ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246890

MRG4980046 ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

รายงานฉบับสมบูรณ์

การศึกษายีนและการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมืองไทย

โดย ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ และคณะ

ธันวาคม 2553

600251498
246890
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246890

สัญญาเลขที่ MRG4980046

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษายีนและการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมืองไทย

ผู้วิจัย	สังกัด
ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์	สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
รศ.ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล	สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สนับสนุนงานโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย รศ.ดร. ญาณิณ โอภาสพัฒนกิจ ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย และ รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักศึกษาทุกท่านที่ได้ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อองค์กร หน่วยงาน นักวิชาการ และผู้ที่สนใจในการนำผลจากการวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2553

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980046

ชื่อโครงการ: การศึกษายีนและการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมืองไทย

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail address: kjkanya@kmitl.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 24 เดือน

246890

คาลปาสเตตินเป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนทั้ง μ- และ m-calpain งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมืองไทย นอกจากนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนและกิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองเทียบกับโคพื้นเมืองลูกผสมกำแพงแสน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนคาล. ปาสเตตินด้วยเทคนิคปฏิกิริยาย้อนกลับ (RT-PCR) พบว่ายีนคาลปาสเตตินที่แยกได้จากโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนมีความเหมือนกับในโคสายพันธุ์ชาโรเลส์ 98-99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งครอบคลุมบริเวณบางส่วนของโดเมนที่ III และโดเมนที่ IV การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมืองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในสภาพจริง (Realtime PCR) โดยใช้ยีนเบต้าแอคตินเป็นยีนควบคุม พบว่าการแสดงออกของยีนในกล้ามเนื้อชนิด Longissimus dorsi (LD), Longissimus troracis (LT), Transversus abdominis (TA) และ Semitendinosus (ST) มีปริมาณใกล้เคียงกัน กล้ามเนื้อชนิด Rectus abdominis (RA) มีการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินมากที่สุดเป็น 2 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่กล้ามเนื้อ Semimembranosus (SM) พบการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินน้อยที่สุดเพียง 1/3 เท่าของกล้ามเนื้อ LD เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ พบว่าปริมาณการแสดงออกของยีนในลำไส้และหัวใจมีค่าเป็น 0.17 เท่าของกล้ามเนื้อ LD การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอัณฑะ ไต และ ม้าม มีปริมาณใกล้เคียงกัน ขณะที่ในสมองและตับมีการแสดงออกของยีนเพียงเล็กน้อย การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในตัวอย่างกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองหลังการฆ่าภายใน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-DomIV สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa และ 70 kDa มีการแสดงออกในปริมาณมากในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ในกล้ามเนื้อยังตรวจพบแถบโปรตีนบางๆที่ขนาดโมเลกุล 170, 110, 90, 60, 45 และ 40 kDa อีกด้วย โดยพบว่าการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อ RA และ ST มีปริมาณสูง ขณะที่กล้ามเนื้อ TA, LT และ LD มีปริมาณใกล้เคียงกัน และกล้ามเนื้อ SM พบโปรตีนคาลปาสเตตินในปริมาณน้อย ในเนื้อเยื่อของอวัยวะของโคพื้นเมืองพบว่าการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในหัวใจ ไต ม้าม สมองและตับ แต่ไม่สามารถตรวจ

246890

พบโปรตีนในอัณฑะและลำไส้ โดยไอโซฟอร์ม 125-145 kDa มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ทำการตรวจสอบ เมื่อเปรียบเทียบค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีค่ามากกว่าโคกำแพงแสนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในโคทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ Pearson Correlation พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคมีความสัมพันธ์ในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบว่ายีนคาลปาสเตตินในโคเป็นยีนที่มีความอนุรักษ์สูง การแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตตินขึ้นอยู่กับชนิดของกล้ามเนื้อและอวัยวะของโค นอกจากนี้การแสดงออกของยีนและโปรตีนรวมทั้งการทำงานของโปรตีนในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คาลเปนมีอิทธิพลต่อความนุ่มของกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมากกว่าโคกำแพงแสน การประเมินความนุ่มของเนื้อโคด้วยปริมาณยีนคาลปาสเตตินและค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะช่วยให้การประเมินความนุ่มของเนื้อมีความแม่นยำมากขึ้น งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองเพื่อการบริโภคและยังสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ได้ ทั้งนี้จะเพื่อช่วยเพิ่มมูลค่าทางเศรษกิจและคุณค่าของโคพื้นเมืองของไทยได้อย่างยั่งยืนต่อไป

คำหลัก: คาลปาสเตติน, โคพื้นเมืองไทย, *Bos indicus*, การแสดงออก, ความนุ่มของเนื้อ

Abstract

Project Code: MRG4980046

Project Title: Study of Calpastatin Gene and Its Expression in Thai Native Cows

Investigator: Assistant Professor Dr. Kanya Jirajaroenrat

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

E-mail address: kjkanya@kmitl.ac.th

Project Period: 24 months

246890

Calpastatin (CAST) is a specific protein inhibitor of the calcium dependent proteinases μ- and m- calpains. This research was performed to study the expression of CAST gene and protein in muscles and organs of Thai native cattle. Moreover, the relationship between shear force, gene expression and CAST activity in longissimus muscle of the native cattle was also studied, and compared with a native crossbred, Kampaengsaen. The CAST gene analysis was performed by RT-PCR. The results showed that the CAST gene isolated from both Thai native and Kampaengsaen crossbred was 98-99% similar to that of the Charolais breed. The isolated fragment covered domain III and IV of the full-length gene. Relative CAST gene expression was determined in muscles and organs of the native cattle by realtime PCR using the beta-actin gene as an internal control. The results found that the CAST expression in muscles: Longissimus dorsi (LD), Longissimus troracis (LT), Transversus abdominis (TA) and Semitendinosus (ST) were approximately similar. The gene expression in Rectus abdominis (RA) muscle was twice as high as the LD whereas that in Semimembranosus (SM) muscle was 1/3 of the LD. Among the organs, the CAST gene expression in intestine and heart was 0.17-times that of LD muscle. The expression values in testis, kidney and spleen were smaller and similar between each other, while expression in brain and liver was very limited. Expression of CAST protein in muscles of native cattle was investigated by Western blot analysis using an Anti-DomIV. The protein bands corresponding to 145 and 70 kDa were found in all samples. Moreover, trace amounts of protein bands corresponding to 170, 110, 90, 60, 45 and 40 kDa were also detected. The CAST expression in RA and ST muscles was high. The expression of TA, LT and LD muscles were in small and similar amounts while that of SM was low. In tissue organs of native cattle, the CAST protein was found in heart, kidney, spleen, brain and liver, however, not detected in testis and intestine. The isoforms of 125-

246890

145 kDa were expressed in the tissue samples. When comparing the analysis results in the LD muscles of the native and the Kampaengsaen cows, the Warner-Bratzler shear force (WBS) and the relative CAST gene expression of the native cow were significantly higher than in the Kampaengsaen cow ($p<0.05$). However, the CAST activities in both cows were not significantly different. The WBS, the relative CAST gene expression and the CAST activity of the LD muscles in both cows were positively correlated with p-value <0.05.

This research suggested that the bovine CAST gene was highly conserved. The expressions of gene and protein depended on the type of muscles and organs. Furthermore, both gene expression and CAST activity in inhibiting the calpain enzyme had a clear effect on tenderness of the LD muscle in the Thai native cow, and to some extent also in the Kampaengsaen cow. Incorporation of gene expression and protein activity to the WBS analysis will increase the precision of the beef tenderness evaluation. The results of this research serve as fundamental information for further development of the Thai native beef quality. Moreover, it could be also applied in the medical field. This will increase both economical value and appreciation of the Thai native cattle in long term.

Keywords: Calpastatin, Thai native cattle, *Bos indi*cus, Expression, Tenderness

สรุปย่อโครงการ

Executive summary

1. ชื่อโครงการ: การศึกษายีนและการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมืองไทย
Study of Calpastatin Gene and Its Expression in Thai Native Cows

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ:

ชื่อ-สกุล	ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์
	Dr. Kanya JIRAJAROENRAT
ตำแหน่งวิชาการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง
	คณะเทคโนโลยีการเกษตร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
	ถ. ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์	02-329-8519
โทรศัพท์มือถือ	089-751-4162
โทรสาร	02-329-8519
E-mail	kjkanya@kmitl.ac.th

3. ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา:

ชื่อ-สกุล	ดร. จุฑารัตน์ เศรษฐกุล
	Dr. Jutarat Sethakul
ตำแหน่งวิชาการ	รองศาสตราจารย์
หน่วยงานที่สังกัด	สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง
	คณะเทคโนโลยีการเกษตร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
	ถ. ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
โทรศัพท์	02-329-8519
E-mail	ksejutar@kmitl.ac.th

4. งบประมาณทั้งโครงการ 480,000 บาท

5. ระยะเวลาดำเนินงาน 24 เดือน

6. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โคพื้นเมืองไทย (Thai native cattle) จัดอยู่ในกลุ่มโคเมืองร้อนหรือโคอินเดีย เป็นโคตระกูล *Bos indicus* เช่นเดียวกับโคบราห์มัน (Brahman) เดิมเกษตรกรไทยเลี้ยงไว้ใช้แรงงาน มีความแข็งแรง คล่องแคล่วว่องไว มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง เลี้ยงลูกเก่ง ให้ลูกดก ทนโรคและแมลงต่างๆ รวมทั้งทนทานต่อสภาพอากาศร้อนของประเทศไทยได้ดี โคพื้นเมืองไทยไม่ทราบที่มาชัดเจนพบมีการเลี้ยงกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย โคพื้นเมืองไทยแบ่งได้เป็น 4 สายพันธุ์ ตามลักษณะรูปร่างภายนอก ภูมิภาคและวัตถุประสงค์การเลี้ยง ได้แก่ โคสายภาคเหนือหรือโคขาวลำพูน โคสายภาคอีสาน โคสายภาคกลางหรือโคลาน และโคสายภาคใต้หรือโคชน

ในปี 2553 ประเทศไทยมีการเลี้ยงโคเนื้อมากที่สุดจำนวน 4,610,395 ตัว ส่วนใหญ่เป็นโคพันธุ์พื้นเมืองที่ผลิตขึ้นเองในประเทศไทย แต่คุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองมีความเหนียว ไขมันแทรกต่ำและราคาถูก ไม่เป็นที่นิยมต่อผู้บริโภคระดับบน ส่งขายได้เพียงตลาดชั้นกลางและตลาดชั้นล่างซึ่งเป็นตลาดสด ร้านอาหารทั่วไปและตลาดลูกชิ้นที่ไม่เน้นคุณภาพของเนื้อแต่จะเน้นที่ราคาถูกมากกว่า ในปัจจุบันได้มีการการส่งเสริมของรัฐบาลเพื่อพัฒนาการผลิตเนื้อโคเพื่อบริโภค โดยมีการมุ่งเน้นการนำเข้าโคสายพันธุ์ต่างประเทศเพื่อให้ได้ผลผลิตเนื้อคุณภาพดี หรือการผสมกับโคพื้นเมืองเพื่อให้ได้ลูกผสมที่ทนต่อสภาพอากาศของประเทศไทย ทำให้โคไทยพื้นเมืองไม่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์เท่าที่ควร

ปัจจัยสำคัญที่จะบ่งบอกคุณภาพของเนื้อโคซึ่งผู้บริโภคให้ความสำคัญอย่างมากในการเลือกซื้อคือ ความนุ่มของเนื้อ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ เพศ อายุของโค ชนิดเส้นใยกล้ามเนื้อ และระดับไขมันแทรก นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย โดยเฉพาะเอนไซม์ในระบบคาลเปนและคาลปาสเตติน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเอนไซม์คาลเปนเป็นเอนไซม์ที่จะช่วยย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเมื่อมีการปลดปล่อยแคลเซี่ยมภายหลังสัตว์ตาย และโปรตีนคาลปาสเตตินเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปน ในโคที่มีสายเลือด *Bos indicus* พบว่ามีปริมาณคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสูงมาก ซึ่งคาลปาสเตตินสามารถใช้ในการบ่งบอกความนุ่มเหนียวของเนื้อโคระหว่างสายพันธุ์ *Bos indic*us และ *Bos taur*us ได้

นอกจากนี้ยังพบว่า ในทางการแพทย์ ได้มีการทดลองใช้คาลปาสเตตินในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการทำงานที่ผิดปกติของเอนไซม์คาลเปน อาทิ เช่น โรคระบบประสาท โรคหัวใจ โรคกล้ามเนื้อลีบ และโรคต้อกระจก เป็นต้น ซึ่งเนื้อเยื่อของโคพื้นเมืองก็น่าจะเป็นแหล่งของโปรตีนคาลปาสเตตินที่น่าจะนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้

การศึกษาข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่า งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับคาลปาสเตตินส่วนใหญ่เป็นข้อมูลที่ได้มาจากงานวิจัยในโคเมืองหนาวซึ่งเป็นโคในกลุ่ม *Bos taurus* แต่ไม่พบงานวิจัยในระดับโมเลกุลของโคเมืองร้อนสายเลือด *Bos indicus* ซึ่งโคพื้นเมืองไทยนั้นจัดเป็นโคในตระกูล *Bos indicus* การแสดงออกของยีนและการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินอาจจะแตกต่างจากโคในกลุ่ม *Bos taurus* จึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาและเข้าใจการทำงานของคาลปาสเตตินอย่างลึกซึ้งใน

ระดับโมเลกุล งานวิจัยนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างองค์ความรู้ใหม่จากโคพื้นเมืองไทยอย่างจริงจัง โดยผลงานวิจัยจะสามารถนำไปศึกษาต่อถึงปัจจัยต่าง ๆที่ควบคุมการแสดงออกของคาลปาสเตติน ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนกับการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตติน การนำส่วนของโปรตีนที่ได้สร้างชุดตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินเพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพเนื้อที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้จะได้มีการศึกษาต่อถึงปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อลดการทำงานของคาลปาสเตตินซึ่งจะทำให้เกิดพัฒนาการเลี้ยงโคที่ให้คุณภาพของเนื้อที่ดีขึ้น ยังส่งผลทำให้โคพื้นเมืองไทยได้รับความสนใจต่อการวิจัยมากขึ้นและจะทำให้กระตุ้นการพัฒนาสายพันธุ์และการจัดการโคพื้นเมืองของประเทศไทยได้อย่างยั่งยืนต่อไป

7. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อศึกษาลำดับรหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมืองไทย
2) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมืองไทย
3) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ การแสดงออกของยีนและการทำงานของโปรตีนของคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองไทย

8. ระเบียบวิธีวิจัย

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อลายชนิด *Rectus abdominis, Semitendinosus, Semimembranosus, Transversus abdominis, Longissimus troracis* และ *Longissimus dorsi* และอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ตับ ไต ม้าม ลำไส้ และ อัณฑะ จากโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน

สกัด RNA โดยใช้น้ำยา Trizol และจำแนกยีนคาลปาสเตตินด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล Genbank

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ เปรียบเทียบความเหมือนของยีนคาลปาสเตตินที่แยกได้ทั้งในระดับนิวคลิโอไทด์และระดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ClustalW

วิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะส่วนต่าง ๆโคพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ในสภาพจริง (Realtime-PCR)

วิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน

สกัดโปรตีนคาลปาสเตติน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนด้วยสถิติ T-test

วิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนด้วยสถิติ Pearson Correlation

9. ผลการวิจัย

ชิ้นส่วนยีนคาลปาสเตตินที่จำแนกได้จากโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนมีความเหมือนกับยีนคาลปาสเตตินในโคสายพันธุ์ซาโรเลส์ 98-99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งครอบคลุมบริเวณปลาย 3' ของเส้น mRNA ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นบางส่วนของโดเมนที่ III และโดเมนที่ IV

การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมืองด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในสภาพจริง (Realtime PCR) โดยใช้ยีนเบต้าแอคตินเป็นยีนควบคุม พบว่าการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อชนิด Longissimus dorsi (LD), Longissimus troracis (LT), Transversus abdominis (TA) และ Semitendinosus (ST) มีปริมาณใกล้เคียงกัน กล้ามเนื้อชนิด Rectus abdominis (RA) มีการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินมากที่สุดเป็น 2 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่กล้ามเนื้อ Semimembranosus (SM) พบการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินน้อยที่สุดเพียง 1/3 เท่าของกล้ามเนื้อ LD เท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ พบว่า ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในลำไส้และหัวใจมีค่าเป็น 0.17 เท่าของกล้ามเนื้อ LD การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอัณฑะ ไต และ ม้าม มีปริมาณใกล้เคียงกันมีค่าเป็น 0.03-0.04 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในสมองและตับมีค่าเพียง 0.002 และ 0.007 เท่าของปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อ LD เท่านั้น

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อลายของโคพื้นเมืองไทย โดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อหลังการฆ่าภายใน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดี้ Anti-DomIV พบว่า สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa และ 70 kDa มีการแสดงออกในปริมาณมากในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ในกล้ามเนื้อยังตรวจพบแถบโปรตีนที่มีความเข้มเล็กน้อยที่ขนาดโมเลกุล 170, 110, 90, 60, 45 และ 40 kDa ในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในแต่ละกล้ามเนื้อที่ทำการทดสอบ พบว่า การแสดงของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อลายชนิด RA และ ST ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มมาก ขณะที่กล้ามเนื้อลายชนิด TA, LT และ LD ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มรองลงมา และกล้ามเนื้อชนิด SM พบโปรตีนคาลปาสเตตินในปริมาณน้อย

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของโคพื้นเมือง ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-DomIV พบว่า ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหัวใจพบไอโซฟอร์มขนาด 145, 135, 125 และ 95 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 135 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุด ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากไตพบไอโซฟอร์มเพียง 2 ขนาด คือ 125 และ 145 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าไอโซฟอร์มขนาด 125 kDa ประมาณ 2 เท่า ในเนื้อเยื่อจากม้ามพบไอโซฟอร์ม 2 ขนาด คือ 125 และ 135 kDa ในปริมาณการ

แสดงออกที่เท่าๆกัน ขณะที่ในเนื้อเยื่อจากสมองและตับ สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa เพียงขนาดเดียว โดยมีปริมาณการแสดงออกเพียงเล็กน้อย โดยไอโซฟอร์มขนาด 95-135 kDa มีการเคลื่อนที่สอดคล้องกับคาลปาสเตติน type III และ 145 kDa มีการเคลื่อนที่สอดคล้องกับคาลปาสเตติน type II อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ตรวจไม่พบโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อจากอัณฑะและลำไส้

เมื่อเปรียบเทียบค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีค่ามากกว่าโคกำแพงแสนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในโคทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ในตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองโดยใช้ Pearson Correlation พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ขณะที่ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสน ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสนมีความสัมพันธ์ในทางบวกทั้งสามค่า โดยค่าแรงตัดผ่านเนื้อและและค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

10. สรุปผล

การวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบว่ายีนคาลปาสเตตินในโคเป็นยีนที่มีความอนุรักษ์สูง การแสดงออกของยีนและโปรตีนคาลปาสเตตินขึ้นอยู่กับชนิดของกล้ามเนื้อและอวัยวะของโค การแสดงออกของยีนและโปรตีนรวมทั้งการทำงานของโปรตีนในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คาลเปนมีอิทธิพลต่อความนุ่มของกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมากกว่าโคกำแพงแสน การประเมินความนุ่มของเนื้อโคด้วยปริมาณยีนคาลปาสเตตินและค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะช่วยให้การประเมินความนุ่มของเนื้อมีความแม่นยำมากขึ้น

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาคุณภาพเนื้อโคพื้นเมืองเพื่อการบริโภคและยังสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ได้ ทั้งนี้จะเพื่อช่วยเพิ่มมูลค่าและคุณค่าของโคพื้นเมืองของไทยได้อย่างยั่งยืนต่อไป

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สรุปย่อโครงการ	VI
สารบัญ	XI
สารบัญตาราง	XIV
สารบัญภาพ	XV
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ปัญหาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 สถานที่ทำการวิจัย	3
1.5 ระยะเวลาทำการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของโคพื้นเมืองไทย	4
2.1.1 การจำแนกโคทางสัตววิทยา	4
2.1.2 ที่มาของโคพื้นเมืองไทย	4
2.1.3 การจำแนกประเภทโคพื้นเมืองไทยทางวิทยาศาสตร์	5
2.1.4 รูปร่างลักษณะของโคพื้นเมืองไทย	6
2.2 คุณสมบัติและการแสดงออกของคาลปาสเตติน	8
2.2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมี	9
2.2.2 โครงสร้างจีโนมของยีน	9
2.2.3 การแสดงออกของยีน	9
2.2.4 โครงสร้างของโปรตีน	12
2.2.5 การแสดงออกของโปรตีน	12
2.2.6 การแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อสัตว์	14
2.2.7 การทำงานของเอนไซม์	14
2.3 ความสำคัญของคาลปาสเตติน	15
2.3.1 ด้านคุณภาพเนื้อ	15
2.3.2 ด้านการแพทย์	16

สารบัญ

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 19

3.1 กลุ่มประชากรโคที่ศึกษา 19

3.2 การเก็บตัวอย่าง 19

3.3 การวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ 20

3.4 การจำแนกและวิเคราะห์รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตติน 20

3.4.1 การออกแบบไพรเมอร์ 20

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ 21

3.4.3 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบย้อนกลับ 22

3.4.4 การแยกดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลด้วยกระแสไฟฟ้า 22

3.4.5 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส 23

3.4.6 การโคลนยีนในพลาสมิดเวกเตอร์ 23

3.4.6.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียคอมพิเทนต์ 23

3.4.6.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ 24

3.4.6.3 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพิเทนต์ 24

3.4.6.4 การคัดเลือกโคลนโดยเทคนิค blue/white screening 25

3.4.6.5 การสกัดพลาสมิดลูกผสม 25

3.4.6.6 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 26

3.4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 26

3.4.8 การวิเคราะห์ข้อมูลรหัสพันธุกรรม 26

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตติน 26

3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตติน 28

3.6.1 การสกัดโปรตีน 28

3.6.2 การวัดความเข้มข้นโปรตีน 28

3.6.3 การแยกโปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้า 28

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot analysis 30

3.7 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของคาลปาสเตติน 30

3.7.1 การสกัดโปรตีน 30

3.7.2 การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ 31

3.7.3 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของโปรตีน 31

3.8 สถิติที่ใช้ในการวิจัย 32

บทที่ 4 ผลการวิจัย 34

4.1 การเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อของโค 34

สารบัญ

หน้า

4.1.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน 34
4.2 รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตตินในโค 36
4.3 การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโค 36
4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณยีน 36
4.3.2 การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง 38
4.3.3 การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง 40
4.4 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในโค 42
4.4.1 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อโคพื้นเมือง 42
4.4.2 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง 42
4.4.3 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคกำแพงแสน 44
4.5 ความสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโค 45
4.5.1 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ 45
4.5.2 ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตติน 46
4.5.3 ค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตติน 46
4.5.4 ค่าสหสัมพันธ์ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมือง 48
4.5.5 ค่าสหสัมพันธ์ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสน 49
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ 50
5.1 รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตติน 50
5.2 ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตติน 50
5.3 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตติน 51
5.4 อิทธิพลของสายเลือดโคต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ การแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานโปรตีนคาลปาสเตติน 53
5.5 ความสัมพันธ์ของความนุ่มของเนื้อต่อการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานโปรตีนคาลปาสเตติน 53
ข้อเสนอแนะ 54
ผลงานจากโครงการวิจัย 54
บรรณานุกรม 56
ภาคผนวก 64
ภาคผนวก ก ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนคาลปาสเตติน 65
ภาคผนวก ข ข้อมูลและผลการวิเคราะห์ทางสถิติ 72
ภาคผนวก ค ผลงานวิจัยที่เผยแพร่ 81

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	น้ำหนักโมเลกุลและตำแหน่งการเคลื่อนที่บนเจลโพลิอะคริลาไมด์ของคาลปาสเตตินแต่ละไอโซฟอร์ม	13
3.1	การเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับการแยกเอนไซม์คาลปาสเตตินด้วยเทคนิค SDS-PAGE	29
3.2	การเตรียมปฏิกิริยาเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตติน	31
4.1	ค่าแรงตัดผ่านกล้ามเนื้อสันนอกของโค	46
4.2	ปริมาณการแสดงออกของยีนในกล้ามเนื้อสันนอกของโค	46
4.3	ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโค	48
4.4	ค่าสหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองไทย	48
4.5	ค่าสหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสน	49

ตารางภาคผนวกที่		
ข1	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน	72
ข2	ผลการประเมินประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินโดยเทคนิค Realtime PCR	73
ข3	ค่าเฉลี่ยปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง	74
ข4	ค่าเฉลี่ยปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง	74
ข5	ค่า $E^{\Delta CP(actin-cast)}$ ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน	75
ข6	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel™	76
ข7	ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมือง	77
ข8	ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสน	78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โคพื้นเมืองภาคเหนือหรือโคขาวลำพูนเพศผู้และเพศเมีย	7
2.2	โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพศผู้และเพศเมีย	7
2.3	โคพื้นเมืองภาคกลางหรือโคลานเพศผู้และเพศเมีย	8
2.4	โคพื้นเมืองภาคใต้หรือโคชนเพศผู้และเพศเมีย	8
2.5	โครงสร้างของทรานสคริปท์ของยีนคาลปาสเตติน type I, II, III และ type IV	10
2.6	ทรานสคริปท์ของยีนคาลปาสเตตินในสมองของหนู	11
2.7	โครงสร้างของยีนคาลปาสเตตินในโค	12
2.8	โครงสร้างของโปรตีนคาลปาสเตติน	12
3.1	ตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์บนยีนคาลปาสเตติน	21
3.2	แผนที่ยีนของเวคเตอร์ pTZ57R/T	24
4.1	ผลการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินในโคพื้นเมือง	35
4.2	ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลายและอวัยวะของโคพื้นเมือง	35
4.3	กราฟแสดงผลการวัดค่าการเรืองแสงระหว่างรอบของการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน	37
4.4	กราฟระหว่างค่า cycle threshold (CT) และ ค่า log quantity ของการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน	37
4.5	ผลการวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิตพีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน	38
4.6	ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง	39
4.7	ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง	41
4.8	เจล SDS-PAGE และ Western blot ของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง	43
4.9	Western blot ของโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่ออวัยวะของโคพื้นเมือง	44
4.10	Western blot ของโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่ออวัยวะของโคกำแพงแสน	45
4.11	กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel™	47