ตรวจหารูปแบบและความหลากหลายของ MHC class I ในไก่ ด้วยเทคนิค PCR-SSCP

Identified Haplotype and Polymorphisms of MHC class I in Chicken Using PCR-SSCP

ปรัชญาพร เอกบุตร[1], มนต์ชัย ดวงจินดา[1*] และยุพิน ผาสุข[1]

Pradchayaporn Akaboot[1], Monchai Duangjinda[1*] and Yupin Phasuk[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของ MHC บริเวณ domain α1 ของ *B-F* gene ด้วย Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) โดยใช้ ไก่ป่าตุ้มหูขาว (GG) และไก่ป่าตุ้มหูแดง (GS), ไก่พื้นเมืองไทย: ไก่ประดู่หางดำ (PD) และไก่ชี (CH) และไก่ทางการค้า: ไก่เนื้อ (BR), ไก่ไวท์เล็กฮอร์น (WL) และไก่โรดไอร์แลนด์เรด (RIR) ผลการศึกษา พบรูปแบบ SSCP 6 รูปแบบ โดยรูปแบบที่มีความสูง คือ 2 (30%), 1 (24%), 3 (18%), 4 (10%), 5 (9%) และ 6 (8%) ตามลำดับ โดย MHC class I ที่ศึกษาด้วย SSCP ไม่สามารถจำแนกรูปแบบ MHC ที่จำเพาะในไก่ป่า ซึ่งจัดว่ามีความต้านทานต่อโรคมาเร็กซ์ออกจากไก่กลุ่มอื่นได้

คำสำคัญ: Major Histocompatibility Complex, โรคมาเร็กซ์

Abstract: The objective of this study was to identify polymorphism of MHC α1 domain of *B-F* gene using Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) in Red Jungle Fowl (RJF): *Gallus gallus gallus* (GG) and *Gallus gallus spadiceus* (GS), Thai Native Chicken: Pradoo Hang Dam (PD) and Chee (CH) and commercial chicken: broiler (BR), White Leghorn layer (WL) and Rhode Island Red layer (RIR). The result showed the polymorphism with 6 haplotypes. The highest to lowest frequency were haplotype 2 (30%), 1 (24%), 3 (18%), 4 (10%), 5 (9%) and 6 (8%), respectively. In this study, of MHC classes I by SSCP was unable to identify the RJF specific haplotype (marek resistant) from the others.

Keywords: Major Histocompatibility Complex, Marek's disease

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Animal Science Department, Agricultural Faculty, Khon Kaen University. Khon Kaen 40002

[*] Corresponding author: monchai@kku.ac.th

บทนำ

สัตว์ทุกชนิดมีโอกาสเกิดโรคเนื่องจากการได้รับเชื้อไวรัส, ปรสิต และแบคทีเรีย แต่บางตัวอาจแสดงอาการเป็นโรคหรือบางตัวอาจทนทานจึงไม่แสดงอาการเป็นโรค ทั้งนี้การที่สัตว์ได้รับเชื้อต่างๆ แต่ไม่แสดงอาการอาจเนื่องมาจากการทำงานของ Major Histocompatibility Complex (MHC), MHC-like genes (Rfp-Y) และ ระบบ T cells (Lakshmanan et al., 1997) MHC เป็นกลุ่มของยีนที่สำคัญที่ทำหน้าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายชนิด T lymphocytes ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Juul-Madsen et al., 2000) Shiina et al. (2006) รายงานว่า MHC ในไก่ มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อไวรัสที่ก่อให้เกิด เช่น Marek's disease virus (MDV), Rous sarcoma virus (RSV), lymphoid leukosis virus และ infectious bursal disease virus (IBDV) โดยยีน MHC ในไก่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 16 ประกอบด้วยระบบ B-complex และระบบ restriction fragment polymorphism pattern-Y (Rfp-Y) สำหรับ B-complex สามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิด ได้แก่ *B-F*, *B-L* และ *B-G* ไก่ที่มี MHC แบบ *B-F* จะมีความสามารถในการทนทานต่อโรคมาเร็กซ์ได้ดีกว่าไก่ที่มี MHC แบบ *B-G* (Lakshmanan et al., 1997) โดย B^{21} จะมีความสามารถในการต้านทานมาเร็กซ์ (Bacon, 1987) และ MHC class I สามารถให้รูปแบบที่ต้านทานมาเร็กซ์ คือ B^{21}และ B^{21}-like รวมทั้งรูปแบบที่ไวต่อการเกิดโรคมาเร็กซ์ คือ B^{15} และ B^{19} (Juul-Madsen et al., 2000) แม้ว่าการเลี้ยงไก่ในทางการค้าจะนิยมทำวัคซีนโรคมาเร็กซ์ แต่รูปแบบของ B-complex ก็ยังมีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อโรคมาเร็กซ์ในไก่ที่ได้รับการทำวัคซีน (Bacon and Witter, 1994) การศึกษา MHC ในไก่จะช่วยให้เข้าใจระบบภูมิคุ้มกันของไก่ได้มากขึ้น โดยเฉพาะในไก่ป่าและไก่พื้นเมือง ซึ่งดำรงชีวิตอยู่ตามธรรมชาติหรือมีการเลี้ยงดูโดยไม่ได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคมาเร็กซ์ แต่ก็ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ วัตถุประสงค์การศึกษาครั้งนี้คือ ศึกษารูปแบบของ MHC เพื่อนำไปเป็นข้อมูลพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบและการทนทานต่อโรคมาเร็กซ์

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างเลือด จากไก่ป่าตุ้มหูขาว (GG, 49 ตัว) จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจุฬาภรณ์ ไก่ป่าตุ้มหูแดง (GS, 40 ตัว) จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ ไก่ประดู่หางดำ (PD, 75 ตัว) และไก่ชี (CH, 35 ตัว) จากศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ (ไก่พื้นเมือง) และไก่ไวท์เล็กฮอร์น (WL, 34 ตัว) และไก่โรดไอร์แลนด์เรด (RIR, 18 ตัว) จากหมวดสัตว์ปีก ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ไก่เนื้อ (BR, 35 ตัว) ที่มีสารป้องกันการแข็งตัว 0.5M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) และสกัด DNAโดยวิธีของ Goodwin et al. (2007) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis และเก็บที่อุณหภูมิ ^{0} 20-C เพื่อศึกษาขั้นตอนต่อไป

ปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ B-Fα1 (F): 5' GAGCTCCATACCCTGCGGTACAT C-3' และ *B-F*α1 (R) : 5'-CGGCCAGACCAACATCGC GGCGACGTC-3' ซึ่งจะเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ domain α1 ของ *B-F* gene (Juul-Madsen et al., 2000) ในแต่ละปฏิกิริยา 10 μl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 ng/μl ปริมาตร 1 μl, 50 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 μl, 10XPCR-buffer ปริมาตร 1 μl, 1 mM/each dNTPs ปริมาตร 1 μl, 2.5 μM/μl Forward และ Reverse primer (QIAGEN, Germany อย่างละ (1 μl, 5 U Taq DNA polymerase (RBC®) ปริมาตร 0.1 μl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำ R.O. claved ปริมาตร 4.1

μl โดยมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ^{0}C 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ^{0}C 30 วินาที ,primer annealing 30 วินาที, primer extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C 45 วินาที และจบด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C 5 นาที จากนั้นจึงนำ PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis และย้อมสีด้วย gel star ซึ่งจะได้ PCR ขนาด 270 bp

ตรวจสอบความหลากหลายของ MHC class I ด้วย SSCP

ตรวจสอบความหลากหลายของ MHC class I ของไก่แต่ละตัว โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้ จำนวน 5 μl ผสมกับ SSCP loading buffer (Bromophenol blue, Xylenecyanol, 5N NaOH, H_2O claved และ Formamide) 5 μl และ denature ที่อุณหภูมิ 95 ^{0}C 5 นาที และแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อรักษาสภาพการเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single strand DNA) จากนั้นจึงนำส่วนผสมดังกล่าว load ลงบน non denaturing gel electrophoresis 6% acrylamide (40% acrylamide (19:1),10X TBE, Glycerol: Formamide (3:1), 10 % APS, TEMED และ H_2O claved) ปล่อยให้มีการเคลื่อนที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 250 โวลต์ 300 นาที ตรวจผลแผ่นเจลโดยการย้อมด้วย gel star (Gelstar INC. NY) เพื่อดูรูปแบบของ PCR-SSCP product ที่ปรากฏภายใต้แสง UV

ผลการศึกษาและวิจารณ์

รูปแบบและความหลากหลายของ MHC class I

ผลการศึกษา MHC class I ด้วย PCR-SSCP ในบริเวณ บริเวณ α1 (domains *B-F*α1) พบว่า บริเวณว่าดังกล่าวมีรูปแบบ SSCP เกิดขึ้นจำนวน 6 รูปแบบ โดย

จาก**ตารางที่ 1** แสดงให้เห็นว่าไก่ที่ทำการศึกษา MHC class I บริเวณ α1 มีรูปแบบ 1, 2 และ 3 ความถี่สูงกว่า รูปแบบ 4, 5 และ 6 โดยเฉพาะรูปแบบ ที่ 2 และ 3 มีการพบความถี่ใกล้เคียงกันทั้งในไก่ป่าสีแดง (ซึ่งเชื่อว่าทนต่อโรคมาเร็กซ์) และไก่ไข่ไวท์เล็กฮอร์น (ซึ่งเชื่อว่าไวต่อการเกิดโรคมาเร็กซ์) และจากการศึกษานี้พบรูปแบบที่ 2 มีความถี่สูงสุด รองลงมาคือ รูปแบบที่ 1, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ โดยไก่ป่าและไก่พื้นเมืองจะมีการกระจายของความถี่สูงไปต่ำสอดคล้องกัน คือ รูปแบบที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 5 ตามลำดับ แต่ไก่ทางการค้าจะมีความถี่สูงในรูปแบบ 2, 3,1, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของแต่ละรูปแบบที่ได้ เพื่อประเมินความสัมพันธ์กับความจำเพาะในไก่แต่ละกลุ่มด้วย logistic regression analysis พบรูปแบบที่สัมพันธ์ ($p<0.05$) กับไก่ชี (รูปแบบ 3และ4), ไก่เนื้อ (รูปแบบ 5 และ 6) และไก่ไวท์เล็กฮอร์น (รูปแบบ 2) โดยความน่าจะเป็นมีค่า 56%, 52% และ 18% ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้พบรูปแบบที่มีความจำเพาะกับไก่ชี, เนื้อ และไวท์เล็กฮอร์น แต่พบว่าความน่าจะเป็นที่จะนำไปใช้มีค่าต่ำ ดังนั้นรูปแบบเหล่านี้อาจไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการทำนายความสัมพันธ์

ตารางที่ 1 การกระจายตัวจองความถี่แฮพโพไทด์ (haplotype) ในไก่แต่ละกลุ่ม

กลุ่มตัวอย่าง[1]	รูปแบบ 1	รูปแบบ 2	รูปแบบ 3	รูปแบบ 4	รูปแบบ 5	รูปแบบ 6
GG (n=49)	0.39	0.25	0.12	0.00	0.12	0.12
GS (n=40)	0.33	0.40	0.08	0.08	0.05	0.08
PD (n=75)	0.33	0.28	0.13	0.11	0.08	0.07
CH (n=35)	0.14	0.17	0.34	0.17	0.11	0.06
BR (n=35)	0.14	0.20	0.23	0.06	0.20	0.17
WL (n=34)	0.32	0.44	0.06	0.06	0.09	0.03
RIR (n=18)	0.06	0.33	0.33	0.22	0.00	0.06

1 = กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา GS = ไก่ป่าตุ้มหูขาว, GG =ไก่ป่าตุ้มหูแดง, PD = ไก่ประดู่หางดำ, CH = ไก่ชี, BR = ไก่เนื้อ ไก่ไวท์เล็กฮอร์น และ RIR = ไก่โรดไอร์แลนด์เรด; n= จำนวนตัวอย่าง

ระหว่างรูปแบบและไก่กลุ่มดังกล่าว ต่างจาก Juul-Madsen et al. (2000) รายงานว่าไก่ที่มีความทนทานต่อโรคมาเร็กซ์จะมีระดับ leukocytes ต่ำและสัมพันธ์กับ MHC class I แบบ B^{21} และB^{W1} ส่วนไก่ที่มีรูปแบบ B^{15} และ B^{19} จะมีความไวต่อการเกิดโรคมาเร็กซ์ และเมื่อสุ่มไก่แต่ละรูปแบบเพื่อศึกษา MHC class I รูปแบบต่างๆ ด้วยวิธี SSCP พบว่าสัตว์มีรูปแบบ SSCP ที่ไม่ต่างกัน แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะใช้ไพรเมอร์ตำแหน่งเดียวกับ Juul-Madsen et al. (2000) แต่พบรูปแบบ SSCP แตกต่างกัน อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงรูปของ DNA สายเดี่ยวในการทำ SSCP มีหลายอย่างที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่นอุณหภูมิที่ใช้ระหว่างการทำ electrophoresis, ความเข้มข้นและสัดส่วนของเจล, การใส่สารบางตัวในเจลแตกต่างกัน เช่น glycerol, formamide, ความเข้มข้นของ PCR product (สุรินทร์, 2552)

นอกจากนี้มีรายงานว่าไก่ป่าสีแดงมีความสามารถในการทนทานต่อโรคที่สำคัญในไก่โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุเนื่องมาจากไวรัส และไก่ที่มีการสืบเชื้อสายมาไก่ป่าสีแดงหรือมีไก่ป่าสีแดงเป็นบรรพบุรุษก็จะมีความสามารถในการทนทานต่อโรคมาเร็กซ์ได้ดีเช่นเดียวกัน Lakshmanan et al. (1997) รายงานว่า Class II สามารถใช้เป็น candidate gene เพื่อการคัดเลือกให้ไก่มีผลิตไข่เพิ่มขึ้นและมีความสามารถในการทนทานโรคมาเร็กซ์ได้อีกด้วย และรูปแบบของ B-complex ในไก่เกี่ยวข้องกับอัตราการผสมติด (fertilization rate), การตายของตัวอ่อน (embryonic mortality), การฟักออก (hatchability), การตายของลูกและตัวโตเต็มวัย (juvenile and adult mortality) และการให้ผลผลิตไข่ (egg production) (Bacon, 1987)

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า MHC class I ที่ศึกษาด้วย SSCP ไม่สามารถแสดงให้เห็นรูปแบบ MHC ที่จำเพาะในไก่ป่า ซึ่งจัดว่ามีความต้านทานต่อโรคมาเร็กซ์ออกจากไก่กลุ่มอื่นได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักคณะกรรมการ การอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ (ไก่พื้นเมือง), ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจุฬาภรณ์ และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมาย DNA: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Bacon, L. D., 1987. Influence of the major histocompatibility complex on disease resistance and productivity. Poult. Sci. 66:802-811.

Bacon, L. D., and R. Witter. 1994. B haplotype influence on the relative efficacy of marek's disease vaccines in commercial chickens. Poult. Sci. 73:481-487.

Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. An introduction to forensic genetics. John Wiley and Sons Ltd, Oxford.

Juul-Madsen, H. R., T. S. Dalgaard, M. Afanassieff. 2000. Molecular characterization of major and minor MHC class I and II genes in B21-like haplotypes in chickens. Anim. Genet. 31: 252–261.

Lakshmanan, N., J. S. Gavora, and S. J. Lamont, 1997. Major histocompatibility complex class II DNA polyphisms in chicken strains selected for marek's disease resistance and egg production or for egg production alone. Poult. Sci. 76:1517–1523.

Shiina, T., K. Hosomichi, and K. Hanzawa, 2006. Comparative genomics of the poultry major histocompatibility complex. Anim. Sci. J. 77: 151–162.