* นำไปบ่มที่ 50 ^{O}C ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.2.5 การทำ polyacrylamide gel electrophoresis (Gilliespie et al., 1999)

<u>อุปกรณ์</u>

1. ชุดอุปกรณ์การทำ gel electrophoresis
2. power supply
3. UV-transluminator
4. กล้องถ่ายรูป

<u>สารเคมี</u>

1. 40 เปอร์เซ็นต์ acrylamide
2. 2 เปอร์เซ็นต์ bisacrylamide
3. TBE buffer (0.9M Tris.base, 0.09M boric acid, 2.5 mM EDTA, pH8.3)
4. TEMED
5. 10% amoniumpersulfate
6. 1.0 μg/ml. ethidium bromide

7. 6Xdye (bromophenol blue กับ xylene cyanol FF)

8. 25 bps marker (Gibco BRL®)

<u>วิธีทำ</u>

1. ผสม acrylamide 3 ml. bis-acrylamide 2 ml. น้ำ 3.9 ml. TEMED 5 μl. amoniumpersulfate 100 μl. แล้วเทลงในอุปกรณ์การเตรียมเจลซึ่งจะได้แผ่นเจลที่มีความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์

2. นำผลการตัดด้วยเอนไซม์ตามขั้นตอนที่ 3.2.4 มาเติม dye จำนวน 2 μl. เพื่อช่วยให้มองเห็นขณะ run บน polyacrylamide gel

3. ประกอบชุด electrophoresis แล้วดูดสารที่ได้จากข้อ 2 มา 5 μl. หยอดลงในหลุมของแผ่นเจล

4. เปิดกระแสไฟฟ้า 25 mA นาน 55 นาที

5. นำแผ่นเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide นาน 20 นาที

6. จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องดูแถบเรืองแสงภายใต้แสงความยาวคลื่น 300 nm. (UV) เพื่อจำแนกลักษณะอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 แล้วถ่ายรูป

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.1 การหาความถี่ยีนของประชากร (Falconer and Mackay, 1996)

$$H_i = \sum n_i / N$$

โดยที่ H_i = ความถี่อัลลีลที่ i

n_i = จำนวนของสัตว์ที่พบอัลลีลที่ i

N = จำนวนสัตว์ทั้งหมด

3.2.2 การใช้ PROC GENMOD ใน SAS6.12 โดยใช้หลักการของ Logistic regression ดังนี้

$$\log (P_i/(1-P_i) = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \ldots + \beta_iX_i + \beta_{ij}$$

เมื่อ P_i = ค่าความน่าจะเป็น (probability) ของการเกิดโรคเต้านมอักเสบ

β_0 = จุดตัดแกน y (intercept)

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \ldots, \beta_i$ = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของอัลลีล ที่ 1, 2, 3…,i เมื่อ i = 1, 2, 3…,12

$X_1, X_2, X_3, \ldots, X_i$ = ตัวแปรดัมมีของการปรากฏอัลลีล ที่ 1, 2, 3,…,i เมื่อ i = 1, 2, 3…,12

e_{ik} = ค่าความคลาดเคลื่อน (random error term)

ความน่าจะเป็นของการเกิดโรคเต้านมอักเสบจาก อัลลีล ต่าง ๆ (p_i) คำนวณได้โดย

$$p_i = e^{\beta 0 + \beta i}/(1 + e^{\beta 0 + \beta i})$$

เมื่อ β_0 = เป็นค่า estimate ของ intercept

β_i = เป็นค่า estimate ของ regression coefficient ของอัลลีล

e = exponential

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัย อาคารเครื่องมือ 2 อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5 ระยะเวลาทำการทดลอง

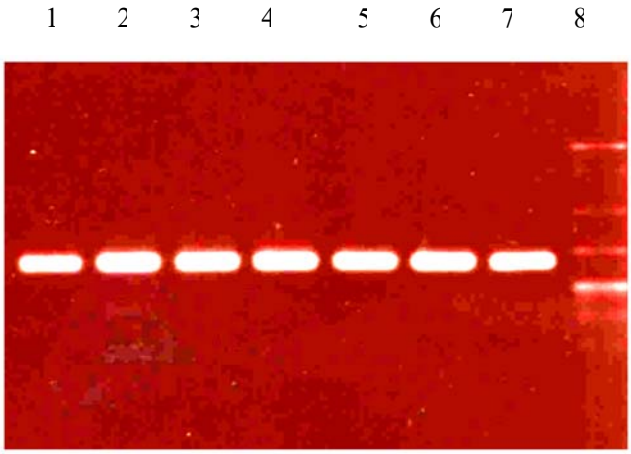
เริ่มทดลองตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ.2544 ถึง 31 สิงหาคม พ.ศ.2545

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลองที่เป็นตัวอย่างแถบ ดีเอ็นเอ

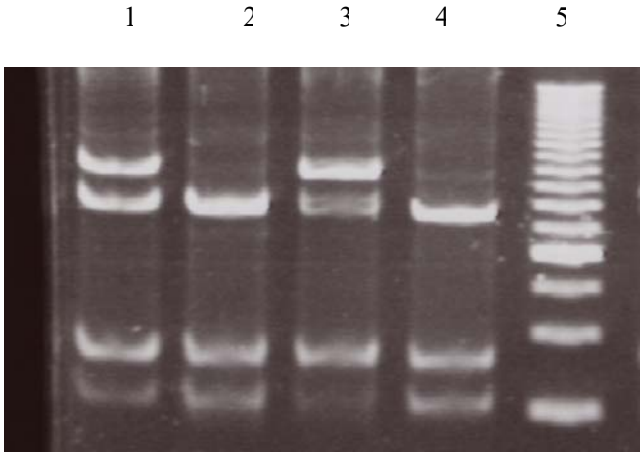
จากการทดลองเจาะเลือดโคนม 103 ตัว มาสกัด ดีเอ็นเอ และทำ PCR ตัดด้วยเอนไซม์ 3 ตัว คือ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* เพื่อกำหนดรูปแบบอัลลีลได้ผลดังตารางที่ 1, 2 และผลบางส่วนแสดงในภาพที่ 4.1-4.4



ภาพที่ 4.1 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ nested PCR (3% agarose gel)

lane ที่ 1-7 แสดงผลของการทำ nested PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากเลือดโคเป็น template และใช้ HLO30, HLO31 และ HLO32 เป็นไพรเมอร์

lane ที่ 8 คือขนาดของ Marker pBR322/*MspI*

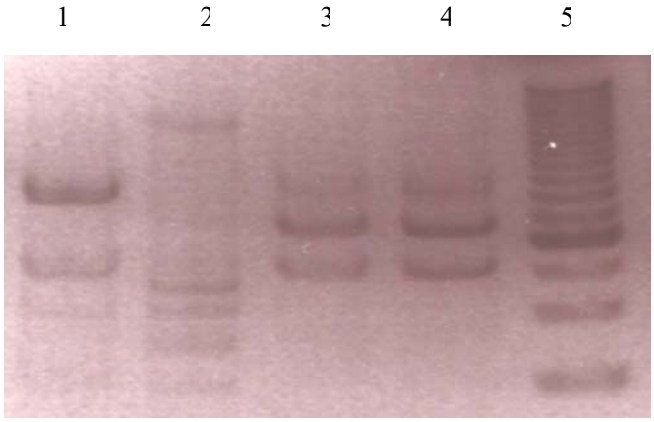


ภาพที่ 4.2 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *BstYI*

(12%polyacrylamide gel)

lane ที่ 1-4 แสดงผลของการนำ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำ nested PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ *BstYI*

lane ที่ 5 คือขนาดของ Marker 25 bp

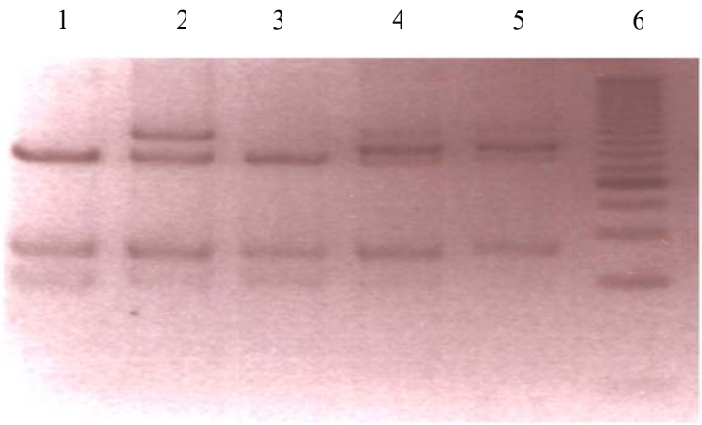


ภาพที่ 4.3 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*

(12% polyacrylamide gel)

lane ที่ 1-4 แสดงผลของการนำ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำ nested PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*

lane ที่ 5 คือขนาดของ Marker 25 bp



ภาพที่ 4.4 แสดงตัวอย่างผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์*HaeIII* (12%polyacrylamide gel)

lane ที่ 1-5 แสดงผลของการนำ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการทำ nested PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

lane ที่ 6 คือขนาดของ Marker 25 bp

4.2 รูปแบบของอัลลีลที่พบในฝูงโคนม

พบว่ายีน BoLA-DRB3.2 ของสัตว์ภายในฝูงโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 103 ตัวมี 48 อัลลีล ดังนี้ (ef)(acd)a, (ef)(acd)c, (ef)(acd)d, (ef)(acd)f, (ef)bc, aba, bba, c(acd)a, g(acd)a, gaa, gbd, gea, h(acd)a, hba, iba, j(acd)a, j(acd)b, jbd, k(acd)c, kba, kbf, l(acd)a, lba, m(acd)a, mba, mea, n(acd)a, n(acd)c, nba, nbf, nea, o(acd)a, obb, q(acd)c, r(acd)a, rec, s(acd)a, s(acd)c, s (acd)d, sbd, sbe, see, v(acd)a, vba, w(acd)a, wba, x(acd)a และ xba เมื่อนำอัลลีลเหล่านี้มาเทียบกับที่มีรายงานวิจัยไว้แล้วนั้นพบว่ามีรูปแบบที่เหมือนกับที่มีรายงานไว้แล้วอยู่ 26 อัลลีล ดังต่อไปนี้ DRB3.2*2, DRB3.2*4, DRB3.2*7, DRB3.2*8, DRB3.2*11, DRB3.2*12, DRB3.2*13, DRB3.2*15, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*23, DRB3.2*25, DRB3.2*28, DRB3.2*30, DRB3.2*32, DRB3.2*33, DRB3.2*36, DRB3.2*41, DRB3.2*43, DRB3.2*46, DRB3.2*47, DRB3.2*48, DRB3.2*50, DRB3.2*51, DRB3.2*52 และ DRB3.2*54 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และมีอัลลีลที่ไม่ปรากฏว่ามีรายงานมาก่อน 22 อัลลีล ดังนี้คือ อัลลีล r(acd)a, (ef)(acd)d, (ef)(acd)f, (ef)bc, gaa, gbd, j(acd)a, k(acd)c, kba, l(acd)a, mea, n(acd)a, n(acd)c, nea, rec, s(acd)c, s(acd)d, sbd, sbe, see, v(acd)a และ x(acd)a ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 รูปแบบของ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* และอัลลีล ที่พบและเทียบได้จากรายงานอื่น ๆ

ลำดับที่	*RsaI*[1]	*BstYI*[2]	*HaeIII*[3]	อัลลีลที่พบ	อัลลีลที่เทียบได้[4]
1	b	b	a	bba	DRB3.2*2
2	c	acd	a	c(acd)a	DRB3.2*4
3	ef	acd	c	(ef)(acd)c	DRB3.2*7
4	ef	acd	a	(ef)(acd)a	DRB3.2*8
5	g	e	a	gea	DRB3.2*11
6	h	acd	a	h(acd)a	DRB3.2*12
7	h	b	a	hba	DRB3.2*13
8	i	b	a	iba	DRB3.2*15
9	j	b	d	jbd	DRB3.2*16
10	m	b	a	mba	DRB3.2*22
11	n	b	a	nba	DRB3.2*23
12	o	acd	a	o(acd)a	DRB3.2*25
13	o	b	b	obb	DRB3.2*28
14	q	acd	c	q(acd)c	DRB3.2*30
15	m	acd	a	m(acd)a	DRB3.2*32
16	n	b	f	nbf	DRB3.2*33
17	l	b	a	lba	DRB3.2*36
18	a	b	a	aba	DRB3.2*41
19	k	b	f	kbf	DRB3.2*43
20	v	b	a	vba	DRB3.2*46
21	w	acd	a	w(acd)a	DRB3.2*47
22	w	b	a	wba	DRB3.2*48
23	x	b	a	xba	DRB3.2*50
24	g	acd	a	g(acd)a	DRB3.2*51
25	s	acd	a	s(acd)a	DRB3.2*52
26	j	acd	b	j(acd)b	DRB3.2*54

<u>หมายเหตุ</u>

[1]= van Eijk et al., 1992, Gelhaus et al., 1995 และ Maillard et al., 1999

[2] = van Eijk et al., 1992

[3] = van Eijk et al., 1992 และ Gelhaus et al., 1995

[4] = อัลลีลที่มีรายงานไว้โดย van Eijk et al., 1992, Gelhaus et al., 1995 และ Maillard et al., 1999

ตารางที่ 4.2 รูปแบบของ ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* และอัลลีล ที่พบซึ่งไม่มีรายงานไว้ก่อน

ลำดับที่	*RsaI*[1]	*BstYI*[2]	*HaeIII*[3]	อัลลีลที่พบ
1	ef	acd	d	(ef)(acd)d
2	ef	acd	f	(ef)(acd)f
3	ef	b	c	(ef)bc
4	g	a	a	gaa
5	g	b	d	gbd
6	j	acd	a	j(acd)a
7	k	acd	c	k(acd)c
8	k	b	a	kba
9	I	acd	a	l(acd)a
10	m	e	a	mea
11	n	acd	a	n(acd)a
12	n	acd	c	n(acd)c
13	n	e	a	nea
14	r	acd	a	r(acd)a
15	r	e	c	rec
16	s	acd	c	s(acd)c
17	s	acd	d	s(acd)d
18	s	b	d	sbd

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับที่	*RsaI*[1]	*BstYI*[2]	*HaeIII*[3]	อัลลีลที่พบ
19	s	b	e	sbe
20	s	e	e	see
21	v	acd	a	v(acd)a
22	x	acd	a	x(acd)a

<u>หมายเหตุ</u>

[1]= van Eijk et al., 1992, Gelhaus et al., 1995 และ Maillard et al., 1999

[2] = van Eijk et al., 1992

[3] = van Eijk et al., 1992 และ Gelhaus et al., 1995

4.3 ความถี่ยีนของอัลลีล พบในประชากรโคนม

ตารางที่ 4.3 ความถี่ยีนของอัลลีลที่พบในประชากรโคนมที่ศึกษา

ลำดับที่	อัลลีล	ความถี่ยีน	ความถี่ยีนสะสม
1	DRB3.2*11	0.087	0.087
2	DRB3.2*16	0.087	0.174
3	DRB3.2*8	0.078	0.252
4	DRB3.2*22	0.058	0.310
5	DRB3.2*51	0.049	0.359
6	DRB3.2*52	0.049	0.408
7	DRB3.2*23	0.039	0.447
8	DRB3.2*7	0.039	0.486
9	DRB3.2*12	0.029	0.515
10	DRB3.2*32	0.029	0.544
11	DRB3.2*46	0.029	0.573
12	n(acd)a	0.029	0.602
13	DRB3.2*33	0.019	0.621
14	DRB3.2*4	0.019	0.640

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับที่	อัลลีล	ความถี่ยีน	ความถี่ยีนสะสม
15	DRB3.2*50	0.019	0.659
16	DRB3.2*54	0.019	0.678
17	mea	0.019	0.697
18	(ef)(acd)d	0.010	0.707
19	(ef)(acd)f	0.010	0.717
20	(ef)bc	0.010	0.727
21	DRB3.2*13	0.010	0.737
22	DRB3.2*15	0.010	0.747
23	DRB3.2*2	0.010	0.757
24	DRB3.2*25	0.010	0.767
25	DRB3.2*28	0.010	0.777
26	DRB3.2*30	0.010	0.787
27	DRB3.2*36	0.010	0.797
28	DRB3.2*41	0.010	0.807
29	DRB3.2*43	0.010	0.817
30	DRB3.2*47	0.010	0.827
31	DRB3.2*48	0.010	0.837
32	gaa	0.010	0.847
33	gbd	0.010	0.857
34	j(acd)a	0.010	0.867
35	k(acd)c	0.010	0.877
36	kba	0.010	0.887
37	l(acd)a	0.010	0.897
38	n(acd)c	0.010	0.907
39	nea	0.010	0.917
40	r(acd)a	0.010	0.927
41	rec	0.010	0.937

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับที่	อัลลีล	ความถี่ยีน	ความถี่ยีนสะสม
42	s(acd)c	0.010	0.947
43	s(acd)d	0.010	0.957
44	sbd	0.010	0.967
45	sbe	0.010	0.977
46	see	0.010	0.987
47	v(acd)a	0.010	0.997
48	x(acd)a	0.010	1.000

จากตารางที่ 4.3 สรุปได้ว่าอัลลีล DRB3.2*11 และ DRB3.2*16 มีความถี่ยีนสูงที่สุด คือมีอยู่ในประชากร 8.7 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน รองลงมาคืออัลลีล DRB3.2*8, DRB3.2*22, DRB3.2*51 และ DRB3.2*52 ซึ่งมีความถี่ยีนเท่ากับ 7.8, 5.8, 4.9 และ 4.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อคิดทั้ง 6 อัลลีลรวมกันจะมีความถี่ยีนอยู่ในประชากรคือ 40.8 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมด ส่วนอัลลีลที่มีความถี่ยีนมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ มีอยู่ทั้งหมด 12 อัลลีล และคิดเป็น 60.2 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งหมด อัลลีลดังกล่าวทั้ง 12 อัลลีล คือ DRB3.2*11, DRB3.2*16, DRB3.2*8, DRB3.2*22, DRB3.2*51, DRB3.2*52, DRB3.2*23, DRB3.2*7, DRB3.2*12, DRB3.2*32, DRB3.2*46 และ n(acd)a

4.4 การวิเคราะห์อิทธิพลของอัลลีล

นำอัลลีลที่มีความถี่ยีนมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ไปวิเคราะห์โปรแกรม SAS 6.12 โดยใช้คำสั่ง Proc GENMOD เพื่อวิเคราะห์หาอิทธิพลของอัลลีลได้ผลดังตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์อิทธิพลของอัลลีลจากการใช้ Proc GENMOD

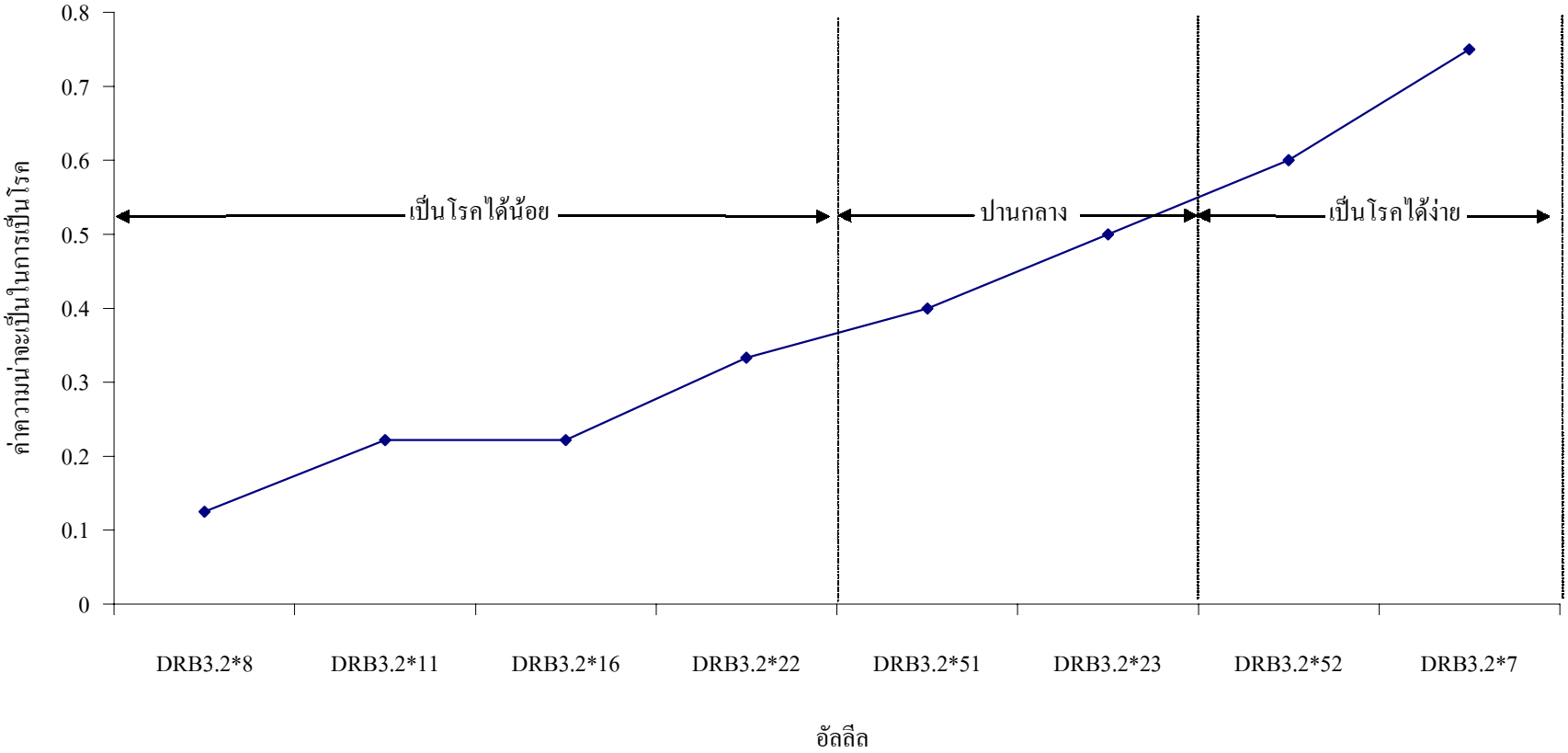
ลำดับ	อัลลีล	ตัวประมาณ	ค่าประมาณ ($\beta_0 + \beta_i$)	SE	ความน่าจะเป็นของการเป็นโรคเต้านมอักเสบ (p)
0	intercept	β_0	-26.365	1.06	
1	DRB3.2*12	β_1	-26.365	306617.19	3.545649×10^{-12}
2	DRB3.2*32	β_2	-26.365	306617.19	3.545649×10^{-12}
3	DRB3.2*46	β_3	-26.365	306617.19	3.545649×10^{-12}
4	n(acd)a	β_4	-26.365	306617.19	3.545649×10^{-12}
5	DRB3.2*8**	β_5	-1.9459	0.00	0.125001
6	DRB3.2*11**	β_6	-1.2527	1.34	0.222233
7	DRB3.2*16**	β_7	-1.2527	1.34	0.222233
8	DRB3.2*22**	β_8	-0.6931	1.38	0.333344
9	DRB3.2*51**	β_9	-0.4054	1.41	0.400016
10	DRB3.2*23**	β_{10}	0.0000	1.46	0.500000
11	DRB3.2*52**	β_{11}	0.4055	1.41	0.600008
12	DRB3.2*7**	β_{12}	1.0986	1.57	0.749997

** $P<0.01$ จากการทดสอบ chi-square test

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์อัลลีล, ค่าประมาณ, ค่าความน่าจะเป็น, ความถี่ยีน, จำนวนตัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ และจำนวนสัตว์ที่ไม่เป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ

ลำดับ	อัลลีล	ความน่าจะเป็นโรคจากการคำนวณ	สัดส่วนการเป็นโรคจากสัตวที่พบจริง	ความถี่อัลลีล	เป็นโรค (ตัว)	ไม่เป็นโรค(ตัว)	รวม(ตัว)
1	DRB3.2*8	0.125001	0.125000	0.078	1	7	8
2	DRB3.2*11	0.222233	0.22222	0.087	2	7	9
3	DRB3.2*16	0.222233	0.22222	0.087	2	7	9
4	DRB3.2*22	0.333344	0.33333	0.058	2	4	6
5	DRB3.2*51	0.400016	0.40000	0.049	2	3	5
6	DRB3.2*23	0.500000	0.50000	0.039	2	2	4
7	DRB3.2*52	0.600008	0.60000	0.049	3	2	5
8	DRB3.2*7	0.749997	0.75000	0.039	3	1	4
			รวม	0.515	17	33	50

จากตารางที่ 4.4 และ 4.5 สรุปได้ว่า อัลลีล DRB3.2*8 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบด้วยความน่าจะเป็นต่ำสุดคือเท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออัลลีล DRB3.2*11 และ DRB3.2*16 ด้วยความน่าจะเป็น 22.2 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน รองลงมาคืออัลลีล DRB3.2*22, DRB3.2*51, DRB3.2*23, DRB3.2*52 และ DRB3.2*7 ด้วยความน่าจะเป็น 33.3, 40.0, 50.0, 60.0 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลกับค่าความน่าจะเป็นในการเป็นโรคเต้า

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การกระจายตัวของยีน

จากการศึกษาได้พบว่ายีน BoLA-DRB3 มีอัลลีลทั้งหมด 48 อัลลีล ซึ่งตรงกับที่มีรายงานไว้แล้วโดย van Eijk et al., (1992), Gelhaus et al., (1995) และ Maillard et al., (1999) อยู่ 26 อัลลีล คือ DRB3.2*2, DRB3.2*4, DRB3.2*7, DRB3.2*8, DRB3.2*11, DRB3.2*12, DRB3.2*13, DRB3.2*15, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*23, DRB3.2*25, DRB3.2*28, DRB3.2*30, DRB3.2*32, DRB3.2*33, DRB3.2*36, DRB3.2*41, DRB3.2*43, DRB3.2*46, DRB3.2*47, DRB3.2*48, DRB3.2*50, DRB3.2*51, DRB3.2*52 และ DRB3.2*54 และมีอัลลีลที่ไม่ปรากฏว่ามีรายงานมาก่อน 22 อัลลีล ดังนี้คือ อัลลีล r(acd)a, (ef)(acd)d, (ef)(acd)f, (ef)bc, gaa, gbd, j(acd)a, k (acd)c, kba, l(acd)a, mea, n(acd)a, n(acd)c, nea, rec, s(acd)c, s(acd)d, sbd, sbe, see, v(acd)a และ x(acd)a ซึ่งจากการทดลองของ van Eijk et al.,(1992) ได้ศึกษาในโคพันธุ์แท้ทั้งหมด 10 พันธุ์ คือ Angus, Ayrshire, Brown-Swiss, Gelbvieh, Guernsey, Jersey, Holstein-Friesian, Polled Hereford, Simmental และ South Devon พบ อัลลีล 30 แบบ ต่อมา Gelhaus et al., (1995) ค้นพบเพิ่มอีก 14 แบบ และ Maillard et al., (1999) ศึกษาในโคพันธุ์ Zebu Brahman พบเพิ่มอีก 18 อัลลีล รวมเป็น 62 อัลลีล และจากการศึกษาในฝูงโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีพันธุ์ผสมกับโคพันธุ์ Holstein- Friesian (Bos taurus) พบอัลลีลเพิ่มอีก 22 อัลลีล สามารถสรุปได้ว่าฝูงโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีความหลายหลายของยีน BoLA-DRB3.2 มาก และจากความหลากหลายที่พบในฝูงโคนมของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จึงสามารถสรุปได้ว่าฝูงโคนมที่เป็นพันธุ์ผสม Holstein- Friesian มีความหลากหลายของยีน BoLA-DRB3.2 สูงตามด้วย

2. ความสัมพันธ์ของยีน BoLA-DRB3 กับการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ

จากอัลลีลที่มีความถี่ของยีนมากกว่า 0.02 ซึ่งมีอยู่ 12 อัลลีล คือ DRB3.2*7, DRB3.2*8, DRB3.2*11, DRB3.2*12, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*23, DRB3.2*32, DRB3.2*46, DRB3.2*51, DRB3.2*52 และ n(acd)a คิดเป็น 60.2 เปอร์เซ็นต์ของฝูง นำเข้าวิเคราะห์ทางสถิติพบอัลลีล DRB3.2*7, DRB3.2*8, DRB3.2*11, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*23, DRB3.2*51 และ DRB3.2*52 ที่มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ โดยพบว่าโคนมที่มีอัลลีล DRB3.2*8 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบน้อยที่สุด รองลงมาคืออัลลีล DRB3.2*11,

DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*51, DRB3.2*23, DRB3.2*52 และ DRB3.2*7 ตามลำดับ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคืออัลลีล DRB3.2*8, DRB3.2*11, DRB3.2*16 และ DRB3.2*22 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบน้อยที่สุดโดยมีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบน้อยกว่า 33.3 เปอร์เซ็นต์ และอัลลีล DRB3.2*51 และ DRB3.2*23 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้ปานกลาง คือ มีโอกาสเป็นโรคมากกว่า 40.0 เปอร์เซ็นต์ แต่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน อัลลีล ที่เป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้ง่ายที่สุดในฝูง คือ DRB3.2*52 และ DRB3.2*7 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้มากกว่า 60.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากรายงานของ Sharif et al., (1998) พบว่า DRB3.2*16 สามารถ ต้านทานโรคโรคเต้านมอักเสบ และ DRB3.2*23 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้ง่าย Diet et al., (1997a) ซึ่งทดลองเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันรายงานว่า DRB3.2*8, DRB3.2*11 และ DRB3.2*23 ต้านทานโรคโรคเต้านมอักเสบ Diet et al., (1997b) รายงานว่า DRB3.2*11 และ DRB3.2*23 ต้านทานโรคโรคเต้านมอักเสบ ส่วน DRB3.2*16 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้ง่าย Kelm et al., (1997) รายงานว่า DRB3.2*11 และ DRB3.2*23 ต้านทานโรคโรคเต้านมอักเสบ และ DRB3.2*8 กับ DRB3.2*16 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้ง่าย ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5.1 จะเห็นว่าอัลลีลที่สามารถต้านทานโรคโรคเต้านมอักเสบในแต่ละฝูงแตกต่างกันไปขึ้นกับหลายปัจจัย เพราะแต่ละฝูงมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคโรคเต้านมอักเสบที่แตกต่างกันไป

ตารางที่ 5.1 อัลลีลที่ต้านทานโรคและอัลลีลที่เป็นโรคได้ง่ายในแต่ละการทดลอง

แหล่งข้อมูล	อัลลีลที่ต้านทานโรค	อัลลีลที่เป็นโรคได้ง่าย
จากการทดลองนี้	DRB3.2*8,DRB3.2*11, DRB3.2*16, DRB3.2*22	DRB3.2*52, DRB3.2*7
Sharif et al., 1998a	DRB3.2*16	DRB3.2*23
Diet et al., 1997a	DRB3.2*8,DRB3.2*11, DRB3.2*22, DRB3.2*23	-
Diet et al., 1997b	DRB3.2*11, DRB3.2*23	DRB3.2*16
Kelm et al., 1997	DRB3.2*11, DRB3.2*23	DRB3.2*8, DRB3.2*16

บทที่ 6
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อหาอิทธิพลของอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 ต่อการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในโคนม โดยใช้เทคนิค nested PCR-RFLP เป็นตัวกำหนดรูปแบบของอัลลีลและใช้ proc GENMOD ในการวิเคราะห์หาอิทธิพลของอัลลีลต่อการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 มีอิทธิพลต่อการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบ พบว่ามีอัลลีลดังนี้คือ DRB3.2*7, DRB3.2*16, DRB3.2*11, DRB3.2*16, DRB3.2*22, DRB3.2*23, DRB3.2*51 และ DRB3.2*52 โดยแต่ละอัลลีลจะมีอิทธิพลต่อการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในระดับที่แตกต่างกันไปดังนี้ อัลลีล DRB3.2*8 มีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบด้วยความน่าจะเป็นต่ำสุดคือเท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ อัลลีล DRB3.2*11 และ DRB3.2*16 ด้วยความน่าจะเป็น 22.2 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน รองลงมาคือ DRB3.2*22, DRB3.2*51, DRB3.2*23, DRB3.2*52 และ DRB3.2*7 ด้วยความน่าจะเป็น 33.3, 40.0, 50.0, 60.0 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการควบคุมโรคโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนมอาจจะแบ่งได้เป็น 3 แนวทาง ดังนี้ (1) ทำการคัดเลือกโคนมให้มีเฉพาะอัลลีล DRB3.2*8 ซึ่งมีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบน้อยที่สุดอยู่ในฝูงเท่านั้น (2) กำจัดโคนมที่มีอัลลีล DRB3.2*7 ซึ่งมีโอกาสเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบได้มากที่สุดออกจากฝูง หรือ (3) ไม่กำจัดโคนมที่มีอัลลีล DRB3.2*7 ออกจากฝูงโคนม แต่เน้นการจัดการที่ดีกับโคนมที่มีอัลลีล DRB3.2*7 เป็นพิเศษ การที่จะเลือกวิธีใดวิธีหนึ่งหรือ อัลลีลใดมาใช้เป็นแนวทางหรือดัชนีในการควบคุมโรคโรคเต้านมอักเสบในฝูงโคนมฝูงหนึ่ง ๆ นั้นขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพื้นฐานทางพันธุกรรม สภาพแวดล้อม และการจัดการในแต่ละฝูงและยังขึ้นกับวิจารณญาณของผู้ทำการคัดเลือกเอง

6.2 ข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี nested PCR-RFLP ซึ่งจะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของการตัดด้วยเอนไซม์บางตัวในบางอัลลีลออกจากกันได้ การที่จะจำแนกการตัดด้วยเอนไซม์บางตัวออกจากกันได้จะต้องใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีอื่นซึ่งมีความละเอียดมากขึ้นกว่าเดิมเข้ามาช่วยคือวิธีการตรวจหาลำดับเบส (sequencing) ซึ่งจะสามารถทำให้แยกความแตกต่างในระดับนี้ออกจากกันได้ แต่เนื่องจากในขั้นตอนของการวิเคราะห์ทางสถิติและ

จากจำนวนสัตว์ที่มีอยู่น้อยทำให้เป็นปัจจัยจำกัดในการวิเคราะห์อยู่แล้วซึ่งหากเลือกใช้วิธีการตรวจดีเอ็นเอที่มีความละเอียดมากขึ้นทำให้จำนวนสัตว์ที่มีอยู่น้อยแล้วกลับน้อยลงไปอีก ทำให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติไม่มีความน่าเชื่อถือ หรืออาจไม่พบความแตกต่างซึ่งเป็นอิทธิพลของอัลลีลเลย แต่ขณะที่ในต่างประเทศซึ่งมีจำนวนสัตว์มากจึงมีความจำเป็นต้องใช้วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีความละเอียดพอจึงจะสามารถจัดกลุ่มของสัตว์และจำแนกอิทธิพลของอัลลีลได้

ข้อจำกัดของการทดลองนี้

1. การคัดเลือกโดยใช้ยีน BoLA-DRB3 เป็นการคัดเลือกในแต่ละรุ่นเท่านั้น เพราะการหาลักษณะของยีนนี้เป็นการหาเฉพาะในสัตว์ตัวนั้น ๆ ซึ่งเมื่อไปถึงรุ่นลูก ลูกตัวนั้นก็จะต้องทำการตรวจหาลักษณะของยีนนี้ใหม่ เพราะลักษณะของยีนในลูกนี้ได้รับการถ่ายทอดมาจากทั้งพ่อและแม่ซึ่งเป็นความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการแยกตัว (segregation) และการรวมตัวของยีน (recombination) ในแกมีต

2. การวิเคราะห์ข้อมูลควรแยกตามแลคเตชั่น แต่เมื่อแยกตามแลคเตชั่นแล้วทำให้มีจำนวนโคในแต่ละแลคเตชั่นน้อยเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติทำให้ไม่พบความแตกต่าง ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อ ๆ ไป ควรที่จะวางแผนการทดลองเพื่อให้ได้จำนวนโคในแต่ละแลคเตชั่นที่มากพอ

3. การทดลองนี้เป็นการทดลองเปรียบเทียบกับการเกิดโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในอดีต ซึ่งโคที่ไม่เป็นโรคในแลคเตชั่นที่กำลังศึกษาอยู่อาจเป็นโรคในแลคเตชั่นต่อ ๆ ไปก็ได้ ทำให้การทดลองที่ได้อาจไม่เป็นผลที่แท้จริง

4. หากทำการทดลองเปรียบเทียบลักษณะของยีน BoLA-DRB3 กับโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (เนื่องจากโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการนี้มีบทบาทมากในโคนม) ซึ่งสามารถตรวจได้โดยดูจากค่า SCC จะทำให้การทดลองสมบูรณ์แบบมากขึ้น

5. ยีนตัวนี้อาจมีผลทำให้ผลผลิตอื่น ๆ เช่น ปริมาณน้ำนม ไขมัน โปรตีน ลดลง แต่อย่างไรก็ตามสามารถที่จะแก้ปัญหาได้ด้วยการศึกษาหาความสัมพันธ์ของยีนนี้กับลักษณะที่ลดลงไปเหล่านี้ควบคู่ไปกับลักษณะการเป็นโรค

รายการอ้างอิง

จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ และ เปล่งศรี อิงคนินันท์. 2542. สถานภาพงานวิจัยโคนมในประเทศไทย (2526-2542). การ**ประชุมวิชาการเรื่องวิจัยและพัฒนาเพื่ออนาคตโคนมไทย และการประชุมทางวิชาการโคนมและผลิตภัณฑ์ครั้งที่ 3 4-5 พฤศจิกายน 2542 ณ โรงแรมเอเชีย ราชเทวี กรุงเทพฯ**.

ชวนิศดากร วรวรรณ, ม.ร.ว. จำเนียร สัตยาพันธุ์ และอุทัย พิสนฑ์. 2510. การศึกษาโรคโรคเต้านมอักเสบในฝูงวัวนมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. **รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 6 30 มกราคม- 2 กุมภาพันธ์ 2510**. หน้า 218-227.

นิมิต ลีสิริกุล, เพชรรัตน์ เฝ้าทรัพย์ และสมใจ ศรีหาคิม. 2537. สภาวะโรคโรคเต้านมอักเสบในโคนม และประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค. **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21 28-30 พฤศจิกายน 2537**. หน้า 38-46.

วาสนา แสงสุวรรณ์, ศุภลักษณ์ จันทร์อุดม, อภัสรา วรราช และนิมิต ไตรวนาธรรม. 2538. สภาวะโรคโรคเต้านมอักเสบในโคนมภาคใต้. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 5 (1) : 1-10.

ศีลธรรม วราอัศวปติ, กิติกรณ์ เจนไพบูลย์ และจำรัส ภักดี. 2540. การศึกษาการแก้ปัญหาโรคโรคเต้านมอักเสบชนิดไม่แสดงอาการในโคนมจังหวัดขอนแก่น. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 7(1) : 16-24.

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2544. สุขภาพเต้านม-คุณภาพน้ำนมดิบโค โรคโรคเต้านมอักเสบและเครื่องรีดนมโค. **คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**.

อัมพวัน ตฤษณารมย์, นุชา สิมะสาธิตกุล, วิสุทธิ์ หิมารัตน์, มาโนช รุ่งสวัสดิ์ และธวัชชัย อินทรตุล. 2537. ผลของฤดูกาล ปริมาณน้ำนม ช่วงเวลาที่ให้น้ำนม ระยะการให้น้ำนมและอายุของแม่โคต่อโรคโรคเต้านมอักเสบชนิดไม่แสดงอาการ. **เวชชสารสัตวแพทย์**. 24(2) : 123-135.

Aaarestrup F.M., N.E. Jenson and H. ØStergarc. 1995. Analysis of Associations Between Major Histocompatibility Complex (BoLA) Class I Haplotypes and Subclinical Mastitis of Dairy Cows. **J. Dairy Sci**. 78:1684-1692.

Ali, A.K.A. and G.E. Shook. 1980. An Optimum Transformation for Somatic Cell Concentration in Milk. **J. Dairy Sci**. 63:487-496.

Allison, Paul D. 1997. Survival Analysis Using the SAS System. **A practical guide**, Cary, NC:SAS Institute Inc., 292 pp.

Ashwell, MS, CE Rexroad Jr, RH Miller and PM VanRaden. 1996. Mapping Economic Trait Loci for Somatic Cell Score in Holstein Cattle Using Microsatellite Markers and Selective Genotyping. **Animal Genetics**. 27:235-242.

Blosser, T.H. 1979. Economic Losses from and the National Research Program on Mastitis in the United States. **J. Dairy Sci**. 62:119-127.

Dietz, A.B., J.C. Detilleux, A.E. Freeman, D.H. Kelley, J.R. Stabel and M.E. Kehrli, JR. 1997a. Genetic Association of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3 Haplotypes with Immunological Traits of Holstein Cattle. **J. Dairy Sci**. 80:400-405.

Dietz, Allan D., Noah D. Cohen, Leo Timms and Marcus E. Kehrli, JR. 1997b. Bovine Lymphocyte Antigen Class II Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in milk of Lactating Dairy Cows. **J. Dairy Sci**. 80:406-412.

Dodgson, Jerry B., Hans H. Chang and Ronald Okimoto. 1997. DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics. **Poultry Science**. 76:1108-1114.

Falconer, D.S and Trudy F.C. Mackay. 1996. **Introduction to Quantitative Genetics**. Fourth Edition. Longman. 464pp.

Gelhaus A., Schnittger L., Mehlitz D., Horstmann R.D. and Meyer C. G. 1995. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. **Animal Genetics**. 26:147-153.

Gilliespie, B.E., B.M. Jayarao, H.H. Dowlen and S.P. Oliver. 1999. Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Jersey Cows. **J. Dairy Sci**. 82:2049-2053.

Harmon, R.J. 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. **J. Dairy Sci**. 77:2103-2112.

Hood, L., M. Steinmetz, and B. Malissen. 1983. Genes of the Major Histocompatibility Complex of the Mouse. **Ann. Rev. Immunol**. 1:529-535.

Jain, N.C. 1979. Common Mammary Pathogens and Factors in Infection and Mastitis. **J. Dairy Sci**. 62:128-134.

Kelm, S.C., J.C. Detilleux, A.E. Freeman, M.E. Kehrli, JR., A.B. Dietz, L.K. Fox, J.E. Butler, I. Kasckovics and D.H. Kelley. 1997. Genetic Association Between Parameters of Innate Immunity and Measures of Mastitis in Periparturient Holstein Cattle. **J. Dairy Sci**. 80:1767-1775.

King, J.O.L. 1972. Mastitis as a Production Disease. **Vet. Rec**. 91: 325-332.

Larsen, B., N.E. Jensen, P. Madsen, S. M. Nielsen, O. Klastrup and P.S. Madsen. 1985. Association of the M Blood Group System with Bovine Mastitis. Anim Blood Groups Biocem. **Genet.** 16:165-171.

Lewin, Harris A. 1989. Disease Resistance and Immune Response Genes in Cattle: Strategies for Their Detection and Evidence of Their Existence. **J. Dairy Sci**. 80:1334-1348.

Lewin, Harris A. 1996. Genetic Organization, Polymorphism, and Function of the Bovine Major Histocompatibility Complex. Pages 65-98 in **The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species**. L. B. Schook and S.J. Lamont, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Lin, H.K., P.A. Oltenach, L.D. Van Vleck, H.N. Erb, and R.D. Smith. 1989. Heritabilities of and Genetic Correlations Among Six Health Problems in Holstein Cows. **J. Dairy Sci**. 72:180-186.

Maillard , IC., C. Renard, P. Chardon, I. Chantal and A. Bensaid. 1999. Characterisation of 18 new BoLA-DRB3 alleles. **Animal Genetics**. 30:200-203.

Mallard, B.A., K.E. Leslie, J.C.M. Dekkers, R. Hedge, M. Bauman and M.J. Stear. 1995. Differences in Bovine Lymphocyte Antigen Associations Between Immune Responsiveness and Risk of Disease Following Intramammary Infection with Staphylococcus aureus. **J. Dairy Sci**. 78:1937-1944.

Mcdonald, John S. 1979. Bovine Mastitis: Introductory Remarks. **J. Dairy Sci**. 62:117-118.

Miller, D.D. 1973. **Relation of Clinical and Subclinical Mastitis to Milk Production and Composition**. New Mexico Agr. Exp. Sta. Bull. 605, pp.28.

Russell Lande and Robin Thompson.1990. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. **Genetics**. 124:743-756.

Shanks, R. D., A. E. Freeman, P. J. Berger and D. H. Kelley. 1978. Effect of Selection for Milk Production on Reproductive and General Health of the Dairy Cow. **J. Dairy Sci**. 61: 1765.

Sharif, S., B.A. Mallard, B.N. Wilkie, J.M. Sargeant, H.M. Scott, J.C.M. Dekkers and K.E. Leslie. 1998a. Associations of the Bovine Major Histocompatibility Complex DRB3 (BoLA-DRB3) Alleles with Occurrence of Disease and Milk Somatic Cell Score in Canadian Dairy Cattle. **Animal Genetics**. 29:185-193.

Sharif, S., B.A. Mallard, B.N. Wilkie, J.M. Sargeant, H.M. Scott, J.C.M. Dekkers and K.E. Leslie. 1998b. Associations of the Bovine Major Histocompatibility Complex DRB3 (BoLA-DRB3) with Production Traits in Canadian Dairy Cattle. **Animal Genetics**. 30:157-160.

Shook, G.E. 1989. Selection for Disease Resistance. **J. Dairy Sci**. 72:1349-1362.

Shook, G.E. and M. M. Schutz. 1994. Selection on Somatic Cell Score to Improve Resistance to Mastitis in the United States. **J. Dairy Sci**. 77:648 -658.

Soller, M. 1994. Marker Assisted Selection – An Overview. **Animal Biotechnology**. 5(2):193-207.

Strandberg, E., and G. E. Shook. 1989. Genetic and Economic Responses to Breeding Programs that Consider Mastitis. **J. Dairy Sci**. 72:2136-2145.

Starkenburg, R.J., L.B. Hansen, M.E. Kehrli, JR. and H. Chester-Jones. 1997. Frequencies and Effects of Alternative DRB3.2 Alleles of Bovine Lymphocyte Antigen for Holsteins in Milk Selection and Control Lines. **J. Dairy Sci**. 80:3411-3419.

Stear, M.J., M.J. Newman and F.W. Nicholas. 1982. Two Closely Linked and One Aparently Independent Locus Code for Bovine Lymphocyte Antigens. **Tissue Antigens**. 20:289-295.

Suriyasathaporn, W., Y.H. Schukken, M. Nielen and A. Brand. 2000. Low Somatic Cell Count: A Risk Factor for Subsequent Clinical Mastitis in a Dairy Herd. **J. Dairy Sci**. 83:1248-1255.

Uribe, H.A., B.W.Kennedy, S.W.Martin and D.F.Kelton. 1995. Genetic Parameters for Common Health Disorders of Holstein Cows. **J. Dairy Sci**. 78:421-430.

Van eijk, M.J.T., J.A. Stewart-Haynes and H.A. Lewin. 1992. Extensive Polymorphism of the BoLA-DRB3 Gene Distinguished by PCR-RFLP. **Animal Genetics**. 23:483-496.

Vint, L.F. 1997. Integration of Classical and Molecular Approaches of Genetic Selection Disease Resistance – Implications for Selection. **Poultry Science**. 76:1126.

Weigel, K.A., A.E. Freeman, M. E. Kehrli, JR, M.J. Stear and D.H. Kelley. 1990. Association of Class I Bovine Lymphocyte Antigen Complex Alleles with Health and Production Traits in Dairy Cattle. **J. Dairy Sci**. 73:2538-2546.

Wilton, J. W., L. D. Van Vleck, R. W. Everett, R. S. Guthrie, and S. J. Roberts. 1972. Genetic and Environmental Aspects of Udder Infections. **J. Dairy Sci**. 55:183.

ภาคผนวก ก

แสดงคำสั่ง sas ที่ใช้ใน proc GENMOD และการแปลงค่าประมาณ

คำสั่ง SAS ที่ใช้ใน proc GENMOD

```
DATA MyThesis;
INFILE 'A:\BoLA\mastitis.prn';
LENGH allele $ 20;
INPUT id symptom allele $;
PROC GENMOD DATA = MyThesis;
        CLASS allele;
        MODEL symptom = allele/D=BINOMIAL LINK = LOGIT TYPE3;
RUN;
```

DATA MyThesis หมายถึง ให้ชื่อข้อมูลที่นำมาใช้ใน SAS นี้มีชื่อว่า MyThesis

INFILE 'A:\BoLA\mastitis.prn' หมายถึง นำข้อมูลที่อยู่ใน file 'A:\BoLA\mastitis.prn' มาใช้ในการวิเคราะห์

LENGH allele $ 20 หมายถึง กำหนดให้อัลลีลเป็นตัวแปรที่เป็นตัวอักษรและมีความยาวไม่เกิน 20 ตัวอักษร

INPUT id symptom allele $ หมายถึง ตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์นี้มี ตัวแปรที่ชื่อว่า id, symptom และ allele

โดย

id	คือ หมายเลขหรือชื่อของสัตว์ที่ใช้ในการวิเคราะห์
symptom	คือ การที่สัตว์ตัวนั้นเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบให้มีค่าเท่ากับ 1 หรือถ้าสัตว์ไม่มีประวัติการเป็นโรคโรคเต้านมอักเสบให้มีค่าเท่ากับ 0
allele	คือ รูปแบบอัลลีลที่พบในสัตว์แต่ละตัว

ในส่วนของคำสั่ง PROC GENMOD หมายความดังนี้ ให้วิเคราะห์ข้อมูลที่ชื่อ MyThesis โดยใช้คำสั่ง PROC GENMOD กำหนดให้ตัวแปรอัลลีลเป็นอิทธิพลแบบ fixed effect (เป็นการทดสอบว่าตัวแปรอัลลีลมีผลต่อการเป็นโรคหรือไม่เป็นโรคของสัตว์หรือไม่) โดยใช้รูปแบบ MODEL คือ การเป็นโรคหรือไม่เป็นโรคของสัตว์แต่ละตัวขึ้นกับรูปแบบของอัลลีล โดยให้มีรูปแบบการแจกแจงแบบ binomial distribution และมีรูปแบบการ transform ข้อมูลเป็นแบบ logit

ภาคผนวก ข

การเรียกชื่อยีน BoLA-DRB3 ที่ถูกจำแนกด้วยวิธี nested PCR-RFLP

การเรียกชื่อยีน BoLA-DRB3 ที่ถูกจำแนกด้วยวิธี nested PCR-RFLP (van Eijk et al., 1992)

การเรียกชื่อโดยเรียงลำดับดังนี้ โลกัส.เอคซอน*อัลลีล

เช่น BoLA-DRB3.2*1

BoLA-DRB3	คือ	โลกัสที่ชื่อว่า BoLA-DRB3
2	คือ	เอคซอนตำแหน่งที่ 2
1	คือ	อัลลีลรูปแบบที่ 1

นั่นคือ BoLA-DRB3.2*1 หมายถึง อัลลีลรูปแบบที่ 1 ในตำแหน่งเอคซอนที่ 2 ของยีน BoLA-DRB3

การกำหนดรูปแบบอัลลีลของยีน BoLA-DRB3 จะกำหนดตามรูปแบบของดีเอ็นเอ ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ 3 ชนิดเรียงกัน คือ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII* (ภาคผนวก ค) ส่วน รูปแบบที่เอนไซม์แต่ละตัวตัดได้นั้นก็จะกำหนดตามรูปแบบในภาคผนวก ง เช่น รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* ได้รูปแบบ a (ภาคผนวก ค) รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *BstY* ได้รูปแบบ a (ภาคผนวก ค) และ รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* ได้รูปแบบ a (ภาคผนวก ค) อัลลีล เรียงตามเอนไซม์คือ *RsaI, BstYI* และ *HaeIII* จะได้เป็น aaa แล้วนำไปเทียบใน ภาคผนวก ง ก็จะได้เป็น อัลลีล BoLA-DRB3.2*1 เป็นต้น

ภาคผนวก ค

รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*, *BstYI* และ *HaeIII*

1. รูปแบบของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*

```
          78          33      30      39          54          50
a ____________________|_______|_______|___________|____________|__________

                111                 30      39          54          50
b ________________________________|_______|___________|____________|__________

                111                 30              93              50
c ________________________________|_______|________________________|__________

                111                 30                  143
d ________________________________|_______|____________________________________

                141                         39          51          50
e ____________________________________|___________|__V_________|__________

                141                         39          54          50
f ____________________________________|___________|____________|__________

                141                         39              104
g ____________________________________|___________|________________________

                111                     69              54          50
h ________________________________|___________________|____________|__________

                        180                             54          50
i ____________________________________________________|____________|__________
          78              63                  93              50
j ____________________|_______________|________________________|__________
```

รูปแบบของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* (ต่อ)

```
          78                          156                    50
k ____________________|____________________________________|__________

                          234                                50
l ____________________________________________________________|__________

          111                    69                  104
m ____________________________|__________________|__________________________

                  180                                104
n ____________________________________________________|__________________________

                          284
o ____________________________________________________________________________

          111                30        39        51        50
p ____________________________|_______|__________|_\/_________|__________

          141                                90          50
q ____________________________________|____________\/_________|__________

          111                30                90          50
r ____________________________|_______|____________\/_________|__________

          141                                93          50
s ____________________________________|__________________________|__________

          141                                    143
t ____________________________________|____________________________________
```

รูปแบบของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* (ต่อ)

	111	123		50
u				
	78	102	54	50
v				
	78	33	69	54	50
w					
	78	33	69	104
x				
	78	63	39	54	50
y					

<u>หมายเหตุ</u> : a - s van Eijk et al., 1992

t - u Gelhaus et al., 1995

v – y Maillard et al., 1999

2. รูปแบบของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BstYI*

```
                    199                          85
a ___________________________________________|__________________

                              284
b ____________________________________________________________________

                    196                          85
c ___________________________________________\/_|__________________

          87                          197
d ____________________|_____________________________________________

          87                  112                  85
e ____________________|___________________________|__________________
```

<u>หมายเหตุ</u> : a - e van Eijk et al., 1992

3. รูปแบบของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

```
                167                         52          65
a ______________________________________|_______________|____________

                        219                             65
b ____________________________________________________|____________

                167                         49          65
c ______________________________________|_______V_______|____________

                        190                         29      65
d ____________________________________________________|_____|____________

                167                         117
e ______________________________________|______________________________

                167                     4   48          65
f ______________________________________|_|_____________|____________

                164                         55          65
g ______________________________________|_______________|____________
                    167                         46   6      65
h ______________________________________|___________|__|____________

                    167                 4           113
i ______________________________________|_|____________________________
```

<u>หมายเหตุ</u>: a - f van Eijk et al., 1992

g - h Gelhaus et al., 1995

i มาจากอัลลีล DRB3.2*25011

ภาคผนวก ง

แสดงรูปแบบของยีน BoLA-DRB3

ตารางที่ 1ง แสดงรูปแบบของอัลลีลของยีน BoLA-DRB3.2

ลำดับที่	รูปแบบ BoLA-DRB3.2	รูปแบบ *RsaI*, *BstYI*,*HaeIII*
1	BoLA-DRB3.2*1	aaa
2	BoLA-DRB3.2*2	bba
3	BoLA-DRB3.2*3	bbb
4	BoLA-DRB3.2*4	caa
5	BoLA-DRB3.2*5	rcc
6	BoLA-DRB3.2*6	daa
7	BoLA-DRB3.2*7	ecc
8	BoLA-DRB3.2*8	faa
9	BoLA-DRB3.2*9	fda
10	BoLA-DRB3.2*10	fba
11	BoLA-DRB3.2*11	gea
12	BoLA-DRB3.2*12	haa
13	BoLA-DRB3.2*13	hba
14	BoLA-DRB3.2*14	hbb
15	BoLA-DRB3.2*15	iba
16	BoLA-DRB3.2*16	jbd
17	BoLA-DRB3.2*17	kbb
18	BoLA-DRB3.2*18	lbf
19	BoLA-DRB3.2*19	sbb
20	BoLA-DRB3.2*20	lbb
21	BoLA-DRB3.2*21	lbe
22	BoLA-DRB3.2*22	mba
23	BoLA-DRB3.2*23	nba
24	BoLA-DRB3.2*24	nbb
25	BoLA-DRB3.2*25	oaa

ตารางที่ 1ง (ต่อ)

ลำดับที่	รูปแบบ BoLA-DRB3.2	รูปแบบ *RsaI*, *BstYI*,*HaeIII*
26	BoLA-DRB3.2*26	oab
27	BoLA-DRB3.2*27	obf
28	BoLA-DRB3.2*28	obb
29	BoLA-DRB3.2*29	pcc
30	BoLA-DRB3.2*30	qcc
31	BoLA-DRB3.2*31	ibf
32	BoLA-DRB3.2*32	maa
33	BoLA-DRB3.2*33	nbf
34	BoLA-DRB3.2*34	lab
35	BoLA-DRB3.2*35	cbb
36	BoLA-DRB3.2*36	lba
37	BoLA-DRB3.2*37	oba
38	BoLA-DRB3.2*38	bda
39	BoLA-DRB3.2*39	tba
40	BoLA-DRB3.2*40	uba
41	BoLA-DRB3.2*41	aba
42	BoLA-DRB3.2*42	hbf
43	BoLA-DRB3.2*43	kbf
44	BoLA-DRB3.2*44	kbi
45	BoLA-DRB3.2*45	sdb
46	BoLA-DRB3.2*46	vba
47	BoLA-DRB3.2*47	waa
48	BoLA-DRB3.2*48	wba
49	BoLA-DRB3.2*49	wbe
50	BoLA-DRB3.2*50	xba

ตารางที่ 1ง (ต่อ)

ลำดับที่	รูปแบบ BoLA-DRB3.2	รูปแบบ *RsaI*, *BstYI*,*HaeIII*
51	BoLA-DRB3.2*51	gaa
52	BoLA-DRB3.2*52	sda
53	BoLA-DRB3.2*53	yba
54	BoLA-DRB3.2*54	jdb

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุภาวดี มานะไตรนนท์ เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน 2519 ที่จังหวัดนครปฐม ศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2541 หลังจากสำเร็จการศึกษาได้เข้าทำงานที่กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร และได้ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2543