

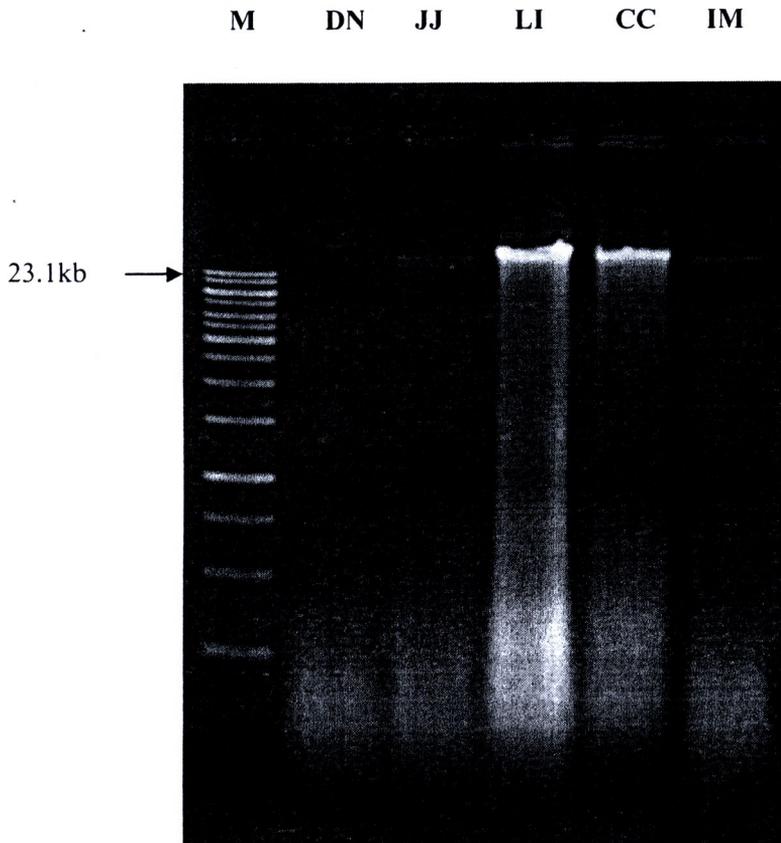
ผลการวิจัย

ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในลำไส้ไก่ โดยวิธีทางชีวโมเลกุล เริ่มต้นโดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย จากของเหลวในลำไส้ไก่หลังฆ่าและวิเคราะห์ ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมเข้าสู่ Competent cell *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างรูปแบบแผนภูมิ ต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4 เพื่อจำแนกชนิดและจกกลุ่มของประชากรแบคทีเรีย รวมทั้งหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมในลำไส้ไก่

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน

เมื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างตามวิธีการของ (An *et al.*, 2005) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าปฏิกิริยาแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda HindIII ที่มีขนาด 23.1 kb แสดงตามภาพที่ 2 จากผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอใน Lane ที่ 1 ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณความเข้มข้น 2.77 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แต่เมื่อพิจารณาประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ปนเปื้อนอยู่หลังการสกัดแยกที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (A_{230}) สำหรับกรดนิวคลีอิกและ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับโปรตีนซึ่งคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอพิจารณาจาก A_{260}/A_{280} DN (duodenum) เท่ากับ 1.63, JJ (jejunum) เท่ากับ 1.60, LI (large intestine) เท่ากับ 1.70, CC (caecum) เท่ากับ 1.69 และ IM (ilium) เท่ากับ 1.69 ค่า A_{260}/A_{230} DN เท่ากับ 1.88, JJ เท่ากับ 1.39, LI เท่ากับ 2.13, CC เท่ากับ 1.92 และ IM เท่ากับ 1.57 โดยค่าที่ปรากฏทั้ง 2 ค่าแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่อาจจะไปรบกวนการทำงานของเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Harry *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงต้องกำจัดสิ่งปนเปื้อนก่อนด้วยชุดแยกจีโนมิก

ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 %



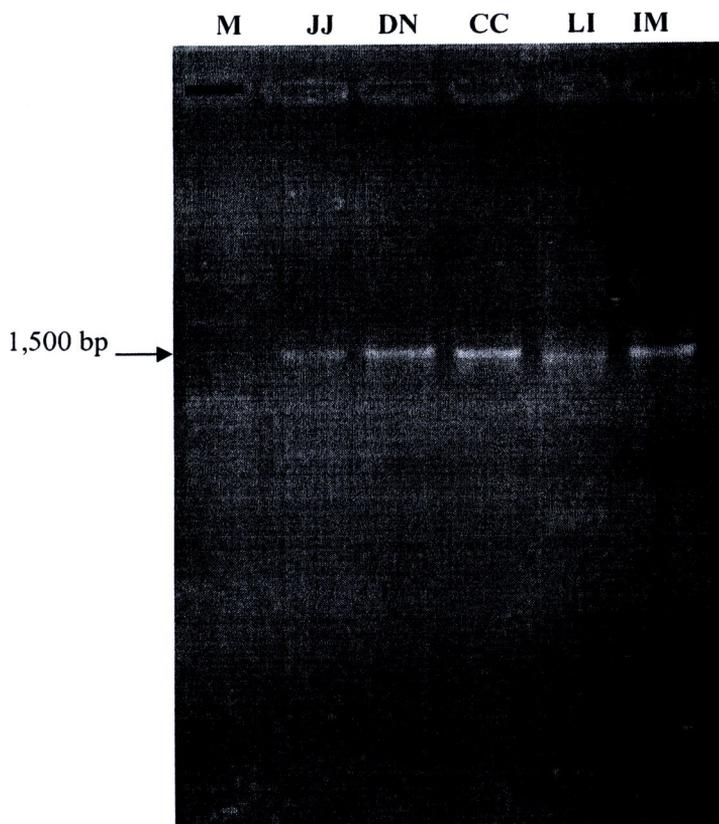
ภาพที่ 2 แสดงจีโนมดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม Lambda *Hind* (III) Lane DN (duodenum) Lane JJ (jejunum) Lane LI (large intestine) Lane CC (caecum) และ Lane IM (ilium) คือ จีโนมดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสกัดของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน

การสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene library

1. ผลการเพิ่มปริมาณจีโนมดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 3 ปฏิกริยา (25 ไมโครลิตรต่อปฏิกริยา) โดยใช้จีโนมดีเอ็นเอจากของเหลวในลำไส้ไก่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

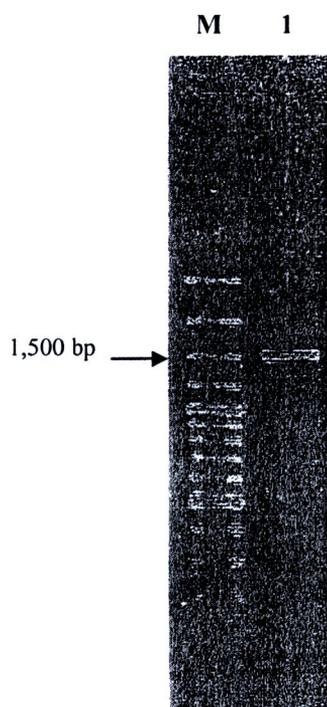
และใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REV8 (Kanokratana *et al.*, 2004) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp แสดงตามภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane DN (duodenum) Lane JJ (jejunum) Lane LI (large intestine) Lane CC (caecum) และ Lane IM (ilium) คือ ผลผลิตพีซีอาร์จากตัวอย่างของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน

2. ผลการทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

สกัดชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างโดยการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต้องการ (~1,500 bp) ออกจากเจล แล้วนำมาสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเป็นออกจากแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ตรวจสอบขนาดและปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ แสดงตามภาพที่ 4

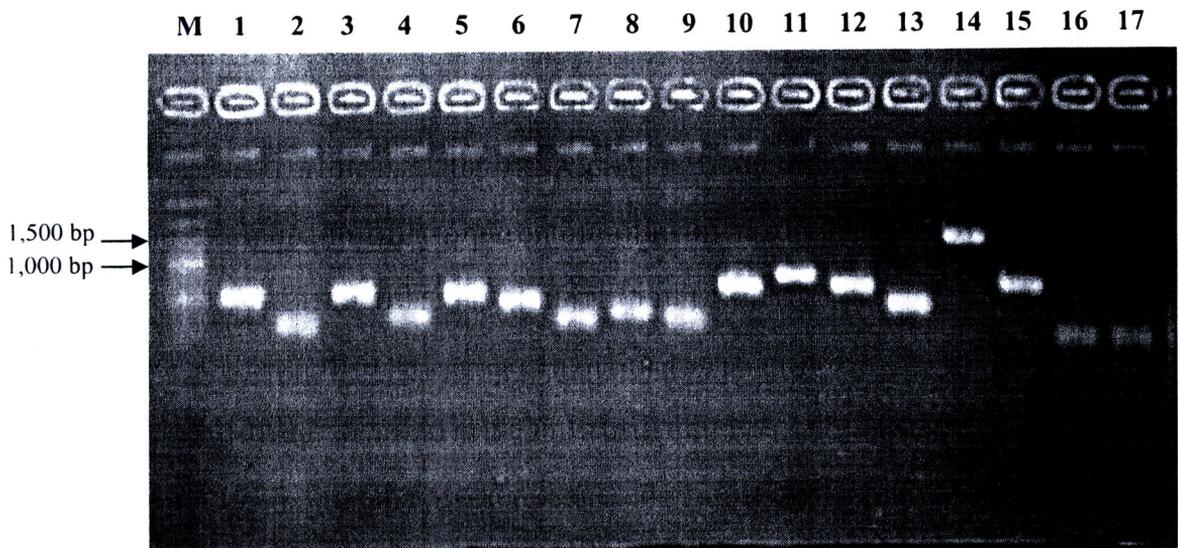


ภาพที่ 4 แสดงผลการทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์และตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์

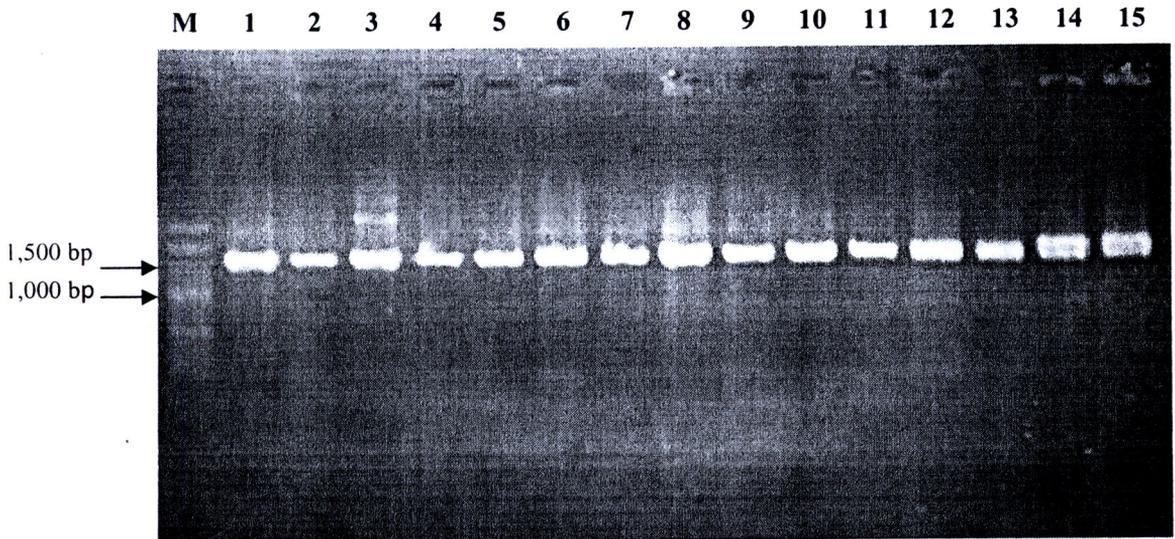
ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม

1. ผลการวิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิคโคลนพีซีอาร์

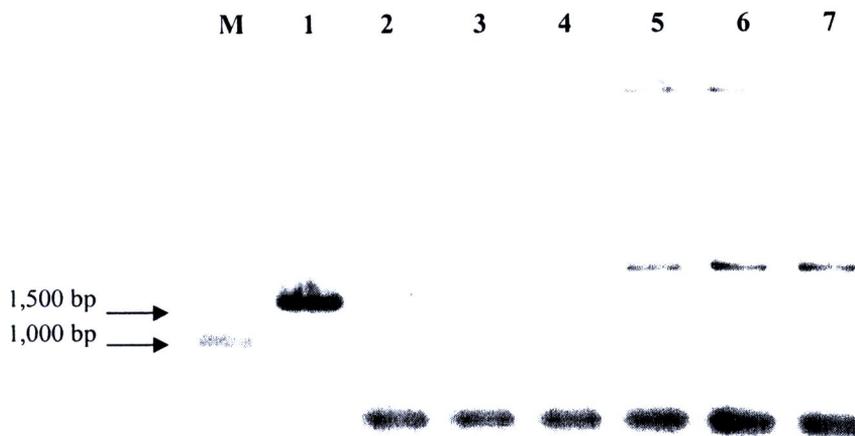
จากการวิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรงจากโคลนนี้ โดยเจีย (pick up) โคลนนี้เหล่านี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ M13F และ M13R เป็นคู่ไพรเมอร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp จึงทำการคัดเลือกโคลนที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป แสดงตามภาพที่ 5 - 9 โดยลำไส้ส่วน DN (duodenum) ได้โคลนพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 85 โคลน ส่วน JJ (jejunum) ได้โคลนพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 111 โคลน ส่วน IM (ilium) ได้โคลนพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 120 โคลน ส่วน LI (large intestine) ได้โคลนพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 107 โคลน และส่วน CC (caecum) ได้โคลนพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 191 โคลน



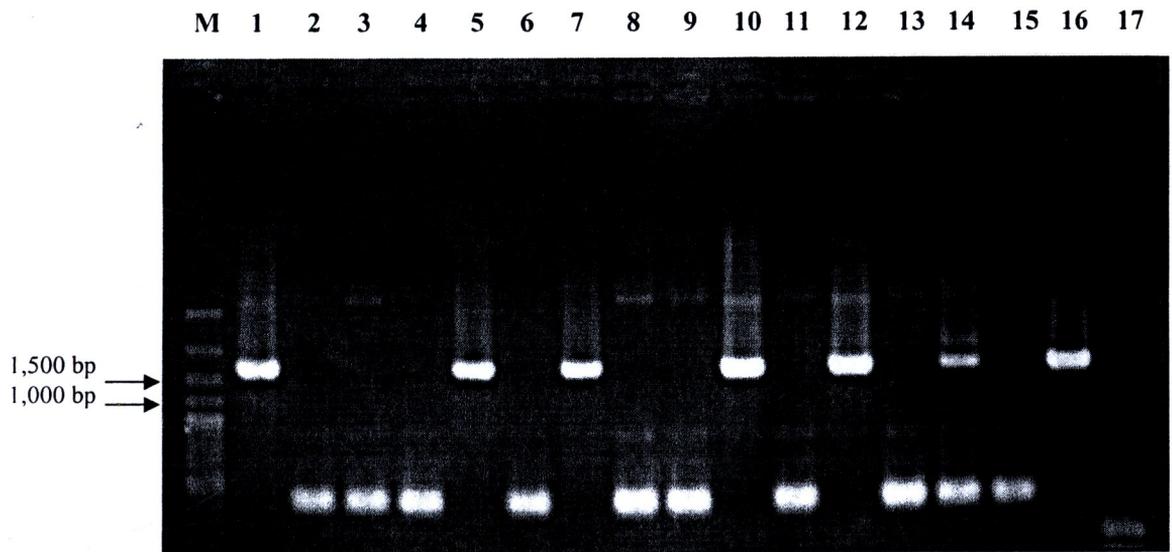
ภาพที่ 5 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน DN (duodenum) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1 - 7 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene



ภาพที่ 6 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน JJ (jejunum) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มี
 จีน 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1-15 คือ
 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีจีน 16S rRNA gene



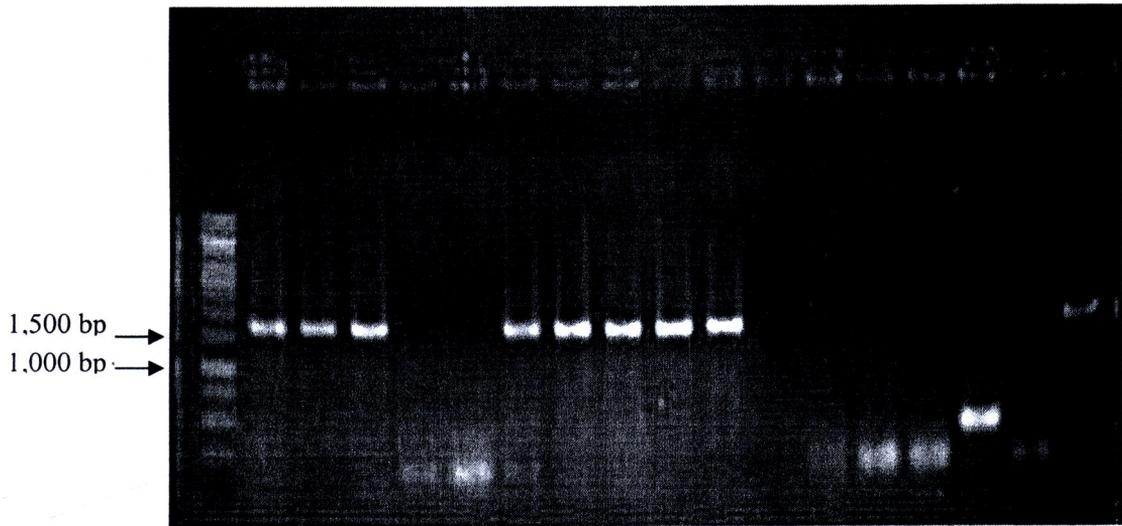
ภาพที่ 7 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน IM (ilium) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีจีน
 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M
 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1-7 คือ ผลผลิตพีซี
 อาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีจีน 16S rRNA gene



ภาพที่ 8 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน LI (large intestine) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1-17 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



ภาพที่ 9 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน CC (caecum) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 1kb DNA Ladder) Lane ที่ 1-17 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene

2. ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอสายผสมโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII* ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเข้มข้น 3 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder จากนั้นบันทึกภาพเจลแต่ละเจลไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์และจัดเป็นกลุ่มตามขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เหมือนกันจัดเป็น Phiyotype เดียวกันซึ่งจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 614 โคลน ได้ทั้งหมด 212 โคลน

โดยลำไส้ไก่ส่วน Duodenum จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 85 โคลนได้ทั้งหมด 4 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 3 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 3 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบ

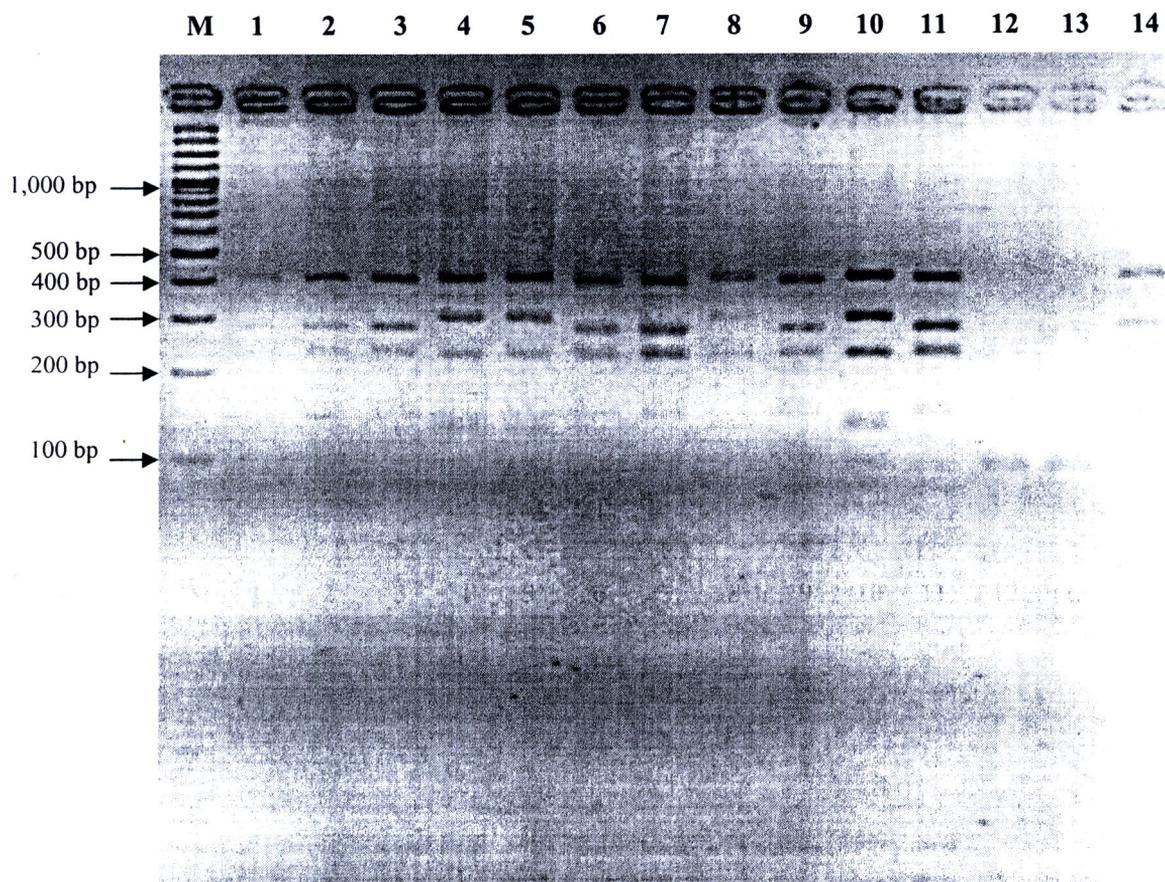
เทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่อ่ส่วน Duodenum มีดังนี้ *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured Bacteroidetes bacterium* (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 96 % และ *Uncultured bacterium clone cc_99* (DQ071521.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 %

ลำไส้ไก่อ่ส่วน Jejunum จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 111 โคลนได้ทั้งหมด 80 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 8 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 8 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่อ่ส่วน Jejunum มีดังนี้ *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured Bacteroidetes bacterium* (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 96 % *Uncultured bacterium clone SJTU* (EF403242.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured bacterium clone S1-25* (GQ898117.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured bacterium* (AM500763.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Lactobacillus aviarius* strain: LAV4 (AB175729.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 98 % *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % และ *Uncultured bacterium clone cc_99* (GQ175432.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 %

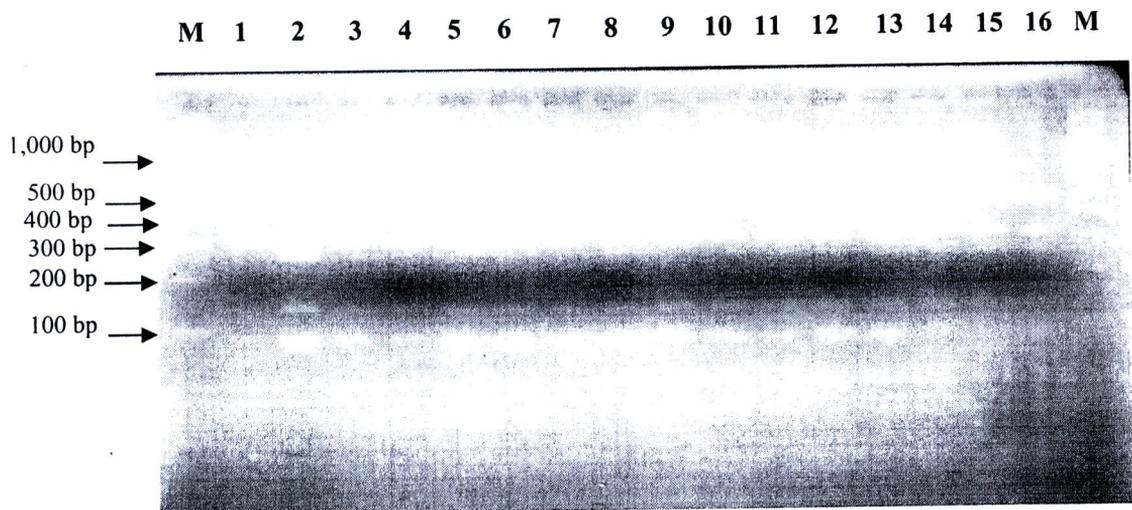
ลำไส้ไก่อ่ส่วน Ileum จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 120 โคลนได้ทั้งหมด 19 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 3 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 3 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่อ่ส่วน Ileum มีดังนี้ *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured Bacteroidetes bacterium* (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 96 % และ *Uncultured bacterium* (AM500763.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 %

ลำไส้ไก่อ่ส่วน Large intestine จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 107 โคลนได้ทั้งหมด 20 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นแบบเดียวกันทั้งหมดจึงคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้งหมด เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่อ่ส่วน Last intestine คือ *Uncultured bacterium clone S1-25* (GQ898117.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 %

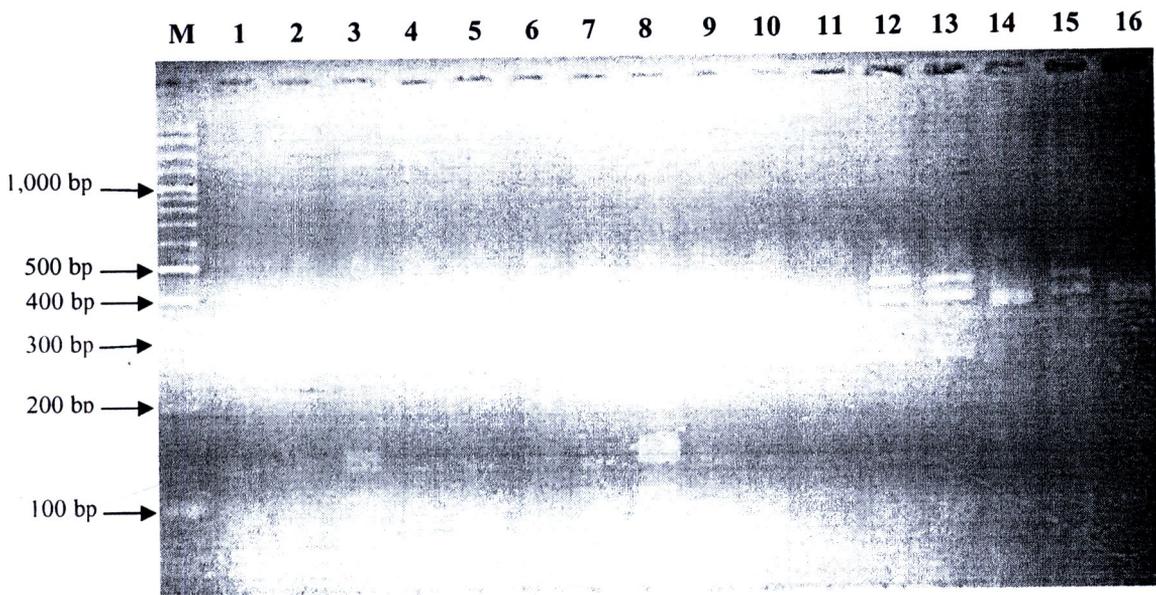
ลำไส้ไก่ส่วน Caecum จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 191 โคลนได้ทั้งหมด 89 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 5 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 5 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่ส่วน Caecum มีดังนี้ *Lactobacillus aviaries* strain: LAV7 (AB175732.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured Bacteroidetes bacterium* (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 96 % *Uncultured bacterium clone SJTU* (EF403242.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Uncultured bacterium clone cc_99* (GQ175432.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 % และ *Uncultured bacterium clone S1-25* (GQ898117.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % จากนั้นสุ่มเลือกโคลนของแต่ละกลุ่ม Phyotype ที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์มาสกัด พลาสมิดเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป แสดงตามภาพที่ 10 – 14



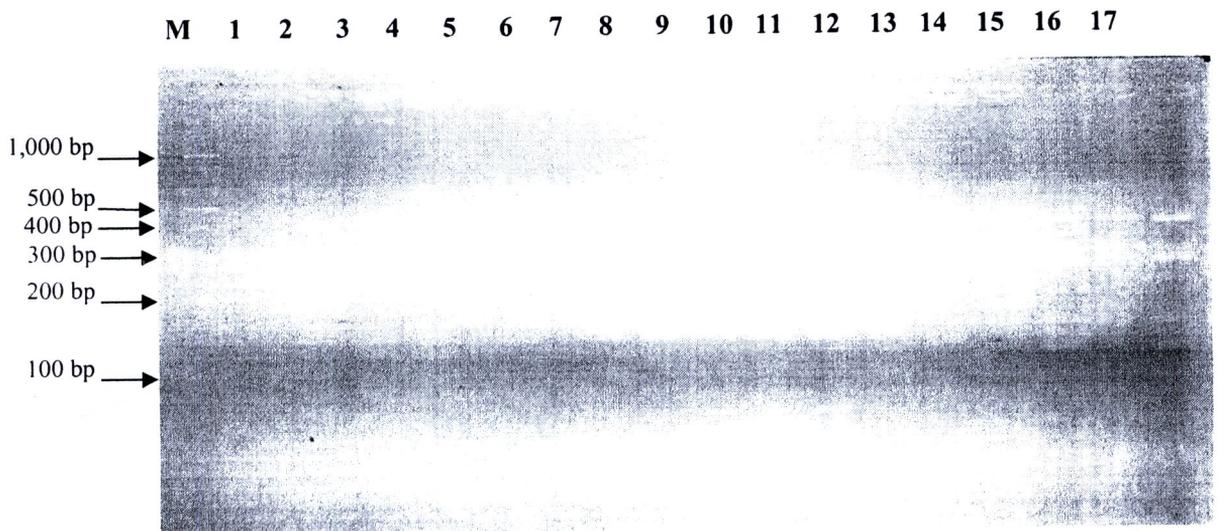
ภาพที่ 10 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน DN (duodenum) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII* ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-14 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII*



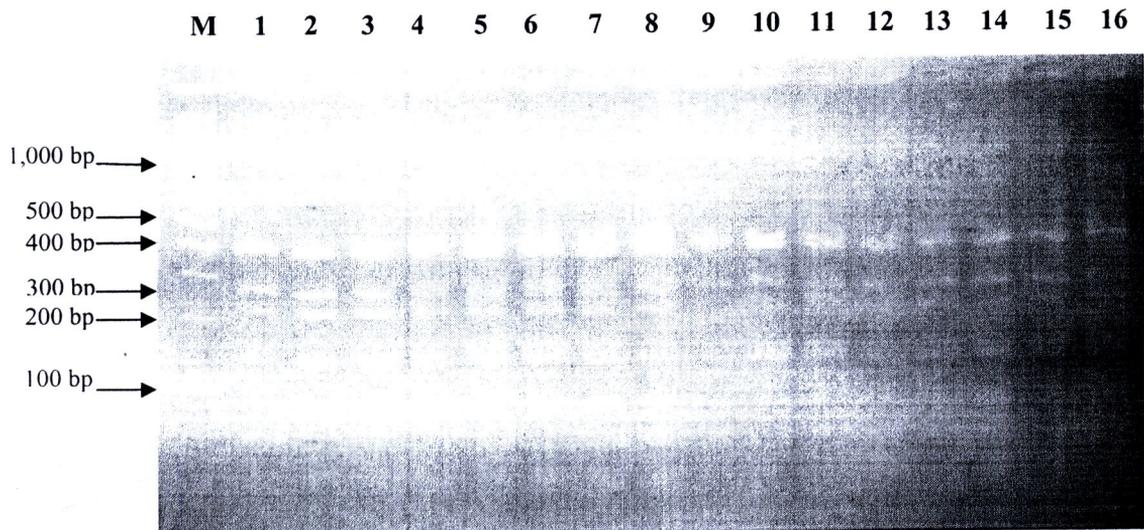
ภาพที่ 11 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน JJ (jejenum) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII* ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-16 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII*



ภาพที่ 12 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน IM (ilium) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII* ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-16 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII*



ภาพที่ 13 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน LI (large intestine) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII* ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-17 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII*



ภาพที่ 14 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน CC (caecum) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII* ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-16 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* และ *HaeIII*

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLASTN (basic local alignment search tools) จากฐานข้อมูล NCBI เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) หรือความคล้าย (% similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยผลการวิเคราะห์เป็นดังนี้

ในลำไส้ไก่ส่วน Duodenum พบแบคทีเรีย 1 โคลนที่เหมือนกับ *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) โดยมีความเหมือน 99 % พบแบคทีเรีย 2 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015 (EF071148.1) โดยมีความเหมือน 98 % และพบแบคทีเรีย 1 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) โดยมีความเหมือน 95 %

ในลำไส้ไก่ส่วน Jejunum พบแบคทีเรีย 20 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) โดยมีความเหมือน 95 % พบแบคทีเรีย 52 โคลนที่เหมือนกับ *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) โดยมีความเหมือน 99 % พบแบคทีเรีย 12 โคลนที่เหมือนกับ *Lactobacillus aviarius* strain: LAV4 (AB175729.1) โดยมีความเหมือน 98 % พบแบคทีเรีย 2 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone E1 (AM500763.1) โดยมีความเหมือน 99 % พบแบคทีเรีย 1 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015 (EF071148.1) โดยมีความเหมือน 98 % พบแบคทีเรีย 1 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone SJTU_A1_5_23 (EF403242.1) โดยมีความเหมือน 99 % และพบแบคทีเรีย 1 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone S1-25 (GQ898117.1) โดยมีความเหมือน 99 %

ในลำไส้ไก่ส่วน Ileum พบแบคทีเรีย 16 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015_030 (EF071148.1) โดยมีความเหมือน 98 % พบแบคทีเรีย 1 โคลนที่เหมือนกับ *Lactobacillus aviarius*, strain: LAV7 (AB175732.1) โดยมีความเหมือน 99 % และพบแบคทีเรีย 2 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone E1 (AM500763.1) โดยมีความเหมือน 99 %

ในลำไส้ไก่ส่วน Large intestine พบแบคทีเรีย 20 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone S1-25 (GQ898117.1) โดยมีความเหมือน 99 %

ในลำไส้ไก่ส่วน Caecum พบแบคทีเรีย 2 โคลนที่เหมือนกับ *Lactobacillus aviarius*, strain: LAV7 (AB175732.1) โดยมีความเหมือน 99 % พบแบคทีเรีย 3 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015_030 (EF071148.1) โดยมีความเหมือน 98 % พบแบคทีเรีย 46 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone SJTU_A1_5_23 (EF403242.1) โดยมีความเหมือน 96 % พบแบคทีเรีย 15 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) โดยมีความเหมือน 95 % และพบแบคทีเรีย 22 โคลนที่เหมือนกับ Uncultured bacterium clone S1-25 (GQ898117.1) โดยมีความเหมือน 99 %

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าลำไส้ไก่ส่วน Jejunum พบความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียมากที่สุดและพบแบคทีเรีย *Lactobacillus aviaries* เป็นจำนวนมากที่สุด ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกส์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในลำไส้ไก่ทุกส่วนจะเป็นแบคทีเรียชนิดที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการหรือเรียกว่า Uncultured bacterium โดยที่จะพบมากในลำไส้ไก่ส่วนปลาย ได้แก่ Large intestine และ Caecum แสดงตามตารางที่ 1

การวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรียในลำไส้ไก่

เมื่อสร้างแผนภูมิด้านไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียของลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน โดยเลือกตัวแทนโคลนของแต่ละ Phylotype มาวิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และกำหนดแบบจำลองการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide substitution) ด้วย Kimura-2-parameter model โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรมด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ผลการวิเคราะห์พบว่า โคลนที่แยกได้จากลำไส้ส่วน Jejunum หมายเลข JJ17, JJ39, JJ3 และ JJ6 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Lactobacillus aviaries* หมายเลขยีน AB175732.1 และ AB175729.1 ที่ความเชื่อมั่น 98 % ขณะที่โคลนหมายเลข JJ93 ซึ่งเป็น Uncultured bacterium มีความสัมพันธ์ของรหัสพันธุกรรมกับโคลน IM14 และ CC30 ที่แยกได้จาก Ileum และ Ceacum ตามลำดับ โคลนที่แยกได้จากลำไส้ส่วน Large intestine หมายเลข LI65 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับแบคทีเรีย Uncultured bacterium หมายเลขยีน GQ898117.1, EF403242.1 และ EF071148.1 ขณะที่โคลน CC43 ที่แยกได้จาก Ceacum มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับแบคทีเรีย Uncultured bacterium หมายเลขยีน GQ175432.1 แสดงตามภาพที่ 15

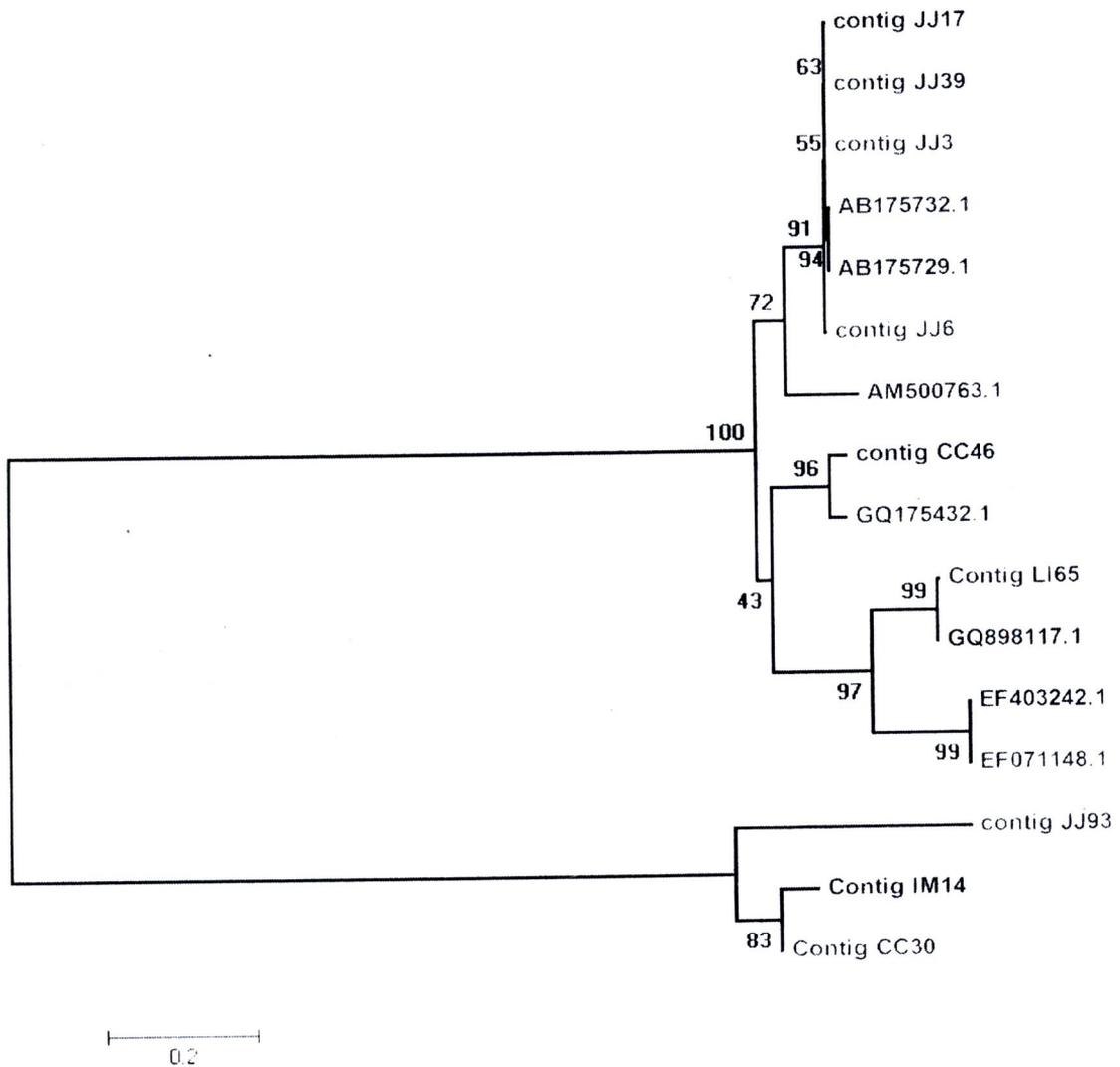


ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ ลำไส้ไก่ 5 ส่วน

Section	Clones	Closest specie	Description	Identity
Duodinum				
	1	AB175732.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> , strain:LAV7	99%
	2	EF071148.1	Uncultured <i>Bacteroides</i> bacterium clone M0015_030	96%
	3	GQ175432.1	Uncultured bacterium clone cc_99	95%
Jejunum				
	20	GQ175432.1	Uncultured bacterium clone cc_99	95%
	52	AB175732.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> , strain: LAV7	99%
	12	AB175729.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> , strain:LAV4	98%
	2	AB175729.1	Uncultured bacterium clone E1	99%
	1	EF071148.1	Uncultured <i>Bacteroides</i> bacterium clone M0015_030	96%
	1	EF403242.1	Uncultured bacterium clone SJTU_A1_5_23	99%
	1	GQ898117.1	Uncultured bacterium clone S1-25	99%
Ileum				
	16	EF071148.1	Uncultured <i>Bacteroides</i> bacterium clone M0015_030	96%
	1	AB175732.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> , strain: LAV7	99%
	2	AM500763.1	Uncultured bacterium clone E1	99%

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Section	Clones	Closest specie	Description	Identity
Large intestine				
	20	GQ898117.1	Uncultured bacterium clone S1-25	99%
Caecum				
	2	AB175732.1	<i>Lactobacillus aviarius</i> , strain:LAV7	99%
	3	EF071148.1	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015_030	96%
	46	EF403242.1	Uncultured bacterium clone SJTU_A1_5_23	99%
	15	GQ175432.1	Uncultured bacterium clone cc_99	95%
	22	GQ898117.1	Uncultured bacterium clone S1-25	99%



ภาพที่ 15 แสดงแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน สเกล 0.2 แทน Evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (Node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิ ด้วย Bootstrap test โดย AB175732.1 คือ *Lactobacillus aviarius* gene for 16S rRNA, strain: LAV7, AB175729.1 คือ *Lactobacillus aviarius* gene for 16S rRNA, strain: LAV4, GQ175432.1 คือ Uncultured bacterium clone cc_99 16S ribosomal RNA (rrs) gene, EF403242.1 คือ Uncultured bacterium clone SJTU_A1_5_23 16S ribosomal RNA gene, EF071148.1 คือ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015_030 16S ribosomal RNA gene, AM500763.1 คือ Uncultured bacterium 16S rRNA gene, clone E1 และ GQ898117.1 คือ Uncultured bacterium clone S1-25 16S ribosomal RNA gene