

บทที่ 4

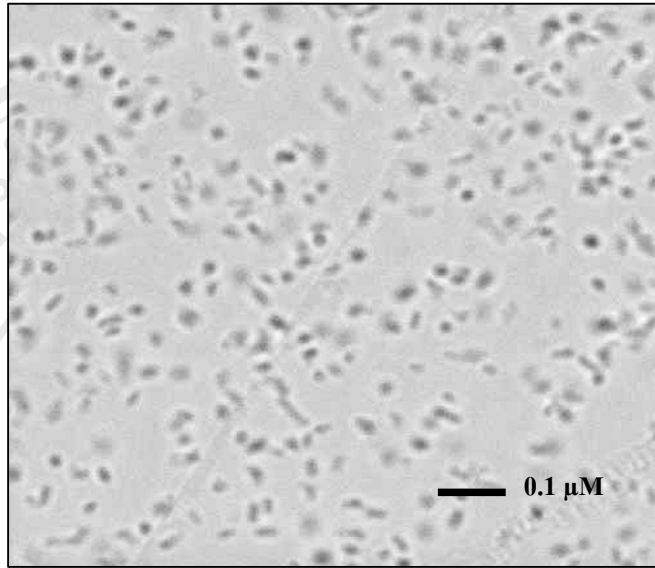
ผลการทดลอง

4.1 การจำแนกฟิโนไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม

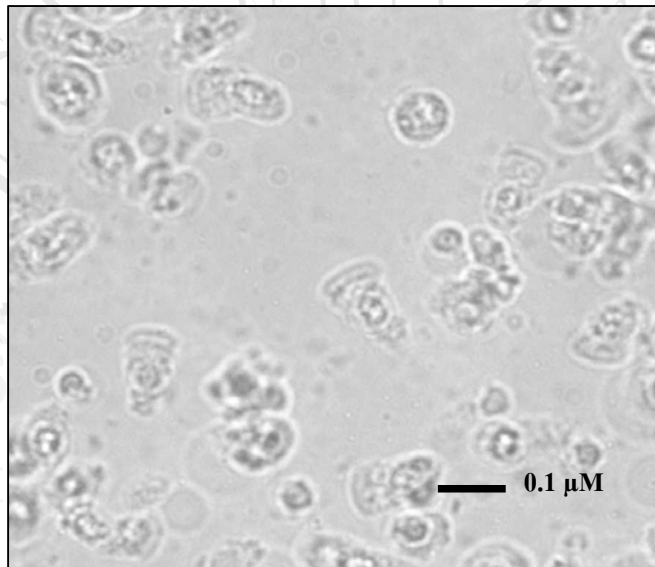
เชื้อ *E. coli* (ภาพ 9) ถูกใช้ทดสอบการยึดเกาะกับตัวรับ (receptor) ของ brush border (ภาพ 10) ในลูกสุกร เพื่อจำแนกกลุ่มฟิโนไทป์ที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วง ผลการทดสอบ adhesion test ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม (ดังภาพ 11) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับตัวรับของ brush border มีค่าอยู่ระหว่าง 4-41% (ดังตาราง 3) โดยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับตัวรับของลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้ามีค่าเฉลี่ยประมาณ 32% (25-40%) ในขณะที่ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมืองมีค่าเฉลี่ยประมาณ 7% (4-9.7%) ซึ่งต่ำกว่าลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ดังภาพ 12)

ตาราง 3 เปอร์เซนต์การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกับตัวรับบน brush border

สุกร	จำนวน brush border ที่มีแบคทีเรียเกาะมากกว่า 2 เซลล์	เปอร์เซนต์การยึดเกาะ	ฟิโนไทป์
พันธุ์ทางการค้า	10	25	อ่อนแอ
พันธุ์ทางการค้า	18	40	อ่อนแอ
พันธุ์ทางการค้า	13	31	อ่อนแอ
พันธุ์พื้นเมือง	2	4	ต้านทาน
พันธุ์พื้นเมือง	4	9.7	ต้านทาน
พันธุ์พื้นเมือง	3	7.1	ต้านทาน

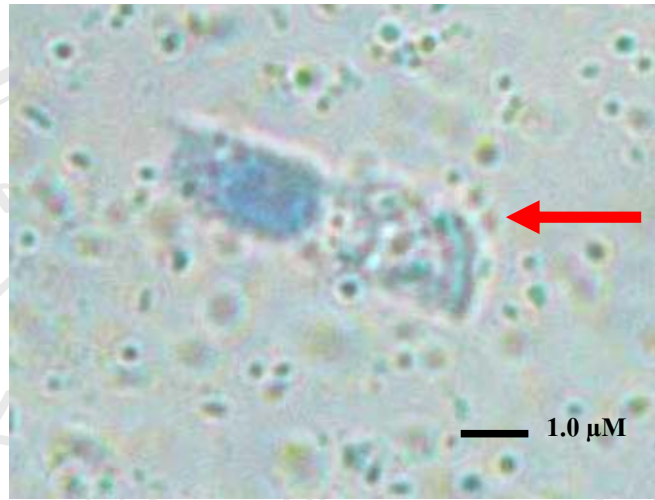


ภาพ 9 เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157 (K88) (x40)

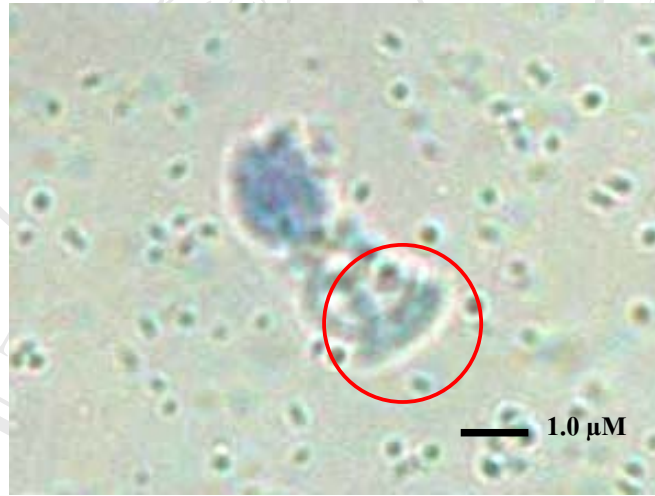


ภาพ 10 brush border ที่แยกได้จากผนังลำไส้ (x40)

(ก)



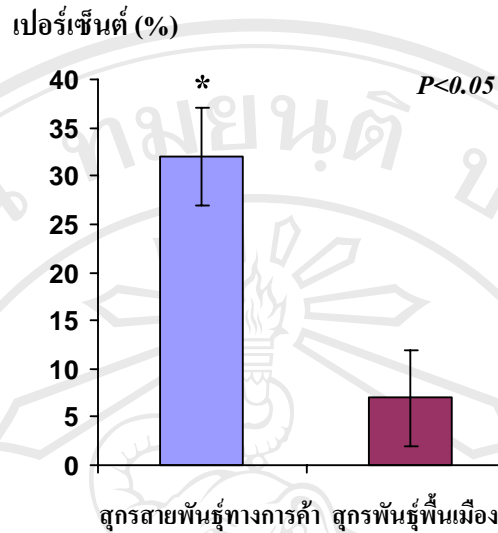
(ข)



ภาพ 11 การยึดเกาะของเชื้อ K88-*E. coli* กับตัวรับ บน brush border (x40)

(ก) แสดงการยึดเกาะของเชื้อ ตรงตำแหน่งลูกศร (←)

(ข) แสดง brush border ที่ไม่ปรากฏตัวรับของ K88-*E. coli*



ภาพ 12 เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกกันว่าตัวรับบน brush border บนผนังลำไส้ของลูกสุกร

4.2 การจำแนกยีนที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วง โดยเทคนิค DDRT-PCR

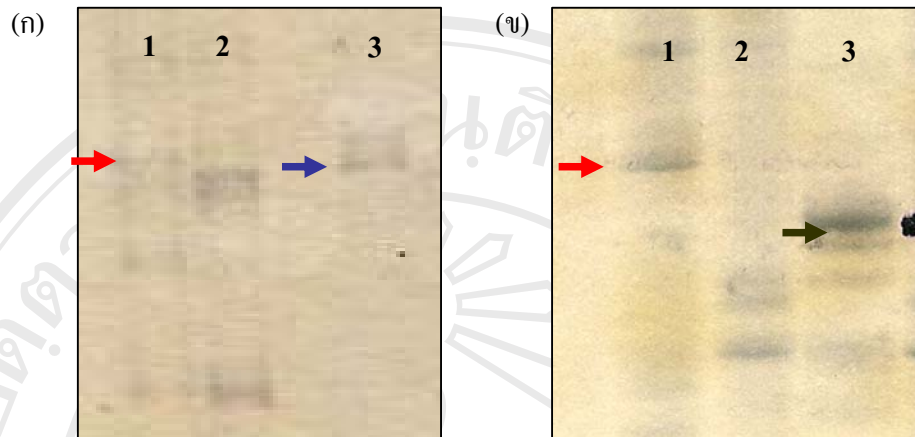
ผลการวิเคราะห์หายีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ด้วยเทคนิค DDRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 12 คู่ (anchor primer dT₁₂VG และ arbitrary primer) พบแถบ cDNA มีขนาดตั้งแต่ 151-573 bp มีจำนวนทั้งหมด 512 แถบ ซึ่งในแต่ละคู่ไพรเมอร์มีจำนวนแถบ cDNA โดยเฉลี่ย 42.67 แถบ (21-84 แถบ) ตัวอย่างแถบ cDNA ที่แสดงออกใน brush border แสดงดังภาพ 12 ในการศึกษาครั้งนี้พบ cDNA ที่ปรากฏเฉพาะในลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* (non-shared band หรือ specific band) จำนวน 12 แถบ โดยพบแถบ cDNA ปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่ต้านทานต่อเชื้อ K88-*E. coli* จำนวน 5 แถบ ซึ่งได้จากคู่ไพรเมอร์ dT₁₂VG-ZP6, dT₁₂VG-ZP13 และ dT₁₂VG-ZP18 จำนวน 1 (340 bp), 1(460 bp) และ 3 (296, 230 และ 220 bp) แถบ ตามลำดับ สำหรับแถบ cDNA ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มของลูกสุกรที่อ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* มีจำนวน 7 แถบ ซึ่งพบที่คู่ไพรเมอร์ dT₁₂VG-ZP1, dT₁₂VG-ZP17, dT₁₂VG-ZP18 และ dT₁₂VG-ZP24 จำนวน 1 (194 bp), 1(188 bp), 3 (530, 297 และ 262 bp) และ 2 (350 และ 309 bp) แถบ ตามลำดับ (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่พบแถบ cDNA ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างสุกรที่มีฟินโทปี้ด้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli*

Primer combinations	ฟินโทปี้ต่อเชื้อ K88- <i>E. coli</i>	
	อ่อนแอ	ด้านทาน
T ₁₂ VG-ZP1	1 (~ 194 bp)	0
T ₁₂ VG-ZP6	0	1 (~ 340 bp)
T ₁₂ VG-ZP13	0	1 (~ 460 bp)
T ₁₂ VG-ZP17	1 (~ 188 bp)	0
T ₁₂ VG-ZP18	3 (~ 530, 297 และ 262 bp)	3 (~ 296, 230 และ 220 bp)
T ₁₂ VG-ZP24	2 (~ 350 และ 309 bp)	0
รวม	7	5

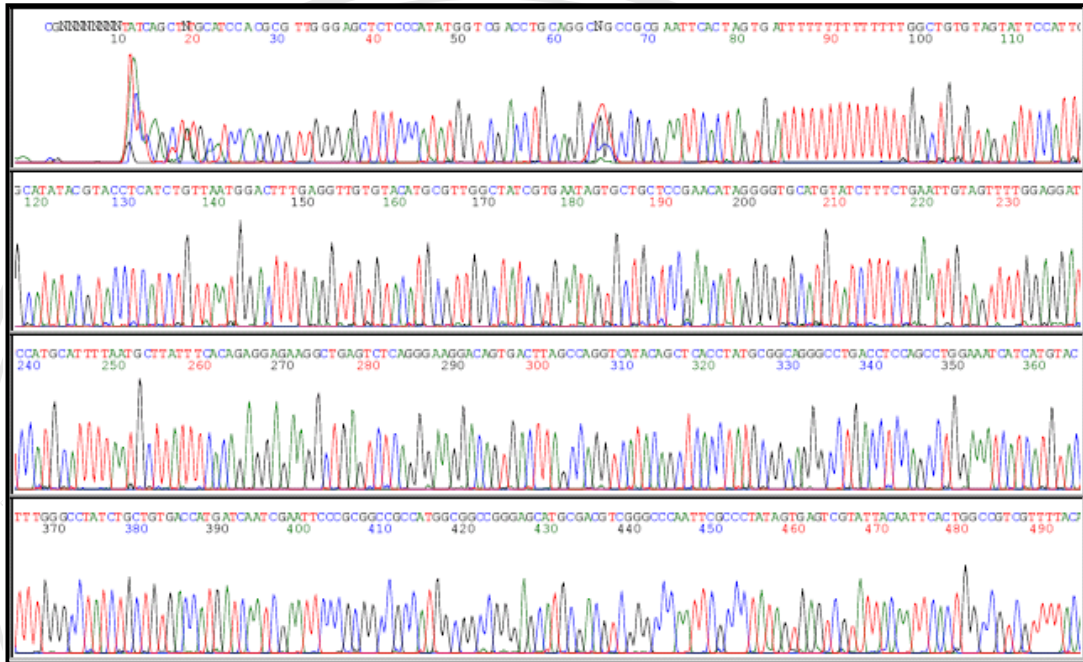
4.3 การตรวจสอบโคลน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA-DDRT-PCR

แถบ cDNA-DDRT-PCR ที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีฟินโทปี้ด้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* จำนวน 12 แถบ ถูกโคลนเข้าสู่ vector ในจำนวนนี้มีเพียง 5 แถบ (42%) ที่ประสบความสำเร็จในการโคลน อันได้แก่ ZP01B1, ZP17B1, ZP18B1, PZP18B3 และ PZP24B2 ภาพ 14 แสดงผลการตรวจสอบโคลนที่มีแถบ cDNA ถูกเชื่อมต่อเข้ากับ vector ได้ถูกต้องด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแถบ cDNA



ภาพ 14 (ก) แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งผลผลิต PCR ที่ได้จากการ reamplified แถบ cDNA-DDRT-PCR และ cDNA ถูกเชื่อมต่อย่างถูกต้อง (ข) แสดงโคลนที่มีแถบ cDNA ถูกเชื่อมต่อไม่ถูกต้อง หมายเลข 1 คือ แถบ cDNA ของยีนที่แสดงออกในกลุ่มสุกรที่อ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* หมายเลข 2 คือ แถบ cDNA ของยีนที่แสดงออกในสุกรที่ต้านทานต่อเชื้อ K88-*E. coli* หมายเลข 3 คือ reamplified cDNA band เครื่องหมาย → แสดงตำแหน่งของ original specific band โดยเครื่องหมาย → แสดงตำแหน่งของแถบ cDNA ที่ถูกต้อง และเครื่องหมาย → แสดงตำแหน่งของแถบ cDNA ที่ไม่ถูกต้อง

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA ทั้ง 5 โคลน พบว่าความยาวของแถบ cDNA อยู่ระหว่าง 162-283 bp ภาพ 15 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากเครื่อง automated sequencer และ ภาพ 16-20 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน ZP01B1, ZP17B1, ZP18B1, PZP18B3 และ PZP24B2 ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA ทั้งหมดปรากฏไพรเมอร์ทั้ง anchor และ arbitrary primer



ภาพ 15 แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากเครื่อง ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer

Reverse primer

ACAACAAAAAAACATTAAGGGAACCCACATACACGCAACCAATCAACAC
 CGCACACAACACGAACCGCATCACAAAGCACGCACGCCANCGACCTCACTC
 ACACACCACTCCAATCGGCCGCTCCACCGCCAACAACCCTCGACACNACG
 CAGAACAAGCAAGACAACAAGAACAAAAAA**CCTGCTACAA**

Forward primer

ภาพ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP01B1 ความยาวขนาด 170 เบส

Forward primer

GATCTCACAGTGGCGACGCAGGTCTGAGAAAGTCAACCGGAGCAACCGGGA
 AGTACCACCCTTAACGCCAGGACGGTGACCCTGTACCACCTTCGTATCGGT
 AGCAGAGTCCAGGCAGCCTTCTTCGGCGTCAACCTTGAAGAAAGAACCGCC
 CATGGTGTCCGAAACGA**CTATCAAAAATGAAA**

Reverse primer

ภาพ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP17B1 ความยาวขนาด 162 เบส

Forward primer

GATCTCAGACCAGGGNTTAGAAGGGCTGCTGCTTCTAGCAAAGAAGACTCA
 GCAGAATTTAGGGATTCAATAAATGTCCCCACGCTCCTCATCATCAGCATA
 TCCGCTTGTGAGAATTGCAGACCTCGGTTTGCATTTCACTGTATGTAAAAT
 TTATATTAGAAAAGGGATTGTTGGAGTTCCCACTGTGGTGCAGCATCTCTG
 CAGGGCACATGTGCACCTTGGGTGAAACTGCAGCTCAGATCTGATCCCTG
 GCTCAGGAACTCTACATGCCCGGGTGG**CCAAAAAAAAAAAA**

Reverse primer

ภาพ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP18B1 ความยาวขนาด 273 เบส

Reverse Primer

TTTTTTTTTTTTTGGGAGTGGGGTAATTTTTATTGAACTCTGAGATGATC
 AATTGCAAAGTACAGCAATAACAATCCAGAAGTGGAGCATTTAGTAACAGGC
 CAAAATGCAGAACTGATTTTCATCATCATAAGAGTTTGACTTGAGCTTTT
 GCAGGACACTTAAAGCTTTAAAATTTCCCTTTAATCAGCAAATTTGTCCAT
 TCCCTCCCCAACGCACACTTAAGTTCTAAACTGCAGTGACTTCCTGAT**TTC**

TGAGAAG

Forward primer

ภาพ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP18B3 ความยาวขนาด 236 เบส

Reverse primer

TTTTTTTTTTTTTTGGCTGTGTAGTATTCCATTGCATATACGTACCTCATC
 TGTTAATGGACTTTGAGGTTGTGTACATGCGTTGGCTATCGTGAATAGTGC
 TGCTCCGAACATAGGGGTGCATGTATCTTTCTGAATTGTAGTTTTGGAGGA
 TCCATGCATTTTAATGCTTATTTTACAGAGGAGAAGGCTGAGTCTCAGGGA
 AGGACAGTGACTTAGCCAGGTCATACAGCTCACCTATGCGGCAGGGCCTGA
 CCTCCAGCCTGGAAATCATCATGTACTTTGGGCCTATCTGCTGT**GACCATG**
ATC

Forward primer

ภาพ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ clone ZP24B2 ความยาวขนาด 283 เบส

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Expressed Sequence Tags (EST) กับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า EST จำนวน 2 โคลนเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล โดยโคลน ZP18B3 มีคล้ายกับยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPP1*) ของไก่ (accession no. XM_417207) ซึ่งมีค่า identity เท่ากับ 99% (228/230) และมีค่า E-value เท่ากับ $9e-121$ (ภาพ 21) ในขณะที่ โคลน ZP24B2 มีคล้ายกับยีน S-adenosylhomocysteine hydrolase ของสุกร (accession no. AJ427478.2) ซึ่งมี identity เท่ากับ 87% (84/96) และมีค่า E-value เท่ากับ $2e-14$ (ภาพ 22) โดย EST ทั้ง 2 โคลน (ZP18B3 และ ZP24B2) นั้นปรากฏเฉพาะในกลุ่มของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์อ่อนแอต่อเชื้อ K88-*E. coli* ซึ่งเชื้อสามารถยึดเกาะได้ดีกับ brush border บนผนังลำไส้ ส่วน ESTs จำนวน 3 โคลน (ZP01B1, ZP17B1 และ ZP18B1) ปรากฏว่าไม่เหมือนกับยีนหรือ EST ในฐานข้อมูลของ GenBank (ตาราง 5)

ตาราง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับพันธุกรรมบนฐานข้อมูล GenBank

EST	length (bp)	ยีนที่มีความคล้ายคลึง	สปีชีส์	Accession no. (BLASTN)	% similarity (bp)	E- value
ZP24B2	283	ยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (<i>DDPI</i>)	ไก่	XM_417207	99% (228/230)	9e-121
ZP18B3	262	S-adenosylhomocysteine hydrolase (<i>AHCY</i>)	สุกร	AJ427478.2	87% (84/96)	2e-14
ZP18B1	297	no homology	-	-	-	-
ZP17B1	162	no homology	-	-	-	-
ZP01B1	170	no homology	-	-	-	-

6	GGGTAATTTTATTGAACTCTGAGATGATCAATTGCAAAGTACAGCAATACAATCCAGAA	65
2223	GGGTAATTTTATTGAACTCTGAGATGATCAATTGCAAAGTACAGCAATACAATCCAGAA	2164
66	CTGGAGCATTAGTAACAGGCCAAAATGCAGAACTGATTTTCATCATCATAAGAGTTTGA	125
2163	CTGGAGCATATAGTAACAGGCCAAAATGCAGAACTGATTTTCATCATCATAAGAGTTTGA	2104
126	CTTGTAGCTTTTGCAGGACACTTAAAGCTTTAAATTTCCCTTTAATCAGCAAAAATTGTC	185
2103	CTTGTAGCTTTTGCAGGACACTTAAAGCTTTAAAGTTTCCCTTTAATCAGCAAAAATTGTC	2044
186	CATTCCCTCCCCAACGCACACTTAAAGTTCTAAACTGCAGTGACTTCCTGAT	236
2043	CATTCCCTCCCCAACGCACACTTAAAGTTCTAAACTGCAGTGACTTCCTGAT	1993

ภาพ 21 แสดง Homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ PZP18B1 กับยีน *DDPI*

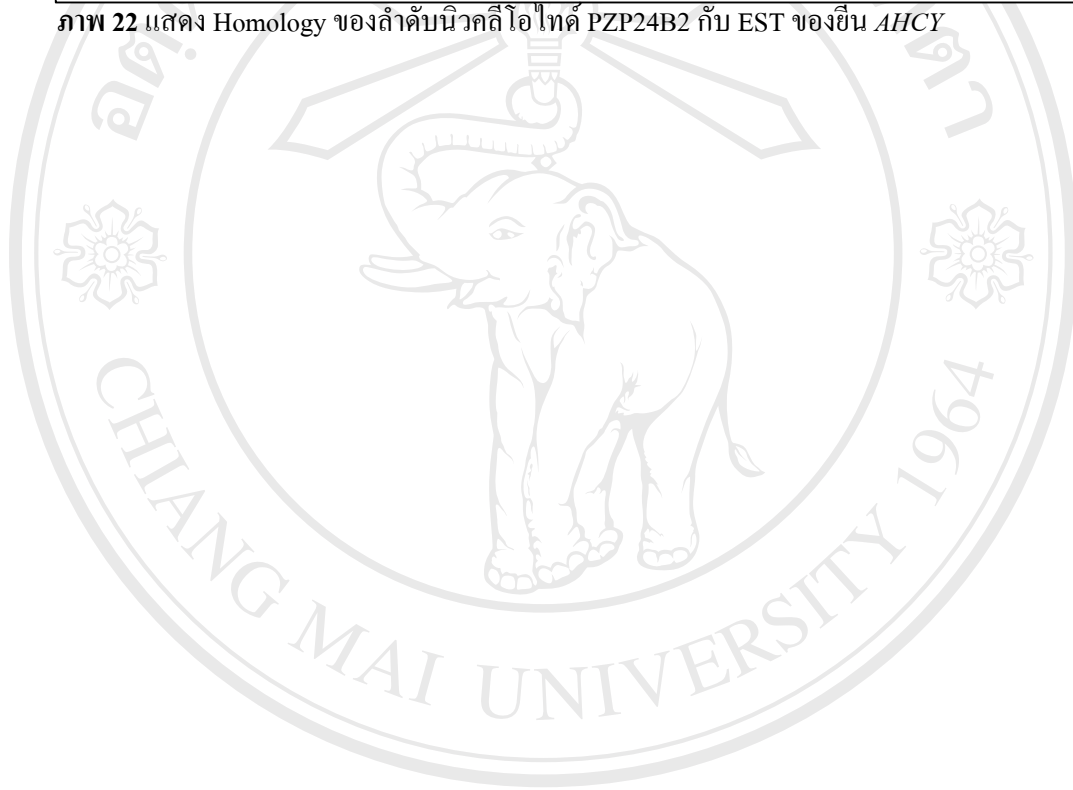
```

31 TCATCTGTTAATGGACTTTGAGGTTGTGTACATGCGTTGGCTATCGTGAATAGTGCTGCT 90
   ||||| ||||| || ||||| | |||| ||||| ||||| |||||
333 TCATCTGTCAATGGACATT-AGGTTGTTTCCATGTCTTGGCTATTGTGAATGGTGCTGCT 275

91 CCGAACATAGGGGTGCATGTATCTTTCTGAATTGTA 126
   ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
274 ATGAACATAGGGGTGCATGTATCTTTTGAATTGTA 239

```

ภาพ 22 แสดง Homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ PZP24B2 กับ EST ของยีน *AHCY*



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved