Thesis Title Detection for Polymorphism in Porcine Vinculin Gene

Author Miss Kasinee Gatphayak

M.S.(Agriculture) Animal Science

Examining Committee Assoc.Prof.Dr. Therdchai Vearasilp Chairman

Asst.Prof.Dr. Nucha Simasatitkul,D.V.M. Member

Assoc.Prof.Dr. Araya Jatisatienr Member

ABSTRACT

Vinculin is a cytoskeletal protein that localizes in the cytoplasmic plaque of microfilament associated of both cell-cell and cell-extracellular matrix adherens-type junctions. It functions as one of several interacting proteins involved in anchoring F-actin to the membrane. Adhesion of cells to the extracellular matrix is a critical step in such diverse biological process as normal cell growth, development, differentiation, and embryological development. In skeletal muscle, vinculin is localized in the myotendinous junctions. The studies about expression of vinculin gene in porcine *M. longissimus dorsi* by DD-RT-PCR method have found that this gene has high differential expression within Berlin-Bonn resource population. In order to use these studies usefully as genetic marker for the trait eye-muscle area, this research study aimed to identify the sequence of porcine vinculin gene and detection for the polymorphism within this gene by the comparision of 5 pig breeds (Hamshire, Duroc,

German Landrace(GL), Pietrain and F2 animal) cDNA sequences. The results of this research indicated that the vinculin gene contained 5,172 base pair (bp) with 3 single nucleotide polymorphisms (NSPs) at position 2,382 (C to A) in Hamshire, 2,457 (A to G) in Hamshire, 4,197 (G to T) in German-Landrace. The comparision of amino acid sequences derived for the sequences revealed that the polymorphism did not affect the amino acid sequence. Searching for the restriction enzyme for RFLP method, it showed that XcmI, BfaI and MboI will be allowed to genotype at position 2,382, 2,457 and 4,197 respectively. The physical mapping by Radiation Hybrid panel showed that porcine vinculin gene were mapped on chromosome 14 in 25 cR and 45 cR distance to microsatellites SW1536 and SW2105 (LOD score 13.89 and 8.92). Therefore, this gene might be evident from neighbouring desirable performance gene that can then be selected using the neighbouring marker. The differential expression might be due to transcription rate or mutation in promotor gene sequence. To apply this NSPs usefully as genetic marker, it should be screened in the resource population which can serve as a valuable model for swine improvement.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาความหลากรูปของจีนวินคูลินในสุกร

ชื่อผู้เขียน นางสาว เกศินี เกตุพยัคฆ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. เทอดชัย	เวียรศิลป์	ประธานกรรมการ
ผศ.สพ.ญ. นุชา	สิมะสาธิตกุล	กรรมการ
รศ.ดร. อารยา	จาติเสถียร	กรรมการ

บทคัดย่อ

จีนวินคูลิน (Vinculin Gene) เป็นจีนที่มีรหัสของการสร้างโปรตีนวินคูลินซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างในไซโตพลาสซึม (cytoskeleton protein)ของเซลล์ โปรตีนวินคูลินเป็นตัวเชื่อมระหว่างเส้นใยแอคติน (F-actin) กับโปรตีนอินทีกริน (Integrin) ซึ่งจะร่วมกันในการควบคุมกิจกรรมของเซลล์ การรวมกันของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cell differentiation) ในระหว่างการพัฒนาของคัพภะ (embryo) โปรตีนวินคูลินพบมากในกล้ามเนื้อในส่วนที่มีการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ (cell-cell adheren type junction) และบริเวณที่เซลล์เชื่อมกับของเหลวภายนอกเซลล์ (cell-extracellular martrix) และเป็นส่วนประกอบของคอสตาเมีย (Costamere) ในเส้นใยกล้ามเนื้อ จากการศึกษาการแสดงออกของจีนในกล้ามเนื้อสัน (*M. longissimus dorsi*) ของสุกรที่มีขนาดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันต่างกันในสุกรพันธุ์เยอรมัน-แลนเดรซ (German Landrace, GL) และ พันธุ์ดูรอค (Duroc) โดยวิธี Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DD-RT-PCR) ซึ่งเป็นการหาการแสดงออกของจีน (gene expression) ในกล้ามเนื้อสันในระดับ mRNA พบการแสดงออกของจีนวินคูลินมีความสัมพันธ์กับขนาดพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (Eye-muscle area) และยีนนี้สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปยังลูกได้สูง มีความแปรปรวนสูงในสัตว์แต่ละตัวทั้งในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์ จึงนำจีนนี้มาตรวจหาความหลากรูปทางพันธุกรรม (polymorphism) โดยวิธีการเปรียบเทียบลำดับเบส (direct sequencing) ของ complementaryDNA (cDNA) ในสุกรพันธุ์ ดูรอค เยอรมัน-แลนเดรซ เพียเทรน (Pietrain) แฮมเชียร์ (Hamshire) และสุกรลูกผสม (F_2 offsprings) ระหว่างแม่สุกรลูกผสมระหว่างพันธุ์ เบอร์ลิน มินิเอเจอร์ (Berlin Miniature) กับดูรอค และพ่อสุกรพันธุ์ เยอรมัน-แลนเรซ พบว่ายีนวินคูลินมีความยาว 5,172 คู่เบส (base pair, bp) มีการเปลี่ยนแปลงของเบส (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 2,382 , 2,457 ในสุกรพันธุ์แฮมเชียร์ และตำแหน่งที่ 4,197 ในสุกรพันธุ์เยอรมัน-แลนเดรซ แต่การเปลี่ยนแปลงของเบสนี้ไม่ทำให้ชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (silent mutation) การศึกษาโดยใช้เทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Lenght Polymorphisms , RFLPs) ใน genomicDNA พบ

ว่า มิวเตชันทั้ง 3 ตำแหน่ง สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ XcmI, BfaI และ MboI ตามลำดับ จึงสามารถใช้เอนไซม์นี้ในการหาจีโนไทป์ (genotype) ของสุกรเพื่อนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) ได้ การศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของจีนวินคูลินของสุกรโดยวิธี Radiation Hybrid Panel (RH-panel) พบว่าจีนวินคูลินตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 14 ซึ่งอยู่ห่างจากไมโครเซตเทลไลท์ (microsatellite) SW1536 และ SW2105 25 cR และ 45 cR ตามลำดับ (LOD score 13.89 และ 8.92) จากการศึกษานี้สามารถนำจีนวินคูลินมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม ของลักษณะปริมาณพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันของสุกรได้ เพราะการแสดงออกของ mRNA ที่แตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากจีนที่อยู่ใกล้เคียงกับจีนวินคูลินซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะพื้นที่หน้าตัดเนื้อสันซึ่งถูกถ่ายทอดไปกับจีนวินคูลิน หรือ ปัจจัยอื่นที่มีผลต่ออัตราการสังเคราะห์ mRNA เช่น การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในโปรโมเตอร์ (promotor) ของจีน ปัจจัยที่มีผลต่อการถอดรหัสจากDNA (transcription factors) และ อัตราการสลายตัวของ mRNA จึงควรมีการนำ SNPs นี้มาศึกษาในประชากรเพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์สุกรต่อไป