วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 41(1): 82-90

การพัฒนาปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสนิปส์ (SNP) ของยีน Thyroglobulin (*TG5*) ในโคลูกผสมวากิว

Development of Tetra Primer Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction (ARMS - PCR) for the Detection of Thyroglobulin (*TG5*) SNP in Cross Breed Wagyu

กิตรติ นาคเกตุ[1] นัทธีวรรณ อุดมศิลป์[2] สุจิตรา คำผาง[1] และมารินา เกตุทัต-คาร์นส์[1*]

Kitrati Nakket[1], Natteewan Udomsil[2], Sujittra Khampang[1] and Mariena Ketudat-Cairns[1*]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

[2]สาขาเทคโนโลยีการอาหาร สำนักวิชาสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยมหิดล (วิทยาเขตกาญจนบุรี) กาญจนบุรี 71150

[1]School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

[2]Division of Food Technology, School of Interdisciplinary Studies, Mahidol University, Kanchanaburi, Thailand 71150

*Corresponding author: ketudat@sut.ac.th

Received: *March 03, 2023*
Revised: *September 12, 2023*
Accepted: *November 01, 2023*

Abstract

Amplification refractory mutation system PCR (ARMS–PCR) was designed to detect single nucleotide polymorphism (SNP) in cross breed Wagyu thyroglobulin (*TG5*) gene. The C422T SNP has been shown to be related to marbling phenotype. Other detection methods including PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing have high sensitivity. However, it is relatively time-consuming, and high cost compared to ARMS-PCR. Therefore ARMS-PCR technique was developed to reduce time and cost for SNPs detection. Genomic DNA extracted from follicles hair was used as templates for PCR amplification. Three different genotypes were observed. The samples with PCR products of 400 bp and 199 bp indicated homozygous (T/T), those with 400 bp and 275 bp products indicated homozygous (C/C) and the ones with three products of 400 bp, 275 bp and 199 bp were heterozygous (C/T). The SNP detection by ARMS-PCR was compared with the conventional method of PCR-RELP. The results were found to be consistent. This work showed that the ARMS-PCR can be successfully applied to the detection of *TG5* C422T SNP in cattle. The ARMS-PCR method is more economical, easy to perform, and precise genotyping can be observed. Results from this study suggest

that ARMS-PCR procedure is a useful technique for SNPs genotyping. ARMS-PCR to detect SNPs of other meat quality associated gene will be further developed.

Keywords: ARMS-PCR, Wagyu crossbreed, marbling, SNP, Thyroglobulin gene (*TG5*)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ Amplification Refractory Mutation System–PCR (ARMS-PCR) เพื่อใช้ในการตรวจหาสนิปส์ (Single nucleotide polymorphism, SNPs) ของยีนไทโรโกลบูลิน (*TG5*) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทป์ C422T ซึ่งเป็นยีนที่มีอิทธิพลต่อลักษณะไขมันแทรกในโควากิว ปัจจุบันการตรวจหา SNPs ของยีนจะต้องใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR–RFLP) หรือวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง มีขั้นตอนที่ซับซ้อนยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูงและใช้ระยะเวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ARMS–PCR คณะผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิค ARMS–PCR มาใช้ในการตรวจ SNPs ของยีน *TG5* โดยนำตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดจากขนหางของโคลูกผสมวากิวมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใช้ในเทคนิค ARMS–PCR สามารถระบุสนิปส์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทป์ C422T ได้ โดยนำผลผลิต PCR มาแยกตามขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส สามารถระบุได้ว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจากโควากิวที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอสองแถบขนาด 400 bp และ 199 bp มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส T/T และตัวอย่างดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 400 และ 275 bp มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส C/C ในขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งสามขนาด 400, 275 และ 199 bp มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส C/T และเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สนิปส์ ด้วยเทคนิค ARMS–PCR กับ วิธีมาตรฐาน PCR–RFLP พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค ARMS–PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสนิปส์ของยีน *TG5* ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐาน ทั้งนี้ ARMS–PCR เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการทำ PCR–RFLP และ DNA sequencing ซึ่งเทคนิค ARMS–PCR สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สนิปส์ของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพเนื้อโคเพื่อเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรในการปรับปรุงพันธุ์ของโคเนื้อต่อไป

คำสำคัญ: ARMS–PCR โคลูกผสมวากิว ไขมันแทรก สนิปส์ (SNP) ยีนไทโรกลอบูลิน (*TG5*)

คำนำ

สนิปส์ หรือ Single nucleotide polymorphisms (SNPs) คือความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งหรือสองตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดความแตกต่างและมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะที่ปรากฏของสิ่งมีชีวิต (Phenotype) (Giardina *et al*., 2007) ปัจจุบันไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ (Intramuscular fat) หรือเนื้อลายหินอ่อน (Marbling) เป็นตัวบ่งชี้ในการกำหนดคุณภาพและราคาของเนื้อโค โดยปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อนั้นถูกควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมด้วยยีนหลายยีน ซึ่งหนึ่งในนั้น คือ ยีนไทโรกลอบูลิน (Thyroglobulin หรือ *TG5*) ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของต่อมไทรอยด์ มีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน (Belew *et al*., 2003) มีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หรือสนิปส์ ที่บริเวณ 5’–untranslated region (5’–UTR) ที่ตำแหน่ง C422T (Shin and Chung, 2007) ของยีน *TG5* มีผลต่อปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ ปัจจุบันการตรวจสนิปส์สามารถทำได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับ

นิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสอาร์เอฟแอลพี (PCR–RFLP) ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ความจำเพาะ แม่นยำสูง แต่มีความซับซ้อน ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้นทุนสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะนำเทคนิค Amplification refractory mutation system–PCR (ARMS–PCR) ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย (Newton *et al*., 1989) มาใช้ในการตรวจสอบ SNPs ของยีน *TG5* ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ C422T โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจง เทคนิค ARMS–PCR นี้ทำให้การตรวจ SNPs ที่พัฒนาขึ้นมีความประหยัด สะดวก รวดเร็ว และยังสามารถใช้ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และเพิ่มศักยภาพในการผลิตโคเนื้อคุณภาพสูงของเกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างขนหาง (รากขน) ของโคลูกผสมวากิวจากฟาร์มของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อโคราชวากิวจำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการตัดขนหาง 30-40 เส้นด้านที่เป็นรากขนให้มีความยาวประมาณ 0.3-0.5 ซม. ใส่ในหลอด 1.5 มล. ต่อการสกัด 1 ตัวอย่าง แล้วเติม Tris–NaCl–Tween buffer 1 มล. ใส่ในหลอดที่มีขนหางเพื่อทำความสะอาดและกำจัดสิ่งปฏิกูลต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างรากขน ที่ล้างสะอาดแล้วมาสกัดสารพันธุกรรม หรือ Genomic DNA (gDNA) ด้วยชุดสกัด DNA GF–1 Blood DNA Extraction (VIVANTIS, Malaysia) โดยปฏิบัติตามคู่มือวิธีการสกัดของชุดสกัด จากนั้นนำ gDNA ที่สกัดได้มาทำการวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) โดยค่าปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรมจะอยู่ที่ 10-100 ng/μl และค่าความบริสุทธิ์ (OD260/280) จะอยู่ที่ 1.80-1.90 จากนั้นนำสารพันธุกรรมเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

การตรวจจีโนไทป์ของยีน *TG5* ด้วยวิธี ARMS–PCR

การตรวจหาสนิปส์ C422T ของยีน *TG5* ด้วยวิธี ARMS–PCR จะใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 เส้น (Table 1) ที่ถูกออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank accession X05380 โดยที่ไพรเมอร์ Forward inner และ Reverse inner นั้นทำให้เกิดความจำเพาะในการตรวจสนิปส์ C422T โดยมีการ Optimize ตำแหน่งที่ -3 จากปลาย 3′ ของไพรเมอร์ และตำแหน่งสุดท้ายของปลาย 3′ ให้เหมาะกับสนิปส์ C422T จากนั้นนำตัวอย่าง gDNA ของโคที่ทราบลักษณะจีโนไทป์ของสนิปส์ C422T (Homozygous T/T, Homozygous C/C และ Heterozygous C/T) มาใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี ARMS–PCR โดยศึกษาหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน Primer annealing นอกจากนี้ยังศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์ Mg^{+2} และ *Taq* DNA polymerase ด้วย เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์แต่ละคู่แล้ว นำไพรเมอร์ทั้ง 4 เส้นรวมกันเพื่อทำปฏิกิริยาแบบ Multiplex PCR และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 2.5% Agarose gel electrophoresis

การตรวจจีโนไทป์ของยีน *TG5* ด้วยวิธี PCR–RFLP

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย Forward outer primer และ Reverse outer primer มาตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*II (VIVANTIS, Malaysia) โดยปฏิกิริยาในการตัดด้วย Enzyme ประกอบด้วย 1X Buffer V2, PCR product ไม่น้อยกว่า 50 ng และ 1.0 unit *Xho*II บ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการตัดด้วย Restriction enzyme ด้วย 3% Agarose gel electrophoresis

Table 1 Sequences of primers used for PCR and ARMS–PCR amplification of *TG5* gene

Primer name	Primer sequences (5'-3')
Forward outer	ATTGCTAGGAGGGAAGGAAGGAGCATGG
Reverse outer	AATCTTGTGGAGGCTGTAGGGGAGCAGA
Forward inner	GGTTTGATCCCTGGGTTGGGAAGGTT
Reverse inner	AGTGGGTAGCCATTCCCTTCTCCAGCGG

Underlines are nucleotide at the position -3 from the 3' ends of both forward inner and revers inner primers designed to make them more specific for each allele.

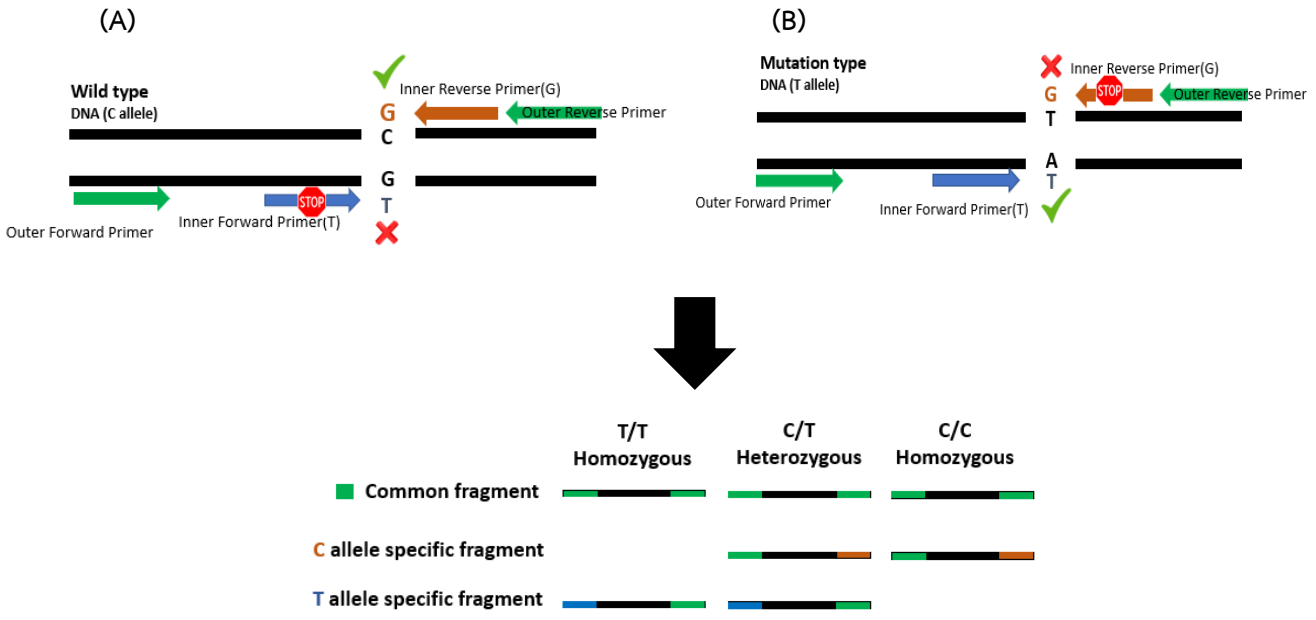

Figure 1 Schematic summary of ARMS–PCR primer design different colors indicate different primers participating in the PCR reaction. Green: outer primers; orange: inner C-allele-specific primer; blue: inner T-allele-specific primer; (A) binding of primers for the wildtype (C allele), (B) binding of primers for the T mutant allele Adaped from Medrano and Oliveira (2014)

ผลการวิจัย

นักวิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ (Tetra-primer ARMS-PCR) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ SNP ของยีน *TG5* ที่ตำแหน่ง 422 ในโควากิวและโคลูกผสมวากิว โดยได้เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR–RFLP) และ ARMS–PCR เพื่อทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของวิธี ARMS–PCR

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการใช้ PCR–RFLP และ ARMS–PCR ของตัวอย่างโควากิวที่ไม่ทราบจีโนไทป์ จำนวน 7 ตัว (Unknown genotype) และตัวอย่างโควากิวที่ทราบจีโนไทป์ (Control known genotype) จำนวน 3 ตัว (Figure 2) พบว่าการใช้วิธี ARMS–PCR ในการวิเคราะห์ SNP ของยีน *TG5* มีความแม่นยำและความจำเพาะไม่แตกต่างจากวิธีดั้งเดิม PCR–RFLP โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 400 bp (Reference band) และ 199 bp (T specific band) สำหรับตัวอย่างที่เป็น T/T จีโนไทป์ และแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp (Reference band) และ 275 bp (C specific band) สำหรับตัวอย่างที่เป็น C/C จีโนไทป์ และดีเอ็นเอแบนขนาด 400 bp (Reference band) 199 bp (T specific band) และ 275 bp (C specific band) สำหรับตัวอย่างที่เป็น C/T จีโนไทป์ ซึ่งจากงานวิจัยของ Barendse (1999) พบว่าโคที่มีเครื่องหมายทางพันธุกรรมของยีน *TG5* เป็น T/T และ C/T จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะไขมันแทรกในกล้ามเนื้อสูงกว่าโคที่มีเครื่องหมายทางพันธุกรรมเป็น C/C อย่างมีนัยสำคัญ

วิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี Tetra–primer ARMS-PCR ที่พัฒนาขึ้นสำหรับในการตรวจยีน *TG5* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพเนื้อที่มีความสำคัญในทางปศุสัตว์เพื่อใช้ในการเป็น Biomarker สำหรับการคัดเลือกพันธุกรรมที่ดีและลักษณะที่พึงประสงค์ของโคเนื้อ ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อออกแบบวิธีการตรวจสอบจีโนไทป์เพื่อศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในโคเนื้อ โดยในอดีตนักวิจัยได้ใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR–RFLP methods) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ (Tetra–primer ARMS–PCR) เพื่อใช้ตรวจสอบ SNP หรือความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ถือว่าเป็นวิธีการสำหรับการตรวจสอบจีโนไทป์ที่ได้ผลรวดเร็วและสะดวกที่สุด เนื่องจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ราคาสูง และยังต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญทางเทคนิคอนูชีววิทยาสูงอีก ส่วนวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะต้องอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ จึงต้องมีจุดตัดของเอนไซม์ในบริเวณที่เกิดสนิปส์หรือบริเวณใกล้เคียงที่เอนไซม์จะใช้เป็นจุดจดจำจึงเกิดข้อจำกัดในการเลือกใช้เอนไซม์และอาจไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งที่ต้องการได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*II ในการตรวจสอบสนิปส์ที่บริเวณ 5'–untranslated region (5'–UTR) ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ C422T โดย Shin and Chung (2007) ได้รายงานว่าตำแหน่งดังกล่าวมีผลต่อปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อของโคเนื้อวากิว แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ซึ่งมีความรวดเร็วในการทดสอบ แม่นยำ และประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสนิปส์ (Dodgson *et al*., 1997) และ Etlik *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์เปรียบเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ Real time PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเทคนิคดังกล่าวให้ความถูกต้องและแม่นยำไม่แตกต่างกัน แต่วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ได้เปรียบในแง่ของประหยัดเวลาและต้นทุนในการวิเคราะห์ อีกทั้งยังสามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

ดังนั้นปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ ARMS–PCR จึงถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อตรวจสอบสนิปส์ในโควากิวและโคลูกผสมวากิวเพราะเป็นวิธีที่ใช้ได้ง่ายและสะดวกกว่าวิธีแบบดั้งเดิม คือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศอีกทั้งการตัดด้วยเอนไซม์จำเป็นต้องบ่ม (Incubation) เอนไซม์กับ DNA ซึ่งใช้เวลานาน 2-3 ชั่วโมง โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโคที่มีจีโนไทป์ทั้ง 3 ชนิด คือ Homozygous T/T และ C/C และ Heterozygous T/C และได้มีการทวนสอบเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Figure 2) พบว่าผลทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกัน 100% แสดงให้เห็นว่าทั้งสองวิธีนี้ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบสี่ไพรเมอร์ (Tetra-primer ARMS–PCR) ที่อธิบายไว้ข้างต้นมีวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำเชื่อถือได้ อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการวิเคราะห์ และยังสามารถใช้สำหรับการศึกษาจีโนไทป์ที่มีจำนวนตัวอย่างน้อยและมากได้อีกด้วย ซึ่งที่ผ่านมางานวิจัยของ Nicol *et al*. (2001) ได้ทำการศึกษา SNPs C422T ของยีน *TG5* ในโคสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าตัวอย่างโคสายพันธุ์วากิวที่ทำการทดสอบมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมเป็น T/T และ C/T ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะไขมันแทรกสูงกว่าโคสายพันธุ์วากิวที่มีเครื่องหมายทางพันธุกรรมเป็น C/C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และงานวิจัยของ Barendse *et al.* (2004) พบว่าโคลูกผสมแองกัสและชอตฮอร์นมีความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพเนื้อไขมันแทรก (Marbling score) กับยีน *TG5* อย่างมีนัยสำคัญ ในอนาคตผู้วิจัยจะทำการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรม T/T, C/T และ C/C ในโคลูกผสมของไทยต่อไป

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Tetra–primer ARMS–PCR ในการตรวจสนิปส์ของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพเนื้อโคเช่น ยีนที่มีอิทธิพลต่อไขมันแทรกในกล้ามเนื้อโค ได้แก่ ยีน Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1*) (Anton *et al*., 2011) ยีน Fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) (Ardicli *et al*., 2017) ยีนที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มเนื้อโค ได้แก่ ยีน Calpastatin (*CAST*) (Schenkel *et al*., 2006) ยีน Calpain (*CAPN*) (Rincon and Medrano 2006) และยีนที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการให้อาหาร (Feed efficiency) ได้แก่ Neuronal Differentiation 1 (*NEUROD 1*) (Oliveira *et al.,* 2016) ยีน Growth hormone receptor (*GHR*) (Al–Husseini *et al*., 2014) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและนักปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเนื้อโคขุนเกรดพรีเมียมต่อไป

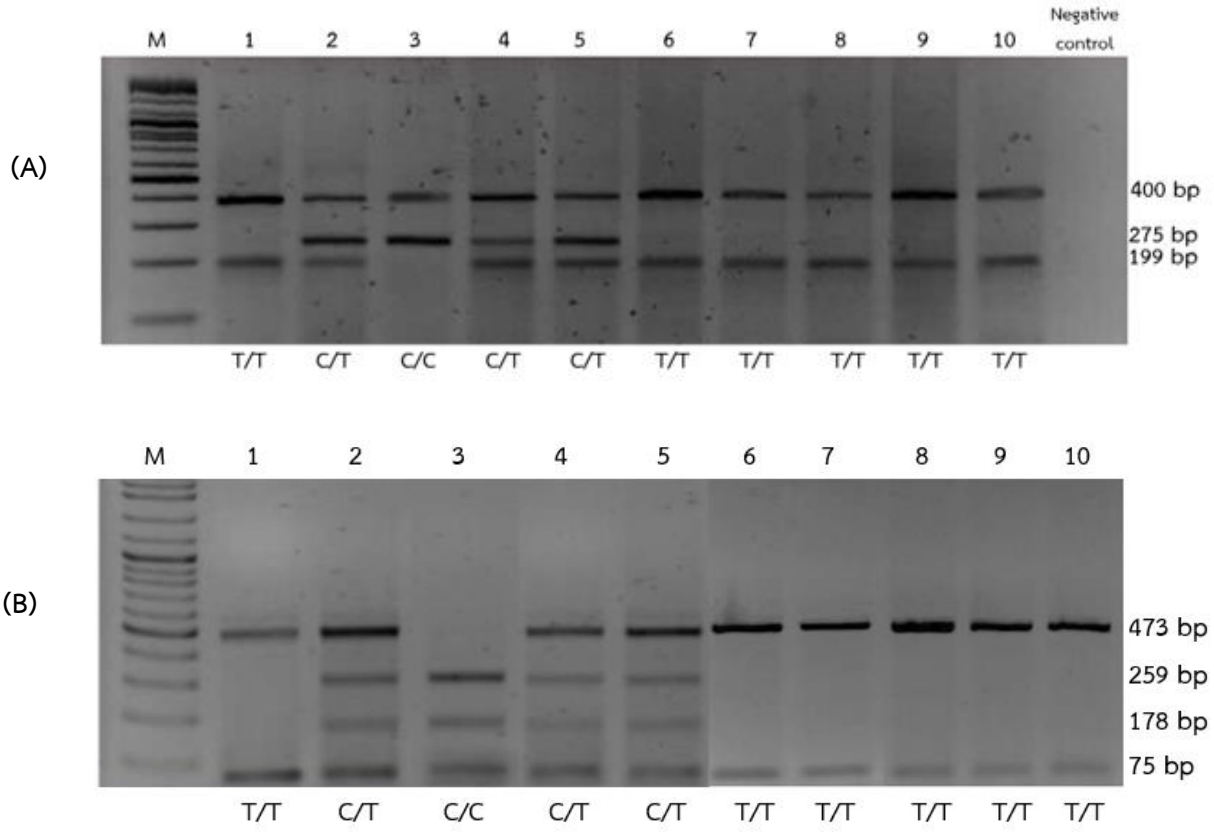

Figure 2: Comparison of the ARMS–PCR and PCR–RFLP methods. (A) Genomic DNA was used for ARMS–PCR method; (B) Estimating genotyping size of PCR–RFLP, for the three SNP genotypes, T/T, C/T and C/C; (C) Genomic DNA was used for PCR–RFLP method M: 100 bp DNA ladder.

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเทคนิค Tetra–primer ARMS–PCR ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ สนิปส์ของยีนไทโรกลอบูลิน (*TG5*) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ไม่แตกต่างจากวิธีดั้งเดิม คือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR–RFLP) ทั้งนี้เทคนิค ARMS–PCR เป็นวิธีที่ง่าย ได้ผลรวดเร็ว ราคาถูก และมีประสิทธิภาพ การพัฒนา ARMS–PCR สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสนิปส์ของยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพเนื้อได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อโคราชวากิว จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างขนหางจากโคลูกผสมวากิว งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ทุนโครงการวิจัยและนวัตกรรม N23A650896 และ OROG จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (กิตรติ นาคเกตุ ผู้รับทุน)

เอกสารอ้างอิง

Al-Husseini, W., C. Gondro, K. Quinn, L.M. Cafe, R.M. Herd, J.P. Gibson, P.L. Greenwood and Y. Chen. 2004. Hormonal growth implants affect feed efficiency expression of residual feed intake-associated genes in beef cattle. **Animal Production Science** 54: 550-556.

Anton, I., K. Kovács, G. Holló, V. Farkas, L. Lehel, Z. Hajda and A. Zsolnai. 2011. Effect of *leptin*, *DGAT1* and *TG* gene polymorphisms on the intramuscular fat of Angus cattle in Hungary. **Genome Research** 135: 300-303.

Ardicli, S., H. Samli, F. Alpay, D. Dincel, B. Soyudal and F. Balci. 2017. Association of single nucleotide polymorphisms in the *FABP4* gene with carcass characteristics and meat quality in Holstein bulls. **Annals of Animal Science** 17: 117-130.

Barendse, W. 1999. **Assessing Lipid Metabolism. International Patent Application PCT/AU98/00882.** International Patent Publication WO 99/23248.

Barendse, W., R.J. Bunch, M.B. Thomas, S.M. Armitage, S. Baud and N. Donaldson. 2004. The *TG5* thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait locus evaluated in feedlot cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 44: 669-674.

Belew, J.B., J.C. Brooks, D.R. McKenna and J.W. Savell. 2003. Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. **Meat Science** 64: 507-512.

Dodgson, J.B., H.H. Cheng and R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. **Poultry Science** 76: 1108-1114.

Etlik, O., V. Koksal, S.T. Arican-Baris and L. Baris. 2011. Development and validation of a cost-effective in-house method, tetra-primer ARMS PCR assay, in genotyping of seven clinically important point mutations. **Molecular and Cellular Probes** 25: 177-181.

Giardina, C.P., L.M. Litton, J.M. Thaxton, S. Cordell, L.J. Hadway and D.R. Sandquist. 2007. Science driven restoration: a candle in a demon haunted world response to cabin. **Restoration Ecology** 15: 171-176.

Medrano, R.F.V. and C.A. de Oliveira. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. **Mol Biotechnol** 56: 599-608.

Newton, C.R., A. Graham, L.E. Heptinstall, S.J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J.C Smith and A.F Markham. 1989. Analysis of any point mutation in DNA, the amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research** 17(7): 2503-2516.

Nicol, D.C, S.M. Armitage, D.J.S Hetzel and G.P Davis. 2001. Genotype frequencies for GeneSTAR MARBLING®–a DNA based diagnostic test for beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 14: 537-540.

Oliveira, de P.S.N., P.C. Tizioto, W. Malago Jr, M.L. do Nascimento, A.S.M. Cesar, W.J.S. Diniz, M.M. de Souza, D.P.D. Lanna, R.R. Tullio, G.B. Mourão, M. de A. Mudadu, L.L. Coutinho and L.C. de A. Regitano. 2016. A single nucleotide polymorphism in *NEUROD1* is associated with production traits in Nelore beef cattle. **Genetics and Molecular Research** 15(2): DOI: 10.4238/gmr.15028161.

Rincón, G and J.F. Medrano. 2006. Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine *CAPN1* gene. **Animal Genetics** 37: 94-295.

Schenkel, F.S., S.P. Miller, Z. Jiang, L. Mandell, X. Ye, H. Li and J. Wilton. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the *calpastatin* gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 84: 291-299.

Shin, S.C. and E.R. Chung. 2007. Association of SNP marker in the thyroglobulin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Science** 2: 172-177.