

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

โคเขตอบอุ่นหรือเขตนาว (*Bos taurus*) เป็นโคที่มีสมรรถนะในการให้ผลผลิตคุณภาพดีและปริมาณสูง จึงเป็นเหตุจูงใจที่ดีในการนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย แต่เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อน มีสภาพอากาศร้อนชื้น ทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสัตว์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศที่แตกต่างจากเดิม คือความเครียดเนื่องจากความร้อน ซึ่งร่างกายโคจะพยายามปรับตัวจากสภาพอุณหภูมิร่างกายสูงให้กลับมาอยู่ที่อุณหภูมิร่างกายปกติ หรือรักษาสสมดุล (homeostasis) ของร่างกาย (Ewing et al., 1998) ถ้าอุณหภูมิร่างกายสัตว์สูงกว่าระดับอุณหภูมิปกติ จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ระบบต่างๆ ภายในร่างกาย และกลไกการควบคุมอุณหภูมิร่างกาย (Willmer et al., 2000) เป็นผลให้ผลผลิตต่ำกว่าระดับผลผลิตที่ควรจะได้เมื่อเลี้ยงในเขตอากาศที่หนาวเย็นกว่า (อุมาพร, 2548) อีกทั้งความเครียดเนื่องจากอากาศร้อนส่งผลต่อประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ ทำให้อัตราการผสมติดต่ำ อัตราการตายของตัวอ่อนสูง และเพิ่มจำนวนสัตว์ที่มีปัญหาของระบบสืบพันธุ์มากขึ้น (ทัศนีย์, 2545ก)

โคพื้นเมืองไทยแม้จะให้ผลผลิตต่ำแต่สามารถต้านทานต่อโรค แมลง และทนทานต่อสภาพอากาศของภูมิภาคเขตร้อนได้ดี (ยุทธชัย, 2552) เพราะโคพื้นเมืองไทยเป็นโคดั้งเดิมของท้องถิ่นเขตร้อนชื้นมีการปรับตัวมาหลายชั่วรุ่น จึงทำให้มีการตอบสนองความเครียดเนื่องจากความร้อนได้ดีกว่าโคเขตนาว ซึ่งการตอบสนองของร่างกายต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนมี 2 ระดับ คือ ระดับสรีรวิทยา และระดับโมเลกุล โดยการตอบสนองระดับสรีรวิทยามีดัชนีชี้วัดระดับความสามารถในการทนร้อนได้แก่ อุณหภูมิทวารหนัก อัตราการหายใจ และอัตราการขับเหงื่อ (Hammond et al., 1996) เป็นต้น จากการตรวจเอกสารพบว่าโคเขตร้อนมีค่าดัชนีดังกล่าว แตกต่างจากโคเขตนาว ซึ่งบ่งชี้ว่าโคเขตร้อนมีการปรับตัวต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนได้ดีกว่าโคเขตนาว (อุทัย และคณะ, 2549; Hansen, 2004 และ Carvalho et al., 1995) จึงทำให้นักวิจัยนำข้อมูลการตอบสนองทางสรีรวิทยามาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการตอบสนองในระดับโมเลกุล ซึ่งพบว่าเมื่อเซลล์ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อน ร่างกายจะมีการแสดงออกของโปรตีนชนิดหนึ่งคือ กลุ่มโปรตีน Heat Shock Protein (HSP) จะมีการผลิตออกมาในปริมาณมาก โดยเฉพาะกลุ่ม HSP70 จะพบหลังจากที่ร่างกายได้รับความร้อนเป็นเวลา 30 นาที (Guerriero and Raynes, 1990) ซึ่งโปรตีนกลุ่ม HSP 70 มีอยู่หลายชนิดในสิ่งมีชีวิต แต่ชนิดที่พบในโคและสามารถผลิตได้อย่างรวดเร็วในปริมาณมากคือ

HSP70-1 และ HSP70-2 ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันและรักษาสภาพเซลล์ เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนในระบบ MHC-linked (Major Histocompatibility Complex-linked), วงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) และกระบวนการสร้างอสุจิ (Adamowicz et al., 2005; Yamashita et al., 2004 และ Gutierrez and Guerriero, 1995a)

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ HSP70 พบว่าหากพบโปรตีน HSP70 ในปริมาณมากแสดงถึงความสามารถทนต่อความร้อนได้ดี (Johnston and Kucey, 1998 อ้างโดย สุรางคณา, 2551 และ King et al., 2002) และการพบปริมาณของ HSP70 ที่เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หรืออาจเกิดการกลายพันธุ์ของยีน HSP70 (Gutierrez and Guerriero, 1995a) ทำให้เกิดรูปแบบของยีน HSP70 ที่หลากหลาย ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้การตอบสนองการทนร้อนในระดับสรีรวิทยาของสัตว์แตกต่างกัน จากรายงานของอุมาพร(2548) ศึกษาความหลากหลายของยีน HSP70-2 ด้วยเทคนิค PCR-SSCP ในโคพื้นเมืองไทย โคนมลูกผสมพื้นเมือง 50% และ โคนมลูกผสมพื้นเมือง 3.12% เปรียบเทียบกับการตอบสนองการทนร้อนในระดับสรีรวิทยา พบว่าความหลากหลายของรูปแบบ SSCP บริเวณ 5'flanking region ของยีน HSP70-2 มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตราการหายใจและอุณหภูมิทวารหนัก ดังนั้นการที่โคสามารถทนร้อนได้ดีต่างกัน อาจเนื่องมาจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทนร้อนในโคแตกต่างกัน แต่งานวิจัยที่อธิบายเกี่ยวกับกลไกการทำงานของยีน HSP70 ที่สัมพันธ์กับการตอบสนองการทนร้อนในระดับสรีรวิทยาของโคพื้นเมืองไทยยังมีไม่มากนัก อีกทั้งยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ในโคพื้นเมืองไทยหรือโคเขตร้อนที่ทำให้เกิดรูปแบบของยีน HSP70 หลากหลายนั้นเป็นอย่างไร ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคอีสานซึ่งเป็น โคนท้องถิ่นและเป็นตัวแทนกลุ่มโคเขตร้อน (*Bos indicus*) ที่มีคุณสมบัติในการทนร้อนได้ดี กับ โคโฮลสไตน์ฟรีเซียนซึ่งเป็นโคที่นิยมนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศต่างๆและมักใช้เป็นตัวแทนของกลุ่มโคเขตหนาว (*Bos taurus*) โดยได้นำเทคนิค polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์เบื้องต้นและสามารถตรวจสอบบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ของ DNA โดยอาศัยรูปแบบที่แตกต่างกันมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบว่าเป็นอย่างไร แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งยีนที่เลือกนำมาศึกษาคือ HSP70-2 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม heat inducible ที่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบกับการตอบสนองในระดับสรีรวิทยากับโคพื้นเมืองไทยซึ่งเป็นโคที่ทนร้อนได้ดี อีกทั้งยังมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์ในฐานข้อมูล GenBank แม้จะเป็นโคกลุ่ม *Bos taurus* แต่ก็มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้สำหรับศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนระหว่างโคสองสายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคทั้งสองสายพันธุ์ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต

และแก้ไขประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของสัตว์เมื่ออยู่ในสภาวะความเครียดจากความร้อนและหากพบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จะสามารถใช้ความแตกต่างที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกโคทนร้อนต่อไป

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน HSP70-2 และเปรียบเทียบหาตำแหน่งที่ความแตกต่างระหว่างโคพื้นเมืองไทย และโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน

2.2 ศึกษาเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ภายในตำแหน่งที่มีความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ระหว่างโคสองสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

3. ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษารั้งนี้ต้องการศึกษาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ที่ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 จากโคพันธุ์แองกัส (*Bos taurus* Angus) ในฐานข้อมูล GenBank accession number BTU02892 ด้วยเทคนิค PCR-SSCP ซึ่งใช้ตรวจหาความหลากหลายเบื้องต้น และนำรูปแบบ SSCP ที่พบไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ระหว่างโค 2 สายพันธุ์ คือ โคพื้นเมืองไทยภาคอีสาน จากหมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และหน่วยบำรุงพันธุ์สัตว์บุณฑริก อำเภอบุณฑริก จังหวัดอุบลราชธานี ที่ได้รวบรวม โคพื้นเมืองไทยในเขตพื้นที่ภาคอีสาน และโคโฮลสไตน์ฟรีเชียนระดับสายเลือด 100 จากฟาร์มโชคชัยและฟาร์มจากจังหวัดเชียงใหม่

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ของโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน ซึ่งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนในโคพื้นเมืองไทย และอาจนำข้อมูลไปประยุกต์สำหรับปรับปรุงพันธุ์สัตว์ทนร้อนต่อไป

4.2 ทราบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ และตำแหน่งที่แตกต่างระหว่างโคสองสายพันธุ์ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาและออกแบบเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับคัดเลือกโคที่มีความสามารถในการทนร้อน