สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 โรคท้องร่วงในลูกสุกร	3
2.2 ลักษณะปรากฏของตัวรับ (receptor)	3
2.3 ยีนที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม	6
2.4 การค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันด้วยเทคนิค DDRT-PCR	7
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	11
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	11
3.1.1 สารเคมีและสารละลาย	11
3.1.2 ชุด kits	12
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	12

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สัตว์ทดลอง 13
3.4 การจำแนกฟีโนไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม 15
3.4.1 การเตรียม brush border ของลำไส้ของลูกสุกร 15
3.4.2 เชื้อ *Escherichia coli* 15
3.4.3 Brush border adherence assay 16
3.5 การสกัดอาร์เอ็นเอ 16
3.6 DNase digestion 17
3.7 RNA clean up 17
3.8 β-actin PCR amplification 19
3.9 DDRT-PCR 20
3.9.1 การสังเคราะห์ first strand cDNA 20
3.9.2 การคัดกรองยีนที่แสดงออกแตกต่างกันโดยใช้เทคนิค DDRT-PCR 21
3.10 Reamplification 23
3.11 การสกัด DNA fragment จาก agarose gel 24
3.12 การโคลน cDNA fragment เข้าสู่เวกเตอร์ 24
3.13 การสกัด Plasmid DNA 26
3.14 Sequence Analysis 27
3.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 28
3.15.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการยึดเกาะ 28
3.15.2 การเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมกับทางข้อมูลทางพันธุกรรม 28

บทที่ 4 ผลการทดลอง 29
4.1 การจำแนกฟีโนไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม 29
4.2 การจำแนกยีนที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E.coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงโดยเทคนิค DDRT-PCR 32
4.3 การตรวจสอบโคลน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA-DDRT-PCR 34

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 41

5.1 การจำแนกฟีโนไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม 41

5.2 การจำแนกยีนที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E.coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง 42

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 46

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก 52

ประวัติผู้เขียน 57

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	Arbitrary 10 mer primers used for DDRT-PCR	9
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ของ DDRT-PCR ที่ใช้	22
3	เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับตัวรับบน brush border	29
4	คู่ไพร์เมอร์ที่พบแถบ cDNA ที่ปรากฏแตกต่างกัน	34
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับลำดับพันธุกรรมบนฐานข้อมูล	39

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

ภาพ		หน้า
1	เชื้อ *Escherichia coli*	4
2	ลักษณะของ fimbriae ที่ก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกร	4
3	brush border และตำแหน่งที่ตั้งบนผนังลำไส้	5
4	โคโลนีของเชื้อ *E. coli* บนผนังลำไส้	5
5	ไดอะแกรม Differential Display	8
6	ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมืองและสายพันธุ์ทางการค้า	14
7	การปรากฏของแถบอาร์เอ็นเอ	18
8	ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของ genomic DNA	21
9	เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157 (K88)	30
10	brush border ที่แยกได้จากผนังลำไส้	30
11	การยึดเกาะของเชื้อ K88- *E. coli* กับตัวรับบน brush border	31
12	เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับตัวรับ	22
13	ตัวอย่างรูปแบบ cDNA ของยีนที่แสดงออกใน brush border	33
14	การตรวจสอบตำแหน่งผลผลิต PCR ที่ได้จากการ reamplified	35
15	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	36
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP01B1 (susceptible)	36
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP17B1 (susceptible)	37
18	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP18B1 (susceptible)	37
19	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP18B3 (susceptible)	37
20	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP24B2 (susceptible)	38
21	Homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ PZP18B1 กับยีน *DDPI*	39
22	Homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ PZP24B2 กับ EST ของยีน *AHCY*	40
23	Comparative mapping ของยีน *DDPI* หรือ *CAPN1* ของสุกรกับคน	43

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
24	การทำงานของเอนไซม์ S-Adenosylhomocysteine hydrolase	44
25	ตำแหน่งของยีน *AHCY* บนโครโมโซมแท่งที่ 17 ของสุกร	44

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์

A	=	adenine
bp	=	base pair
APS	=	ammonium peroxydisisulfate
C	=	cytosine
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
ddH_2O	=	double distilled water
DDRT-PCR	=	Differential display reverse transcription-polymerase chain reaction
DEPC	=	diethylpyrocarbonate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	=	1, 4, Dithio theritol
E. coli	=	*Escherichia coli*
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
G	=	guanine
IPTG	=	Isopropyl β-D-galactopyranoside
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mRNA	=	messenger Ribonucleic acid
nm	=	nanometre
O.D.	=	optical density
^oC	=	centigrade
PBS	=	phosphate-buffered saline
PCR	=	polymerase chain reaction
pmol	=	picomol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	rotations per minute
T	=	tyrosine
TAE	=	Tris-acetate-EDTA
TE	=	Tris-EDTA
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
U	=	unit
µl	=	microlitre
W	=	watt
w/v	=	weight by volume
X-gal	=	5-Bromo 4-chloro 3-indodly-β-D-galactoside

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved