

มาติกแนนท์ ไฮเปอร์เทอร์เมียในสุกร I. เปรียบเทียบ การตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ กับเทคนิคฮาโลเทน

Malignant Hyperthermia in Swine I. Detection Comparing Between PCR and Halothane Technique

สินชัย พารักษา¹ วรวิทย์ วัชชวัลคุ² สุรัชชัย แซ่ลิ้ม¹ ประพันธ์ เกษสังข์²
และลอลิต้า เมฆสงฆ์³

Sinchai Paraksa, Worawidh Wajjwalku, Surachai Saelim, Prapant Kessank,
and Lolita Meksongsee

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to detect malignant hyperthermia (MH) genotypes in swine by amplifying the calcium-releasing channel gene with the use of the forward primer (5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3') and the reverse primer (5'-TTCACCGGAGTGAGTCTCTGAGT-3'). A DNA fragment consisting of 659 base pairs (bp) was obtained. Digestion of this DNA fragment by Hha I yielded two fragments (166 and 493 bp) for the normal genotype (NN), three fragments (166, 493 and 659 bp) for the heterozygous genotype (Nn) and only one fragment (659 bp) for the recessive homozygous genotype (nn).

PCR was compared with the halothane test, 190 swines aging from 3-8 weeks were tested . Detecting genotypes by PCR differed from the halothane test by 1.16 percent in the halothane negative (NN or Nn) and by 33.33 percent in the halothane positive (nn) animals.

Key words : malignant hyperthermia, polymerase chain reaction, halothane test, swine.

1 ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaengsean Nakhon Pathom 73140, Thailand.

2 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Faculty of Veterinary, Kasetsart University, Kamphaengsean Nakhon Pathom 73140, Thailand.

3 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

บทคัดย่อ

การตรวจสอบลักษณะพันธุกรรม มาลิกันแนทไฮเปอร์เทอร์เมีย (malignant hyperthermia) ในสุกร โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วยการเพิ่มปริมาณสายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ความยาว 659 base pairs (bp) ของยีน calcium - releasing channel โดยใช้ forward primer (5'-TCCAGTTTGCCACAG GTCCTACCA-3') และ reverse primer (5'-TTCA CCGGAGTG GAGTCTCTGAGT-3') และใช้เอนไซม์ Hha I ย่อยสายชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ เพื่อแยกความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรม พบว่าลักษณะปกติ (NN) ได้แถบดีเอ็นเอสองแถบมีความยาว 166 และ 493 bp ลักษณะพาหะ (Nn) ได้แถบดีเอ็นเอสามแถบมีความยาว 166, 493 และ 659 bp ส่วนสุกรที่เป็น MH (nn) ได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวมีความยาว 659 bp.

การตรวจสอบยีนในโทปี MH ในสุกรโดยใช้ PCR เปรียบเทียบกับการทดสอบฮาโลเรน ในสุกรช่วงอายุระหว่าง 3 - 8 สัปดาห์ จำนวน 190 ตัว พบว่าเทคนิค PCR ให้ผลการตรวจยีนในโทปี MH คลาดเคลื่อนจากการทดสอบฮาโลเรนในกลุ่มฮาโลเรนลบ (NN หรือ Nn) เพียง 1.16 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในกลุ่มฮาโลเรนบวก (nn) เกิดความคลาดเคลื่อนเนื่องจากความผิดพลาดจากการสังเกตการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อโดยวิธีตรวจสอบด้วยฮาโลเรน ทำให้ความคลาดเคลื่อนจากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี มีค่าสูงถึง 33.33 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

มาลิกันแนทไฮเปอร์เทอร์เมีย (MH) ในสุกรเป็นลักษณะอาการผิดปกติทางพันธุกรรมอันเนื่องมาจากยีนด้อย จากการกลายพันธุ์ของยีน Calcium releasing channel โดยพบว่าเบสไซโตซีน (cytosine) ในตำแหน่งที่ 1843 ของสาย cDNA เปลี่ยนเป็นเบสไทมีน (thymine)

(Fujii et al., 1991) เป็นเหตุให้สุกรที่เป็น MH เมื่อเกิดความเครียด จะเกิดการช็อคตายอย่างเฉียบพลัน นอกจากนี้ยังผลให้ซากสุกรที่เป็น MH มีลักษณะเนื้อซีด เหลว และแฉะ ซึ่งมีคุณภาพต่ำ ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจการผลิตสุกรเป็นอย่างมาก (Smith and Bampton, 1977).

สำหรับการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรม MH ในสุกร ที่ผ่านมานิยมใช้การตรวจสอบฮาโลเรนเป็นที่แพร่หลายกันมาก แต่ข้อจำกัดคือ สามารถตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมได้เฉพาะกลุ่มที่เป็น MH ส่วนลักษณะปกติและพาหะนั้นไม่สามารถตรวจแยกออกจากกันได้ จึงทำให้ไม่สามารถคัดสุกรลักษณะพาหะได้นอกจากใช้การทดสอบลูกเข้าช่วย (progeny test) ซึ่งต้องใช้เวลานาน และเสียค่าใช้จ่ายสูง ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค PCR ขึ้น และได้มีการนำมาใช้ตรวจสอบลักษณะพันธุกรรม MH ในสุกรพบว่าเทคนิคนี้มีความเหมาะสมกว่าการทดสอบฮาโลเรน เนื่องจากสามารถตรวจสอบลักษณะพันธุกรรม MH ได้ทุกลักษณะ จึงทำให้สามารถวางแผนการควบคุมลักษณะพันธุกรรม MH ในฝูงสุกรพ่อ-แม่พันธุ์ได้ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรม MH เปรียบเทียบกับการทดสอบฮาโลเรนว่าเพื่อหาผลแตกต่างของทั้งสองเทคนิคนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

การตรวจลักษณะพันธุกรรม MH โดยการทดสอบฮาโลเรน

ให้สุกรพันธุ์แลนด์ราซ ลาร์จไวท์ และดुरอค อายุระหว่าง 3 - 8 สัปดาห์ จำนวน 190 ตัว สูดดมก๊าซฮาโลเรนจากเครื่องฮาโลเรนที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ก๊าซออกซิเจนเป็นสื่อมีความเร็ว 2 - 3 ลิตร/นาที สุกรจะมีอาการสลับภายในระยะเวลา 3

นาที่ จากนั้นสังเกตการเกร็งตัวของขาหลังถ้าขาหลังของสุกรทั้งสองขามีการเกร็งตัว ผลการทดสอบเป็นกลุ่มฮาโลเธนบวก (nn) ส่วนสุกรที่มีขาหลังอ่อนตัวลักษณะปกติจัดเป็นกลุ่มฮาโลเธนลบ (NN หรือ Nn : Webb and Jordan, 1978) ดัง Figure 1.

การตรวจลักษณะพันธุกรรม MH โดยเทคนิค PCR

1. การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) จากเลือดสุกร โดยวิธี ตกตะกอนด้วย Ethanol (Kanasaki, 1990)

2. การเพิ่มปริมาณสายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยการสังเคราะห์สายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ความยาว 659 base pair (bp) จากการกำหนดช่วงของสาย forward primer (5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3') และสาย

reverse primer (5'-TTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAGT-3') พบว่าเบสในตำแหน่งที่ 494 นับจากปลายสาย forward primer เป็นตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของเบสไซโตซีน (cytosine) ถูกเปลี่ยนเป็นเบสไทมีน (thymine) ดังแสดงใน Figure 2 (O'Brien *et al.*, 1993) สำหรับความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการสังเคราะห์สายชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR ในสารละลาย 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

dATP	0.2	มิลลิโมล
dTTP	0.2	มิลลิโมล
dCTP	0.2	มิลลิโมล
dGTP	0.2	มิลลิโมล
KCl	50	มิลลิโมล
Tris-HCl pH 8	20	มิลลิโมล
MgCl ₂	1.5	มิลลิโมล

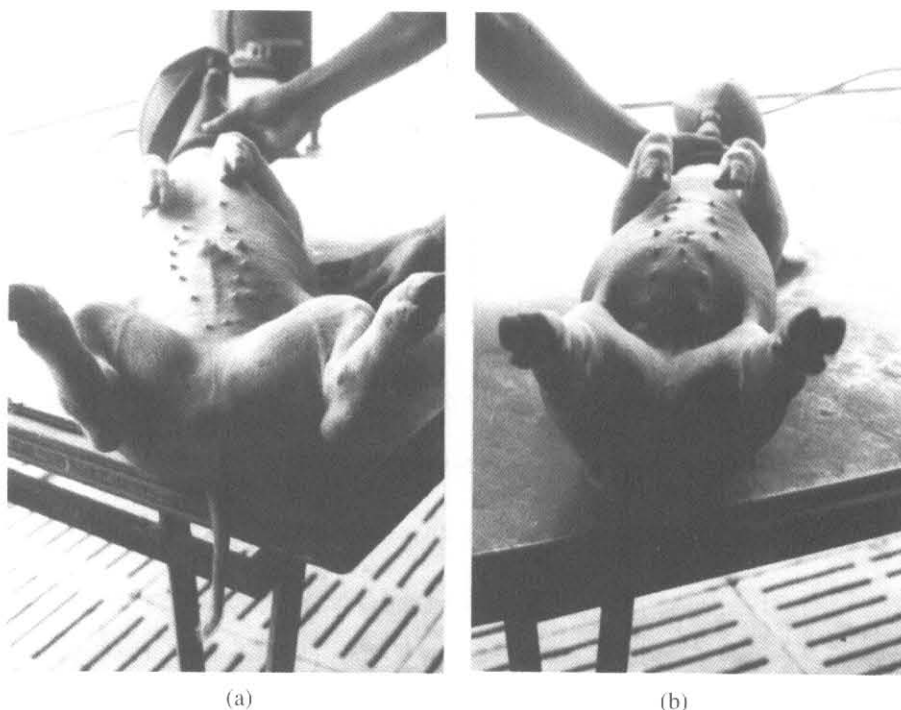


Figure 1 The halothane test detect malignant hyperthermia genotype in swine. (a) halothane negative (NN or Nn) and (b) halothane positive (nn).

forward primer	0.4	ไมโครโมล	<i>Hha</i> I ซึ่งจดจำต่อการย่อยของลำดับเบส GCG↓C
reverse primer	0.4	ไมโครโมล	โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในข้อที่ 2 ย่อย
Taq DNA polymerase	2.5	หน่วย	ด้วยเอนไซม์ <i>Hha</i> I จากนั้นทำการแยกแแถบ ดีเอ็นเอ
ตัวอย่างดีเอ็นเอ	600	นาโนกรัม	ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2

โดยมีการกำหนดอุณหภูมิภายในรอบดังนี้

DNA denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 60 วินาที

primer annealing ที่อุณหภูมิ 67 °C เป็นเวลา 30 วินาที

primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที

โดยการเพิ่มปริมาณจะผ่านกระบวนการ PCR เป็นจำนวนทั้งหมด 35 รอบ

3. การตรวจสอบลำดับเบสที่ 494 ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ว่าตำแหน่งนี้เป็นเบสไทมีนหรือเบสไซโตซีน ด้วยเอนไซม์ restriction endonuclease ที่ชื่อว่า

ผลและวิจารณ์

การตรวจสอบยีนโนไทป์ MH โดยวิธี PCR พบว่าสุกรปกติปรากฏแถบดีเอ็นเอสองแถบมีความยาว 166 และ 493 base pair (bp) สุกรพาหะมีแถบดีเอ็นเอสามแถบมีความยาว 166 493 และ 659 bp ส่วนสุกรที่เป็น MH จะต้องมียีนดีเอ็นเอมีความยาว 659 bp (Figure 3)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค PCR กับ การทดสอบฮาโลเรนได้แสดงไว้ใน Table 1. โดยเทคนิค PCR มีความคลาดเคลื่อนไปจากการทดสอบฮาโลเรน

```

5'-tccagtttgccacaggtctcactgacccactgaattaatttttaaccaacctcatgtatggacaacatccacctggccccgaag
atgcaogttgggacccccgccatccagaacctcgtcttgggtctcgtgctcgcactgacccggcctttcactcttgcctcggac
ttctacccccctgtcccgctctctcttctcctctgtctgatgcgcgatcccatccctcacagccccctgctgtcaccagacctttt
ctttgaccttgatctccctgtgtcatccctgaccttccgctttcaccacctcttctcagtcacatccccacctccacccctgggacatc
atccttctgggtccacccctgggtcttccatggacacacccctcccgcaagtgccctcacaccttgacctctgaccttgaccccta
gGTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCTGTGTGTGCAATGGTGTGGCCGTGC GCTCCAACCAAGA
TCTCATTACTGAGAACTTGCTCCCTGGCCGCGAGCTTCTGCTGCAGACAAACCTCATCAACTAT
GTCACCAggtctggcccccaaccttgacccagagottagaacctccacaccccgccccgactcagagactccactcc
ggtgaa-3'

```

Figure 2 The base-sequence of DNA which showed the mutation point at position 494. (O' Brien et al., 1993)

ในกลุ่มฮาโลเรนลบ (NN, Nn) เพียง 1.16 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นนี้ O'Brien *et al.* (1993) ได้รายงานไว้ว่า เทคนิค PCR นี้มีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากบุคลากรผู้ทำการทดสอบ นอกจากนี้การทดสอบด้วยฮาโลเรนในกลุ่มฮาโลเรนลบ ก็ยังเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้อีกด้วยจากสภาวะแวดล้อมที่ทำให้สุกรเกิดความเครียด (Fischer *et al.*, 1987)

ส่วนการตรวจสอบโดย PCR ในกลุ่มฮาโลเรนบวกนั้น พบความคลาดเคลื่อนไปจากการทดสอบฮาโลเรนนegative สูงถึง 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rempel *et al.* (1993) ซึ่งรายงานว่าเทคนิค PCR มีความคลาดเคลื่อนไปจากการทดสอบฮาโลเรนในกลุ่มฮาโลเรนลบ 1.05 เปอร์เซ็นต์ และในกลุ่มฮาโลเรนบวก 47.48 เปอร์เซ็นต์

ความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นน่าจะมีสาเหตุมาจากการทดสอบฮาโลเรน จาก Table 1 จะเห็นได้ว่าสุกรในกลุ่มฮาโลเรนบวก (nn) จำนวน 18 ตัวนั้น เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบลักษณะปกติและลักษณะพาหะ (NN และ Nn) ด้วย ถึง 6 ตัว Rempel *et al.* (1993) ได้ให้ข้อสังเกตว่าการทดสอบฮาโลเรนบางครั้งสุกรมีการเกร็งตัวของขาหลังไม่สมบูรณ์ ทำให้ยากที่จะตัดสินใจว่าสุกรนั้นอยู่ในกลุ่มฮาโลเรนบวกหรือลบ นอกจากนี้ Carden and Webb (1984) รายงานว่าการทดสอบฮาโลเรนในกลุ่มฮาโลเรนบวกมีความคลาดเคลื่อนจากปัจจัย อายุ เพศ และพันธุ์สุกรเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

เมื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมในการตรวจสอบยีนในหมู MH ในสุกรระหว่างเทคนิค PCR กับ การทดสอบฮาโลเรน สำหรับการนำไปใช้ในการวาง

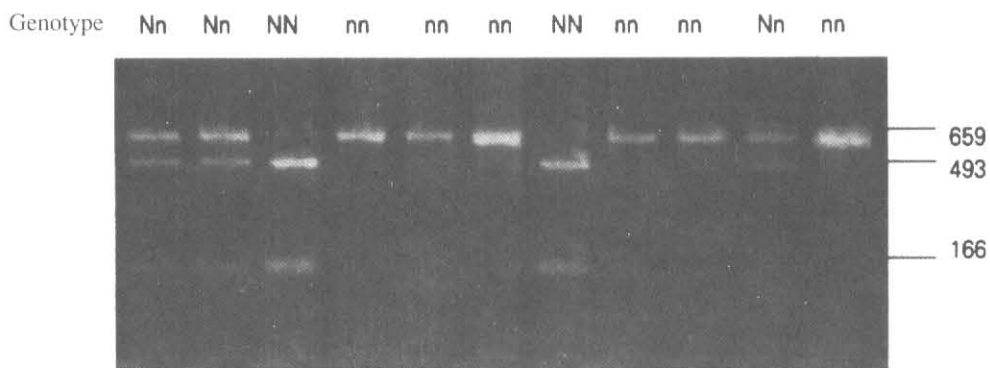


Figure 3 Polymerase chain reaction detect malignant hyperthermia genotype in swine [(NN) normal, (Nn) heterozygous and MH (nn)].

Table 1 Comparison of the detecting for MH genotype by halothane test and PCR.

Halothane test	Number	PCR			Error (%)
		NN	Nn	nn	
Halothane negative (NN or Nn)	172	114	56	2	1.16
Halothane positive (nn)	18	4	2	12	33.33
Total	190	118	58	14	-

แผนควบคุมลักษณะพันธุกรรม MH ในฝูงสุกรพ่อแม่พันธุ์ พบว่าเทคนิค PCR สามารถตรวจได้ทั้งลักษณะปกติ พาหะ และลักษณะพันธุกรรม MH อีกทั้งสามารถตรวจได้ทุกช่วงอายุของสุกร ส่วนการทดสอบฮาโลเทนมีข้อจำกัดในช่วงอายุของสุกร ซึ่งต้องอยู่ในช่วงอายุระหว่าง 3 - 8 สัปดาห์ และยังมีข้อจำกัดของการทดสอบในกลุ่มฮาโลเรนลบที่ไม่สามารถแยกสุกรลักษณะปกติออกจากลักษณะพาหะได้ นอกจากนี้สุกรในกลุ่มฮาโลเรนบวกต้องเผชิญความเสี่ยงของการสูญเสียสุกรลักษณะดีที่เป็น MH เนื่องจากสุกรในกลุ่มฮาโลเรนบวกบางตัว จะเกิดการช็อคตายอย่างเฉียบพลันในขณะดำเนินการทดสอบฮาโลเรน ดังนั้นการตรวจพันธุกรรมสุกรด้วยเทคนิค PCR จะสามารถควบคุมลักษณะ MH ในฝูงสุกรพ่อแม่พันธุ์ได้สะดวกและแม่นยำกว่าการทดสอบฮาโลเรน

สรุป

การตรวจสอบยีนในพาหะ MH ในสุกร โดยเทคนิค PCR มีความถูกต้องในการตรวจสอบสูง เนื่องจากเป็นการตรวจสอบจากดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นรหัสทางพันธุกรรมโดยตรง ส่วนความผิดพลาดของการตรวจสอบจะเกิดขึ้นมาน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับความละเอียดรอบคอบและความชำนาญของบุคลากรผู้ทำการตรวจสอบ นอกจากนี้การตรวจลักษณะพันธุกรรม MH ในสุกรด้วยเทคนิค PCR ยังให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำในสัตว์ทุกช่วงอายุ จึงเหมาะสมในการวางแผนควบคุมลักษณะ MH ในฝูงสุกรมากกว่าการทดสอบฮาโลเรน

เอกสารอ้างอิง

- Carden, A.E. and A.J. Webb. 1984. The effect of age on halothane susceptibility in pigs. *Anim. Prod.* 38 : 469-475.
- Fischer, K., C. Augustine, A. Festerling, and F. Schmitt. 1987. Investigation on the effect of short-term changes in environmental temperature on halothane reactions in pigs. *Zuchtungskunde.* 59 : 191-201.
- Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S.de Leon, V.K. Khanna, J.E. Weiler, P.J. O'Brien, and D.H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science.* 253 : 448-451.
- Kanasaki, E.S. 1990. Sample preparation from blood, cell and other fluids, pp. 456-458. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds) *PCR Protocols : guide to methods and applications.* Academic Press, Inc., San Diego. Sanfancisco.
- O'Brien, P.J., H. Shen, C.R. Cory, and X. Zhang. 1993. Use of DNA-based test for the mutation associated with malignant hyperthermia (porcine stress syndrome) in 10,000 breeding swine. *Food Anim.* 206 : 842-851.
- Rempel, W.E., M.Y. Yum, S. W. Kandelgy, C.F.H Kennedy, L.R. Irvin, J.R. Mickelson, and C.F. Louis. 1993. Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene for malignant hyperthermia. *J. Anim. Sci.* 71 : 1395-1399.
- Smith, C. and P.R. Bampton. 1977. Inheritance of reaction to halothane anaesthesia in pigs. *Gen. Res.* 29 : 287-292.
- Webb, A.J. and C.H.C. Jordan. 1978. Halothane sensitivity as a field test for stress susceptibility in the pig. *Anim. Prod.* 26 : 157-168.