

## บทที่ 2

### เอกสารที่เกี่ยวข้อง

#### 1. คุณสมบัติการทนร้อนระหว่างโคเขตร้อนและโคเขตหนาว

การทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นกลไกการควบคุมอุณหภูมิของร่างกายในขณะที่อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงในแต่ละวัน ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อสภาพทางสรีรวิทยาและภายในเซลล์ร่างกายของสัตว์ การทนทานต่อความร้อนมีความแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ แต่ละตัว เช่น โคจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางพฤติกรรมและสรีรวิทยาเพื่อควบคุมอุณหภูมิร่างกายให้คงที่หรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และมีการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลภายในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ เพื่อป้องกันและรักษาความเสียหายภายในเซลล์ที่ได้ รับผลกระทบจากความร้อน โคพันธุ์โคที่มีความสามารถในการทนร้อน จะมีกลไกระดับสรีรวิทยา และระดับโมเลกุลควบคุมไม่ให้อุณหภูมิร่างกายและอุณหภูมิภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงมากนัก เมื่ออยู่ในสภาวะเกิดความเครียดจากความร้อน (Gaughan et al., 1999; รักปัญญา, 2539 และยุพิน, 2538) ซึ่งการควบคุมการทนร้อนในโคนั้นมีอยู่ 2 ระดับ

##### 1.1 การควบคุมการทนร้อนในระดับสรีรวิทยา

สัตว์มีการระบายความร้อน (heat loss) อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากร่างกายมีการผลิตความร้อน (heat production) อยู่ตลอดเวลา ถ้าอุณหภูมิสภาพแวดล้อมเหมาะสม (neutral temperature) สัดส่วนของการระบายความร้อนกับการผลิตความร้อนจะสมดุลกัน ทำให้อุณหภูมิร่างกายสัตว์คงที่ แต่เมื่ออุณหภูมิแวดล้อม ไม่เหมาะสมจะทำให้สัดส่วนของกลไกทั้งสองเปลี่ยนแปลงไป หากอุณหภูมิแวดล้อมสูง อุณหภูมิร่างกายโค จะสูงขึ้นและเริ่มมีการระบายความร้อน โดยการระเหยน้ำผ่านการหายใจ การขับเหงื่อ กินน้ำเพิ่มขึ้น แต่การกินอาหารลดลงเพื่อลดการผลิตความร้อนจากการสันดาปอาหาร ทำให้ผลผลิตลดลง อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อศักยภาพ ของระบบสืบพันธุ์โค (อุมาพร, 2548; รักปัญญา, 2539 และ ยุพิน, 2538) โดยความเครียดเนื่องจากความร้อนส่งผลให้ร่างกายหลั่งฮอร์โมนเพื่อตอบสนองต่อความเครียด ซึ่งได้แก่ Adrenocorticotropin (ACTH) ทำให้ยับยั้งการหลั่ง LH มีผลต่อการตกไข่และการพัฒนาของคอร์ปัสลูเทียม อีกทั้งลดการผลิตโปรเจสเตอโรนที่รังไข่ แต่เพิ่มการผลิตที่ต่อมหมวกไต ทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนแปรปรวน การทำงานในช่วงเวลาต่างๆ ของระบบสืบพันธุ์ไม่ปกติ เช่น วงรอบการเป็นสัดซ้ำ ระวังพฤติกรรมความเป็นสัด การผสมติดต่ำ การปฏิสนธิล้มเหลว อัตราการตายของตัวอ่อนสูง ทำให้จำนวนสัตว์ที่มีปัญหาของระบบสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น ส่วนในเพศผู้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์ของอสุจิ (Huang et al., 2002 และ ทศนีย์, 2545ข)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยการทนร้อนในระดับสรีรวิทยา จึงมีการนำพารามิเตอร์ต่างๆมาใช้เป็นดัชนีวัดการทนร้อนและบ่งชี้ถึงความสมดุลอุณหภูมิร่างกาย เพื่อวิเคราะห์การตอบสนองต่อความเครียดทางระบบสรีรวิทยาว่าเป็นอย่างไร มีแนวทางใดที่จะบรรเทาผลกระทบดังกล่าวและช่วยเพิ่มผลผลิตได้ ซึ่งค่าดัชนีที่ใช้ในการศึกษาทางระบบสรีรวิทยา ได้แก่

1.1.1 ค่าดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (temperature humidity index : THI) เป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ลักษณะของอากาศที่อยู่รอบตัวสัตว์ในเชิงปริมาณ และค่า THI ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละหน่วยจะทำให้สัตว์มี กลไกทางสรีรวิทยาในการขจัดความร้อนภายในร่างกาย และส่งผลกระทบต่อทำให้ผลผลิตของสัตว์ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการชี้วัดความเครียดจากความร้อนของโค (Faquay, 1981 และ Hahn, 1999)

1.1.2 อุณหภูมิทวารหนักเป็นตัวแทนอุณหภูมิแกนกลางในร่างกายและบ่งบอกถึงสมดุลอุณหภูมิร่างกาย โดยโคที่ทนร้อนได้ดีจะมีอุณหภูมิตวารหนักคงที่ หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่ออยู่ในอุณหภูมิแวดล้อมสูง จากการทดลองของ Hammond et al. (1996) ศึกษาการทนร้อนในโคตระกูล *Bos indicus* (Brahman) โคตระกูล *tropical Bos taurus* (Senepol และ Romosinuano) และโคตระกูล *Bos taurus* (Angus และ Hereford) โดยใช้อุณหภูมิตวารหนักและอัตราการหายใจเป็นดัชนีในการชี้วัดการทนร้อน พบว่าโค *Bos indicus* มีอุณหภูมิตวารหนักต่ำกว่าโค *Bos taurus* แต่ไม่แตกต่างจากโค *tropical Bos taurus* สอดคล้องกับรายงานของ Carvalho et al. (1995) ที่ศึกษาการทนร้อนในโคเขตร้อนกับโคเขตหนาวในระดับสรีรวิทยา พบว่าโคเขตร้อนสามารถรักษาระดับอุณหภูมิภายในร่างกายได้ดีกว่าโคเขตหนาว เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดจากความร้อน และศึกษาการทนร้อนในโคพื้นเมืองเขตร้อน โคลูกผสมพื้นเมืองกับชิมเมนทอลที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และโคชิมเมนทอลพันธุ์แท้ พบว่าโคลูกผสมสามารถรักษาระดับอุณหภูมิภายในร่างกายไม่แตกต่างกับโคพื้นเมือง ในขณะที่โคชิมเมนทอลพันธุ์แท้มีอุณหภูมิภายในร่างกายสูงกว่า อาจเนื่องมาจากโคลูกผสมได้รับคุณสมบัติการทนร้อนจากโคพื้นเมือง และงานวิจัยของ อุทัย และคณะ (2549) ศึกษาความสามารถในการทนร้อนระดับสรีรวิทยาของโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน พบว่าอุณหภูมิตวารหนักโคพื้นเมืองไทยต่ำกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ซึ่ง อุณหภูมิตวารหนักเป็นดัชนีที่ทำให้ทราบว่โคปกติหรือไม่ หากโคไม่สามารถระบายความร้อนออกได้ทัน อยู่อย่างไม่สบาย อุณหภูมิตวารหนักจะสูงขึ้น ดังนั้นอุณหภูมิตวารหนักเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์ในการศึกษากลไกการทนร้อนของโค เนื่องจากในทางปฏิบัติมีความสะดวกและประหยัดเพราะไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนและลงทุนสูงในการตรวจวัด

1.1.3 อัตราการขับเหงื่อ จำนวนต่อมเหงื่อ เส้นผ่านศูนย์กลางต่อมเหงื่อ จำนวนชั้นของผิวหนัง เป็นตัวที่ใช้บ่งบอกถึงการขนถ่ายและระบายความร้อนของร่างกาย (Hammond et al., 1996) โดยโค เขตร้อนจะมีอัตราการขับเหงื่อสูงกว่าโคเขตหนาว จากรายงานของ Hansen (2004) เปรียบเทียบความสามารถ ในการทนร้อนจากลักษณะทางสรีรวิทยา ระหว่างโคพันธุ์ซิมู (*Bos indicus*) กับโคสายพันธุ์ยุโรป (*Bos taurus*) พบว่าอัตราการขับเหงื่อของโคซิมูสูงกว่าโคสายพันธุ์ยุโรป สอดคล้องกับงานวิจัยของ อุทัย และคณะ (2549) พบว่าโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) มีอัตราการขับเหงื่อสูงกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน (*Bos taurus*) การที่โคเขตร้อนมีอัตราการขับเหงื่อเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิร่างกายสูง เนื่องจากความหนาแน่นของต่อมเหงื่อมาก เป็นเพราะกลไกระบายความร้อนของร่างกายเกี่ยวข้องกับระบบไหลเวียนเลือดซึ่งเป็นสื่อนำความร้อนไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายทำให้เกิดการสะสมความร้อน และระบบไหลเวียนเลือดยังเป็นสื่อพาความร้อนออกจากร่างกายโดยเกิดการระเหยความร้อนที่สะสมออกทางต่อมเหงื่อ อีกทั้งลักษณะของขนที่สั้น มีสีขนที่สว่างไม่ดูดกลืนรังสีความร้อนและมีขนเป็นมันกว่าโคเขตหนาว จึงสามารถรักษาอุณหภูมิตัวให้ต่ำเมื่ออยู่ในภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน (Olson et al., 2003) ทำให้โคเขตร้อนสามารถทนร้อนได้ดีกว่าโคเขตหนาว

1.1.4 อัตราการหายใจ เป็นกลไกทางสรีรวิทยาที่ใช้ในการขจัดความร้อนออกจากร่างกายและเป็นดัชนีชี้วัดการทนร้อนที่ใช้ควบคู่กับอุณหภูมิตัวและการขับเหงื่อ การที่โคมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นเป็นผลจากการได้รับความร้อน โคที่มีอัตราการหายใจเร็วแสดงถึงโคทนทานต่อความร้อนได้ดีค่า เมื่อเทียบกับโคที่มีอัตราการหายใจปกติ จากรายงานของ Hansen (2004) พบว่าอัตราการหายใจของโคพันธุ์ซิมูต่ำกว่าโคสายพันธุ์ยุโรป เนื่องจากโคซิมูเป็นโคตระกูล *Bos indicus* ที่มีการระบายความร้อนด้วยการขับเหงื่อเป็นกลไกหลักคั่งหัวข้อที่กล่าวมา ส่วนโคสายพันธุ์ยุโรป เป็นโคในตระกูล *Bos taurus* มีการขนถ่ายความร้อนมายังผิวหนังได้น้อย เพราะลักษณะทั่วไปของโคตระกูลนี้จะไม่มีผิวหนังกระชับแนบชิดติดลำตัว ความหนาแน่นของต่อมเหงื่อน้อย และมีขนยาวปกคลุมร่างกาย (กฤตพล, 2550 และวิโรจน์, 2546) จึงเกิดการสะสมความร้อนภายในร่างกาย อุณหภูมิร่างกายสูงขึ้น ทำให้การระบายความร้อนที่สะสมผ่านทางผิวหนังไม่นัก ร่างกายจึงปรับตัวโดยอาศัยการระบายความร้อนออกมาทางการหายใจเป็นกลไกหลัก จึงทำให้อัตราการหายใจสูงกว่าโคตระกูล *Bos indicus* สอดคล้องกับงานวิจัยของ อุทัย และคณะ (2549) พบว่าโคพันธุ์พื้นเมืองไทยมีอัตราการหายใจต่ำกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน และงานวิจัยของรักปัญญา (2539) ศึกษาการทนต่อความร้อนของโคนมที่มีระดับเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียนต่างๆ พบว่าโคพื้นเมืองที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียน 50% มีอัตราการหายใจต่ำกว่าโคนมที่มีระดับเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียน 75-87.5% และ 90-100%

1.1.5 พารามิเตอร์อื่นๆที่ใช้ในการศึกษาการทนร้อนในระดับสรีรวิทยา เช่น ฮอร์โมน คอร์ติซอล ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume : PCV) อัตราส่วนเม็ดเลือดขาว นิวโทรฟิลล์ต่อลิมโฟไซต์ เป็นต้น (Stull and Rodiek, 2000; Hammond et al., 1998; Hammond et al., 1996 และ Carvalho et al., 1995)

อาจกล่าวได้ว่าสัตว์ 2 ประเภทคือ สัตว์ในเขตร้อนและเขตหนาวจะมีกลไกควบคุม อุณหภูมิของร่างกายโดยวิธีการที่แตกต่างกัน คือโคเชตร้อน (*Bos indicus*) จะใช้กลไกทางสรีรวิทยา ด้านการขับเหงื่อ เพื่อระบายความร้อนออกจากร่างกายเป็นกลไกหลัก ในขณะที่โคเขตหนาว (*Bos taurus*) ใช้การหายใจเป็นกลไกหลักในการระบายความร้อนออกจากร่างกาย จากงานวิจัยที่กล่าวข้างต้นทำให้พบว่าโคทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อการทนร้อนในระดับสรีรวิทยา แตกต่างกัน จึงทำให้มีการศึกษาในเชิงลึกถึงระดับโมเลกุล เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองภายใน เซลล์หลังจากโคทั้งสองสายพันธุ์ได้รับการกระตุ้นจากความร้อนว่าเป็นอย่างไร พบความแตกต่าง กันหรือไม่

## 1.2 การควบคุมการทนร้อนของโคในระดับโมเลกุล

การศึกษาในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษากลไกการตอบสนองในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ เมื่อใช้ความร้อนเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะมีการตอบสนองต่อความร้อน โดยการสร้างโปรตีนจำเพาะชื่อ heat shock protein (HSP) ทำให้เซลล์สามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอด และทำงานได้ตามปกติ (Krebs and Betencourt, 1999)

### 1.2.1 HSPs

HSPs เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบการแสดงออกได้จากเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด เมื่อได้รับแรงกดดันจากความเครียดต่างๆ เช่น ความเครียดเนื่องจากความร้อน ความเครียดเนื่องจาก ความเย็น การได้รับโลหะหนัก การฉายรังสี การได้รับสารเคมีต่างๆ (Feder and Hofmann, 1999 และ Nover, 1991) ซึ่งจะมีการสร้างโปรตีนชนิดนี้ขึ้นมาเพื่อช่วยซ่อมแซมโปรตีนภายในเซลล์ที่ เสียสภาพ ทำให้สามารถอยู่รอดและทำหน้าที่ภายใน เซลล์ได้ปกติ ช่วยในการขจัดมวลตัวใหม่ อีก ครั้งของโครงสร้างโปรตีนที่เสียสภาพ (refolding) อีกทั้งช่วยขนย้ายโปรตีนที่เสื่อมสภาพหรือ โปรตีนที่ไม่ต้องการออกนอกเซลล์ HSPs พบครั้งแรกในเซลล์ของแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อน มีการสร้างโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 70 และ 26 kDa ดังนั้นจึงเรียกชื่อโปรตีนชนิดนี้ว่า “heat shock protein” (Ritossa, 1962 อ้างโดย Multhoff, 2007; Kregel, 2002 และ Goldman, 2002) ต่อมาได้มีการศึกษาโปรตีนกลุ่มดังกล่าวอย่าง แพร่หลาย ทำให้พบโปรตีนกลุ่ม HSPs เพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด (Multhoff, 2007; Kregel, 2002 และ

Kiang and Tsokos, 1998) ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ตามน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ ขนาด 104/110 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 60 kDa และ 15-30 kDa ดังนี้คือ

1) HSP104/110 ในสภาวะปกติเซลล์จะสังเคราะห์ HSP104 ในปริมาณที่ น้อยมาก ถ้าได้รับการกระตุ้นจากสภาวะอุณหภูมิสูงจะชักนำให้เซลล์มีการสังเคราะห์ HSP104 เพิ่มขึ้น โปรตีนกลุ่มนี้จึงสามารถทนต่อความร้อนได้ดี นอกจากนี้ HSP104 ยังทำหน้าที่เป็นเอ็นไซม์ protease หรือ อาจมีส่วนในการทำงานของเอ็นไซม์ protease โดยช่วยป้องกันการตกตะกอนของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างสำคัญของเซลล์

2) HSP90 ในสัตว์มีกระดูกสันหลังพบมากที่บริเวณเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม และพบบางส่วนในนิวเคลียส เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน HSP90 จะทำหน้าที่จับกับโปรตีนให้มีความเสถียรคงรูปได้ และช่วยในการขจัดม้วนตัวของโปรตีนให้สามารถทำงานได้

3) HSP70 พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนจะมีการสังเคราะห์ HSP70 ทำหน้าที่เป็น chaperoning คือ จับกับสายโพลีเปปไทด์ที่สังเคราะห์ใหม่เพื่อช่วยในการม้วนพับตัวให้มีรูปร่างที่ถูกต้องและสามารถทำงานได้ นอกจากนี้ HSP70 ยังช่วยนำโปรตีนเข้าสู่ส่วนต่างๆ ของเซลล์

4) HSP60 พบในอวัยวะเซลล์ต่างๆ ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม เช่น ไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ช่วยในการม้วนพับของโปรตีนให้มีโครงสร้างถูกต้องและสามารถทำงานได้

5) Small HSPs (sHSPs) เป็นกลุ่มของ HSP ที่มีความหลากหลายของขนาดโมเลกุลมาก ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดจะมีจำนวนของ sHSPs ที่ต่างกันไป มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 15-30 kDa พบทั้งในส่วนไซโตพลาสซึมและอวัยวะเซลล์ต่างๆ แต่ยังไม่สามารถระบุหน้าที่ทั่วไปได้

### 1.2.2 Heat Shock Protein70

จากการศึกษาข้อมูลของ HSPs ทั้ง 5 กลุ่ม พบว่าโปรตีนที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากคือ กลุ่ม HSP70 เนื่องจากโปรตีนกลุ่มนี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Kregel, 2002 และ Yahav et al., 1997) ดังงานวิจัยของ Guerriero and Raynes (1990) พบการแสดงออกของกลุ่ม HSP70 หลังจากถูกกระตุ้นด้วยความร้อนเป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่โปรตีนกลุ่มอื่นจะแสดงออกหลังจากถูกกระตุ้นเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที

HSP70 สามารถแบ่งได้เป็น 4 ชนิด ตามหน้าที่และตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ คือ HSP72 (Hsp70), HSP73 (Hsc70), HSP75 (mHSP70) และ HSP78 (GRP70) (Kregel, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง HSP70 ตามการสังเคราะห์ได้อีก 2 ชนิด คือ constitutive และ inducible โดย constitutive หมายถึง ในสภาวะปกติเซลล์มีการสังเคราะห์อยู่ตลอดเวลา แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความเครียดต่างๆ จะสังเคราะห์ในปริมาณน้อยมากในขณะที่ inducible หมายถึง ในสภาวะปกติเซลล์

จะมีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณน้อยมาก แต่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความเครียดจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความร้อน จะมีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Bio-Active, 2007; Qin et al., 2003 และ Moon et al., 2001)

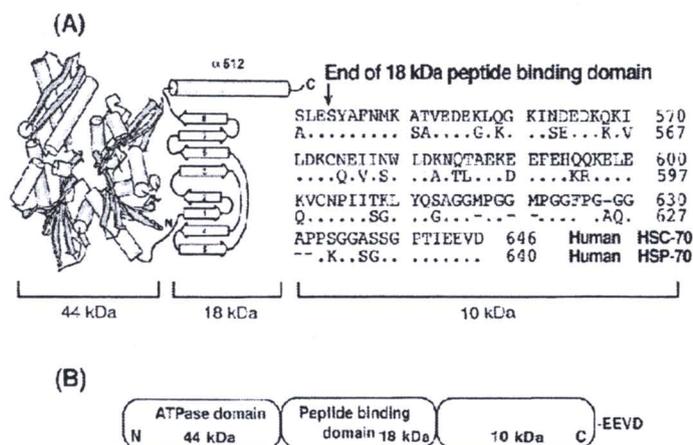
### 1.2.3 โครงสร้างโมเลกุลของ HSP70

โมเลกุลของ HSP70 ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 630-650 สามารถจำแนกเป็นส่วนต่างๆ ได้ 3 ส่วน (ภาพที่ 2.1) ดังนี้ (Kregel, 2002 และ Hightower et al., 1994)

1) N-terminus มีขนาด 44 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนจากตำแหน่งที่ 1-386 เป็น ATPase domain คือ เป็นส่วนที่จับกับ ATP (Adenosine triphosphate) และแตกตัวเป็น ADP (Adenosine diphosphate) ซึ่งแรงขับเคลื่อนของ ATP (ATP driver) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโดเมนต่อไป

2) substrate binding domain มีขนาด 18 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนจากตำแหน่งที่ 384-543 เป็น peptide binding domain ประกอบด้วยช่อง ทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวกับกรดอะมิโนส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ช่องนี้มีความยาวพอสำหรับทำปฏิกิริยากับเปปไทด์

3) C-terminal domain มีขนาด 10 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนจากตำแหน่งที่ 542-646 โครงสร้างเป็น alpha helical ทำหน้าที่เป็นประตูของส่วน substrate binding domain เมื่อ HSP70 เกิด ATP bound ประตูจะเปิดแล้วเกิดการจับกับเปปไทด์และปล่อยออกมาอย่างรวดเร็ว เมื่อเกิด ADP bound ประตูนี้จะปิด เปปไทด์จะจับแน่นกับส่วนของ substrate binding domain



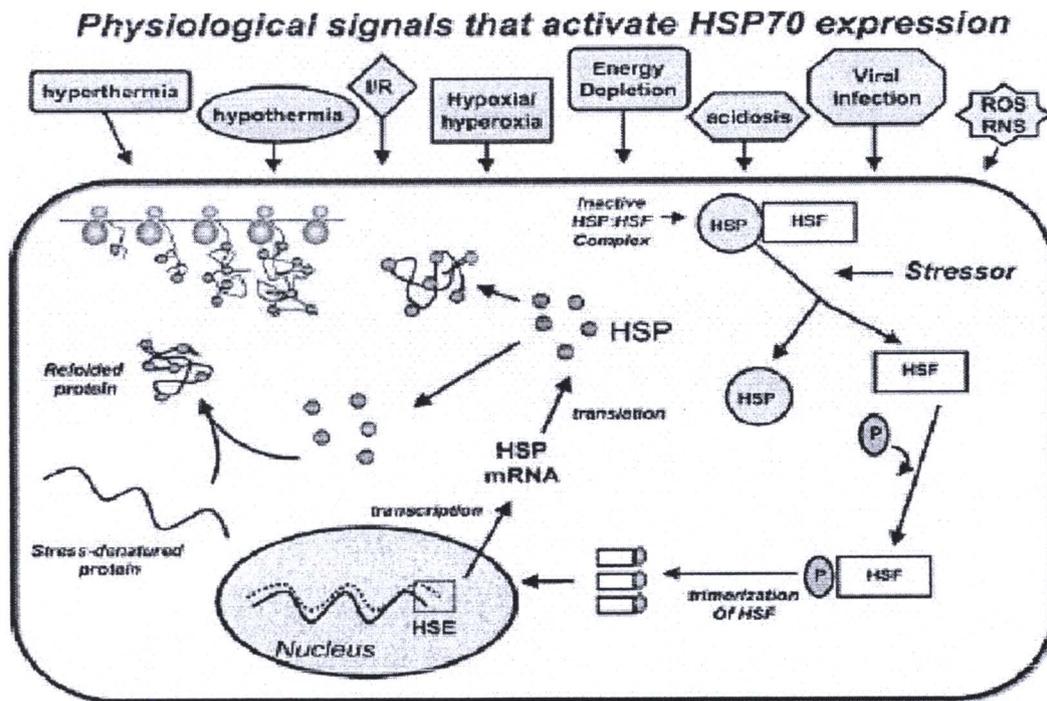
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของ HSP70

ที่มา : Hightower et al. (1994)

#### 1.2.4 บทบาทของ HSP70 ต่อการทนร้อนและการสังเคราะห์ HSP70

เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเมื่อเกิดความเครียดเนื่องจากความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อการทำงานของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ภายในร่างกาย โดยมีผลไปเปลี่ยนคุณสมบัติการเลือกผ่านของ เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น pH ของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงตาม pH และอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป ส่งผลต่อการทำงานของกระบวนการเมตาบอลิซึมภายใน และการลดลงของ ATP ในเซลล์ โปรตีนเสียสภาพและกระตุ้นโปรแกรมการทำลายตัวเองของเซลล์ (apoptotic program) ทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนในร่างกายเสียหาย (Sonna et al., 2002; Willmer et al., 2000 และ Welch, 1992) แต่เซลล์สิ่งมีชีวิตมีการตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนด้วยการสังเคราะห์ โปรตีน HSP70 ขึ้นมา ดังการศึกษาของ Sonna et al. (2002) พบว่าความเครียดเนื่องจากความร้อนจะกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์โปรตีน HSP70 เพื่อป้องกันและซ่อมแซมความเสียหายภายในเซลล์ดังที่ได้กล่าวใน ข้อ 1.2.1 โดยกลุ่มโปรตีน HSP70 ประกอบด้วยส่วนที่ทำหน้าที่ ATPase และ Peptide-binding ซึ่งเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะปกติจะมีการสังเคราะห์ HSP70 ในปริมาณที่น้อย และตรงกันข้ามเมื่อได้รับสภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน HSP70 จะเพิ่มขึ้น (Bodega et al., 2002)

กระบวนการสังเคราะห์ HSP70 ภายในเซลล์เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ตอบสนองต่อความเครียดที่ร่างกายได้รับ ในสภาวะปกติ heat shock transcription factors1 (HSF-1) จะจับอยู่กับโปรตีน HSP70 โดยอยู่ในรูป HSP:HSF complex ทำให้ HSF-1 อยู่ในสภาวะไม่สามารถทำงานได้ (inactive) เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียด (stressor) มีผลให้ HSP:HSF complex เกิดแยกจากกัน HSP70 จะไปทำหน้าที่ป้องกันและซ่อมแซมโปรตีนที่อาจเกิดความเสียหาย ส่วน HSF-1 จะเกิดกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) โดยการทำงานของเอนไซม์ protein kinases ทำให้ HSF-1 จำนวน 3 โมเลกุลรวมตัวกันเป็น HSF trimeric complexes แล้วเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อจับกับ heat shock element (HSE) บริเวณโปรโมเตอร์ (promotor) ของยีน HSP70 ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ได้ mRNA ของ HSP70 แล้วขนย้ายไปยังไซโตพลาสซึมและแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีน HSP70 (Kregel, 2002 และ Currie et al., 2000) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 กลไกการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง HSP70 ภายในเซลล์ด้วยปัจจัยเหนี่ยวนำชนิดต่าง ๆ  
ที่มา : Kregel (2002)

การสังเคราะห์ HSP70 เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากโครงสร้างของยีน HSP70 ไม่มี intron (ส่วนที่ไม่ถูกแปลรหัสพันธุกรรม) จึงลดขั้นตอนตัดแต่ง RNA (RNA splicing) ทำให้ยีน HSP70 สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณมาก (Sonna et al., 2002) จากงานทดลองของ Guerriero and Raynes (1990) ที่นำเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ของโค แกะ และไก่มาเหนี่ยวนำด้วยความร้อนพบการแสดงออกของโปรตีนขนาด 70 kDa ใน lymphocyte ของโค แกะ และไก่ หลังจากถูกกระตุ้นด้วยความร้อนเป็นเวลา 30 นาที และเมื่อทดสอบด้วยการทำปฏิกิริยากับ antibody ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนกลุ่ม HSP70 พบว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนกลุ่ม HSP70 จากงานวิจัยของ Lacetera et al. (2006) และ Kamwanja et al. (1994) ที่เหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวโคด้วยอุณหภูมิตั้งแต่ 39°C, 40°C, 41°C, 42°C และ 43°C พบปริมาณ mRNA ของ HSP70 เพิ่มขึ้นตามระดับอุณหภูมิ โดยอุณหภูมิที่ 42°C และ 43°C มีปริมาณ mRNA HSP70 สูงที่สุด กล่าวได้ว่าหลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากความร้อนจะมีการผลิตโปรตีนขนาด 70 kDa ซึ่งสอดคล้องกับการผลิต mRNA HSP70 หากเพิ่มระดับอุณหภูมิสูงขึ้นก็จะพบปริมาณ mRNA ของ HSP70 มีปริมาณมากขึ้นตามไปด้วย และจากการทดลองของ Koatdoke (2009) เหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมือง

ไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 38.5°C และ 42°C ที่ 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่าที่ชั่วโมงที่ 4 มีปริมาณสัมพัทธ์ของโปรตีน 70 kDa เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มจาก 0 ถึง 4 ชั่วโมง โดยโคพื้นเมืองนั้นมีการผลิตโปรตีนขนาด 70 kDa ภายในเซลล์สูงกว่าโคโฮลสไตน์ฟรีเซียน ในภาวะอุณหภูมิสูง (42°C) จากงานทดลองนี้ยังพบว่าหลังชั่วโมงที่ 6 ถึง 8 ปริมาณของโปรตีน 70 kDa เริ่มลดลงจนเกือบคงที่ ซึ่งการตอบสนองความร้อนจะใช้เวลาเพียงช่วงเวลาหนึ่ง นั่นคือเมื่อได้รับการกระตุ้นจากความร้อน ภายในเซลล์จะผลิตโปรตีนขนาด 70 kDa เพื่อรักษาโครงสร้างของเซลล์และซ่อมแซมส่วนที่ได้รับความเสียหาย จนเซลล์สามารถปรับตัวทำงานได้ตามปกติการผลิตโปรตีนเหล่านี้ก็จะลดปริมาณลง

นอกจากการสังเคราะห์ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้วยังพบการสังเคราะห์ HSP70 ในเซลล์ชนิดอื่นด้วย ดังการทดลองของ Gutierrez and Guerriero (1995b) นำกล้ามเนื้อลายของโคมาบ่มที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 4°C, 37°C และ 42°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อสกัด mRNA HSP70 และโปรตีน HSP70 พบว่าการแสดงออกของ mRNA HSP70 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ HSP70 ในอุณหภูมิ 4°C และ 37°C ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนที่อุณหภูมิ 42°C พบเปอร์เซ็นต์ mRNA และความเข้มข้นของ HSP70 สูงกว่าอุณหภูมิ 2 ระดับแรก ซึ่งสอดคล้องกับผลของการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูงในเซลล์เม็ดเลือดขาว

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ทำให้เห็นว่า HSP70 มีปฏิสัมพันธ์กับความสามารถในการทนร้อน จากงานทดลองของ King et al. (2002) เหนี่ยวนำเซลล์ตับของหนู mouse ด้วยความร้อน 41°C เปรียบเทียบกับเซลล์ตับที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำความร้อน พบว่าเซลล์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยความร้อนมีปริมาณ HSP70 มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยร้อน อีกทั้งยังพบว่าหนูที่เคยได้รับความร้อนมาแล้วครั้งหนึ่งเมื่อได้รับความร้อนครั้งต่อมาก็สามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่าหนูที่ไม่เคยได้รับความร้อน และรายงานของ Johnston and Kucey (1998) อ้างโดย สุรางคณา (2551) ทำการยับยั้งการสังเคราะห์ HSP70 ในเซลล์หนู Chinese hamster โดยแทรกพลาสมิดเข้าไปในบริเวณ 5'control region ของยีน HSP70 มีผลทำให้การสังเคราะห์ HSP70 ลดลงร้อยละ 90 และทำให้เซลล์ทนร้อนลดลง ซึ่งจะสังเกตได้ว่า HSP70 เกี่ยวข้องกับการทนร้อนและบางบริเวณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน HSP70 เป็นอีกปัจจัยที่ทำให้ปริมาณโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลง

จากข้อมูลของงานวิจัยต่างๆ ทำให้ทราบว่า HSP70 มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนร้อนของเซลล์ คือเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจากความร้อนจะมีการผลิต HSP70 เพื่อป้องกันโปรตีนไม่ให้ถูกทำลายจนเสียหาย ช่วยในการทำงานของโปรตีนให้เป็นปกติ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการทนร้อนของเซลล์นั้นๆ หากเป็นเซลล์ที่สามารถทนทานต่อความ



ร้อนได้ดีหรือเคยได้รับความร้อนมาแล้วจะมีปริมาณ HSP70 สูงกว่าเซลล์ทั่วไป อาจเป็นเพราะภายในเซลล์มีโปรตีน HSP70 ที่สะสมอยู่ก่อนแล้วโดยจับอยู่กับ HSF-1 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน HSF-1 จะแยกตัวเพื่อเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ส่วน HSP70 จะออกไปปฏิบัติหน้าที่และทำงานร่วมกับโปรตีนกลุ่มใหม่ที่สังเคราะห์ออกมา เมื่อเซลล์สามารถปรับตัวได้แล้วโปรตีน HSP70 ที่ผลิตออกมาในปริมาณมากจะเกิดการเก็บสะสมอยู่ภายในเซลล์ จึงทำให้สัตว์ที่ทนร้อนหรืออาศัยอยู่ในเขตร้อนจะพบปริมาณของ HSP70 ในเซลล์สูงกว่าสัตว์ไม่ทนร้อนหรืออาศัยอยู่ในเขตหนาว ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อความร้อนจะส่งสัญญาณให้สังเคราะห์โปรตีนเมื่อถูกเซลล์เหนี่ยวนำด้วยความร้อน แต่ปริมาณโปรตีนที่ผลิตอาจแตกต่างกันตามปริมาณการสังเคราะห์ได้ของ mRNA และจากการเปลี่ยนแปลงของบางบริเวณในยีนกลุ่ม HSP70

### 1.2.5 HSP70 gene

การสังเคราะห์ HSP70 ถูกควบคุมด้วยกลุ่มยีน HSP70 ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่ตำแหน่งที่อยู่และชื่ออาจแตกต่างกันไปในแต่ละสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น กลุ่มยีนที่สังเคราะห์โปรตีนขนาด 70 kDa ในมนุษย์ที่มีชื่อว่า *HSPA-6* และ *HSPA-7* อยู่บนโครโมโซมที่ 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับยีน HSP70-4 ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมที่ 3 ในโคเป็นต้น (Gallagher et al., 1993) จากงานวิจัยของ Grosz et al. (1992) ศึกษา ยีน HSP70 ในมนุษย์และโค โดยใช้ยีน HSP70 ในมนุษย์เป็นต้นแบบเพื่อศึกษา ยีน HSP70 ในโค พบว่ายีน HSP70 ในโคทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ HSP70-1, HSP70-2, HSP70-3 และ HSP70-4 ซึ่ง HSP70-1 และ HSP70-2 เป็นยีนชนิด inducible มีบทบาทในการป้องกันและรักษาสภาพเซลล์ในระบบ MHC-linked (major histocompatibility complex-linked), วงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) และกระบวนการสร้างอสุจิ เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความร้อน (Adamowicz et al., 2005; Yamashita et al., 2004 และ Gutierrez and Guerriero, 1995b) ขณะที่ HSP70-3 เป็นยีนชนิด constitutive ที่ป้องกันและรักษาสภาพเซลล์บริเวณอวัยวะ ส่วน HSP70-4 ไม่สามารถระบุการทำงานของยีนได้

## 2. หลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีวโมเลกุล (molecular biology) ที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือ DNA ในหลอดทดลองจากปริมาณ DNA ต้นแบบเพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิต DNA ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ มีการคิดค้นขึ้นครั้งแรกโดย Mullis et al. (1983) อ้างโดย จริยาและคณะ (2540) ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดได้นั้นต้องอาศัย DNA ต้นแบบ, เอนไซม์ DNA polymerase โดยทั่วไปนิยมใช้ *Taq* DNA polymerase ทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์อิสระ (dNTP) คือ dATP, dCTP,

dTTP และ dGTP มาต่อเป็นเบสคู่สม โดยมีไพรเมอร์ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับปลายด้าน 3' ของ DNA มาเป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ DNA เป้าหมาย ดังนั้นจึงควรพิจารณาการเลือกหรือออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของงานในการเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย ดังนี้ (วีระพงษ์, 2539ก)

- 1) ความยาวไพรเมอร์ควรมีความยาวประมาณ 18- 28 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
- 2) ค่า Tm (melting temperature) ของ forward primer และ reward primer ควรใกล้เคียงกัน ซึ่งจะอยู่ในช่วง 55-72 องศาเซลเซียส หรือ สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{จำนวน A+T}) + 4(\text{จำนวน C+G})$$

- 3) ไพรเมอร์ควรมี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% เพราะหาก GC-content สูงเกินไปส่งผลให้อุณหภูมิของไพรเมอร์สูง จับกับ DNA ได้ไม่ดี
- 4) ไพรเมอร์ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสาย DNA ต้นแบบ เนื่องจากเป็นบริเวณที่เอนไซม์พอลิเมอเรสเข้าจับ ไพรเมอร์ต้องจับกันต้นแบบอย่างแข็งแรง เอนไซม์ ที่เข้ามาจับจึงทำงานได้ดี และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวควรมีความจำเพาะ ซึ่งไม่พบในบริเวณอื่นๆ ของสาย DNA ต้นแบบ
- 5) พิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละสายต้องไม่เป็นคู่สมกัน ไม่เกิดการจับคู่กันเอง (self dimer) หรือจับอีกสายหนึ่งได้ (heterodimer) อันมีสาเหตุมาจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆ กัน ซึ่งส่งผลให้เกิด primer – dimer product ไพรเมอร์ไม่จับกับ DNA ต้นแบบ หรือจับได้น้อย

**2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA** มี 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 2.3) ดังนี้ (สุรินทร์, 2552; ปรีชา, 2551 และ วีระพงษ์, 2539ก)

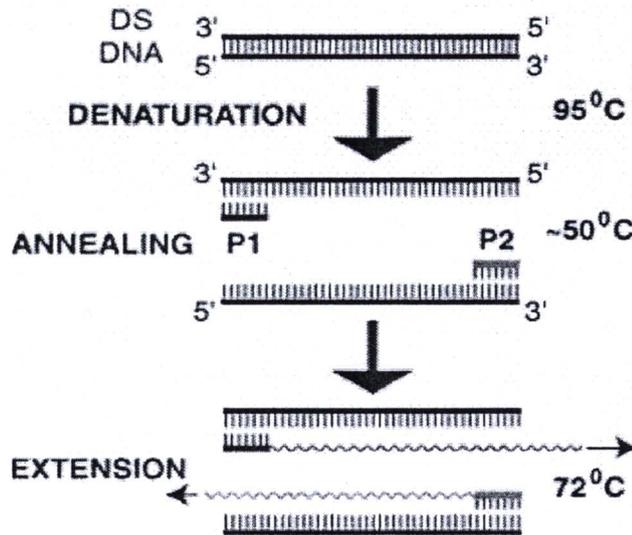
2.1.1 Template denaturation เป็นการคลายเกลียวคู่ของสาย DNA แม่แบบด้วยอุณหภูมิสูงประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 30-60 วินาที

2.1.2 Primer annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA ต้นแบบ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ต้องอยู่ในระดับใกล้เคียงกับอุณหภูมิแยกตัวของไพรเมอร์ (melting temperature; Tm ) อยู่ในช่วง 55-72 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 30 – 45 วินาที

2.1.3 Extension เป็นการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบน DNA ที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ใช้อุณหภูมิประมาณ 72-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 – 60 วินาที

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนรวมกันเรียกว่า 1 รอบพีซีอาร์ (PCR cycle) และเกิดขึ้นซ้ำๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสาย DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์สายใหม่ในรอบต่อไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้นผลผลิต DNA ที่ได้จึงเพิ่มขึ้นเป็น

ทวิคูณ เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า “Exponential amplification” ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ  $2^n$  (n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) การทำ PCR จำเป็นต้องมีการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับงานนั้นๆ เพื่อให้ประสิทธิภาพการทำ PCR เกิดขึ้นสูงสุด



ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : Pabinger (2006)

### 3. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

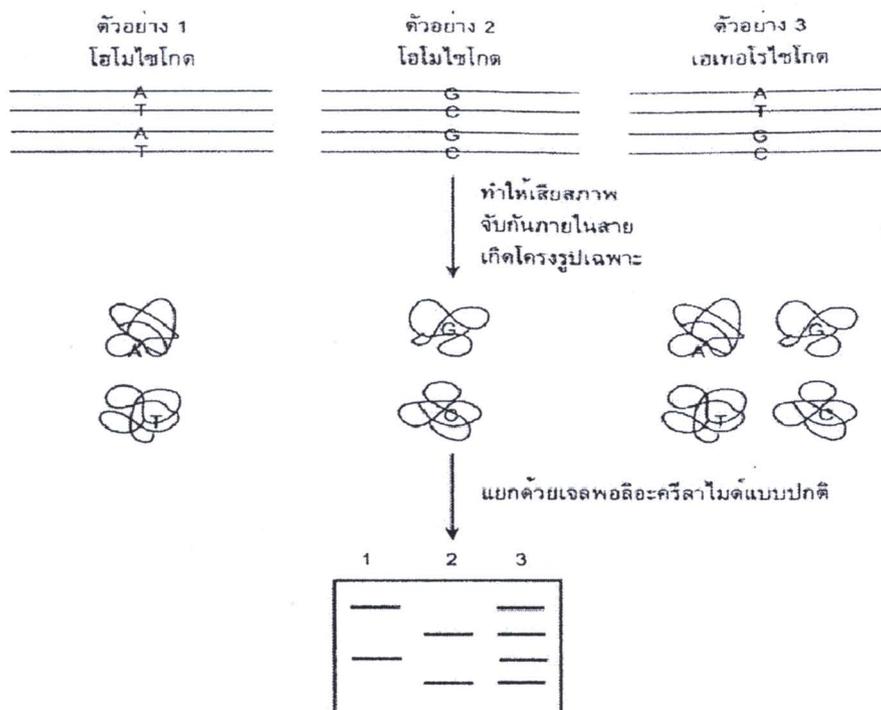
SSCP เป็นวิธีตรวจกรองจุดกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบชนิดมาก่อน (unknown mutation) หรือตรวจหาความหลากหลายจาก DNA ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้น DNA นั้น หรือเกิดจาก point mutation ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของตำแหน่งที่ไม่ทราบแน่ชัด สามารถตรวจหาความหลากหลายได้ด้วยวิธี ดังนี้ (สุรินทร์, 2552)

เทคนิค SSCP อาศัยหลักการคือ เมื่อ DNA สายคู่ถูกทำให้แยกเป็น DNA สายเดี่ยว (ssDNA; single strand DNA) ด้วยความร้อน (denaturation) DNA สายเดี่ยวในสภาวะธรรมชาติจะมีการขดตัวหรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสของ DNA สายนั้น หรือมีโครงรูป (conformation) ที่จำเพาะ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสแม้เพียง 1 ตำแหน่ง สามารถทำให้เกิดโครงสร้าง เฉพาะที่แตกต่างไปจากเดิมได้ ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำ electrophoresis ในเจลอะครีลาไมด์แบบปกติ (non-denaturing polyacrylamide gel) โมเลกุลของ DNA ที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงรูปแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำ electrophoresis เร็วช้าต่างกัน (ภาพที่ 2.4) (สุรินทร์, 2552; สมาคมพันธุ

ศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548 และ วีระพงษ์, 2539ข )

วิธี SSCP เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดในการศึกษาความหลากหลายเบื้องต้น เนื่องจากขั้นตอนง่ายไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญที่มักประสบเสมอในงานตรวจวิเคราะห์ คือ ปริมาตรตัวอย่างตรวจที่ได้มา มักมีปริมาณค่อนข้างน้อย ทำให้ปริมาณ DNA ไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิค PCR เข้าร่วมในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งจะมีการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนที่สนใจก่อน จากนั้นจึงนำ PCR product ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ต่อด้วย SSCP ในช่วงเวลาต่อมา การตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายหรือการ กลายพันธุ์จึงนิยมใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ SSCP ซึ่งเรียกว่า PCR-SSCP (อุมาพร, 2548)

PCR-SSCP เริ่มจากการเพิ่มจำนวน DNA โดยมีเป้าหมายเพื่อต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียง 1 bp ในสาย DNA ประมาณ 100-500 bp ด้วยวิธี Simple PCR จากนั้นนำ PCR product มาทำ SSCP โดยอาศัยหลักการ denature PCR product ให้เป็น single stand แล้วจึงนำไปแยกด้วย non-denaturing gel เพื่อดูการเคลื่อนที่ของ DNA ถ้า DNA สายนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเพียง 1 bp ก็จะทำให้การเคลื่อนที่ของ DNA ในเจลแตกต่างกันไปจากเดิม



ภาพที่ 2.4 การตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี SSCP เมื่อแยก DNA เป็นสายเดี่ยวแล้ว DNA สายเดี่ยวแต่ละสายจะมีโครงสร้างแตกต่างกัน

ที่มา : สุรินทร์ (2552)

### 3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อความไวของ PCR-SSCP

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงรูปของ DNA สายเดี่ยว ได้แก่ (สุรินทร์, 2552 และ วีระพงศ์, 2539ข)

#### 3.1.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่ใช้ระหว่างการทำ electrophoresis จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลกระทบต่อโครงรูปของ DNA สายเดี่ยว จากรายงานของ Fujita and Silver (2009) กล่าวว่าช่วงของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ SSCP จะอยู่ในช่วง 4-37°C ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์และความเหมาะสมขององค์ประกอบต่างๆ ใน PCR product ดังนั้นช่วงทำ electrophoresis จึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิระหว่างทำให้คงที่ตลอดเวลาและตลอดการทดลอง ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้เครื่อง electrophoresis ที่มีระบบหล่อเย็น หรือการทำในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้

#### 3.1.2 ความเข้มข้นและสัดส่วนของเจล

polyacrylamide gel ที่มีเปอร์เซ็นต์ของการ cross-linking ต่ำ ช่วยให้ DNA สายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สมแยกออกจากกันได้ดี โดยทั่วไปช่วงความเข้มข้นของ polyacrylamide ที่ใช้ในงาน SSCP จะอยู่ในช่วง 4-12% ในขณะที่ตัว cross-link (%C) มีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 2-3.4%C ของความเข้มข้น polyacrylamide การใช้แผ่นเจลที่บางจะให้ผลการทดลองที่ดีกว่าและคงที่กว่าการใช้แผ่นเจลที่หนา ซึ่งผลจากแผ่นเจลที่บางจะมีการควบคุมอุณหภูมิของเจลให้คงที่และทั่วถึงได้ดีกว่าแผ่นเจลหนาสอดคล้องกับรายงานของ Hayashi (2008) ได้กล่าวว่าการทำงาน electrophoresis ที่อุณหภูมิห้อง (20-26°C) หรือที่ 4°C ความเข้มข้นของ polyacrylamide ที่เหมาะสมจะใช้นในงาน SSCP ควรอยู่ระหว่าง 5-6% และความเข้มข้นของ cross-link อยู่ที่ 1-2%C ของความเข้มข้น polyacrylamide

#### 3.1.3 Additives

จากการศึกษาพบว่า การใส่สารบางตัวลงในเจลช่วยทำให้การแยกของ DNA สายเดี่ยวในเจลดีขึ้นและปรับอุณหภูมิภายในเจลให้สมดุลระหว่างทำ electrophoresis ที่ใช้เวลานาน สารเหล่านี้ ได้แก่ glycerol, urea, formamide, dimethylsulfoxide, sucrose และ polyethylene glycerol (สุรินทร์, 2552; Fujita and Silver, 2009 และ Zhu et al., 2006)

#### 3.1.4 ขนาดของ DNA

ความไวของการตรวจ SSCP ขึ้นกับความยาวของ DNA ที่ตรวจวิเคราะห์ ซึ่ง ความไวของ SSCP ลดลงเมื่อ DNA มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยทั่วไปขนาดของ DNA ที่นำมาวิเคราะห์ ควรมีความยาว 150-300 bp ถ้าความยาวของ DNA ที่วิเคราะห์มีขนาดมากกว่า 300 bp ควรเติมสารกลุ่ม additive เช่น glycerol

### 3.1.5 ลักษณะการกลายพันธุ์หรือความแตกต่างในสาย DNA

ในทางทฤษฎีตำแหน่งและชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลง ตลอดจนส่วนประกอบและลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาย DNA ที่ตรวจวิเคราะห์ ล้วนมีผลต่อการตรวจพบโดย SSCP ซึ่งตำแหน่งของเบสที่เปลี่ยนแปลงมีผลอย่างมากต่อการตรวจพบโดย SSCP ในขณะที่ชนิดของเบสที่เปลี่ยนแปลงในตำแหน่งนั้นๆ ไม่ว่าจะเป็น transition (การแทนที่ระหว่างเบสชนิดเดียวกัน) หรือ transversion (การแทนที่ระหว่างเบสต่างชนิด) ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อต่อไป ในกรณีที่เบสมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าหนึ่งเบส ถ้าตำแหน่งของเบสเหล่านั้น มีการรวมตัวอยู่บริเวณใดบริเวณหนึ่งในสาย DNA โอกาสการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงโดย SSCP จะมีโอกาสมากกว่าในกรณีที่ตำแหน่งของเบสเหล่านั้นกระจายอยู่ทั่วสาย DNA นอกจากนี้แล้วยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ทั้งสองด้านของตัวเบสที่เปลี่ยนแปลงก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการตรวจพบการเปลี่ยนแปลง

### 3.1.6 ไพรมเมอร์ในรูปอิสระ

ไพรมเมอร์ในรูปอิสระที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาการทำ PCR สามารถรวมตัวเข้ากับ PCR product ที่แยกเป็นสายเดี่ยวแล้ว และทำให้การเคลื่อนที่ในตัวเจลของมันเปลี่ยนแปลงได้ ปัญหานี้สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยการเจือจาง PCR products หรือขจัดไพรมเมอร์ออกจาก PCR product โดยการแยกด้วย Sephacryl S-300 column ซึ่งในกรณีหลัง PCR product ควรจะมีขนาดมากกว่า 200 bp (Fujita and Silver, 2009)

### 3.1.7 ความเข้มข้นของ PCR product

PCR product ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป อาจทำให้ PCR products ที่แยกเป็นสายเดี่ยวแล้วเกิดการ reannealing อย่างรวดเร็ว และเป็นเหตุให้การทำ SSCP ไม่ได้ผล ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้หลายวิธี ได้แก่

- การเจือจาง PCR product ก่อนนำมาทำ SSCP
- การเติม methylmercury hydroxide ลงใน loading buffer
- การเพิ่มส่วน stacking gel ที่มี 75%formamide เพื่อรักษาสภาพ DNA สายเดี่ยว

จนกว่า DNA จะถูกแยกในเจล

ปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการทำ SSCP และที่สำคัญก็คือปัจจัยแต่ละอย่างอาจมีผลเล็กน้อยแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับสภาวะหรือชนิดของ DNA ที่วิเคราะห์ ดังนั้นเมื่อนำเทคนิค PCR-SSCP มาใช้ทำการตรวจวิเคราะห์ DNA ชนิดใดชนิดหนึ่ง จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปรับสภาพให้เหมาะสมกับการทดลองแต่ละครั้ง

#### 4. ความสำคัญของรูปแบบ SSCP และการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์

การเกิดรูปแบบต่างๆ ของเส้น DNA สายเดี่ยว เกิดจาก nucleic acid ที่ถูกทำให้เป็นเส้นเดี่ยว เกิดการจับคู่ระหว่างเบสภายใน ทำให้มีโครงสร้างเป็นแบบทุติยภูมิ ซึ่งมีลักษณะเฉพาะของเบสแต่ละตัว ส่งผลให้การเคลื่อนที่ภายในเจลอะครีลาไมด์แบบปกติแตกต่างกัน เกิดเป็นรูปแบบ SSCP ที่หลากหลาย (Muhaghegh and Goswami, 2006 และ Kalvathev and Draganov, 2005) โดยปรากฏแถบ DNA ขนาดต่างๆ ในเจลอะครีลาไมด์ ซึ่งความแตกต่างของรูปแบบ SSCP สามารถนำมาใช้ในการประเมินคุณลักษณะเบื้องต้นของสัตว์ ค้างงานวิจัย ของวิโรจน์ และคณะ (2551) พบรูปแบบ SSCP ที่แตกต่างจากการศึกษาความหลากหลายของยีน Very low density lipoprotein และ Vitellogenin receptor ในไก่ไข่พันธุ์การค้ำและไก่สามเหลือง ซึ่งเป็นยีนที่สัมพันธ์กับลักษณะแสดงของการให้ไข่ ด้วยเทคนิค PCR-SSCP ซึ่งคาดว่าความแตกต่างของรูปแบบ SSCP ที่พบ จะส่งผลต่อลักษณะที่แสดงออกของการให้ไข่ของไก่สองสายพันธุ์ต่างกัน และรายงานของ Muhagegh and Goswami (2006) ศึกษาความหลากหลายบริเวณ 3'flanking region ของยีน growth hormone ในกระบืออินเดีย 5 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบรูปแบบ SSCP ทั้งหมด 6 รูปแบบ ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างกันนี้มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของกระบือ อย่างไรก็ตามความแตกต่างของรูปแบบ SSCP ไม่สามารถระบุแตกต่างของตำแหน่งเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมหลังจากได้รูปแบบ SSCP แล้ว เพื่อพิจารณาความแตกต่างของตำแหน่งเบสหรือการกลายพันธุ์ที่อาจเป็นปัจจัยเกี่ยวข้องการแสดงออกของคุณลักษณะต่างๆ ที่กำลังศึกษาอยู่

##### 4.1 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) การกลายพันธุ์แบบ base substitution เรียกอีกอย่างว่าการเกิดจุดกลายพันธุ์ เกิดขึ้นจากการแทนที่คู่เบส

จุดกลายพันธุ์ของตำแหน่งเบสในแต่ละรูปแบบมี 3 ชนิด คือ (ปรีชา, 2551 และอมรา, 2546)

1) base substitution (bs) เป็นการแทนที่เบส ซึ่งการแทนที่เบสสามารถเกิดขึ้นได้ทั้ง 4 ชนิดของเบส (A,T,C และ G) เบสในโมเลกุลของ DNA มีสถานะของการเปลี่ยนรูปไปมาได้ เกิดจากการย้ายพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของเบสใดเบสหนึ่ง มีผลทำให้คุณสมบัติการเข้าคู่ของเบสผิดไปจากเดิม การแทนที่ของเบสเป็นได้ 2 แบบ ได้แก่



(1) transition (ts) เป็นการแทนที่ระหว่างชนิดของเบสที่เหมือนกัน คือ ระหว่าง A กับ G (เบสพิวรีน) หรือระหว่าง C กับ T (เบสไพริมิดีน) สามารถเกิดได้ในธรรมชาติจากการเปลี่ยนแปลงโยกย้ายโปรตอนหรืออิเล็กตรอนของไฮโดรเจนอะตอม ภายในโมเลกุลของเบสใดเบสหนึ่ง

(2) tranversion (tv) เป็นการแทนที่ระหว่างชนิดของเบสที่ต่างกัน คือระหว่างเบสพิวรีนกับเบสไพริมิดีน คือ ระหว่าง A (เบสพิวรีน) กับ C หรือ T (เบสไพริมิดีน), ระหว่าง G (เบสพิวรีน) กับ C หรือ T (เบสไพริมิดีน) เกิดได้ในธรรมชาติซึ่งเกิดในช่วงระยะที่มีการซ่อมแซมสาย DNA

2). insertion (i) เป็นการเพิ่มขึ้นของเบสบางส่วนในลำดับนิวคลีโอไทด์

3) deletion (d) เป็นการขาดหายของเบสบางตัวในลำดับนิวคลีโอไทด์

นอกจากการแทนที่ของเบสทั้ง 4 ชนิด ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีสัญลักษณ์แทนเบสที่ใช้ในลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ต้องการระบุเบสที่มีมากกว่า 1 ชนิด ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สัญลักษณ์ต่างๆ ของเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

Symbol	Description	Bases represented			
		A	C	G	T
A	Adenosine	A			
C	Cytidine		C		
G	Guanosin			G	
T	Thymine				T
U	Uridine				U
W	Weak	A			T
S	Strong		C	G	
M	Amino	A	C		
K	Keto			G	T
R	Purine	A		G	
Y	Pyrimidine		C		T
B	Not A		C	G	T
D	Not C	A		G	T
H	Not G	A	C		T
V	Not T	A	C	G	
N	Any base	A	C	G	T

ที่มา : คัดแปลงจาก NEW ENGLAND BioLabs Inc. (2009)

## 4.2 การแทนที่ของเบสในบริเวณต่างๆ ของยีน

การแทนที่ของเบสในบริเวณ 5'flanking region และ 3'flanking region ซึ่งเป็นส่วนควบคุมการทำงานของยีนและส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (nontranscribed part)

บริเวณ 5' flanking region (upstream) ของยีนเป็นส่วนควบคุมที่เรียกว่า promoter มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเจาะจง (consensus sequence) ประกอบไปด้วย CCAAT box, GC box และ TATA box เป็นตำแหน่งให้โปรตีนชนิดที่จับได้ (promoter binding protein) มาจับ เพื่อเริ่มต้นการสังเคราะห์ RNA ที่ถูกต้องและแม่นยำ หากเกิดการแทนที่ของเบสหรือการกลายพันธุ์ในบริเวณเหล่านี้ การถอดรหัสสามารถเกิดขึ้นได้ แต่มีผลให้จุดเริ่มต้นของการถอดรหัสเปลี่ยนตำแหน่งไปจากเดิม และทำให้ผลผลิตในระดับโปรตีนเปลี่ยนแปลงได้ หรืออาจขัดขวางการทำงานของระบบการถอดรหัสของยีน ขัดขวางการจับของ RNA polymerase และ transcription factor ส่งผลให้การสร้าง mRNA และโปรตีนลดลง (อมรา, 2546)

บริเวณ 3'flanking region จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของสูตรรหัสที่บอกการหยุดถอดรหัส (termination of transcription) โดยบริเวณนี้จะถูกตัดออกไปอย่างรวดเร็วทันทีที่การถอดรหัสสิ้นสุดลง หากมีการกลายพันธุ์บริเวณนี้ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงรหัสสิ้นสุดเดิมให้กลายเป็นรหัสอ่านต่อไปได้ และจะหยุดการสังเคราะห์เมื่อผ่านไปถึงรหัสสิ้นสุดครั้งต่อไป ทำให้ได้ polynucleotide ที่ยาวกว่าปกติ ซึ่งมีผลโดยตรงกับ รูปร่างและหน้าที่ของโปรตีน ทำให้ได้โปรตีนที่ผิดปกติและเป็นโปรตีนที่ไม่มั่นคงถูกทำลายได้ง่าย (อมรา, 2546) แต่รายงานของ Adamowicz et al. (2005) พบว่าการแทนที่ของเบสบางตำแหน่งในบริเวณ 3'-UTR ของยีน HSP70-1 ทำให้ mRNA มั่นคงและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บริเวณ coding sequence เป็นบริเวณกำหนดการสร้างโปรตีน ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 3 เบส (triplet code) ที่เป็นรหัสพันธุกรรม มีผลต่อการแปลรหัสเป็นโปรตีน โดยเบสตำแหน่งที่ 1 และ 2 มีความสำคัญต่อการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมากกว่าเบสตำแหน่งที่ 3 เนื่องจากเป็นตัวกำหนดชนิดของกรดอะมิโน หากพบการแทนที่เบสในรหัสพันธุกรรมย่อมส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนและโปรตีนด้วย (เปรมใจ และคณะ, 2548; สุริพร, 2548 และ ปรีชา, 2545) ซึ่งการแทนที่เบสสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1) แบบ synonymous หรือ silent substitution คือ การแทนที่เบสแล้วไม่มีผลทำให้ผลผลิตการเรียงตัวของกรดอะมิโน หรือการกลายพันธุ์ที่เบสแต่ยังคงให้ผลผลิตโปรตีนปกติ

2) แบบ nonsynonymous substitution คือ การแทนที่เบสแล้วมีผลทำให้ชนิดหรือการเรียงตัวของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิด ได้แก่

(1) missense mutation เป็นการเปลี่ยนสูตรรหัสพันธุกรรม ที่มีผลทำให้ชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนไปจากเดิม

(2) nonsense mutation เป็นการเปลี่ยนสูตรรหัสพันธุกรรมเดิมมาเป็นสูตรรหัสพันธุกรรมชนิดสิ้นสุดการสังเคราะห์โปรตีน (termination codon) ซึ่งมีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีนมีขนาดสั้นกว่าโปรตีนปกติ polynucleotide ไม่สมบูรณ์และไม่สามารถทำงาน (อมรา, 2546 และ ปรีชา, 2545)

## 5. การประยุกต์ใช้ PCR-SSCP ในการหาความหลากหลายของยีน HSP70 ในโค

ความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีชีวภาพทำให้ตรวจพบความแปรปรวนใน HSP70 gene ซึ่งพบ polymorphism ที่บริเวณ 5'flanking region ของ HSP70 gene ซึ่งมีผลต่อปริมาณการสังเคราะห์ mRNA HSP70 จากการทดลองของ Cai et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการเกิด polymorphism ของยีน HSP70-1 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน ด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบการเกิด polymorphism บริเวณ 5'flanking region 4 รูปแบบ คือ AA, BB, AB และ AC มีความถี่เป็น 58.9%, 11.1%, 7.78% และ 22.22% ตามลำดับ โดยบริเวณที่พบ polymorphism มีผลต่อปริมาณ mRNA HSP70 ซึ่งรูปแบบ AC มีผลต่อปริมาณ mRNA HSP70 สูงกว่ารูปแบบ AA BB AB และจากงานวิจัยของอุมาพร (2548) ศึกษาความหลากหลายของยีน HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคพื้นเมืองไทย และโคนมลูกผสมโดยใช้เทคนิค PCR-SSCP พบว่ามีการเกิด polymorphism ที่บริเวณ 5'flanking region ของยีน HSP70-2 ในโคทั้ง 2 พันธุ์จำนวน 5 รูปแบบ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจ และอุณหภูมิทวารหนัก โดยพบว่าโคที่มีรูปแบบที่ 2 มีการเปลี่ยนแปลงของอัตราการหายใจ น้อยที่สุด ในขณะที่รูปแบบที่ 3 จะพบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทวารน้อยที่สุดซึ่งพบมากในโคพื้นเมืองไทย บริเวณ coding sequence ของ HSP70-2 พบรูปแบบของ SSCP เพียง 1 แบบซึ่งไม่มีความแตกต่างในโคทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งจากงานวิจัยนี้ได้ให้ข้อเสนอแนะว่าหากต้องการพิจารณาเลือกรูปแบบการเกิด polymorphism ของยีน HSP70 ไปใช้ในการคัดเลือกลักษณะการทนร้อน ควรเลือกใช้รูปแบบ SSCP ของยีน HSP70-2 โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทวารหนักน้อยที่สุด เพราะอุณหภูมิทวารหนักเป็นตัวชี้วัดการทนร้อนในโคแม่นยำกว่าอัตราการหายใจ เนื่องจากสัตว์อาจเกิดความตื่นเต้นจากการวัดซึ่งอาจมีผลทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าค่าจริงที่ควรจะเป็น

งานวิจัยของ Cheng et al. (2009) ทำการศึกษาความหลากหลายของยีน HSP70-1 บริเวณ coding region ที่สัมพันธ์กับ somatic cell score (SCS) ใน Chinese Holstein โดยใช้เทคนิค PCR-SSCP พบว่าที่ตำแหน่ง 1623 bp และ 2409 bp เกิดการกลายพันธุ์ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในลำดับกรดอะมิโน อย่างไรก็ตามบริเวณตำแหน่งที่ 1623 bp มีรูปแบบ genotype ได้แก่ AG, GG และ CC ที่สัมพันธ์กับ SCS โดย CC มีความสัมพันธ์กับ SCS ต่ำกว่า genotype รูปแบบอื่น โดย CC เป็นลักษณะ

ที่สามารถต้านทานต้านมอักเสบได้ จึงได้มีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้เป็น marker ในการตรวจต้านมอักเสบต่อไป

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาบริเวณ 3' UTR (3' untranslated region) จากการทดลองของ Adamowicz et al. (2005) ศึกษา SNPs ใหม่บริเวณ 3'-UTR ของยีน HSP70-1 ใน *Bos taurus* และ *Bos indicus* ด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบรูปแบบ SSCP ทั้งหมด 4 รูปแบบในโค 2 สายพันธุ์ และนำรูปแบบที่แตกต่างหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า บริเวณ 3'-UTR ในโคทั้ง 2 สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ซึ่งควบคุม post-transcriptional gene ทำให้ mRNA ที่คัดลอกออกมาค่อนข้างคงที่ อาจมีการแทรกของเบส G และเบส C หรือการแทนที่เบส U/A บางตำแหน่งเป็นผลให้ mRNA สมบูรณ์ยิ่งขึ้น แต่เมื่อ translated เป็นโปรตีนในโคทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่าง ซึ่ง SNPs ที่เกิดขึ้นอาจมีอิทธิพลต่อความคงทนของ mRNA ที่เป็นต้นแบบสำหรับถอดรหัสเป็นโปรตีน ซึ่งบริเวณ 3'-UTR อาจไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณการสังเคราะห์ mRNA HSP70

จากการทบทวนเอกสารเกี่ยวกับกลไกควบคุมความร้อนในระดับสรีรวิทยา ระดับโมเลกุล ทำให้ทราบถึงบทบาทของยีน HSP70 ในการตอบสนองต่อความร้อนที่แตกต่างกันของโคสองสายพันธุ์ อันเป็นแนวทางสำหรับศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยความหลากหลายของรูปแบบ SSCP และลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70-2 ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม inducible และเคยมีการศึกษาเปรียบเทียบกับ การตอบสนอง ในระดับสรีรวิทยาของโค เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้สำหรับการศึกษายีน HSP70-2 ในโคพื้นเมืองไทยหรือโคเขตร้อน และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกสัตว์ที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อความร้อนต่อไป