

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

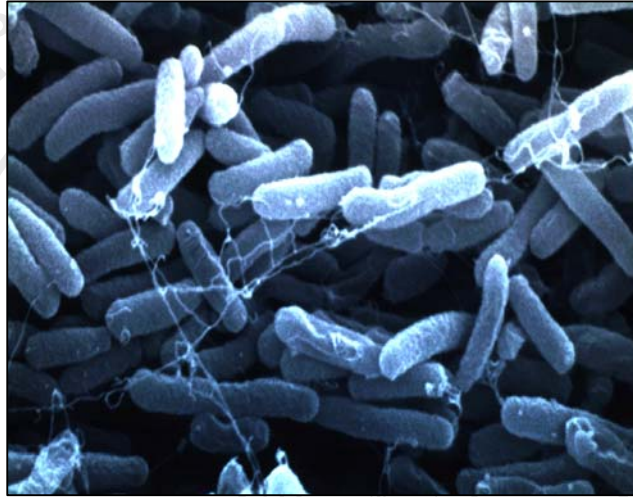
2.1 โรคท้องร่วงในลูกสุกร

โรคท้องร่วงมักจะเกิดขึ้นกับลูกสุกรในช่วงก่อนและหลังหย่านม ลักษณะเด่นของโรคนี้คือลูกสุกรมีอาการถ่ายอุจจาระเหลว และมีอัตราการตายสูงถึง 2.7% (Python *et al.*, 2002) โดยมี *Escherichia coli* (ภาพ 1) เป็นเชื้อสาเหตุ เชื้อ *E. coli* มีการสร้างแอนติเจนที่เป็น fimbriae 5 ชนิด (ภาพ 2) ได้แก่ F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F41 และ F18 โดยแอนติเจนชนิด F4 และ F18 fimbriae มักพบเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในสุกรช่วงหย่านม ในขณะที่ F18 fimbriae พบในสุกรช่วงหลังหย่านม และ F4 (K88) fimbriae มักพบเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรช่วงก่อนหย่านม (Python *et al.*, 2003) ลักษณะการก่อโรคของเชื้อ เริ่มต้นจากลูกสุกรได้รับเชื้อสาเหตุเข้าสู่ร่างกาย และเชื้อเข้ายึดเกาะอย่างจำเพาะเจาะจงกับตัวรับ บน brush border ของผนังลำไส้ (ภาพ 3) (Van den Broeck *et al.*, 2000) สร้างโคโลนี (ภาพ 4) และผลิตสารพิษที่ชักนำการขับของเหลวและอิเล็กโทรไลต์ออกสู่ช่องว่างของลำไส้เป็นปริมาณที่มากเกินความสามารถของลำไส้ที่จะดูดซึมกลับได้ทำให้เกิดอาการท้องร่วงขึ้น (วัลลภา, 2541)

2.2 ลักษณะปรากฏของตัวรับ (receptor)

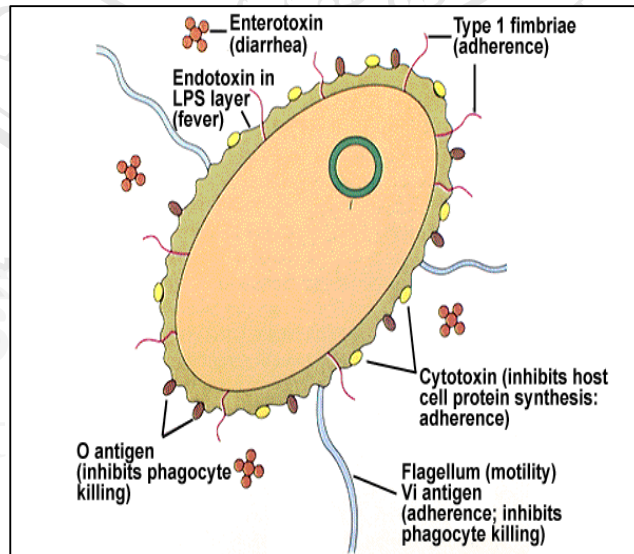
การเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกร เกิดจากการยึดเกาะระหว่าง K88-fimbriae ของเชื้อ *E. coli* กับตัวรับ บนผนังลำไส้ของลูกสุกร (Jeyasingham *et al.*, 1999) ซึ่งลักษณะอ่อนแอหรือต้านทานต่อเชื้อ K88-*E. coli* จะมีความสัมพันธ์กับการปรากฏตัวรับหรือไม่ปรากฏตัวรับ บนผนังลำไส้ สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี adhesion test โดยลูกสุกรที่อ่อนแอต่อโรคท้องร่วงนั้น จะมีการยึดเกาะระหว่าง K88 - fimbriae ของเชื้อกับตัวรับบนผนังลำไส้ได้ดี ในขณะที่ลูกสุกรที่ต้านทานต่อโรคท้องร่วงจะไม่พบการยึดเกาะแต่อย่างใด

Duchet-Sucheux *et al.* (1991) ได้ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ K88-*E. coli* ในลูกสุกร พบว่าลูกสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ซึ่งเป็นสุกรสายพันธุ์ทางการค้ามีอัตราการตายสูงถึง 96% ในขณะที่สุกรพันธุ์เหมยซานซึ่งเป็นสุกรพันธุ์พื้นเมืองของประเทศจีนมีอัตราการตายเป็น 0%

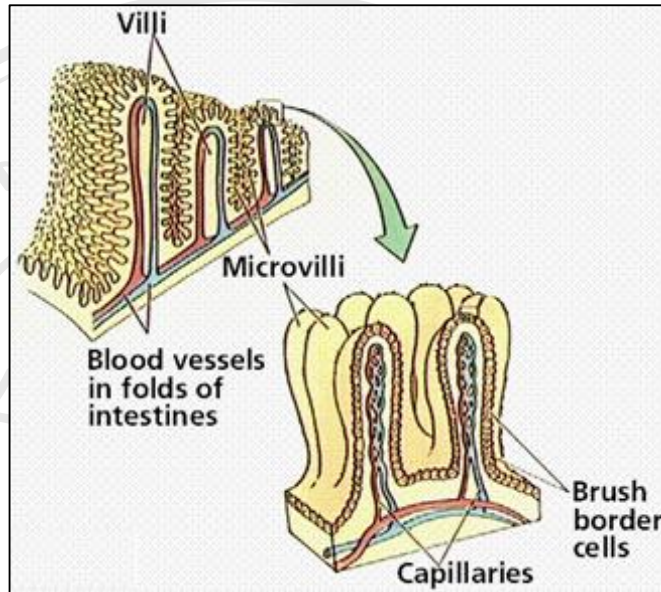


ภาพ 1 เชื้อ *Escherichia coli*

(ที่มา : <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/Pf07002.jpg>)

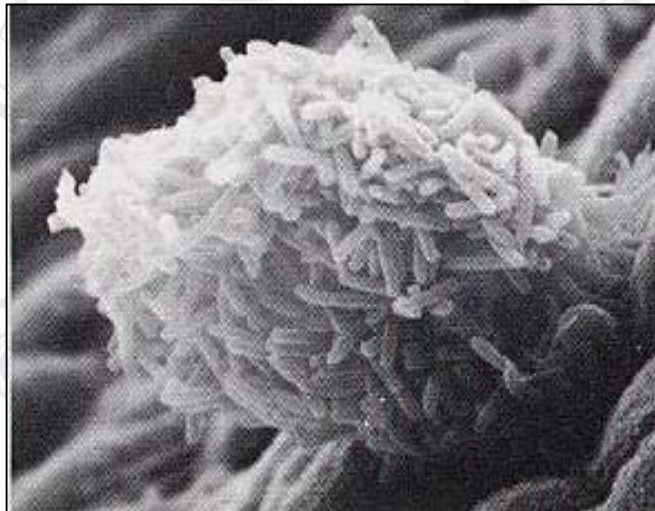


ภาพ 2 ลักษณะของ fimbriae ที่ก่อโรคท้องร่วงในลูกสุกร (ที่มา : http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect_25/FG19_015.GIF)



ภาพ 3 brush border และตำแหน่งที่ตั้งบนผนังลำไส้

(ที่มา : http://www.cals.ncsu.edu/course/zo250/brush_border.gif)



ภาพ 4 โคไลนิจของเชื้อ *E. coli* บนผนังลำไส้สุกร

(ที่มา : <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/Pf07002.jpg>)

2.3 ยีนที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* สาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม

การหาตรวจหาฟิโนไทป์ของตัวรับ โดยวิธี adhesion test สามารถใช้ในการจำแนกสุกรที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อ K88-*E. coli* ออกจากสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อโรคท้องร่วงได้ แต่่วิธีการตรวจสอบดังกล่าว จำเป็นต้องฆ่าสุกรก่อนจึงจะสามารถวัดค่าได้ ทำให้วิธีการดังกล่าวไม่สามารถใช้คัดสุกรพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อเชื้อ K88-*E. coli* ได้โดยตรง การใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์มาช่วยค้นหา ยีน สามารถทำให้ทราบถึงยีนที่มีการแสดงออกหรือเกี่ยวข้องกับปรากฏของตัวรับ บนผนังลำไส้ได้ Francis *et al.* (1998) พบว่าความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ K88 - *E. coli* กับผนังลำไส้ขึ้นขึ้นอยู่กับความผันแปรทางพันธุกรรมของสุกร และสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ นอกจากนี้ Hu *et al.* (1993) รายงานว่าลักษณะดังกล่าวนี้ ถูกควบคุมด้วยยีนที่ตั้งอยู่บนออโตโซม อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุถึงยีนที่เป็นสาเหตุของความต้านทานหรืออ่อนแอได้แน่ชัด จึงได้มีความพยายามค้นหาโมเลกุลตัวรับดังกล่าว ซึ่งพบว่าประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลหลายชนิด เช่น D-galactoside (Sellwood *et al.*, 1975), N-acetylgalactoseamine (Francis *et al.*, 1998) และ N-acetylglucoseamine (Van den Broeck *et al.*, 2000) แต่ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนดังกล่าวในปัจจุบันยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด สำหรับการศึกษาด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อค้นหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุของโรคท้องร่วงในสุกร ได้มีรายงานการศึกษา ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อเชื้อ F18-*E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรหลังหย่านม โดย Meijerink *et al.* (2000) รายงานว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *FUT1* (α 1,2 fucosyltransferase 1) มีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะของเชื้อ F18-*E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง โดยการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 307 ของยีน *FUT1* จากเบส G ไปเป็นเบส A ทำให้สุกรเกิดลักษณะความต้านทานต่อโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ F18-*E. coli* นอกจากนี้ Klukowska *et al.* (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *FUT1* ณ ตำแหน่งเบสที่ 307 ของลูกสุกรพันธุ์ Zlotnicka Spotted ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศโปแลนด์ในระยะหลังหย่านม พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีลำดับเบส ณ ตำแหน่ง 307 ของยีน *FUT1* เป็นอัลลิล A ซึ่งทำให้เกิดลักษณะความต้านทานต่อโรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ F18-*E. coli* สำหรับการศึกษาลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ในลูกสุกรก่อนหย่านม Python *et al.* (2002) รายงานว่า ยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อดังกล่าวตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 13 ของสุกรแต่ยังไม่สามารถระบุถึงยีนสาเหตุได้อย่างแน่ชัด (Python, 2003)

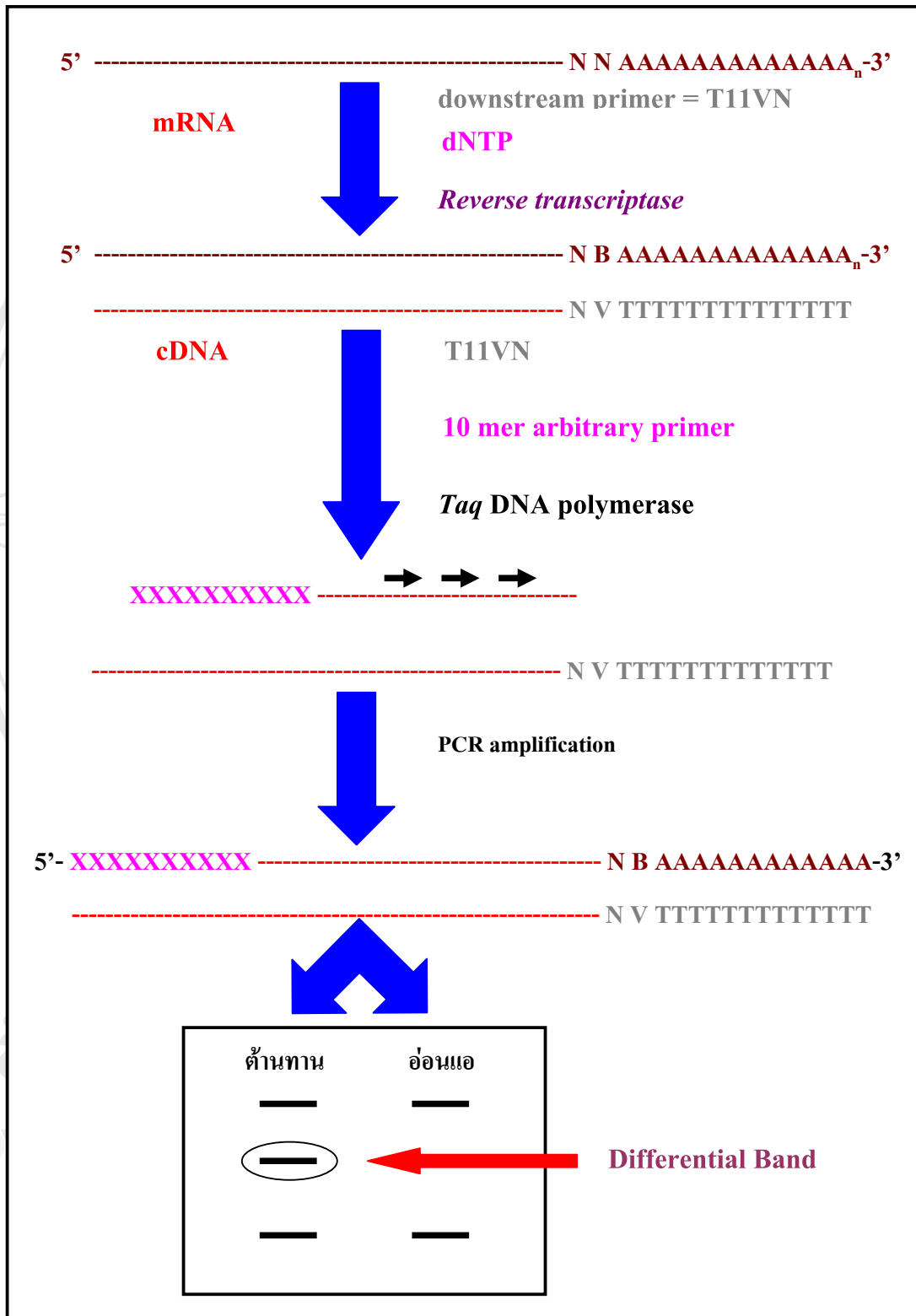
2.4 การค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันด้วยเทคนิค Differential display

เทคนิค Differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR) เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลวิธีการหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันโดยสามารถใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (Liang and Pardee, 1992) ประกอบด้วยขั้นตอนของการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA (ภาพ 5) โดยใช้ anchored primer และเอนไซม์ reverse transcriptase ตามด้วยการคัดกรองแถบ cDNA ด้วย random arbitrary primer จำนวน 26 ตัว (ตาราง 1) ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวถูกนำไปแยกความแตกต่างบน polyacrylamide gel electrophoresis และตัด specific band เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมโดยนำไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์

เทคนิค DDRT-PCR สามารถใช้ในการจำแนกการแสดงออกของยีนที่ออกแตกต่างกันได้ทั้งในสัตว์ พืช แมลง และจุลินทรีย์ และเป็นที่ยอมรับเนื่องจากสามารถปฏิบัติง่ายและได้ผลดี (Chen *et al.*, 2004) สำหรับในสัตว์มีการนำเอาเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหายีนที่ควบคุมหรือเกี่ยวข้องกับลักษณะของระบบทางสรีรวิทยาและการสืบพันธุ์ อาทิเช่น ใน กระจ่าง (Sabine *et al.*, 2001) โค (Sally *et al.*, 2002) ไก่ (Cao *et al.*, 1999; Wilfrid *et al.*, 2002) เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิค Differential display ยังถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาหาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนระหว่างเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน

ดังรายงานของ Clouscard *et al.* (1998) ที่ใช้เทคนิค Differential display ในการเปรียบเทียบยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างเซลล์จากรังไข่ของสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH) และกลุ่มควบคุม โดยพบยีนในเซลล์จากรังไข่ของสุกรที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนดังกล่าวมีปริมาณการแสดงออกที่ลดลง (down-regulated) ได้แก่ *bovine NADH dehydrogenase gene subunit 4*, *Xenopus chromosome sequence polypeptide E* และ *transformation sensitive protein*

Bertani *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค Differential display ในการศึกษาเปรียบเทียบยีนที่มีแสดงออกแตกต่างกันในต่อมใต้สมองส่วนหน้าระหว่างแม่สุกรที่ผ่านการคัดเลือกพันธุ์ที่มีอัตราการตกไข่สูงและอัตราการตายของตัวอ่อนต่ำกับแม่สุกรในกลุ่มควบคุม พบว่าในแม่สุกรที่ผ่านการคัดเลือกพันธุ์มียีนที่มีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้น (up-regulated) ได้แก่ G-beta link protein, ferritin heavy chain และ follicle stimulating hormone beta subunit



ภาพ 5 ไดอะแกรม Differential Display (ดัดแปลงจาก : <http://www.dean.pku.edu.cn/5p3.3-2.jpg>)

ตาราง 1 Arbitrary 10 mer primers used for DDRT-PCR

Primer name	Sequence (5'→3')	Primer name	Sequence (5'→3')
ZP1	TACAACGAGG	ZP14	GATCAAGTCC
ZP2	CTTTCTACCC	ZP15	GATCCAGTAC
ZP3	TTTTGGCTCC	ZP16	GATCACGTAC
ZP4	GGAACCAATC	ZP17	GATCTGACAC
ZP5	AAACTCCGTC	ZP18	GATCTCAGAC
ZP6	TCGATACAGG	ZP19	GATCATAGCC
ZP7	TGGTAAAGGG	ZP20	GATCAATCGC
ZP8	TGGATTGGTC	ZP21	GATCTAACCG
ZP9	TCGGTCATAG	ZP22	GATCGCATTG
ZP10	GGTACTAAGG	ZP23	GATCTGACTG
ZP11	TACCTAAGCG	ZP24	GATCATGGTC
ZP12	CTGCTTGATG	ZP25	GATCATAGCG
ZP13	GTTTTCGCAG	ZP26	GATCTAAGGC

ที่มา : Bauer *et al.* (1993)

Stephanie *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค Differential display ศึกษาการแสดงออกของยีนในช่วงการพัฒนาของตัวอ่อน (embryo) ของสุกร ที่อายุ 21, 35 และ 45 วัน พบว่ายีน CD3 γ -subunit, collagen XIV alpha1, complement component C6, crystalline- γ E, cranial development protein 1, forming binding protein 2, secreted frizzled related protein และ Vitamin D binding protein มีปริมาณการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นโดยแปรผันตามอายุของตัวอ่อนที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีน DNA binding protein B, E-globin, timin ribosomal protein L23 และ small acidic protein มีปริมาณการแสดงออกที่ลดลงโดยแปรผันตามอายุของตัวอ่อนที่เพิ่มขึ้น

Lopez *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค DDRT – PCR ศึกษารูปแบบการแสดงออกยีนที่ visceral white adipose tissue ในหนูที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไขมันสูงกับกลุ่มควบคุม พบว่า adiponectin, fibrillin-1, transferrin, Y-box binding protein-1, IgE receptor b chain (FceRIb), α -1 haemoglobin, and ribosomal proteins S10 and L7 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลอง ในขณะที่ยีน caveolin-

2, lactate dehydrogenase-A, mitochondrial 16S rRNA และ mitochondrial cytochrome oxidase subunit I/serine tRNA มีการแสดงออกลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่า ยีน adiponectin และ caveolin-2 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับโรคอ้วน ในขณะที่ยีนอื่น ๆ มีบทบาทในการส่งสัญญาณและการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของพลังงาน

Coutinho-Camill *et al.* (2006) ใช้เทคนิค DDRT - PCR ศึกษาการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของฮอร์โมนแอนโดรเจนในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (prostate cancer cell line LNCaP) ที่ได้รับสาร dihydrotestosterone และ bicalutamide เพื่อกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนแอนโดรเจน เป็นเวลา 6 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนที่ 48 ชั่วโมง พบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของเซลล์ เช่น การถอดรหัสดีเอ็นเอ การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ การสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมรวมถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้อง จำนวน 56 ยีน โดยพบว่าเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ถูกกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนแอนโดรเจนมีการแสดงของยีน *SPA17* และ *DDEF2* ซึ่งคาดว่าจะมีบทบาทและกลไกการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนแอนโดรเจน ภายในเซลล์ต่อมลูกหมาก

Bratanich and Blanchetot (2006) ใช้เทคนิค DDRT – PCR ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในต่อมน้ำเหลืองของสุกรที่เป็นโรค Porcine Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ Porcine Circovirus type 2 (PCV2) เปรียบเทียบกับสุกรปกติ พบยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะกลุ่มสุกรที่มีต่อมน้ำเหลืองติดเชื้อ PCV2 เท่านั้น อันได้แก่ ยีน RNA splicing factor and hyaluronan-mediated motility receptor (*RHAMM*)