

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70-2 ระหว่างโคพื้นเมืองไทย และโฮลสไตน์ฟริเซียน

Comparative nucleotide sequence gene HSP70-2 between Thai Native cattle and Holstein Friesian

จุฬานีย์ น่วมจิตร¹, ยูพิน ผาสุก^{2*}, เทวินทร์ วงษ์พระลับ² และ สุภกร กตเวทิน²

Julanee Nuamchit¹, Yupin Phasuk^{2*}, Thevin Vongpralub² and Suporn Katavatin²

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ระหว่างโคพื้นเมืองไทย (NT) และพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียน (HF) โดยใช้ดีเอ็นเอจากตัวอย่างโคจำนวน 70 และ 52 ตัวอย่าง ตามลำดับเพิ่มปริมาณยีน HSP70-2 ด้วยเทคนิค PCR-SSCP โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน HSP70-2 จำนวนทั้งสิ้น 10 คู่ (HP1-HP10) ครอบคลุมบริเวณต่างๆ ของยีนดังนี้ 1) 5' flanking region 2) coding sequence และ 3) 3' flanking region พบรูปแบบ SSCP จากโคทั้งสองสายพันธุ์จำนวน 32 รูปแบบ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากรูปแบบที่ได้ พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดทั้งยีนในโคทั้งสองสายพันธุ์ และพบตำแหน่งที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์รวม 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1262, 2347, 2515, 2516 และ 2556 เกิดจากไพรเมอร์ HP5 HP9 และ HP10 ที่ครอบคลุมบริเวณ coding sequence และ 3' flanking region ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการแปลรหัส DNA เป็นโปรตีน และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ post-transcription ของยีน HSP70-2 แตกต่างกัน จึงอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้โคสองสายพันธุ์มีการตอบสนองของยีน HSP70-2 ที่ต่างกัน

คำสำคัญ: โคพื้นเมืองไทย, โคพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียน, ยีน HSP70-2, ลำดับนิวคลีโอไทด์

ABSTRACT: The objective of this study was to compare nucleotide sequence of heat shock protein 70-2 gene (HSP70-2) between Thai Native (NT) and Holstein Friesian (HF) cattle using Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) method. DNA were extracted from 70 and 52 samples of NT and HF, respectively. Ten primers specifically (HP1-HP10) designed to HSP 70-2 include 3 regions: 1) 5' flanking region 2) coding sequence and 3) 3' flanking region. The results of ten primers were 32 patterns, respectively in both NT and HF. Sequence analysis had polymorphism in HSP70-2 gene and mutation sequence at 1262, 2347, 2515, 2516 and 2556 in HP5 HP9 and HP10. Difference species cattle by nucleotide sequence in HP5 HP9 primer cover coding sequence and HP10 primer cover 3' flanking region, those affect primers translation protein and post-transcription of HSP70-2 respectively. Therefore, the polymorphisms on HP5 HP9 and HP10 would used association with the expression of HSP70-2 in each cattle species.

Keywords: Thai Native cattle, Holstein Friesian, Nucleotide sequence, HSP70-2 gene.

¹ ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130
Regional Reference Laboratory of Food and Mouth disease in South East Asia (RRL) Pakchong
Nacomratchasima 30130

² ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 4002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Khan University 40002

* Corresponding author: yuplua@kku.ac.th

บทนำ

การทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นกลไกการควบคุมอุณหภูมิร่างกายในขณะที่ยอดของสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพทางสรีรวิทยาและภายในเซลล์ร่างกายของสัตว์ในระดับโมเลกุลเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเมื่อเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน จะตอบสนองโดยการสร้างโปรตีนจำเพาะชื่อ heat shock protein (HSP) ซึ่งโปรตีนที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากคือ กลุ่ม HSP70 เนื่องจากเป็นโปรตีนกลุ่มที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (Kregel, 2002) จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ HSP70 พบว่าหากพบโปรตีน HSP70 ในปริมาณมากแสดงถึงความสามารถทนต่อความร้อนได้ดี (สุรางคนา, 2551) อาจเนื่องจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือเกิดการกลายพันธุ์ของยีน HSP70 (Gutierrez and Guerriero, 1995) ดังนั้นโคที่มีความสามารถในการทนร้อนที่แตกต่างกันอาจเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) หรือมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 แตกต่างกัน แต่งานวิจัยที่อธิบายเกี่ยวกับกลไกการทำงานของยีน HSP70 ที่สัมพันธ์กับการตอบสนองการทนร้อนในโคพื้นเมืองไทยยังมีไม่มาก และยังไม่มียารายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ในโคพื้นเมืองไทยหรือโคเขตร้อน ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม heat inducible ที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ในฐานข้อมูล GenBank ของโคกลุ่ม *Bos taurus* ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนเพื่อเปรียบเทียบหาตำแหน่งที่แตกต่างระหว่างโคพันธุ์พื้นเมืองไทย ซึ่งเป็นโคในท้องถิ่นและเป็นตัวแทนกลุ่มโคเขตร้อน (*Bos indicus*) ที่มีคุณสมบัติในการทนร้อนได้ดี กับโคพันธุ์ไฮลัสไต้หวันฟรีเซียน ซึ่งเป็นโคที่นิยมนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศต่างๆ และมักใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มโคเขตร้อน (*Bos taurus*) เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์

ของโคทั้งสองสายพันธุ์ และสามารถประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกโคทนร้อนต่อไป

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อโคพันธุ์พื้นเมืองไทยและโคพันธุ์ไฮลัสไต้หวันฟรีเซียน จำนวน 70 และ 52 ตัวตามลำดับ สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการ Goodwin et al. (2007) ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน HSP70-2 ซึ่งรายงานในฐานข้อมูล GenBank (accession number ; BTU02892) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ GENEFISH2 และ Primer3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย NCBI BLAST และตรวจสอบโอกาสที่จะเกิด hairpin loop และโอกาสที่ไพรเมอร์จะจับกันเองระหว่างเกิดปฏิกิริยา (Self dimer) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Oligoanalyzer ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 คู่ (HP1-HP10) ซึ่งครอบคลุมบริเวณต่างๆ ดังแสดงใน Table 1

การตรวจสอบความหลากหลายของดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-SSCP และ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปเพิ่มปริมาณขึ้นยีนด้วยเทคนิค PCR และตรวจหารูปแบบด้วยวิธี SSCP โดยนำ PCR product ที่ดีเอ็นเออยู่ในสภาพสายเดี่ยวผสมกับ SSCP dye ในอัตราส่วน 1:1 ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว จากนั้นทำ electrophoresis โดยใช้ปริมาตร 3 µl หยดลงบนแผ่น 5% nondenaturing polyacrylamide gel แนวตั้งใน 0.5X TBE buffer กระแสไฟฟ้าคงที่และเวลาดังแสดงใน Table 1 ในอุณหภูมิห้อง ย้อมแผ่นเจลด้วย gel star (Gelstar INC, NY) เพื่อดูรูปแบบของ PCR-SSCP product ภายใต้แสง UV สุ่มตัวอย่าง

จากรูปแบบ SSCP ในโคพื้นเมืองไทย และโคไฮลส์ไต้หวัน
ฟรีเซียน รูปแบบละ 1 ตัวอย่าง/สายพันธุ์ ส่งวิเคราะห์
ลำดับนิวคลีโอไทด์ (macrogen, South Korea)
นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงตามรูปแบบ
SSCP ที่พบในโคแต่ละตัว เปรียบเทียบตัวอย่างโค
ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดด้วยโปรแกรม DNAMAN
version 5.2.2 BioEdit และ ClustalW2 และ
เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล
GenBank ด้วย NCBI BLAST

ผลการศึกษาและวิจารณ์

เพิ่มปริมาณชิ้นยีน HSP70-2 และวิเคราะห์
หาความหลากหลายด้วยเทคนิค PCR-SSCP โดยใช้
ไพรเมอร์ HP1-HP10 ได้รูปแบบของ SSCP ทั้งหมด 32
รูปแบบในโคสองสายพันธุ์ นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลี
โอไทด์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคแต่ละตัว
มาตามกลุ่มรูปแบบ SSCP พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์
ยีน HSP70-2 ในโคทั้งสองสายพันธุ์มีขนาดประมาณ
2,720 bp ซึ่งพบความหลากหลายในหลายตำแหน่ง
ตลอดทั้งยีน

Table 1 Primer of HSP70-2 gene.

Primer	Sequence 5' → 3'	Size of PCR product (bp)	Annealing temperature (°C)	Position	Electrophoresis protocol for SSCP (volt/time)
HP1-F	F: CTCCTGTTTCCTCCAGCGAA	517	63	position 6-523 in 5'flanking region and	200V 360 min
HP1-R	R: GTCGTTGGCGATGATCTCCA			coding sequence	
HP2-F	F: GCACCACCTACTCCTGCGTA	230	66	position 461-691 in coding sequence	200 V 180 min
HP2-R	R: CTTTCATGTCCGACTGCACCA				
HP3-F	F: CGCAGAACACGGTGTTTCA	247	62	position 614-862 in coding sequence	200V 180 min
HP3-R	R: GTGATCACCGCGTTGGTCA				
HP4-F	F: GCTGACCAAGATGAAGGAGA	271	61	position 795-1066 in coding sequence	200V 180 min
HP4-R	R: GTCGATCGTCAGGATGGACA				
HP5-F	F: GTTCGACGTGTCCATCTGA	253	64	position 1038-1291 in coding sequence	200V 180 min
HP5-R	R: GAACAGGGAGTCGATCTCCA				
HP6-F	F: GAGAACCTTGTCGTCCAGCA	646	66	position 1239-1885 in coding sequence	200V 390 min
HP6-R	R: CAGGATGCCATTGGCATCGA				
HP7-F	F: AGATCGAGGTGACCTTCGACA	260	66	position 1844-2304 in coding sequence	200V 240 min
HP7-R	R: CTTTCAGCCCCCTCATCTCCA				
HP8-F	F: GTCGTACGCTTCAACATGA	271	66	position 2055-2325 in coding sequence	200V 240 min
HP8-R	R: AGACCCAGAGCCCCCTTTA				
HP9-F	F: GTGTAACCCATCATCAGCAGA	290	64	position 2232-2522 in coding sequence	200V 240 min
HP9-R	R: TCGAAACATTCTGGTGAACACA			and 3'flanking region	
HP10-F	F: GTTATAGTGAGTGTGTCCACAGA	238	64	position 2489-2709 in 3'flanking region	200V 180 min
HP10-R	R: AAGCCATTATCCCTCCCA				

บริเวณ 5' flanking region มีขนาด 423bp พบความหลากหลายของเบสในบริเวณนี้ ซึ่งความหลากหลายของเบสที่พบอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้การตอบสนองต่อความร้อนของโคแตกต่างกัน โดยบริเวณ 5' flanking region มีอิทธิพลต่อปริมาณการสร้างโปรตีนในเซลล์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนจำเพาะที่เรียกว่า transcription factors (TF) และเอนไซม์ที่ช่วยให้เกิดการกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) หากพบการเปลี่ยนแปลงของเบสหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ จะทำให้บริเวณเข้าจับของโปรตีนกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการตั้งต้นถ่ายถอดรหัส DNA แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณและความไวในการสังเคราะห์ mRNA HSP70 ที่แตกต่างกันด้วย (Cai et al., 2005) แต่ความหลากหลายของเบสที่พบไม่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ได้

บริเวณ coding sequence ถึง 3'flanking region เริ่มตั้งแต่ตำแหน่งเบสที่ 424-2720 ซึ่งพบความหลากหลายตลอดทั้งยีนในโคทั้งสองสายพันธุ์ แต่ตำแหน่งที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างโคพื้นเมืองไทยกับโคไฮลด์สไตร์ฟริเซียนได้อย่างชัดเจนได้แก่ ตำแหน่ง 1262 ในบริเวณไพรเมอร์ HP5 พบการแทนที่ของเบส M เป็น G และตำแหน่ง 2347 ในบริเวณไพรเมอร์ HP9 พบการแทนที่ของเบส T เป็น C ในโคพื้นเมืองไทยกับโคไฮลด์สไตร์ฟริเซียน ตามลำดับ (Figure 1) ทั้ง 2 ไพรเมอร์ครอบคลุมบริเวณ coding sequence ของยีน ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนแตกต่างกัน ทำให้โปรตีนจากยีน HSP70-2 มีการหมุนและขดม้วนตัวของโปรตีนต่างกัน เป็นผลให้ตำแหน่งการเข้าจับกับ

โปรตีนชนิดอื่นเปลี่ยนแปลงไป การทำงานของโปรตีนในโคสองสายพันธุ์จึงแตกต่างกัน (สุริพร, 2548)

ส่วนตำแหน่ง 2515, 2516 และ 2556 ในบริเวณไพรเมอร์ HP10 พบการแทนที่ของเบส K เป็น C, Y เป็น G และ G เป็น T ในโคพื้นเมืองไทยกับโคไฮลด์สไตร์ฟริเซียน ตามลำดับ (Figure 2) ซึ่งครอบคลุมบริเวณ 3'flanking region แม้ไม่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโน และปริมาณการสังเคราะห์ mRNA แต่มีอิทธิพลต่อกระบวนการ post-transcriptional gene ทำให้การคัดลอก mRNA สมบูรณ์ยิ่งขึ้น สามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีนได้ดีและไม่ถูกทำลายโดยง่าย สอดคล้องกับงานทดลองของ Adamowicz et al. (2005) ศึกษา SNPs ใหม่บริเวณ 3'-UTR ของยีน HSP70-1 ใน *Bos taurus* และ *Bos indicus* พบว่ามีการแทรกของเบส G และเบส C หรือการแทนที่เบส U/A บางตำแหน่งเป็นผลให้ mRNA สมบูรณ์ยิ่งขึ้น แต่ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณการสังเคราะห์ mRNA HSP70

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคที่ศึกษาไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างโคที่ศึกษาทั้งหมด 122 ตัว มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bos taurus* HSP70-2 gene (GenBank accession number BTU02892) (Grosz, 1993) ประมาณ 96%-98% และที่ตำแหน่ง 1262, 2347, 2515, 2516 และ 2556 ของยีนต้นแบบพบเบสเหมือนกับเบสของโคไฮลด์สไตร์ฟริเซียนที่ใช้ในการศึกษา จึงกล่าวได้ว่ากลุ่มโคเขตหนาวอาจมีตำแหน่งเบสที่สามารถแยกความแตกต่างจากโคพื้นเมืองไทยได้จากตำแหน่งเบสดังกล่าวได้

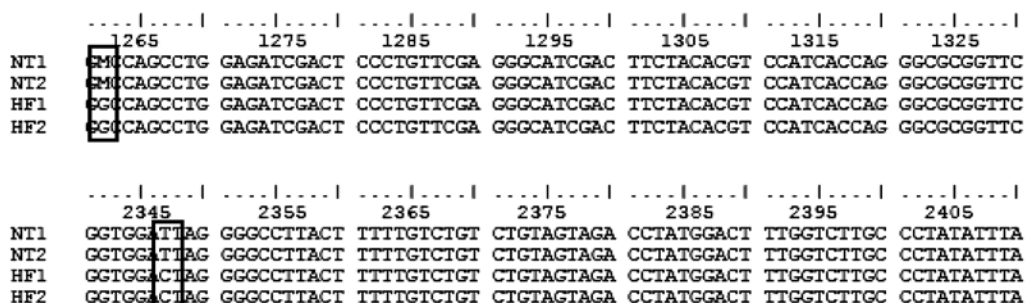


Figure 1 Multiple sequence alignment in position 1260 to 1330 and position 2345 to 2405 for NT 2 samples and HF 2 samples.

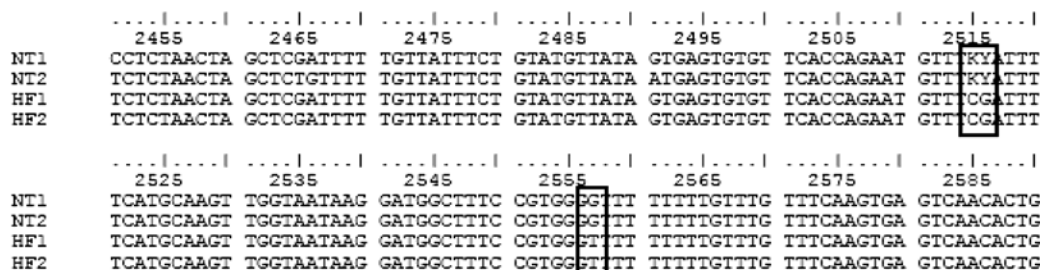


Figure 2 Multiple sequence alignment in position 2450 to 2590 for NT 2 samples HF 2 samples.

สรุป

จากการทดลองเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ระหว่างโคสของสายพันธุ์ พบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในยีน HSP70-2 จากบริเวณ 5'flanking region coding sequence และ 3'flanking region ในโคทั้งสองสายพันธุ์ โดยในโคนั้นเป็นความหลากหลายที่พบเฉพาะในโคแต่ละตัว แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบตำแหน่งเบสที่แยกความแตกต่างของยีน HSP70-2 ระหว่างโคสองสายพันธุ์ คือ ตำแหน่งที่ 1262, 2347, 2515, 2516 และ 2556 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอิทธิพลต่อปริมาณและความไวในการสังเคราะห์ mRNA การแปลรหัส และกระบวนการ post-transcription ของยีน HSP70-2 ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการตอบสนองของยีน HSP70-2 ในโคต่างกัน ทำให้โคสามารถทนร้อนในระดับโมเลกุล

และการตอบสนองของความร้อนทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน อาจใช้เป็นแนวทางสำหรับศึกษาความแตกต่าง การตอบสนองของยีน HSP70-2 ระหว่างโคพื้นเมืองไทยและโคไฮลสไตร์นฟรีเซียนได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวง ศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณ รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือด และ DNA โคพันธุ์ไฮลสไตร์นฟรีเซียน คุณนันทมน ตั้งจิตวัฒนาชัย

ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อโคพันธุ์พื้นเมือง
ไทย และหมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะ
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความ
อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดโคพันธุ์พื้นเมืองไทย

เอกสารอ้างอิง

- สุรางคนา สุขเลิศ. 2551. ผลของฤดูกาลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ
แบบแผนโปรตีนและปริมาณ HSP70 ในน้ำเชื้อพ่อพันธุ์
โคโฮลสไตน์-ฟรีเซียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุวีรเทศงาม. 2548. ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืชเบื้องต้น.
อุบลราชธานี : ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- Adamowicz, T., E. Pers., and D. Lechniak. 2005. A new
SNP in the 3'-UTR of the *hsp70-1* gene in *Bos Taurus*
and *Bos indicus*. Biochemical Genetics, 43, 623-627.
- Cai, Y., Q. Liu., G. Xing., Y. Yang., L.J. Li., and G. Wang.
2005. Polymorphism of promoter region of Hsp70
gene relationship with the expression of HSP70mRNA,
HSF1, Bel-2mma and Bax-AMrna in lymphocytes
in peripheral heat shocked dairy cows. Asain-Aust.
J.Anim.Sci, 18, 734-740. (Abstract)
- Goodwin, W., L. Adrian., and H. Sibte. 2007. An introduction
to forensic genetics. John Wiley and Sons Ltd,
Oxford.
- Grosz, M.D. 1993. Retrieved January 25, 2007, *Bos taurus*
Angus 70 Kda Heat shock protein-2 (HSP70-2) gene.
from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=414974>.
- Gutierrez, J.A., and V. Guerriero, Jr. 1995. Relative
abundance of bovine Hsp70 mRNA and protein.
Biochimica et Biophysica acta, 1260, 239-242.
- 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.