Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 523-526 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 523-526 (2551)

ผลของการกลายพันธุ์ในยีน *Ryanodine receptor 1 (RYR1)* ต่อการเก็บรักษาเนื้อสุกร

Effect of a Mutation in *Ryanodine receptor 1 (RYR1)* on Postmortem Pork Quality

สุมาลี แท้สูงเนิน[1] สัญชัย จตุรสิทธา[1] นุชา สิมะสาธิตกุล[1] วิชชา สอาดสุด[2,3] และ เกศินี เกตุพยัคฆ์[1,3]

Sumalee Taesoongnern[1], Sanchai Jaturasitha[1], Nucha Simasatitkul[1], Vicha Sardsud[2,3] and Kesinee Gatphayak[1,3]

Abstract

Porcine Stress Syndrome (PSS) is a disorder caused by a mutation of *Ryanodine receptor 1 (RYR1)* gene. Homozygous stress-susceptible pigs (TT) is associated with an increased lean meat content but losses to the meat quality because of the mutation leads to pale, soft and exudative pork (PSE). The aim of this study was to detect a mutation in *RYR1* on meat quality traits in commercial crossbred pigs. PCR-RFLP technique was used for genotyping. The results processed 3 genotypes CC (n=73), CT (n=25) and TT (n=2). Comparison of pH 45 min and pH 24 hr postmortem in *Musculus Longissimus Dorsi* and *Musculus Semimembranosus* showed no significant differences of percentage of drip loss, lightness (L*), redness (a*) and yellowness (b*) after slaughter between animals with the normal and carrier pigs. However, pH 45 min and pH 24 hr postmortem in both muscles of normal and carrier pigs were significantly higher than homozygous stress-susceptible pigs ($P < 0.05$). Percentage of drip loss, L*, a* and b* were significantly lower than homozygous stress-susceptible pigs ($P < 0.05$). However, redness was significantly higher for homozygous stress-susceptible and carrier pigs compared to normal pigs ($P < 0.05$).

Keywords: PSS, *RYR1*, Pork Quality

บทคัดย่อ

ลักษณะทางพันธุกรรมที่ไวต่อความเครียดมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ในยีน *Ryanodine receptor 1 (RYR1)* โดยสุกรที่มีลักษณะไวต่อความเครียด (TT) จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะของเนื้อแดง ที่เพิ่มขึ้น แต่มีผลทำให้เนื้อเกิดลักษณะซีด เหลว และไม่คงรูป จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *RYR1* ต่อคุณภาพเนื้อในสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่า มีจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ CC (n=73), CT (n=25) และ TT (n=2) เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) ภายหลังการฆ่าที่เวลา 45 นาที (pH_1) และ 24 ชั่วโมง (pH_u) ที่อุณหภูมิประมาณ 38 ºC และ 7 ºC ตามลำดับ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา ค่าความสว่าง (L*) ค่าความเป็นสีแดง (a*) และค่าความเป็นสีเหลือง (b*) ของกล้ามเนื้อสันนอกที่อุณหภูมิ 4 ºC 48 ชั่วโมงหลังฆ่า ระหว่างสุกรปกติและสุกรที่เป็นพาหะ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่า pH ของกล้ามเนื้อสุกรทั้งสองกลุ่มสูงกว่าเนื้อสุกรที่มีลักษณะไวต่อความเครียด ($P < 0.05$) และค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา ค่าความสว่าง ค่าความเป็นสีแดง และค่าความเป็นสีเหลืองต่ำกว่า ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามกลุ่มสุกรที่ไวต่อความเครียดและสุกรที่เป็นพาหะจะมีค่าความเป็นสีแดงสูงกว่ากลุ่มสุกรปกติ ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: ลักษณะทางพันธุกรรมที่ไวต่อความเครียด *RYR1*

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[1] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

[2] Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[3] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3] Postharvest Technology Innovation Center, Chiangmai University

คำนำ

Porcine Stress Syndrome (PSS) หรือ Malignant Hyperthermia Syndrome (MHS) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากการกลายพันธุ์จากเบส C เป็น T ในยีน *Ryanodine receptor 1 (RYR1)* ที่มีผลทำให้สุกรมีความไวต่อความเครียด เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือสภาพแวดล้อม เมื่อได้รับความเครียดสุกรมักช็อคตายอย่างฉับพลัน โดยสุกรที่มียีนเครียดมักจะแสดงอาการเมื่อขนส่งระยะทางไกล โดยเกิดการสั่นของกล้ามเนื้อ หายใจแรง ผิวหนังแดงและมีจุดแดงทั่วไป อุณหภูมิของร่างกายสูงขึ้น และอาจสลบหรือตายได้ อย่างไรก็ตามลักษณะสุกรที่มียีนด้อยจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณเนื้อแดง (lean content) ที่เพิ่มขึ้น แต่มีคุณภาพเนื้อต่ำลง คือเกิดลักษณะเนื้อซีด เหลว และไม่คงรูป (pale, soft and exudative; PSE) ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร (Herenda *et al*., 2000) การกลายพันธุ์ในยีน *RYR1* เป็นยีนที่ตั้งอยู่บนออโตโซม (Autosome) ประกอบด้วย 2 อัลลีล (allele) คือ อัลลีลยีนปกติ (N) และอัลลีลยีนกลายพันธุ์ (n) สุกรปกติจะมีจีโนไทป์เป็น NN สุกรที่เป็นโรคจะมีจีโนไทป์เป็น nn ส่วนสุกรที่เป็นพาหะหรือที่มีจีโนไทป์เป็น Nn จะไม่แสดงอาการเครียดง่าย แต่จะมีสมรรถภาพการผลิต เช่น การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร เปอร์เซ็นต์เนื้อแดง และความหนาไขมันสันหลังดีกว่าสุกรที่เป็นปกติ (สุรชัยและคณะ, 2538) การกลายพันธุ์ของยีน *RYR1* ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปจากปกติมีผลให้ Calcium-releasing channel ปิดช้าลงภายหลังการหดตัวของกล้ามเนื้อ จึงทำให้ Ca^{2+} ใน Cytoplasm เพิ่มมากขึ้น ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวหรือเกร็งตัวตลอดเวลา (ศิริลักษณ์และคณะ , 2539) จากรายงานดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาโดยใช้กลุ่มตัวอย่างสุกรในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดใกล้เคียง โดยการทำจีโนไทป์สุกรด้วยเทคนิค PCR-RFLP เพื่อจำแนกพันธุกรรมของสุกรที่ปลอดจากยีนเครียด สุกรที่เป็นพาหะ และสุกรที่เป็นโรคออกจากกัน และเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ คุณภาพเนื้อ และสวัสดิภาพสัตว์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของสุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค) ทั้งหมด 100 ตัว จากนั้นนำไปสกัด DNA ตามวิธีการของ Sambrook *et al*. (1989) และ Miller *et al*. (1988) นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; O.D.) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพด้วย 2% Agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 15 นาที และส่องดูแถบ DNA ใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีน *RYR1* ที่ครอบคลุมตำแหน่งที่เกิดจุดกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Primer forward 5′GTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTG3′และ Primer reverse 5′GCCAGGGAGCAAGTTCTCAGTAAT3′ อุณหภูมิ (Tm) 65.1 °c และจำแนกจีโนไทป์ของสุกรโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP (PCR-Restriction fragment Length polymorphism) โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (*Hin* 6I) กับบริเวณที่เกิดจุดกลายพันธุ์ แล้วแยกชิ้นส่วน DNA โดยใช้ 4% agarose gel electrophoresis ทำการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อ โดยนำตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dosi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) มาวิเคราะห์ตามวิธีของ สัญชัย (2543) ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH value) ค่าสีของเนื้อ และค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity; WHC) ในด้านของค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา (drip loss) จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *RYR1* กับลักษณะคุณภาพเนื้อ และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านคุณภาพเนื้อด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS for windows version 8.2 (SAS, 2001)

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *RYR1* ต่อคุณภาพเนื้อในสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่า มีจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ CC (n=73), CT (n=25) และ TT (n=2) เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) ภายหลังการฆ่าที่เวลา 45 นาที (pH_1) และ 24 ชั่วโมง (pH_u) ที่อุณหภูมิประมาณ 38 ºC และ 7 ºC ตามลำดับ พบว่า กลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT มีค่าสูงกว่าในกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT ($P < 0.05$) ซึ่งกล้ามเนื้อทั้งสองของสุกรที่มีจีโนไทป์ทั้งสามแบบมีแนวโน้มค่า pH_u ลดลง (Table 1) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fisher *et al*. (2000) ทำการศึกษาในสุกรลูกผสมลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ พบว่าค่า pH_1 และ pH_u ในสุกรปกติและกลุ่มที่เป็นพาหะมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ค่า pH ของสุกรทั้ง 2 กลุ่มมีค่าแตกต่างกับกลุ่มสุกรที่มีลักษณะไวต่อความเครียด อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษา ค่าความสว่าง (L*) ค่าความเป็นสีแดง (a*) และค่าความเป็นสีเหลือง (b*) ของกล้ามเนื้อสันนอกที่อุณหภูมิ 4 ºC 48 ชั่วโมงหลังฆ่า ของกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT

มีค่าสูงกว่ากลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่พบว่ากลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT และ CT มีค่าความเป็นสีแดงไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่แตกต่างจากกลุ่มที่มีจีโนไทป์ CC อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Table 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ De Smet *et al*. (1992) ที่พบว่าสุกรที่มีลักษณะไวต่อความเครียดมีค่า L* และ b* แตกต่างจากกลุ่มที่เป็นพาหะอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่มีค่า a* ไม่แตกต่างกัน และการศึกษาของ van Laack *et al*. (1993) ที่พบว่าสุกรปกติและสุกรที่เป็นพาหะมีค่า % drip loss ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า % drip loss กับกลุ่มสุกรที่มีลักษณะไวต่อความเครียดจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

Table 1 A relationship between *RYR1* and meat quality traits in crossbred pigs

Traits	Genotype			R^2
	CC	CT	TT	
pH_{45}				
SM	6.55±0.26[a]	6.48±0.24[a]	5.74±0.08[b]	0.176
LD	6.34±0.23[a]	6.27±0.22[a]	5.60±0.31[b]	0.179
pH_{24}				
SM	5.86±0.12[a]	5.86±0.09[a]	5.58±0.04[b]	0.106
LD	5.76±0.15[a]	5.75±0.11[a]	5.43±0.19[b]	0.101
Drip loss (%)	4.66±2.34[b]	4.01±2.58[b]	22.5±0.40[a]	0.537
L^*	50.59±4.08[b]	49.79±4.77[b]	56.96±0.05[a]	0.052
a^*	8.33±1.58[b]	8.90±1.39[ab]	10.54±0.14[a]	0.060
b^*	5.42±1.75[b]	5.14±1.94[b]	8.68±0.57[a]	0.070
Total (N)	73	25	2	

The values are the mean ± S.D. of number (N) of observations for each trait and genotype

[a,b]Means without the same superscript within a row differ significantly ($P < 0.05$).

pH_{45} – pH 45 min after slaughter; pH_{24} – pH 24 h after slaughter; L^* - lightness; a^* - redness; b^* - yellowness; LD - *Longissimus dorsi*; SM - *Semimembranosus*

สรุป

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน RYR1 กับคุณภาพเนื้อในสุกรสุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค) พบว่ากลุ่มสุกรที่ไวต่อความเครียด (TT) มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH value) เวลา 45 นาที (pH_1) และ 24 ชั่วโมง (pH_u) หลังฆ่า ต่ำกว่ากลุ่มสุกรปกติ (CC) และกลุ่มที่เป็นพาหะ (CT) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) ค่าความสว่างของสีเนื้อ (L*) ค่าสีเหลือง (b*) และค่าสีแดง (a*) สูงกว่ากลุ่มสุกรปกติ (CC) และกลุ่มที่เป็นพาหะ (CT) ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามกลุ่มสุกรที่ไวต่อความเครียด (TT) และกลุ่มสุกรที่เป็นพาหะ (CT) มีค่าสีแดงสูงกว่ากลุ่มสุกรปกติ (CC) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

เอกสารอ้างอิง

ศิริลักษณ์ พรสุขศิริ, K. Wimmers, เพทาย พงษ์เพียจันทร์, ศุภมิตร เมฆฉาย และสุรภี ทองหลอม. 2539. Malignant Hyperthemia Syndrome (MHS) ในสุกร. หน้า 59-63. ใน: การประชุมเชิงปฏิบัติการ Molecular Genetics in Farm Animal Breeding. ภาควิชาสัตวศาสตร์และโครงการจัดตั้งศูนย์บริการวิชาการและเทคโนโลยีเกษตร, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2543. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 244 หน้า.

สุรชัย แซ่ลิ้ม, วรวิทย์ วัชชวัลคุ และเนรมิตร สุขมณี. 2538. การตรวจสอบพันธุกรรมไวความเครียดของสุกรด้วยเทคนิค PCR. สุกรสาส์น 22(6): 11-16.

De Smet, S., H. Pauwels, D. Eeckhout, I. Demeyer, S. Vervaeke, G. De Bie, G. van de Voorde and M. Casteels. 1992. Relationships between halothane sensitivity, carcass quality and meat quality in Belgian slaughter pigs. pp. 259-272. In: E. Puolanne and D.I. Demeyer, (eds.), *Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors*. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, UK.

Fisher, P., F.D. Mellett and L.C. Hoffman. 2000. Halothane genotype and pork quality. 1. Carcass and meat quality characteristics of three halothane genotypes. *Meat Sci*. 54: 97-105.

Herenda, D., P.G. Chambers, A. Ettriqui, P. Seneviratna and T.J.P. da Silva. 2000. Porcine stress syndrome (PSS). Manual on meat inspection for developing countries, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Chapter 4 Specific Diseases of Pigs, Miscellaneous conditions. [Online]. Available: http://www.fao.org/docrep/033/t0756e/.htm#ch 4.4.1 [2007, March 1]

Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 16: 1215.

Sambrook, J., E.F. Frisch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

SAS. 2001. SAS/STAT Software: User's Guide (Release 8.2). SAS Inst. Inc., Cary, NC.

van Laack, R.L.J.M., C. Faustman and J.G. Sebranek. 1993. Pork quality and the expression of stress protein Hsp 70 in swine. *J. Anim. Sci*. 71: 2958-2964.