

# 雞熱休克蛋白 70 基因點突變檢測技術開發 與基因型分析<sup>(1)</sup>

朱家德<sup>(2)</sup> 賴永裕<sup>(2)</sup> 鄧學極<sup>(3)</sup> 劉宗霖<sup>(4)</sup> 吳明哲<sup>(2)</sup> 張秀鑾<sup>(5)</sup> 林德育<sup>(2)(6)</sup>

收件日期：112 年 9 月 12 日；接受日期：112 年 12 月 20 日

## 摘 要

熱休克蛋白家族 (heat shock proteins, HSPs) 是生物因應熱緊迫狀態的關鍵生物指標。在生物處於熱緊迫或其他壓力環境下，熱休克蛋白 70 (heat shock 70 protein, HSP70) 是維持正常蛋白質結構與減緩組織損傷不可或缺的調控因子。本研究旨針對紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞等臺灣有色肉雞種 *HSP70* 基因 *C667G* 基因型頻率分佈，應用單股結構多態性檢測技術 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 與螢光引子標記之競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應 (kompetitive allele-specific polymerase chain reaction, KASP™) 等 2 種基因型檢測平臺，進行雞隻 *HSP70* 基因點突變多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 基因型鑑定。結果顯示，2 種基因型檢測技術分析 *HSP70* 基因 AA、AB 及 BB 基因型 100% 相符 ( $P < 0.01$ )，驗證此 2 種技術可相互替代應用，而 KASP™ 更可效縮短基因型檢測時間與降低成本費用。商用紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞的 *HSP70* 基因的交替基因 A 頻率分別為 0.40、0.35 及 0.04。未來，可依據臺灣有色肉雞品種 *HSP70* 基因之基因型頻率差異，探討熱緊迫環境下 *HSP70* 基因對臺灣有色肉雞經濟性狀表現之影響。

關鍵詞：雞、熱緊迫、熱休克蛋白基因、競爭性交替基因特異性聚合酶鏈鎖反應。

## 緒 言

熱休克蛋白家族 (heat shock proteins, HSPs) 是從細菌至人類等生物體細胞中普遍存在的重要蛋白質，HSPs 對於保護細胞免受各種壓力的損害至關重要，特別是在高溫等極端環境下，故 HSPs 被認為是生物因應熱緊迫狀態的關鍵生物指標 (Tang *et al.*, 2011; Balakrishnan *et al.*, 2023)。在熱緊迫或其他壓力的環境下，HSPs 具有維持蛋白質結構完整，以及減緩組織損傷的功能角色 (Gething and Sambrook, 1992)。熱休克蛋白 70 (heat shock 70 protein, HSP70) 為 HSPs 家族中重要的成員之一。Liew *et al.* (2003) 在早期飼餵與熱緊迫的試驗條件下，每天 2 小時暴露在  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  和 80% 相對濕度的環境中，紀錄 192 隻公白肉雞 (Cobb) 的 HSP70 蛋白質量對傳染性華氏囊炎 (infectious bursal disease, IB) 抵抗力及生長速率等表現，發現 HSP70 蛋白質量與華氏囊組織病理得分 (Bursal Histological Score) 呈顯著負相關 ( $r = -0.33$ ,  $P = 0.0008$ )，並認為 HSP70 蛋白質量可增強白肉雞對熱緊迫的耐受性與抗病力。Yu *et al.* (2008) 探討在 0、2、3、5 和 10 小時等不同時間長短的熱緊迫，從  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  迅速升高到  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  的環境下，100 隻白肉雞 (Arbor Acres) 心臟組織中 HSP60、HSP70、HSP90 蛋白質和 mRNA 表現量，於受熱緊迫的 2 小時後，HSP60、HSP70 和 HSP90 的蛋白質量與 mRNA 表達量皆顯著上升，並認為此 3 種 HSPs 是高溫環境下雞自體保護蛋白質。Gabriel *et al.* (2002) 針對  $41^\circ\text{C}$  與  $44^\circ\text{C}$  熱緊迫對雞胚胎 *HSP70* mRNA 表現量的關係研究中，結果發現在  $44^\circ\text{C}$  的孵化溫度下，*HSP70* 表達量大幅上升，其 mRNA 表達量是在正常孵化條件下 ( $37.5^\circ\text{C}$ ) 的 15 倍。

林等 (2005) 依據美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 公開雞 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579)，應用聚合酶連鎖反應與單股結構多態性 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 技術，鑑定 *HSP70* 基因的 SNPs 變異，該試驗分析 84 隻來亨雞、48

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2774 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 坤諳生技股份有限公司。

(4) 國立成功大學生物科技與產業科學系。

(5) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(6) 通訊作者，E-mail: lin0429@mail.ttri.gov.tw

隻白肉雞、104 隻紅羽土雞、99 隻畜試土雞近親品系 L7、174 隻近親品系 L9、155 隻近親品系 L11 及 162 隻近親品系 L12，共計 826 隻雞隻 *HSP70* 基因型。結果顯示，來亨雞、白肉雞、紅羽土雞、畜試土雞近親品系 L7、L9、L11 及 L12 的 *HSP70* 基因 A 交替基因頻率分別為 0.03、0.09、0.37、0.93、0.59、0.62 及 0.63。本土雞種畜試土雞近親品系及紅羽土雞的交替基因 *HSP70* A 頻率顯著地高於外國雞種來亨蛋雞及白肉雞基因頻率 ( $P < 0.001$ )。Tamzil *et al.* (2013a) 運用 PCR-SSCP 檢測平臺分析 Ayam Kampong、Arabic 及商用雞種等 3 個雞種的 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579)，結果發現在 Ayam Kampong 的 *HSP70* 基因有七個基因型 (AA、AB、AC、CC、AD、DD 和 BC 基因型)，Arabic 的 *HSP70* 基因有六個基因型 (AA、AB、AC、CC、AD 和 BC 基因型)，商用雞種的 *HSP70* 基因有一個 DD 基因型，進行基因型與性狀間的關聯性分析後，發現雞對熱緊迫的耐熱或抗熱參數與 *HSP70* 基因型有關 (Tamzil *et al.*, 2013b)。

PCR-SSCP 是一種具有操作簡單與成本低廉優勢的單核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 檢測技術，其原理基於 DNA 序列發生 SNP 點位變異、缺失或插入時所造成單股 DNA 有結構上的差異，可在非變性聚丙烯醯胺凝膠電泳過程中產生不同程度的泳動位移，藉此差異作為基因型判定的依據，然基因型檢測時間較長 (6-7 小時) 且易受電泳溫度、電泳緩衝液濃度、凝膠濃度及甘油濃度等外在因素影響 (Konstantinos *et al.*, 2008)。

KASP™ 是由 LGC 公司 (Laboratory of the Government Chemist, LGC, UK) 開發之新一代 SNP 檢測技術，其基本程序是藉由兩股 5' 端各自帶有 FAM/HEX-labelled 標記螢光與 3' 端分別能辨識突變點鹼基之引子和一股反向引子所構成之 primer mix，並利用帶有兩種不同螢光訊號的兩條 quencher 抑制螢光探針 master mix，對 SNP 位點進行 PCR 擴增反應，達到一定程度的 PCR 擴增反應後，再利用 Real-time PCR 吸光值測定相對應 PCR 產物擴增螢光強度，以判定基因型 (Semagn *et al.*, 2013)。此技術具有高通量、低錯誤率、低成本及基因型檢測效率高等優點，被廣泛應用在玉米 (Nair *et al.*, 2015)、小麥 (Rasheed *et al.*, 2016) 與大豆 (Shi *et al.*, 2015) 等作物，以及荷蘭牛 (Zhang *et al.*, 2020)、臺灣有色肉雞 (朱等, 2022a)、臺灣商用豬種 (朱等, 2022b) 與哈薩克馬 (Liu *et al.*, 2020) 等動物的分子標識輔助選拔研究。

本研究旨在運用 KASP™ 基因型檢測技術，建置臺灣有色肉雞熱休克蛋白 70 基因之基因型檢測平臺，以 KASP™ 具備的高準確性與基因型鑑定時程短之優勢，提升種禽分子標識輔助育種效率。

## 材料與方法

本試驗於農業部畜產試驗所遺傳生理組執行試驗動物 *HSP70* 基因型檢測與分析。試驗動物飼養於民間畜牧場，試驗動物之使用、飼養及試驗內容皆依據畜產試驗所實驗動物管理小組批准之文件與試驗準則進行 (IACUC 畜試動字 110-38 號)。

### I. 試驗動物

以民間畜牧場自家育成之第 15 世代紅羽土雞 120 隻、第 4 世代黑羽土雞 120 隻及第 13 世代烏骨雞 120 隻等雞隻為試驗動物，共計 360 隻。

### II. 採血及基因體 DNA 萃取

本研究採集試驗雞隻翼下靜脈採集血液約 0.5 – 1.0 mL，置入含抗凝血劑 EDTA-K<sub>3</sub> (VACUETTE® TUBE, Greiner Bio-One GmbH, Austria) 之採血管中混合後供基因體 DNA (gDNA) 萃取出。以 gDNA 快速萃取套組 (EasyPure Genomic DNA mini Kit, TransGen Biotech, Beijing) 分別萃取試驗雞隻 gDNA 後，經乾燥並加入適量 T.E. 緩衝液 (Tris-EDTA) 溶解，再利用微量分光光譜儀 (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, USA) 測定 gDNA 濃度，將符合品質標準 OD 260/280 ratios 為 1.8 – 2.0 的 gDNA 調整濃度為 100 – 150 ng/μL，供作 PCR 反應之模板 (Semagn *et al.*, 2013)。

### III. *HSP70* 基因之 PCR-SSCP 基因型檢測平臺建置

以林等 (2005) 發表 *HSP70* 基因 PCR-SSCP 基因型檢測平臺之引子序列。以正向引子序列 5'-TTTGTATGCCAAGCGTCTCAT-3' 與反向引子 5'-ATCTCCTCTGGGAAG AAGGT-3' 進行 PCR 反應 (預熱反應 94°C, 5 分鐘後，連續進行 94°C, 40 秒、62°C, 30 秒及 72°C, 30 秒的 35 個循環反應，最後延長反應 72°C, 5 分鐘)。將 PCR 擴增片段以 GenePhor 電泳設備 (GenePhor Electrophoresis Unit from GE Healthcare, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 進行 SSCP 基因型分析。取 5 μL PCR 反應後的產物與 5 μL denaturing buffer 於離心管中，混合均勻置於 95°C, 12 分鐘後立刻置入冰中，使 PCR 反應後的產物變性。取 6 μL 混合液置入 GeneGel Excel 12.5/24 Kit (polyacrylamide gel T: 12.5%, C: 2%) 電泳膠片，以 600V, 25 mA, 15W, 15°C 的條件電泳 120 分鐘。電泳結束後

以 GeneStain Automated Gel Stainer (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 進行染色 30 分鐘，待呈像後判讀基因型。

#### IV. *HSP70* 基因之 KASP™ 基因型檢測平臺建置

依 NCBI 公開雞 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579) 與 Ensembl (<https://www.ensembl.org>) Red Jungle fowl (GRCg6a) 序列資料 (5:53,059,707 - 5:53,060,326) 比對後，設計 KASP™ 基因型檢測引子。A 交替基因 guanine 正向引子 5'- CAGACATGAAGCACTGGCCG-3' 標記 FAM 螢光、B 交替基因 cytosine 正向引子 5'- CAGACATGAAGCACTGGCCC-3' 標記 HEX 螢光及反向引子 5'- TGAGCACCATAGAGCTGATC-3'，並以即時聚合酶鏈鎖反應儀 (Applied Biosystems StepOne™ System, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行 KASP™ 基因型檢測。KASP™ 反應綜合液包括 DNA (50 ~ 100 ng/μL) 1.5 μL、2X master mix (FRET cassettes、ROX™ passive reference dye、Taq 聚合酶及 MgCl<sub>2</sub>) 5 μL、ddH<sub>2</sub>O 3.3 μL 與 assay mix (一個正向 FAM™ 螢光標記引子、一個正向 HEX™ 螢光標記引子、一個反向互補引子，以及 FRET cassettes) 0.2 μL，共計 10 μL。KASP™ 反應依序為 (A) 95°C 預變性 15 分鐘；(B) 10 個循環的 95°C 變性 20 秒與 66 - 60°C 黏合 60 秒，每個循環降低 0.6°C；(C) 26 個循環的 95°C 變性 20 秒與 55°C 黏合 60 秒，並以儀器內建 StepOne Software v2.3 軟體進行基因型判別。

#### V. *HSP70* 基因序列定序

依 NCBI 公開雞 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579) 比對 Ensembl (<https://www.ensembl.org>) Red Jungle fowl (GRCg6a) 序列資料 (5:53,059,707 - 5:53,060,326) 後，設計正向引子 5'-TGCGAGC GAGCAAGTGACT G -3' 與反向引子 5'- TCCAAGCCATAGGCAA TAGCAG -3'，以核苷酸自動定序儀 (Applied Biosystems 3500 xL Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, USA) 進行定序。

## 結果與討論

本研究以 PCR-SSCP 基因型檢測技術建置紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞 *HSP70* 基因之基因型。試驗樣本經 PCR 擴增 155 bp 目標片段產物後，進行 SSCP 取得電泳結果。每個基因型皆有單股與雙股區域，基因型的鑑定由單股區域呈現的不同分子量片段，可區分 AA、AB 及 BB 基因型 (圖 1)。

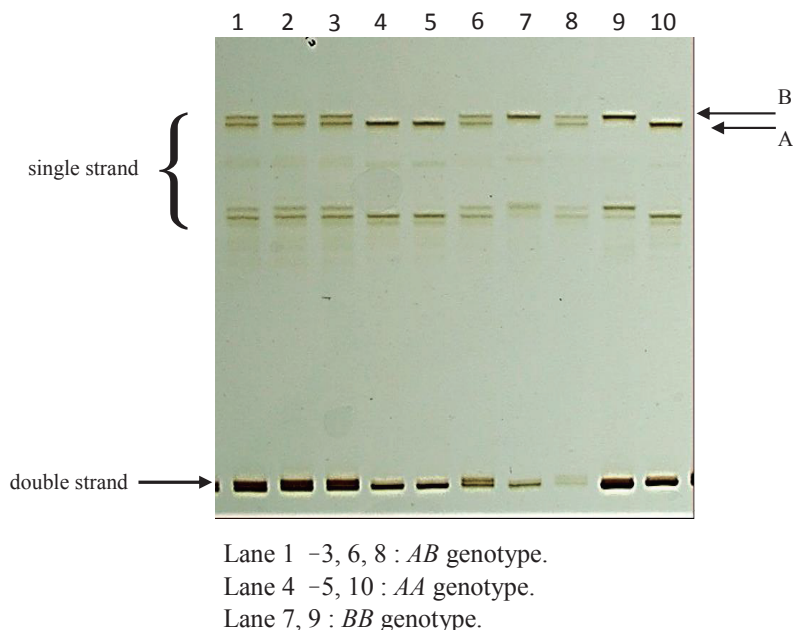


圖 1. 以 PCR-SSCP 檢測技術分析雞 *HSP70-C667G* 之電泳圖。

Fig. 1. Genotyping result of *HSP70-C667G* by PCR-SSCP.

本研究開發建立之 KASP™ 基因型檢測平臺技術進行 *HSP70-C667G* 基因型鑑定，以 PCR 反應條件擴增 119 bp 目標片段產物，結果如圖 2。KASP™ 螢光標記可明確地區分三種基因型，其中近 X 軸 (HEX 螢光強度) 為 *HSP70-BB* 純合子基因型，近 Y 軸 (FAM 螢光強度) 為 *HSP70-AA* 純合子基因型，中間綠點 (FAM/HEX 混合螢光強度) 為 *HSP70-AB* 雜合子基因型，方塊黑點則為空白對照。

本試驗研究為進一步驗證 KASP™ 基因型檢測技術之準確性，依 NCBI 公開 *HSP70* 基因序列 (GenBank J02579) 設計定序引子，並經 PCR 擴增長度為 619 bp 產物後，以核苷酸自動定序儀進行雙向定序，將定序結果與 Ensembl (<https://www.ensembl.org>) Red Jungle fowl (GRCg6a) 序列資料 (5:53,059,707 - 5:53,060,326) 進行序列比對。結果顯示 AA 純合子基因型者 *HSP70-667* 鹼基為 G (guanine) (圖 3A)，PCR 擴增定序序列第 330-339 bp 之 DNA 序列為 TGGCCGTTCC；BB 純合子基因型者 *HSP70-667* 鹼基為 C (cytosine)，PCR 擴增定序序列第 330-339 bp 之 DNA 序列為 TGGCCCTTCC (圖 3C)。

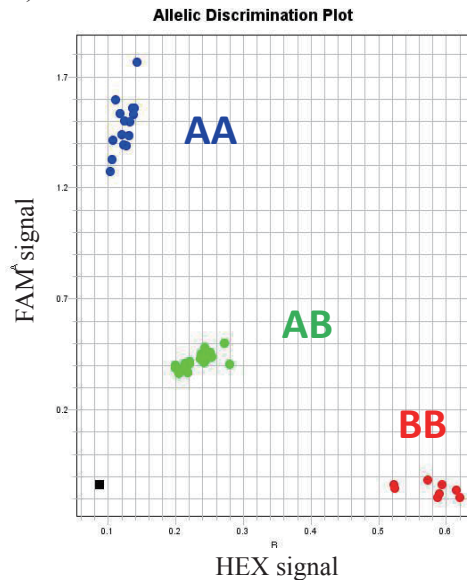


圖 2. 應用 KASP™ 檢測技術分析雞 *HSP70-C667G* 之基因型圖。AA 純合子基因型呈現 FAM 螢光標記為藍色，BB 純合子基因型呈現 HEX 螢光標記為綠色，AB 雜合子基因型呈現 FAM/HEX 螢光標記為綠色，空白樣本以黑點表示。

Fig. 2. Genotyping cluster plots of *HSP70-C667G* by the kompetitive allele-specific PCR (KASP™) assay. The genotyped samples marked blue are AA homozygotes; those marked red are BB homozygotes; those marked green are AB heterozygous. Black is the control.

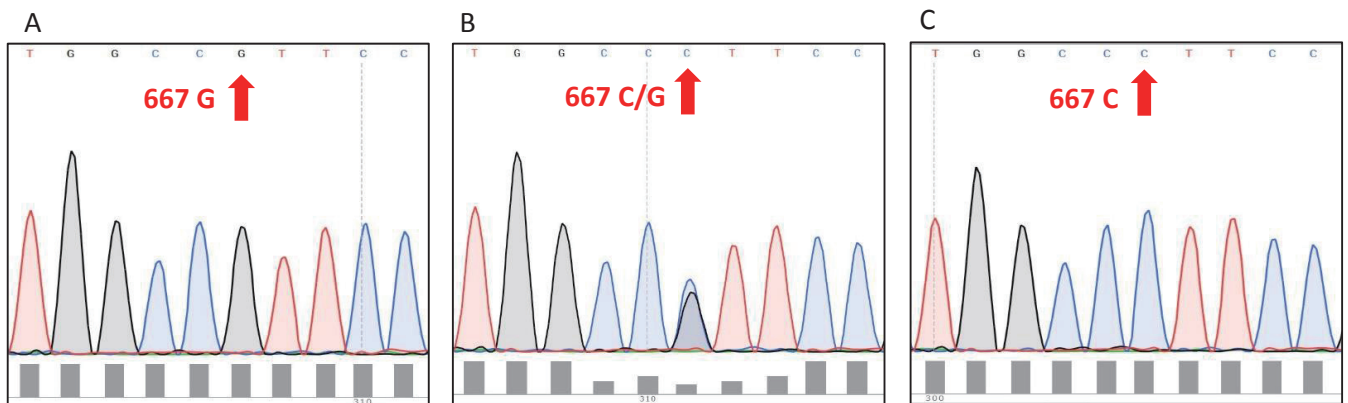


圖 3. 雞 *HSP70-C667G* 之 (A) AA (*HSP70-667G*)、(B) AB (*HSP70-667C/G*) 及 (C) BB (*HSP70-667C*) 基因型定序圖。  
Fig. 3. Sequencing profile of (A) AA (*HSP70-667G*), (B) AB (*HSP70-667C/G*), and (C) BB (*HSP70-667C*) homozygotes of

朱等 (2022a) 已成功運用 KASP™ 技術建立雞隻 *PRLR* 基因 SNP 點位 *C617T* 之基因型檢測平臺。經實際比較 KASP™ 與 PCR-SSCP 基因型檢測時間，發現 KASP™ 僅需要 PCR-SSCP 的 1/3 時間，即可完成基因型鑑定工作，並以 DNA 序列定序 *PRLR* 基因 *PP*、*PR* 及 *RR* 基因型後，證實 KASP™、PCR-SSCP 及 DNA 序列定序法等三種檢測法判定基因型之結果其相關性均達 100% 一致。Chang *et al.* (2021) 將 KASP™ 基因型檢測法運用於賽鴿乳酸脫氫酶 A (*lactate dehydrogenase A, LDH-A*)、粒線體細胞色素 B (*mitochondrial cytochrome B, MTCYB*) 和多巴胺受體 D4 (*dopamine receptor D4, DRD4*) 等 3 個基因共 4 個 SNPs 的鑑定，並進行 KASP™ 與 PCR-RFLP 測試法工作時間與試劑耗材之比較分析，發現 2 種基因型檢測方法的鑑定準確率達到 100%，然而 KASP™ 工作時間通常僅需 2.5 小時，而 PCR-RFLP 則需要約 7 小時才能完成同等樣本數量的基因型分析。如果將人員工作執行時間納入成本分析，KASP™ 的整體成本將比 PCR-RFLP 低大約三倍。

本試驗研究應用 PCR-SSCP 與 KASP™ 等 2 種基因型檢測技術，比較紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞共 360 個試驗樣本之 *HSP70* 基因型鑑定結果，2 種基因型檢測技術分析 *HSP70* 基因 *AA*、*AB* 及 *BB* 基因型 100% 相符（表 1），驗證此 2 種技術可相互替代應用。商用紅羽土雞、黑羽土雞及烏骨雞的 *HSP70* 基因的交替基因 A 頻率分別為 0.40、0.35 及 0.04。

## 結 論

藉由 2 種不同基因型檢測技術的比較，發現 KASP™ 基因型檢測平臺除具備基因型鑑定的高正確度外，更可有效縮短工作時間及降低人工與耗材試劑成本，應可符合我國種畜禽動物發展以 SNP 分子標識輔助選拔之需。未來，如依據本研究分析臺灣有色肉雞不同品種（系）*HSP70* 基因之基因型頻率結果，探討熱緊迫環境下 *HSP70* 基因對臺灣有色肉雞隻經濟性狀性能表現之影響，另可進一步了解作為臺灣有色肉雞遺傳選育的參考資訊。

## 誌 謝

研究團隊感謝農業部科技計畫（110 農科 -2.5.3- 畜 -L1）經費支持，民間牧場與遺傳生理組同仁協助採樣、資料處理與實驗技術等支援，特此誌謝。

## 參考文獻

- 朱家德、林德育、賴永裕、梁筱梅、楊深玄、劉宗霖、張秀鑾、吳明哲、蕭振文。2022a。雞泌乳素接受體基因點突變多態性基因型檢測技術平臺開發與應用。畜產研究 55：47-55。
- 朱家德、林德育、賴永裕、吳明哲、張秀鑾。2022b。即時聚合酶鏈鎖反應檢測豬 *UBE3C* 基因點突變多態性之基因型分析。中畜會誌（增刊）51：94。
- 林德育、鍾秀枝、黃鈺嘉、黃祥吉、林宗貴、吳明哲。2005。雞種的熱休克蛋白 70 基因頻率。中畜會誌（增刊）34：135。
- Balakrishnan, K. N., S. K. Ramiah, and I. Zulkifli. 2023. Heat shock protein response to stress in poultry: A Review. *Animals* 13: 317-345.
- Chang, C. C., B. B. I. Silva, H. Y. Huang, C. Y. Tsai, R. J. D. Flores, L. L. Tayo, Y. C. Tyan, M. A. Tsai, G. E. M. Catulin, K. P. Chuang, and J. L. Yang. 2021. Development and validation of KASP assays for the genotyping of racing performance-associated single nucleotide polymorphisms in pigeons. *Genes*. 12: 1383-1392.
- Gabriel, J. E., A. F. da Mota, I. C. Boleli, M. Macari, and L. L. Coutinho. 2002. Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic *hsp70* gene expression. *Growth Dev. Aging* 66: 27-33.
- Gething, M. J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in cell. *Nature* 355: 33-45.
- Liew, P. K., I. Zulkifli, M. Hair-Bejo, A. R. Omar, and D. A. Israf. 2003. Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heat shock protein 70 expression, resistance to infectious bursal disease, and growth in male broiler chickens subjected to heat stress. *Poult. Sci.* 82: 1879-1885.
- Liu, L. L., C. Fang, H. Y. Ma, X. Yu, S. P. Lv, and W. J. Liu. 2020. Development and validation of KASP markers for the milk traits genes in Kazakh horse. *J. Appl. Anim. Res.* 48: 293-299.
- Konstantinos, K. V., P. Panagiotis, V. T. Antonios, P. Agelos, and N. V. Argiris. 2008. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol. Biotechnol.* 38: 155-163.
- Nair, S. K., R. Babu, C. Magorokosho, G. Mahuku, K. Semagn, Y. Beyene, B. Das, D. Makumbi, P. L. Kumar, M. Olsen, and P. M. Boddupalli. 2015. Fine mapping of *Msv1*, a major QTL for resistance to Maize Streak Virus leads to development of production markers for breeding pipelines. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1839-1854.
- Rasheed, A., W. Wen, F. M. Gao, S. N. Zhai, H. Jin, J. D. Liu, Q. Guo, Y. J. Zhang, S. Dreisigacker, X. C. Xia, and Z. G. He. 2016. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 129: 1843-1860.
- Semagn, K., R. Babu, S. Hearne, and M. Olsen. 2013. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele

- Specific PCR (KASP) : overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breeding* 33: 1-14.
- Shi, Z., S. Liu, J. Noe, P. Arelli, K. Meksem, and Z. Li. 2015. SNP identification and marker assay development or high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. *BMC Genomics* 16: 314.
- Tamzil, M. H., R. R. Noor, P. S. Hardjosworo, W. Manalu, and C. Sumantr. 2013a. Polymorphism of the heat shock protein 70 gene in Kampong, Arabic and commercial chickens. *J. Vet.* 14: 317-326.
- Tamzil, M. H., R. R. Noor, P. S. Hardjosworo, W. Manalu, and C. Sumantr. 2013b. Acute heat stress responses of three lines of chickens with different Heat Shock Protein (HSP) 70 genotypes. *Int. J. Poult. Sci.* 12: 264-272.
- Tang, C., Z. M. Zhang, and H. Yue. 2011. Clone and prokaryotic expression of *Hsp70* gene of the broiler. *J. Southwest Univ. Natl. Nat. Sci. Ed.* 37: 401-404.
- Yu, J., E. Bao, J. Yan, and L. Lei. 2008. Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. *Cell Stress Chaperon.* 13: 327-335.
- Zhang, Y., D. Liang, H. Huang, Z. Yang, Y. Wang, Y. Yu, L. Liu, S. Zhang, J. Han, and W. Xiao. 2020. Technical note: development and application of KASP assays for rapid screening of 8 genetic defects in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 103: 619-624.

表 1. 應用 PCR-SSCP 與 KASP™ 檢測技術鑑定 HSP70-C667G 之基因型比較表  
 Table 1. Comparison of the HSP70-C667G genotype via PCR-SSCP and KASP™ genotyping platform.

Breed	N	HSP70-C667G						Accuracy <sup>3</sup> (%)	P-value <sup>4</sup>		
		Observed genotypic frequencies by PCR-SSCP <sup>1</sup> (%)			Frequency of A allele	Observed genotypic frequencies by KASP™ <sup>2</sup> (%)				Frequency of A allele	
		AA	AB	BB		AA	AB				BB
Red-feather native chicke	120	22 (18.4)	52 (43.3)	46 (38.3)	96 (0.40)	22 (18.4)	52 (43.3)	46 (38.3)	96 (0.40)	100	<0.01
Black-feather native chicken	120	18 (15.0)	49 (40.8)	53 (44.2)	85 (0.35)	18 (15.0)	49 (40.8)	53 (44.2)	85 (0.35)	100	<0.01
Silkie	120	5 (4.2)	0 (0.0)	115 (95.8)	10 (0.04)	5 (4.2)	0 (0.0)	115 (95.8)	10 (0.04)	100	<0.01

<sup>1</sup> PCR-SSCP: polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism.

<sup>2</sup> KASP™: kompetitive allele-specific polymerase chain reaction.

<sup>3</sup> Accuracy analyzed by the Pearson correlation coefficient between PCR-SSCP and KASP™ methods.

<sup>4</sup> P-value significance based on SAS PROC CORR procedure.

# The establishment of a genotyping platform for the Heat Shock Protein 70 gene and analysis of genotypic distribution in Taiwan native chicken <sup>(1)</sup>

Chia-Te Chu <sup>2)</sup> Yung-Yu Lai <sup>(2)</sup> Hsueh-Chi Teng <sup>(3)</sup> Tsung-Lin Liu <sup>(4)</sup> Ming-Che Wu <sup>(2)</sup>  
Hsiu-Luan Chang <sup>(5)</sup> Der-Yuh Lin <sup>(2)(6)</sup>

Received: Sep. 12, 2023 ; Accepted: Dec .20, 2023

## Abstract

The heat shock protein family (HSPs) is a critical biomarker for organisms responding to heat stress conditions. Under heat stress or other stressful environments, the heat shock 70 protein (*HSP70*) is an indispensable regulatory factor for maintaining the proper protein structure and mitigating tissue damage. The purpose of this study was to analyze the genotype frequency distribution of the *HSP70* gene in Taiwan colored native chickens including red-feathered native chicken, black-feathered native chicken and silkies. The single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes of the chicken *HSP70* gene were identified by two genotyping platforms, polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and the fluorescent primer marked kompetitive allele-specific polymerase chain reaction (KASP<sup>TM</sup>). The results illustrated that the *HSP70* gene genotypes *AA*, *AB*, and *BB* analyzed by both detection techniques were 100% consistent, confirming that these techniques can be interchangeably used. Furthermore, KASP<sup>TM</sup> can effectively reduce working time and economic expenditure. The allele *A* frequencies of *HSP70* gene in red-feathered native chickens, black-feathered native chicken, and silkies were 0.40, 0.35, and 0.04, respectively. In the future, the influence of the *HSP70* gene on economic traits under heat stress conditions can be discovered based on the differences in the genotype frequency of the *HSP70* gene in different chicken breeds in Taiwan.

Key Words: chicken, heat stress, HSPs, KASP<sup>TM</sup>

---

(1) Contribution No. 2774 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Quantum Life Biotechnology Co., Ltd.

(4) Department of Biotechnology and Bioindustry Sciences, National Cheng Kung University, Tainan 701, Taiwan. R.O.C.

(5) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung 912, Taiwan. R.O.C.

(6) Corresponding author, E-mail: lin0429@mail.tlri.gov.tw.