RESEARCH ARTICLE

# Development of F18 *Escherichia coli* Strain with Fluorescent Property

Praiboon Surakot[1], Preekamol Klanrit[2],
Niyomsak Upatoom[3], Netchanok Jiwakanon[3], Sarthorn Porntrakulpipat[4,5*]

## Abstract

**Objective**—To develop *E. coli* F18, the bacterial strain isolated from pigs, to have fluorescent property for antibiotic and herb tests.

**Materials and Methods**—*E. coli* F18 was isolated from mesenteric lymph nodes of post weaning pigs with diarrhea and edema and was not resistant to amplicillin. The pGFPuv plasmid was transformed into *E. coli* F18 to make it having fluorescent property. Then, the transformed *E. coli* F18 was tested for fluorescent property, antibiotic resistance, presence of gene *fed*A, ability to grow in LB medium, and persistence of pGFPuv plasmids. *E. coli* F18 without the plasmid transformation was used as a control.

**Results**—*E. coli* F18 with the plasmid transformation had ability to grow in LB agar and showed fluorescent property under UV light. It resisted to ampicillin, sulpha/trimethoprim, tetracycline, and lincomycin. *E. coli* F18 both with and without the plasmid transformation had gene *fed*A type F18ab. There was not significantly different in bacterial count between *E. coli* F18 with and without the plasmid transformation (mean ± SD, $38.83\pm94.1\times10^{10}$ CFU vs $34.33\pm7.3\times10^{10}$ CFU, respectively; $P>0.05$). In the test for persistence of pGFPuv plasmid, the pGFPuv plasmid was initially found lost in the third passage and the loss increased up to 73.6% in the tenth passage.

**Conclusion**—*E. coli* F18 with pGFPuv plasmid transformation exhibited fluorescent property and had a potential for use in antibiotic and herb tests.

*KKU Vet J. 2012;22(2):223-233.* http://vmj.kku.ac.th/

**Keywords:** *Escherichia coli* F18; Green fluorescent properties; Swine

[1] Master of Science Student in Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002
[2]Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Thailand 40002
[3]Veterinary Research and Development Center (Upper Northeastern Region), Khon Kaen, Thailand 40000
[4]Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen university, Thailand 40002
[5]Research Group for Preventive Technology in Swine and Ruminant Diseases, Khon Kaen University, Thailand 40002
[*]**Corresponding author** E-mail: sarthorn@kku.ac.th

# การพัฒนาเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ F18 ให้มีคุณสมบัติเรืองแสง

ไพรบูรณ์ สุระโคตร[1], ปรีย์กมล กลั่นฤทธิ์[2], นิยมศักดิ์ อุปทุม[3],
เนตรชนก จิวากานนท์[3], สาธร พรตระกูลพิพัฒน์[4,5*]

## บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อพัฒนาเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ F18 ที่คัดแยกได้จากสุกร ให้มีคุณสมบัติเรืองแสงเพื่อใช้ในการทดสอบยาปฏิชีวนะและสมุนไพร

**วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ** เชื้อ *E.coli* F18 ซึ่งคัดแยกได้จากปุ่มน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ ( mesenteric lymph node) ของสุกรที่ป่วยด้วยอาการท้องร่วงหลังหย่านม และมีอาการบวมน้ำ เป็นเชื้อไม่ดื้อต่อยา ampicillin ถูกนำมาทำการแปลงพันธุ์ (transformation) ให้มีคุณสมบัติเรืองแสงโดยการใส่พลาสมิด pGFPuv เข้าสู่เซลล์ของเชื้อดังกล่าว จากนั้น ทำการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อโดยดูการเรืองแสง ความไวต่อยาปฏิชีวนะ การตรวจหายีน *fedA* ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ และการคงอยู่ของพลาสมิด pGFPuv การทดสอบดังกล่าวใช้เชื้อ *E. coli* F18 ที่ไม่ถูกแปลงพันธุ์เป็นตัวเปรียบเทียบ

**ผลการศึกษา** พบว่าเชื้อ *E.coli* F18 ที่ถูกแปลงพันธุ์แล้วสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar และมีคุณสมบัติเรืองแสงเมื่อส่องผ่านเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin, Sulpha/Trimethoprim, Tetracyclin, และ Lincomycin พบยีน *fedA* ในเชื้อ *E. coli* F18 ที่ถูกแปลงพันธุ์และไม่ถูกแปลงพันธุ์ เป็นชนิด F18ab และพบว่าเชื้อ *E. coli* F18 ที่ถูกแปลงพันธุ์และไม่ถูกแปลงพันธุ์มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้ดีไม่แตกต่างกัน (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $38.83\pm94.1\times10^{10}$ CFU และ $34.33\pm7.3\times10^{10}$ CFU ตามลำดับ; $P>0.05$) ส่วนการทดสอบการคงอยู่ของพลาสมิดในเชื้อ *E. coli* F18 ที่ถูกแปลงพันธุ์พบว่าการเพิ่มจำนวนใน passage ที่ 3 เริ่มเห็นการหลุดของพลาสมิด โดยพบโคโลนีของเชื้อที่ไม่เรืองแสง และในการเพิ่มจำนวนใน passage ที่ 10 พบโคโลนีที่ไม่เรืองแสงร้อยละ 73.6

**ข้อสรุป** เชื้อ *E. coli* F18 ที่ถูกแปลงพันธุ์โดยการใส่พลาสมิด pGFPuv มีคุณสมบัติในการเรืองแสงและมีศักยภาพในการนำมาใช้ทดสอบยาปฏิชีวนะและสมุนไพร

*วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2555;22(2):223-233.* http://vmj.kku.ac.th/

**คำสำคัญ:** *Escherichia coli* F18; โปรตีนเรืองแสง; สุกร

[1]นักศึกษาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002
[3]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตอนบน) 40002
[4]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002
[5]กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการป้องกันโรคในสุกรและสัตว์เคี้ยวเอื้อง 40002
[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: sarthorn@kku.ac.th

## บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงสุกรในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงในเชิงอุตสาหกรรมมีการนำเทคโนโลยีใหม่ๆ เข้ามาใช้มีการนำเอาน้ำเชื้อและพ่อพันธุ์สุกรพันธุ์ดีจากต่างประเทศมาปรับปรุงสุกรในประเทศไทยให้มีความสามารถในการเจริญเติบโตเร็วขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดที่ขยายตัวเพิ่มขึ้นทั้งในและต่างประเทศแต่อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิตสุกรเช่นการจัดการอาหารสายพันธุ์สุกรและโรคติดเชื้อที่เกิดในสุกรโดยเฉพะอย่างยิ่ง โรคบวมน้ำ (edema disease) และท้องเสียในสุกรหลังหย่านมซึ่งเกิดจากเชื้อ *Escherichia coli*(*E. coli*) โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งต่อการผลิตสุกรโดยเฉพาะในสุกรเพิ่งหย่านมทำให้เกิดการสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรเป็นอย่างสูงลักษณะของโรคที่สำคัญคือสุกรที่เพิ่งหย่านมจะแสดงอาการท้องเสียเป็นน้ำ (watery diarrhea) ร่างกายสูญเสียน้ำ ( dehydration)น้ำหนักลดและบางครั้งอาจถึงตายสุกรบางตัวอาจแสดงอาการทางประสาทหรือมีการบวมน้ำของเปลือกตาและอาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ [2] นอกจากจะมีผลต่อสุกรโดยตรงแล้ว (มีอาการทางประสาทและท้องเสีย) โรคนี้ยังก่อให้เกิดผลทางอ้อมอีกหลายประการคือทำให้ผลผลิตสุกรลดลงสุกรเจริญเติบโตช้า ส่งผลให้เกษตรกรเลี้ยงสุกรนานขึ้นซึ่งทำให้รายจ่ายของฟาร์มหรือเกษตรกรสูงขึ้น

สาเหตุของโรคนี้เกิดจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดที่สร้างแอนติเจนชนิด F18+ (fimbrial-antigen) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้จะทำให้เกิดโรคในสุกรหลังหย่านมโดยการผลิตสารพิษออกมา(enterotoxins และ/หรือ shiga-like toxins) [5] fimbria F18 นั้นสามารถแยกด้วยการทำ PCR-RFLP ได้เป็นสองชนิดคือ F18ab และ F18ac ซึ่งความแตกต่างระหว่างสองชนิดคือการก่อโรคโดย *E.coli* ที่ผลิต F18ab นั้นมักจะผลิต Shiga toxin 2e ซึ่งจะก่อให้เกิดโรค edema disease ส่วน ชนิด F18ac นั้นมักพบใน enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคท้องเสีย fimbria F18 จะถูกควบคุมการสร้างสารพิษโดยยีน *fed A* ซึ่งมีขนาด 510 bp มีความสำคัญในการระบุชนิดของ F18 ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ตรวจสอบคือ PCR-RFLP test โดยใช้เอ็นไซม์ *Ngo*MI ตัดยีน *fed* A ถ้าเป็นชนิด F18ab จะไม่มีตำแหน่ง proline-encoding (CCG) เอ็นไซม์ *Ngo*MI จะไม่สามารถตัดได้ และถ้าเป็นชนิด F18ac จะมีตำแหน่ง proline-encoding (GCCGGC) เอ็นไซม์ *Ngo*MIจะสามารถตัดได้ [4, 6, 14]

ในปัจจุบันมีวิธีการควบคุมโรค edema disease และท้องเสียที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* หลายวิธีซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะและสมุนไพรในการควบคุมและป้องกันโรคดังกล่าวเป็นวิธีหนึ่งในวิธีเหล่านั้นมี

นักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของยาปฏิชีวนะและสมุนไพรชนิดต่างๆ โดยวิธีการป้อนเชื้อ *E. coli* ให้สุกรแล้วทำการรักษาโดยให้ยาปฏิชีวนะหรือสมุนไพรและตรวจประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยการตรวจปริมาณของเชื้อ *E. coli* ที่ขับออกมาพร้อมกับมูลของสุกรแต่วิธีการที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *E. coli* นั้นไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเชื้อ *E. coli* ที่ขับออกมานั้นเป็นเชื้อที่สนใจในการศึกษา (เชื้อที่ป้อนให้กับสุกร) หรือเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในตัวของสุกร ซึ่งนักวิจัยได้พยายามหาวิธีที่ใช้เพื่อการบ่งชี้ว่าเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชนิดเดียวกับที่ป้อนให้แก่สุกรหลากหลายวิธีเช่นการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ [15] โดยอาศัยคุณสมบัติในการต่อต้านยาปฏิชีวนะซึ่งในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *E. coli* หลายสายพันธุ์มีการพัฒนาในการต่อต้านยาปฏิชีวนะและเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ทั่วไปในลำไส้ของสัตว์วิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในปัจจุบัน [11] หรือการใช้เทคนิค PCR และ DNA probe [3] ซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อจำกัดในการปฏิบัติงานมากมาย เช่น มีขั้นตอนในการปฏิบัติงานหลายขั้นตอนและใช้เวลานานในการทดสอบและมีราคาแพง

สำหรับการทดลองนี้จะใช้เทคนิคทางด้าน molecular มาประยุคใช้ในการตรวจสอบและติดตามเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการ transformation พลาสมิด pGFPuv ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน green fluorescent protein (gfp) เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียซึ่งจะทำให้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเรืองแสงเมื่อส่องผ่านแสง UV และดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ F18 ให้มีคุณสมบัติในการเรืองแสงเพื่อติดตามเชื้อได้อย่างชัดเจนซึ่งจะเป็นอีกหนึ่งแนวทางในการทดสอบยาปฏิชีวนะและสมุนไพรให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### *เชื้อแบคทีเรีย*

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตอนบน) ผ่านการตรวจพิสูจน์ว่าเป็น *E. coli* F18 ด้วยการตรวจหายีน *fedA* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เชื้อ *E. coli* F18 ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วย Trizol® LS Reagent จากนั้นดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* F18 จะถูกนำมาตรวจหายีน *fed A* ด้วยวิธี PCR-RFLP ตามวิธีของ Imberechts et al,1992 [7] ดังมีวิธีการโดยสังเขปต่อไปนี้ คือทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ forward primer 5'-GTG AAA AGA CTA GTG TTT ATT TC -3' และ reverse primer 5'-CTT GTA AGT AAC CGC GTA AGC -3' ในขนาด 0.5 µM primers โดยในขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 55 °C นาน 1 นาที และ ขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 25 รอบจากนั้นนำ

ผลิตผลของ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis และนำมาตรวจสอบยืนยันว่าเป็นเชื้อ *E. coli* F18 ชนิด F18ab หรือ F18ac โดยนำผลิตผล PCR มาตัดด้วยเอ็นไซม์ *Ngo*MI บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง และวิเคราะห์แถบ DNA ด้วย gel electrophoresis และเชื้อไม่ดื้อต่อยา ampicillin

***การใส่พลาสมิด pGFPuv เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ E. coli F18 ด้วยวิธีการ chemical transformation***

เตรียม Competent cell [1] โดยใช้สารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ และทำการใส่พลาสมิด pGFPuv เข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* F18 [1] ด้วยวิธี heat shock และตรวจหาเซลล์ของเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับพลาสมิด pGFPuv โดยนำเซลล์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร LB agar ที่มียา ampicillin ผสมอยู่ ใช้ที่เกลี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อเกลี่ยให้เซลล์กระจายทั่วผิวหน้าของจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยผ่านเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต

***การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ E. coli F18***

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ 7 ชนิดได้แก่ Enrofloxacin, Sulpha/Trimethoprim, Ampicillin, Tetracyclin, Gentamicin, Kanamycin และ Lincomycin โดยวิธี Disc diffusion ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) มาแล้ว 5 ชั่วโมง มาปรับความขุ่นใน Normal saline solution จากนั้นใช้สำลีพันที่ไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้าจานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate(MHA) ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำแผ่นยามาวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดสอบไปอบ (Incu-bate) ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อุณหภูมิ 35-37 °C แล้วปล่อยให้เชื้อเจริญเติบโตในตู้อบนาน 18-20 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อมาอ่านผลการทดลอง

***การเพิ่มจำนวนของเชื้อ E. coli F18 ที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv***

เปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนระหว่างเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv โดยการนำเอาเชื้อจำนวน 3 โคโลนีเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-broth ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ampicillin บ่มในเครื่องแบบเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอาเชื้อมาเจือจางด้วย PBS ลดลงแบบสิบเท่า ดูดสารละลายเชื้อที่เจือจางปริมาตร 100 µl ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ตามระดับความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีและหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

***การทดสอบการคงอยู่ของพลาสมิด***

นำเอาเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับพลาสมิด pGFPuv เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเชื้อใน LB broth 2 ml ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ในเครื่องบ่มเพาะแบบเขย่า ความเร็วรอบ 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จำนวน 3 โคโลนีเป็นจำนวน 10 passage ทำการนับจำนวนเชื้อภาย

ใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อให้สารถมองเห็นโคโลนีที่เรืองแสง (เชื้อที่มีพลาสมิด pGFPuv) และเชื้อที่ไม่เรืองแสง (เชื้อที่ไม่มีพลาสมิด pGFPuv) ได้อย่างชัดเจน

***การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทางสถิติ***

เปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนระหว่างเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv วิเคราะห์เปรียบเทียบทางสถิติแบบ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS for WindowVersion 11.5

## ผลการศึกษา

***การตรวจหายีน fedA ด้วยวิธี PCR-RFLP***

ทำการตรวจตรวจหายีน *fed* A ที่มีขนาด 510 bp โดยใช้เทคนิค PCR พบว่าเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv มียีน *fed* A แสดง (**Figure1**) และผลการทดสอบระบุชนิดของเชื้อ *E.coli* F18 ว่าเป็นชนิด F18ab หรือ F18ac โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอ็นไซม์ *Ngo*MIตัดยีน *fed* A พบว่าเอ็นไซม์ *Ngo*MI ไม่สามารถตัดยีน *fed* A ได้ แสดงว่าไม่มีตำแหน่ง proline-encoding (CCG) ดังนั้นเชื้อ *E. coli* F18 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นชนิด F18ab ดังแสดงใน (**Figure2**)

***การใส่พลาสมิด pGFPuv เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ E. coli F18 ด้วยวิธีการ chemical transformation***

พบว่าเชื้อ *E.coli* F18 เมื่อผ่านกระบวนการ transformation แล้วสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ได้ และเมื่อนำเชื้อ *E. coli* F18 ซึ่งมีพลาสมิดpGFPuv ไปส่องผ่านแสงอัลตราไวโอเลตพบว่าเชื้อสามารถเรืองแสง (**Figure3**)

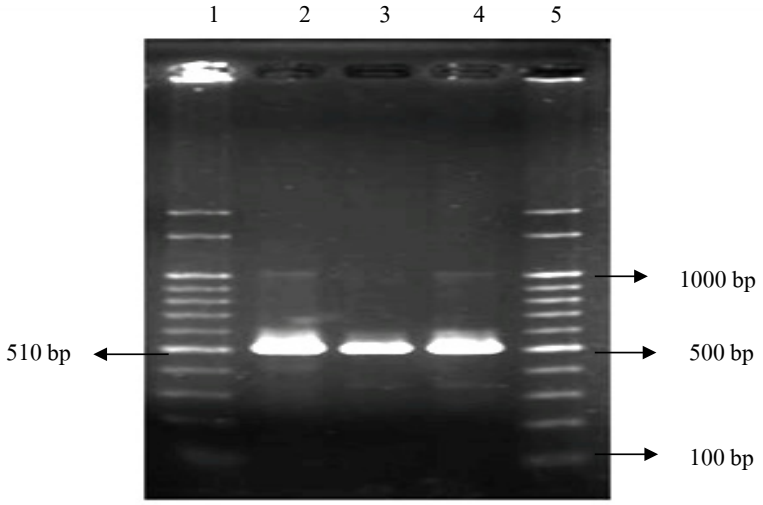
***การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ E. coli F18***

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *E. coli* F18 ที่ไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv นั้นมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin, Ampicillin, Gentamicin และ Kanamycin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Sulpha/Trimethoprim, Tetracyclin และ Lincomycin ส่วนเชื้อ *E. coli* F18 ที่ได้รับพลาสมิด pGFPuv นั้นมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Enrofloxacin, Gentamicin และ Kanamycin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin, Sulpha/Trimethoprim, Tetracyclin, และ Lincomycin

***การเพิ่มจำนวนของเชื้อ E. coli F18 ที่ได้รับพลาสมิดและไม่ได้รับ พลาสมิด pGFPuv***

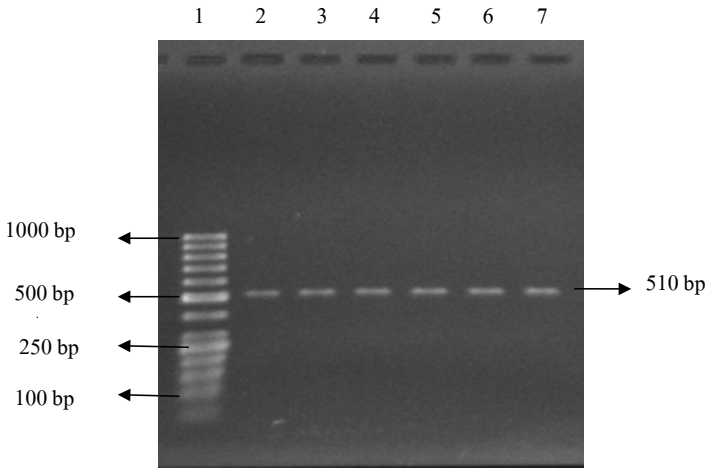
จากผลการทดลองเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนระหว่างเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับพลาสมิดและไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv โดยการนำเอาเชื้อทั้งสองเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB-broth ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ampicillin บ่มในเครื่องแบบเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37 $^{o}$C นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดมีการเพิ่มจำนวนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับพลาสมิด pGFPuv มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ$38.83\pm94.1\times10^{10}$CFU/ml และเชื้อ *E.coli*F18 ที่ไม่ได้รับพลาสมิด pGFPuv มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $34.33\pm7.3\times10^{10}$CFU/ml

**Figure 1.** Detection of Gene *fed*A by PCR




Analysis of the DNA by gel electrophoresis lane 1 and lane 5: Marker 100 bp, lane 2: Gene *fed* A positive control, lane 3: *fed* A gene from bacteria *E.coli* F18 a plasmid pGFPuv. , lane 4: *fed* A gene from bacteria *E.coli* F18 that are not plasmid pGFPuv.

**Figure 2.** Test results Indicating the Type of Infection *E.coli* F18 ( F18ac and F18ab ) Using PCR-RFLP




Analysis of the DNA by gel electrophoresis lane 1: DNA Marker 50 bp, lane 2 to lane 7: fed A gene with the enzymes *NgoMI*.

***การทดสอบการคงอยู่ของพลาสมิด***

การทดสอบการคงอยู่ของพลาสมิด ทำการทดลองโดยการเพิ่มจำนวนเชื้อที่ได้รับพลาสมิด pGFPuv และเรืองแสงมาเพาะเลี้ยงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ LB-broth ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เป็นจำนวน 10 Passage พบว่าในการเพิ่มจำนวนใน passage ที่ 3 เริ่มเห็นการหลุดของพลาสมิดคือพบเห็นโคโลนีของเชื้อที่ไม่เรืองแสง และในการเพิ่มจำนวนใน passage ที่ 10 พบโคโลนีที่ไม่เรืองแสงร้อยละ 73.6 แสดงใน **Table 1**

**Figure 3.** *E.coli* F18 After pGFPuv Plasmid Transformation

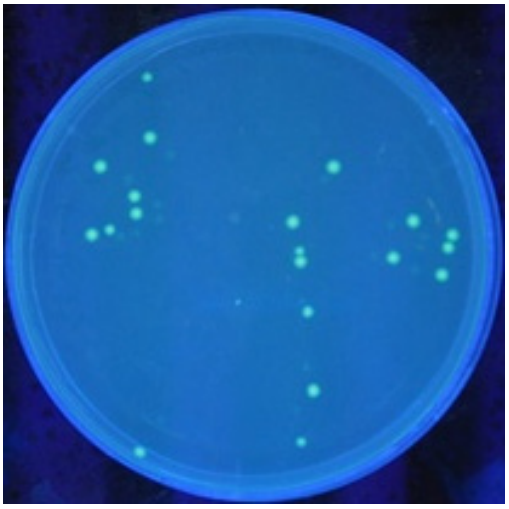


**Table1**. Results from Testing the Existence of Plasmids pGFPuv

| Passage | Sample with fluorescent ($\times 10^{10}$CFU/ml) | Sample without fluorescent ($\times 10^{10}$CFU/ml) | Percent (%) of colony without fluorescent |
|---|---|---|---|
| 1 | 31 | 0 | 0 |
| 2 | 37 | 0 | 0 |
| 3 | 42 | 5 | 11.9 |
| 4 | 39 | 15 | 38.4 |
| 5 | 40.5 | 20 | 49.3 |
| 6 | 36 | 21 | 58.3 |
| 7 | 49.5 | 29 | 58.5 |
| 8 | 46 | 27 | 58.6 |
| 9 | 38 | 23 | 60.5 |
| 10 | 47.5 | 35 | 73.6 |

## วิจารณ์

เชื้อ *E.coli* ต้นแบบที่นำมาทำการวิจัยเป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากสุกรอนุบาลที่เป็นโรค edema disease และท้องเสียโดยแยกได้จากต่อมน้ำเหลืองบริเวณเยื่อแขวนลำไส้ของสุกรป่วย คุณสมบัติสำคัญของเชื้อนี้ที่ทำให้ได้รับการคัดเลือกมาใช้ในการทดลองคือ เป็นเชื้อที่ไม่ดื้อต่อยา ampicillin ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นมาร์คเกอร์ในการคัดเลือกในขั้นตอนการทำ transformation ซึ่งเชื้อต้นแบบที่ไม่ได้รับ pGFPuv ซึ่งมียีนต้านยาampicillinจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา ampicillin ขณะที่เชื้อต้นแบบที่ได้รับ pGFPuv จะสามารถมีชีวิตรอดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยา ampicillin ได้ และสามารถผลิตโปรตีน gfp ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อส่องผ่านแสง UV ซึ่งคุณสมบัตินี้จะมีประโยชน์ในแง่ของการติดตามจำนวนของเชื้อในการทดลองต่างๆ เช่นการติดตามการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมและอาหาร และที่สำคัญสามารถนำมาใช้ในการติดตามเชื้อในเนื้อเยื่อสัตว์ หรือในสัตว์ที่ยังมีชีวิตได้ [12] หรือเมื่อนักวิจัยต้องการติดตามกลไกการเกิดโรคหรือการแพร่กระจายของเชื้อในสุกรก็สามารถนำเชื้อนี้ไปใช้ในการทดลองได้ซึ่งจะทำให้สามารถติดตามเชื้อที่ป้อนให้แก่สุกรและแน่ใจได้ว่าเชื้อที่ติดตามนั้นเป็นเชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ป้อนให้แก่สุกร ไม่ใช่เชื้อชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ก่อนในทางเดินอาหาร เนื่องจากมีรายงานว่าในทางเดินอาหารของสุกรมีเชื้อ *E. coli* อยู่ประจำถิ่นเฉลี่ย 2.4 ชนิด [8] ทำให้การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ศึกษาอาจรวมเชื้อประจำถิ่นไปด้วยก็ได้ ในปัจจุบันผู้ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อในทางเดินอาหารมักใช้คุณสมบัติการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อมาใช้ให้เป็นประโยชน์เพื่อใช้แยกเชื้อประจำถิ่นออกจากเชื้อที่ป้อนให้แก่สุกร [5] อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะพบว่าเชื้อประจำถิ่นมียีนที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดเดียวกับเชื้อที่เราทดสอบก็มีอยู่ ทำให้การใช้เชื้อที่มีคุณสมบัติเรืองแสง UV มาใช้ในการทดสอบจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่า อย่างไรก็ตามเชื้อที่ได้รับพลาสมิด นั้นควรมีคุณสมบัติคงเดิมเหมือนก่อนการได้รับพลาส-มิดซึ่งมีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อที่ได้รับพลาสมิดที่ทำให้มีคุณสมบัติเรืองแสง UV เพื่อเป็นมาร์คเกอร์พบว่าการ transform พลาสมิดชนิด high-copy numberให้แก่เชื้อ *E. coli* K-12 จะไปลดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยไม่สัมพันธ์กับการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนgfp [10] ส่วน ลักษณะสำคัญของเชื้อเช่น รูปร่าง ลักษณะทางซีรั่มวิทยา ลักษณะทาง biochemical และยีนที่บ่งความรุนแรงของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อ transform พลาสมิดซึ่งมียีน gfpให้แก่เชื้อ *E. coli* O157:H7 [13] ซึ่งการแก้ไขในเรื่องการลดการเจริญเติบโตของเชื้อนั้น [10] ได้แนะนำให้ใช้พลาสมิดที่เป็น low copy number หรือไม่ก็ทำการแทรกยีนเรืองแสงเข้าไปในโครโมโซมของเชื้อที่จะศึกษา ตามลำดับ ซึ่งวิธีแรกจะทำให้การตรวจหาเชื้อที่ผลิตโปรตีน gfp ค่อนข้างยากเนื่องจากมีการผลิตโปรตีน gfp น้อย ขณะที่วิธีที่สองนั้นยุ่งยากและซับซ้อน ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้พลาสมิด pGFPuv ซึ่งเป็น high-copy number มาใช้ในการ transform ให้แก่เชื้อ *E. coli* F18 ซึ่งเมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อ *E.coli* F18 ที่ไม่ได้รับ พลาสมิด pGFPuv เทียบกับเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับ พลาสมิดพบว่าเชื้อ *E. coli* F18 ยังคงรักษายีน *fed A* ซึ่งมีความสัมพันธ์ถึงลักษณะ

ความรุนแรงของเชื้อได้แก่การสร้างสารพิษ STa, STb และ SLT-IIV [9] เอาไว้ได้ และภายใต้สภาวะไร้แรงกดดันที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ampicillin เชื้อ *E. coli* F18 ยังคงสามารถรักษาพลาสมิด pGFPuv เอาไว้ได้ร้อยละ 100 ถึง 2 passages และใน passages ที่สามมีเชื้อเพียง 11.9 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สูญเสีย pGFPuv สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* F18 ที่ไม่ได้รับ พลาสมิด pGFPuv เทียบกับเชื้อ *E.coli* F18 ที่ได้รับพลาสมิดนั้นบ่งชี้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อที่ได้รับ pGFPuv นั้นไม่แตกต่างจากเชื้อที่ไม่ได้รับ pGFPuv ในสภาพที่ไม่เติม ampicillin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในการนำไปใช้ในการทดสอบโดยเฉพาะในสัตว์นั้นมักจะไม่มีการเติม ampicillin ลงไป ทำให้เชื้อ *E. coli* F18 ซึ่งได้รับ pGFPuv มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับเชื้อ *E. coli* F18 ที่ไม่ได้รับ pGFPuv ดังแสดงในการทดสอบ *in vitro*pGFPuv ซึ่งหากพิจารณาจากคุณสมบัติของเชื้อที่ได้กล่าวมาทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า เชื้อ *E. coli* F18 ซึ่งได้รับ pGFPuv เหมาะสำหรับใช้ในการทดสอบในสัตว์โดยเฉพาะในแง่ของการศึกษาการขับเชื้อออกมากับมูลสุกรภายหลังการได้รับเชื้อ

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการทดสอบในตัวสัตว์โดยเฉพาะในแง่ของการศึกษาการขับเชื้อออกมากับมูลสุกรภายหลังการได้รับเชื้อ

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและดูแลเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาของการศึกษา รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิยาลัยขอนแก่น และกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีการป้องกันโรคในสุกรและสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

1. Sirinda yoonchalad. Basic techniques of genetic engineering. Department of Biotechnology, Faculty of Technology Khon Kaen University. 1998.
2. Bertschinger HU. Postweaning *Escherichia coli* Diarrhea and edama Disease. In: Straw, B.E., D'Allair, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J.(Eds.), disease of swine. Iowa state University Press, Ames, IA, 1999. 441-454
3. Burlage RS, Palumbo AV, McCarthy J. Method efficiency and signal qantitation of bacteria for a groundwater transport experiment. In: Hinchee, R.E. (Ed.): Proceedings of the Third International In Situ and On Site Bioreclamation Symposium, San Diego, CA. Lewis Publishers, Boca Raton, EL. 1995.
4. Dean-Nystrom EA, Burkhardt D, Bosworth BT, and Welter MW. Presence of F18ac (2134P) fimbriae on 4P$^-$ *Esccheriichai coli* isolates from weaned pigs with diarrhea. *J. Vet*. 1997; 9: 77-79
5. Frydendahl KT, Jensen K, Anderso JS, Fredholm M, Evans G. Association between the porcine *E. coli* F18 receptor genotype and phynotype and susceptibility to colonization and postweaning diarrhea caused by *E. coli* O138:H18. *Vet Microb*. 2003; 93: 39-51.

6. Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet. Anal. Tech. Appl*. 1992; 9: 73-79

7. Imberechts H, De Greve H and Schlicker C. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, fedA. *Infect Immun.* 1992; 60: 1963–1971.

8. Katouli M, Lund A, Wallgren P, Kuhn I, Soderlind O and Mollby R. Phenoyypic Characterization of Intestinal *Escherichia coli* of Pig during Suckling, Postweaning, and Fattening Periods. *App Env Microb*. 1995; 61: 778-783

9. Nagy B, Whipp SC, Imberechts H, Bertschinger H.U, Dean-Nystrom EA, Casey TV And SalajKa EP. Biological relationship between F18ad and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pig with oedema disease or diarrhea. *Microb Pathog*.1997; 22:1-11.

10. Oscar TP, Dulal K and Boucaud D. Transformation of Escherichia coli K-12 with a High-Copy Plasmid Encoding the Green Fluorescent Protein Reduces Growth: Implications for Predictive Microbiologyt. *J. Food Prot*. 2006; 69: 276-281.

11. Robert S, Burlage K, Zamin, Yang and Tonia Mehlhorn. A transposon for green fluorescent protein transcriptional fusions:application for bacterial transport experiments. *Gene*. 1995; 173: 53-58.

12. Valdivia, Raphael H, Alexander E, Hromockyj, Denise Monack, Lalita Ramak rishnan. And Stanley Falkow. Applications for green fiuorescent (GFP) in the study of host pathogen interaction. *Gene*. 1996; 173: 47-52.

13. Vialette M, Jandos-Rudnik AM, Guyard C. Legeay O, Pinon A. and Lange M. Validating the use of green fluorescent-marked *Escherichia coli* O157:H7 for assessing the organism behavior in foods. *App Microb J.* 2004;96:1097-1104.

14. Wittig W, Prager R, Stamm M, Streckel W, Tscha¨pe H. Expression and plasmid transfer of genes coding for the fimbrial antigen F107 in porcine *Escherichia coli* strains. *Zbl Bakt.* 1994;281:130-139.

15. Wollum AG,Cassel DK. Transport of microorganisms in sand columns. *Soil Sci Soc Am J.* 1978;42:72-76.