

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATA2, LAT2, 4F2hc, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1, และ CAT2B ที่ช่วงต้นและช่วงให้น้ำนมสูงในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร

(A STUDY ON QUANTITATIVE GENE EXPRESSIONS OF AMINO ACID TRANSPORTERS; ATA2, LAT2, 4F2hc, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1 AND CAT2B, AT EARLY AND PEAK LACTATION IN PORCINE MAMMARY TISSUE)

โดย

1. รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. บุญฤทธิ์ ทองทรง

หัวหน้าโครงการวิจัย

2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.สฤณี กลั่นทกานนท์-ทองทรง

ผู้ร่วมวิจัย

3. นายสมพร แวงสูงเนิน

ผู้ร่วมวิจัย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
เดือนสิงหาคม ปีพ.ศ. 2552

### กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

ขอขอบคุณทุนการวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2550 (R 013\_2550) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในครั้งนี้ ผู้ดูแลฟาร์มสุกรรวมทั้งบุคลากรในฟาร์มทุกท่านที่มีส่วนช่วยสนับสนุนในการทำงาน คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการเอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้สาธารณูปโภคในการทำงานในห้องปฏิบัติการ และคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการพิจารณาให้ทุนและประเมินผลงานการวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ส่วนส่งเสริมและประสานงานวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านเอกสาร และดำเนินการตามขั้นตอนต่างๆ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ชื่อโครงการวิจัย** ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATA2, LAT2, 4F2hc, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1, และ CAT2B ที่ช่วงต้นและช่วงให้น้ำนมสูงในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร

**ชื่อผู้วิจัย** 1. รศ.น.สพ.ดร. บุญฤทธิ์ ทองทรง

2. ผศ.สพ.ญ.ดร.สฤณี กลั่นทกานนท์-ทองทรง

3. นายสมพร แวงสูงเนิน

**เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ** เดือนสิงหาคม ปีพ.ศ. 2551

### บทคัดย่อ

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบต่างๆ ได้แก่ LAT2, 4F2hc, ATA2, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1 และ CAT2B ในเซลล์เต้านมของแม่สุกรระยะให้นมช่วงต้น (วันที่ 9) และช่วงให้นมสูง (วันที่ 19) โดยใช้แม่สุกรพันธุ์ลูกผสมที่ผ่านการตั้งท้องมาแล้วมากกว่า 2 ครั้ง และมีสมรรถนะด้านผลผลิต ลักษณะของเต้านมและวันคลอดที่ใกล้เคียงกัน จำนวน 8 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 4 ตัว ในวันที่ 9 และวันที่ 19 ของระยะการให้น้ำนมเลี้ยงลูก ทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่ตำแหน่ง anterior vena cava ของแม่สุกรและลูกสุกร รวมทั้งเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเซลล์ผลิตน้ำนมจากเต้านมแม่สุกร โดยวิธีผ่าตัด ผลการทดลองในแม่สุกรไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับความเข้มข้นกรดอะมิโนอิสระในพลาสมาทั้ง 18 ตัว เมื่อเปรียบเทียบในวันที่ 9 กับ วันที่ 19 ของระยะให้นม ส่วนในลูกสุกรทั้งสองกลุ่ม พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เฉพาะ โพรลีน อาร์จินีน และไลซีน เท่านั้น เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ ดังกล่าวในเนื้อเยื่อเซลล์ผลิตน้ำนม พบว่ากลุ่มแม่สุกรซึ่งได้รับโภชนาการตามระดับความต้องการในวันที่ 9 ของระยะเลี้ยงให้นมลูก มีปริมาณการแสดงออกที่สูงของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ได้แก่ LAT2, ATA2, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1 และ CAT2B กว่าในวันที่ 19 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามยกเว้นยีนตัวที่เป็นตัวร่วมช่วยในการทำหน้าที่ของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่หลักของระบบ L ได้แก่ 4F2hc มีปริมาณการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะอธิบายผลการแสดงออกของยีนเพื่อการปรับตัวรองรับการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นและเตรียมจำนวนเซลล์ที่มากเพียงพอในการรองรับการผลิตน้ำนม

---

**คำสำคัญ:** ระยะการให้น้ำนม เนื้อเยื่อเต้านม ตัวขนส่งกรดอะมิโน การแสดงออกของยีน แม่สุกร

---

**Project Title:** A STUDY ON QUANTITATIVE GENE EXPRESSIONS OF AMINO ACID TRANSPORTERS; ATA2, LAT2, 4F2hc, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1 AND CAT2B, AT EARLY AND PEAK LACTATION IN PORCINE MAMMARY TISSUE.

**Name of the Investigators:** 1. Associate professor Dr. Boonrit Thongsong  
2. Assistant professor Dr. Sarinee Kalandakanond-Thongsong  
3. Mr. Somporn Wangsoongnoen

**Year:** August 2008

### Abstract

The objective of this study was to determine the physiological changes in the early (day 9<sup>th</sup>) and peak (day 19<sup>th</sup>) stage of lactation on the quantitative mRNA expression of these amino acid transporters; LAT2, and 4F2hc (System L and heterodimer), ATA2 (System A), ASCT1 (System ASC), ATB<sup>0+</sup> (System B<sup>0+</sup>), CAT1, and CAT2B (System y+) in lactating porcine mammary cell. Eight multiparous crossbred lactating sows were randomly divided into 2 groups based on their equal productive performances, mammary gland conformation and farrowing day. Blood samples of sows and their piglets were collected via anterior vena cava puncture and mammary tissue samples of sows were obtained by incisional biopsy on d 9 and 19 of lactation. For 18 free amino acids in blood plasma, no significant effect of the two different stages was observed in sows but proline, arginine and lysine in suckling piglets were changed significantly ( $P < 0.05$ ). To focus on the stages of lactation, sows in early lactation (day 9) with normal dietary nutrients showed enhancement in quantitative mRNA expression of variety amino acid transporters; LAT2, ATA2, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1 and CAT2B in mammary secretory cells when compared to those in peak lactation (day 19). On the other hand, no significant difference in quantitative mRNA expression of supporting transporter; 4F2hc, of system L was found between these lactation periods. One possible explanation of this might be to adjust their physiological functions involved in the adaptation to mammary cell proliferation and differentiation for milk production.

**Keywords:** lactation, mammary cell, amino acid transporter, mRNA expression, sow

## สารบัญ

	หน้า
บทนำ (Introduction)	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)	2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of related literature)	2
- การพัฒนาของเต้านมสุกรช่วงอู้มท้องและให้นม	2
- การใช้ประโยชน์ของกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรช่วงให้นม	3
- ปัจจัยจากระยะของการให้น้ำนมที่มีผลต่อการนำเข้ากรดอะมิโน และการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร	4
- คุณสมบัติของตัวขนส่งกรดอะมิโนที่สนใจศึกษา	5
วิธีการดำเนินงานวิจัย (Procedure)	6
- สัตว์ทดลอง	6
- อาหารทดลอง	7
- การเก็บตัวอย่างนำไปตรวจในห้องปฏิบัติการ	8
- การแสดงข้อมูลผลการทดลอง	10
- การวิเคราะห์หาการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน	11
- การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน โดยวิธี Semiquantitative RT-PCR	12
- การวิเคราะห์หาชนิดกรดอะมิโนในพลาสมาจากเลือด	13
- การวิเคราะห์ทางสถิติ	13
ผลการทดลอง (Result)	14
- ผลการวิเคราะห์ทางด้านโภชนะในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง	14
- ผลปริมาณอาหารที่แม่สุกรกินได้และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร	15
- ผลระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนทั้ง 18 ตัวในพลาสมาของแม่สุกร ช่วงให้นม เลี้ยงลูกและในลูกสุกรระยะคูดนม	16
- ผลการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกร	19
- ผลการตรวจยืนยันลำดับเบส	20
- ผลจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอน semiquantitative RT-PCR	27
- ผลปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกร	28
วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)	31
ข้อสรุป (Conclusion)	33
เอกสารอ้างอิง (References)	34

## รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง	7
ตารางที่ 2	แสดงองค์ประกอบทางโภชนะ(จากการคำนวณ)ในสูตรอาหารที่ใช้ทดลอง	8
ตารางที่ 3	แสดงคู่ primer ที่ใช้ในกระบวนการ PCR และขนาดของยีนเป้าหมายที่ ออกแบบมาจากข้อมูลใน Gen Bank ที่ใช้เป็นต้นแบบ	12
ตารางที่ 4	Proximate analysis of nutrient composition in the experimental diets	14
ตารางที่ 5	Result of amino acid composition in the experimental diets	14
ตารางที่ 6	Effect of lactation periods on performance of lactating sows and their piglets	15
ตารางที่ 7	Amino acid concentration in sow's plasma (pmol/microliter) on day 9 and 19 of lactation	17
ตารางที่ 8	Amino acid concentration in piglet's plasma (pmol/microliter) on day 9 and 19 of lactation	18

## รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ภาพแสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเซลล์ผลิตน้ำนมที่บริเวณเต้านม ส่วนหน้า เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน	9
รูปที่ 2	PCR amplification of sequences comprising cDNA from porcine mammary tissues by RT-PCR	19
รูปที่ 3	Determination of optimum cycles for PCR amplification	27
รูปที่ 4	Analysis of relative quantification of mRNA amino acid transporter by semiquantitative RT-PCR	28

### แสดงผลการตรวจยืนยันลำดับเบส (sequencing analysis)

		หน้า
ชุดที่ 1	เปรียบเทียบยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน 18S rRNA	20
ชุดที่ 2	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ASCT1	21
ชุดที่ 3	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATB <sup>0,+</sup>	21
ชุดที่ 4	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน LAT2	22
ชุดที่ 5	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน 4F2hc	23
ชุดที่ 6	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน CAT1	24
ชุดที่ 7	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATA2	25
ชุดที่ 8	เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน CAT2B	26

## รายการสัญลักษณ์และตัวย่อภาษาอังกฤษ

ADG = Average daily gain

AOAC = Association of official analytical chemists

ASCT1 = Alanine serine cysteine threonine transporter 1

ATA2 = Amino acid transporter A 2

ATB<sup>0+</sup> = Amino acid transporter B<sup>0+</sup>

CAT1 = Cationic amino acid transporter 1

CAT2B = Cationic amino acid transporter 2B

cDNA = Complementary DNA

DNA = Deoxyribonucleic acid

g = Gram

g/d = Gram / day

HPLC = High performance liquid chromatography

kg/d = Kilogram / day

LAT2 = L-type amino acid transporter 2

mRNA = Messenger RNA

μl = Microliter

NCBI = National Center for Biotechnology Information

NRC = National research council

pmol = Picomole

RNA = Ribonucleic acid

RT-PCR = Reverse transcriptase – polymerase chain reaction

SEM = Standard error of mean

TAE = Tris acetic acid EDTA

4F2hc = 4F2 heavy chain

18s rRNA = 18S ribosomal RNA



## บทนำ

สุกรช่วงระยะการให้นมถือว่าเป็นช่วงที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นช่วงที่แม่สุกรต้องทำการผลิตน้ำนมให้เพียงพอต่อความต้องการของลูกสุกร เพื่อให้ลูกสุกรมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตสูงสุด ลูกสุกรช่วงแรกเกิดถึงหย่านมได้รับสารอาหารที่สำคัญต่างๆ จากน้ำนมเป็นหลัก ได้แก่ กรดอะมิโนหรือโปรตีน ไขมัน แลคโตส วิตามินและแร่ธาตุ โดยมีการศึกษาพบว่าลูกสุกรมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อได้รับน้ำนมที่มีกรดอะมิโนไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เช่น กรดอะมิโนอาร์จินีน และวาเลอีน (O'Quinn et al., 2002) รวมทั้งในกรณีที่แม่สุกรได้รับอาหารที่มีระดับไลซีนต่ำ (Gaun et al., 2002) เพราะมีผลทำให้ผลผลิตน้ำนมและปริมาณโปรตีนในน้ำนมลดลง ทั้งนี้กลไกสำคัญในการตอบสนองของเต้านมสุกรที่มีผลต่อระดับของกรดอะมิโนในน้ำนมคือ อัตราการไหลเวียนของเลือดแดงไปเลี้ยงที่เต้านม (mammary plasma flow) ทำหน้าที่พากรดอะมิโนไปยังเนื้อเยื่อเต้านม และระบบการขนส่งกรดอะมิโนที่เนื้อเยื่อเต้านมทำหน้าที่นำเข้า (uptake) กรดอะมิโนจากหลอดเลือดแดงที่มาเลี้ยงเต้านมเข้าสู่เซลล์สร้างน้ำนมโดยอาศัยตัวขนส่งกรดอะมิโน (amino acid transporter) ที่เฉพาะเจาะจงต่อกรดอะมิโนแต่ละชนิดหรือกลุ่ม

ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อกลไกการตอบสนองดังกล่าวของเต้านมแม่สุกรที่มีการศึกษาแล้ว ได้แก่ ช่วงระยะวันการให้น้ำนม โดยเต้านมมีการนำเข้ากรดอะมิโนสูงขึ้นเมื่อช่วงระยะวันการให้นมเพิ่มขึ้น (Nielsen et al., 2002) ซึ่งคำนวณจากค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงที่มาเลี้ยงที่เต้านมและหลอดเลือดดำที่ออกจากเต้านม (arteriovenous difference) มีค่าสูงขึ้น ซึ่งค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงที่มาเลี้ยงที่เต้านมและหลอดเลือดดำเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกนำเข้าผ่านเนื้อเยื่อเต้านมสุกร (Trottier et al., 1995) ในขณะที่ค่าการไหลของเลือดมาเลี้ยงเต้านมไม่เปลี่ยนแปลง (Nielsen et al., 2002) จึงแสดงให้เห็นว่ากลไกการตอบสนองที่มีผลโดยตรงต่อค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงที่มาเลี้ยงที่เต้านมและหลอดเลือดดำที่สูงขึ้นคือ ตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบต่างๆ (amino acid transport systems) ที่อยู่ที่เนื้อเยื่อเต้านมมีการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน (gene expression) ตัวขนส่งกรดอะมิโนของระบบการขนส่งกรดอะมิโนและ/หรือตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีนตัวขนส่งกรดอะมิโนบนเซลล์สร้างน้ำนม โดยระบบขนส่งกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อแม่สุกรหรือลูกสุกรและควรศึกษา ได้แก่ ระบบ A ขนส่งกรดอะมิโนที่สำคัญคือ เมทไธโอนีน ระบบ ASC ขนส่งกรดอะมิโนที่สำคัญคือ ตรีโอนีน ระบบ L ขนส่งกรดอะมิโนที่สำคัญคือ กรดอะมิโนกลุ่มที่มีกิ่งก้านสาขา ระบบ  $y^+$  ขนส่งกรดอะมิโนที่สำคัญคือ ไลซีน และอาร์จินีน และระบบ  $B^{0+}$  ขนส่งกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ การแลกเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เป็นกลางและเป็นด่างต่างๆ

ทั้งนี้ ระดับความต้องการกรดอะมิโนของแม่สุกรช่วงให้นม กำหนดโดย National Research Council (NRC) ปี 1998 แนะนำระดับความต้องการโดยประเมินจากปริมาณของกรดอะมิโนที่พบใน

น้ำนมเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้ได้ค่าที่ไม่ถูกต้องนัก เนื่องจากกรดอะมิโนที่พบในน้ำนมประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ได้รับจากเลือดโดยตรงและกรดอะมิโนที่ผ่านกระบวนการทางเคมีต่างๆ ภายในเต้านมแล้ว เช่น การ oxidation และการเปลี่ยนจากกลุ่มกรดอะมิโนจำเป็นไปเป็นกลุ่มกรดอะมิโนไม่จำเป็น เป็นต้น ดังนั้นการประเมินค่าความต้องการกรดอะมิโนของแม่สุกรช่วงให้นม ควรใช้ข้อมูลในการประเมินจากกรดอะมิโนที่ถูกนำเข้ามาผ่านเนื้อเยื่อเต้านม เพราะเป็นค่าของกรดอะมิโนที่ได้รวมกรดอะมิโนทั้งที่ใช้ในกระบวนการทางเคมีภายในเต้านมและค่าของกรดอะมิโนน้ำนม (Trottier et al., 1997) ซึ่งเมื่อทราบข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้ในระดับอนุโมเลกุลแล้วจะมีประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลประกอบเพิ่มเติมในการประเมินความต้องการกรดอะมิโนในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการให้นม แต่ทั้งนี้การศึกษาในระดับอนุโมเลกุลเกี่ยวกับตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบการขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ ในเต้านมของแม่สุกรช่วงให้นมมีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นๆ

ดังนั้นการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรช่วงระยะให้น้ำนม เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานของตัวขนส่งกรดอะมิโนบนเซลล์สร้างน้ำนมที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโน ซึ่งมีผลต่อกรดอะมิโนที่ถูกนำเข้า และช่วยทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของตัวขนส่งกรดอะมิโนของแม่สุกรในช่วงให้นม นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการเสริมกรดอะมิโนบางตัวหรือโปรตีนเพื่อให้ไปมีผลต่อเซลล์เต้านมและผลผลิตน้ำนมของแม่สุกรต่อไป โดยมีสมมุติฐานของการวิจัย ดังนี้

1. การนำเข้ากรดอะมิโนผ่านเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรช่วงให้นมได้นั้น แสดงว่าในเนื้อเยื่อเต้านมน่าจะต้องมีการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบต่างๆ ที่สำคัญ
2. ระดับความเข้มข้นและปริมาณการนำเข้ากรดอะมิโนของเนื้อเยื่อเต้านมที่เปลี่ยนแปลงเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลเบื้องต้นมาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านม

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนที่มีชื่อว่า ATA2, LAT2, 4F2hc, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1 และ CAT2B ในเนื้อเยื่อเต้านมของแม่สุกรระยะให้น้ำนมลูกในช่วงต้น (วันที่ 9) และช่วงให้น้ำนมสูง (วันที่ 19)

### การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### การพัฒนาของเต้านมสุกรช่วงอุ้มท้องและให้นม

ในวัยเจริญพันธุ์ ระบบต่อต่างๆ ในเต้านมมีจำนวนและแตกสาขามากมาย (Turner, 1952) Kensinger และคณะ (1982) พบว่าปริมาณของ DNA ในเนื้อเยื่อเต้านมของสุกรสาวเกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วงอุ้มท้องและช่วงแรกของการให้นม ซึ่งเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่คลอดจนถึงวันที่ 4 ของการให้นม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kim และคณะ (1999) ที่พบว่า เมื่อจำนวนวันการให้นม

เพิ่มขึ้นมีการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างน้ำมันในเต้านม (hyperplasia) โดยปริมาณของ DNA ทั้งหมดในเนื้อเยื่อเต้านมจะเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ช่วงต้นของการให้นม ( $728 \pm 99$  มิลลิกรัม) และมีปริมาณสูงที่สุดในช่วงกลางของการให้นม ( $1,489 \pm 100$  มิลลิกรัม) ทั้งนี้ยังพบว่าเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้นระบบท่อภายในเต้านมมีความยาวและแตกสาขามากขึ้นเข้าไปในส่วนของเนื้อเยื่อไขมัน (fat pad) (Tucker, 1987) ซึ่งไขมันในเต้านมอยู่ในรูป interlobular adipocyte และ cellular lipid ดังนั้นการที่เนื้อเยื่อไขมันภายในเต้านมลดลงเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้นเกิดจากการถูกแทนที่ด้วย parenchymal tissue (Kim et al., 1999) จนเมื่อถึงเวลาหย่านมหรือระยะสิ้นสุดของการให้นม ค่อม น้ำมันจะกลับเข้าสู่สภาวะปกติ

#### การใช้ประโยชน์ของกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรช่วงให้นม

สุกรช่วงให้นมมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องได้รับอาหารที่มีกรดอะมิโนจำเป็นที่เพียงพอต่อความต้องการเพื่อใช้ในการสร้างน้ำมัน การเจริญเติบโตของเต้านม และการรักษาสภาพของเต้านม (Kim et al., 1999) ปริมาณกรดอะมิโนที่เนื้อเยื่อเต้านมได้รับอาศัย 2 กลไกหลักคือ อัตราการไหลเวียนของเลือดมาเลี้ยงเต้านม และตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบต่างๆผ่านเนื้อเยื่อเต้านม โดย Trottier และคณะ (1997) รายงานว่า กรดอะมิโนจำเป็นถูกนำเข้ามาผ่านเนื้อเยื่อเต้านมทั้งสิ้น 188.5 กรัมต่อวัน แต่ถูกหลั่งออกไปกับน้ำนมเพียง 139.5 กรัมต่อวัน ดังนั้นส่วนที่ไม่ถูกหลั่งออกไปกับน้ำนมหรือเป็นส่วนที่คงอยู่ในเต้านมเท่ากับ 49 กรัมต่อวัน โดยกรดอะมิโนที่คงอยู่ในเนื้อเยื่อเต้านมนี้ถูกใช้สำหรับกระบวนการทางเคมีต่างๆ โดยส่วนมากซึ่งคิดเป็น 85.7 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนที่ถูกสะสมทั้งหมดเกิดกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโนจำเป็นให้เป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็น การ oxidation และการเกิด metabolic pathway อื่นๆ (Richert et al., 1998) และส่วนน้อยซึ่งคิดเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนที่คงอยู่ทั้งหมดใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อโปรตีนของเต้านมเพื่อรักษาสภาพการเจริญเติบโตของเต้านม (Kim et al., 1999) ในภาวะปกติของแม่สุกรช่วงให้นม กรดอะมิโนจำเป็นทุกตัวถูกนำเข้ามาผ่านเนื้อเยื่อเต้านมในปริมาณมากกว่ากรดอะมิโนที่พบในน้ำนมที่หลั่งออกมา โดยกรดอะมิโนจำเป็นที่ถูกนำเข้ามาเข้าสู่เซลล์เต้านมในปริมาณมากที่สุดคือ ลูซีน (35 กรัมต่อวัน) รองลงมาคือ อาร์จินีน ไลซีน วาลีน ไอโซลูซีน ทรีโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน ฮิสทีดีน และเมทไธโอนีน ตามลำดับ (Trottier et al., 1997) และบางส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นเหล่านี้จะคงอยู่ในเนื้อเยื่อเต้านม โดยอาร์จินีนและกรดอะมิโนกลุ่มที่เป็น branched-chain amino acid จะมีปริมาณการคงอยู่มากที่สุดถึง 16 และ 11 กรัมต่อวันตามลำดับ จึงทำให้สัดส่วนของกรดอะมิโนจำเป็นที่พบในน้ำนมที่หลั่งออกมามีปริมาณน้อยกว่าที่นำเข้ามาผ่านเนื้อเยื่อเต้านม (Neilsen et al., 1997; Trottier et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีผลให้กรดอะมิโนไม่จำเป็นบางตัว เช่น อะลานีน โพรลีน และกลูตามิก เป็นต้น พบในน้ำนมในปริมาณมากกว่าที่ถูกนำเข้ามา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในเต้านมมีทั้งกระบวนการสร้าง (anabolic) และสลาย (catabolic) ที่มีความจำเป็นต่อการสร้างน้ำมันและการสร้างโปรตีนของเนื้อเยื่อเต้านม เช่น อาร์จินีนสามารถถูกสลายเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานและ

กรดอะมิโนไม่จำเป็น เช่น โปรีลีน กลูตามัท และกลูตามีน โพลีเอมีน และไนตริกออกไซด์ (O'Quine et al., 2002) และกรดอะมิโนกลุ่มที่มีกิ่งก้านสาขา เช่น ไอโซลูซีน ลูซีน และวาเลีน สามารถถูกออกซิไดซ์เป็นพลังงานในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร (DeSantiago et al., 1998; Richert et al., 1998)

ทั้งนี้การนำเข้ากรดอะมิโนผ่านเนื้อเยื่อเต้านมสุกรอาจเปลี่ยนแปลงได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น ปัจจัยจากลักษณะทางสรีรวิทยาของตัวสัตว์เอง (physiological state) ซึ่งได้แก่ระยะการให้นม เป็นต้น ปัจจัยจากระยะของการให้นมที่มีผลต่อการนำเข้ากรดอะมิโนและการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร

ปัจจัยจากระยะต่างๆ ของการให้นมจัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญปัจจัยหนึ่ง เนื่องจากได้มีการศึกษาพบว่าปัจจัยจากระยะของการให้นมมีผลต่อการนำเข้ากรดอะมิโน (Trottier et al., 1997) และมีผลต่อระดับของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในน้ำนม โดยเมื่อวัดจากค่าการไหลเวียนของเลือดและค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงและเลือดดำ (ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกนำเข้าผ่านเนื้อเยื่อเต้านมสุกร (Trottier et al., 1995)) พบว่าค่าการไหลเวียนของเลือดมาเลี้ยงเต้านมมีค่าเท่ากับ 3,700 ถึง 4,500 ลิตรต่อวัน ซึ่งไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการให้นม คิดเป็นปริมาณเลือดจำนวน 541 ลิตรต่อการสร้างน้ำนม 1 ลิตร ในขณะที่ค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำสูงขึ้นเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้นจากวันที่ 11 จนถึงวันที่ 20 ของการให้นม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงและเลือดดำที่เพิ่มขึ้นเป็นกลไกการตอบสนองจากการที่เนื้อเยื่อเต้านมอาจมีตัวขนส่งกรดอะมิโนที่มีประสิทธิภาพที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังพบว่าการนำเข้ากรดอะมิโนบางตัว โดยเฉพาะกรดอะมิโนจำเป็นมีการนำเข้าไปในปริมาณมากกว่าที่พบในน้ำนมที่หลั่งออกมา และกรดอะมิโนไม่จำเป็นส่วนมากมีปริมาณการนำเข้าน้อยกว่าปริมาณที่พบในน้ำนม เช่นเดียวกับ Neilsen และคณะ (2002) ที่ได้ศึกษาถึงจำนวนวันการให้นมที่มีผลต่อการนำเข้ากรดอะมิโนผ่านเนื้อเยื่อเต้านมสุกร ผลปรากฏว่าเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้นมีผลให้ผลผลิตน้ำนมมีแนวโน้มสูงขึ้น (มีค่าสูงสุดวันที่ 15 และ 21 เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Kim และคณะ (1999) ซึ่งมีผลมาจากความสามารถในการนำเข้ากรดอะมิโนที่เต้านมเพิ่มขึ้น โดยวัดได้จากค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนในหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำที่มีค่าสูงขึ้น ในขณะที่ค่าการไหลเวียนของเลือดที่มาเลี้ยงเต้านมไม่เปลี่ยนแปลง จึงแสดงให้เห็นว่าเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้นอาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ ที่ทำหน้าที่อยู่ในเนื้อเยื่อเต้านม

ทั้งนี้ ได้มีการศึกษาเบื้องต้นถึงการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน CAT1, CAT2A, CAT2B, ATB<sup>0+</sup> และ ASCT1 ในเต้านมสุกรขณะให้นมซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี Northern blot analysis (Laspiur et al., 2004) พบว่าตัวขนส่งกรดอะมิโนที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรขณะให้นมคือ CAT1, CAT2B, ATB<sup>0+</sup> และ ASCT1 แต่สำหรับ CAT2A ไม่พบการแสดงออก และ

เมื่อเลือกศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนบางตัว เปรียบเทียบระหว่างในวันที่ 7 และ 17 ของการให้นม พบว่ามีเพียง mRNA ของ  $ATB^{0,+}$  ที่มีแนวโน้ม ปริมาณการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปในวันที่ 7 และ 17 ของระยะการให้นม

### คุณสมบัติของตัวขนส่งกรดอะมิโนที่สนใจศึกษา

**1. ATA/SNAT; Amino acid transporter A / sodium-dependent neutral amino acid transporter** ทำหน้าที่ในการขนส่งกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นกลาง (neutral amino acid) สายสั้นๆ ได้แก่ เมทไธโอนีน อะลานีน ไกลซีน โพรลีน และกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นกลางตัวอื่นๆ (Baumrucker, 1985) ซึ่งเมทไธโอนีนถือเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในระบบนี้สำหรับสุกร โดยสามารถเปลี่ยนเป็นซิสเทอีนได้ในเนื้อเยื่อเต้านม (Guan et al., 2004) นอกจากนี้ ยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATA สามารถถูกควบคุมโดยลักษณะทางสรีรวิทยาของร่างกาย ซึ่งการทำงานจะเพิ่มขึ้น ตั้งแต่ช่วงตั้งท้องจนถึงช่วงการให้นมในเนื้อเยื่อเต้านมของหนู (mouse) (Sarah et al., 2005) และการขนส่งกรดอะมิโนยังสามารถถูกเหนี่ยวนำได้จากอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ภาวะการอดอาหาร และฮอร์โมน (Hatanaka et al., 2000., Tanaka et al., 2005) รวมทั้ง interleukin 1 beta (Thongsong et al., 2005) และ insulin-like growth factor-I (Thongsong et al., 2006) เป็นต้น โดยตัวขนส่งกรดอะมิโนที่สนใจศึกษาคือ ATA2 (Amino acid transporter A2) เนื่องจากมีรายงานว่ามีการแสดงออกได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อต่างๆ ของหนู (Rat) และคน ซึ่งตรงข้ามกับ ATA1 และ ATA2 พบว่ามีการแสดงออกที่เฉพาะเจาะจงมาก ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน ถึงการแสดงออกของตัวขนส่งกรดอะมิโน ATA2 ในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรช่วงให้นม

**2. ASCT; Alanine serine cysteine threonine transporter** ทำหน้าที่ในการขนส่งกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นกลาง เช่น อะลานีน เซอรีน ซิสเทอีน และทรีโอนีน (Baumrucker, 1985) เป็นต้น ซึ่งทรีโอนีนถือว่าเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในระบบขนส่งนี้ เนื่องจากสามารถถูกสังเคราะห์ได้เป็นพลังงานและถูกเปลี่ยนให้เป็กรดอะมิโนไม่จำเป็นได้ (Guan et al., 2004) สำหรับตัวขนส่งกรดอะมิโนที่สนใจศึกษาในระบบนี้คือ ASCT1 เนื่องจากได้มีการศึกษาพบว่า mRNA ของ ASCT1 มีการแสดงออกได้ทั่วไป รวมทั้งการศึกษาของ Laspiur และคณะ (2004) พบการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน ASCT1 ในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรช่วงให้นม

**3.  $ATB^{0,+}$ ; Amino acid transporter B<sup>0,+</sup>** ทำหน้าที่ขนส่งแลกเปลี่ยนระหว่างกรดอะมิโนที่เป็นกลางและเป็นด่าง และพบการแสดงออกของ mRNA ของ  $ATB^{0,+}$  ในเต้านมสุกรช่วงให้นม นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนวันให้นมที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ  $ATB^{0,+}$  (Laspiur et al., 2004)

**4. LAT; L-type amino acid transporter** ทำหน้าที่ในการขนส่งกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง (neutral amino acid transporter) ได้แก่ กรดอะมิโนกลุ่มที่มีกิ่งก้านสาขา (Baumrucker, 1985) การขนส่งจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันกับ 4F2hc แบบ heterodimeric complex จึงทำหน้าที่

ขนส่งกรดอะมิโนได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับกรดอะมิโนกลุ่มที่มีกิ่งก้านสาขาถือว่าเป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญอย่างมาก สามารถถูก oxidized ได้เป็นพลังงานในเนื้อเยื่อเต้านมสุกร โดยวาซีนเป็นกรดอะมิโนที่ถูก oxidized ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ลูซีนและไอโซลูซีน และจากรายงานการพบความสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายกรดอะมิโนดังกล่าวคือ branched-chain amino transferase และ branched  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase ซึ่งปริมาณของเอนไซม์นี้สูงขึ้นเมื่อจำนวนวันการให้นมเพิ่มขึ้น (DeSantiago et al., 1998; Richert et al., 1998) สำหรับยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบ L ที่สนใจศึกษาคือ LAT2 (L-type amino acid transporter 2) เนื่องจากได้มีรายงานว่าพบการแสดงออกได้ทุกๆ ไปทั้งในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนและตัวเต็มวัย (Segawa et al., 1999; Rajan et al., 2000) กรดอะมิโนที่ขนส่งโดยระบบ L ในเนื้อเยื่อเต้านมมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นได้กว้างและหลากหลาย (Shemman et al., 1997) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการแสดงออกตัวขนส่งกรดอะมิโน LAT2 และ Heterodimer 4F2hc ในเนื้อเยื่อเต้านมของสุกรช่วงให้นม

**5. CAT; Cationic amino acid transporter** ทำหน้าที่ในการขนส่งกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวก (cationic amino acid) ที่สำคัญ ได้แก่ โลซีน อาร์จินีน ฮิสทีน และฮิสทีดีน (Baumrucker, 1985) สำหรับกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในระบบขนส่งนี้คือ โลซีน เพราะโลซีนเป็น first-limiting amino acid ของสุกรที่ได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดและกากถั่วเหลืองเป็นหลัก สำหรับยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบ  $y^+$  ที่สนใจศึกษาคือ CAT1 (cationic amino acid transporter type 1) และ CAT2B (cationic amino acid transporter type 2B) เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่า mRNA ของ CAT1 และ CAT2B มีแสดงออกในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรช่วงให้นม (Laspiur et al., 2004) แต่ CAT3 พบแสดงออกในเนื้อเยื่อสมองเท่านั้น

ดังนั้นจากการรายงานข้อมูลต่างๆดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า ตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบต่างๆเป็นกลไกและตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการขนส่งกรดอะมิโนผ่านเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรช่วงให้นม โดยการศึกษาในระดับอณูโมเลกุลเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ ในเนื้อเยื่อเต้านมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น คน โค หนู (rat และ mouse) และหนูตะเภาที่อยู่มาก แต่การศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบต่างๆ ในเนื้อเยื่อเต้านมสุกรยังมีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ดังกล่าวข้างต้น จึงทำให้ขาดข้อมูลทางอณูโมเลกุลเกี่ยวกับตัวขนส่งกรดอะมิโนในระบบการขนส่งกรดอะมิโนของเนื้อเยื่อเต้านมสุกร ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนระบบต่างๆในช่วงอายุการให้นมวันที่ 9 และวันที่ 19 ของสุกร เพิ่มเติมทั้งที่มีรายงานไว้และไม่เคยมีรายงาน

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 1. สัตว์ทดลอง

ใช้แม่สุกรพันธุ์ลูกผสม ( Landrace x Large white) จำนวน 8 ตัว ที่ผ่านการตั้งท้องมาแล้วมากกว่า 2 ครั้ง (multiparous sows) ซึ่งมีวันคลอดใกล้เคียงกัน มีน้ำหนักตัว ลักษณะทางพันธุกรรมที่

เกี่ยวกับประสิทธิภาพการให้ลูกสุกรที่ดีใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีลักษณะของตัวแม่ที่มีความสมบูรณ์ดีและมีจำนวนตัวแม่ที่ใกล้เคียงกัน แม่สุกรแต่ละตัวได้รับอาหารและมีน้ำดื่มอย่างเพียงพอเหมาะสมตลอดช่วงของการให้นม เป็นเวลา 4 สัปดาห์

## 2. อาหารทดลอง

จัดทำสูตรอาหารสุกรระยะเลี้ยงลูกที่ใช้ในฟาร์มทั่วไป โดยสูตรอาหารมีระดับโปรตีนประมาณ 18.5 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าระดับพลังงานใช้ประโยชน์ได้ในอาหารเท่ากับประมาณ 3.2 ME, Mcal/kg โดยค่าโภชนาการอื่น ๆ มีค่าใกล้เคียงระดับความต้องการมากที่สุด ซึ่งได้จากการคำนวณโดยโปรแกรมคำนวณสูตรอาหารสัตว์

### ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบอาหารสัตว์	ปริมาณ (กิโลกรัม)
ปลายข้าว (broken rice)	18.00
ข้าวโพด (corn)	17.00
มันสำปะหลัง (cassava)	10.00
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	3.00
ไขมันผง (fatpack)	2.00
รำละเอียด (raw rice bran)	7.00
รำสกัดน้ำมัน (rice solvent bran)	10.00
ถั่วเหลือง (soybean 48%CP)	21.00
ถั่วอบไขมันเต็ม (full fat soybean meal)	7.00
แอล-ไลซีน (L-lysine)	0.30
ดีแอล-เมทไธโอนีน (DL-methionine)	0.30
แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate)	1.50
โมโนไดแคลเซียมฟอสเฟต (monocalcium phosphate)	2.30
เกลือ (salt)	0.35
<sup>1</sup> พรีมิกซ์(trace mineral and vitamin premix)	0.25
<b>รวม</b>	<b>100.00</b>

<sup>1</sup> ส่วนประกอบของวิตามินและแร่ธาตุในพรีมิกซ์ (trace mineral and vitamin premix) 1 กิโลกรัม ได้แก่ วิตามินเอ 6.0 ล้านหน่วยสากล วิตามินดี<sub>3</sub> 0.8 ล้านหน่วยสากล วิตามินอี 12,000 หน่วยสากล วิตามินเค<sub>3</sub> 0.8 กรัม วิตามินบี<sub>1</sub> 0.6 กรัม วิตามินบี<sub>2</sub> 1.4 กรัม วิตามินบี<sub>6</sub> 0.8 กรัม วิตามินบี<sub>12</sub> 0.008 กรัม กรดแพนโททีนิก 6.0 กรัม ไนอาซิน 8.0 กรัม กรดโฟลิก 0.12 กรัม ไบโอติน 0.12 กรัม โคลีน 120.0 กรัม ซีลีเนียม 0.12 กรัม เหล็ก 40.0 กรัม แมงกานีส 12.0 กรัม สังกะสี 24.0 กรัม ทองแดง 8.0 กรัม โคบอลต์ 0.08 กรัม ไอโอดีน 0.20 กรัม

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบทางโภชนา (จากการคำนวณ) ในสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบทางโภชนา	ระดับโภชนาในอาหาร
พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (ME, Mcal/kg)	3.20
โปรตีนรวม (%)	18.24
ไขมัน (%)	8.47
เยื่อใย (%)	4.47
แคลเซียม (%)	1.08
ฟอสฟอรัส (%)	1.01
ฟอสฟอรัสที่ใช้ประโยชน์ได้ (%)	0.48
เกลือ (%)	0.41
ไลซีน (%)	1.18
ทรีโอนีน (%)	0.66

### 3. การเก็บตัวอย่างนำไปตรวจในห้องปฏิบัติการ

อาหารสัตว์ สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้เลี้ยงแม่สุกร เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของอาหารโดยประมาณ (proximate analysis) ได้แก่ ความชื้น พลังงาน โปรตีน เยื่อใย ไขมัน เถ้า แคลเซียมและฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990) รวมทั้งชนิดและปริมาณกรดอะมิโน 15 ตัว ด้วยเครื่อง HPLC

ตัวอย่างเลือด เพื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบและระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโน 18 ตัว ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจาก anterior vena cava ในแม่สุกรขณะเลี้ยงให้นมลูกในวันที่ 9 และ 19 ครั้งละ 3 มิลลิลิตร ส่วนลูกสุกรหลังคลอดในแต่ละแม่สุกรทดลองข้างต้น จำนวน 4 ตัวต่อครอก ถูกคัดเลือกแบบสุ่มใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาจากแม่สุกรแต่ละตัวจำนวน 8 ตัว และถูกเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจาก anterior vena cava ตัวละ 1 มิลลิลิตรในวันที่ 9 และ 19 ของอายุลูกสุกร ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว (heparinized tubes) เพื่อรอการส่งตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC การเก็บตัวอย่างเลือดทำในช่วงเวลา 9.30–10.00 น. เพื่อลดความแปรปรวนที่เป็นผลมาจากอาหาร

เนื้อเยื่อเต้านม หลังจากที่ทำให้แม่สุกรสงบและซึมลงด้วยการฉีดยา Azaperone (1.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ทำการฉีดยาชาเฉพาะที่ 2% Xylocaine ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมจากเต้านมที่อยู่บริเวณส่วนหน้า (anterior mammary gland) ประมาณ 1-2 กรัมโดยวิธีผ่าตัด ตัดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการผลิตน้ำนมและหลีกเลี่ยงบริเวณหลอดเลือด เก็บตัวอย่างจากแม่สุกร 4 ตัว ต่อ 1 ช่วงระยะของการให้นม คือ วันที่ 9 (ระยะต้นของการให้น้ำนม) และวันที่ 19 (ระยะให้น้ำนมสูง) ของการให้นม จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนมใส่ในหลอดที่มีสารละลาย RNAlater<sup>®</sup>



(Qiagen, Germany) สำหรับป้องกัน RNA ถูกทำลาย แล้วเก็บในตู้ทำความเย็นที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออก mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน เมื่อเสร็จสิ้นการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนม ทำการเย็บแผลปิด และปล่อยลูกสุกรมากินนมตามปกติใน 2 ชั่วโมงต่อมา (ดังแสดงในรูปภาพที่ 1) ซึ่งโครงการวิจัยผ่านการพิจารณาและได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการใช้สัตว์ทดลองให้เป็นไปตามจรรยาบรรณ ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1. ทำให้แม่สุกรสงบและซึมลงด้วยการฉีดยา Azaperone (1.5มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และทำการฉีดยาชาเฉพาะที่ 2% Xylocaine



2. ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมจากเต้านมที่อยู่บริเวณส่วนหน้า (anterior mammary gland)



3. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนมใส่ในหลอดที่มีสารละลาย RNAlater<sup>®</sup> สำหรับป้องกัน RNA ถูกทำลาย



4. ทำความสะอาด และเย็บปิดแผลด้วยไหมละลาย



5. ปลดปล่อยลูกสุกรมากินนมตามปกติใน 2 ชั่วโมงต่อมา

**รูปที่ 1** ภาพแสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเซลล์ผลิตน้ำนมที่บริเวณเต้านมส่วนหน้า เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน

#### 4. การแสดงข้อมูลผลการทดลอง

1) ผลคุณลักษณะการเจริญเติบโต ได้แก่ ข้อมูลปริมาณอาหารที่กินได้ทุกวันของแม่สุกร (ก่อนให้อาหารเช้า) ซึ่งน้ำหนักตัวลูกสุกรทุกๆ 3 วัน เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต (ADG) ตั้งแต่วันที่คลอดจนกระทั่งหย่านม (วันที่ 28 ของการให้น้ำนม) และปริมาณอาหารที่กินได้ของลูกสุกร ตั้งแต่วันที่ได้รับอาหาร creep feed (วันที่ 19 ของการให้น้ำนม) จนกระทั่งหย่านม (วันที่ 28 ของการให้น้ำนม)

2) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของอาหาร จากการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกรทดลองตลอดการทดลอง ได้แก่ ความชื้น พลังงาน โปรตีน เยื่อใย ไขมัน เถ้า แคลเซียมและฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990) รวมทั้งชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่อง HPLC

3) ผลการตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดอะมิโนรายตัวในพลาสมาด้วยเครื่อง HPLC ในวันที่ 9 และ 19 ของการให้นม ทั้งในแม่และลูกสุกร

4) ผลการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนที่ตรวจพบ โดยแสดงเป็นรูปถ่ายของแถบ DNA สำหรับตัวขนส่งกรดอะมิโนแต่ละตัว และเปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลใน Gen Bank โดยใช้โปรแกรมของ NCBI blast

5) ผลปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเต้านม สุกกรในวันที่ 9 และ 19 ของการให้นม ที่คิดเป็นสัดส่วนเปรียบเทียบกับการแสดงออกของ internal control โดยแสดงเป็นรูปถ่ายของแถบ DNA สำหรับตัวขนส่งกรดอะมิโนแต่ละตัว และแสดงเป็น รูปกราฟของปริมาณที่คิดเป็นสัดส่วนของยีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนแต่ละตัวที่ศึกษาต่อ internal control ด้วยโปรแกรมวัดความเข้มของแถบ DNA (ScionImage)

##### 5. การวิเคราะห์ทำการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน

###### การสกัด Total RNA และขั้นตอนการทำ RT-PCR

1) นำตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมสุกกรที่เก็บรักษาอยู่ใน RNAlater tissue protection kit<sup>®</sup> (Qiagen, Germany) มาทำการสกัด Total RNA ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดทดสอบ Aurum<sup>™</sup> Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Biorad, USA) นำ Total RNA ที่ได้มาสร้างสาย cDNA (complementary DNA) โดยวิธี Reverse transcription ด้วยชุดทดสอบ iScript<sup>™</sup> Select cDNA Synthesis kit (Biorad, USA) ซึ่งมีสายของ mRNA ที่ถูกสร้างเป็น cDNA โดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ Reverse transcriptase และใช้ random hexamer primer มาเป็นจุดเริ่มเชื่อมต่อเบส โดย ปฏิบัติตามขั้นตอนที่แนะนำไว้ในคู่มือของชุดทดสอบดังกล่าว

###### 2) การทำปฏิกิริยา PCR และการแยกขนาดด้วย gel electrophoresis

กระบวนการ PCR ซึ่งดำเนินการตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดทดสอบ IQ<sup>™</sup> Supermix (มีส่วนประกอบ 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, 1.6 mM dNTPs, iTaq DNA polymerase, 50 units/ml, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, and stabilizers) (Biorad, USA) ประกอบด้วยสัดส่วน IQ supermix 25  $\mu$ l, autoclaved ultra pure water 22  $\mu$ l, primer ที่ออกแบบจากยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนที่สนใจศึกษา forward primer 0.5  $\mu$ l และ reverse primer 0.5  $\mu$ l และสารตั้งต้น cDNA ของเนื้อเยื่อเต้านม 2.0  $\mu$ l รวมทั้งสิ้นเท่ากับ 50  $\mu$ l ต่อ 1 ปฏิกิริยา ทั้งนี้สำหรับ primer pairs (Operon, USA) ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3 โดยกำหนดโปรแกรมของกระบวนการ PCR ดังนี้ ทำการ activate enzyme ที่ 95<sup>°</sup>C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยรอบกระบวนการทำ PCR; 3 step cycling ประกอบด้วย denaturation 94<sup>°</sup>C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 58<sup>°</sup>C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72<sup>°</sup>C เป็นเวลา 1 นาที (จำนวน 40 รอบ สำหรับการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ และ 30 รอบ สำหรับ 18S rRNA) และทำการ complete polymerization 72<sup>°</sup>C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำผลผลิต PCR ที่ได้มาแยกขนาด DNA ของยีนแต่ละตัวด้วย gel electrophoresis (1.8% agarose gel in TAE) ซึ่งมีสาร ethidium bromide ผสมอยู่ กำหนดกระแสไฟเท่ากับ 70 โวลต์ เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานที่ทราบขนาดที่แน่นอน (DNA ladder) และนำผลผลิต PCR ส่งตรวจยืนยันลำดับเบส (sequencing) อีกครั้ง เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลใน Gen Bank โดยใช้โปรแกรมของ NCBI blast

ตารางที่ 3 แสดงคู่ primer ที่ใช้ในกระบวนการ PCR และขนาดของยีนเป้าหมาย ที่ออกแบบมาจากข้อมูลใน Gen Bank ที่ใช้เป็นต้นแบบ

ยีน	Primer pair		GenBank Accession no.	ขนาด (bp)	ชนิดของสัตว์ ต้นแบบ
	5' →	3'			
4F2hc (Heterodimer ระบบ L)	CACAAGAACCAGAAGGATGA	(F)	J02939	183	human
	AGTGTCAACCTGAGTGGAGA	(R)			
LAT2 (ระบบ L)	TTCCAGGAACCTGACATCG	(F)	AF171669	200	human
	ACATTGCAGTGACATAAGCG	(R)			
ATA2 (ระบบ A)	AATCTGACCAATGCGATTGTG	(F)	AF249673	164	rat
	AATAAAGACCCTCCTTCGTTG	(R)			
ASCT1 (ระบบ ASC)	GGACTCTTTCCTCGACCTG	(F)	L14595	150	human
	ATCTCAGTGCCTATGGGGATCT	(R)			
CAT1 (ระบบ y <sup>+</sup> )	CCTACCTCTACAGCTACGT	(F)	AY371320	153	porcine
	AGAACTCCCCGATGGGCTTG	(R)			
CAT2B (ระบบ y <sup>+</sup> )	CCCAATGCCTCGTGAATCT	(F)	U76369	121	human
	TGCCACTGCACCCGATGATAAAGT	(R)			
ATB <sup>0+</sup> (ระบบ B <sup>0+</sup> )	GGTGGTCCATTTTGGTCCATAT	(F)	AF151978	86	human
	GTGATCGTTTCAATCGAAGCAA	(R)			
18S rRNA (ตัวควบคุม)	CCGCGGTTCTATTTTGGTGGTTTT	(F)	AF102857	399	porcine
	CGGGCCGGGTGAGGTTTC	(R)			
CAT2A (ระบบ y <sup>+</sup> )	CAAGACGGGGTCTGCATATT	(F)	U76368	368	porcine
	TGCCACATTTTCCTTTCACAA	(R)			

#### 6. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน โดยวิธี Semiquantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction

ก่อนการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน ทำการหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับยีนของตัวขนส่งกรดอะมิโนแต่ละตัวพร้อมกับ 18S rRNA กระบวนการ PCR ดำเนินการตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของชุดทดสอบ IQ™ Supermix ดังรายละเอียดข้างต้นที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน แต่ใช้ primer ทั้งจากยีนเป้าหมายและยีนตัวควบคุมภายในในหลอด PCR พร้อมกัน หลังจากกระบวนการ PCR เสร็จสมบูรณ์และทำการแยกขนาดด้วย gel electrophoresis จากนั้นเปรียบเทียบสัดส่วนความเข้มของแถบ (band) ของผลผลิต PCR ระหว่าง DNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนเป้าหมายและตัว internal control หลังจากที่ถูกแยกบน gel electrophoresis แล้วด้วยเครื่องตรวจวัดความเข้มของแถบ DNA

(densitometer) โดยระดับการแสดงผลของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนเป้าหมายจะแสดงเป็นสัดส่วนต่อระดับการแสดงผลของตัว internal control

7. การวิเคราะห์หาชนิดกรดอะมิโนในพลาสมาจากเลือด ตัวอย่างเลือดถูกนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) ความเร็ว 3000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 °C ทำการแยกเก็บพลาสมาไว้ในหลอดทดลองและแช่แข็งเก็บที่ -20 °C จนกระทั่งพร้อมที่จะนำส่งไปตรวจด้วยเครื่อง HPLC เพื่อแยกส่วนประกอบและวัดความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละตัว จำนวน 18 ตัว ได้แก่ แอสปาร์เตท/แอสพาราจีน (Asp/Asn) กลูตามัท/กลูตามีน (Glu/Gln) เซอรีน (Ser) ทรีโอนีน (Thr) ไกลซีน (Gly) อะลานีน (Ala) อาร์จินีน (Arg) ทอรีน (Tau) โพรลีน (Pro) วาลีน (Val) เมทไทโอนีน (Met) ไอโซลูซีน (Ile) ลูซีน (Leu) ทริปโตแฟน (Trp) ฟีนิลอะลานีน (Phe) ไลซีน (Lys) ฮิสทีดีน (His) และไทโรซีน (Tyr)

#### 8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองของปริมาณการแสดงผลของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเต้านม และความเข้มข้นของกรดอะมิโนในพลาสมา ในวันที่ 9 และ 19 ของการให้นม รวมทั้งคุณลักษณะการเจริญเติบโต ได้แก่ ปริมาณอาหารที่กินได้ของแม่สุกร น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต (ADG) ของลูกสุกร เปรียบเทียบกันในแต่ละสัปดาห์ ด้วย unpair t-test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่  $P < 0.05$

### ผลการทดลอง

**ผลการวิเคราะห์ทางด้านโภชนะในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง** ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่ามีคุณค่าอยู่ในระดับความต้องการของแม่สุกรระยะเลี้ยงให้นมลูกตามที่ NRC แนะนำ รวมทั้งปริมาณความเข้มข้นและสมดุลของกรดอะมิโน (ดังแสดงในตารางที่ 5) อยู่ในระดับที่ปกติที่แม่สุกรควรได้รับ

**ตารางที่ 4** Proximate analysis of nutrient composition in the experimental diets

Nutrients	Nutrient level (%)
Crude protein, %	19.43
Fat, %	9.98
Fiber, %	2.89
Ash, %	8.05
Calcium, %	1.09
Phosphorous, %	1.34
Moisture, %	9.08

**ตารางที่ 5** Result of amino acid composition in the experimental diets

Amino acids in diet	Concentration (mg/100mg)
Lysine	1.32
Threonine	0.61
Arginine	1.11
Histidine	0.36
Isoleucine	0.62
Leucine	1.27
Phynylalanine	0.65
Valine	0.74
Alanine	0.82
Aspartic	1.93
Serine	0.81
Glutamic	3.23
Glycine	0.68
Proline	0.65
Tyrosine	0.43

แสดงปริมาณอาหารที่แม่สุกรกินได้และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร (ในตารางที่ 6) พบว่าในแม่สุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง สามารถกินอาหารได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ของการทดลอง รวมถึงไม่มีผลต่อความแตกต่างต่ออัตราการเลี้ยงลูกรอดชีวิตในช่วงการทดลอง สำหรับในลูกสุกร ปริมาณอาหารที่กินได้ น้ำหนักตัวและค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวันในแต่ละสัปดาห์ตลอดระยะเวลาการทดลองของลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

**ตารางที่ 6** Effect of lactation periods on performance of lactating sows and their piglets

Items	Day of lactation		P-value
	Group of day 9	Group of day 19	
<b>Sows</b>			
Number of sows	4	4	
Feed intake of sow (kg/d)			
wk 1	2.88 ± 1.08	2.99 ± 0.91	0.28
wk 2	2.17 ± 1.18	2.99 ± 0.91	0.23
wk 3	3.39 ± 0.96	3.00 ± 0.71	0.51
wk 4	3.61 ± 0.54	3.30 ± 0.55	0.42
Piglet survivability (%)			
d 0-28	83.3 ± 16.30	92.5 ± 16.80	0.44
Number of piglets			
d 0	10.8 ± 1.71	9.00 ± 1.0	0.09
d 6	9.00 ± 0.82	8.60 ± 1.7	0.68
d 12	9.00 ± 0.82	8.60 ± 1.67	0.68
d 18	9.00 ± 0.82	8.60 ± 1.67	0.68
d 24	9.00 ± 0.82	8.40 ± 2.07	0.61
d 28	8.75 ± 0.50	8.40 ± 2.07	0.75
d 0-28	8.75 ± 0.50	8.40 ± 2.07	0.75

Items	Day of lactation		P-value
	Group of day 9	Group of day 19	
<b>Piglets</b>			
Feed intake of piglet (g/d)	25.7 ± 5.3	27.3 ± 9.9	0.78
Piglet weight (kg)			
d 0	1.62 ± 0.14	1.46 ± 0.24	0.27
d 6	2.56 ± 0.25	2.41 ± 0.24	0.40
d 12	3.42 ± 0.28	3.19 ± 0.28	0.25
d 18	4.50 ± 0.45	4.26 ± 0.29	0.36
d 24	5.75 ± 0.56	5.46 ± 0.39	0.39
d 28	6.673 ± 0.53	6.582 ± 0.46	0.79
ADG of piglet (g/d)			
d 0-6	155 ± 57.0	158 ± 31.0	0.91
d 6-12	145 ± 36.8	129 ± 36.7	0.56
d 12-18	180 ± 52.2	180 ± 27.98	0.99
d 18-24	208 ± 39.2	200 ± 45.1	0.78
d 24-28	230 ± 45.57	256 ± 38.84	0.39
d 0-28	174.1 ± 20.0	173.3 ± 16.0	0.10

Data are presented as means ± SEM.

ผลระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนทั้ง 18 ตัวในพลาสมาของแม่สุกรช่วงให้นมเลี้ยงลูก และในลูกสุกรระยะดูนม ถูกนำมาตรวจแยกและวิเคราะห์ โดยการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อแยกพลาสมาในวันที่ 9 และ 19 ของระยะเลี้ยงให้นมลูกจากแม่สุกร (ดังแสดงในตารางที่ 7) และในลูกสุกร (ดังแสดงในตารางที่ 8) ความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละตัวในแม่สุกรระยะให้นมในทั้ง 2 วันดังกล่าว ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ส่วนในลูกสุกรระยะดูนมสามารถพบการเปลี่ยนแปลงที่มีระดับความเข้มข้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.01$ ) ในวันที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 9 ของการให้นม ได้แก่ โพรลีน ส่วนกรดอะมิโนที่พบการเปลี่ยนแปลงที่มีระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ได้แก่ อาร์จินีน และไลซีน



**ตารางที่ 7** Amino acid concentration in sow's plasma (pmol/microliter) on day 9 and 19 of lactation

No.	Amino acids	Plasma concentration (pmol/microliter)		Significant	P-value
		Day 9 of lactation	Day 19 of lactation		
		(n = 4)	(n = 4)		
1	Aspartic	24.49 ± 5.589	17.95 ± 3.438	ns	0.3572
2	Serine	147.6 ± 36.39	220.2 ± 18.64	ns	0.1262
3	Glutamic	140.9 ± 39.89	110.2 ± 17.40	ns	0.5068
4	Glycine	672.1 ± 104.3	919.7 ± 98.67	ns	0.1354
5	Histidine	335.4 ± 40.13	417.8 ± 31.19	ns	0.1560
6	Taurine	29.41 ± 6.980	31.30 ± 1.815	ns	0.8019
7	Arginine	179.5 ± 51.71	236.8 ± 12.74	ns	0.3228
8	Threonine	157.2 ± 23.79	232.8 ± 22.77	ns	0.0616
9	Alanine	433.1 ± 75.22	494.3 ± 22.85	ns	0.4657
10	Proline	565.1 ± 87.56	439.6 ± 151.9	ns	0.5011
11	Tyrosine	94.36 ± 12.75	124.4 ± 12.03	ns	0.1371
12	Valine	267.8 ± 33.81	285.2 ± 29.34	ns	0.7123
13	Methionine	86.32 ± 24.28	120.3 ± 29.50	ns	0.4080
14	Lysine	238.6 ± 69.42	320.9 ± 26.69	ns	0.3107
15	Isoleucine	101.4 ± 12.56	112.4 ± 8.752	ns	0.4992
16	Leucine	140.1 ± 19.75	152.9 ± 13.67	ns	0.6112
17	Phenylalanine	73.38 ± 11.60	88.57 ± 5.259	ns	0.2779
18	Tryptophan	167.9 ± 23.38	155.4 ± 15.54	ns	0.6727

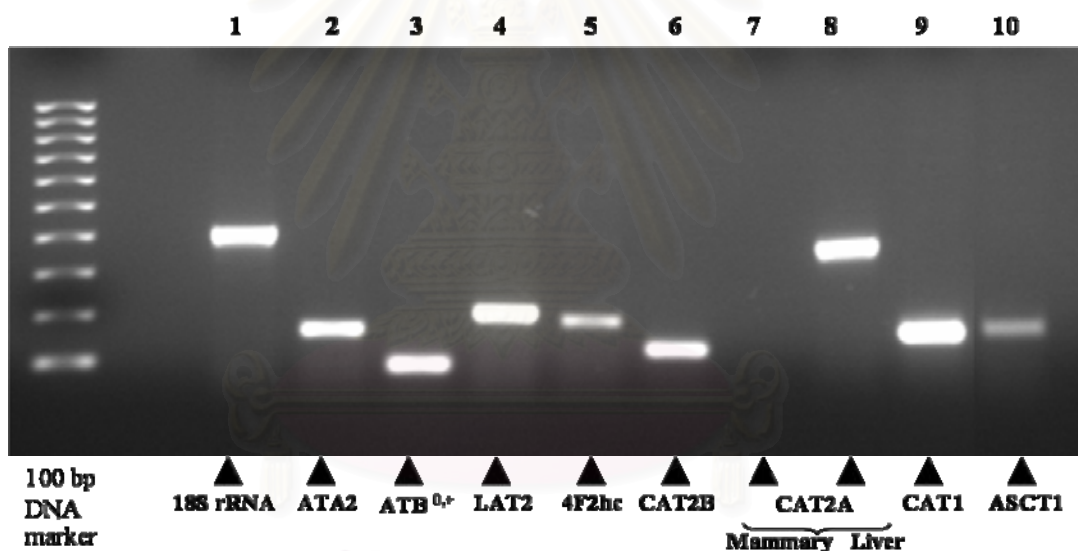
Data are presented as means ± SEM. ns is not statistical significance at  $p > 0.05$ .

**ตารางที่ 8** Amino acid concentration in piglet's plasma (pmol/microliter) on day 9 and 19 of lactation

No.	Amino acids	Plasma concentration (pmol/microliter)		Significant	P-value
		Day 9 of lactation (n = 4)	Day 19 of lactation (n = 4)		
1	Aspartic	32.52 ± 6.926	16.93 ± 1.723	ns	0.0717
2	Serine	222.6 ± 32.17	229.6 ± 13.00	ns	0.8460
3	Glutamic	257.6 ± 41.35	163.5 ± 22.28	ns	0.0918
4	Glycine	729.3 ± 72.73	882.2 ± 60.53	ns	0.1574
5	Histidine	383.5 ± 56.86	447.5 ± 50.25	ns	0.4311
6	Taurine	118.3 ± 17.95	109.1 ± 12.90	ns	0.6911
7	Arginine	83.26 ± 10.17	157.2 ± 20.32	*	0.0174
8	Threonine	218.6 ± 18.74	184.6 ± 11.37	ns	0.1716
9	Alanine	723.7 ± 88.50	539.8 ± 48.88	ns	0.1189
10	Proline	978.4 ± 89.40	461.3 ± 27.70	**	0.0015
11	Tyrosine	124.5 ± 6.618	148.8 ± 19.27	ns	0.2779
12	Valine	222.2 ± 7.226	203.4 ± 16.33	ns	0.3326
13	Methionine	50.22 ± 6.094	57.35 ± 10.42	ns	0.5765
14	Lysine	143.6 ± 13.88	218.0 ± 13.23	**	0.0081
15	Isoleucine	104.5 ± 9.993	101.0 ± 10.90	ns	0.8224
16	Leucine	182.5 ± 8.933	161.3 ± 18.01	ns	0.3321
17	Phenylalanine	64.38 ± 5.338	68.04 ± 8.068	ns	0.7180
18	Tryptophan	119.9 ± 3.273	103.5 ± 10.02	ns	0.1723

Data are presented as means ± SEM. Data are determined as statistical significance at \* $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ . ns is not statistical significance at  $p > 0.05$ .

**ผลการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกร** แสดงแถบและขนาดตำแหน่งของผลผลิต DNA ที่ได้จากกระบวนการ PCR ของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนแต่ละตัวในเนื้อเยื่อเซลล์สร้างน้ำนม และ CAT2A ในตับสุกร ที่ผ่านกระบวนการโดยวิธี RT-PCR ซึ่งมีขนาดตรงตามทีออกแบบไว้ คือ 18S rRNA = 399, ATA2 = 164, ATB<sup>0,+</sup> = 86, LAT2 = 200, 4F2hc = 183, CAT2B = 121, CAT2A(ตับ) = 368, CAT1 = 153 และ ASCT1 = 150 bp ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการยืนยันว่าคู่ primer ที่ใช้สามารถนำมาใช้กับสุกรได้จริง โดยเฉพาะกับเนื้อเยื่อเต้านม โดย total RNA ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR ได้จากการสกัดตัวอย่างเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรในช่วงระยะการให้น้ำนมทั้ง 2 ช่วง และตัวอย่างตับสุกรสำหรับยีน CAT2A ที่ใช้เป็น negative control ซึ่งแสดงว่า primer pairs ที่ออกแบบสามารถใช้งานได้ ดังรายละเอียดที่แสดงในรูปที่ 2 นอกจากนี้ยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน LAT2 , 4F2hc และ ATA2 ยังไม่เคยมีรายงานการแสดงออกในเนื้อเยื่อผลิตน้ำนมของสุกร



**รูปที่ 2** PCR amplification of sequences comprising cDNA from porcine mammary tissues by RT-PCR. Amplification products by 40 cycles were subjected to electrophoresis on a 1.8% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining. The PCR amplified products were loaded at 18  $\mu$ l/well. The mRNA of 18S rRNA, ATA2, ATB<sup>0,+</sup>, LAT2, 4F2hc, CAT2B, CAT1, ASCT1 expressed in porcine mammary tissues (lane 1- 6 and 9-10) and CAT2A expressed in pig liver tissues (lane 8). CAT2A was used as negative control which did not expressed in porcine mammary tissues (lane 7 and 8).

แสดงผลการตรวจยืนยันลำดับเบส (sequencing analysis) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับเบสที่ได้จากกระบวนการทำ PCR กับข้อมูลใน Gen Bank โดยใช้โปรแกรมของ NCBI blast เมื่อเปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในแต่ละตัวและยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน 18S rRNA ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำมันที่ได้จากการเพิ่มปริมาณผลผลิตในกระบวนการ PCR และนำมาตรวจลำดับเบสเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับที่ข้อมูลในสุกรหรือในคนหรือในหนู rat ที่ใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบคู่ primer ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่ายีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในแต่ละตัวและยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน 18S rRNA ที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในสุกร คน หรือ หนู rat (sbjct) มีความเหมือนของลำดับเบส 95 – 100 % ในสุกร 88 – 94 % ในคน และ 78 – 94 % ในหนู rat ซึ่งยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ASCT1 ไม่มีข้อมูลลำดับเบสในสุกรที่รายงานไว้ใน Gen Bank ส่วนยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน LAT2 และ ATA2 ในสุกรเป็นข้อมูลการทำนาย (predicted) ลำดับเบสที่มีความเหมือนกับยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน (ดังแสดงในผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 1 – 8)

ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 1 เปรียบเทียบยีนที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน 18S rRNA ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในสุกร (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 98%

```
>gb|AF102857.1|AF102857 sus scrofa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=649

Score = 641 bits (347), Expect = 0.0
Identities = 357/361 (98%), Gaps = 3/361 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 5 CGCA-GCT-CACTCCTGGTGGTGGCCGGTCCGTC AATTCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAA 62
      |||
Sbjct 477 CGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGGCC-TTCCGTC AATTCTTTAAGTTTCAGCTTTGCAA 419

Query 63 CCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGGTTTCCCGGAAGCTGCCCGGCGGGTCATGG 122
      |||
Sbjct 418 CCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGGTTTCCCGGAAGCTGCCCGGCGGGTCATGG 359

Query 123 GAATAACGCCGCCGCATCGCCAGTCGGCATCGTTTATGGTCGGAACACTACGACGGTATCTG 182
      |||
Sbjct 358 GAATAACGCCGCCGCATCGCCAGTCGGCATCGTTTATGGTCGGAACACTACGACGGTATCTG 299

Query 183 ATCGTCTTCGAACCTCCGACTTTGTTCTTGATTAATGAAAACATTCTTGGCAAATGCTT 242
      |||
Sbjct 298 ATCGTCTTCGAACCTCCGACTTTGTTCTTGATTAATGAAAACATTCTTGGCAAATGCTT 239

Query 243 TCGCTCTGGTCCGTCTTGCGCCGGTCCAAGAATTTACCTCTAGCGGCGCAATACGAATG 302
      |||
Sbjct 238 TCGCTCTGGTCCGTCTTGCGCCGGTCCAAGAATTTACCTCTAGCGGCGCAATACGAATG 179

Query 303 CCCCCGGCCGTCCCTCTTAATCATGGCCTCAGTTCGGAAAACCAACAAAATAGAACC GCG 362
      |||
Sbjct 178 CCCCCGGCCGTCCCTCTTAATCATGGCCTCAGTTCGGAAAACCAACAAAATAGAACC GCG 119

Query 363 G 363
      |
Sbjct 118 G 118
```

ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 2 เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ASCT1 ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในคน (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 88% โดยไม่มีรายงานใน สุนัข

```
>gb|L14595.1|HUMASCT1A Human alanine/serine/cysteine/threonine transporter
(ASCT1) mRNA,
complete cds
Length=2102

GENE ID: 6509 SLC1A4 | solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid
transporter), member 4 [Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)

Score = 121 bits (65), Expect = 7e-25
Identities = 90/102 (88%), Gaps = 2/102 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query 10 TGTTGTGGGTCACCTCTTCAT-AGCTGGTTGCGTACGTACGGAAAGCTGCAACCACGAGA 68
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
sbjct 787 TGTTCTGGGTCACGACTTTATAATC-GGTTGCATACGTACGGAAAGCTGCAACCACAAGA 729

Query 69 TTTGATGGAAAGAGGTTTCTGGCCAGGTCGAGGAAAGAGTCC 110
      || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
sbjct 728 TTGGAGGGAAACAGGTTTCTGGCCAGGTCGAGGAAAGAGTCC 687
```

ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 3 เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATB<sup>0+</sup> ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในสุนัข และคน (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 97% ในสุนัข และ 93% ในคน

```
>gb|AY375265.2| Sus scrofa amino acid transporter B0+ mRNA, partial cds
Length=1058

GENE ID: 431671 SLC6A14 | solute carrier family 6 (amino acid transporter),
member 14 [Sus scrofa] (10 or fewer PubMed links)

Score = 78.7 bits (42), Expect = 1e-12
Identities = 44/45 (97%), Gaps = 0/45 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 9 TTTGACTTTGGGTCTGGACTCTCAGTTTGCTTCGATTGAAACGAT 53
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
sbjct 895 TTTGACTTTGGGTCTGGACTCTCAGTTTGCTTCGATTGAAACGAT 939
```

```
>ref|NM_007231.1| Homo sapiens solute carrier family 6 (amino acid
transporter),
member 14 (SLC6A14), mRNA
gb|AF151978.1|AF151978 Homo sapiens amino acid transporter B0+ (ATB0+) mRNA,
complete
cds
Length=4520

GENE ID: 11254 SLC6A14 | solute carrier family 6 (amino acid transporter),
member 14 [Homo sapiens] (10 or fewer PubMed links)

Score = 73.1 bits (39), Expect = 7e-11
Identities = 45/48 (93%), Gaps = 0/48 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 9 TTTGACTTTGGGTCTGGACTCTCAGTTTGCTTCGATTGAAACGATCAC 56
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
sbjct 1336 TTTAACTTTGGGTCTCGATTCTCAGTTTGCTTCGATTGAAACGATCAC 1383
```

ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 4 เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน LAT2 ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในสุกร และคน (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 98% ในสุกร และ 94% ในคน

```
>ref|XM_001924415.1| PREDICTED: Sus scrofa similar to 4F21c-5 (LOC100151863),
partial
mRNA
Length=3553
```

```
GENE ID: 100151863 LOC100151863 | similar to 4F21c-5 [Sus scrofa]
```

```
Score = 268 bits (145), Expect = 3e-69
Identities = 152/155 (98%), Gaps = 2/155 (1%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 TGTGACCAGTGGGA-GGAG-TGAAGATGGCTCTGGGAAGGTTCTTGTAGGGATCCACAAG 58
|||||
sbjct 323 TGTGACCAGTGGGATGGAGATGAAGATGGCTCTGGGAAGGTTCTTGTAGGGATCCACAAG 264

Query 59 TTCCTCAGTCACATAATTGAGGAAGTTCAGCCTCCGTAGGCAAAGGAGCCCTGAAGGAA 118
|||||
sbjct 263 TTCCTCAGTCACATAATTGAGGAAGTTCAGCCTCCGTAGGCAAAGGAGCCCTGAAGGAA 204

Query 119 AGCCAGTGCATGAGGCCGATGTCAGGTTCTGGA 153
|||||
sbjct 203 AGCCAGTGCATGAGGCCAATGTCAGGTTCTGGA 169
```

```
>gb|AF171669.1|AF171669 Homo sapiens glycoprotein-associated amino acid
transporter LAT2
(LAT2) mRNA, complete cds
Length=3728
```

```
GENE ID: 23428 SLC7A8 | solute carrier family 7 (cationic amino acid
transporter, y+ system), member 8 [Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)
```

```
Score = 235 bits (127), Expect = 4e-59
Identities = 146/155 (94%), Gaps = 2/155 (1%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 TGTGACCAGTGGGA-GGAG-TGAAGATGGCTCTGGGAAGGTTCTTGTAGGGATCCACAAG 58
|||||
sbjct 1054 TGTGACCAGTGGGATGGAGATGAAGATGGCTCTGGGAAGGTTCTTGTAGGGATCAACAAG 995

Query 59 TTCCTCAGTCACATAATTGAGGAAGTTCAGCCTCCGTAGGCAAAGGAGCCCTGAAGGAA 118
|||||
sbjct 994 CTCCTCAGTCACGTAATTGAGAAAGTTCAGCCTCCATAGGCAAAGGAGCCCTGAAGGAA 935

Query 119 AGCCAGTGCATGAGGCCGATGTCAGGTTCTGGA 153
|||||
sbjct 934 AGCCAGTGCATGAGGCCGATGTCAGGTTCTGGA 900
```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 6 เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน CAT1 ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในสุกร และคน (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 100% ในสุกร และ 90% ในคน

```
>ref|NM_001012613.1| Sus scrofa solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1 (SLC7A1), mRNA
gb|AY371320.1| Sus scrofa cationic amino acid transporter-1 mRNA, complete cds
Length=6416
```

```
GENE ID: 503545 SLC7A1 | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1 [Sus scrofa] (10 or fewer PubMed links)
```

```
Score = 217 bits (117), Expect = 1e-53
Identities = 117/117 (100%), Gaps = 0/117 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1   ACGTCGCACTCCAGGCTCTGGCGACGCTGGATGTACCGATGATGTAGGAGAGGATGAGGT 60
          |||
sbjct 772  ACGTCGCACTCCAGGCTCTGGCGACGCTGGATGTACCGATGATGTAGGAGAGGATGAGGT 713

Query 61  TCCAGCCGGTGATGAAGGCCAGAGCTCGCCACGGTGACGTAGCTGTAGAGGTAGG 117
          |||
sbjct 712  TCCAGCCGGTGATGAAGGCCAGAGCTCGCCACGGTGACGTAGCTGTAGAGGTAGG 656
```

```
>gb|AF078107.1|AF078107 Homo sapiens cationic amino acid transporter (CAT-1) mRNA, complete cds
Length=2130
```

```
GENE ID: 6541 SLC7A1 | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1 [Homo sapiens] (Over 10 PubMed links)
```

```
Score = 143 bits (77), Expect = 2e-31
Identities = 97/107 (90%), Gaps = 0/107 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 9   CTCCAGGCTCTGGCGACGCTGGATGTACCGATGATGTAGGAGAGGATGAGGTTCCAGCCG 68
          |||
sbjct 518  CTCCAGGCCCTCGCTACGCTTGAAGTACCGATGATGTAGGAGAGGATTAAGTTCCAGCCG 459

Query 69  GTGATGAAGGCCAGAGCTCGCCACGGTGACGTAGCTGTAGAGGTA 115
          |||
sbjct 458  GTGATGAAGGCCAGAGCTCTCCAACGGTGACATAGCTGTAGAGGTA 412
```

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 7 เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน ATA2 ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในสุกร และหนูrat (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 98% ในสุกร และ 94% ในหนูrat

```
>ref|XM_001927127.1| PREDICTED: Sus scrofa similar to solute carrier family 38, member 2 (LOC100151955), mRNA
Length=4369
```

```
GENE ID: 100151955 LOC100151955 | similar to solute carrier family 38, member 2 [Sus scrofa]
```

```
Score = 213 bits (115), Expect = 1e-52
Identities = 120/122 (98%), Gaps = 1/122 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 ACAGAATACAGGG-AAATATTGACACAACGTCAAGAGAATTATAAAAAGAGCAATTCCA 59
|||||
sbjct 413 ACAGAATACAGGGAAAATATTGACACAACGTCAAGAGAATTATAAAAAGAGCAATTCCA 354

Query 60 GTATTAGCCATGGCATAAGAAAGCCCAAGGATTCCACTGCCCAATCGCATTGGTCAGA 119
|||||
sbjct 353 GTATTAGCCATGGCATAAGAAAGCCCAAGGATTCCACTGCCCAATCGCATTGCTCAGA 294

Query 120 TT 121
||
sbjct 293 TT 292
```

```
>gb|AF273024.1|AF273024 Rattus norvegicus amino acid system A transporter mRNA, complete cds
Length=4434
```

```
GENE ID: 29642 slc38a2 | solute carrier family 38, member 2 [Rattus norvegicus] (Over 10 PubMed links)
```

```
Score = 174 bits (94), Expect = 6e-41
Identities = 110/117 (94%), Gaps = 3/117 (2%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 7 TACAG-GGAAATATTGACAC-AACTGTCAAGAGAATTATAAAAAGAGCAATTCCAGTATT 64
|||||
sbjct 579 TACAGAGAAAAATCGACACGAAC-GTCAAGAGAATTATAAAAAGAGCAATTCCAGTATT 521

Query 65 AGCCATGGCATAAGAAAGCCCAAGGATTCCACTGCCCAATCGCATTGGTCAGATT 121
|||||
sbjct 520 AGCCATGGCATAAGAAAGCCCAAGGATTCCACTGCCCAATCGCATTGCTCAGATT 464
```

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการตรวจยืนยันลำดับเบสชุดที่ 8 เปรียบเทียบยีนตัวขนส่งกรดอะมิโน CAT2B ระหว่างที่ได้ (query) กับที่มีรายงานในคน และหนูrat (sbjct) มีความเหมือน (identity) ของลำดับเบส 97 % ในคน และหนูrat โดยไม่มีรายงานในสุกร

```
>gb|U76369.1|HSU76369 Human cationic amino acid transporter-2B (ATRC2) mRNA,
partial
cds
Length=400
```

```
GENE ID: 6542 SLC7A2 | solute carrier family 7 (cationic amino acid
transporter, y+ system), member 2 [Homo sapiens] (10 or fewer PubMed links)
```

```
Score = 143 bits (77), Expect = 1e-31
Identities = 82/84 (97%), Gaps = 2/84 (2%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 TCTTCGTTTTGG-ATTGA-TTGAGCTAGACATTTGAAAAGCAACCCATCCTCCGCCATAG 58
|||||
sbjct 150 TCTTCGTTTTGGAATTGATTTGAGCTAGACATTTGAAAAGCAACCCATCCTCCGCCATAG 91

Query 59 CATAGATTACACGAGGCATTGGGA 82
|||||
sbjct 90 CATAGATTACACGAGGCATTGGGA 67
```

```
>gb|DQ067615.1| Rattus norvegicus cationic amino acid transporter-2 (CAT2)
gene
complete cds, alternatively spliced
Length=25411
```

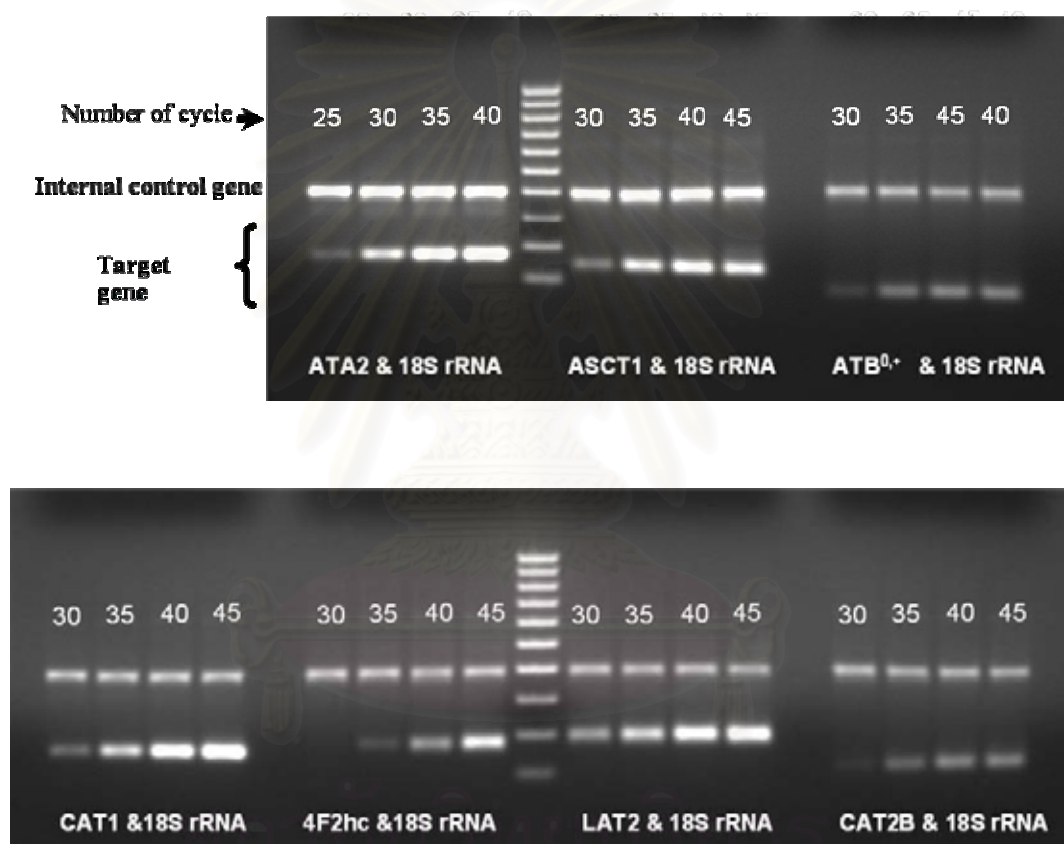
```
Score = 143 bits (77), Expect = 1e-31
Identities = 82/84 (97%), Gaps = 2/84 (2%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 TCTTCGTTTTGG-ATTGA-TTGAGCTAGACATTTGAAAAGCAACCCATCCTCCGCCATAG 58
|||||
sbjct 15153 TCTTCGTTTTGGAATTGATTTGAGCTAGACATTTGAAAAGCAACCCATCCTCCGCCATAG
15094

Query 59 CATAGATTACACGAGGCATTGGGA 82
|||||
sbjct 15093 CATAGATTACACGAGGCATTGGGA 15070
```

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

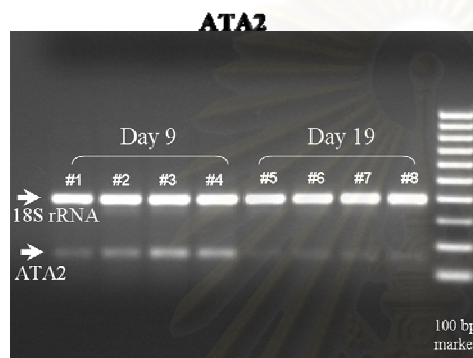
การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอน *semiquantitative RT-PCR* รูปที่ 3 แสดงจำนวนรอบต่างๆตั้งแต่ 25-45 รอบ ในการทำให้เกิดแถบผลผลิต DNA ในกระบวนการ PCR ต่อการแสดงผลของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในแต่ละตัว เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกจำนวนรอบที่เหมาะสม จากข้อมูลดังกล่าว เมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาจำนวนรอบที่เหมาะสม (อยู่ในช่วงเส้นตรงของการเพิ่มผลผลิตของ DNA) จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับกำหนดรอบการทำงานของเครื่อง PCR เท่ากับ 30 รอบ ใช้สำหรับการแสดงผลของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนที่มีชื่อว่า ATA2, ASCT1, ATB<sup>0,+</sup> และเท่ากับ 33 รอบ ใช้สำหรับการแสดงผลของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนที่มีชื่อว่า CAT1, 4F2hc, LAT2 and CAT2B



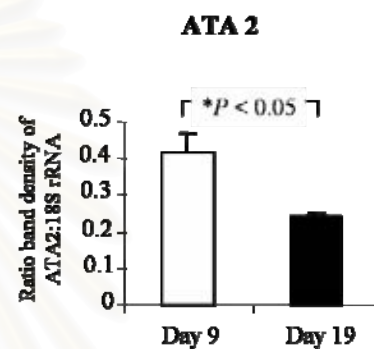
รูปที่ 3 Determination of optimum cycles for PCR amplification of ATA2, ASCT1, ATB<sup>0,+</sup>, CAT1, 4F2hc, LAT2 and CAT2B gene in each experimental group. 18S rRNA was used as internal control. Amplification products were subjected to electrophoresis on 1.6% agarose gel in TEA buffer for 67 min at 70 volt. DNA bands were visualized with ethidium bromide. The PCR amplified products were loaded for 12  $\mu$ l/well. The figure was represented the optimum cycles for PCR amplification of sow's mammary tissues on day 9<sup>th</sup> and day 19<sup>th</sup> of lactation group.

ปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกร พบว่า mRNA ตัวขนส่งกรดอะมิโน ได้แก่ ATA2, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1, CAT2B, และLAT2 มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรในกลุ่มที่เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนมภายในเต้านมแม่สุกร ในวันที่ 9 และ 19 ของระยะเลี้ยงให้นมลูก โดยมีปริมาณการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในวันที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับในวันที่ 9 ยกเว้น 4F2hc ที่มีปริมาณการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 9 และ 19 ของระยะเลี้ยงให้นมลูก ดังแสดงในรูปที่ 4

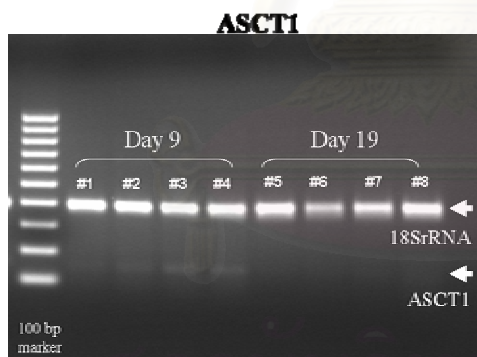
A.



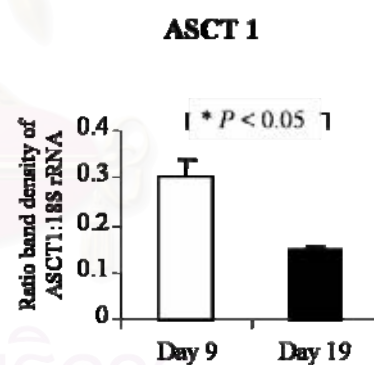
H.



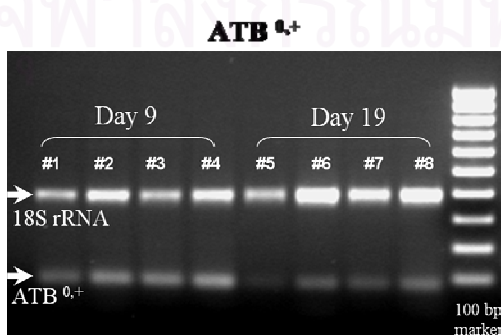
B.



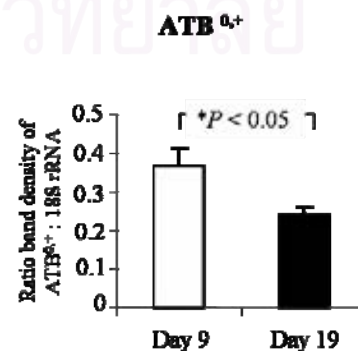
I.



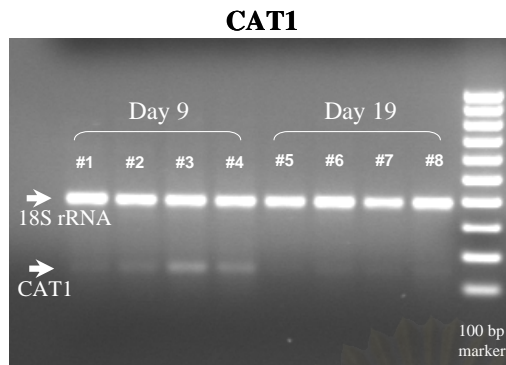
C.



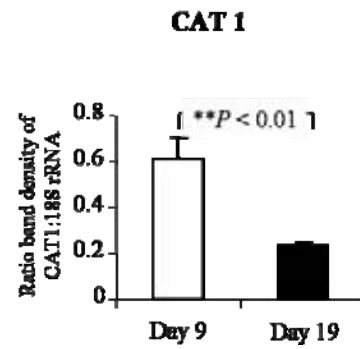
J.



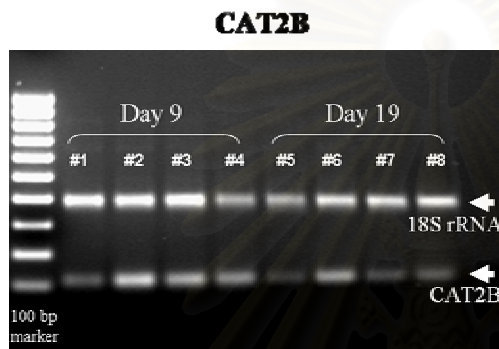
D.



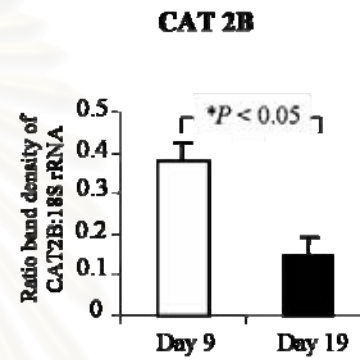
K.



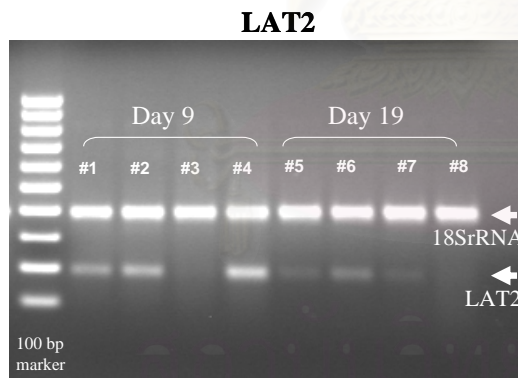
E.



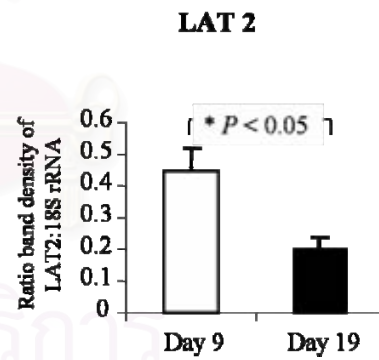
L.



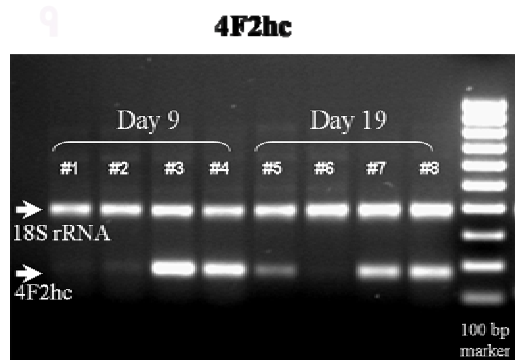
F.



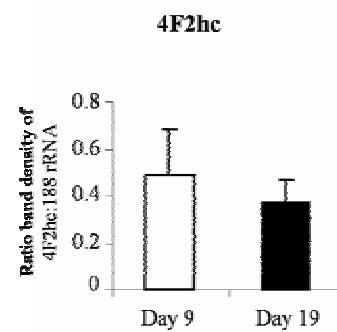
M.



G.



N.



รูปที่ 4 Analysis of relative quantification of mRNA amino acid transporter by semiquantitative RT-PCR. Total RNA were isolated from sow mammary secretary cells on day 9 and day 19 of lactation. Semiquantitative RT-PCR reaction for amino acid transporter gene; ATA2, ASCT1, ATB<sup>0,+</sup>, CAT1, CAT2B, LAT2, and 4F2hc were performed using 18S rRNA as internal control. The gel figures were representative of 3 independent experiments. The amplification products were size-fractionated on 1.5 % agarose gels and the DNA bands were visualized by ethidium bromide staining. The relative abundance of each transporter gene in both groups was showed as figure and bar chart, respectively. Data represent as the means  $\pm$  SEM. (n = 4).

A and H: The relative mRNA abundance of ATA2; system A was decreased significant when compared to sows on day 9 with those on day 19 of lactation ( $P < 0.05$ ).

B and I: The relative mRNA abundance of ASCT1; system ASC was decreased significant when compared to sows on day 9 with those on day 19 of lactation ( $P < 0.05$ ).

C and J: The relative mRNA abundance of ATB<sup>0,+</sup>; system B<sup>0,+</sup> was decreased significant when compared to sows on day 9 with those on day 19 of lactation ( $P < 0.05$ ).

D and K: The relative mRNA abundance of CAT1; system y<sup>+</sup> was decreased significant when compared to sows on day 9 with those on day 19 of lactation ( $P < 0.01$ ).

E and L: The relative mRNA abundance of CAT2B ; system y<sup>+</sup> was decreased significant when compared to sows on day 9 with those on day 19 of lactation ( $P < 0.05$ ).

F and M: The relative mRNA abundance of LAT2 ; system L was decreased significant when compared to sows on day 9 with those on day 19 of lactation ( $P < 0.05$ ).

G and N: The relative mRNA abundance of 4F2hc ; heterodimer of system L did not differ between two groups of sows on day 9 and day 19 of lactation ( $P > 0.05$ ).

## วิจารณ์ผลการทดลอง

### *ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาของอาหารและปริมาณความเข้มข้นของกรดอะมิโน*

**ในอาหาร** สูตรอาหารสัตว์ที่ออกแบบนำมาใช้ในการทดลอง ผลจากการคำนวณของสารอาหารหลักๆ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีคุณค่าของสารอาหารอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน และประการสำคัญอยู่ในช่วงตามข้อแนะนำของ NRC สำหรับแม่สุกรระยะให้น้ำนมเลี้ยงลูก เช่นเดียวกับผลปริมาณความเข้มข้นของกรดอะมิโนทั้ง 15 ตัวในอาหารที่ใช้ จึงไม่ควรเป็นผลกระทบต่อการทดลองเพื่อศึกษาถึงผล กระทบต่อช่วงระยะเวลาการให้น้ำนมในแม่สุกร

### *ผลการทดลองในด้านประสิทธิภาพในแม่สุกรและผลคุณลักษณะการเจริญเติบโตในลูกสุกร*

ที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แม่สุกรทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง ที่ถูกทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนมภายในเต้านมในวันที่ 9 และ 19 ของระยะเลี้ยงให้นมลูก เมื่อทำการเปรียบเทียบในช่วงเวลาเดียวกันของการทดลอง มีความสามารถกินอาหาร มีอัตราการเลี้ยงลูกรอดชีวิตในช่วงการทดลอง ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ผลเช่นเดียวกับในลูกสุกร โดยปริมาณอาหารที่กินได้ น้ำหนักตัวและค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวันในแต่ละสัปดาห์ตลอดระยะเวลาการทดลองของลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่า เนื้อเยื่อที่ผลิตน้ำนมภายในเต้านมที่เก็บมาทำการศึกษาในวันที่ 9 และ 19 ของระยะเลี้ยงให้นมลูก เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนต่างๆดังกล่าว มีผลกระทบจากปัจจัยด้านอื่นๆน้อยมาก เช่น สารอาหารที่ได้รับ หรือการกระตุ้นการทำหน้าที่ของเต้านม เพราะปัจจัยจากผลของโปรตีนในอาหารที่ได้รับ เมื่อมีระดับโปรตีนไม่เพียงพอ (8.2% CP) พบการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านการพัฒนาของเต้านม ซึ่งสังเกตได้ทั้งจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่สังเกตเห็นจากภายนอกและทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อเต้านม ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อเต้านมว่าส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร (Rungcharoen et al., 2008) โดยอาจมีความเป็นไปได้สูงที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำนมที่แม่สุกรสร้างได้ ทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง (Jones and Stahly, 1999) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Guan และคณะ (2004) ที่พบว่า แม่สุกรได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน 7.8% CP ส่งผลให้แม่สุกรสูญเสียน้ำหนักตัวมากขึ้น และมีผลทำให้ลูกสุกรมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตลดลง แต่ในการทดลองครั้งนี้สูตรอาหารสัตว์ที่ออกแบบนำมาใช้ ทั้งจากการคำนวณและวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการมีคุณค่าของสารอาหารหลักๆ ตามข้อแนะนำของ NRC จึงไม่ควรส่งผลต่อสุกรทดลองทั้ง 2 กลุ่ม เพราะสุกรมีปริมาณการกินได้ที่ไม่แตกต่างกัน และลูกสุกรมีคุณลักษณะการเจริญเติบโตตามปกติ

### *ผลระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนทั้ง 18 ตัวในพลาสมาของแม่สุกรช่วงให้นมเลี้ยงลูก*

**และในลูกสุกรระยะคุณนม** เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละตัวในพลาสมาแม่สุกรทั้ง 2 กลุ่ม ในวันที่ 9 และ 19 ของระยะเลี้ยงให้นมลูก ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นผลมาจากการปรับสมดุล โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือการเคลื่อนเข้า-ออก

ระหว่างเซลล์ต่างๆกับระบบไหลเวียนเลือด เพราะภายในตัวแม่สุกรช่วงเลี้ยงให้นมลูก ต้องมีการปรับตัวอยู่ตลอดเวลา เพื่อความเหมาะสมเพียงพอในการดำรงชีวิตทั้งของแม่สุกรและลูกสุกร ซึ่งสนับสนุนจากผลการวิจัยของ บุญฤทธิ์ และคณะ ปี 2549 พบว่าระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนในแม่สุกรตัวนั้นๆ ทำการตรวจวัดต่อเนื่องในตลอดช่วงอายุ 4 สัปดาห์หลังคลอด พบความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ได้แก่ กลูซีน ฮิสทีดีน ฟีนิลอะลานีน วาลีน ไอโซลูซีน ไกลซีน กลูตามีน/กลูตาเมท โปรีลีน ไทโรซีน และทอรีน ส่วนในลูกสุกรระยะคูดนมสามารถพบการเปลี่ยนแปลงที่มีระดับความเข้มข้นลดลง ได้แก่ โปรีลีน และระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ได้แก่ อาร์จินีน และ ไลซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในวันที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 9 ของระยะการให้น้ำนม ซึ่งการลดลงของกรดอะมิโน โปรีลีน อาจเป็นผลมาจากการถูกนำไปใช้ในการสร้างคอลลาเจน (Collagen) ในปริมาณมากสำหรับในลูกสัตว์ที่กำลังเจริญเติบโต (Ball et al., 1986; Thongsong et al., 1999) ส่วนระดับความเข้มข้นของอาร์จินีนและไลซีนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนอาร์จินีนสามารถถูกสลายเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานและกรดอะมิโนไม่จำเป็น เช่น โปรีลีน กลูตาเมท และกลูตามีน โพลีเอมีน และไนตริกออกไซด์ (O'Quine et al., 2002) แต่จากผลวิจัยของ บุญฤทธิ์และคณะในปี 2549 เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงในช่วง 4 สัปดาห์ของความเข้มข้นของกลุ่มกรดอะมิโนที่จำเป็นและไม่จำเป็นบางตัว ในลูกสุกรหลังคลอด (วันที่ 1) ถึงวันที่หย่านม (วันที่ 28) พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่ลดลงจนอายุ 28 วัน ยกเว้น ไกลซีน กลูตามีน/กลูตาเมท และ ไอโซลูซีน มีการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ความแตกต่างของรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในพลาสมาของ 2 การทดลองที่แตกต่างกัน เป็นผลมาจากการเก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรทดลองตัวนั้นๆต่อเนื่องกันและเปรียบเทียบความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในแต่ละช่วงกับวันที่ 1 หลังคลอด

**ผลการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนที่ศึกษาในแต่ละตัว และการเปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลใน Gen Bank** เนื้อเยื่อเซลล์ผลิตน้ำนมในสุกรมีการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ เช่นเดียวกับ คนและสัตว์ชนิดอื่นๆ แต่มีรายงานที่เคยศึกษาแสดงให้เห็นผลการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโนน้อยมาก สำหรับในด้านมสุกร จากที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเบื้องต้นถึงการแสดงออกของ mRNA ของตัวขนส่งกรดอะมิโน CAT1, CAT2A, CAT2B, ATB<sup>0+</sup> และ ASCT1 ในด้านมสุกรขณะให้นม โดยวิธี Northern blot analysis (Laspieur et al., 2004) เท่านั้น จึงทำให้ยากต่อการออกแบบคู่ primer ที่จะนำมาใช้ในการศึกษา ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ เลือกใช้ข้อมูลลำดับเบส จาก คน หนู rat ที่เคยมีผู้ส่งข้อมูลเข้าไปเก็บไว้ใน Gen Bank ส่วนในกรณีที่ไม่เคยมีข้อมูลรายงานไว้ในสุกร มีข้อน่าสังเกตได้ว่าการเลือกออกแบบคู่ primer ที่ได้ข้อมูลมาจากคน มีโอกาสและความเป็นไปได้สูงกว่าที่ได้ผลการทดลองตามเป้าหมาย และสามารถสนับสนุนได้ด้วยผลของการเปรียบเทียบความเหมือน



(identity) ของลำดับเบสของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนต่างๆระหว่างสุกรกับคน และสุกรกับหนูrat ซึ่งเป็นข้อมูลประการหนึ่งที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาสำหรับยีนตัวขนส่งโคซิมที่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนในสุกร หรือในทางตรงกันข้ามเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาสำหรับยีนตัวขนส่งโคซิมต่างๆที่ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนในคน แต่เคยมีรายงานในสุกร

**ปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกร** พบว่ายีนตัวที่ทำหน้าที่หลักในการขนส่งกรดอะมิโน ได้แก่ ATA2, ASCT1, ATB<sup>0+</sup>, CAT1, CAT2B, และ LAT2 มีปริมาณการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในวันที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับในวันที่ 9 และสอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณการแสดงออกโปรตีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในการทำหน้าที่นำส่งกรดอะมิโนที่เป็นตัวตั้งต้น (substrate) เช่น ATA2 (Thongsong et al., 2008) ภายในเซลล์ของเต้านมหรือออกสู่น้ำนมสำหรับลูกสุกรต่อไป ความไวรับและการส่งสัญญาณต่อการเปลี่ยนแปลงหรือมีบทบาทตัวขนส่งกรดอะมิโนในเซลล์สัตว์ เคยรายงานโดย Hyde et al. (2003) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างช่วงระยะของการให้น้ำนมที่ช่วงต้นและช่วงให้น้ำนมสูง กับปริมาณการแสดงออกของยีนตัวขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรมีความใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Laspiur et al. (2004) ที่พบว่ามีแนวโน้มลดลงของตัวขนส่งกรดอะมิโน ATB<sup>0+</sup> ในวันที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบกับในวันที่ 7

**สรุปผลการทดลองในครั้งนี้** มีประโยชน์ในการเป็นข้อมูลพื้นฐานระดับอณูโมเลกุลเกี่ยวกับการแสดงออกและปริมาณของยีนขนส่งกรดอะมิโนต่างๆ ที่จะนำไปสู่การศึกษาต่อในระดับการแสดงออกและทำหน้าที่ของโปรตีนในการขนส่งกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมแม่สุกรระยะการให้นม หรือนำไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติ ที่เป็นข้อมูลวางแผนทางการประเมินความต้องการกรดอะมิโนในระยะการให้นมของแม่สุกร สำหรับเป็นประโยชน์ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของลูกสุกร นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลในการพัฒนาเสริมกรดอะมิโนหรือสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ลงในอาหารแม่สุกรที่ระยะการให้นม เพื่อให้ไปมีผลต่อการใช้ประโยชน์ได้ของกรดอะมิโนในเนื้อเยื่อเต้านมและน้ำนม ซึ่งในที่สุดจะส่งผลต่อสุขภาพการทำงานของเต้านม และองค์ประกอบในน้ำนมที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

- บุญฤทธิ ทองทรง สถณี ทองทรง ภัทราพรรณ รุ่งเจริญ สมพร แวงสูงเนิน และมนกานต์ อินทรกำแหง 2549. พัฒนาการเปลี่ยนระดับพลาสมากรดอะมิโนในแม่สุกรระยะตั้งท้องถึงให้นมและระยะลูกสุกรคุดนม ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32 กรุงเทพฯ หน้า 123-128
- AOAC., 1990. Official Methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists Inc., Washington, DC, USA.
- Ball, R. O., Atkinson, J. L., and Bayley, H. S. 1986. Proline as an essential amino acid for the young pig. Br. J. Nutr. 55: 659-668.
- Baumrucker, C. R. 1985. Symposium: Nutrient uptake across the mammary gland (amino acid transport systems in bovine mammary tissue). J. Dairy Sci. 68: 2436-2451.
- DeSantiago, S., Torres, N., Suryawan, A., Tovar, A. R., and Hutson, S. M. 1998. Regulation of branched-chain amino acid metabolism in lactating rat. J. Nutr. 128: 1165-1171.
- Guan, X., Bequette, B. J., Calder, G., Ku, P. K., Ames, K. N., and Trottier, N. L. 2002. Amino acid availability affects amino acid flux and protein metabolism in the porcine mammary gland. J. Nutr. 132: 1224-1234.
- Guan, X., Bequette, B. J., Ku, P. K., Tempelman, R. J., and Trottier, N. L. 2004. The amino acid need for milk synthesis is defined by maximal uptake of plasma amino acids by porcine mammary glands. J. Nutr. 134: 2182-2190.
- Hatanaka, T., Huang, W., Wang, H., Sugawara, M., Prasad, P. D., Leibach, F. H and Ganapathy, V. 2000. Primary structure, functional characteristics and tissue distribution pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. Biochim. Biophys. Acta. 1467: 1-6.
- Hyde, R., Taylor, P. M., and Hundal, H. S. 2003. Amino acid transporters: Roles in amino acid sensing and signaling in animal cells. Biochem. J. 373: 1-18.
- Jackson, S. C., Bryson, J. M., Wang, H., and Hurley, W. L. 2000. Cellular uptake of valine by lactating porcine mammary tissue. J. Anim. Sci. 78: 2927-2932.
- Jones, D.B., and Stahly, T.S. 1999. Impact of amino acid nutrition during lactation on body nutrient mobilization and milk nutrient output in primiparous sows. J Anim Sci. 77: 1513 – 1522.
- Kensinger, R. S., Collier, R. J., Bazer, F. W., Ducsay, C. A., and Becker, H. N. 1982. Nucleic acid, metabolic and histological changes in gilt mammary tissue pregnancy and lactogenesis. J. Anim. Sci. 54: 1297-1308.

- Kim, S. W., Osaka, I., Hurley, W. L., and Easter, R. A. 1999. Mammary gland growth as influenced by litter size in lactating sows: impact on lysine requirement. J. Anim. Sci. 77: 3316-3321.
- Laspiur, J. P., Burton, J. L., Weber, P. S. D., Kirkwood, R. N., and Trottier, N. L. 2004. Short communication: Amino acid transporters in porcine mammary gland during lactation. J. Dairy Sci. 87: 3235-3237.
- Nielsen, T. T., Trottier, N. L., Bellaver, C., Hans, H. H., and Easter, R. A. 1997. Effect of litter size on mammary gland amino acid uptake in lactating sows. Livestock Production Science. 67: 273-279.
- Nielsen, T. T., Trottier, N. L., Stein, H. H., Bellaver, C., and Easter, R. A. 2002. The effect of litter size and day of lactation on amino acid uptake by the porcine mammary glands. J. Anim. Sci. 80: 2402-2411.
- NRC. 1998. Nutrition requirement of swine (9<sup>th</sup> Ed.). National Academy Press, Washington, DC.
- O'Quinn, P. R., Knabe, D. A., Wu, G. 2002. Arginine catabolism in lactating porcine mammary tissue. J. Anim. Sci. 80: 467-474.
- Rajan, D. P., Kekuda, R., Huang, W., Deoe, L. D., Leibach, F. H., Prasad, P. D., and Ganapathy, V. 2000. Cloning and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent, broad-specific neutral amino acid transporter from mammalian intestine. Biochim. Biophys. Acta. 1463: 6-14.
- Richert, B. T., Goodband, R. D., Tokach, M. D., and Neilsen, J. L. 1998. *In vitro* oxidation of branched-chain amino acids by porcine mammary tissue. Nutr. Res. 18: 833-840.
- Rungcharoen, P., Thongsong, B., and Kalandakanond-Thongsong, S. 2008. Animal nutrigenomic: Nutrients can alter the expression of gene; Dietary protein deficiency alter the mRNA expression of some amino acid transporters at peak lactation in porcine mammary cells. Proceeding of 2008 graduate seminar; Innovations for animal health and production. : 37-39.
- Sarah, C., Wang, H., Bryson, J. M., and Hurley, W. L. 2005. Cellular uptake of amino acids by lactating sow mammary tissue. [online]. Available: [http:// www.traill.uiuc. edu/ porknet/paperDisplay.cfm? Type= Both & ContentID= 81.](http://www.traill.uiuc.edu/porknet/paperDisplay.cfm?Type=Both&ContentID=81)
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H., and Kanai, Y. 1999. Identification and functional characterization of Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. J. Biol. Chem. 274: 19745-19751.
- Shennen, D. B., Millar, I. D., and Calvert, D. T. 1997. Mammary tissue amino acid transport systems. Proc. Nutr. Soc. 56: 177-191.

- Sugawara, M., Nakanishi, T., Fei, Y. J., Huang, W., Ganapathy, M. E., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. 2000. Cloning of an amino acid transporter with functional characteristics and tissue distribution pattern identical to that of system A. Biol. Chem. 275: 16473-16477.
- Tanaka, K., Yamamoto, A., and Fujuta, T. 2005. Functional expression and adaptive regulation of Na<sup>+</sup> dependent neutral amino acid transporter SNAT2/ATA2 in normal human astrocytes under amino acid starved condition. Neurosci. Letters. 378: 70-75.
- Thongsong, B., Mukai, K., Bonkobara, M., Uchide, T., Ogawa, H., Miyazawa, K., Taguch, K., Yamada, H., Satoh, K., and Ono, K. 1999. Proline uptake into equine placental microvillous membrane vesicles. J. Equine Sci. 10: 21-25.
- Thongsong, B., Subramanian R. K., Ganapathy, V., and Prasad, P. D. 2005. Inhibition of amino acid transport system A by interleukin-1beta in trophoblasts. J. Soc. Gynec Inves. 12: 495-503.
- Thongsong, B., Kalandakanond-Thongsong, S., Prasad, P. D., and Ganapathy, V. 2006. Insulin-like growth factor-I regulates system A amino acid transport activity in BeWo choriocarcinoma cells. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Bangkok, Thailand : 389-393.
- Thongsong, B., Kalandakanond-Thongsong, S., Rungcharoen, P., Rungsipipat, A and Wangnaitham, S. 2008. Physiological changes in early and peak lactating sows regulate mammary cell proliferation, SNAT2/ATA2 gene-protein expression and localization. Proceedings 15<sup>th</sup> Congress of the FAVA 2008 - OIE Symposium. Bangkok, Thailand. (In press)
- Trottier, N. L., Shipley, C. F., and Easter, R. A. 1995. A technique for the venous cannulation of the mammary gland in the lactating sow. J. Anim. Sci. 73: 1390-1395.
- Trottier, N. L., Shipley, C. F., and Easter, R. A. 1997. Plasma amino acid uptake by the mammary gland of the lactation sow. J. Anim. Sci. 75: 1266-1278.
- Tucker, H. A. 1987. Quantitative estimates of mammary gland growth during various physiological states: A review. J. Dairy Sci. 70: 1958-1966.
- Turner, C. W. 1952. The anatomy of the mammary gland of swine. In: The mammary gland. I. The anatomy of the udder of cattle and domestic animals. Lucas Brothers, Columbia, Missouri. 279-314.