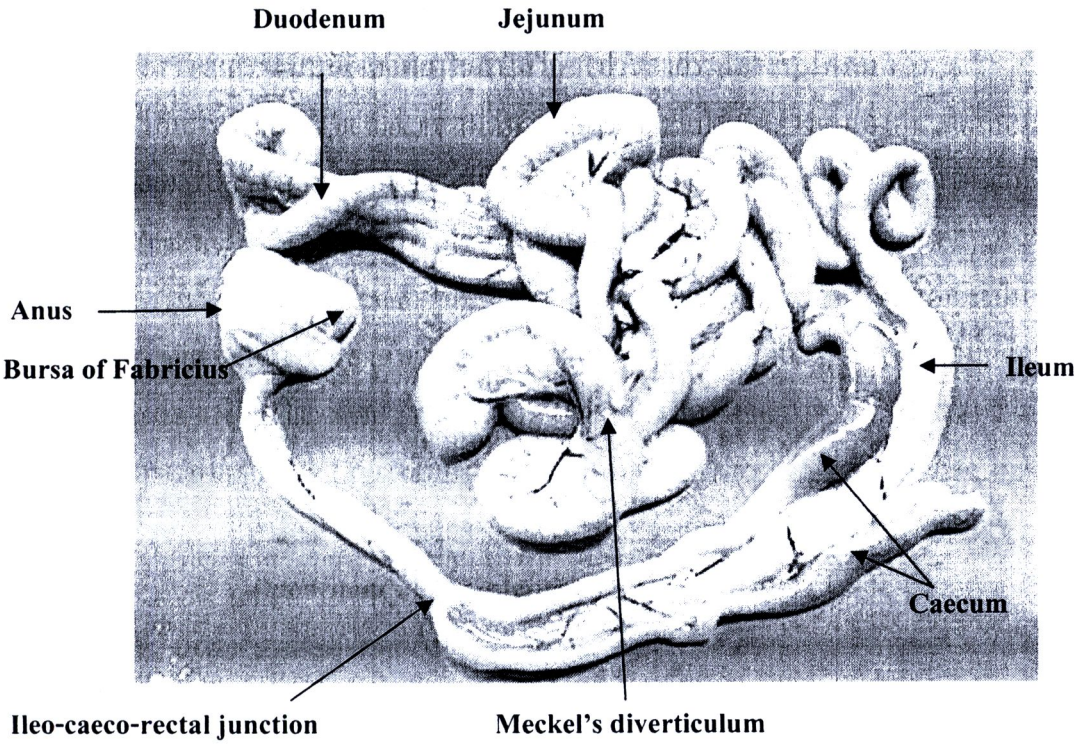
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

ลักษณะโครงสร้างและระบบนิเวศวิทยาในลำไส้ไก่ (ประภากร, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

1. ลำไส้เล็ก (small intestine) ส่วนต้น (duodenum) เป็นท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะโค้งเป็นห่วง (loop) เรียกว่า Duodenal loop เป็นที่ยึดตับอ่อน (pancreas) ซึ่งตับอ่อนจะทำหน้าที่ ในการผลิตน้ำย่อย (pancreatic juice) เข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ส่วนปลาย (ilium)

2. ไส้ติ่งหรือไส้ตัน (caecum) ในสัตว์ปีกเกือบทุกชนิดมีไส้ติ่ง 2 อันมีลักษณะเป็นถุงตอนปลายขยายใหญ่กว่าตอนโคนถุงกับท่อทางเดินอาหาร บริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ (ileo-caeco-rectal junction) เป็นส่วนสุดท้าย สำหรับการย่อยอาหารและการดูดซึมน้ำ เป็นบริเวณที่เกิดการหมัก และย่อยเยื่อใยในอาหาร โดยแบคทีเรีย



ภาพที่ 1 แสดงระบบลำไส้ไก่ (ประภากร, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

3. ลำไส้ใหญ่และทวารร่วม ลำไส้ใหญ่ (large intestine) อยู่ต่อจากลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วม มีความยาวเพียงประมาณ 10 เซนติเมตร ในส่วนนี้จะมีการดูดซึมน้ำจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกาย ทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้งก่อนที่จะขับถ่ายออกจากร่างกาย ทางทวารร่วม (cloaca) เป็น

ส่วนสุดท้ายของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะเปิดเข้าสู่ทวารร่วม เป็นท่อร่วมระหว่างระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์ หน้าที่ของลำไส้ใหญ่ คือ ขับอาหารที่ย่อยแล้วไปยัง Cloaca โดยการบีบรัดของกล้ามเนื้อแบบ Peristaltic movement ดูดซึมน้ำและ Electrolyte จากมูลสัตว์ที่กำลังจะถูกถ่ายออก ส่วนทวารร่วมมีหน้าที่ คือ ดูดซึมน้ำและ Electrolyte จากอาหารที่กำลังจะถูกถ่ายออก บีบรัดตัวเพื่อผลักดันอาหารที่ย่อยเสร็จแล้ว ออกนอกร่างกายทางทวารหนัก

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรีย

การตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture dependent method) เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลา ค่าใช้จ่ายและแรงงานมาก นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้จริง เช่น pH แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้จริงทั้งหมด ในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมา การวิเคราะห์ในระดับอณูชีววิทยา (molecular biology หรือ culture-independent method) ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก เนื่องจากสามารถสกัดดีเอ็นเอ ออกมาได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมทุกประเภท (Zhengdong *et al.*, 2002; Kamara, 2005) และปัจจุบันวิธีเปรียบเทียบด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้อย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน โดย Ribosomal RNA gene ถูกเลือกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย (เจษฎา, 2545)

1. ข้อมูล Ribosomal RNA (rRNA) และการใช้ 16S rRNA gene

ไรโบโซมของโพรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยขนาดใหญ่ 50S (large subunit) และหน่วยขนาดเล็กขนาด 30S (small subunit) โดยหน่วยใหญ่ประกอบด้วย 23S rRNA ขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ 5S rRNA ขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ และโปรตีน 34 ชนิด ส่วนหน่วยเล็กประกอบด้วย 16S rRNA ขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์และโปรตีน 21 ชนิด (ลัดดา, 2547) rRNA เหมาะสำหรับนำมาศึกษาวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์เนื่องจากไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์ทุกชนิดมีหน้าที่ที่แน่นอนในสิ่งมีชีวิต โดยมีการผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ ซึ่งมีการอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสมทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างนี้มีหน้าที่แน่นอนและมีความสำคัญต่อเซลล์และ rRNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะแน่นอนจึงสามารถนำมาใช้สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (Madigan and Martinco, 2006)

นิยมเลือก 16S rRNA gene มาใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งนี้เนื่องจากความเหมาะสมของโมเลกุล 16S rRNA gene โดยที่ 5S rRNA gene มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น้อย เมื่อเทียบกับ 16S rRNA gene ที่มี 1,500 นิวคลีโอไทด์ส่วน 23S rRNA มี 2,900 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มากและเป็นส่วนที่ดีแต่ในทางปฏิบัติและการวิเคราะห์นั้นทำได้ยากกว่า (Deng *et al.*, 2007) รวมทั้ง 16S rRNA gene มีส่วนของบริเวณอนุรักษ์และความผันแปรเพียงพอสำหรับจัดกลุ่ม หรือบอกความสัมพันธ์ ซึ่งหากยีนมีความผันแปรสูงคือ มีมิวเทชั้นสูงจะทำให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์สูญหายไป และไม่สามารถทำการเปรียบเทียบความเหมือนของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (alignment) ได้ เนื่องจากในการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ คือการเปรียบเทียบหาส่วนที่เหมือนและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Madigan and Martinco, 2006) ศรีสุดา (2547) กล่าวว่า แบคทีเรียจะมี 16S rRNA gene เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับโมเลกุล ไรโบโซม ซึ่งมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงของสายดีเอ็นเอ ของ 16S rRNA gene ที่เหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ในส่วนที่เหมือนกันนี้สามารถนำมาใช้เพื่อออกแบบไพรเมอร์หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ 16S rRNA gene จะมีช่วงของสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสช่วงนั้นเหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิด ในขณะเดียวกัน 16S rRNA gene ก็มีช่วงของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ช่วงที่เหมือนและช่วงที่แตกต่างกันของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ นั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย

2. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียจากข้อมูล 16S rRNA gene (Staley *et al., 2007*)

อนุกรมวิธานคือ การจำแนกประเภทด้วยการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่คล้ายกัน ให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และการจัดลำดับชั้นต่างๆเหล่านี้จะต้องไม่ทับซ้อนกัน โดยในปี ค.ศ.1923 David Bergey ศาสตราจารย์ทางวิทยาแบคทีเรียแห่งมหาวิทยาลัยเพนซิลวาเนียและเพื่อนร่วมงาน 4 คน ได้พิมพ์ผลงานการจัดจำแนกประเภทของแบคทีเรียที่สามารถใช้ในการตรวจสอบหาชนิดของแบคทีเรียได้หนังสือดังชื่อ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology และต่อมามีการออกรูปแบบใหม่ที่ชื่อ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ซึ่งมีรายละเอียดคำบรรยายเกี่ยวกับโพรคาริโอตที่ผ่านการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้นและมีการนำข้อมูลจากการศึกษาหาลำดับ rRNA gene ดีเอ็นเอและโปรตีนมาช่วยในการวิเคราะห์วิวัฒนาการของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น และในปัจจุบันมีการพิมพ์เป็นครั้งที่ 2 ชื่อว่า Bergey's Manual of Systematic Bacteriology-2nd ed. Emphasis on 16S rRNA

sequence phylogenetic classification ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียไฟลัมต่างๆ โดยหนังสือแบ่งออกเป็น 5 เล่ม ดังนี้

เล่มที่ 1 อาร์คีแบคทีเรียและยูแบคทีเรียบางกลุ่ม (Archeae & Deeply Branching & Phototrophic Bacteria) ซึ่งมีความหลากหลายมากทางสัณฐานวิทยา การสืบพันธุ์ สรีรวิทยา และนิเวศวิทยา เจริญแบบไม่ใช้ออกซิเจนในที่อยู่ที่เค็มจัดและอุณหภูมิสูงมาก

เล่มที่ 2 โพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) บางครั้งเรียกว่า แบคทีเรียสีม่วง ซึ่งเป็น ยูแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดและมีความหลากหลายมาก ประกอบด้วย 5 กลุ่มย่อยคือ แอลฟา-เบต้า-แกมมา-เดลต้า-และเอพซิลอน โพรทีโอแบคทีเรียมีรูปพรรณสัณฐานตั้งแต่รูปแท่งและกลมอย่างธรรมดาจนถึงโพรสทีกา หน่อ และฟรุตติงบอดี ส่วนทางสรีรวิทยามีความหลากหลายมาก เช่น โฟโตออโตโทรฟ เคโมลิโทโทรฟ และเคโมเฮเทอโรโทรฟ

เล่มที่ 3 แบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C ต่ำ (The Low G+C Gram-positive Bacteria) แบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *Myroplasma* *Clostridium* กับพวกที่ใกล้เคียงกัน *Bacillus* และ *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งพวกที่ไม่มีผนังเซลล์ พวกที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์

เล่มที่ 4 แบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณ G+C สูง (The High G+C Gram-positive Bacteria) เป็นแบคทีเรียที่มี G+C สูง คือมีปริมาณ G+C สูงกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกับรา

เล่มที่ 5 แพลงค์โทไมซีต สไปโรขีด ไฟโบรแบคเตอร์ แบคทีรอยด์ และฟูโซแบคทีเรีย (Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteria, Bacteroidetes & Fusobacteria) โพรคาริโอตที่ผ่านการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้นและมีการนำข้อมูลจากการศึกษาหาลำดับ rRNA gene ดีเอ็นเอและโปรตีนมาช่วยในการวิเคราะห์วิวัฒนาการของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น แสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียไฟลัมต่างๆ

แบคทีเรียในลำไส้จะมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ โดยมีผลต่อ รูปลักษณะของท่อทางเดินอาหาร โภชนะ การเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร และภูมิคุ้มกันโรค จุลินทรีย์ในลำไส้จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคมายึดเกาะผนังลำไส้ และยังช่วยตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย (Mead, 2000) อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายประการ ที่ส่งผลกระทบต่อส่วนประกอบของแบคทีเรียในลำไส้สัตว์ปีก เช่น อาหาร อายุของสัตว์ปีก การให้ยาปฏิชีวนะ และการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

การศึกษาถึงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก พบว่าประกอบไปด้วยพวก anaerobic bacteria ในส่วนของ cecum ไม่น้อยกว่า 38 ชนิด (Barnes, 1979) และมีสายพันธุ์ที่หลากหลาย ซึ่งคาดว่ามีประมาณ 10 – 60 % ของแบคทีเรียใน cecum เท่านั้นที่ตรวจพบด้วยวิธีการเพาะเชื้อ (Mead, 1989)

Jiangrang *et al.* (2003) ได้ศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในไก่ ด้วยการวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลโดยการใช้ยีน 16S rDNA พบว่า ในส่วนของ ileum ประกอบด้วย *Lactobacillus* 70% *Clostridiaceae* 11% *Steptococcus* 6.5% และ *Enterococcus* 6.5% สำหรับในส่วนของ cecum ประกอบด้วย *Clostidiaceae* 65% ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละส่วนของลำไส้จะมีกลุ่มของตัวเองเมื่อไก่มีอายุมากขึ้น

การใช้เทคนิค Culture-independent approach เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในลำไส้ไก่

เทคนิควิธี Culture-independent approach เป็นวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเข้ามาแทนที่ข้อจำกัดบางประการของวิธี Culture-independent approach และประสิทธิภาพของวิธีนี้จะสามารถจำแนกความแตกต่างลักษณะจุลินทรีย์ที่มีความซับซ้อน โดยเฉพาะกลุ่มที่ไม่สามารถแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและมีการพัฒนาเทคนิคของวิธีดังกล่าวอย่างมากมาย (Deng *et al.*, 2007)

1. การสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene (16S rRNA gene libraries)

เทคนิคการสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene นำมาประยุกต์เพื่อหาจุลินทรีย์ในระบบนิเวศทำให้สามารถแยกประชากรแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (cultured) และประชากรแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ (uncultured) โดยห้องสมุดโคลนจะประกอบด้วยโคลนที่มาจากสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด วิธีการที่สำคัญและจำเป็นสำหรับเทคนิคนี้คือ Gene cloning ซึ่งเป็นวิธีการที่จะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (เสาวนีย์, 2547; McSween ey *et al.*, 2007) โดยต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญ ดังนี้ (อารีลักษณ์, 2533)

1 ยีน (gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการที่ได้มาจากเซลล์แบคทีเรียชนิด ต่างๆ โดยการสกัด ดีเอ็นเอทั้งหมดออกจากเซลล์ (total DNA) จากนั้นนำมาสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณ ที่จำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer)

2. ดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ (vector) เนื่องจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองได้ในเซลล์ผู้รับ ดังนั้นต้องมีการเชื่อม ต่อกับดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์เพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนโดยการจำลองตัวเองในเซลล์ผู้รับ

3. เซลล์ให้อาศัยหรือเซลล์ผู้รับ (host) ในการเลือกเซลล์ให้อาศัยต้องมีการพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและไม่เป็นอันตรายหรือก่อให้เกิดโรค

4. การถ่ายทอดดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (host) การนำเซลล์ที่มีอยู่เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย เพื่อทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์ให้อาศัยได้นั้นทำโดยวิธีการที่เรียกว่า ทรานส์ฟอร์เมชั่น (transformation) ซึ่งเป็นวิธีการที่เกิดขึ้นเองได้ในธรรมชาติของแบคทีเรียบางชนิดอยู่แล้ว ซึ่งเมื่อถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะบางสภาวะอาจทำให้ Cell envelope เกิดลักษณะที่จะรับดีเอ็นเอจากภายนอกสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้น เซลล์ที่เกิดลักษณะดังกล่าวนี้เรียกว่า Competent cell เมื่อทำทรานส์ฟอร์แล้วนำทรานส์ฟอร์แมนท์ที่ได้ไปตรวจหา (screen) เซลล์ที่ต้องการ

2. อาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism)

อาร์เอฟแอลพี หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมีความสามารถที่จำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกหลาน แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง เช่น การเกิดการกลายพันธุ์แบบต่างๆ การเปลี่ยนแลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยวิธีอาร์เอฟแอลพีได้ใช้หลักการนี้คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัดดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งซึ่งมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์แบบจำเพาะ(recognition site) โดยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4 ถึง 6 bp ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างจากเดิมเรียกว่า เกิดโพลีมอร์ฟิซึมหรืออาร์เอฟแอลพี แล้วทำการเปรียบเทียบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น ใน ทางปฏิบัติการวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีที่เกิดขึ้นทำโดยคิดความแตกต่างของอาร์เอฟแอลพีระหว่างตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทีละคู่และนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจวิเคราะห์ด้วย คอมพิวเตอร์เพื่อแสดงแผนภาพความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น (สุรินทร์, 2545)

เทคนิคอาร์เอฟแอลพีสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบประชากรของจุลินทรีย์ เพื่อนำไปประเมินดูความหลากหลายของจุลินทรีย์ในการสุ่มเลือกโคลนที่เป็นตัวแทนของประชากร ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทาง พันธุกรรม ที่ผ่านมาเทคนิคนี้ได้มีการนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากร จุลินทรีย์ตัวอย่างต่างๆ (Augustin *et al.*, 1994)

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (Mulhardt, 2007)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอมีความสำคัญและเป็นประโยชน์มาก เช่น ทำให้ ทราบว่ายีนนั้นคือยีนใด หรือเพื่อที่จะเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายนั้นใน สิ่งมีชีวิตเดียวกันและต่างชนิดกัน ซึ่งเทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ ปี 1970 โดยมี 2 วิธี

1. Maxam-Gilbert sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Alian Maxam และ Walter Gilbert โดย ใช้สารเคมีตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ กัน

2. Didoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Fred Sanger โดย วิธีการใช้เอนไซม์มาต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นได้รับการพัฒนามาโดยตลอด ปัจจุบันสามารถทำได้ง่าย และไม่ยุ่งยากซับซ้อนคือ ใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า Automate machine ซึ่งสามารถหาลำดับนิ วคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้นโดยดัดแปลงมาจากวิธีการ Dideoxy sequencing หรือเรียกอีกอย่างว่า Dideoxy chain terminating method คือใช้เอนไซม์ DNA polymerase1 เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอ ที่เป็นคู่สมกับ ดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ โดยเริ่มจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดี เอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อน (denature) และใช้ Sequencing primer ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอ ไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบให้ด้าน 3' อยู่ใกล้กับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น Sequencing primer จะจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์กันอย่างเหมาะสม และเอนไซม์ DNA polymerase 1 จะทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จาก Deoxyribonucleotide 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ที่เติมลงไปในหลอดทดลองในปริมาณที่เพียงพอ โดยจะทำการ สังเคราะห์ทางปลาย 3' ต่อจาก Sequencing primer นอกจากนี้จะมีการเติมสาร Deoxyribonucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) เพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์ จบ การสังเคราะห์ (chain terminator) ซึ่ง Didexyribonucleotide ทั้ง 4 ชนิดจะถูกติดฉลากด้วย สีฟลูออ เรสเซนต์ต่างๆกัน เนื่องจากปกติเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย 3'-OH ในการ สังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ แต่ Didexyribonucleotide มีปลาย 3'-H แทน 3'-OH ดังนั้นใน กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นหาก DNA polymerase 1 ดึง Didexyribonucleotide เข้ามาแทน

Deoxyribonucleotide การสังเคราะห์ก็จะหยุดเพราะขาดปลาย 3'-OH ซึ่งจะป้องกันการเกิด Phosphodiester bond กับ 5'-P ของ Deoxyribonucleotide ตัวที่จะเข้ามาใหม่ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดในหลอดเดียวกัน และเมื่อจบปฏิกิริยาทำการแยกชิ้นส่วน ดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซีส เจลช่องเดียว ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับหยุดการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ตัวใดในสายนั้นและดีเอ็นเอสายที่มีการหยุดการสังเคราะห์ที นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวนี้ จะมีฟลูอเรสเซนต์จากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลจะบันทึกผลที่ออกมาว่าแถบดีเอ็นเอแถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีนิวคลีโอไทด์ตัวใด และตรวจแถบถัดมาเรื่อยๆ ตามลำดับ และแปลผลออกมาเป็น A หรือ T หรือ C หรือ G ตามสีที่ติดฉลากไว้ โดยข้อมูลที่ได้จะวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA และวินิจฉัยโรคบางชนิด (สสวท, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

ดีเอ็นเอคลังข้อมูลพันธุกรรมดีเอ็นเอ หรือ Deoxyribonucleic (DNA) เป็นสารพันธุกรรมทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอจะประกอบด้วยหน่วยย่อยพื้นฐานที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ อันเป็นชุดของโมเลกุลฟอสเฟต น้ำตาลเพนโตส และสารเคมีที่มีสมบัติเป็นด่างหรือเบส 1 ตัว ซึ่งเบสจะมีอยู่ 4 ชนิดคือ Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C), Thymine (T)

ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบขึ้นจากสายชุดนิวคลีโอไทด์ 2 สายที่มาพันเข้าด้วยกันเป็นลักษณะเกลียวคู่หรือบันไดเวียน โดยมีเบสที่เรียงรายอยู่ตามสายแต่ละสาย แต่ละสายทำหน้าที่ยึดจับระหว่างสายทั้งสองและปรากฏว่าสายส่วนที่มีเบส A จะจับคู่สร้างพันธะกับเบส T และส่วนที่มีเบส G จะจับคู่เบส C ซึ่งการจับคู่กันนี้เรียกว่าเป็นเบสคู่สม (Alberts *et al.*, 1983) และแต่ละส่วนบนสายดีเอ็นเอนี้เองที่เป็นที่อยู่ของยีน (gene) ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุข้อมูลสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยยีนที่ต่างกันก็จะมีตำแหน่งที่อยู่และการเรียงลำดับของเบสบนตัวมันแตกต่างกันไป

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับ

งานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น