บทความวิจัย

สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.vet.mut.ac.th/journal_jmvm

ความหลากรูปแบบของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพื้นเมือง

อนุสรณ์ จ่าแสนชื่น[1] ประดิษฐ์ แสงทอง[2] และดานัย แสงทอง[3,#]

[1]สาขาวิชาคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

[2]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[3]สาขาวิชาสัตวบาลและพื้นฐานวิชาชีพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: ยีน heat shock proteins family เป็นกลุ่มยีนที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากความร้อน หากเกิดการกลาย หรือการขาดหายไปของเบสไซโทซีน (cytocine) ที่ตำแหน่ง AP2 box region ของยีน *hsp70.1* (ตำแหน่ง g895) จะส่งผลกระทบต่อการลดความสามารถในการทนร้อนของโค ซึ่งในโคพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่งดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง AP2 box region ของยีน *hsp70.1* (ตำแหน่ง g895) ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 4 กลุ่มประกอบด้วย โคขาวลำพูน จำนวน 9 ตัวอย่าง โคไทยพันธุ์พื้นเมืองแถบภาคอีสาน จำนวน 22 ตัวอย่าง โคลาน จำนวน 10 ตัวอย่าง และโคชน จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่ารูปแบบของยีนเป็นแบบ wild type genotype จำนวน 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70.59 แบบ homozygous deletion mutation จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.45 และแบบ heterozygous deletion mutation จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.96 โดยผลการศึกษาพบว่าการกลายแบบ homozygous mutation เกิดขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างของโคขาวลำพูนมากที่สุด ผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ที่พบกับความสามารถในการทนร้อนของโคไทยพันธุ์พื้นเมือง และนำไปสู่การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: โคไทยพันธุ์พื้นเมือง *hsp70.1* ฮีตช็อคโปรตีน70 PCR-RFLP

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2559. 11(2): 79-90.

E-mail address: pdanai@mut.ac.th

The Polymorphism of *Heat Shock Protein 70.1* (*hsp70.1*) Gene at AP2 Box Region in Thai Native Cattle

Anusorn Jasanchuen[1], Pradit Sangthong[2] and Danai Sangthong[3,#]

[1]Department of Clinic, Faculty of Veterinary medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, Thailand

[2]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

[3]Department of Animal Husbandry and Basic Professional Sciences, Faculty of Veterinary medicine, Mahanakorn University of Technology, Bangkok 10530, Thailand

---

Abstract: Heat shock proteins family (Hsp) is known to play a major role in the protection of cells from thermal stress. It is an important to protect cells from heat damage as well as to prevent protein denaturation and apoptosis. The genotypic variants of *hsp70.1* gene in the AP2 box region, especially the deletion of cytosine base (base position g895) are associated to decrease cellular thermo-tolerance in cattle. In Thailand, There is no information to display the mutation of this gene in Thai native cattle. The aim of this study is to investigate the genotypic variation of *hsp70.1* gene in the AP2 box region in Thai native cattle (at base position g895). To elucidate, we used DNA from 51 samples of Thai native cattle comprise 9, 22, 10 and 10 samples from 4 regions of Thailand composed of the North, North-East, Central region and the South, respectively. Double PCR-RFLP was used to identify the genotypes of *hsp70.1* gene in theAP2 box region. Our results revealed that the wild type genotype was found in 70.59 % (n=36), homozygous mutation 27.45 % (n=14) and heterozygous mutation 1.96 % (n=1) respectively. Furthermore, The North region of Thailand is the most group of mutation. The result from this study may be useful to evaluate the correlation of thermo-tolerance and genotypic variation and useful for selection and improvement of Thai native cattle in the future.

Keywords: Thai native cattle, *hsp 70.1*, Heat shock protein 70, PCR-RFLP

[#]Corresponding author
J. Mahanakorn Vet. Med. 2016. 11(2): 79-90.
E-mail address: pdanai@mut.ac.th

บทนำ

ภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress) มีผลกระทบต่อโคที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะในประเทศไทย โดยทำให้การกินอาหารได้น้อยลงทำให้เกิดภาวะขาดพลังงาน ส่งผลทำให้ผลผลิตลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณน้ำนม (Ravagnolo *et al*., 2000; Hansen, 2004; Deb *et al*., 2014) นอกจากนั้นยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ ทำให้คุณภาพของเซลล์ไข่ (oocyte) ต่ำลง ลดการฝังตัวของตัวอ่อน และไปเพิ่มระยะการผสมติดหลังคลอด (calving to conception interval) (Rensis *et al*., 2003) โปรตีนในกลุ่ม Heat shock proteins (HSP) family เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับความเสียหายจากความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม heat shock protein 70 (HSP70.1 และ HSP70.2) ซึ่งโปรตีน HSP70 จะช่วยในการขดตัวใหม่ (refolding) ของโปรตีน (Chen *et al*., 2009) รวมไปถึงมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) ทำให้เซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากความร้อน (Sonna *et al*., 2002) โปรตีน HSP70 จะมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับผลกระทบจากความร้อนมากกว่าการถูกกระตุ้นด้วยภาวะความเครียดจากปัจจัยอื่น เช่น สารอนุมูลอิสระ ภาวะขาดเลือด หรือการอักเสบของเซลล์ (Basirico *et al*., 2011) การสังเคราะห์โปรตีน HSP70 ถูกควบคุมโดยยีน *heat shock protein 70 gene (hsp70)* ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ promoter region ในส่วน 5′-UTR จะมีผลต่อการลดลงของการสังเคราะห์โปรตีนหรือการคงตัวของ mRNA ของยีน hsp70 และมีผลต่อความสามารถในการทนร้อนของเซลล์ลดลงด้วย (Shwerin *et al*., 2003; Basirico *et al*., 2011; Deb *et al*., 2013)

การควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน HSP70 มีตำแหน่งสำคัญที่ตำแหน่ง promoter region ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ heat shock protein transcription factor เข้ามาเกาะและกระตุ้นให้เกิดกระบวนการคัดลอกสารพันธุกรรม ถอดรหัส และสังเคราะห์เป็นโปรตีนต่อไป โดยในโคพบว่าตำแหน่งที่ heat shock transcription factor เข้ามาเกาะจะอยู่ที่ตำแหน่ง AP2 box region (position -130) ซึ่งเป็นส่วนของ promoter region ของยีน *hsp70* พบว่าการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งดังกล่าวมีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีน HSP70 ลดลงทำให้ความสามารถในการทนร้อนของโคลดลง และมีผลทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง (Schwerin *et al*., 2003) เช่นเดียวกับการทดลองในโคนมสายพันธุ์ลูกผสม Frieswal ในประเทศอินเดียและในสายพันธุ์ Chinese Holstein ในประเทศจีน (Xiong *et al*., 2012; Deb *et al*., 2013) ทั้งนี้โคที่อยู่ในกลุ่ม *Bos indicus* จะมีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่าโคที่อยู่ในกลุ่ม *Bos taurus* (Hansen, 2004; Deb *et al*., 2014)

สำหรับโคไทยพื้นเมืองจัดอยู่ในกลุ่มโคอินเดีย (*Bos indicus*) มีขนาดค่อนข้างเล็ก มีขนสั้นเกรียน หน้ายาวบอบบาง หน้าผากแคบ ตะโหนกเล็ก เหนียงคอและหนังใต้ท้องไม่มากนัก ใบหูเล็ก นิสัยปราดเปรียวตื่นตกใจง่าย มีความแข็งแรงทนทาน นอกจากนี้ยังมีความสามรถในการทนร้อน ทนต่อโรคและแมลงได้ดี หากินเก่ง (กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์) แต่สำหรับข้อมูลความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน *hsp70* ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองที่จัดอยู่ในกลุ่ม

Bos indicus ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อสภาพอากาศร้อนได้ดี ยังไม่มีข้อมูลมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง เพื่อที่จะได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวและเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการคัดเลือกและพัฒนาเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์โคพื้นเมืองในประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมืองที่อาศัยอยู่ในแต่ละพื้นที่ของประเทศไทยทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ โคขาวลำพูนซึ่งเป็นโคพื้นเมืองทางภาคเหนือ จำนวน 9 ตัวอย่าง โคไทยพื้นเมืองแถบภาคอีสาน จำนวน 22 ตัวอย่าง โคลานซึ่งเป็นโคพื้นเมืองทางภาคกลาง จำนวน 10 ตัวอย่าง และโคชนซึ่งเป็นโคพื้นเมืองทางภาคใต้ จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ (Jugular vein) บรรจุใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA ตัวอย่างละ 6 มิลลิลิตร จากนั้นรักษาสภาพตัวอย่างในกล่องรักษาความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

- การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ AP2 box region ด้วยไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่คือ Forward: 5′ GTC GCC AGG AAA CCA GAG AC 3′ และ Reverse: 5′GGA ACA CCC CTA CGC AGG AG 3′ (GenBank accession number M98823) (Schwerin *et al*., 2003) จากตัวอย่างเลือดโคที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (FavorPrep™, Favorgen Biotech corporation, Taiwan) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR Taq-buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร Forward primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 unit/ul ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร และเติม dH_2O จนครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสภาวะควบคุมอุณหภูมิจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ดัดแปลงจาก Schwerin *et al*., 2003) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ Thermo Fisher Scientific Inc. USA.)

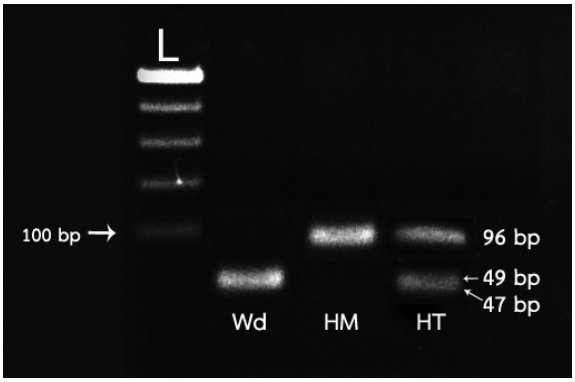
- การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box regionในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ promoter ของ AP2 box region จากผลผลิตพีซีอาร์ในข้อ 2.1 ด้วยไพรเมอร์ Forward: 5'

GTT CTG GGA GGA GAG GCA TTC AG 3' Reverse: 5' CTG CCA TGT CGG GAA TAT TCA AGG 3' (Schwerin *et al*., 2003) โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR Taq-buffer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 mM ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร Forward primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 10 pmol/ul ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 unit/ul ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร และเติม dH_2O จนครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่มีสภาวะควบคุมอุณหภูมิจำนวน 35 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30 วินาที (ดัดแปลงจาก Schwerin *et al*., 2003) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ Thermo Fisher Scientific Inc. USA.) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification (Favorgen Biotech corporation, Taiwan)

การตรวจสอบความหลากรูปแบบของยีน hsp70.1 โดยวิธี PCR-RFLP

หลังจากได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box region แล้วทำการตรวจสอบความหลากรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI (Bme1390I, Thermo Fisher Scientific Inc. USA.) โดยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และหยุดการทำปฏิกิริยาโดยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ Thermo Fisher Scientific Inc. USA.) โดยมีรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 รูปแบบ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI L คือ DNA ladder Wdคือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเออยู่ที่ขนาด 49 และ 47 คู่เบส HM คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ homozygous mutation ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเออยู่ที่ขนาด 96 คู่เบส และ HT คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation ซึ่งจะพบแถบดีเอ็นเออยู่ที่ขนาด 96 49 และ 47 คู่เบส

ผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

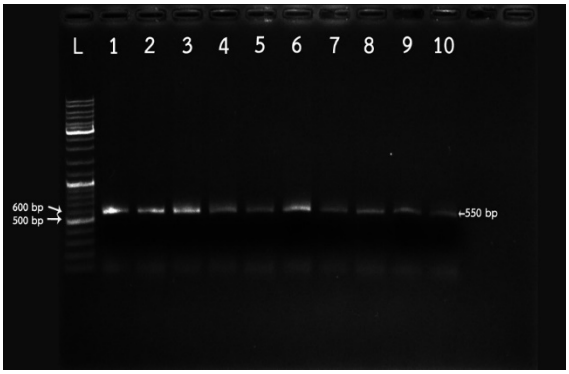
การปรับสภาพการทำปฏิกิริยา โดยปรับช่วง annealing temperature ไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และปรับช่วง extension ไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในโคไทยพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มได้ โดยสามารถพบแถบสารพันธุกรรมขนาด 550 คู่เบส ได้จากตัวอย่างดีเอ็นเอของโคไทยพื้นเมืองทั้ง 51 ตัวอย่างดังรูปที่ 2

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน hsp70.1ในบริเวณ AP2 box region ของโคไทยพันธุ์พื้นเมือง

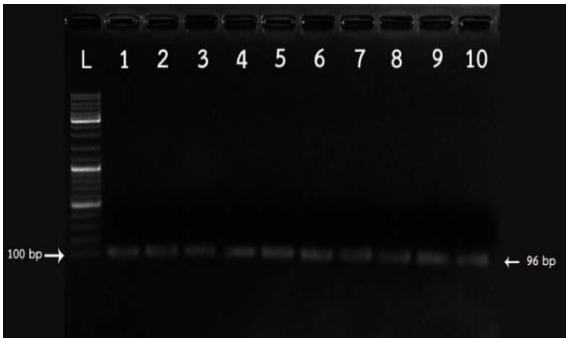
จากการทดลองสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองได้ทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งสิ้น 51 ตัวอย่าง โดยพบแถบสารพันธุกรรมอยู่ที่ขนาด 96 คู่เบส ดังรูปที่ 3

การตรวจสอบความหลากรูปแบบของยีน hsp70.1 ในโคไทยพื้นเมืองโดยวิธี PCR-RFLP

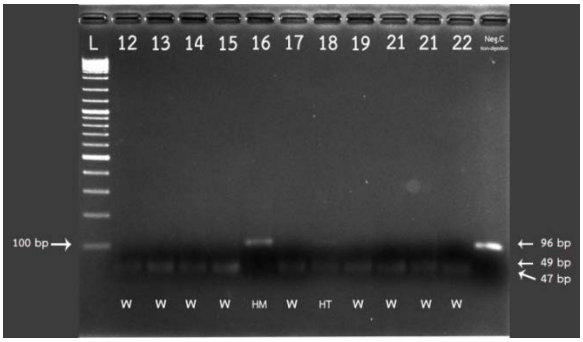
จากการตรวจสอบความหลากรูปแบบของยีน *hsp70.1* ในโคไทยพื้นเมืองโดยวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI พบรูปแบบการตัดได้เป็น 4 รูปแบบ ดังรูปที่ 4 โดยโคขาวลำพูน พบรูปแบบจีโนไทป์เป็นแบบ wild type genotype จำนวน 1 ตัวอย่าง แบบ homozygous mutation จำนวน 8 ตัวอย่าง แต่ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation โคไทยพื้นเมืองแถบภาคอีสานพบจีโนไทป์เป็นแบบ wild type genotype จำนวน 19 ตัวอย่าง แบบ homozygous mutation จำนวน 2 ตัวอย่าง และแบบ heterozygous mutation จำนวน 1 ตัวอย่าง โคลาน พบจีโนไทป์แบบ wild type genotype จำนวน 8 ตัวอย่าง แบบ homozygous mutation จำนวน 2 ตัวอย่าง แต่ไม่พบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation และโคชนพบรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype จำนวน 8 ตัวอย่าง และพบจีโนไทป์แบบ homozygous mutation จำนวน 2 ตัวอย่าง แต่ไม่พบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation โดยจากตารางที่ 1 จะพบว่าสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype พบสัดส่วนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70.59 รองลงมาคือแบบ homozygous mutation คิดเป็นร้อยละ 27.45 และแบบ heterozygous mutation คิดเป็นร้อยละ 1.96 ตามลำดับ



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณ AP2 box region ในโคไทยพื้นเมืองซึ่งพบแถบสารพันธุกรรมที่ขนาด 550 คู่เบส (L คือ DNA Ladder หมายเลข 1-10 คือ ตัวอย่างแถบสารพันธุกรรมที่ได้จากโคชน)



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ในบริเวณ AP2 box region ของโคไทยพื้นเมือง โดยพบแถบสารพันธุกรรมอยู่ที่ขนาด 96 คู่เบส (L คือ DNA Ladder หมายเลข 1-10 คือ ตัวอย่างแถบสารพันธุกรรมที่ได้จากโคลาน)



รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างแถบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด ScrFI (L คือ DNA Ladder หมายเลข 12-22 คือ ตัวอย่างแถบสารพันธุกรรมที่ได้จากโคพื้นเมืองแถบภาคอีสาน Neg.C คือ ตัวอย่างควบคุม)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนและสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์ที่พบของยีน *hsp70.1* ที่บริเวณ AP2 box region ในโคไทยพื้นเมืองแต่ละกลุ่ม

กลุ่มตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมือง	**รูปแบบจีโนไทป์**			**รวม**
	Wild type	Homozygous mutation	Heterozygous mutation	
โคขาวลำพูน	1	8	0	**9**
โคภาคอีสาน	19	2	1	**22**
โคลาน	8	2	0	**10**
โคชน	8	2	0	**10**
รวม	**36**	**14**	**1**	**51**
อัตราร้อยละ	**70.59**	**27.45**	**1.96**	

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างโคไทยพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่ม รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 จะพบว่าสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype พบเป็นสัดส่วนมากที่สุด รองลงมาคือแบบ homozygous mutation และพบน้อยที่สุดแบบ heterozygous mutation ซึ่งต่างจากรายงานของ Deb *et al*. (2013) ที่ได้ทำการศึกษาถึงรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ต่อความสามารถในการทนร้อนของโคนมลูกผสมสายพันธุ์ Frieswal (Holstein Friesian X Sahiwal) ในประเทศอินเดีย พบว่ารูปแบบจีโนไทป์ที่พบส่วนใหญ่เป็น heterozygous mutation ร้อยละ 60.71 รองลงมาคือแบบ wild type genotype พบร้อยละ 39.29 แต่ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์ชนิด homozygous mutation ในขณะที่จากการศึกษาของ Schwerin

et al. (2003) ที่ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์กับลักษณะจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคนมสายพันธุ์ Holstein Friesian ในประเทศเยอรมนี พบว่ารูปแบบจีโนไทป์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นชนิด wild type genotype รองลงมาคือชนิด heterozygous mutation และพบจีโนไทป์ชนิด homozygous mutation น้อยที่สุด ทั้งนี้จากการศึกษาดังกล่าวพบว่ากลุ่มโคที่มีจีโนไทป์แบบ wild type genotype มีประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ดีที่สุดและทำให้อัตราการคัดทิ้งของโคกลุ่มดังกล่าวมีน้อยกว่ากลุ่มที่เกิดการกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Basirico *et al*. (2011) ที่ได้มีการศึกษาถึงรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1* ในส่วน 5'-UTR ที่ตำแหน่ง g895 ในโคนมสายพันธุ์ Holstein Friesian ของประเทศอิตาลี พบว่าโคกลุ่มตัวอย่างมีจีโนไทป์แบบ wild type genotype มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 66.8 รองลงมาคือแบบ heterozygous mutation คิดเป็นร้อยละ 28.8 และกลุ่ม homozygous mutation พบน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 4.4 ทั้งนี้เนื่องจากโคกลุ่มตัวอย่างจากรายงานของ Deb *et al*. (2013) ดังกล่าวเป็นโคสายพันธุ์ลูกผสม (Cross breed) มีการผสมข้ามพันธุ์ทำให้มีโอกาสในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมได้มากกว่าโคกลุ่มที่เป็น Holstein Friesian หรือจากกลุ่มโคไทยพันธุ์พื้นเมือง จึงมีสัดส่วนในการพบรูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation มากกว่ารูปแบบอื่นๆ ในขณะที่โคกลุ่มสายพันธุ์ Holstein Friesian จากตัวอย่างรายงานดังกล่าวหรือโคไทยพันธุ์พื้นเมืองเป็นกลุ่มโคที่มีการผสมภายในสายพันธุ์เดียวกัน (Pure breed) ทำให้มีโอกาสในการแลกเปลี่ยนพันธุ์กรรมน้อยกว่าจึงพบรูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype มากกว่า

จากข้อมูลในตารางที่ 2 จะพบว่าถึงแม้ว่ายีน *hsp70.1* จะเป็นยีนที่อนุรักษ์ (Kregel, 2002) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบการกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region ในโคไทยพื้นเมือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบการกลายชนิด homozygous mutation มากกว่า heterozygous mutation ซึ่งขัดแย้งกับรายงานในต่างประเทศที่พบการกลายแบบ

ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *hsp70.1*ที่ตำแหน่ง AP2 box region จากรายงานต่างๆ

สายพันธุ์	**พื้นที่**	**ผู้รายงาน**	**ร้อยละรูปแบบจีโนไทป์ที่พบ**		
			Wd	HM	HT
โคไทยพื้นเมือง	ประเทศไทย	ผู้วิจัย	70.59	27.45	1.96
ฟรีส์วาล	อินเดีย	Deb et. al., 2013	39.29	0.00	60.71
โฮลสไตล์ฟรีเซียน	เยอรมนี	Schwerin et. al., 2003	66.05	6.98	26.97
โฮลสไตล์ฟรีเซียน	อิตาลี	Basirico et. al., 2011	66.8	4.4	28.8

Wd คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype

HM คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ homozygous mutation

HT คือ รูปแบบจีโนไทป์แบบ heterozygous mutation

heterozygous mutation มากกว่า homozygous mutation และเมื่อพิจารณาในกลุ่มตัวอย่างโคขาวลำพูนแล้ว พบว่าประชากรกลุ่มดังกล่าวเป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบการกลายของยีน *hsp70.1* ซึ่งพบรูปแบบจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous mutation ถึง 8 ตัวอย่างและพบ wild type genotype เพียง 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประชากรของโคขาวลำพูนในปัจจุบันนั้นมีการลดจำนวนลงเป็นอย่างมากและยังพบว่าโคขาวลำพูนในสภาพการเลี้ยงตามธรรมชาตินั้นส่วนใหญ่มีการรวมตัวอยู่เพียง 3 จังหวัดแถบภาคเหนือเท่านั้นได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน และลำปาง เป็นต้น (พิชิต และคณะ, 2553) ซึ่งด้วยเหตุนี้อาจทำให้เกิดการผสมพันธุ์กันภายในกลุ่ม (inbreed) ดังนั้นหากพ่อแม่พันธุ์ของกลุ่มประชากรมีลักษณะจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous mutation ลักษณะความหลากหลายของจีโนไทป์ก็จะลดลงทำให้กลุ่มประชากรพบมีรูปแบบจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous mutation เป็นส่วนใหญ่และจะทำให้สภาพสมดุลของจีโนไทป์ของประชากรนั้นเปลี่ยนแปลงไปไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ในที่สุด (Hartwell *et al*., 2011)

ทั้งนี้ลักษณะดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มตัวอย่างโคไทยพื้นเมืองโดยเฉพาะโคขาวลำพูนอาจเกิดเหตุการณ์ ความไม่แน่นอนทางพันธุกรรม (Genetic drift) เกิดขึ้น โดยมีการคง (fix) รูปแบบจีโนไทป์บางรูปแบบไว้จนทำให้จีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไป โดยสาเหตุของการเกิดความไม่แน่นอนทางพันธุกรรมอาจเกิดจากเหตุการณ์ผลกระทบจากผู้ก่อตั้ง (Founder effect) โดยอาจเกิดจาการอพยพของพ่อแม่พันธุ์หรือประชาการจำนวนน้อยกลุ่มหนึ่งมาจากกลุ่มประชากรกลุ่มเดิมซึ่งอาจจะมีรูปแบบจีโนไทป์เพียงแค่บางรูปแบบเท่านั้นดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มจำนวนของประชากรมากขึ้น กลุ่มประชากรใหม่จึงจะพบรูปแบบของจีโนไทป์เพียงบางรูปแบบตามพ่อแม่พันธุ์เท่านั้นทำให้จีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไป ดังเช่นที่การศึกษาในครั้งนี้พบว่ารูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype หรือแบบ homozygous mutation จะพบมากกว่าการพบแบบ heterozygous mutation (Matute, 2013) นอกจากนั้นแล้วสาเหตุการเกิดความไม่แน่นอนทางพันธุกรรมอาจเกิดจากเหตุการณ์ประชากรคอขวด (Population bottle neck) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยการลดจำนวนของประชากรเดิมลงอย่างรวดเร็วทำให้ประชากรเดิมเหลือเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นและประชากรกลุ่มดังกล่าวนั้นอาจมีรูปแบบจีโนไทป์เพียงบางรูปแบบเท่านั้น ดังนั้นเมื่อกลุ่มประชากรเดิมที่หลงเหลืออยู่มีการเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้น กลุ่มประชากรใหม่จึงจะพบรูปแบบจีโนไทป์เพียงบางรูปแบบเท่านั้นและทำให้รูปแบบจีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไปเป็นต้น (Hartwel *et al*., 2011) นอกจากนี้แล้วสาเหตุการเกิดความไม่แน่นอนทางพันธุกรรม อาจเกิดจากการจงใจคัดเลือกคุณลักษณะตามสายพันธุ์บางประการซึ่งมีผลทำให้รูปแบบจีโนไทป์บางรูปแบบสูญหายไปได้ แต่ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นเพียงส่วนหนึ่งของประชากรที่ใช้ศึกษาถึงลักษณะความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region เท่านั้นการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุศาสตร์ประชากรของกลุ่มโคขาวลำพูนดังกล่าวอาจจะต้องมีการเก็บตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อให้คลอบคลุมและเพียงพอสำหรับประเมินความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของยีน *hsp70.1* ในโอกาสต่อไป

และจากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบถึงความหลากรูปแบบทางพันธุกรรมของของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region โคไทยพื้นเมืองในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาเท่านั้น ยังไม่ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนของโคแต่ละกลุ่มกับรูปแบบจีโนไทป์ต่างๆ ที่พบ ดังนั้นการที่โคไทยพันธุ์พื้นเมืองซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Bos indicus* และมีความสามารถในการทนร้อน (thermotolerance) ได้ดีกว่า *Bos taurus* นั้น (Beatty *et al*., 2006) การทนร้อนดังกล่าวอาจจะอยู่ในลักษณะการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดีร่วมด้วย (compensation) ซึ่งจะเห็นได้จากรูปแบบจีโนไทป์ที่พบมีทั้งส่วนที่เป็น wild type genotype และส่วนที่เกิดการกลายไป และจากรายงานของ จักรกริช และคณะ (2555) พบว่าเมื่อโคอยู่ภาวะเครียดจากความร้อนร่างกายจะมีการปรับตัวโดยการหายใจเร็วขึ้นและมีการขับเหงื่อออกมามากขึ้นแต่ไม่พบความแตกต่างของระดับการเพิ่มขึ้นของ heat shock protein 70 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคไทยพื้นเมือง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโคไทยพันธุ์พื้นเมืองนอกจากจะมีลักษณะการทนร้อนได้ดีแล้วยังพบรูปแบบการทนร้อนในลักษณะการปรับตัวได้ดีอีกด้วยเช่นเดียวกัน

ถึงแม้ว่าจะมีรายงานจากต่างประเทศหลายฉบับที่มีการทดลองถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนกับรูปแบบจีโนไทป์ที่พบและพบว่ารูปแบบจีโนไทป์แบบ wild type genotype ของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box เหมาะแก่การนำมาใช้เป็น Bio-maker เพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ (Schwerin *et al*., 2003, Basicrico *et al*., 2011; Deb *et al*., 2013) แต่ก่อนที่จะนำมาใช้เพื่อเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ในโคไทยพันธุ์พื้นเมืองนั้น ควรมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนกับรูปแบบจีโนไทป์ที่พบในรูปแบบต่างๆ ให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้นก่อน เพื่อที่จะสามารถเลือกได้ว่าจะคัดเลือกโคที่มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีหรือคัดเลือกโคที่มีความสามารถในการปรับตัวต่อความสภาพแวดล้อมได้ดีเป็นต้น และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในโปรตีนชนิดอื่นด้วย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า 1) มีการกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region (position g895) ในโคไทยพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มโดยรูปแบบจีโนไทป์ที่พบมากที่สุดจะเป็นแบบ wild type genotype รองลงมาคือ homozygous mutation และพบน้อยที่สุดเป็นแบบ heterozygous mutation 2) การกลายของยีน *hsp70.1* ที่ตำแหน่ง AP2 box region เกิดขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างของโคขาวลำพูนมากที่สุดโดยเป็นการกลายแบบ homozygous mutation

ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะนำไปใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ที่พบกับความสามารถในการทนร้อนของโคไทยพันธุ์พื้นเมืองและนำไปสู่การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ในโคไทยพื้นเมืองในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) ที่อนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการในการทำ gradient PCR ขอขอบคุณ ดร.สรรเพชญ

โสภณ คุณยุทธนา จ่าแสนชื่น สพ.ญ.ภัทราภา ซึ้งประเสริฐ และ น.สพ.นิธิ ศุภธราธาร ที่กรุณาช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. โคพื้นเมือง. เอกสารเผยแพร่ การเรียนรู้ผ่านสื่ออิเล็กทรอนิกส์. เข้าถึงได้จาก : http://breeding.dld.go.th/biodiversity/new%2 0 elearning/animal%20nativos.html. (19/6/2559)

จักรกริช เจริญศิลป์ สุภร กตเวทิน ยุพินผาสุข และสุรางคนา สุขเลิศ. 2555. การตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณ HSP70 ในเม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทยต่อสภาพอากาศในรอบวัน. *แก่นเกษตร*. 40 ฉบับพิเศษ 2: 377-380.

พิชิต ชูเสน สุวิช บุญโปร่ง และ ชำนาญ ดงปาลี. 2553. แนวโน้มทางพันธุกรรมลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคขาวลำพูน. E-Journal สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. เข้าถึงได้จาก http://e-journal.dld.go.th/ ?p=642 (19/6/2559)

อุมาพร แพทย์ศาสตร์. 2548. ความหลากหลายของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 90 และยีนกลูโคคอร์ติคอยด์รีเซพเตอร์ในโคพื้นเมืองไทยและโคนมลูกผสม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 81

Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N. and Nardone, A. 2011. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactation cows. *Cell Stress Chaperon*. 16: 441-448.

Beatty, D.T., Barnes, A., Taylor, E., Pethick, D., McCarthy, M. and Maloney, S.K., 2006. Physiological responses of Bostaurus and Bosindicus cattle to prolonged, Continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.* 84: 972-985.

Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A.R., Chaisongkram, C., Brenig, B. and Knorr, C. 2012. Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. *Trop. Anim. Health Prod*. 44: 921-928.

Chen, T., Guo, J., Han, C., Yang, M. and Cao, X. 2009. Heat shock protein 70, Released from heat stressed tumor cell, Initiates antitumor immunity by inducing tumor cell chemokine production and activating dendritic cells via TLR4 pathway. *J. Immunol*. 182: 1449-1459.

Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Brahmane, M.P., Singh, R., Sengar, G. and Sharma, A. 2013. Promoter variants at AP2 box region of *hsp70.1* affect thermal stress response and milk production traits in Frieswal cross bred cattle. *Gene*. 532: 230-235.

Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Singh, R., Sengar, G. and Sharma A. 2014. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. *Gene*. 536: 435-440.

Hansen, P.J. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci*. 82-83: 349-360.

Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E. and Silver, L.M. 2011. Genetics From Genes to Genomes. 4th edition. McGraw-Hill company. New York. 730 p.

Kregel, K.C. 2002. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92: 2177-2186.

Matute, D.R. 2013. The role of founder effects on the evolution of reproductive isolation. *J. Evol. Biol*. 26(11): 2299-2331.

Ravagnolo, O., Misztal, I. and Hoogenboom, G. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J. Dairy Sci*. 83: 2120-2125.

Rensis, F.D. and Scaramuzzi, R.J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow: A review. *Theriogenology*. 60: 1139–1151.

Schwerin, M., Sanftleben, H. And Grupe, S. 2003. Genetic predisposition for productive life is associated with functional inactivation of a AP2-binding site in the promoter of the stress protein 70.1-encoding gene in cattle. *Arch. Tierz. Dummerstorf*. 46(2): 177-185.

Sonna, A. Larry, Fujita, J., Gaffin, L. Stephen, and Lilly, M. Craig. 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92: 1725–1742.

Xiong, Q., Chai, J., Xiong, H., Li, W., Huang, T., Liu, Y., Sua, X., Zhang, N., Li, X., Jiang, S. and Chen, M. 2012. Association analysis of HSP70A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. *Cell Stress Chaperon*. 18: 711-718.