ความหลากหลายของยีนต้านทานไวรัส *(Mx1)* ในสุกร

Polymorphism of Porcine Myxovirus-resistance (*Mx1*) gene

สันติ ปินทุกาศ[1], คริสตอฟ คนอร์[2,4], รัชนีวรรณ กุมภคาม[3], เบอร์แทรม บรีนิค[2] และ เกศินี เกตุพยัคฆ์[1,2*]

Santi Pinthukas[1], Christoph Knorr[2,4], Ratchaneewan Kumphakam[3], Bertram Brenig[2] and Kesinee Gatphayak[1,2*]

บทคัดย่อ: โรคระบาดรวมถึงโรคอุบัติใหม่เป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรในปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคของสุกร จึงเป็นอีกวิธีที่จะใช้ในการคัดเลือกสุกรที่มีความต้านทานโรคตั้งแต่กำเนิดได้ ยีน *Mx1* เป็นยีนที่มีผลต่อการต้านทานเชื้อไวรัสและสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ จากการศึกษาถึงความหลากหลายของยีน *Mx1* ในสุกรสายพันธุ์ไทยพื้นเมือง เปรียบเทียบกับสุกรสายพันธุ์จีนและสุกรสายพันธุ์ยุโรป พบจุดกลายพันธุ์ (SNPs) ในแอกซอน 8 (*c. 1022C>G; 1078A>C*) มีค่าความถี่อัลลีลแตกต่างกันทางสถิติในทุกสายพันธุ์ (P<0.05) ในส่วนของแอกซอน 15 พบ silent point mutation (c. *2120G>T*) และ 11-bp indels (*c.2117_2128 indels CGGCGCCGGCT*) มีค่าความถี่อัลลีลแตกต่างกันทางสถิติในบางสายพันธุ์ (P<0.05) โดยเฉพาะค่าความถี่อัลลีลของการเกิดการกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่หายไป (11-bp indels) พบในสายพันธุ์เยอรมันแลนด์เลจและเพียเทรน ซึ่งอาจใช้ข้อมูลความแตกต่างอัลลีลของจุดกลายพันธุ์นี้ มาพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ของลักษณะความต้านทานไวรัสในสุกร

คำสำคัญ: สุกร ยีน Mx1

Abstract: Disease is a major problem in the swine production. The study of genes associated with disease resistance characteristics is used to select for innate immunity in swine. The *Mx1* gene was found to have potent antiviral affect against some virus and can be hereditary. The study of *Mx1* polymorphisms in among 3 pig breeds (Thai native pig breeds, Chinese pig breeds and European pig breeds) were found SNPs in exon 8 (*c. 1022C>G; 1078A>C*) that has allele frequencies of statistical significance between the breeds. (P<0.05) The two variant in exon 15 found silent point mutation (c. *2120G>T*) และ 11-bp

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[1] Department of Animal Science and Aquatic Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

[2] Department für Nutztierwissenschaften, Tierärztliches Institut, Abteilung Molekularbiologie der Nutztiere und Molekulare Diagnostik, Georg-August-Universität Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland

[3] สาขาวิชาคณิตศาสตร์และสถิติ มหาวิทยลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50200

[3] Department of Mathematics and Statistics, Maejo University, Chiang Mai 50290

[4] Department für Nutztierwissenschaften, Tierärztliches Institut, Abteilung Biotechnologie und Reproduktion landwirtschaftlicher Nutztiere, Georg-August-Universität Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland

*Corresponding author: tikki.cmu@googlemail.com

indels (*c.2117_2128 indels CGGCGCCGGCT*) that has allele frequencies of statistical significance in some breed (P<0.05)especially in German Landrace and Pietrain. These data could be developing to use as genetic marker for virus resistance in pig.

Key words: porcine, Gene, *Mx1*

บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร มักจะประสบปัญหาโรคระบาดและโรคอุบัติใหม่หลายโรค จึงทำให้ต้องมีการใช้วัคซีน หรือการใช้อาหารที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะแก่สุกร ซึ่งอาจจะส่งผลต่อผู้บริโภคที่อาจจะได้รับสารตกค้างในเนื้อสุกร ดังนั้นการคัดเลือกสุกรที่มีภูมิคุ้มกันหรือสามารถต้านทานต่อโรคได้ตั้งแต่กำเนิด (innate immunity) เพื่อนำมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ซึ่งอาจจะเป็นอีกวิธีที่ช่วยแก้ไขในเรื่องปัญหาของโรคสุกรได้ โดยศึกษาและวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเช่น ยีน Porcine Myxovirus-resistance (*Mx1*) ซึ่งยีนนี้ถูกถอดรหัสพันธุกรรม โดย Müller et al. (1992) เป็นยีนที่มีผลต่อการต้านทานเชื้อไวรัสในหลายๆ ชนิด เช่น porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS), vesicular stomatitis virus (VSV) (Asano et al., 2002), mengovirus และ Influenza virus การค้นคว้าวิจัยเพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของยีน *Mx1* ในสุกรจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เนื่องจากสามารถนำมาพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) สำหรับลักษณะความต้านทานไวรัสในสุกรได้ นอกจากนี้ความรู้เกี่ยวกับยีน *Mx1* ยังมีอยู่น้อย แม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับ Mx protein และจุดกลายพันธุ์ในเซลล์ของสุกรที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสได้ (Palm et al., 2007) และบางรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน *Mx1* ในสุกรสายพันธุ์จีนและสุกรสายพันธุ์ยุโรป (Morozumi et al., 2001) แต่ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของยีน *Mx1* ในสุกรสายพันธุ์ไทย ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างออกไปจากสุกรสายพันธุ์อื่น และอาจมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสได้ดีกว่า

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาถึงความหลากหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Mx1* ในสุกรสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ไทยพื้นเมือง สุกรสายพันธุ์จีน และสุกรสายพันธุ์ยุโรป และเพื่อศึกษาถึงพื้นฐานและวิเคราะห์จุดกลายพันธุ์ที่เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (Genetic marker) ของลักษณะการต้านทานไวรัสในสุกร

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ใช้สารละลายดีเอ็นเอของสุกรสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ คือ สุกรสายพันธุ์ไทยพื้นเมืองจำนวน 40 ตัว สุกรสายพันธุ์จีนพื้นเมือง 60 ตัว และสุกรสายพันธุ์ยุโรปแบ่งเป็น สายพันธุ์ลาร์จไวท์ 17 ตัว สายพันธุ์เยอรมันแลนด์เลจ 20 ตัว สายพันธุ์เพียเทรน 30 ตัว และสายพันธุ์ดูรอค 29 ตัว

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโทด์กับข้อมูลในฐานข้อมูลทางพันธุกรรมผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (GenBank) เพื่อเป็นการค้นหาจุดกลายพันธุ์ (Single nucleotide polymorphism, SNPs) หรือ deletion/insertion ในเบื้องต้น และนำไปสู่การวางแผนในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) สำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) ดังที่แสดงใน Table 1

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) และตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของสาย

DNA โดย 1% Agarose gel electrophoresis, Polymerase chain reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยเอนไซม์ *Nar*I และ *Nae*I และการเปรียบเทียบจุดกลายพันธุ์โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับเบสโดยตรง (Direct sequencing)

ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยชุดโปรแกรม DNASTAR Lasergene® (DNASTAR, Inc., USA) และข้อมูลความแตกต่างระหว่างความถี่อัลลีล (Allele frequencies) จากผลการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS, 2009)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Mx1* ของสุกรสายพันธุ์ไทย เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Mx1* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลทางพันธุกรรมผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ต เพื่อเป็นการค้นหา SNPs หรือ deletion / insertion ในเบื้องต้น ได้ผลดัง Table 2

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของแอกซอน 8 ใช้เทคนิคการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยตรง โดยพบตำแหน่งของ SNPs จำนวน 2 ตำแหน่ง และเมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์หาค่าความถี่อัลลีล พบว่าค่าความถี่อัลลีลของ SNPs ที่ตำแหน่งแรกภายในแอกซอน 8 (*c. 1022C>G*) มีค่าแตกต่างกันในทางสถิติ (P<0.05) โดยสุกรสายพันธุ์ไทยพื้นเมือง และจีนจะมีค่าความถี่อัลลีล G สูงกว่าสุกรสายพันธุ์ยุโรป ส่วน SNPs ตำแหน่งที่ 2 (*c. 1078A>C*) มีค่าความความถี่อัลลีลแตกต่างกันในทางสถิติทุกสายพันธุ์ (P<0.05) (Table 3) ในส่วนแอกซอน 15 พบ silent point mutation (c. *2120G>T*) และ 11-bp indels (*c.2114_2126 indels CGGCGCCGGCT*) (Figure 1) และเมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์หาค่าความถี่อัลลีลพบว่าค่าความถี่อัลลีลของ SNPs ทั้ง 2 ตำแน่งภายใน exon15 มีค่าความถี่อัลลีลแตกต่างกันทางสถิติในบางสายพันธุ์ (P<0.05) (Table 3) โดยเฉพาะค่าความถี่อัลลีลของ 11-bp indels จะมีค่าต่ำในสายพันธุ์ German Landrace และ Pietrain ซึ่งการหายไปของลำดับเบสนี้ส่งผลต่อการสูญเสียความสามารถในการต่อต้านเชื้อไวรัส (Palm et al., 2007)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาถึงความหลากหลายของยีน *Mx1* ของสุกรสายพันธุ์ไทยพื้นเมืองเปรียบเทียบกับสุกรสายพันธุ์จีน และสายพันธุ์ยุโรป พบว่าในส่วนของจุดกลายพันธุ์ทั้ง 2 ตำแหน่งภายในแอกซอน 8 มีค่าแตกต่างกันในทางสถิติทุกสายพันธุ์ (P<0.05) ส่วนการค้นหาความหลากหลายของยีนในแอกซอน 15 พบว่ามี silent point mutation อยู่ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 11-bp indels และเมื่อนำผลการทดลองไปวิเคราะห์หาค่าความถี่อัลลีลพบว่า มีค่าความถี่อัลลีล แตกต่างกันทางสถิติเพียงบางสายพันธุ์ (P<0.05) โดยเฉพาะค่าความถี่อัลลีลของ 11-bp indels จะมีค่าสูงในสายพันธุ์เยอรมันแลนด์เลจและเพียเทรน ซึ่งอาจจะส่งผลต่อความต้านทานไวรัสของสุกร แต่ละสายพันธุ์ที่จะแตกต่างกัน โดยเฉพาะในสุกรสายพันธุ์ไทยพื้นเมืองและสุกรสายพันธุ์จีนที่ไม่มีการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงของแอกซอน 15 เหมือนกับสุกรสายพันธุ์ยุโรป แสดงให้เห็นว่าสุกรสายพันธุ์ไทยพื้นเมืองน่าจะมีความสามารถในการต้านทานไวรัสได้ดีกว่าสายพันธุ์ยุโรป

เอกสารอ้างอิง

Asano, A., J.H. Ko, T. Morozumi, N. Hamasima, and T. Watanabe. 2002. Polymorphisms and the antiviral property of porcine Mx1 protein. J. Vet. Med. Sci. 64 **:**1085–1089.

Morozumi, T., C. Samantri, E. Nakajima, E. Kobayashi, A. Asano, T. Oishi, T. Mitsuhashi, T. Watanabe, and N. Hamasima. 2001. Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine *Mx1* gene. Biochem Genet. 39 **:** 251–260.

Müller, M., E.L. Winnacker, and G. Brem. 1992. Molecular cloning of porcine *Mx1* cDNAs : New members of a family of interferon inducible proteins with homology to GTP-binding proteins. Journal of Interferon Research 12 **:** 119–129.

Plam, M., M. Leroy, A. Thomas, A. Linden, and D. Desmecht. 2007. Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus crofa Mx1* locus. Journal of Interferon & Cytokine Res. 27 **:** 147-155.

SPSS: SPSS for Windows. 2009. Release 14.0 SAS Institute Inc., NC, USA.

Table 1 Primers to assess allele frequencies of polymorphisms within *Mx1* gene

Location	Oligonucleotides (5'-3')	T_A(°C)
Exon 8	CTTCGCTCTGCAAGCCCATG	58
	AACCTGACAGTGTCCGTTTC	
Exon 15 & 3'UTR	AAGCGCATCTCCAGCCACATC	60
	AAGACATTGGGCGTGAAAGG	

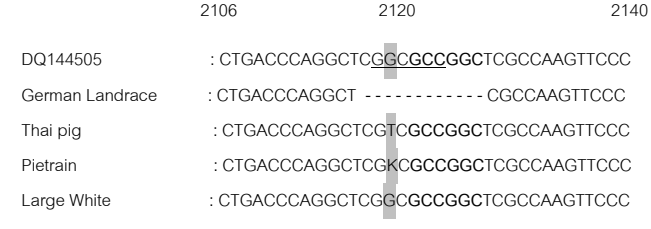

Figure 1 Sequence differences in exon 15. The *Nar*I recognition site is underlined, the mutation *c.[2120G>T]* is marked as a shaded box. The *Nae*I recognition site (in bold) identifies the presence or absence of the 11-bp sequence

Table 2 Comparison of SNPs between Thai native pigs with Genbank (Accession no. M65087)

Nucleotide				Methods for Genotyping
Exon	Position (M65087)	SNPs	Amino acid substitution	
8	1022	C/G	Asp to Glu[289]	Direct sequence
8	1078	A/C	Glu to Ala[308]	Direct sequence
15	2120	G/T	Arg to Arg	*PCR-RFLP by Nar I*
15	2114-2126	α/β*	11-bp Indels	*PCR-RFLP by Nae I*

* α = non-deleted, β = deleted alleles (11-bp deleted)

Table 3 Comparison of Allele frequencies between pig breeds

Breeds	N	Frequencies/Exon 8				Frequencies/Exon 15			
		Direct sequence *c.[1022C>G]*		Direct sequence *c.[1078A>C]*		RFLP-*Nar*I *c.[2120G>T]*		RFLP-*Nae*I *c.2117_2128indel*	
		C	G	A	C	G	T	α	β
Thai Pig	40	0.608	0.392[a]	0.566	0.434[a]	0.575	0.425[a]	0.950	0.050[a]
Chinese pigs	60	0.608	0.392[a]	0.716	0.284[b]	0.867	0.133[b]	1.000	0.000[b]
Large white	17	0.912	0.088[b]	0.853	0.147[b,c]	0.941	0.059[b]	0.971	0.029[a,b]
German Landrace	14	0.821	0.179[b,c]	0.714	0.286[a,b]	0.571	0.429[a]	0.571	0.429[c]
Pietrain	15	0.933	0.067[b]	0.933	0.067[c]	0.733	0.267[a,c]	0.733	0.267[c,d]
Duroc	20	0.750	0.250[a,c]	0.750	0.250[b]	0.825	0.175[b,c]	0.825	0.175[d]
Total	166	0.721	0.279	0.715	0.285	0.747	0.253	0.889	0.111

[a, b, c, d] Superscripts define significant differences between breeds ($P < 0.05$)