รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

Study on Bacteria Diversity in Chicken Intestinal Tract by Molecular Approach

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

รศ.วิชัย ศุภลักษณ์
รศ.เศรษฐสิทธิ์ แสงโสภณจิตร
ผศ.ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้โครงการวิจัยประจำปี งบประมาณ 2552

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(i)
บทนำ	1
หลักการและเหตุผลของ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ระยะเวลาดำเนินโครงการ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)	4
ระเบียบวิธีการวิจัย	13
ผลการวิจัย	16
สรุป	36
เอกสารอ้างอิง	37

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

Study on Bacteria Diversity in Chicken Intestinal Tract by Molecular Approach

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลาย ของประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ไก่ เพื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของ ยีน 16S rDNA และเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่ ทั้งหมด 5 ส่วนคือ ส่วนต้น (duodenum) ส่วนกลาง (jejunum) ส่วนปลาย (ilium) ลำไส้ใหญ่ (large intestine) และไส้ติ่งหรือไส้ตัน (caecum) ด้วยการวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งจากโคลนทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์ 212 โคลน และเปรียบเทียบความแตกต่างจากรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Rsa*I พบว่าจากโคลนทั้งหมด 212โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 8 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 8 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบ เทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน มีทั้งหมด 8 กลุ่ม ดังนี้ Uncultured bacterium clone SJTU (EF403242.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 % Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 % *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Lactobacillus aviarius* strain: LAV4 (AB175729.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 98 % Uncultured bacterium clone E1 (AM500763.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % Uncultured bacterium clone S1-25 (GQ898117.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % และ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015 (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 98 %

Study on Bacteria Diversity in Chicken Intestinal Tract by Molecular Approach

Abstract

The study on bacterial diversity in the chicken intestinal tract was identified and compared the community structure in different regions of the intestinal tracts of chickens. The 16S rDNA sequences were analyzed from the five parts of the duodenum, jejunum, ileum, large intestine and caecum. The DNA fragments (RFLP) from 212 clones were analyzed by using species specific PCR, enzyme *HaeIII* and *RsaI*. There were identified as eight different bands which were compared to the GenBank Data Base. The results indicate that there are eight groups of bacterial community from the five parts of chickens' intestines. They are Uncultured bacterium clone SJTU(EF403242.1), Uncultured bacterium clone cc_99(GQ175432.1), Uncultured bacterium clone cc_99(GQ175432.1), *Lactobacillus avarius* strain:LAV7(AB175732.1), *Lactobacillus avarius* strain:LAV4(AB175729.1), Uncultured bacterium clone E1(AM500763.1), Uncultured bacterium clone S1-25(GQ898117.1) and Uncultured bacteriodes bacterium clone M0015(EF071148.1) which are 99%, 95%, 95%, 95%, 99%, 98%, 99% and 99% identical to the GenBank Data Base, respectively.

บทนำ

หลักการและเหตุผลของโครงการวิจัย

ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (Gastrointestinal system) ประกอบด้วย ท่อทางเดินอาหาร ตับ ตับอ่อน gut-associated lymphoid tissue และจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Resident microflora) เนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านี้มีผลต่อ ประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์ปีก (Dibnex and Richards, 2004) ถึงแม้ว่า จุลินทรีย์จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันลำไส้ของสัตว์ปีกก็ตาม แต่ว่าความรู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ประชากรจุลินทรีย์จะมีขนาดที่แตกต่างกัน และมีความสลับซับซ้อนตลอดท่อทางเดินอาหาร ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ตลอดจนการสันดาปอาหารจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของสัตว์ปีก อายุ สภาพการเลี้ยง และอาหาร จุลินทรีย์สามารถสร้างสารที่หลากหลาย ทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อร่างกายของสัตว์ นอกจากนั้นปฏิกิริยาระหว่างจุลินทรีย์และเยื่อบุทางเดินอาหารของสัตว์ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของระบบทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ที่เป็นโทษสามารถส่งผลกระทบต่อ ระบบการย่อยอาหาร การเจริญเติบโต การให้ผลผลิต และสุขภาพของสัตว์ปีก ส่วนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ (Beneficial microbes) สามารถป้องกันการเกิดโรคในสัตว์ด้วยกระบวนการ competitive exclusion (Gabriel *et al*., 2006) นอกจากนั้นเอ็นไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ สามารถเสริมลงในอาหาร และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้และการดูดซึมโภชนะของสัตว์ด้วย ß – glucanase จาก *Aspergillus niger* และ GPB – glucanase จาก *Trichoderma longibrachiatum* (Mottaghitalab and Ebrahimiyan, 2007)

การจำแนกชนิดและความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่ จึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ และจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการศึกษา เพื่อการเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม รวมทั้งการค้นพบเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ โดยเดิมทีการตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป จะอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เทคนิคดังกล่าวมี

ข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์บางกลุ่ม ยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ ทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวไม่เคยมีการตรวจพบ และไม่มีการศึกษามาก่อน นอกจากนี้ระยะเวลาในการเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานานในการตรวจสอบ

ในช่วง 10-20 ปี ที่ผ่านมาการวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการตรวจสอบความหลากหลายของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความจำเพาะสูง ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วกว่าวิธีการดั้งเดิม รวมทั้งยังสามารถจำแนก ชนิดของจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม ที่ยากต่อการเพาะเลี้ยงได้ โดยการใช้ยีน16S rDNA เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต เนื่องจากยีน16S rDNA เป็นชีวโมเลกุลที่ไม่ค่อยเกิดการกลายพันธุ์ภายในสิ่งมีชีวิตสปีชีย์เดียวกัน จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (Madigan and Martinco, 2006)

การศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ไก่โดยวิธีทางชีวโมเลกุลนั้นยังมีข้อมูลที่ค่อนข้างจำกัด งานวิจัยครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อจำแนกชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในระบบลำไส้ของไก่โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์ฐานข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ (Bioinformatics) เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและคัดแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์ออกมาใช้ในงานปศุสัตว์และงานด้านอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของ ยีน 16S rDNA
2) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ ของกลุ่มประชากรแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1) การเตรียมและสกัดจีโนมของแบคทีเรียจากลำไส้ของไก่
2) การเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์
3) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNAและจัดกลุ่มความหลากหลายของยีน

4) การวิเคราะห์ความเหมือนของยีนจากฐานข้อมูลชีวภาพด้วยคอมพิวเตอร์

5) การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการของแบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่

6) การขึ้นทะเบียนยีนใหม่

ระยะเวลาดำเนินโครงการ

12 เดือน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับของโครงการวิจัย

ทำให้ทราบถึงชนิด และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ แบคทีเรียในระบบลำไส้ของไก่ ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความแตกต่างของประชากรแบคทีเรียในลำไส้ของไก่ ที่เลี้ยงในระบบการเลี้ยงและการให้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน เพื่อนำไปใช้ในการจัดการระบบการเลี้ยงไก่ในกรณีที่ต้องการกลุ่มแบคทีเรียบางชนิดที่มีประโยชน์เฉพาะด้านได้ เช่น แลคติกแบคทีเรียเป็นต้น นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังอาจเกิดการค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ และนำไปขึ้นทะเบียนในระบบฐานข้อมูล

สถานที่ทำการวิจัย

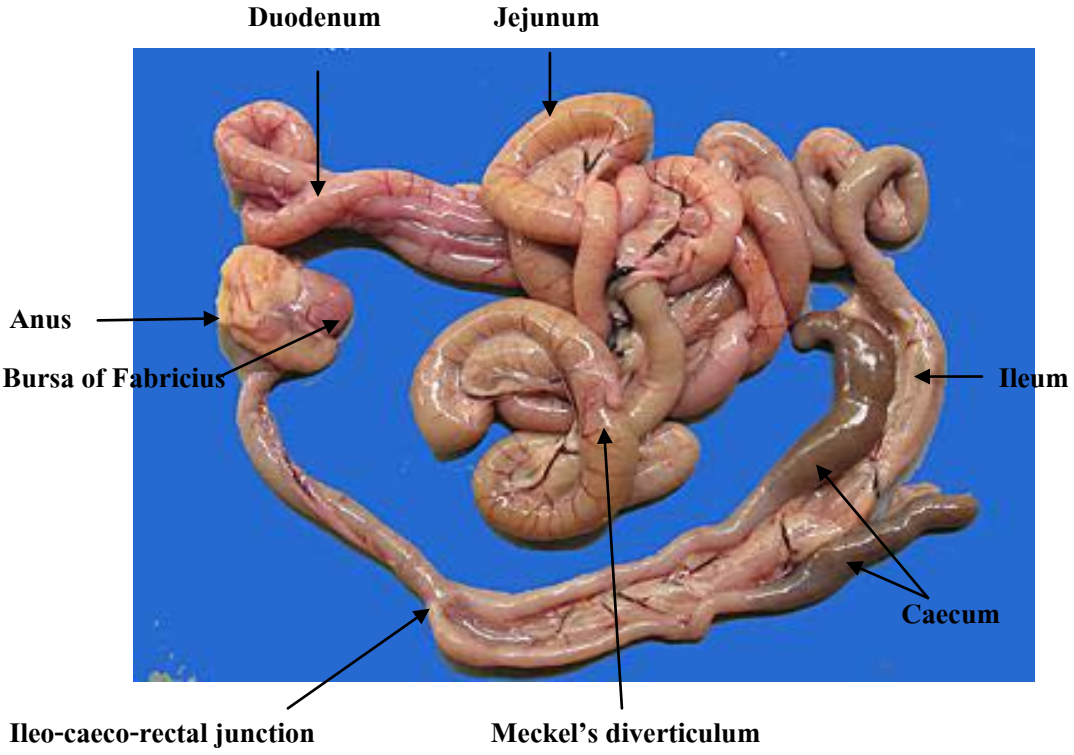
1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

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 และย่อยเยื่อใยในอาหารโดยแบคทีเรีย



ภาพที่ 1 แสดงระบบลำไส้ไก่ (ประภากร, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

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

เพราะว่าโครงสร้างนี้มีหน้าที่แน่นอนและมีความสำคัญต่อเซลล์และ 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 ดีเอ็นเอและ

โปรตีนมาช่วยในการวิเคราะห์วิวัฒนาการของแบคทีเรียได้ดียิ่งขึ้น 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 ที่ส่งผลกระทบต่อส่วนประกอบของ

แบคทีเรียในลำไส้สัตว์ปีก 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 ทางปฏิบัติการวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีที่เกิดขึ้นทำโดยคิดความแตกต่างของอาร์เอฟแอลพีระหว่างตัวอย่างที่นำมา

ตรวจสอบทีละคู่และนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจวิเคราะห์ด้วย คอมพิวเตอร์เพื่อแสดงแผนภาพความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น (สุรินทร์, 2545)

เทคนิคอาร์เอฟแอลพีสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบประชากรของจุลินทรีย์เพื่อนำไปประเมินดูความหลากหลายของจุลินทรีย์ในการสุ่มเลือกโคลนที่เป็นตัวแทนของประชากรไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรม ที่ผ่านมาเทคนิคนี้ได้มีการนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ตัวอย่างต่างๆ (Augustin *et al.*, 1994)

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

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอมีความสำคัญและเป็นประโยชน์มาก เช่น ทำให้ทราบว่ายีนนั้นคือยีนใด หรือเพื่อที่จะเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายนั้นในสิ่งมีชีวิตเดียวกันและต่างชนิดกัน ซึ่งเทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธี

1. Maxam-Gilbert sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Alian Maxam และ Walter Gilbert โดยใช้สารเคมีตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ กัน

2. Didoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Fred Sanger โดยวิธีการใช้เอนไซม์มาต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นได้รับการพัฒนามาโดยตลอด ปัจจุบันสามารถทำได้ง่ายและไม่ยุ่งยากซับซ้อนคือ ใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า Automate machine ซึ่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้นโดยดัดแปลงมาจากวิธีการ Dideoxy sequencing หรือเรียกอีกอย่างว่า Dideoxy chain terminating method คือใช้เอนไซม์ DNA polymerase1 เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอ ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ โดยเริ่มจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อน (denature) และใช้ Sequencing primer ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบให้ด้าน 3’ อยู่ใกล้กับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้น Sequencing primer จะจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์กันอย่างเหมาะสม และเอนไซม์ DNA polymerase 1 จะทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จาก Deoxyribonucleotide 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ที่เติมลงไปในหลอดทดลองในปริมาณที่เพียงพอ โดยจะทำการสังเคราะห์ทางปลาย 3’ ต่อจาก Sequencing primer นอกจากนี้จะมีการเติมสาร Deoxyribonucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) เพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์ จบการสังเคราะห์ (chain terminator) ซึ่ง Didexyribonucleotide ทั้ง 4 ชนิดจะถูกติดฉลากด้วย สีฟลูออเรสเซนต์ต่างๆกัน เนื่องจากปกติเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย 3’-OH ในการ

สังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ แต่ Didexyribonucleotide มีปลาย 3'-H แทน 3'-OH ดังนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นหาก 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 สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

ระเบียบวิธีวิจัย

1) การเก็บตัวอย่างลำไส้ไก่

ทำการสุ่มฆ่าไก่เนื้อลูกผสมทางการค้า อายุ 35 วัน จำนวน 10 ตัว พร้อมเก็บตัวอย่างของเหลว ในระบบทางเดินอาหารของไก่ จากจุดกึ่งกลางของ duodenum จุดกึ่งกลางของทางเปิดท่อน้ำดี และ Meckel's diverticulum ในส่วนของ jejunum จุดกึ่งกลางระหว่าง Meckel's diverticulum และ ileocecal junction ในส่วนของ ileum และจุดกึ่งกลางของ caecum และ large intestine นำของเหลวที่ได้ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ – 80^{0} C.

2) การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการบดลำไส้และกากอาหารในสารละลายน้ำเกลือด้วยเครื่องปั่น บดกรองเอาแต่ส่วนน้ำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยนำของเหลวที่ได้ 300 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย extraction buffer และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำตัวอย่างมาบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ จากนั้นย่อยด้วย lysozyme และ SDS ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ต่อมาเติม proteinase K เพื่อย่อยโปรตีนและนำไปบ่มที่ 37°C นาน 2 ชม. เก็บเฉพาะส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอด้วยส่วนผสมของ phenol-chloroform ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณและคุณภาพ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Kanokratana *et al*., 2004 ดังนี้

BSF8/20 = 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

REVB = 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่สกัดจากลำไส้ไก่ 0.5 ng, 1X Buffer [75mM Tris-HCl, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Tween 20) with $(NH_4)_2SO_4$] , 400 µM dNTP mix, 2 mM $MgCl_2$, ไพรเมอร์อย่างละ 0.4 µM, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase 0.05 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (thermocycler) โดยกำหนดเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ และกำหนดปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จำนวน 35 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 1 วินาที 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาที 45 วินาที ตามลำดับ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสด้วย 1% อะกาโรสเจล แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit

4) การโคลนยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ทำการชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 16S rDNA ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ทางการค้าที่ใช้สำหรับการโคลนยีนด้วย T4 DNA Ligase บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชม. ถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*1989) โดยนำเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ปริมาตร 100 µl มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ผสมชิ้นส่วน ดีเอ็นเอและพลาสสมิดเวคเตอร์ ที่ทำการตัดปลายไว้เรียบร้อยแล้ว ในสัดส่วน 1:3 ในปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani) ปริมาตร 1 ml นำไปบ่ม และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 37°C นาน 1 ชม. นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปบน LB plate ที่มียาปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกเซลล์ของแบคทีเรียที่บรรจุดีเอ็นเอลูกผสมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ถูกแทรกสอดด้วยยีน 16S rDNA ด้วยวิธี blue/white screening

5) การตรวจสอบโคโลนีที่บรรจุยีน 16S rDNA

นำโคโลนีของแบคทีเรียมาตรวจสอบ ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยตรง โดยเริ่มจากการทำถอดแบบ (replica) โคโลนีที่ได้เก็บไว้เป็นระบบเพลท (master plates) และให้หมายเลขประจำโคโลนี เขี่ยโคโลนีเหล่านี้เป็นต้นแบบผสมรวมกับส่วนผสมพีซีอาร์ ประกอบด้วยสารละลาย 1X Taq Buffer, dNTP 200 µM, $MgCl_2$ 2 mM ,ไพรเมอร์ในส่วนของพลาสมิด คือ M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') และ M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') อย่างละ 0.2 µM, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase 5 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (themalcycler) กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94 °C นาน 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 C นาน 30 วินาที 50°C นาน 40 วินาที และ 72°C นาน 2 นาที ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C นาน 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

6) การตรวจสอบความหลากหลายของโคลนที่บรรจุยีน 16S rDNA

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยตรงจากโคโลนี 3 µl มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และ *Hha*I อย่างละ 20 ยูนิต ตามลำดับ และปรับปริมาตรให้ได้ 20 µl ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จัดเป็นกลุ่มตามขนาดและจำนวนชิ้นที่เหมือนกัน ทำการเลือกโคลนของแต่ละกลุ่มที่เป็นตัวแทนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

7) การวิเคราะห์ลำดับเบสและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

วิเคราะห์นำลำดับเบสของโคลนที่เลือกได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rDNA กับฐานข้อมูลสากล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้จัดจำแนกโคลนออกเป็นกลุ่มต่างๆและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987)

8) **การขึ้นทะเบียนยีน**

ทำการขอขึ้นทะเบียนลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดใหม่ (GenBank ID) กับฐานข้อมูลสากลใน GenBank

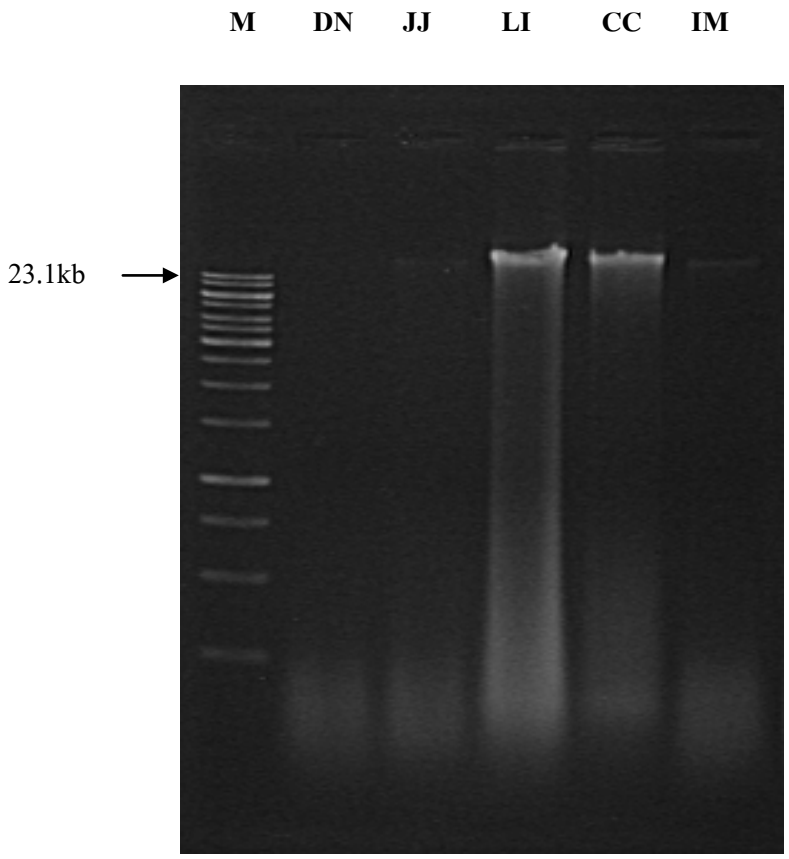
ผลการวิจัย

ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในลำไส้ไก่ โดยวิธีทางชีวโมเลกุล เริ่มต้นโดยทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย จากของเหลวในลำไส้ไก่หลังฆ่าและวิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T แล้วทรานส์ฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ Competent cell *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนท์ที่ได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างรูปแบบแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4 เพื่อจำแนกชนิดและจักกลุ่มของประชากรแบคทีเรีย รวมทั้งหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมในลำไส้ไก่

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน

เมื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างตามวิธีการของ (An *et al.*, 2005) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 0.8 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าปฏิกิริยาแถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda *Hind*III ที่มีขนาด 23.1 kb แสดงตามภาพที่ 2 จากผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอใน Lane ที่ 1 ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงอัตราไวโอเลต พบว่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณความเข้มข้น 2.77 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แต่เมื่อพิจารณาประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดฮิวมิคที่ปนเปื้อนอยู่หลังการสกัดแยกที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (A_{230}) สำหรับกรดฮิวมิคและ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับโปรตีนซึ่งคุณภาพของจิโนมิกดีเอ็นเอพิจารณาจาก 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 ค่าแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนและกรดฮิวมิคที่อาจจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

(Harry *et al*., 1999; Miller *et al.,* 1999) ดังนั้นจึงต้องกำจัดสิ่งปนเปื้อนก่อนด้วยชุดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 0.8 %

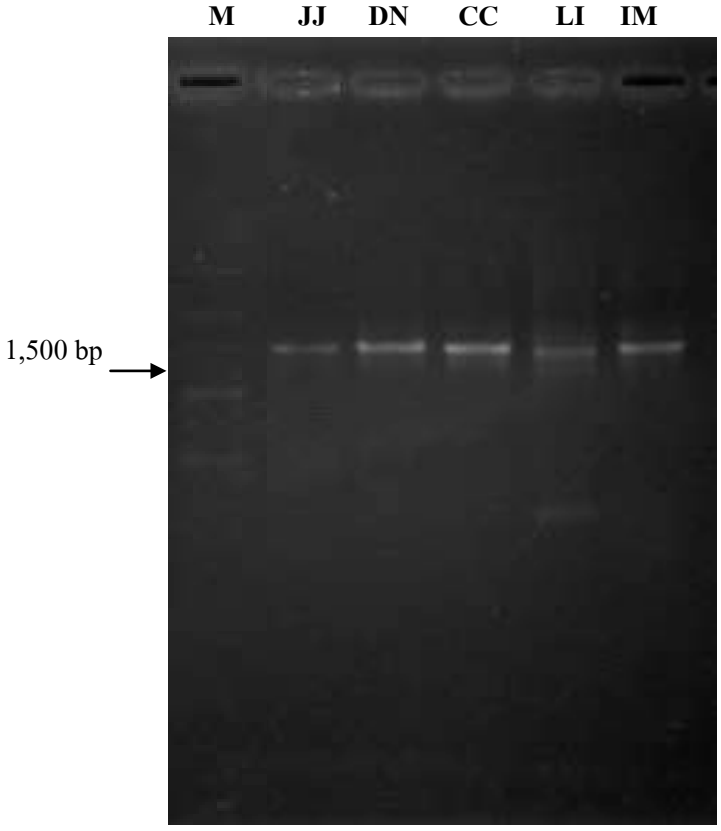


ภาพที่ 2 แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยกจากของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม Lambda *Hind* (III) Lane DN (duodenum) Lane JJ (jejunum) Lane LI (large intestine) Lane CC (caecum) และ Lane IM (ilium) คือ จีโนมิกดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสกัดของเหลวจากลำไส้ไก่ทั้ง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

การสร้างห้องสมุด 16S rRNA gene library

1. ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 3 ปฏิกิริยา (25 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอจากของเหลวในลำไส้ไก่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB (Kanokratana *et al*., 2004) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp แสดงตามภาพที่ 3

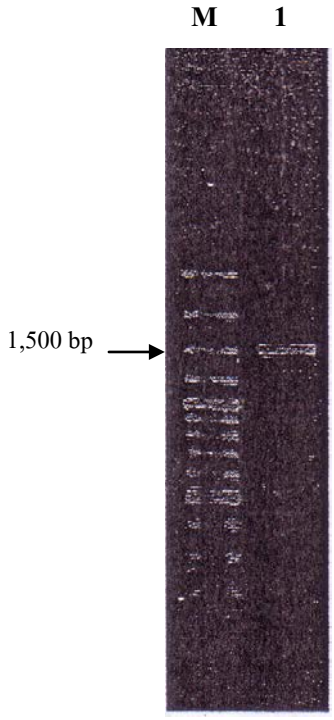


ภาพที่ 3 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane DN (duodenum) Lane JJ

(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 เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะออกจากแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ตรวจสอบขนาดและปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 1 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ แสดงตามภาพที่ 4

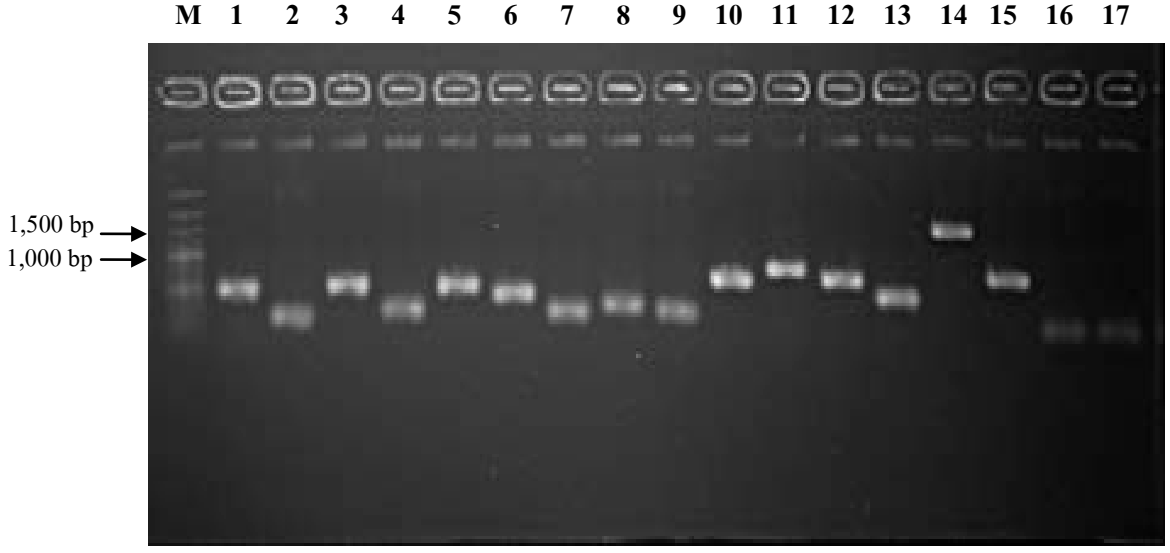


ภาพที่ 4 แสดงผลการทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์และตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำให้ บริสุทธิ์

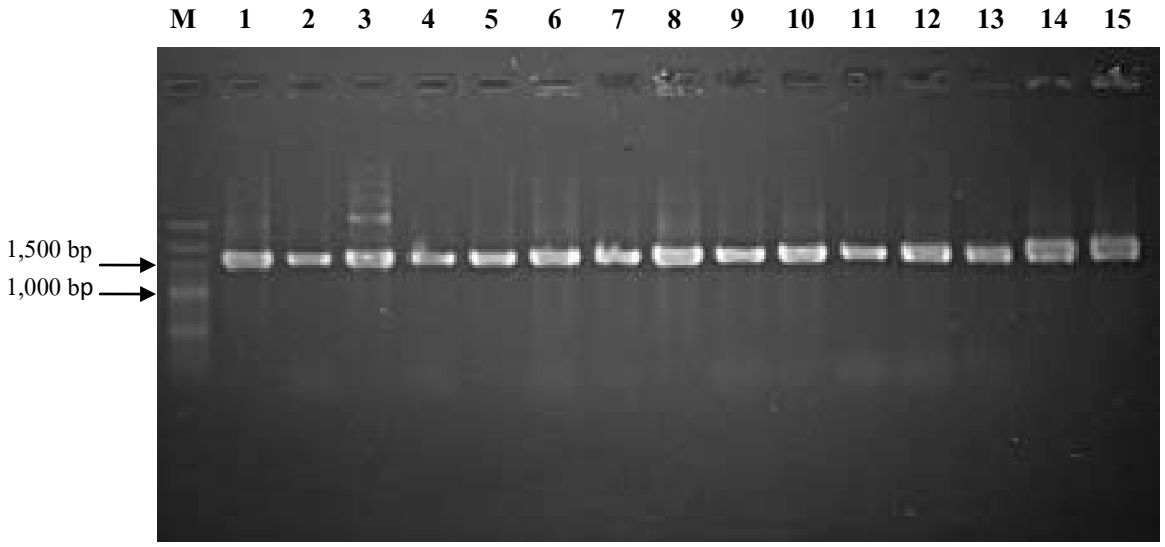
ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม

1. ผลการวิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิคโคโลนีซีอาร์

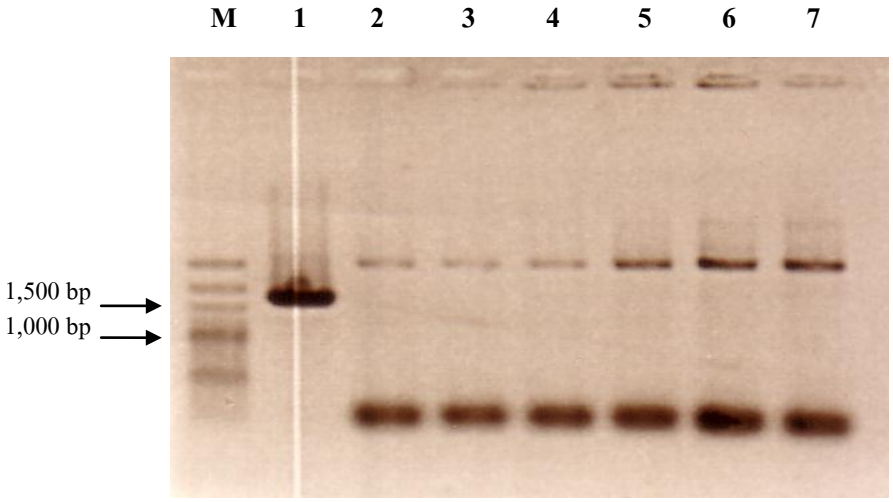
จากการวิเคราะห์โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรงจากโคโลนี โดยเขี่ย (pick up) โคโลนีเหล่านี้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ M13F และ M13R เป็นคู่ไพรเมอร์ จาก นั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรรีซีส 0.8 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder พบว่าโคโลนีที่มีชิ้น 16S rRNA gene จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp จึงทำการคัดเลือกโคลนที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,500 bp เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป แสดงตามภาพที่ 5 - 9 โดยลำไส้ส่วน DN (duodenum) ได้โคโลนีพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 85 โคโลนี ส่วน JJ (jejunum) ได้โคโลนีพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 111 โคโลนี ส่วน IM (ilium) ได้โคโลนีพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 120 โคโลนี ส่วน LI (large intestine) ได้โคโลนีพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 107 โคโลนี และส่วน CC (caecum) ได้โคโลนีพีซีอาร์ตามที่ต้องการ 191 โคโลนี



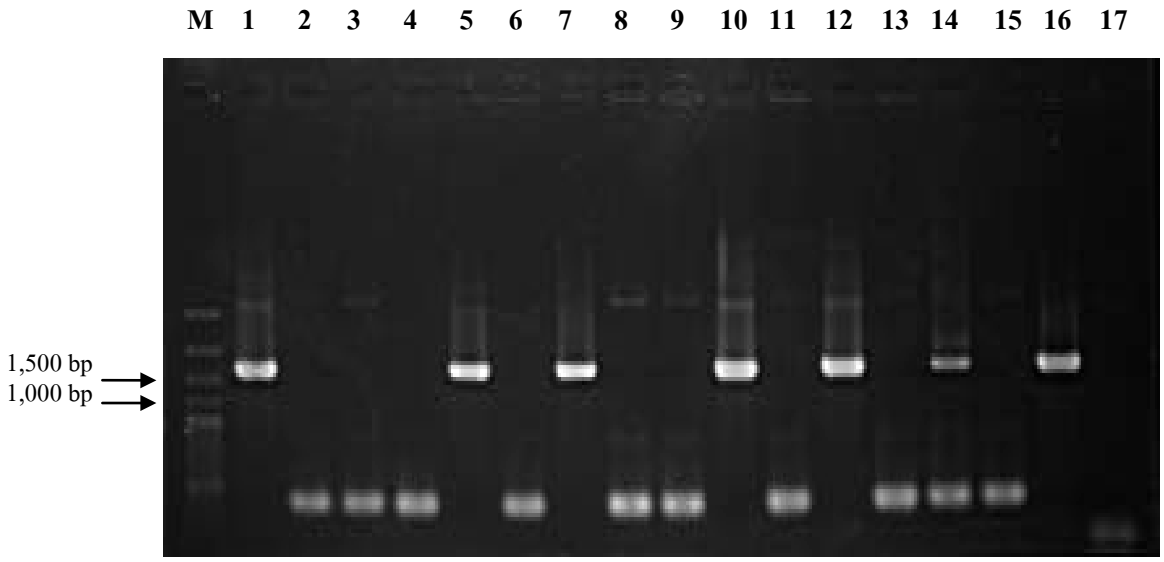
ภาพที่ 5 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน DN (duodenum) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มี ชิ้น 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1 – 7 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene



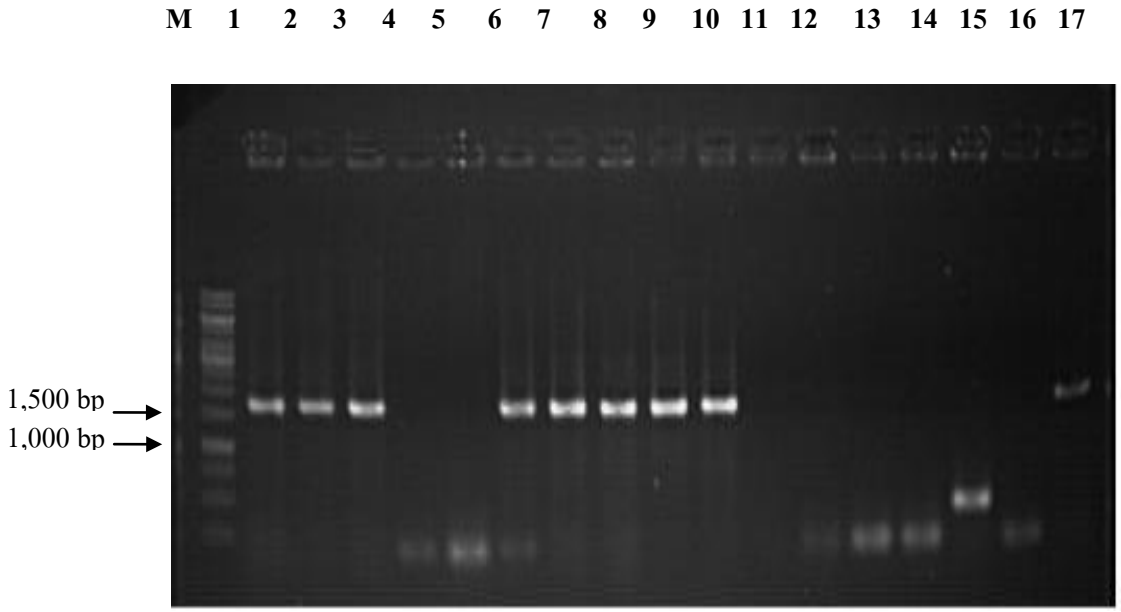
ภาพที่ 6 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน JJ (jejunum) ที่ได้จากการตรวจสอบโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 % Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) Lane ที่ 1-15 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการโคลนที่มีชิ้น 16S rRNA gene



ภาพที่ 7 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน IM (ilium) 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 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



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 *Rsa*I และ *Hae*III ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสเข้มข้น 3 % โดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำเจลมาตรวจสอบภายใต้แสงมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder จากนั้นบันทึกภาพเจลแต่ละเจลไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์และจัดเป็นกลุ่มตามขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เหมือนกันจัดเป็น Phyiotype เดียวกันซึ่งจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 614 โคลน ได้ทั้งหมด 212 โคลน

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

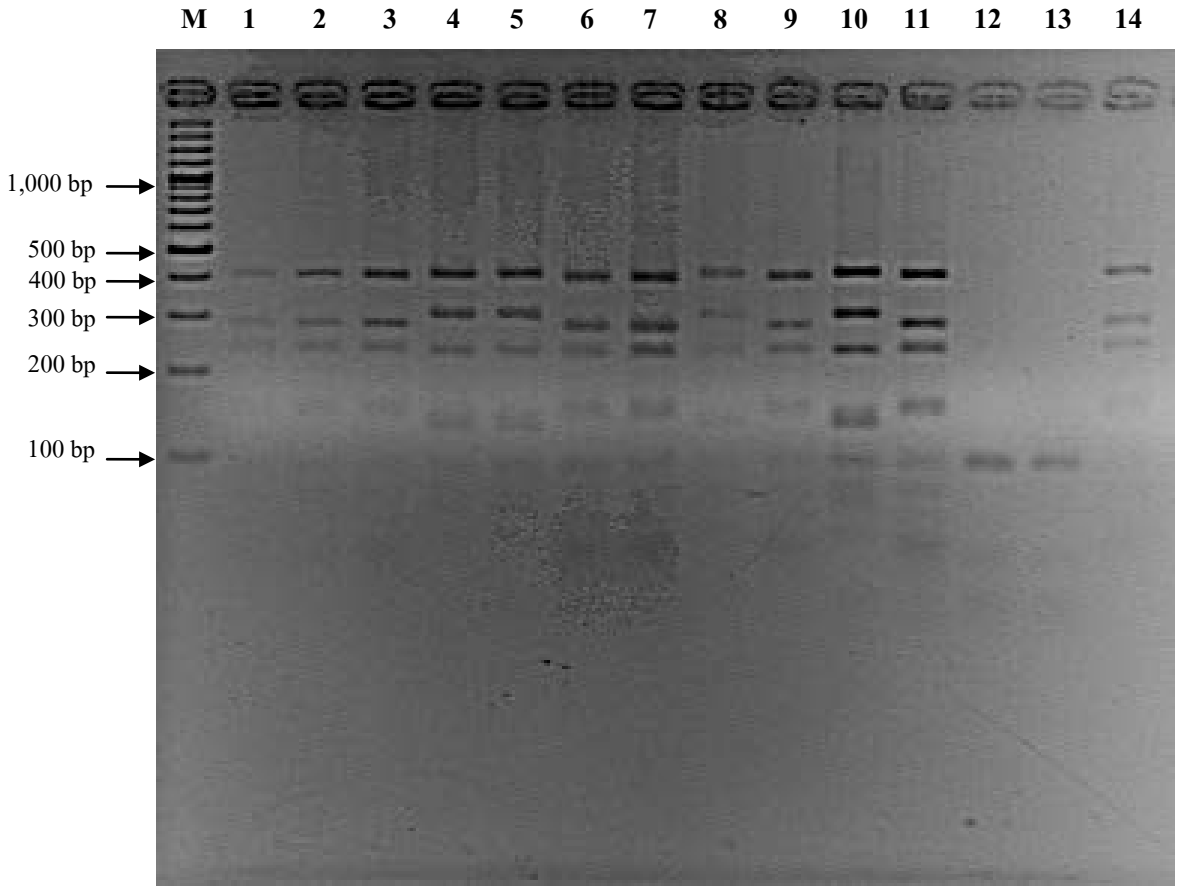
เทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่ส่วน Duodenum มีดังนี้ Lactobacillus aviarius strain: LAV7 (AB1757 32.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % Uncultured Bacteroidetes bacterium (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 96 % และ Uncultured bacterium clone cc_99 (DQ071521.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 %

ลำไส้ไก่ส่วน Jejunum จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 111โคลนได้ทั้งหมด 80 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 8 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 8 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าประชากรของแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่ส่วน 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 %

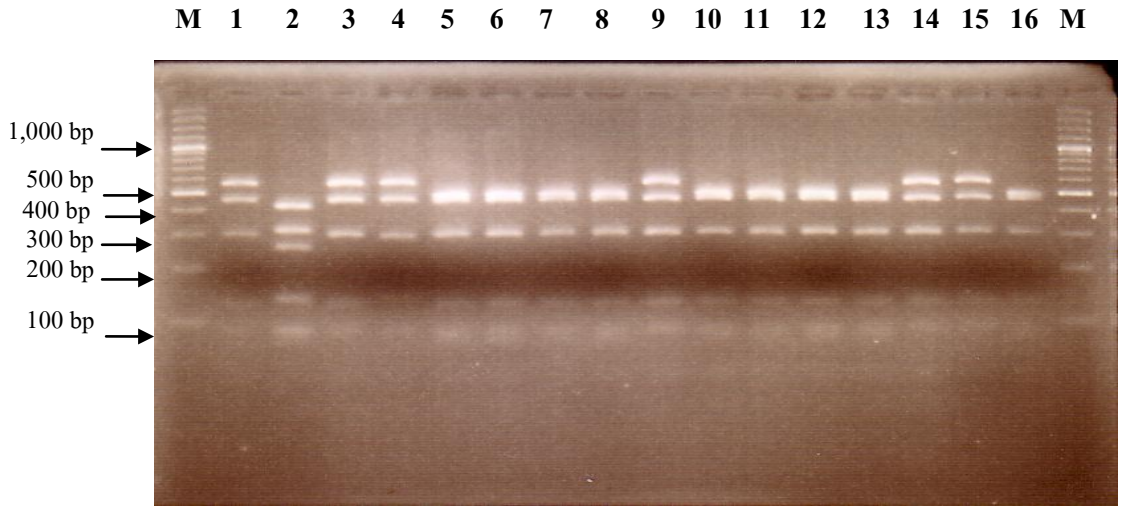
ลำไส้ไก่ส่วน Ilium จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 120 โคลนได้ทั้งหมด 19 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 3 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 3 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล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

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

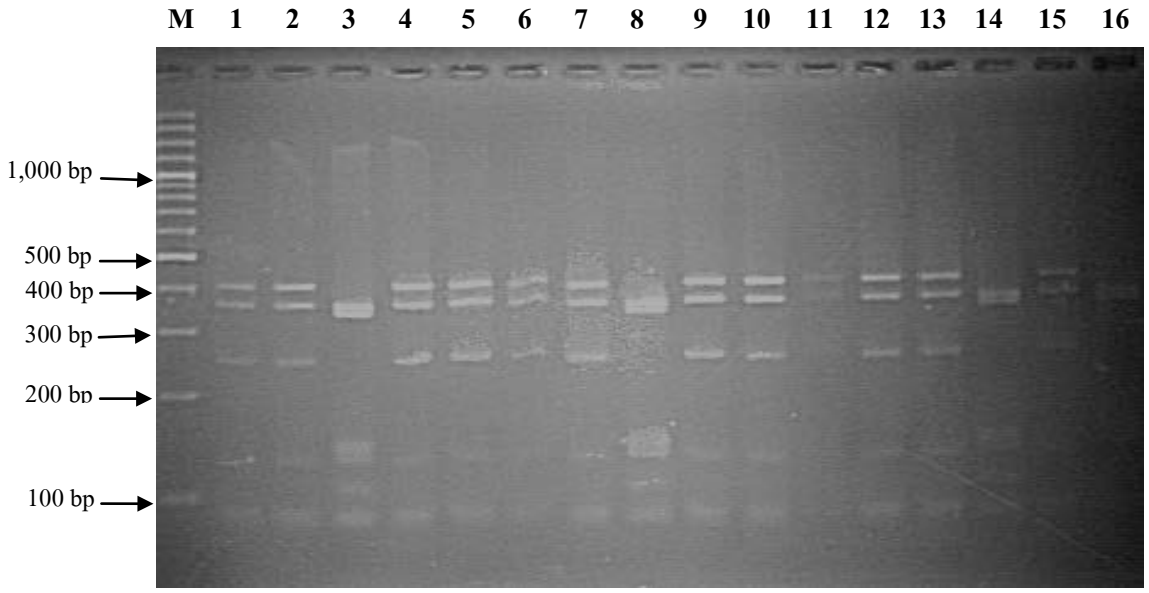
ลำไส้ไก่ส่วน Caecum จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 191 โคลนได้ทั้งหมด 89 โคลน มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันเป็น 5 แบบ จึงทำการจัดกลุ่มของโคลนที่มีรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบเดียวกันและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อเดียวกัน และทำการคัดเลือกตัวแทนของทั้ง 5 แบบ เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 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 Phyiotype ที่เป็นตัวแทนจากการวิเคราะห์มาสกัด พลาสมิดเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป แสดงตามภาพที่ 10 – 14



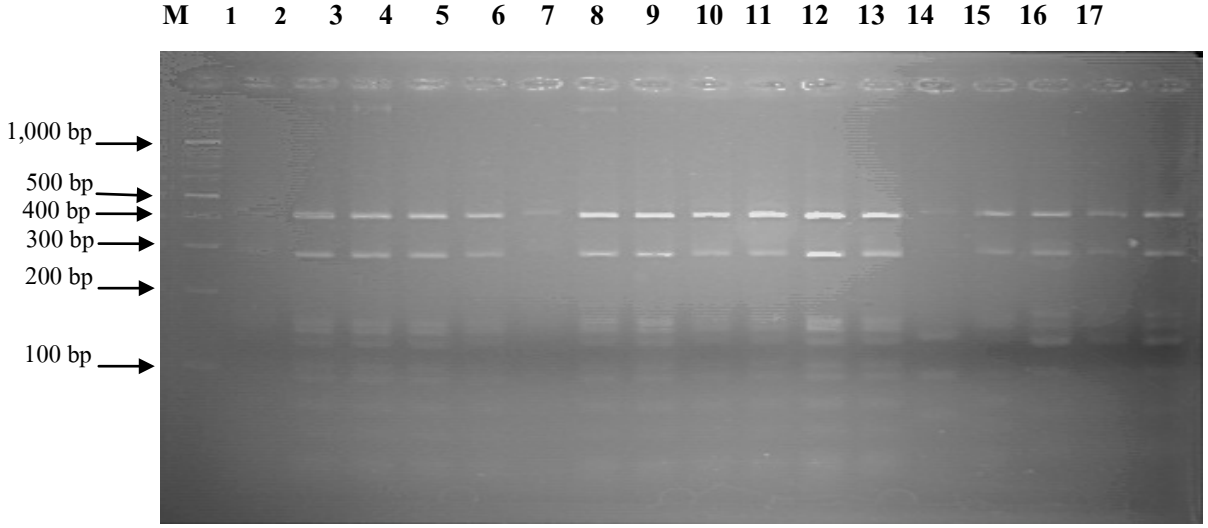
ภาพที่ 10 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน DN (duodenum) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-14 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III



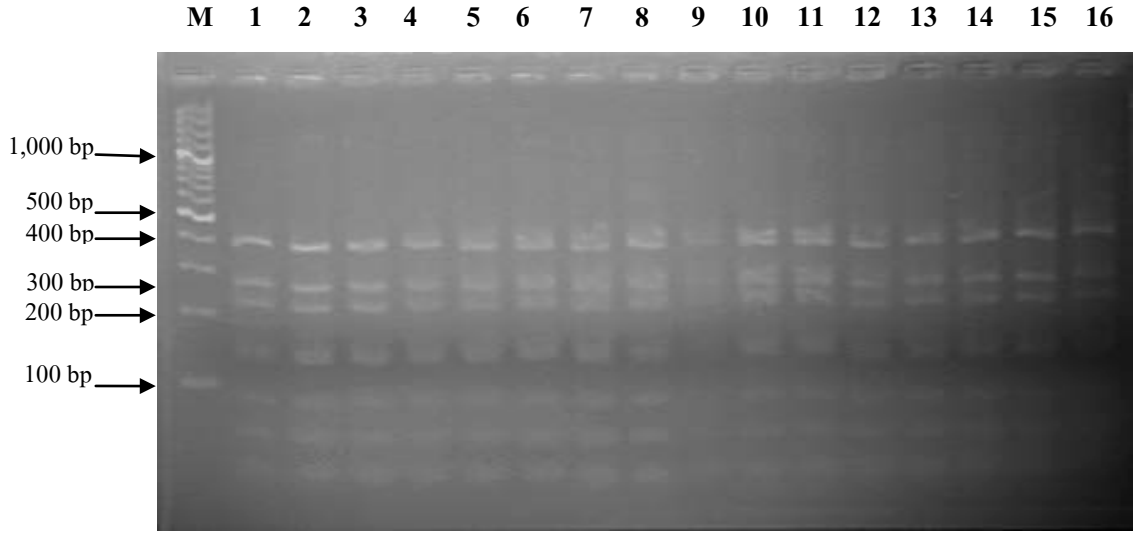
ภาพที่ 11 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน JJ (jejunum) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-16 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III



ภาพที่ 12 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน IM (ilium) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 % อะกาโรสเจล Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-16 คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III



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



ภาพที่14 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของลำไส้ไก่ส่วน CC (caecum) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saIและ *Hae*III ที่ทำการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 3 % อะกาโรสเจลLane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 นาโนกรัม 100 bp DNA Ladder) และ Lane ที่ 1-16คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *R*saI และ *Hae*III

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม 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

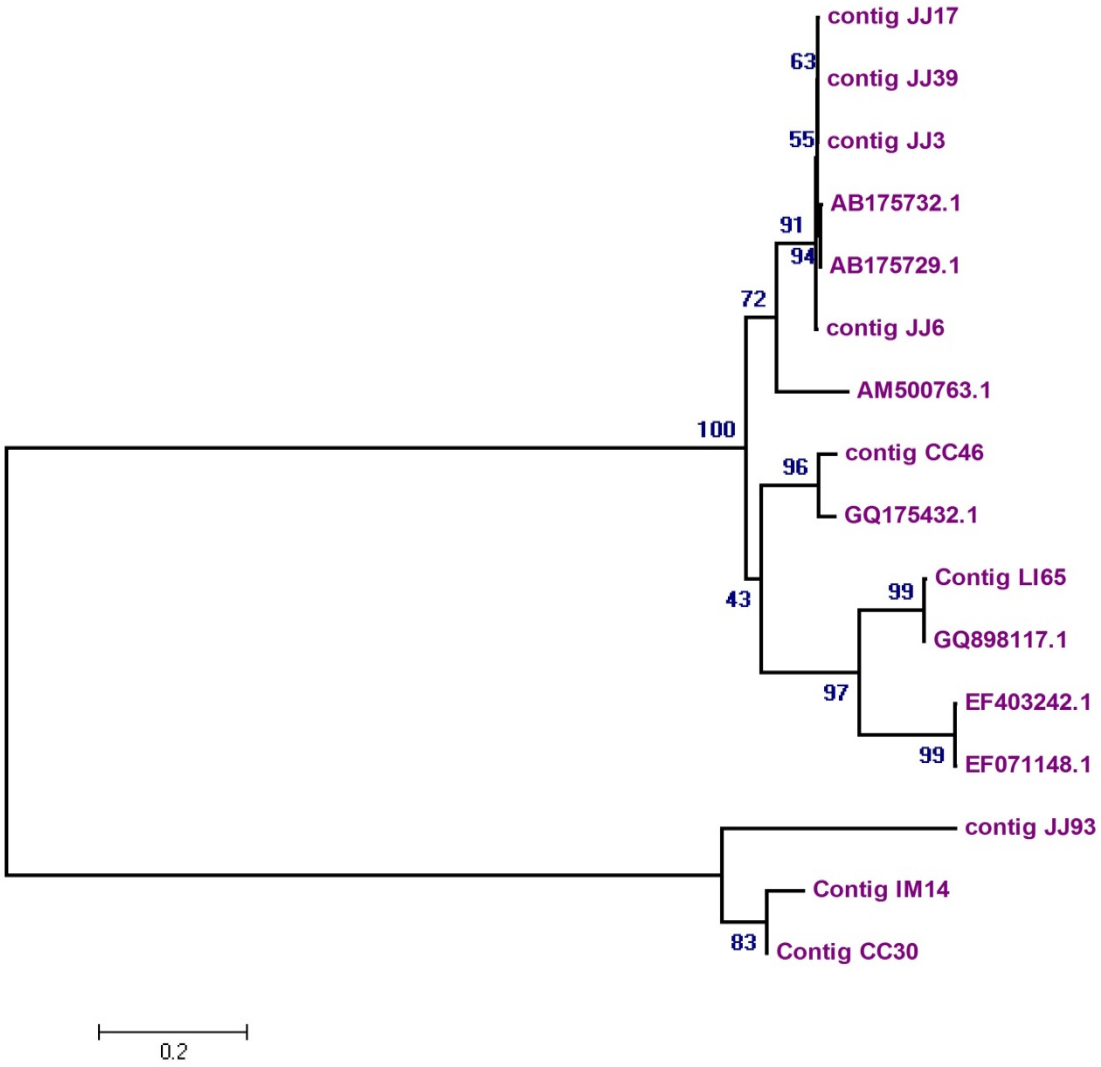
เมื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียของลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน โดยเลือกตัวแทนโคลนของแต่ละ Phylotype มาวิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และกำหนดแบบจำลองการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide substitution) ด้วย Kiruma-2-parameter model โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรมด้วย 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 Uncultural 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 แสดงผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของลำไส้ไก่ 5 ส่วน

Section	Clones	Closest specie	Description	Identity
Duodinum				
	1	AB175732.1	*Lactobacillus aviarius*, strain:LAV7	99%
	2	EF071148.1	Uncultured *Bacteroides* 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	*Lactobacillus aviarius, strain:* LAV7	99%
	12	AB175729.1	*Lactobacillus aviarius*, strain:LAV4	98%
	2	AB175729.1	Uncultured bacterium clone E1	99%
	1	EF071148.1	Uncultured *Bacteroides* 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 *Bacteroides* bacterium clone M0015_030	96%
	1	AB175732.1	*Lactobacillus aviarius*, 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	*Lactobacillus aviarius, 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) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย 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

สรุป

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียจากโมเลกุลของ 16S rDNA ในลำไส้ไก่ทั้งหมด 5 ส่วน ด้วยการวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งจากโคลนทั้งหมดที่ทำการวิเคราะห์ 212 โคลน จากทั้งหมด 614 โคลน และเปรียบเทียบความแตกต่างจากรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Rsa*I พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่พบในลำไส้ไก่ทั้ง 5 ส่วน มีทั้งหมด 8 กลุ่ม ได้แก่ Uncultured bacterium clone SJTU (EF403242.1) ซึ่งมีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 % Uncultured bacterium clone cc_99 (GQ175432.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 95 % *Lactobacillus aviarius* strain: LAV7 (AB175732.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % *Lactobacillus aviarius* strain: LAV4 (AB175729.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 98 % Uncultured bacterium clone E1 (AM500763.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % Uncultured bacterium clone S1-25 (GQ898117.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 99 % และ Uncultured Bacteroidetes bacterium clone M0015 (EF071148.1) มีความเหมือนกับฐานข้อมูล 98 % โดยลำไส้ไก่ส่วนต้น Jejunum พบความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียมากที่สุด และพบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus aviarius* มากที่สุด ขณะที่แบคทีเรียที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการหรือ Uncultured bacteria พบในทุกส่วนของลำไส้โดยพบส่วนมากที่สุดในลำไส้ส่วน Caecum

การศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ไก่ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล สามารถตรวจพบชนิดของแบคทีเรียซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อทั่วไปไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus aviarius* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ ชนิดหนึ่งมาใช้ประโยชน์ควรจะทำการแยกเชื้อจากลำไส้ไก่ส่วน Jejunum โดยตรงเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ต้องการลงได้

เอกสารอ้างอิง

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545. ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ (Systematic and phylogeny) เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา. ว. วิทยาศาสตร์. 175 น.

บุญเสริม ชีวะอิสระกุล. 2542. พื้นฐานสัตวศาสตร์. ภาควิชาสัตวบาล. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 240 น.

ประภากร ธาราฉาย. ไม่ระบุปีที่พิมพ์. ระบบทางเดินอาหารสัตว์ปีก. [Online] Available : http://www.bedo.or.th/lcdb/biodiversity/view2.aspx?id=9652 . 21/11/2010.

ปฐม เลาหเกษตร. 2540. การเลี้ยงสัตว์ปีก. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 232 น.

ศรีสกุล วรจันทรา และรณชัย สิทธิไกรพงษ์. 2539. โภชนศาสตร์สัตว์. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 102 น.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. ชีววิทยาของเซลล์. โรงพิมพ์ โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้า, กรุงเทพมหานคร. 534 น.

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ไม่ระบุปีที่พิมพ์. [Online] Available : http://www3.ipst.ac.th/index2.php. 22/11/2010.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 350 น.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. สถาบันพัฒนนาการสาธารณสุขอาเซียน, นครปฐม. 382 น.

อารีลักษณ์ เกษมสันต์. 2533. ดีเอ็นเอพาหะ. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร. 253 น.

Alberts, F., S.E. Denman, G. Wright and Z. Yu. 1983. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. J. Anim. Sci. 20(20): 283-294.

An, D., B. Chai and Z. Dong. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. Poutl. Sci. 4(1): 207-205.

Augustin, G., F. Wright and H.J. Flint. 1994. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* from the rumen . Int. J. Cysts. Bact. 44(4): 246-255.

Cole, J.R., B. Chai, R.J. Farris, K.S. Wang, A.S. Mohideen, D.M. McGarrell, A.M. Bandelal,

E. Cardenas, L. Garrity and J.M. Tiedje. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. Nucleic Acids Res. 35(1): 169-172.

Deng, W., D. Xi, H. Mao and M. Wanapat. 2007. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. Mol Biol Rep. [Online] Available: http://www. Ias.ac/MolBiolRep/jull02005/124.pdf. 15/12/2011

Freifelder, J. 1985. Identification of characteristic oligonucleotides in bacterial 16S ribosomal RNA sequence dataset. Bioinformatics. 18(2): 244-250.

Harry, M., B. Gambier, Y. Bourezgui and E. Garnier-Sillam. 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances. J. Basic Analysis. 27(2): 439-442.

Higgins, D., J. Thompson and T. Gibson. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22(3): 4673-4680.

Kamara, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. Curr. Sci. 89 (1): 124-135.

Kanokratana, P., S. Chanapan, K. Pootanakit and L. Eurwililaichitr. 2004. Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand. J. Basic Microbial. 44(3): 430-444.

Karp, G. 2000. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments. 2nd ed., Cornell University press, New York, USA. 476 p.

Madigan, M.T. and J.W. Martinco. 2006. Brock Biology of Microorganism. 11nd ed., Association of Office Analytical Chemist, New Jersey, USA. 368 p.

McSweeney, C.S., S.E. Denman, G. Wright and Z. Yu. 2007. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. J. Anim. Sci. 20(20): 283-294.

Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Apply Environ Microbial. 65(5): 4715-4724.

Mulhardt, C. 2007. Molecular Biology and Genomics. 4th ed., Oxford Elsevies Inc, London, England. 476 p.

Ray, C.S., S. Kundu and A. R. Thakur. 2006. Microbial DNA extraction from samples of varied origin. Curr. Sci. 91(12): 1697-1700.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and I. Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Cold Spring

Harbor. Cold Spring Habor Press, New York, USA. 346 p.

Staley, J.T., E.F. Fritsch, S. Lory and J.J. Perry. 2007. Microbial Life. 2nd ed., Sinauer Associates, New York, USA. 45 p.

Tajima, K., R.I. Aminov, T. Nagamine, K. Orgata, M. Nakamuar and Y. Benno. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16 rDNA libraries. J. Microbial. Ecol. 29(3): 159-169.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. K. George. 2007. Molecular evolutionary genetics analysis. J. Basic Microbial. 24(8): 1596-1599.

Zhengdong, Z., C.W. Richard and E.F. George. 2002. Identification of characteristic Oligonucleotides in bacterial 16S ribosomal RNA sequence dataset. Bioinformatics. 18 (3): 244-250.