

รายงานรายวิชา SC187 002

Practical Skill in Biology

NCBI Database and BLAST

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน Interleukin-6 (il-6)

โดยใช้เครื่องมือ และข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI

นางสาวสุริยาพร

ศรจันทร์

รหัสนักศึกษา 655020103-3

หลักสูตรปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสำหรับครู

ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1. ที่มาและความสำคัญของยีนที่สนใจ

Interleukin-6 (IL-6) เป็นหนึ่งในไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammatory cytokines) ที่สำคัญ โดยทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบเฉียบพลัน IL-6 สร้างได้จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ fibroblast, stromal cell, macrophage, T lymphocyte และ mast cell เป็นต้นหน้าที่หลักของไซโตไคน์นี้คือชักนำเซลล์ตับให้มีการสร้าง acute phase protein ซึ่งมีบทบาทในการสร้างเม็ดเลือดหลายชนิด และช่วยกระตุ้นเซลล์ B lymphocyte ให้สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี 1

นอกจากนี้ IL-6 ยังมีส่วนในการส่งเสริมการสร้าง cytotoxic T lymphocyte (CTL) ซึ่งเซลล์ CTL เป็นเซลล์เอฟเฟกเตอร์ (effector cell) หลักในการกำจัดเชื้อไวรัสและการเกิดพยาธิสภาพของตับ สามารถออกฤทธิ์โดยการหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ interferon- γ (IFN- γ) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) ซึ่งไปยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งอยู่ภายในเซลล์โดยใช้กลไกหลัก 2 กลไกคือ การยับยั้งขั้นตอน nucleocapsid formation ในระยะต่างๆ และทำให้จีโนมของเชื้อไวรัสไม่คงตัว (destabilization of viral DNA) ([https://www.tsh.or.th/file_upload/files/06\(6\).pdf](https://www.tsh.or.th/file_upload/files/06(6).pdf))

Interleukin-6 (il-6) คืออะไร สัมพันธ์กับการอักเสบในร่างกายอย่างไร การอักเสบ (Inflammation) เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อร่างกายมีการอักเสบแบบเฉียบพลัน เช่น มีการติดเชื้อไวรัส ติดเชื้อแบคทีเรีย หรือ มีการบาดเจ็บ จะกระตุ้นให้หลั่งไซโตไคน์ (Cytokines) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่หลั่งออกจากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune System) และหลังจากเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บเพื่อกระตุ้นขบวนการอักเสบ

ไซโตไคน์จึงเป็นสารเคมีที่เป็นสื่อส่งสัญญาณการอักเสบของเซลล์ (Inflammatory marker) โดยมีผลทั้งกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (Pro-inflammatory Cytokines) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งให้การอักเสบลดน้อยลง (Anti-inflammatory Cytokines) นอกจากนี้ไซโตไคน์ยังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวให้สามารถกำจัดเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือกระตุ้นการพัฒนาสร้างสารภูมิคุ้มกันต้านทานในร่างกาย Interleukin-6 (IL-6)

ในการตอบสนองต่อการอักเสบจะพบ IL-6 ก่อนไซโตไคน์ ตัวอื่น เช่นเดียวกับ CRP (C-reactive protein) โดยพบในระดับสูง และอยู่ได้นาน ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยการวินิจฉัยการติดเชื้อเฉียบพลันระยะแรกได้ และหลังจากติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่าระดับ IL-6 สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของการติดเชื้อ

นอกจากนี้ยังสามารถใช้ IL-6 เพื่อประเมินความรุนแรงของการติดเชื้อ และพยากรณ์ของโรครวมถึงการตอบสนองต่อการรักษาเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (Macrophages) ถูกกระตุ้นจะมีการหลั่งไซโตไคน์หลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่

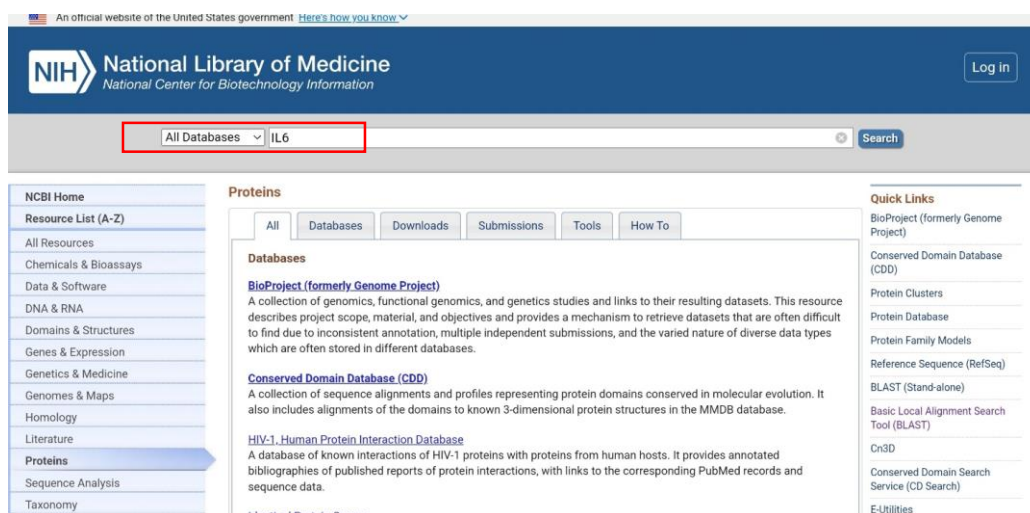
- อินเตอร์เฟอรอน (Interferon) : ทำหน้าที่ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ และขัดขวางการแบ่งตัวของเซลล์
- อินเตอร์ลิวคิน (Interleukin) : IL-1, IL-6, IL-10 และ IL-12 ซึ่งทำหน้าที่ในการประสานการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว

- ทูเมอร์เนโครติกแฟกเตอร์ (Tumoe Necrotic Factor-alpha; TNF-alpha) : ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ แปรกลปคอมชนิดต่างๆ

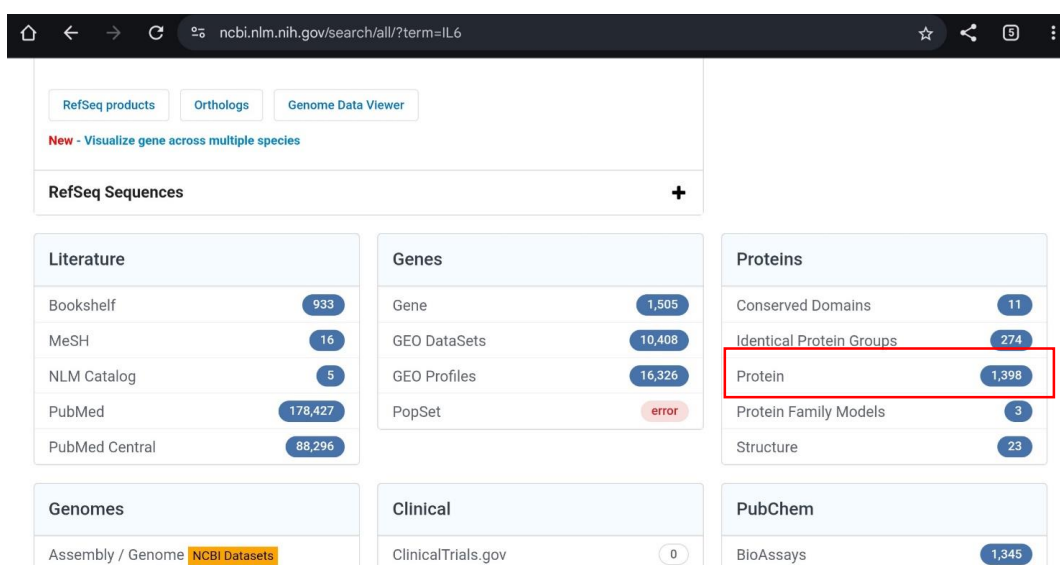
2. ขั้นตอนการดำเนินงาน

2.1 ขั้นตอนการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างลำดับกรดอะมิโนของยีนในสิ่งมีชีวิตที่สนใจกับกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงที่สุด 5-10 ชนิด ที่มาจากสิ่งมีชีวิตอื่น โดยโปรแกรม blastp

1. เข้าไปที่เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> แล้วเลือก All Databases และพิมพ์ชื่อยีนที่ต้องการค้นหา



2. ในหน้ารายละเอียดของยีน ให้เลื่อนลงไปที่ Protein



3. จะพบรายการอื่นที่ต้องการ คลิก

Protein search results for IL6. The search bar shows 'Protein' and 'IL6'. The results list 'IL6 - interleukin 6' from Homo sapiens (human) with Gene ID 3569. A red box highlights the gene entry. The page also shows filters, related data, and search details.

4. รายละเอียดต่าง ๆ ของ ยีน

Gene entry for interleukin-6 isoform X2 [Homo sapiens]. The NCBI Reference Sequence is XP_054214121.1. The accession number XM_054358146.1 is highlighted with a red box. The page also shows the LOCUS, DEFINITION, ACCESSION, VERSION, DBLINK, DBSOURCE, REFSEQ, KEYWORDS, SOURCE, ORGANISM, and COMMENT.

5. ไปที่ Protein BLAST

BLAST website interface. The 'Basic Local Alignment Search Tool' is highlighted with a red box. The 'Protein BLAST' button is also highlighted with a red box. The page shows the search bar, filters, and options for Nucleotide BLAST, Protein BLAST, and BLAST Genomes.

6. ใส่ยีนที่ต้องการลงไป และเลือก Refseq_protein

NIH National Library of Medicine
BLAST® - blastp suite

Standard Protein BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Query subrange

Or, upload file

Job Title

Align two or more sequences ☐

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.) ☐ Experimental databases

Reference proteins (refseq_protein)

Organism ☐ exclude

Exclude ☐ Models (XM/XP) ☒ Non-redundant RefSeq proteins (WP) ☒ Uncultured/environmental sample sequences

Program Selection

Algorithm ☒ blastp (protein-protein BLAST) ☐ PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) ☐ PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) ☐ DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

BLAST

Search database refseq_protein using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window ☐

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with ⓘ

sign

+ Algorithm parameters

FOLLOW NCBI

Connect with NLM

Feedback

7. ระบุสิ่งมีชีวิตที่ต้องการเปรียบเทียบ

NIH National Library of Medicine
BLAST® - blastp suite

Standard Protein BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Query subrange

Or, upload file

Job Title

Align two or more sequences ☐

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.) ☐ Experimental databases

Reference proteins (refseq_protein)

Organism ☐ exclude

Exclude ☐ Models (XM/XP) ☒ Non-redundant RefSeq proteins (WP) ☒ Uncultured/environmental sample sequences

Program Selection

Algorithm ☒ blastp (protein-protein BLAST) ☐ PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) ☐ PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) ☐ DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

BLAST

Search database refseq_protein using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window ☐

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with ⓘ

sign

+ Algorithm parameters

FOLLOW NCBI

Connect with NLM

Feedback

8. ทำเครื่องหมายถูกที่ Exclude ตามภาพ

NIH National Library of Medicine
BLAST® - blastp suite

Standard Protein BLAST

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Query subrange

Or, upload file

Job Title

Align two or more sequences ☐

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.) ☐ Experimental databases

Reference proteins (refseq_protein)

Organism ☐ exclude

Exclude ☐ Models (XM/XP) ☒ Non-redundant RefSeq proteins (WP) ☒ Uncultured/environmental sample sequences

Program Selection

Algorithm ☒ blastp (protein-protein BLAST) ☐ PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) ☐ PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) ☐ DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

BLAST

Search database refseq_protein using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window ☐

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with ⓘ

sign

+ Algorithm parameters

FOLLOW NCBI

Connect with NLM

Feedback

9. เลือก blastp และ BLAST

Program Selection

Algorithm ☒ blastp (protein-protein BLAST) ☐ PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) ☐ PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) ☐ DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)

Choose a BLAST algorithm

BLAST

Search database refseq_protein using Blastp (protein-protein BLAST)

Show results in a new window ☐

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with ⓘ

sign

+ Algorithm parameters

10. จะได้ลำดับสิ่งมีชีวิตที่มียืนดังกล่าว เลือกมา 5-10 ชนิด ทำการเปรียบเทียบเชิงวิวัฒนาการ

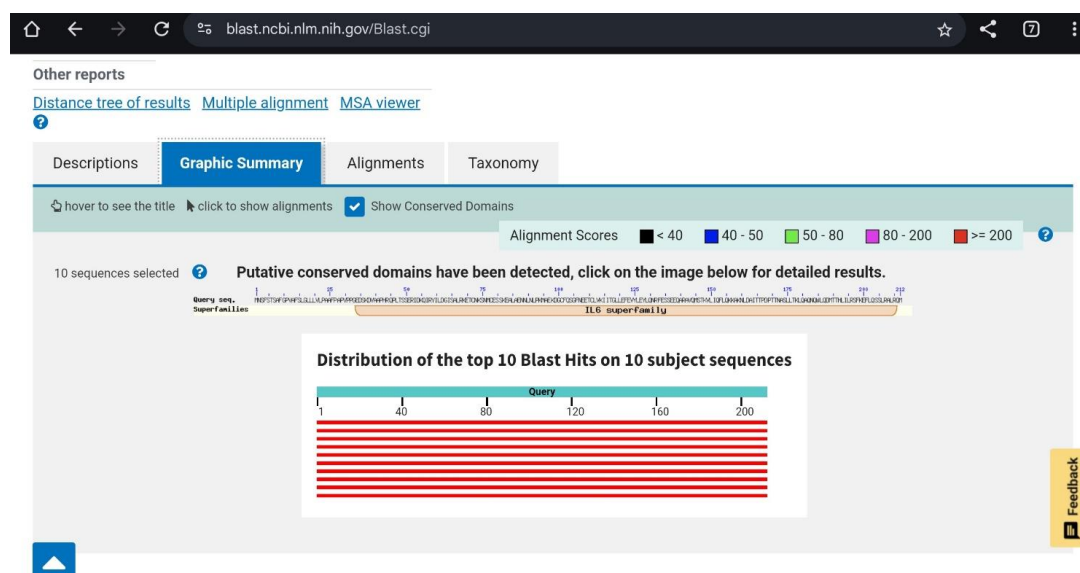
blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

select all 10 sequences selected

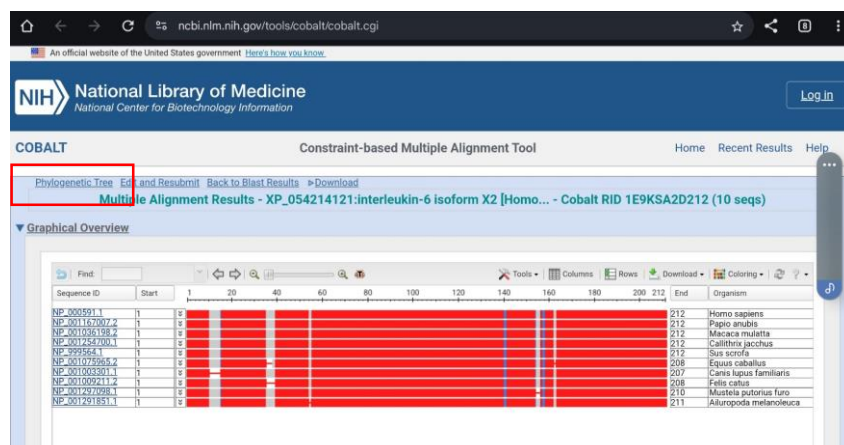
GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 isoform 1 precursor [Homo sapiens]	Homo sapiens	437	437	100%	1e-154	100.00%	212	NP_000591.1
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Papio anubis]	Papio anubis	422	422	100%	4e-149	96.70%	212	NP_001167007.2
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Macaca mulatta]	Macaca mulatta	422	422	100%	6e-149	96.70%	212	NP_001036198.2
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Callithrix jacchus]	Callithrix jacchus	385	385	100%	4e-134	89.15%	212	NP_001254700.1
<input type="checkbox"/>	interleukin-6 isoform 3 [Homo sapiens]	Homo sapiens	378	378	86%	7e-132	99.45%	189	NP_001358025.1
<input type="checkbox"/>	interleukin-6 isoform 2 [Homo sapiens]	Homo sapiens	279	279	64%	2e-93	100.00%	136	NP_001305024.1
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	266	266	100%	2e-87	61.32%	212	NP_999564.1
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Equus caballus]	Equus caballus	264	264	100%	2e-86	60.85%	208	NP_001075965.2
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Canis lupus familiaris]	Canis lupus familiaris	254	254	100%	1e-82	58.96%	207	NP_001003301.1
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Felis catus]	Felis catus	253	253	100%	3e-82	57.55%	208	NP_001009211.2
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Mustela putorius furo]	Mustela putorius furo	249	249	100%	1e-80	58.49%	210	NP_001297098.1
<input checked="" type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Alluropoda melanoleuca]	Alluropoda melanoleuca	244	244	100%	1e-78	60.38%	211	NP_001291851.1
<input type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Capra hircus]	Capra hircus	227	227	99%	9e-72	53.33%	208	NP_001272569.1
<input type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Bos taurus]	Bos taurus	225	225	99%	3e-71	53.33%	208	NP_776348.1
<input type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Ovis aries]	Ovis aries	225	225	99%	5e-71	52.86%	208	NP_001009392.1
<input type="checkbox"/>	interleukin-6 precursor [Bubalus bubalis]	Bubalus bubalis	224	224	99%	1e-70	52.86%	208	NP_001277909.1

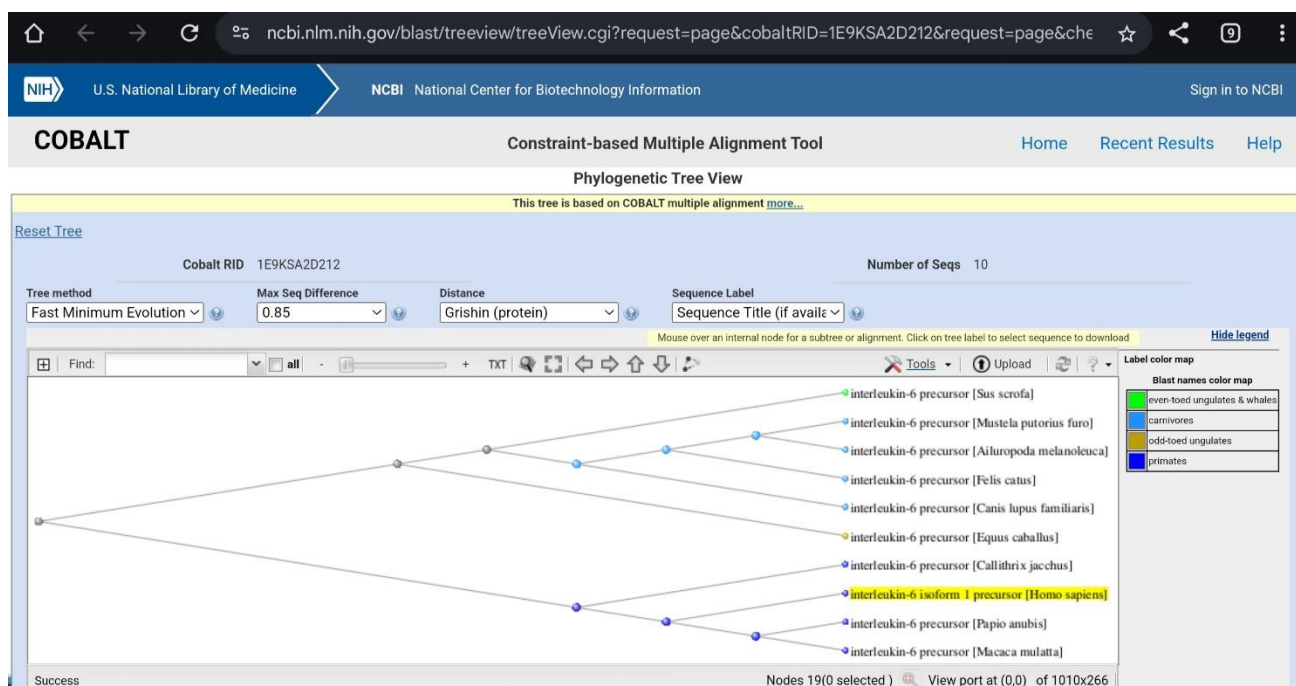
11.แสดง Graphic summary



12. แสดง Multiple Alignment results และ คลิกเพื่อสร้าง Phylogenetic Tree



13. Phylogenetic Tree



แผนผัง Phylogenetic Tree ของโปรตีน IL-6 จากหลายสายพันธุ์ที่ได้จากเครื่องมือ COBALT (Constraint-based Multiple Alignment Tool) ของ NCBI ซึ่งใช้เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ IL-6 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยสามารถเปรียบเทียบเชิงวิวัฒนาการได้ ดังนี้

ความใกล้เคียงของสาขา (Branch Proximity)

- สปีชีส์ที่อยู่ในสาขาเดียวกันหรือลำดับใกล้เคียงกันมาก มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการมากกว่า
- Homo sapiens (มนุษย์) ใกล้เคียงกับ Macaca mulatta (ลิงแสม) และ Papio anubis (บาบูน) → เป็นกลุ่ม primate มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน
- Sus scrofa (หมูบ้าน) อยู่ห่างจากมนุษย์มาก → แสดงว่ามีความแตกต่างของ IL-6 มากกว่า

ความยาวของกิ่งไม้ (Branch Length) ความยาวของกิ่งแสดงถึง “ระยะทางวิวัฒนาการ” หรือความแตกต่างของลำดับโปรตีน โดย กิ่งสั้น → ยิ่งใกล้เคียงกันมาก

กิ่งยาว → ยิ่งมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับมาก


- มนุษย์ (Homo sapiens) อยู่ใกล้กับลิงมาก (ทั้งลิงโลกใหม่และลิงโลกเก่า) → แสดงว่าโปรตีน IL-6 ของมนุษย์มีความใกล้เคียงกับพวก primates อื่น ๆ
- กลุ่มแมว (Felis catus) และสุนัข (Canis lupus familiaris) อยู่ในกลุ่ม carnivores → มีลำดับ IL-6 ใกล้กัน แต่ห่างจากมนุษย์

- หมู (*Sus scrofa*) และม้า (*Equus caballus*) แม้เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเหมือนกัน แต่โปรตีน IL-6 มีความแตกต่างจากมนุษย์มากกว่า

ภาคผนวก

ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่เลือกมา

 An official website of the United States government [Here's how you know](#)

 **National Library of Medicine**
National Center for Biotechnology Information

Log in

Protein

Protein

Search

Advanced

Help

GenPept

Send to

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST


Identify Conserved Domains

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Show in Genome Data Viewer

Protein 3D Structure

 Structure of interleukin 6 (gp130 P496L mutant)
PDB: 8QV6

interleukin-6 isoform X2 [Homo sapiens]

NCBI Reference Sequence: XP_054214121.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS

DEFINITION

ACCESSION

VERSION

DBLINK

DBSOURCE

KEYWORDS

SOURCE

ORGANISM

COMMENT

XP_054214121

interleukin-6 isoform X2 [Homo sapiens].

XP_054214121

XP_054214121.1

BioProject: [PRJNA807723](#)

REFSEQ: accession [XM_054358146.1](#)

RefSeq.

Homo sapiens (human)

[Homo sapiens](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

MNMF REFSEQ: This record is predicted by automated computational

212 aa

linear

PRI 26-AUG-2024