

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์

5.1 รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตติน

ชิ้นส่วนยีนคาลปาสเตตินที่จำแนกได้จากโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนมีความเหมือนกับยีนคาลปาสเตตินในโคสายพันธุ์ซาโรเลสส์ 98-99 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งครอบคลุมบริเวณปลาย 3' ของเส้น mRNA ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นบางส่วนของโดเมนที่ III และโดเมนที่ IV (ภาคผนวก ก) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานโดย Raynaud *et al.* (2005a และ 2005b) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนคาลปาสเตตินในบริเวณที่ศึกษาในโคทั้งสามสายพันธุ์มีความอนุรักษ์ค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นบริเวณที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนและโปรตีน

5.2 ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตติน

การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมืองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาพจริง (Realtime PCR) โดยใช้ยีนเบต้าแอกตินเป็นยีนควบคุมภายใน พบว่าการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อชนิด Longissimus dorsi (LD), Longissimus treracis (LT), Transversus abdominis (TA) และ Semitendinosus (ST) มีปริมาณใกล้เคียงกัน กล้ามเนื้อชนิด Rectus abdominis (RA) มีการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินมากเป็น 2 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่กล้ามเนื้อ Semimembranosus (SM) พบการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินเพียง 1/3 เท่าของกล้ามเนื้อ LD เท่านั้น

เป็นที่ทราบกันดีว่ายีนคาลปาสเตตินเป็นยีนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเพน (Koochmarai, 1988 & 1992) การแสดงออกของคาลปาสเตตินที่มากน่าจะชี้บ่งว่าเนื้อมีความเหนียวมากด้วย จากข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะกล่าวได้ว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองหลังการฆ่า 24 ชั่วโมงที่นำมาทดสอบ กล้ามเนื้อชนิด SM น่าจะมีความนุ่มมากกว่ากล้ามเนื้อชนิด LD, LT, TA และ ST และกล้ามเนื้อชนิด RA น่าจะมีความนุ่มน้อยที่สุด ซึ่งตามรายงานของ Calkins and Sullivan (2007) และ Shackelford *et al.* (1995) ซึ่งทำการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและ Sensory panel test พบว่าโดยภาพรวมกล้ามเนื้อชนิด ST SM มีความนุ่มของเนื้อมากกว่ากล้ามเนื้อ LD อย่างไรก็ตามการตรวจสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และการประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ในกล้ามเนื้อแต่ละชนิดของโคพื้นเมืองจะช่วยยืนยันความนุ่มเหนียวของเนื้อได้อย่างแม่นยำขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในลำไส้และหัวใจมีค่าเป็น 0.17 เท่าของกล้ามเนื้อ LD การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะ ไต และ ม้าม มีปริมาณใกล้เคียงกันประมาณ 0.03-0.04 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินใน

สมองและตับมีค่าเพียง 0.002 และ 0.007 เท่าของการแสดงออกในกล้ามเนื้อ LD เท่านั้น จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ย้อนกลับ (RT-PCR) รายงานโดย de Tullio *et al.* (2007) ซึ่งทำทดสอบในตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะของหนู สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนได้ในสมอง กล้ามเนื้อ หัวใจ และตับ ขณะที่รายงานของ Raynaud *et al.* (2005b) ทำการทดสอบด้วยวิธีเดียวกันในตัวอย่างจากโค สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อ หัวใจ กระบังลม ม้าม และอวัยวะ อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวข้างต้นไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

5.3 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตติน

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อลายของโคพื้นเมืองไทย โดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อหลังการฆ่าภายใน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดี Anti-DomIV พบว่า สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa และ 70 kDa มีการแสดงออกในปริมาณมากในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการศึกษา ผลการทดสอบมีความสอดคล้องกับรายงานของ Boehm *et al.* (1998), Raynaud *et al.* (2005a) และ Sazili *et al.* (2005) โดยไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa น่าจะเป็นคาลปาสเตติน type II ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยเอกซอน 1xb, 1y, 1z, โดเมน L และ โดเมน I-IV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 84 kDa แต่มีการเคลื่อนที่บนเจลอะครีลาไมด์อยู่ที่ขนาด 145 kDa (Goll *et al.*, 2003; Raynaud *et al.*, 2005a) ขณะที่ไอโซฟอร์มขนาด 70 kDa น่าจะเป็นคาลปาสเตตินชนิด Erythrocyte type ซึ่งเป็นโปรตีนคาลปาสเตตินที่ขาดโดเมน L และ โดเมน I มีน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 46 kDa แต่มีการเคลื่อนที่บนเจลอะครีลาไมด์อยู่ในช่วง 68-70 kDa (Goll *et al.*, 2003; Raynaud *et al.*, 2005a; Takano *et al.*, 1988;) การเคลื่อนที่มีลักษณะผิดปกติของโปรตีนคาลปาสเตตินนี้ทำให้ยากต่อการบ่งชี้ขนาดของไอโซฟอร์ม ซึ่งจะพบว่าโมเลกุลของคาลปาสเตตินจะเคลื่อนที่บน SDS-PAGE ช้ากว่าขนาดโมเลกุลที่ได้จากการคำนวณจากน้ำหนักของลำดับกรดอะมิโนบนสายไอโซฟอร์ม (Emori *et al.*, 1988; Takano and Murachi, 1982; Takano *et al.*, 1988)

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ในกล้ามเนื้อยังตรวจพบแถบโปรตีนที่มีความเข้มเพียงเล็กน้อยที่ขนาดโมเลกุล 170, 110, 90, 60, 45 และ 40 kDa ในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการศึกษา ทดสอบอีกด้วย ซึ่งไอโซฟอร์มขนาด 170 kDa น่าจะเป็นคาลปาสเตติน type I ซึ่งเป็นชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด ไอโซฟอร์มขนาด 90-110 kDa น่าจะเป็นไอโซฟอร์ม type III ที่ประกอบด้วยส่วนของโดเมน L และ โดเมน I-IV โดยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของโครงสร้างในโดเมน L ที่อาจมีการตัดต่ออย่างสลับของเอกซอน (alternative splicing) ภายในโดเมนในช่วงหลังของขบวนการถอดรหัส (post-transcription process) ขณะที่ไอโซฟอร์มขนาด 45 และ 40 kDa น่าจะเกิดจากการย่อยสลายโปรตีนคาลปาสเตตินภายหลังจากสัต์ตาย (Goll *et al.*, 2003)

โดยภาพรวมอาจกล่าวได้ว่าในกล้ามเนื้อละลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบมีการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินไอโซฟอร์มชนิดเดียวกันทั้งหมดและพบการแสดงออกถึง 8 ไอโซฟอร์ม ซึ่งน่าจะเกิดจากการควบคุมถอดรหัสโดยโปรโมเตอร์หลายตำแหน่งรวมทั้งขบวนการตัดต่ออย่างสลับของสายอาร์เอ็นเอหรือการย่อยสลายหลังการแปลรหัสโปรตีน (Goll *et al.*, 2003; Raynaud *et al.*, 2005a; Takano *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตามลักษณะการเคลื่อนที่ที่ผิดปกติที่ตรวจพบนี้สามารถตรวจสอบยืนยันได้โดยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนในโอกาสต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อแต่ละชนิดที่ทำการทดสอบ พบว่าการแสดงของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อละลายชนิด RA และ ST ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มมาก เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ของ Raynaud *et al.* (2005a) ขณะที่กล้ามเนื้อละลายชนิด TA, LT และ LD ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มรองลงมา และกล้ามเนื้อชนิด SM พบโปรตีนคาลปาสเตตินในปริมาณน้อย โดยรวมผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคาลปาสเตตินมีความสอดคล้องกับปริมาณการแสดงออกของยีนในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของโคพื้นเมืองด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดี Anti-DomIV พบว่าในตัวอย่างเนื้อเยื่อหัวใจพบโปรตีนคาลปาสเตติน 4 ไอโซฟอร์มขนาด 145, 135, 125 และ 95 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 135 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุด ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากไตพบไอโซฟอร์มเพียง 2 ชนิด คือ 125 และ 145 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าไอโซฟอร์มขนาด 125 kDa ประมาณ 2 เท่า ในเนื้อเยื่อจากม้ามพบไอโซฟอร์ม 2 ชนิด คือ 125 และ 135 kDa ในปริมาณการแสดงออกที่เท่าๆกัน ขณะที่ในเนื้อเยื่อจากสมองและตับสามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa เพียงขนาดเดียว โดยมีปริมาณการแสดงออกเพียงเล็กน้อย โดยไอโซฟอร์มขนาด 95-135 kDa มีการเคลื่อนที่สอดคล้องกับคาลปาสเตติน type III และ 145 kDa มีการเคลื่อนที่สอดคล้องกับคาลปาสเตติน type II (Goll *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ตรวจไม่พบโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อจากอวัยวะและลำไส้ ตามรายงานของ Raynaud *et al.* (2005a) ซึ่งทำการทดลองในโคสายพันธุ์ซาโรเลย์ สามารถพบไอโซฟอร์มขนาด 145, 125 และ 70 kDa โดยพบกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อลาย กระบังลม ม้าม และอวัยวะ ตรวจพบปริมาณไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa ในปริมาณสูงมาก นอกจากนี้ในอวัยวะของโคยังตรวจพบไอโซฟอร์มที่มีขนาด 60 kDa อีกด้วย จะเห็นได้ว่าคาลปาสเตติน type II และ type III มีการตรวจพบในเนื้อเยื่อหลายชนิด แม้ว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ปรากฏอาจมีการคลาดเคลื่อนไปบ้าง ผลการทดลองนี้ชี้บ่งได้ว่าคาลปาสเตตินทั้งสองชนิดนี้น่าจะเป็นไอโซฟอร์มรูปแบบพื้นฐาน (native isoform) ที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อทั่วไป อย่างไรก็ตามการตรวจสอบยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจะช่วยทดสอบสมมติฐานในส่วนนี้ได้

5.4 อิทธิพลของสายเลือดโคต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ การแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานโปรตีนคาลปาสเตติน

เมื่อเปรียบเทียบค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีค่ามากกว่าโคกำแพงแสนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยืนยันได้ว่าเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสนมีความนุ่มกว่าเนื้อโคพื้นเมือง ซึ่งโคกำแพงแสนนั้นเป็นโคลูกผสมที่มีสายเลือดชาโรเลสส์ ซึ่งเป็นโคในตระกูล *Bos taurus* อยู่ 25% กล่าวได้ว่าสายเลือดโคมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อโค ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าเนื้อโคสายเลือด *Bos indicus* มีปริมาณคาลปาสเตตินมากกว่าเนื้อโคที่มีสายเลือด *Bos taurus* (Ouali and Talment, 1990; Pring et al., 1997; Shackelford et al., 1994; Wheeler et al., 1990; Whipple et al., 1990; Wulf et al., 1996) อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในโคทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

5.5 ความสัมพันธ์ของความนุ่มของเนื้อต่อการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานโปรตีนคาลปาสเตติน

ผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ในตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองโดยใช้ Pearson Correlation พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ขณะที่ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสน ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสนมีความสัมพันธ์ในทางบวกทั้งสามค่า โดยค่าแรงตัดผ่านเนื้อและค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่าเมื่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ มีค่าสูงขึ้น ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินและค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินก็มากตามด้วย ผลการทดสอบยืนยันได้ว่าการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทั้งสามค่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามการประเมินความนุ่มของเนื้อโคด้วยปริมาณยีนคาลปาสเตตินและค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ จะช่วยให้การประเมินความนุ่มของเนื้อมีความแม่นยำมากขึ้น ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการและความจำเป็นของการประเมินคุณภาพเนื้อด้วย เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณยีนคาลปาสเตตินและค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินมีขั้นตอนในการปฏิบัติที่ซับซ้อนและใช้เวลานานซึ่งเหมาะกับงานวิจัยที่ต้องการความละเอียดของผลการทดสอบมากกว่าการใช้งานทั่วไป (routine)

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ใช้เป็นฐานข้อมูลในการวิจัยเรื่องที่เกี่ยวข้องอื่นๆ อาทิเช่น

1. การศึกษาปัจจัยในการควบคุมการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโค
2. การตรวจสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และการประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ในกล้ามเนื้อแต่ละชนิดของโคพื้นเมือง
3. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนคาลปาสเตตินแต่ละไอโซฟอร์มเพื่อยืนยันโครงสร้างของไอโซฟอร์มและลักษณะการเคลื่อนที่ของไอโซฟอร์มนั้นๆบนเจลอะครีลาไมด์
4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตตินรวมทั้งค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อโคพื้นเมือง
5. การสกัดโปรตีนคาลปาสเตตินบริสุทธิ์จากอวัยวะของโคพื้นเมืองเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการแพทย์สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าโคพื้นเมืองและลดการนำเข้ายารักษาโรคจากต่างประเทศได้

ผลงานจากโครงการวิจัย

1. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - 1) ชื่อเรื่อง: Association of Shear Force, Relative Expression of Calpastatin Gene and Calpastatin Activity in Longissimus Muscle of Thai Native and Crossbred Cattle.
ผู้แต่ง: K. Jirajoenrat, C. Archawakom, O. Pimsomdaeng, Y. Opatpatanakit and J. Sethakul
วารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Meat Science
 - 2) ชื่อเรื่อง: Relative Gene Quantitation and Protein Expression of Calpastatin in Organs and Skeleton Muscles of Thai Native Cattle.
ผู้แต่ง: K. Jirajoenrat, T. Kemanipitpon, O. Pimsomdaeng, Y. Opatpatanakit and J. Sethakul
วารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Animal

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ: การพัฒนาผู้ช่วยนักวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจำนวน 3 คน

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- 1) ชื่อเรื่อง: Calpastatin Gene Study in Thai Native Cattle (*B. indicus*) and Kampaengsaen Cattle (*B. indicus* x *B. taurus*)

ผู้แต่ง: Jirajaroenrat K., Opatpatanakit Y., Sethakul J.

ชื่อการประชุม: การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ในปี พ.ศ. 2550

- 2) ชื่อเรื่อง: Calpastatin Expression in Different Muscles of Thai Native Cattle

ผู้แต่ง: Jirajaroenrat K., Opatpatanakit Y., Sethakul J.

ชื่อการประชุม: การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ในปี พ.ศ. 2551