

การจำแนกยีนที่ต้านทานต่อเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็น สาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านมโดยใช้ เทคนิค DDRT-PCR

Identification of Resistant Gene Against *Escherichia coli* Causing Diarrhea in Pre-weaned Pigs Using DDRT-PCR Technique

จิรพิพรรธ แพรไพศาล^{1/}ศุภมิตร เมฆฉาย^{1/} และ พัชรินทร์ ครุฑเมือง^{2/}
Chirapiphat Phraephaisarn,^{1/} Supamit Mekchay¹ and Pacharin Krutmuang^{2/}

Abstract: Diarrhea due to *Escherichia coli* (*E. coli*) infection is an important problem in pig production especially in pre-weaned period. It is responsible for considerable high economic losses. The *E. coli* susceptible or resistant pigs were presented or absent specific receptor on brush border of small intestine and associated with adhesion or non adhesion of bacteria to the receptors, respectively. In this study, brush border adhesion test was used to classify susceptible and resistant phenotype of piglets. Differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) was performed with 12 combination primers (dT₁₂VG anchored and arbitrary primers) to identify differentially expressed genes in brush border between two phenotypic groups. The results showed that adhesion values of the susceptible and resistant piglet group were 32% and 7%, respectively. The results of DDRT-PCR analysis showed a total of 512 cDNA fragments and had band size from 150 to 570 bp. Average cDNA fragment were 42.67 cDNA bands per a primer combination. Twelve specific bands revealed differential expression between two piglet groups. Out of these, 7 bands were only expressed in susceptible phenotype where as 5 bands were only expressed in the resistant piglet group. Five cDNA fragments were successfully cloned and sequenced. Three clones (ZP18B3, ZP24B2 and ZP18B1) showed homology with Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPP1*), S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) and liver

^{1/}ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/}ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

^{2/} Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

porcine EST (AK232914), respectively. Two clones (ZP01B1 and ZP17B1) did not show any homology and were identified as novel gene. These ESTs could be used as candidate genes for further investigating of the resistant and susceptible to diarrhea in pre-weaned pigs.

Keywords: Brush bor, ahea, DDRT-PCR, *E. coli* K88, pre-weaned pigs

บทคัดย่อ: โรคท้องร่วงที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในระยะก่อนหย่านม ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในระดับสูง โดยลักษณะความอ่อนแอ หรือความต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* ในสุกรนั้น เกิดจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏตัวรับ (receptor) บน brush border ของผนังลำไส้เล็กของลูกสุกร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะได้หรือไม่ของเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้ลักษณะความต้านทานและความอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม ถูกจำแนกโดยวิธี adhesion test และเทคนิค Differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) ถูกนำมาใช้ในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรทั้งสองกลุ่ม โดยใช้ชุดไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ (dT₁₂VG anchored และ arbitrary primers) ผลการทดสอบ adhesion test พบว่าสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border เท่ากับ 32% ในขณะที่สุกรที่มีลักษณะต้านทาน มีค่าเท่ากับ 7 % ($P < 0.05$) ผลจากการคัดกรองเครื่องหมายโมเลกุล cDNA-DDRT-PCR ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มจำนวนแถบ cDNA ที่มีขนาดในช่วง 150-570 bp เป็นจำนวน 512 แถบ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.67 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ นอกจากนี้แถบ cDNA ที่ปรากฏแตกต่างกัน (differential cDNA fragment) ระหว่างสุกรทั้งสองกลุ่ม มีจำนวน 12 แถบ โดยปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่มีลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 จำนวน 5 และ 7 แถบ ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR ดังกล่าว ถูกโคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีเพียง 5 โคลนที่ประสบความสำเร็จ โดย 3 โคลน (ZP18B3, ZP24B2 และ ZP18B1) พบว่าเหมือน (homology) กับยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPP1*) ยีน S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) และ EST ที่มีการแสดงออกในตับของสุกร (AK232914) ตามลำดับ ส่วนอีก 2 โคลน (ZP01B1 และ ZP17B1) พบว่าเป็นยีนใหม่ ซึ่งไม่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งยีนเหล่านี้จะถูกใช้เป็น candidate gene สำหรับศึกษาลักษณะความต้านทาน หรือความอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมต่อไป

คำสำคัญ: โรคท้องร่วง ลูกสุกรก่อนหย่านม Brush border, DDRT-PCR, *E. coli* K88

คำนำ

โรคท้องร่วงในลูกสุกรระยะก่อนหย่านมเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมผลิตสุกร โดยทำให้ลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมตายสูงถึง 2.7 เปอร์เซ็นต์ (Python et al., 2002) ซึ่งมีเชื้อสาเหตุ คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่มี antigen เป็น K88-fimbriae ซึ่งสามารถยึดเกาะกับตัวรับ (receptors) ที่อยู่บน brush border ของผนังลำไส้เล็กของสุกรได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Van den Broeck et al., 2000) เชื้อดังกล่าว สามารถสร้างโคโลนี และผลิตสารพิษไปกระตุ้น

การขับน้ำและอิเล็กโทรไลต์ออกสู่ช่องว่างของลำไส้เล็กจำนวนมาก ทำให้ลูกสุกรเกิดอาการท้องร่วงตามมา สำหรับความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* K88 กับผนังลำไส้ขึ้นอยู่กับความผันแปรทางพันธุกรรมของสุกร ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Francis et al., 1998) ลักษณะนี้ควบคุมด้วยยีนที่อยู่บนโครโมโซม (Hu et al., 1993) ซึ่งภายหลังถูกระบุว่าตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 13 ของสุกร (Python et al., 2002) แต่ในปัจจุบันนี้ ยังไม่สามารถระบุชี้ชัดได้ว่ายีนใดเป็นสาเหตุที่แท้จริงของความผันแปรลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรได้ อย่างไรก็ตาม ตัวรับ (receptor) ของเชื้อ

E. coli K88 บน brush border ที่ผนังลำไส้ของลูกสุกรยังเป็นปัญหาสำคัญในประเด็นดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงต้องการจำแนกความแตกต่างของยีนที่แสดงออกใน brush border ของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมที่มีฟิโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ในเบื้องต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้ ลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมที่อายุ 14 วัน 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์ทางการค้า (Large White X Landrace) จำนวน 6 ตัว (พันธุ์ละ 3 ตัว) ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมืองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับลูกสุกร สายพันธุ์ทางการค้า ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มสุกรภาควิทยาศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สุกรทั้งหมดถูกเก็บลำไส้เล็กในส่วนเจจูนัม (jejunum) มาแช่น้ำแข็ง เพื่อใช้ทดสอบการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border และเนื้อเยื่อของลำไส้ อีกส่วนหนึ่งถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อสกัด RNA ต่อไป

การจำแนกฟิโนไทป์ในสุกร

การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border บนผนังลำไส้ของลูกสุกรนั้นถูกทดสอบโดยวิธี Brush border adhesion test ตามวิธีการของ Python (2003) เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157 ซึ่งมีการแสดงออกของ K88 fimbriae ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เซลล์ brush border จากลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม ถูกผสมเข้ากับเซลล์ *E. coli* และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปตรวจนับการยึดเกาะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) โดยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border พิจารณาจากการสุ่มนับ brush border จำนวน 40 เซลล์ และคำนวณดังสูตร

เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ =

$$\frac{\text{จำนวน brush border ที่ถูกยึดเกาะโดย } E. coli \text{ ตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไป}}{\text{brush border จำนวน 40 เซลล์}} \times 100$$

ถ้าจำนวน brush border ถูกยึดเกาะด้วยเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่สองเซลล์ขึ้นไป มีมากกว่า 10 % จัดว่ามีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* แต่ถ้า brush border ถูกยึดเกาะด้วยเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่สองเซลล์ขึ้นไป มีจำนวนน้อยกว่า 10 % จัดว่าสุกรมีความต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* (Python, 2003)

การวิเคราะห์ DDRT-PCR

ตัวอย่าง RNA ของเซลล์ brush border จากผนังลำไส้เล็ก ถูกสกัดโดยใช้ Trizol reagent (Invitrogen) และจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนออกด้วย DNase I (Promega) ก่อนแยก RNA ให้บริสุทธิ์ด้วย RNeasy mini Kit (Qiagen) ตัวอย่าง RNA สุกร ถูกนำไปวิเคราะห์ห้ายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border ระหว่างกลุ่มที่มีฟิโนไทป์ต้านทาน และอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค DDRT-PCR ตามวิธีการของ Bauer *et al.* (1993) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ ขั้นตอนแรกสังเคราะห์ first strand cDNA จากตัวอย่าง RNA ซึ่งประกอบด้วย RNA จำนวน 1 µg, oligo dT₁₂VG จำนวน 100 pmol ในปริมาตร 12 µl นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมของเอนไซม์ Superscript-III reverse transcriptase จำนวน 8 µl ซึ่งประกอบไปด้วย : dNTPs จำนวน 10 µM, DTT จำนวน 10 mM เอนไซม์ RNase Inhibitor (Promega) จำนวน 10 units และเอนไซม์ Superscript-III reverse transcriptase (Invitrogen) จำนวน 200 units ในสารละลาย 1X first strand buffer (invitrogen) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 15 นาที และเจือจางสารละลาย first strand cDNA ด้วย RNase free water ในอัตราส่วน 1 : 5 ตัวอย่าง cDNA ถูกคัดกรองหาเครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน

Table 1 Nucleotide sequence of DDRT-PCR primer.

Primer	Nucleotide sequences		Nucleotide sequences	
ZP1	Forward	5'-TACAACGAGG-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP2	Forward	5'-CTTTCTACCC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP3	Forward	5'-TTTTGGCTCC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP4	Forward	5'-GGAACCAATC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP5	Forward	5'-AAACTCCGTC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP6	Forward	5'-TCGATAAGGG-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP13	Forward	5'-GTTTTCGCAG-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP15	Forward	5'-GATCCAGTAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP16	Forward	5'-GATCACGTAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP17	Forward	5'-GATCTGACAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP18	Forward	5'-GATCTCAGAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP24	Forward	5'-GATCTAGGTC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'

12 คู่ (ตารางที่ 1) ปฏิกริยา PCR ถูกเตรียมในปริมาตร 20 μ l ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ cDNA แม่แบบ จำนวน 2.0 μ l, dNTPs 200 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, oligo dT primer 1 μ M, arbitrary decamer primer (ตารางที่ 1) 0.2 μ M และ เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) จำนวน 1 unit ปฏิกริยา PCR ถูกควบคุมที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที และตามด้วยที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที/อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 นาที/อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที โดยทำซ้ำจำนวน 50 รอบ และสุดท้ายบ่มปฏิกริยา PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติม loading buffer (formamide 95%, NaOH 10 mM, bromophenol blue 0.25% และ xylene cyanol) จำนวน 6 μ l ลงใน ผลผลิต PCR ก่อนนำไปแยกขนาดชิ้นส่วน DNA บน denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (6%) โดยใช้กำลังไฟ 50 W เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และนำแผ่นเจล ไปย้อมด้วย silver staining และอบแผ่นเจลให้แห้งด้วย เครื่อง gel dryer (Amersham Bioscience) cDNA จำเพาะ เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับโคลนเข้าสู่ pGEM[®]-T easy vector (Promega) แล้วนำไปวิเคราะห์ ลำดับพันธุกรรม

การเพิ่มปริมาณแถบ DDRT-PCR และวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์

แถบ DDRT-PCR ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่าง สุกอร์ที่มีฟีนไทป์ด้านทาน หรืออ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ถูก ตัดจากแผ่นเจล และนำไปต้มในสารละลาย 2 x PCR buffer ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที และบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 4 °C ชั่วครู่ เพื่อแยกแถบ DNA ออกจากเจล สารละลายแถบ DNA ที่ได้ ถูกใช้เป็นแม่แบบ สำหรับเพิ่ม ปริมาณ DNA ด้วยปฏิกริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิม ที่ ตรวจพบความแตกต่างของแถบ DNA ในขั้นตอนการ วิเคราะห์ DDRT-PCR ผลผลิต PCR ที่ได้ถูกโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy vector (Promega) และวิเคราะห์ลำดับ พันธุกรรม (Nucleotide sequencing) ด้วยเครื่อง Automated Sequence CEQ8000 Genetic analysis system (Beckman-Coulter) ข้อมูลลำดับพันธุกรรมที่ได้ ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ด้วย โปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1997) โดยพิจารณา ความคล้ายคลึง (identity) จากค่า E-value ซึ่งต้องมีค่า น้อยกว่า 1e-10 และ/หรือมี overlapping region มากกว่า 100 bp ที่มีค่า identity มากกว่า 80% จึงจะถือว่ามีความ คล้ายคลึงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

การจำแนกยีนในไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรก่อนหย่านม

ผลการทดสอบ adhesion test ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม (ภาพที่ 1) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับตัวรับของ brush border มีค่าอยู่ระหว่าง 4-41 % และเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอ หรือต้านทาน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ มีค่าเฉลี่ยประมาณ 32 % (25-40%) ซึ่งพบในสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ในขณะที่ลูกสุกรที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* มีค่าเฉลี่ยประมาณ 7 % (4-9%) ซึ่งพบในสุกรพันธุ์พื้นเมือง ดังภาพที่ 2

การจำแนกยีนโดยเทคนิค DDRT-PCR

ผลการวิเคราะห์ยีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ด้วยเทคนิค DDRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ พบแถบ cDNA ที่มีขนาดในช่วง 150-570 bp จำนวนทั้งหมด 512 แถบ โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ สามารถผลิตแถบ cDNA ได้ตั้งแต่ 21- 84 แถบ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.67 แถบ/ไพรเมอร์ ในการศึกษาครั้งนี้เทคนิค DDRT-PCR สามารถตรวจพบแถบ cDNA ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างกลุ่มของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 (non-shared band หรือ specific band) จำนวน 12 แถบ (ภาพที่ 3) โดยเครื่องมือ DDRT-PCR จำนวน 5 แถบ ปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่ต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* K88 ซึ่งได้จากคู่ไพรเมอร์ dT₁₂VG-ZP6, dT₁₂VG-ZP13 และ dT₁₂VG-ZP18 จำนวน 1 แถบ (340 bp), 1 แถบ (460 bp) และ 3 แถบ (296, 230 และ 220 bp) ตามลำดับ สำหรับเครื่องมือ DDRT-PCR ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มของลูกสุกรที่อ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 มีจำนวน 7 แถบ โดยพบจากคู่ไพรเมอร์ dT₁₂VG-ZP1, dT₁₂VG-ZP17, dT₁₂VG-ZP18 และ dT₁₂VG-ZP24 จำนวน 1 แถบ (194 bp), 1 แถบ (188 bp), 3 แถบ (530, 297 และ 262 bp) และ 2 แถบ (350 และ 309 bp) ตามลำดับ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA-DDRT-PCR

เครื่องมือโมเลกุล cDNA-DDRT-PCR ที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 จำนวน 12 แถบ ถูกโคลนเข้าสู่ vector และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 5 (42 %) แถบ ที่ประสบความสำเร็จในการโคลน คือ ZP01B1, ZP17B1, ZP18B1, ZP18B3 และ ZP24B2 จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA ทั้ง 5 โคลน พบว่าความยาวของแถบ cDNA อยู่ระหว่าง 162-283 bp โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA (Expressed Sequence Tags, EST) ทั้งหมดปรากฏไพรเมอร์ทั้ง anchor และ arbitrary primer และเมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของ EST เหล่านี้กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า EST จำนวน 3 โคลน (ZP18B1, ZP18B3, ZP24B2) เหมือนกับยีนในฐานข้อมูล โดยโคลน ZP18B3 เหมือนกับ ยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (DPP1) ของไก่ (GenBank accession no. XM_417207) 99 % (identity) ซึ่งมีค่า E-value เท่ากับ 9e-121 ในขณะที่โคลน ZP24B2 คล้ายกับยีน S-adenosylhomocysteine hydrolase ของสุกร (AJ427478) 87 % (identity) และมีค่า E-value เท่ากับ 2e-14 สำหรับ EST-ZP18B1 คล้ายกับ EST ที่แสดงออกในตับของสุกร (AK232914) 98 % (identity) โดยมีค่า E-value เท่ากับ 2e-140 ส่วน ESTs จำนวน 2 โคลน (ZP01B1 และ ZP17B1) นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับยีน หรือ EST ใดในฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 2) โดย EST ทั้ง 5 โคลน ดังกล่าวนั้น พบเฉพาะในกลุ่มของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* K88

วิจารณ์

โรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม นับว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างมากและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อโรคตามมา สำหรับแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้อย่าง

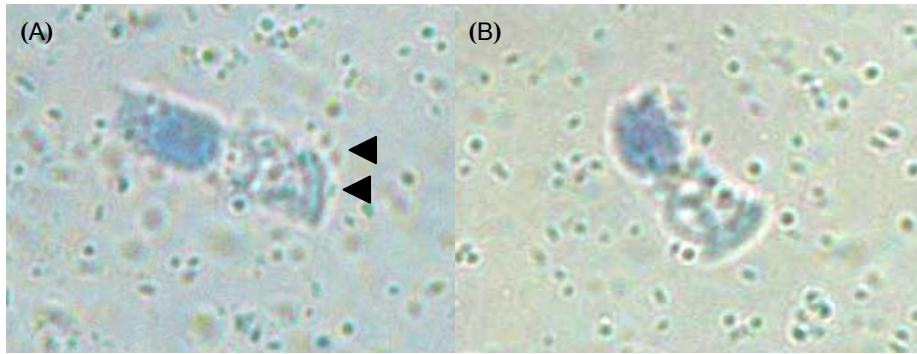


Figure 1 Adhesion of K88-*E. coli* to receptors on brush border (x40).

(A) Adhesion of *E. coli* K88 to the receptor. Arrows indicate adhered *E. coli* cell.

(B) No adhesion between K88-*E. coli* and the receptor.

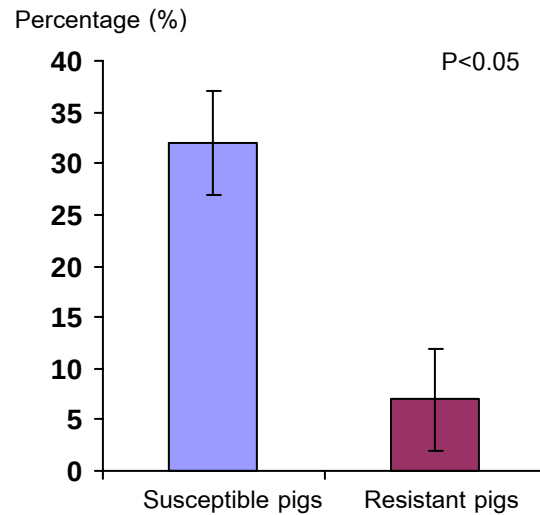


Figure 2 Percentage of adhesion of K88-*E. coli* to brush border on porcine small intestine.

ยั้งยีน คือ การใช้องค์ความรู้ทางอณูพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการคัดเลือกสุกรที่ต้านทานต่อโรคท้องร่วง ดังตัวอย่างที่ประสบความสำเร็จ คือการใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน alpha 1,2 Fucosyltransferase (*FUT1*) เพื่อคัดเลือกลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* F18 ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงของลูกสุกรในระยะหลังหย่านม (Meijerink *et al.*, 2000) แต่สำหรับปัญหาการเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านมนั้น มีสาเหตุจากเชื้อ

E. coli K88 โดยการยึดเกาะของเชื้อดังกล่าวกับ ตัวรับ (receptor) บน brush border ของผนังลำไส้เล็กได้หรือไม่ได้นั้น มีความสัมพันธ์กับลักษณะความอ่อนแอ หรือความต้านทานของลูกสุกร (Van den Broeck *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ยังไม่สามารถระบุถึงยีนที่เป็นสาเหตุของลักษณะดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ในการศึกษาครั้งนี้ได้พยายามศึกษาหา ยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์

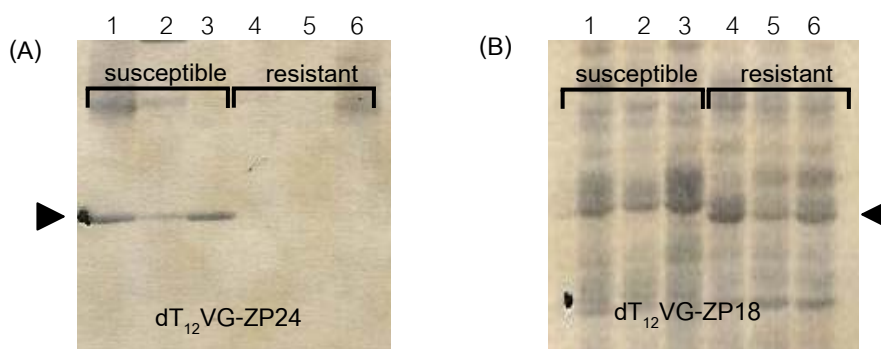


Figure 3 Differential display banding pattern of individual piglets obtained with the primer combination dT₁₂-VG-ZP24 (A) and dT₁₂-VG-ZP18 (B). Arrows indicate the position of differentially expressed cDNA bands of brush border cells from susceptible and resistant pigs.

Table 2 Sequence similarity and characterization of differentially expressed transcripts.

EST*	Length (bp)	Homology (GenBank accession no.)	Species	% similarity (bp)	E-value
ZP24B2	283	Dipeptidyl-peptidase I precursor (DPPI) (XM_417207)	chicken	99% (228/230)	9e-121
ZP18B3	262	S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) (AJ27478.2)	Pig	87% (84/96)	2e-14
ZP18B1	273	EST expressed in liver (AK232914)	pig	98% (264/267)	2e-140
ZP17B1	162	No homology	-	-	-
ZP01B1	170	No homology	-	-	-

* EST = expressed sequence tag.

ต้านทาน และอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 จากผลการทดสอบ brush border adhesion พบว่าลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอ มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* (37 %) สูงกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* (7 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยลูกสุกรที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* K88 พบในสุกรพันธุ์พื้นเมือง ส่วนลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 พบในสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baker *et al.* (1997) และ Sellwood (1980) ที่รายงานว่า การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* K88 กับ brush

border ในลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้า มีแนวโน้มสูงกว่ากับลูกสุกรพันธุ์พื้นเมือง

สำหรับการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border จากผนังลำไส้เล็กของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม ที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ด้วยเทคนิค DDRT-PCR ในการศึกษาครั้งนี้ พบเครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR จำนวน 12 เครื่องหมาย แต่ประสบความสำเร็จในการโคลน และวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ จำนวน 5 โคลน ในจำนวนนี้ 3 โคลน (ZP18B3, ZP24B2 และ ZP18B1) มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPPI*), ยีน S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) และ EST ที่แสดงออกในตับของสุกร ตามลำดับ ส่วน EST จำนวน 2 โคลน ที่เหลือนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับยีน หรือ EST ใดในฐานข้อมูลของ GenBank สำหรับยีน *DPPI* หรืออีกชื่อหนึ่งเรียกว่า cathepsin C เป็น cysteine protease ในกลุ่มไลโซโซม ที่มีคุณสมบัติในการตัดโมเลกุลของกรดอะมิโนสองตัวทำให้ออกจากโปรตีนหรือสายเปปไทด์ได้ (Hsiung *et al.*, 2005) ซึ่งสันนิษฐานว่า ยีน *DPPI* อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างโมเลกุลตัวรับบนเซลล์ brush border ที่มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (Francis *et al.*, 1998; Grange *et al.*, 2002) และเหมาะสมต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* K88 ที่ผนังลำไส้เล็กของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม จากการวิเคราะห์แผนที่ยีนเชิงเปรียบเทียบ (comparative gene mapping) ระหว่างคนและสุกร พบว่ายีน *DPPI* ในสุกรอยู่บนโครโมโซมที่ 2 สำหรับยีน *AHCY* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 17q22 ซึ่งยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ ที่มีอิทธิพลต่อตัวรับของเซลล์ brush border ที่ผนังลำไส้เล็กของสุกรอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ในคนยีน *AHCY* ควบคุมการผลิตเอนไซม์ S-Adenosylhomocysteine hydrolase ซึ่งมีบทบาทต่อการเปลี่ยน S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) ไปเป็น adenosine (Ado) และ L-homocysteine (Hcy) ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในร่างกายนอกจากนี้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ S-Adenosylhomocysteine ยังเกี่ยวข้องกับการกระบวนการ DNA methylation ในสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Hermes *et al.*, 2006) ดังนั้นผลการตรวจพบแถบยีน *AHCY* ซึ่งมีการแสดงออกในเซลล์ brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ที่อ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 แสดงให้เห็นว่ายีนนี้อาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของตัวรับบนเซลล์ brush border ของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม จากรายงานก่อนหน้านี้ Qi *et al.* (2004) ได้จำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม ด้วยเทคนิค DDRT-PCR โดยใช้มันเป็นอวัยวะเป้าหมาย ซึ่งพบยีนที่แสดงออกแตกต่าง

กันในสุกรที่อ่อนแอ คือ mammalian Nck adaptor protein 1 และ human LINE-1 reverse transcriptase ปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่อ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* เช่นกัน

เครื่องหมายโมเลกุล cDNA-DDRT-PCR ที่ได้จากการศึกษาหอยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม นั้น เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีศักยภาพต่อการศึกษายีนที่เป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรสดังกล่าว อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีนหรือ EST ดังกล่าว จะถูกยืนยันผลด้วยเทคนิค Quantitative real time PCR ต่อไป นอกจากนี้ยังมีวิธีการวิเคราะห์ functional genomics แบบอื่น อาทิเช่น microarray รวมถึงการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (proteomic analysis) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพต่อการค้นหา candidate gene ที่เกี่ยวข้องหรือควบคุมลักษณะความต้านทาน หรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรระยะก่อนหย่านมได้ โดยช่วยให้ทราบข้อมูลของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องหรือควบคุมลักษณะดังกล่าวได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุป

การค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทาน และอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 โดยเทคนิค DDRT-PCR จากการใช้ไพรมเมอร์ จำนวน 12 คู่ สามารถตรวจพบแถบ cDNA จำนวน 12 แถบ ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างสุกรทั้งสองกลุ่ม ในจำนวนนี้เครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR จำนวน 5 แถบ ประสบความสำเร็จในการโคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ โดยเครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR จำนวน 3 โคลน คือ ZP18B3, ZP24B2 และ ZP18B1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์กับเหมือนกับยีน *DPPI*, *AHCY* และ EST ที่แสดงออกในตับของสุกร ตามลำดับ ส่วน EST จำนวน 2 โคลน ที่เหลือนั้น (ZP01B1 และ ZP17B1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ไม่เหมือนกับยีน หรือ EST ใดในฐานข้อมูลของ GenBank

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และโครงการสร้างฐาน
ข้อมูลและพัฒนาบุคลากรด้านนาโนเทคโนโลยีทาง
การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Baker, D.R., L.O. Billey and D.H. Francis. 1997. Distribution of K88 *Escherichia coli*-adhesive and nonadhesive phenotypes among pigs of four breeds. *Vet. Microbiol.* 54: 123-132.
- Bauer, D., H. Muller, J. Reich, H. Riedel, V. Ahrenkiel, P. Warthoe and M. Strauss. 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21: 4272-4280.
- Francis, D.H., P.A. Grange, D.H. Zeman, D.R. Baker, R. Sun and A.K. Erickson. 1998. Expression of mucin-type glycoprotein K88 receptors strongly correlation with piglet susceptibility to K88 enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. *Infect. Immun.* 66: 4050-4055.
- Grange, P.A., M.A. Mouricout, S.B. Levery, D.H. Francis and A.K. Erickson. 2002. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesion variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. *Infect. Immun.* 70: 2336-2343.
- Hermes, M., H. Osswald and D. Kloor. 2006. Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine induced apoptosis in HepG2 cells. *Exp. Cell Res.* 313: 264-283.
- Hsiung, H.M., D.L. Smiley, X.Y. Zhang, L. Zhang, L.Z. Yan, L. Craft, M.L. Heiman and D.P. Smith. 2005. Potent peptide agonists for human melanocortin 3 and 4 receptors derived from enzymatic cleavages of human β -MSH(5-22) by dipeptidyl peptidase I and dipeptidyl peptidase IV. *Peptides* 26: 1988-1996.
- Hu, Z.L., J. Hasler-Rapacz, S.C. Huang and J. Rapacz. 1993. Studies in swine on inheritance and variation in expression of small intestinal receptors mediating adhesion of the K88 enteropathogenic *Escherichia coli* variants. *J. Hered.* 84: 157-165.
- Meijerink, E., S. Neuenschwander, R. Fries, A. Dinter, H.U. Bertschinger, G. Stranzinger and P. Vögeli. 2000. A DNA polymorphism influencing alpha(1,2) fucosyltransferase activity of the pig *FUT1* enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion. *Immunogenetics* 52: 129-136.
- Python, P. 2003. Genetic host determinants associated with the adhesion of *E. coli* with fimbriae F4 in swine. Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
- Python, P., H. Jörg, S. Neuenschwander, C. Hagger, C. Stricker, E. Bürgi, H.U. Bertschinger, G. Stranzinger and G. Vögeli. 2002. Fine-mapping of the intestinal receptor locus for enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac on porcine chromosome 13. *Anim. Genet.* 33: 441-447.

Sellwood, R. 1980. The interaction of the K88 antigen with porcine intestinal epithelial cell brush borders. *Biochim. Biophys. Acta* 632: 326-335.

Van den Broeck, W., E. Cox, B. Oudega and B.M. Goddeeris. 2000. The F4 fimbrial antigen of

Escherichia coli and its receptors. *Vet. Microbiol.* 71: 223-244.

Qi, X.H., Q. Zhang, P.Q. Liu, C.Y. Song and R.H. Xu. 2004. Screening specifically expressed ESTs related to piglet diarrhea resistance. *Acta Genetica Sinica.* 31: 251-256.
