การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีนฮีทช็อคโปรตีนในโคนม

Study of genotype pattern for heat shock protein gene in dairy cattle

สุพิชฌาย์ บุญช่วย, ปิยะณัฐ ปะราชิโก[1], มนต์ชัย ดวงจินดา[1] และ วุฒิไกร บุญคุ้ม[1*]

Supitcha Boonchui, Piyanat Parachiko, Monchai Duangjinda[1]

and Wuttigrai Boonkum[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถี่จีโนไทป์ของยีนฮีทช็อคโปรตีนในโคนมที่สัมพันธ์กับการทนร้อนและเปรียบเทียบยีนทนร้อนกับปริมาณผลผลิตน้ำนมในโคนมแต่ละพันธุ์ โดยใช้โคนม 3 พันธุ์ จำนวน 359 ตัว ได้แก่ ซาฮิวาล (SW) 79 ตัว, ไทย ฟรีเชียน (TF) 181 ตัวและไทย มิวกิ้ง ซีบู (TMZ) 99 ตัว ในช่วงปี พ.ศ. 2549-2551 ปริมาณน้ำนมรวมที่ 305 วัน และตัวอย่างเลือดถูกเก็บเพื่อตรวจหารูปแบบ genotype ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFLP) จากการศึกษาพบว่า รูปแบบจีโนไทป์ AA มีมากกว่ารูปแบบจีโนไทป์ AB ซึ่งพบมากในโคนมพันธุ์ SW สำหรับโคนม TF ให้ผลผลิตน้ำนมรวมเฉลี่ยที่ 305 วันสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับโคนม TMZ แต่มีความสามารถในการทนร้อนต่ำสุดแสดงให้เห็นว่าลักษณะทั้งสองมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้าม ดังนั้นในแผนการปรับปรุงพันธุ์ควรเน้นการวิเคราะห์หลายลักษณะพร้อมกัน

คำสำคัญ: ความเครียดเนื่องจากความร้อน, ดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์, Heat Shock Protein gene

ABSTRACT: This study were to investigate genotype frequency of heat shock protein gene associated with heat tolerance in dairy cattle and to compare heat shock protein gene and milk yield in various dairy cattle breeds. Data included 359 records from Sahiwal (SW), Thai Friesian (TF), and Thai milking zebu (TMZ) between 1990 and 2008such as sahiwal, Thai milking zebu, and Thai Friesian. 305-d milk yields and blood samples were collected for investigation of genotype pattern by Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFLP). It was found that pattern of AA genotype has higher than pattern of AB in all dairy breeds, particularly Sahiwal breed (SW). TF had highest average 305-d milk yield compare to TMZ whereas lowest heat tolerance. This result showed that both 305-d milk yield and heat tolerance are negative correlation. Therefore, in breeding scheme should be selected by multiple-traits analysis.

Keywords: Heat stress, Temperature-Humidity Index, Heat Shock Protein gene

บทนำ

สภาวะโลกร้อน (Global warming) ทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องซึ่งส่งผลกระทบด้านลบต่อการเลี้ยงปศุสัตว์ของประเทศไทยโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโคนม (Boonkum et al., 2011) อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมที่สูงขึ้นมีผลทำให้โคนมมีการสะสมความร้อนภายในร่างกายมากขึ้นซึ่งหากไม่สามารถระบายความร้อนออกจากร่างกายได้สมดุลเท่ากับความร้อนที่รับเข้าสู่ร่างกายผลที่ตามมาคือโคนมจะเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน (heat stress) ซึ่งกระทบต่อการกินได้ลดลง ผลผลิตน้ำนมลดลง รวมถึงมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ แนวทางการลดความเครียดเนื่องจากความร้อนในปัจจุบันจะเน้นที่การจัดการ

[1] สาขาสัตวศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย เลย 42000
Department of Animal Science, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Loei University, Loei 42000

* Corresponding author: suntornka@hotmail.com

สภาพแวดล้อม เช่น การจัดการโรงเรือนให้สามารถระบายความร้อนได้อย่างรวดเร็วโดยเพิ่มพัดลมระบายอากาศ เพิ่มจุดให้น้ำ รวมถึงการเพิ่มร่มเงา (Marcillac-Embertson et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการจัดการด้านอาหารโดยโคนมยังคงได้โภชนะครบถ้วนแม้จะกินอาหารได้น้อยลง (Moore et al., 2005) อย่างไรก็ตามวิธีการดังที่กล่าวมายังมีข้อจำกัดทั้งด้านการลงทุนสูงและยังต้องปรับเปลี่ยนรูปแบบการจัดการให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละวันอยู่เสมอ ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่อาจสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้อย่างยั่งยืนคือการปรับปรุงพันธุกรรมของลักษณะการทนต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนโดยใช้หลักการของการประเมินพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกโคนมที่มีความสามารถทางพันธุกรรมที่ดีเก็บไว้ขยายพันธุ์ต่อไปในอนาคตโดยค่าพันธุกรรมที่กล่าวถึงคือ “ค่าประมาณค่าการผสมพันธุ์” (estimated breeding value; EBV) อย่างไรก็ตามการประเมินพันธุกรรมยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ต้องรอเก็บข้อมูลลักษณะปรากฏจนครบก่อนจึงจะสามารถประเมินพันธุกรรมได้ อีกทั้งลักษณะดังกล่าวมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำจึงอาจมีผลต่อความแม่นยำในการประเมินพันธุกรรมและการคัดเลือก ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) โดยการค้นหายีนเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่สัมพันธ์กับลักษณะความทนทานต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนอาจเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มความแม่นยำอีกทั้งยังย่นระยะเวลาของการคัดเลือกโคนมให้สั้นลงได้ อีกทั้งการค้นพบยีนที่สัมพันธ์กับลักษณะความทนทานต่อความเครียดจะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับพันธุ์โคนมของประเทศไทยได้อีกทางหนึ่ง (added value) โดยยีนเครื่องหมายที่มีการศึกษาวิจัยในขณะนี้คือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและแสดงออกของโปรตีน Heat Shock Protein (HSP)โดยพบว่าในสภาวะที่เซลล์ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อนร่างกายจะมีการผลิตโปรตีนดังกล่าวออกมาในปริมาณมากซึ่งมีบทบาทในการป้องกันและรักษาสภาพเซลล์เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน โดยสมมติฐานหากพบ HSP ในปริมาณมากจะแสดงถึงความสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดี (Kregel, 2002) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหายีนเครื่องหมายในโคนมที่สัมพันธ์กับลักษณะการทนร้อนในโคนมและเปรียบเทียบสายพันธุ์โคนมที่มียีนทนร้อนกับปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนมในแต่ละพันธุ์

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้โคนมพันธุ์ซาฮิวาล (SW), โคนมไทยฟรีเซี่ยน (TF) และโคนมไทยมิวกิ้งซีบู (TMZ) จำนวน 79, 181, และ 99 ตัวตามลำดับซึ่งเก็บบันทึกได้จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ปากช่อง และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ ในช่วงปี พ.ศ. 2549-2551 โดยเก็บข้อมูลปริมาณน้ำนมและตัวอย่างเลือดเพื่อนำมาสกัด genomic DNA

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน heat shock protein ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอในแต่ละปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA Template ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Forward (0.5 µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Reverse (0.5 µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, dNTPs (1 mM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, $Mgcl_2$ (25 mM) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร, Sterile water ปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร,Tag DNA polymerase (0.25 U) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตรโดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้เริ่มต้นด้วยกระบวนการ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 66 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที

Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ เป็นเวลา 2 นาที และที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำ PCR product ไปตรวจสอบขนาดของยีนด้วยโปรแกรม Gene Snap และ Gene Tool

การตรวจสอบหายีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFLP)

นำผลผลิต PCR ที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน มาตัดด้วยเอ็นไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) คือ Enzyme HP 188I (NEB Inc) โดยแบ่ง PCR Product ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 4 ไมโครลิตรและใส่องค์ประกอบในการตัดเอ็นไซม์ ประกอบด้วย 10X Buffer 4 ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร, H_2O ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, Enzyme HPY 188I ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มใน Dry Block Heating Thermostat ที่ 37°C นาน 6 ชม. หลังจากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วย 2% agarose electrophoresis จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Snap และ Gene Tool (Figure 1 and Figure 2)

วิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณน้ำนมเฉลี่ย ความถี่จีโนไทป์และความถี่ยีนในโคนมแต่ละพันธุ์ตามลำดับ สำหรับค่าดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (Temperature-Humidity Index; THI) สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

THI = (1.8 x **temperature,**°**C** + 32) - (0.55 - 0.0055 x **Rerative Humidity,%**) x (1.8 x **temperature,**°**C** - 26)

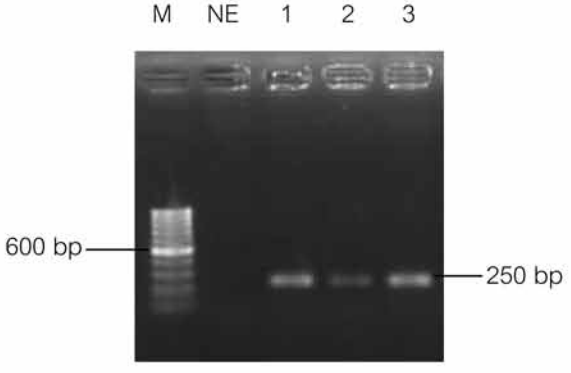

Figure 1 PCR size of heat shock

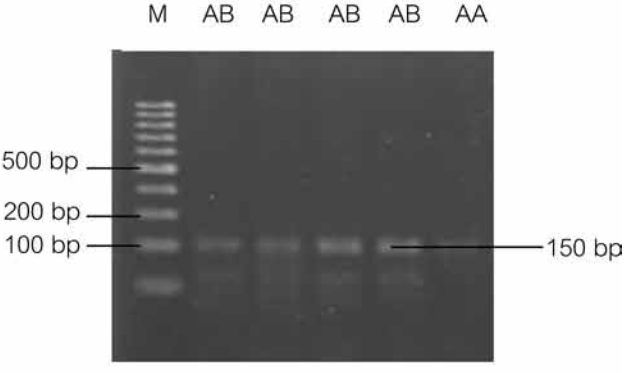

Figure 2 Patterns of heat shock protein gene protein gene by PCR-RFLP

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์หาค่าความถี่จีโนไทป์แสดงในตารางที่ 1 (Table1) พบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ โดยสัดส่วนของจีโนไทป์ AA (แสดงถึงการทนร้อน) มากกว่าจีโนไทป์ AB โดยจะเห็นได้ชัดในโคนมพันธุ์ Sahiwal (SW) มีจีโนไทป์ AA และ AB เท่ากับ 87% และ 13%, สำหรับในโค Thai Milking Zebu (TMZ) มีจีโนไทป์ AA และ AB เท่ากับ 43% และ 57% และโค Thai Friesian (TF) มีจีโนไทป์ AA และ AB เท่ากับ 44% และ 56% ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้ว่าโคนมพันธุ์ Sahiwal มีจีโนไทป์ AA มากที่สุดทั้งนี้เนื่องจากเป็นโคในตระกูล *Bos indicus* ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในด้านการทนร้อน สำหรับการเปรียบเทียบผลผลิตน้ำนมรวมที่ 305 วันพบว่าโคนมพันธุ์ TF ให้ผลผลิตน้ำนมเฉลี่ย 3,534 กก. ในขณะที่โคพันธุ์ TMZ ให้ผลผลิตน้ำนม

เฉลี่ย 3,241 กก. อย่างไรก็ตามความถี่ของจีโนไทป์ของโคนมทั้งสองพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่เนื่องจากโคนม TF สามารถให้ผลผลิตน้ำนมสูงกว่าโคนม TMZ อีกทั้งได้ผลตอบแทนมากกว่า (สดใสและคณะ, 2549) จึงควรเลี้ยงโค TF และแม้ว่ายีน heat shock protein จะเกี่ยวข้องกับการทนร้อนแต่จะพบว่าโคที่มีจีโนไทป์ของยีนดังกล่าวมากจะมีปริมาณน้ำนมต่ำ (negative correlation) ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาในอนาคตถึงการคัดเลือกโคนมที่มีทั้งความสามารถในการทนร้อนได้ดีร่วมกับการให้ผลผลิตน้ำนมสูง จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าโคนมที่เลี้ยงในจังหวัดลพบุรีได้รับผลกระทบจากความร้อนมากกว่าโคนมที่เลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ และนครราชสีมาตามลำดับซึ่งอาจสัมพันธ์กับการที่โคนม TMZ มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่าโคนม TF เนื่องจากความถี่จีโนไทป์ของโคนมทั้งสองไม่แตกต่างกันแต่เลี้ยงในสภาพอากาศที่แตกต่างกันเมื่อพิจารณาจากค่า THI

Table 1 Genotype, allele, and average accumulated 305 days milk yields in dairy cattle

Breeds	Number	Genotype			Allele		305-day milk (kg)	
		AA	AB	BB	A	B	Mean	SD
SW	79	0.87	0.13	0	0.93	0.07	-	-
TMZ	99	0.43	0.57	0	0.71	0.29	3,241	783
TF	181	0.44	0.56	0	0.72	0.28	3,534	1,126

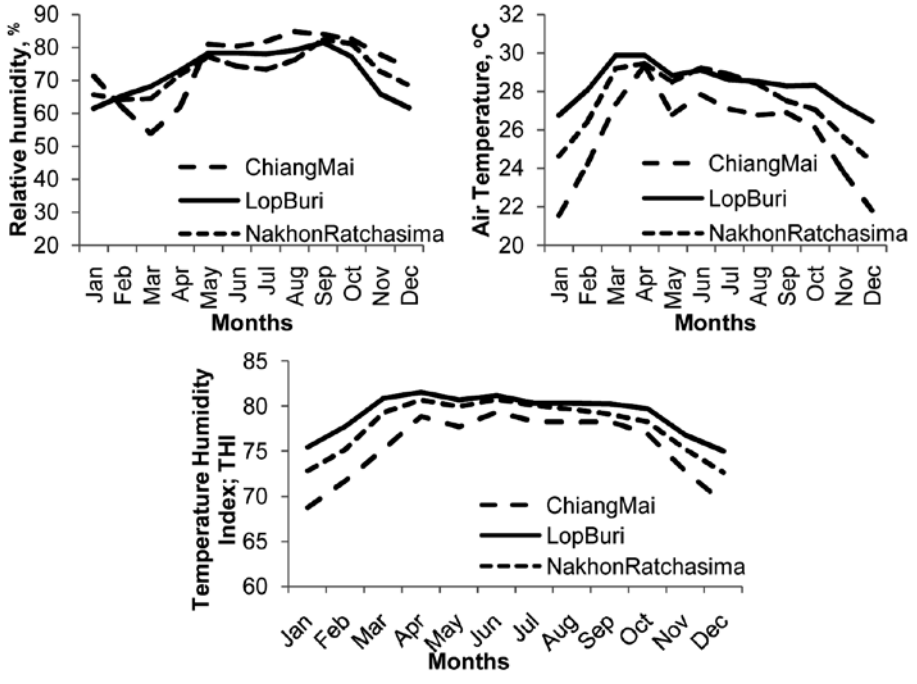

Figure 3 Patterns of relative humidity, air temperature and temperature-humidity index during 2006-2008 in 3 regions

สรุป

การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีนทนร้อนในโคนม พบจีโนไทป์ 2 รูปแบบโดยสัดส่วนของจีโนไทป์ AA มีมากกว่าจีโนไทป์ AB โคนมตระกูล *Bos indicus* จะมีจีโนไทป์ AA มากกว่าโคตระกูล *Bos taurus* อย่างไรก็ตามน้ำนมจะแปรผกผันกับความสามารถในการทนร้อน ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรเน้นปรับปรุงพันธุ์โดยพิจารณาในรูปของการคัดเลือกหลายลักษณะพร้อมกัน

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ที่สนับสนุนข้อมูลและสถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สดใส ยิ่งสง่า, ธวัชชัย สุวรรณกำจาย และกรองแก้ว บริสุทธิ์สวัสดิ์. 2549. เปรียบเทียบผลผลิตน้ำนมและผลตอบแทนของการเลี้ยงโคนมทีเอฟ โคนมทีเอ็มแซทและโคฟรีบราห์. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2549 กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์.

Boonkum, W., I. Misztal, M. Duangjinda, V. Pattarajinda, S. Tumwasorn, and J. Sanpote . 2011a. Genetic effects of heat stress on milk yield of Thai Holstein crossbreds. J. Dairy Sci. 94:487-492.

Kregel, K. C. 2002. Molecular biology of thermotolerance invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J. Appl. Physiol. 92:2177-2186.

Marcillac-Embertson, N. M., P. H. Robinson, J. G. Fadel, and F. M. Mitloehner. 2009. Effects of shade and sprinklers on performance, behavior, physiology, and the environment of heifers. J. Dairy Sci. 92:506-517.

Moore, C. E., J. K. Kay, R. J. Collier, M. J. VanBaale, and L. H. Baumgard. 2005. Effect of supplemental conjugated linoleic acids on heat-stressed Brown Swiss and Holstein cows. J. Dairy Sci. 88:1732-1740.