สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค *(Bos taurus)*

GENETIC DIVERSITY OF BACTERIAL POPULATION IN BOVINE *(Bos taurus)* RUMEN

อภิชาติ พันชูกลาง

APICHART PUNCHUKRANG

วพ.
ว252ค
2551
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....87072.....
วัน,เดือน,ปี.....30 ส.ค. 2552.....

b.....120 21673.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2551

KMITL-2008-AG-M-101-391

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENETIC DIVERSITY OF BACTERIAL POPULATION IN BOVINE *(Bos taurus)* RUMEN

APICHART PUNCHUKRANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2008

KMITL-2008-AG-M-101-391

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค (*Bos taurus*)
นักศึกษา	นายอภิชาติ พันชูกลาง
รหัสประจำตัว	49068906
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2551
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ทักษวัน ทองอร่าม

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โดยใช้หลักการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากการศึกษาได้ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน และทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของ16S rRNA gene โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย จากนั้นเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์กับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57RT ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โคลนว่ามีชิ้นยีน 16S rRNA ถูกแทรกสอดสู่พลาสมิดเวคเตอร์ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยตรงจากโคโลนีโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพลาสมิดเวคเตอร์ ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และ *Hha*I จากจำนวนทั้งสิ้น 297 โคลนพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 177 กลุ่มรูปแบบ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 โดยวิธี Neighbor- joining (NJ) และ คำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ พบว่ามีจุลินทรีย์กระจายอยู่ใน 3 กลุ่มหลัก โดยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB 41.81%) กลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB, 28.25%) และกลุ่ม *Proteobacteria* (17.51%) ทั้งนี้จากจำนวน 177 phylotyes พบว่าแบคทีเรียที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนถึง 83 phylotypes (46.89%) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง และส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่สามารถย่อยเยื่อใยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Genetic Diversity of Bacterial Population in Bovine (*Bos taurus*) Rumen
Student	Mr. Apichart Punchukrang
Student ID.	49068906
Degree	Master of science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2008
Thesis Advisor	Dr.Kanokrat Srikijkasemwat
Thesis Co-Advisor	Dr.Taksawan Thongaram

ABSTRACT

The diversity of bacterial symbionts in Bovine rumen was investigated by analyses of 16S rDNA clone library. Total genomic DNA was isolated, and 16S rRNA gengs were PCR amplified using PCR universal primers conserved for bacteria. The PCR products were cloned into pTZ57R/T vector and transformed into the competent cells *Escherichia coli* DH5α. A total clones were randomly selected and 16S rRNA gene insert was screened by PCR using plasmid vector specific primers. A total of 297 clones from rumen fluid library were grouped and sorted into 177 digestion profiles by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with *Rsa*I and *Hha*I endonuclease. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method, and evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test 1000 replicates. The sequences were mainly related to three phyla, low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB, 41.81%), *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* group (CFB, 33.9%) and *Proteobacteria* (17.51%). Of 177 such phylotypes, 83 phylotypes (46.89%). These results indicate that the bacterial population in bovine rumen presents a highly genetic diversity, and major bacterial was cellulolytic.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ทักษวัน ทองอร่าม จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกทราบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณภรรทนพ กนกรัตนา ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการใช้โปรแกรม Bioinformatics ขอขอบคุณ ดร.ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, ดร.สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ และ ดร.ปิยะนันท์ หาญพิชาญชัย สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้ ตลอดจน นักวิจัย ผู้ช่วยนักวิจัย และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากห้องปฏิบัติการวิจัยเอนไซม์ (Molecular and Enzyme Screening Laboratory) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงลงได้เป็นอย่างดี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับเงินสนับสนุนอีกส่วนจากโครงการพัฒนาบุคลากรวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาระหว่างสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอกราบพระคุณอาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโททุกท่านและ น.สพ.ชนาธิป ธรรมการ ที่ให้การช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในกระเพาะรูเมน คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อภิชาติ พันชูกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....2

1.4 ระยะเวลาในการวิจัย.....3

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของโค.....4

2.2 โครงสร้างทางกายวิภาคและระบบนิเวศน์วิทยาในกระเพาะรูเมน.....4

2.1.1 ระบบย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง.....4

2.1.2 นิเวศน์วิทยาในกระเพาะรูเมน.....6

2.1.3 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน.....7

2.3 พันธุศาสตร์ของแบคทีเรีย.....13

2.3.1 อาร์เอ็นเอไรโบโซม.....13

2.3.2 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรีย.....15

2.4 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย.....16

2.4.1 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกระเพาะรูเมนโดยอาศัยการเลี้ยงเชื้อ....16

2.4.2 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกระเพาะรูเมนโดย
ไม่การอาศัยการเลี้ยงเชื้อ.....17

2.4.3 เทคนิคทางด้าน 16S rRNA.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.4 เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....21
2.4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing).....22
2.4.6 การสร้างวงศ์วานทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic).....25
2.4.7การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม.....27
2.4.8 ลักษณะการเกิด Chimeric sequence.....28
2.5 โปรแกรมชีวสารสนเทศในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธรรกรรม.....29
2.5.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....30
2.5.2 Ribosomal Database Project (RDP-II).....31

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....32
3.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคและการสุ่มเก็บตัวอย่าง
อาหารสัตว์วิเคราะห์ผล.....32
3.1.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน.....32
3.1.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....32
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค
และการทำจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....33
3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมน.....33
3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยก.....34
3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....34
3.3.1 การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์.....34
3.3.2 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล.....36
3.4 การถ่ายทอดยีนและตรวจสอบโคลนที่ได้.....36
3.4.1 การเชื่อมต่อโมเลกุลดีเอ็นเอ.....36
3.4.2 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....37
3.4.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายในพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์
จากโคโลนี (Colony PCR).....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยวิธี Restriction fragment length polymorphism.....39
3.5.1 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้.....39
3.5.2 การสกัดพลาสมิด.....36
3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....40
3.6.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรีย.....40
3.6.2 การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....41

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....42
4.1 ส่วนประกอบของโภชนะในอาหาร.....42
4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค.....45
4.2.1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ.....42
4.2.2 การทำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์.....46
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....47
4.4 การถ่ายทอดยีนและตรวจสอบโคลนที่ได้.....49
4.4.1 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายในพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากโคโลนี (Colony PCR).....50
4.5 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยวิธี Restriction fragment length polymorphism 51
4.5.1 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....51
4.5.2 ผลวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างและจัดกลุ่มดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GelComparII Cluster Analysis Module.....52
4.5.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ.....53
4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....54
4.7 ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย.....60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 68

บรรณานุกรม.....70

ภาคผนวก ก.....77

ภาคผนวก ข.....82

ประวัติผู้เขียน.....106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมน.....10

3.1 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....35

3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....38

4.1 ส่วนประกอบของโภชนะในอาหารที่โคได้รับ..... ...43

4.2 ปริมาณโภชนะที่โคได้รับในแต่ละวัน.....44

4.3 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของจีโนมิกดีเอ็นเอก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์.....45

4.4 ประเภทของโคลนและ Phylotypes ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่มาจาก bovine rumen fluid library.....56

ข.1ผลการ Classification ของโคลนจำนวน 177 โคลน โดยการใช้โปรแกรม BLAST ฐานข้อมูล GenBank และ Similarity Classifier จากฐานข้อมูล RDPII.....86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กระเพาะส่วนต่างๆ ของโค.....5
2.2 การกระจายตัวของแบคทีเรียในรูเมน.....7
2.3 โครงสร้างของแบคทีเรีย.....13
2.4 องค์ประกอบของไรโบโซมของโพรคาริโอต.....14
2.5 rRNA transcription nuit ของโพรคาริโอต.....15
2.6 ขั้นตอนการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย.....20
2.7 แสดงหลักการและขั้นตอนการทำเทคนิค RFLP.....21
2.8 แสดงหลักการและขั้นตอนการทำ sequencing โดยวิธี chain termination method.....23
2.9 แสดงหลักการและขั้นตอนการทำ sequencing โดยวิธี Maxam-Gilbert.....24
2.10 แสดงส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ.....25
2.11 แสดงแผนภูมิต้นไม้แบบยังไม่ได้ตรึงราก และที่ตรึงรากแล้ว.....26
2.12 แสดงแผนภูมิต้นไม้ในรูปทรงแบบเหลี่ยมฉาก แบบเอียง และแบบวงกลม.....26
2.13 ขั้นตอนการสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม.....28
2.14 แสดงรูปแบบของการเกิด Chimeric sequence.....29
4.1 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส.....46
4.2 แถบการทำจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี
เจลอิเล็กโตรโฟริซิส.....47
4.3 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน 16S rRNA gene.....48
4.4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์จากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป
แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส.....49
4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค Colony PCR แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็ก
โตรโฟริซิส.....50
4.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค Colony PCR แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็ก
โตรโฟริซิส.....51
4.7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค RFLP
ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟริซิส.....52
4.8 เปรียบเทียบความแตกต่างและจักลุ่มดีเอ็นเอดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม
GelComparII Cluster Analysis Module.....53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.9 แสดงแถบพลาสมิดดีเอ็นเอ ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส.....54

4.10 ผลความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์.....57

4.11 แสดงการแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล.....57

4.12 ชนิดของแบคทีเรียที่พบภายในกลุ่มต่างๆ จากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI.....58

4.13 จำนวน phylotype ของแบคทีเรียที่ได้จากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์.....59

4.14 กราฟแสดงแหล่งที่มาของแบคทีเรียต่าง ๆ ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง.....60

4.15 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิธี Neighbor-joining.....63

4.16 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria ในกระเพาะรูเมนของโค.....64

4.17 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*)ในกระเพาะรูเมนของโค.....65

4.18 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ในกระเพาะรูเมนของโค.....67

ข.1 การเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนของโค.....83

ข.2 แสดงขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานของ 100bp DNA Ladder และ Lambda DNA/HindIII Marker ตามลำดับ.....84

ข.3 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T Vector (Fermentas Inc., USA).....85

ข.4 ภาพแสดง electrophenogram ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาตัวอย่างที่ CF344 primer M13F.....101

ข.4 (ต่อ) ภาพแสดง electrophenogram ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาตัวอย่างที่ CF344 primer T7.....102

ข.5 ภาพแสดงตัวอย่างรูปแบบการจัดเรียงข้อมูลเข้าโปรแกรมแบบ FASTA format.....103

ข.6 ภาพแสดงตัวอย่างลำดับเบสที่ถูกจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม Clustal W.....104

ข.7 ภาพแสดงรูปแบบของ MEG File ก่อนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

โคเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความสามารถนำอาหารคุณภาพต่ำมาเปลี่ยนเป็นผลผลิตน้ำนม และเนื้อได้ดี โดยเฉพาะอาหารเยื่อใยสูงๆ ซึ่งกระเพาะของโคนั้นประกอบด้วยกันทั้งหมด 4 ส่วน คือ รูเมน เรติคูลัม โอมาซัม และอโบมาซัม กระเพาะรูเมนถือว่าเป็นส่วนที่มีความสำคัญมากเพราะมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับกระเพาะส่วนอื่น และมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในระบบย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมนจะทำให้เกิดกระบวนการหมักอาหารหยาบ จนได้กรดไขมันระเหยได้ (VFA)ที่โคสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นแบคทีเรียจะมีปริมาณมากที่สุด (ฉลอง วชิราภากร. 2541) โดยแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนมีทั้งที่เป็นพวกสามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Obligate anaerobes) และพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobes) (Hungate. 1966) ซึ่งส่วนมากมีลักษณะแบบ cocci นอกจากนี้ยังมีลักษณะอื่นๆอีก เช่น spirochetes, rosettes, ovals และ tetracocci การจัดจำแนกแบคทีเรียอาจจำแนกตามหลักเกณฑ์ได้หลายอย่าง เช่น ลักษณะภายนอก การย้อมสี สารอาหารที่ใช้ ผลผลิตที่สร้างขึ้น องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ หรือหลายๆลักษณะประกอบกัน (Stewart *et al.* 1997) ตลอดระยะเวลามากกว่า 40 ปีที่ผ่านมา ได้มีการพยายามศึกษาจำแนกความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ทั้งชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน และชนิดที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนจากปัจจัยที่แตกต่างกันของสัตว์ ได้แก่ อายุสัตว์ สภาพร่างกายสัตว์ แหล่งที่อยู่ ฤดูกาลและอาหารที่สัตว์ได้รับ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ที่ตรวจพบก็เป็นเพียงส่วนน้อยในระบบนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ทั้งหมดของกระเพาะรูเมน (Amann *et al.* 1995 ; Dehority and Orpin. 1988)

จากความก้าวหน้าทางด้านอณูชีววิทยาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยทำการวิเคราะห์ลักษณะที่มีการแสดงออก (phenotypic) ร่วมกับลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic) โดยอาศัยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสใน 16S rRNA gene ที่จำเพาะเจาะจงเป็นมาตรฐานในการจำแนก (Forster *et al.* 1997 ; Svetlana *et al.* 2001) โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีแบคทีเรียจำนวนมากที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสภาวะที่มนุษย์สร้างขึ้นได้ และมีอีกหลายชนิดที่โตช้ามากหรือเร็วมากจนตรวจสอบได้ยาก (วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2548) การนำไรโบโซมหน่วยย่อยขนาด 16S rRNA มาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียนั้น เนื่องจากการเรียงตัวของลำดับเบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนยีน 16S rRNA มีการเปลี่ยนแปลงน้อยในแบคทีเรียแต่ละชนิด และลำดับเบสบนยีนของ 16S rRNA gene จะมีความแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต (Lane. 1991) ในปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีการนี้มาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมากขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากของเหลวในกระเพาะรูเมน (Rumen Fluid) มาศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน โดยวิเคราะห์ลักษณะทาง phylogenetic มาใช้ในการจัดจำแนก (Whitford *et al.* 1998 ; Wang *et al.* 2005) และนอกจากนี้ก็ได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสจากห้องสมุดยีนของไรโบโซมขนาด 16S (16S rRNA gene library) โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR) มาใช้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วย (Tajima *et al.* 1999 ; An *et al.* 2005)

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนนั้น เมื่อดูจากการศึกษาที่ผ่านมานับว่าเป็นสัดส่วนที่น้อยมากเมื่อเทียบกับประชากรแบคทีเรียทั้งหมด มีแบคทีเรียอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่สามารถค้นพบได้ ซึ่งเมื่อได้มีการเรียนรู้และเข้าใจทางด้านอณูชีววิทยามากขึ้น รวมทั้งการพัฒนาวิธีการใหม่ๆเช่นเทคนิคทาง PCR การตรวจหา rRNA และการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสม จะทำให้ศึกษาการจำแนกความหลากหลายของแบคทีเรียในรูเมนได้ดีขึ้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธีการเพิ่มจำนวนยีนของ 16S rRNA จากของเหลวและอนุภาคของอาหารในกระเพาะรูเมน โดยโคลนยีนที่ได้เข้าในเวคเตอร์ จากนั้นหาลำดับเบสของยีนแล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในรูเมนของโค ซึ่งคาดว่าผลที่ได้จะนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียในรูเมนของโคที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน และสามารถนำไปพัฒนาหาผลผลิตของแบคทีเรียที่ใช้ประโยชน์ได้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิเคราะห์จากลำดับเบสของยีน 16S rRNA
2. เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิพันธุกรรมของแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมนของโคกับแบคทีเรียจากแหล่งอื่นๆ ในฐานข้อมูล

1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

1.4 ระยะเวลาดำเนินงาน

ระยะเวลาดำเนินงานรวม 12 เดือน

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมและชนิดของประชากรแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค

2. ค้นพบแบคทีเรียชนิดใหม่ในกระเพาะรูเมน และนำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของโค

โคเป็นสัตว์ที่สามารถเลี้ยงดูได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ เกือบทุกสภาพ ตั้งแต่เขตร้อนจนถึงเขตที่มีอากาศหนาวเย็น โคที่นิยมนำมาเลี้ยงมี 2 ชนิด คือ โคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) โดยคุณสมบัติพิเศษของโค คือ สามารถใช้พืชอาหารสัตว์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติเปลี่ยนเป็นเนื้อได้ดี

โคสามารถจำแนกตามหลักสัตววิทยาได้ดังนี้

Kingdom: ***Animalia***	- อยู่ในอาณาจักรสัตว์ (Animal Kingdom)
Phylum : ***Chordata***	- เป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Backbone)
Class : ***Mammalia***	- เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Giving Milk)
Order : ***Artiodactyla***	- เป็นสัตว์กีบคู่ (Even Toed, Hooved)
Suborder : ***Ruminatia***	- เป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Cud Chewing)
Family : ***Bovidae***	- มีเขากลวง (Hollow Horn)
Genus : ***Bos***	- เป็นสัตว์กระเพาะรวม (Ruminant)
Species:	***Bos taurus*** (โคยุโรป)
	Bos indicus (โคอินเดีย)

ที่มา: Blakely and Bade (1994)

2.2 โครงสร้างทางกายวิภาคและระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมน

2.2.1 ระบบย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

โคเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความสามารถในการใช้อาหารเยื่อใยได้ดีกว่าสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะของตัวสัตว์เอง โดยกระเพาะทั้งหมดมีอยู่ 4 ส่วน (ภาพที่ 2.1) ซึ่งกระเพาะทั้งสี่ส่วนนี้อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (Compact group) มีขนาดใหญ่มากเมื่อเทียบกับร่างกายคือ มีขนาดประมาณ 3/4 ของช่องท้อง หรือประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของช่องท้องทั้งหมด (ฉลอง วชิราภากร. 2541) ซึ่งรายละเอียดของกระเพาะส่วนต่างๆ มีดังนี้

2.2.1.1 กระเพาะเรติคูลัม (Reticulum)

กระเพาะเรติคูลัม หรือกระเพาะรังผึ้งมีลักษณะเป็นถุงขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อที่เป็นเซลล์รูปร่างห้า-หกเหลี่ยมคล้ายรังผึ้ง อยู่ด้านหน้าของกระเพาะรูเมน โดยมีผนังกั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

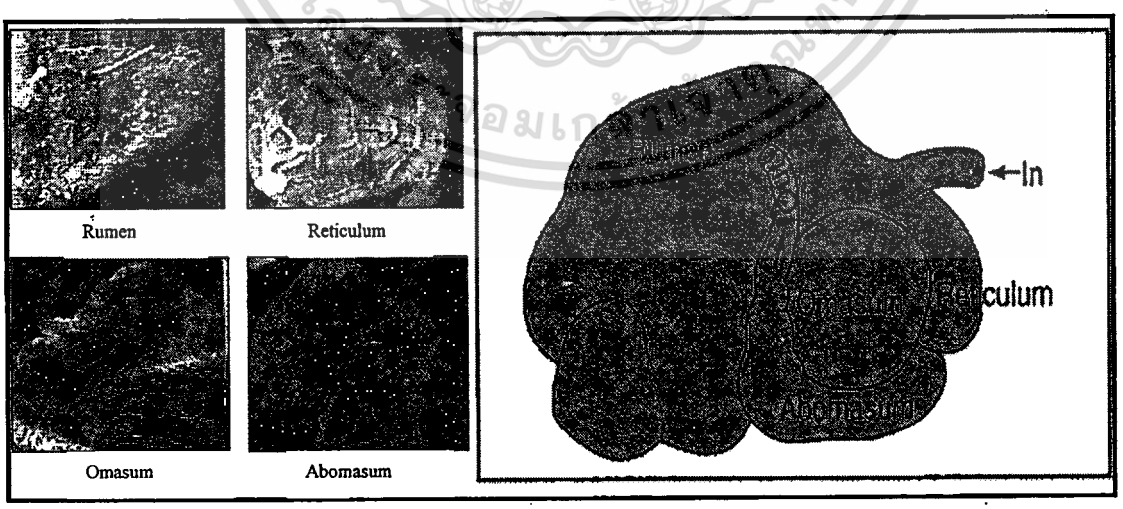
เรียกว่า reticulo-rumen fold ทำให้อาหารที่อยู่ในกระเพาะทั้งสองส่วนนี้ถ่ายเทถึงกันได้อย่างอิสระ จึงเรียกกระเพาะสองส่วนแรกรวมกันว่า reticulo-rumen กระเพาะส่วนนี้เป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับกระเพาะรูเมน และเป็นกระเพาะที่มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับกระเพาะส่วนอื่นๆ คือ กินความจุเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณความจุกระเพาะทั้งหมด (เมธา วรรณพัฒน์. 2533; Church. 1979)

2.2.1.2 กระเพาะรูเมน (Rumen)

กระเพาะรูเมนหรือกระเพาะผ้าขี้ริ้วเป็นกระเพาะส่วนที่ใหญ่ที่สุด มีความจุประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของกระเพาะทั้งหมด ภายในกระเพาะรูเมนแบ่งออกเป็นหลายส่วน เช่น ส่วนบน ส่วนหน้า ส่วนล่าง และส่วนหลัง (Church. 1979) โดยมี muscular pillar เป็นตัวแบ่งแนว แต่เห็นได้ไม่ชัดเจนนัก ลักษณะภายในกระเพาะนี้ถูกปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเป็นขนคล้ายนิ้วมือยื่นออกมา เรียกว่า แพบพิลี (papillae) มีหน้าที่ช่วยคลุกเคล้าอาหาร และบริเวณนี้จะมีการดูดซึมกรดที่เกิดจากกระบวนการหมัก โดยกระเพาะนี้มีความสำคัญมากในกระบวนการย่อยและหมักอาหารเยื่อใยต่างๆ (ฉลอง วชิราภากร. 2541)

2.2.1.3 กระเพาะโอมาซัม (Omasum)

กระเพาะนี้มีลักษณะเป็นรูปกลม มีความจุประมาณ 7-8 เปอร์เซ็นต์ ของกระเพาะทั้งหมด ภายในมีลักษณะเป็นแผ่นเยื่อบางๆ ประมาณ 90-190 กลีบ (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541) เรียงซ้อนกันหนาแน่นคล้ายหนังสือแต่มีขนาดกลีบไม่เท่ากันและบนกลีบเหล่านี้มีปุ่มขนาดเล็กที่เรียกว่า wart-like papillae อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งแต่ละแผ่นนี้จะช่วยเพิ่มการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุต่างๆ ทำให้อาหารที่ออกจากโอมาซัมนี้มีลักษณะที่แห้งขึ้น (ฉลอง วชิราภากร. 2541)



ภาพที่ 2.1 กระเพาะส่วนต่างๆ ของโค

ที่มา: James and Baker (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.4 กระเพาะอโบมาซัม (Abomasums)

กระเพาะแท้เป็นกระเพาะที่อยู่ติดด้านขวามือของกระเพาะหมัก มีทางเปิดเชื่อมต่อกับกระเพาะสามสิบกลีบ มีความจุประมาณ 7-8 เปอร์เซ็นต์ ของกระเพาะทั้งหมด มีต่อมต่างๆที่ทำหน้าที่ผลิตน้ำย่อยออกมาย่อยอาหารเช่นเดียวกับกระเพาะของสัตว์กระเพาะเดี่ยวทั่วไป และจุลินทรีย์ที่ติดมากับอาหารที่ผ่านกระเพาะสองส่วนแรกลงมายังกระเพาะส่วนนี้จะถูกย่อยด้วยน้ำย่อยเช่นเดียวกับอาหารชนิดอื่นๆ ด้วย (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541; Church. 1979)

2.2.2 นิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมน

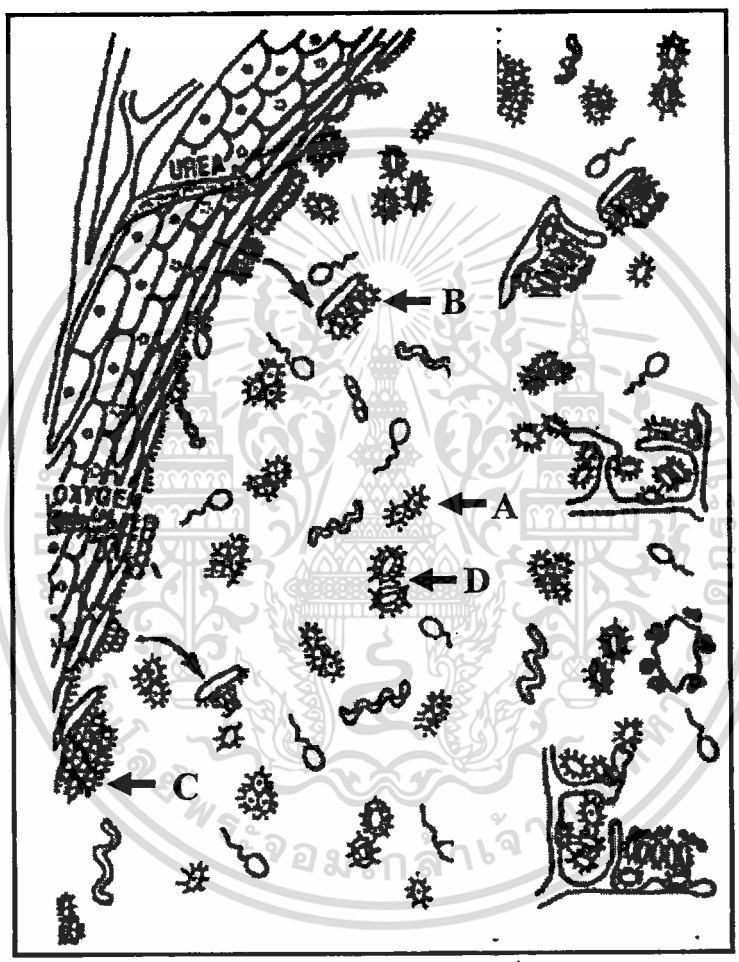
เนื่องจากระบบย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความแตกต่างจากสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง โดยเฉพาะการย่อยอาหารเยื่อใยที่สัตว์ไม่สามารถจะย่อยได้โดยอาศัยน้ำย่อยจากตัวสัตว์เอง ดังนั้นการย่อยอาหารเยื่อใยเหล่านี้จึงจำเป็นต้องอาศัยน้ำย่อยจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยเฉพาะพวกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนในการย่อยเยื่อใย (ฉลอง วชิราภากร. 2541) ดังนั้นสภาพภายในกระเพาะรูเมนจึงต้องมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ คือมีสภาวะแบบไร้ออกซิเจน, มีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.8-6.5 และอุณหภูมิภายในประมาณ 38-40 องศาเซลเซียส (บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541; Church. 1979) จุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมนมีทั้งที่เป็นพวกสามารถเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (obligate anaerobes) และพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) รวมอยู่ด้วยแต่มีปริมาณที่น้อย ทั้งนี้พบว่าอาจติดเข้ามากับน้ำและอาหารที่สัตว์กินเข้าไป (Hungate. 1966; Patterson. 1992)

จากการศึกษาของ Cheng *et al.* (1991) พบว่าแบคทีเรียจะเข้ามาอยู่ในกระเพาะของลูกโคได้ทันทีหลังจากสัตว์เกิดมาได้ประมาณ 38 ชั่วโมง จากการเลียของแม่ผ่านทางน้ำลาย ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม cellulolytic bacteria โดยจะอยู่ในส่วนของเหลวในกระเพาะรูเมน หลังจากนั้นก็จะเข้ายึดเกาะตามผนังรูเมน ซึ่ง Fonty *et al.* (1987) ก็ได้รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มแรกที่พบในสัตว์แรกเกิด คือ cellulolytic bacteria ซึ่งพบหลังจากสัตว์เกิด 4 วัน โดยในช่วง 2 วันแรกหลังจากสัตว์เกิดจะมีการเจริญของแบคทีเรียพวกที่สามารถใช้ยูเรียได้ โดยยึดอยู่กับผนังของกระเพาะรูเมนและจะมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่อยู่ในส่วนของของเหลว (rumen fluid) ในกระเพาะรูเมน และก็จะเริ่มยึดเกาะบนอาหารที่สัตว์กิน ส่วนในช่วง 3-4 วันหลังเกิดก็จะพบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่สามารถใช้ประโยชน์จากเยื่อใย หรือ เซลลูโลส (cellulose) เกิดขึ้นโดยเกาะอยู่ตามเศษอาหาร ในช่วง 8-10 วันก็จะพบมีการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราเกิดขึ้น โดยเชื้อราจะยึดเกาะบริเวณผิวของอาหารและช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลส ส่วนโปรโตซัวจะพบหลังสัตว์เกิดในช่วง 12-20 วัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเพราะมีแบคทีเรียกลุ่ม cellulolytic และ methanogenic ร่วมอยู่ด้วย เพราะโปรโตซัวเหล่านี้ทำหน้าที่แบบพึ่งพาอาศัยกับแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา แบคทีเรียมีจำนวนมากที่สุดคือประมาณ 10^{10}-10^{11} เซลล์/มิลลิลิตร จำนวนโปรโตซัวประมาณ 10^{5}-10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร และจำนวนเชื้อราประมาณ 10^{2}-10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร (Hungate. 1966) การเพิ่มจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของอาหารที่สัตว์ได้รับ โดยขึ้นอยู่กับสมดุลของระบบนิเวศในกระเพาะหมัก (Baik *et al.* 1997)

2.2.3 แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน (Rumen bacteria)



ภาพที่ 2.2 การกระจายตัวของแบคทีเรียในรูเมน A แบคทีเรียที่อยู่ในของเหลวของรูเมน, แบคทีเรียที่เกาะอยู่กับอนุภาคอาหาร, C แบคทีเรียที่เกาะอยู่ตามเนื้อเยื่อผนังของกระเพาะรูเมน, D แบคทีเรียที่เกาะอยู่กับ protozoa

ที่มา: ฉลอง วชิราภากร (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นแบคทีเรียจะมีปริมาณมากที่สุด โดยมีมากกว่า 200 ชนิด และมีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (Hungate. 1966) ซึ่งแบคทีเรียจะมีการกระจายตัวอยู่ในกระเพาะรูเมนได้หลายรูปแบบ (ภาพที่ 2.2) ได้แก่

- Bacteria ที่อยู่ในของเหลวของกระเพาะรูเมน (rumen fluid) มีอยู่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของ bacteria ทั้งหมด
- Bacteria ที่เกาะอยู่กับอนุภาคอาหาร มีอยู่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของ bacteria ทั้งหมด
- Bacteria ที่เกาะอยู่ตามเนื้อเยื่อผนังของกระเพาะรูเมน
- Bacteria ที่เกาะอยู่กับ protozoa (ส่วนใหญ่จะเป็นพวก methanogens)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียอาจจำแนกตามหลักเกณฑ์ได้หลายวิธีเช่น รูปร่างลักษณะการย้อมติดสี สารอาหารที่ใช้และผลผลิตสุดท้าย (ตารางที่ 2.1)

2.2.3.1 ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

การแบ่งแยกชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนอาจแบ่งได้ตามซับสเตรต ที่ใช้และ end products ที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้ (ฉลอง วชิราภากร. 2541; วิศิษฐพร สุขสมบัติ. 2551; Hungate. 1996; McKane and Kandel. 1996)

1) แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสได้ เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในกระเพาะรูเมน ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Bacteroides succinogenes* ในขณะที่ *Cillobacterium cellulosolvens* และ *Clostridium Iochheadii* และ *Cillobacterium Iongisporum* ต่างๆ ก็มีส่วนช่วยในการย่อยเซลลูเลสได้แต่ก็ไม่ค่อยพบในกระเพาะรูเมน

2) แบคทีเรียที่ย่อยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulolytic bacteria) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสจะสามารถใช้ประโยชน์จากเฮมิเซลลูโลสได้ด้วย แต่แบคทีเรียที่ย่อยเฮมิเซลลูโลสจะไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Butyrivibrio fibrisolvens* ส่วนตัวอื่นๆเช่น *Lachnosperia multiparens* และ *Bacteroides ruminicola* สามารถย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและเพคตินได้ดี

3) แบคทีเรียที่ย่อยอะไมโลส (Amylolytic bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้จะมีเป็นจำนวนมากในกระเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นในปริมาณสูง ซึ่งสามารถย่อยแป้งได้ ชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ *Bacteroides amylophilus, Succinimonas amylophilus, Butyrivibrio fibrisolvens, Selenomonas ruminantium, Streptococcus bovis* และ *Bacteroides ruminicola* เป็นต้น จะเห็นว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยเซลลูโลสหลาย species สามารถที่จะย่อยแป้ง (carbohydrates) ได้ด้วย แต่แบคทีเรียที่ย่อยแป้งโดยตรง ไม่สามารถที่จะย่อยเซลลูโลสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) แบคทีเรียที่ย่อยน้ำตาล (Sugar-utilizing bacteria) โดยปกติแล้วแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ อะไมโลส จะสามารถย่อยน้ำตาลได้ด้วย แต่จะไม่สามารถย่อยน้ำตาลเชิงซ้อนได้ แบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Eubacterium ruminantium* และ *Lactobacillus* spp.อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่พบมากในสัตว์ที่โตเต็มที่ แต่มักพบในลูกสัตว์ หรือสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีแป้งมาก โดยจะอาศัย maltose ที่ได้จากการย่อยแป้งของ *Streptococcus bovis* อีกทีหนึ่ง

5) แบคทีเรียที่ใช้กรด (Acid-utilizing bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ประโยชน์จากกรดที่ได้จากการย่อยสลายอาหารเช่น formic, acetic, malic, fumaric, lactic และ succinic แบคทีเรียจำพวกนี้ได้แก่ *Veillonella gazogenes, V. alacalesceus, Propionic bacterian sp., Selemonas ruminantium, Reptostreptococcus elsdenii* และ *Selemonas lactilytica* เป็นต้น

6) แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic bacteria) โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงานพื้นฐาน ได้แก่ *Bacteroides amylophilus, Clostridium sporogens* และ *Bacillus licheniformis* และยังมีแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนได้โดยตรง ได้แก่ *Reptostreptococcus ruminicola, Ruminococcus amylophilus* และ*Streptococcus bovis* เป็นต้น

7) แบคทีเรียที่สร้างแอมโมเนีย (Ammonia-producing bacteria) กลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซแอมโมเนีย ได้แก่ *Bacteroides ruminicola, Selenomonas ruminantivu, Reptostreptococcus eslsdenii* และ *Butyrivibrio spp.*

8) แบคทีเรียที่ผลิตแก๊สมีเทน (Methanogenic-producing bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้จัดอยู่ในพวกแกรมบวก (gram-positive) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ช่วยให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนไม่ลดลงมากนัก แบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Methanobacterium ruminantium* และ *Methanobacterium formicicum*

9) แบคทีเรียที่ใช้ไขมัน (Lipolytic-utilizing bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายไขมันไปเป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมันอิสระได้ (free fatty acid) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ *Veillonella alcalescens* และ *Anaerovibrio lipolytica* เป็นต้น

10) แบคทีเรียที่สังเคราะห์วิตามิน (Vitamin-synthesizing bacteria) มีแบคทีเรียบางชนิดที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์วิตามินบีรวมได้ แต่ยังไม่สามารถทราบชนิดของแบคทีเรียที่แน่นอนได้

แบคทีเรียในแต่ละกลุ่มบางครั้งสามารถที่จะทำหน้าที่ได้เหมือนกับในกลุ่มอื่นๆ แต่บางกลุ่มก็จะมีหน้าที่ย่อยเฉพาะเจาะจงต่อ specific substrates เช่น *Bacteroides amylophilus* จะย่อยเฉพาะ maltose และแป้งเท่านั้น (ฉลอง วชิราภากร. 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ลักษณะแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมน

Organism	Gram stain	Shape	Motility	Fermentation Products
Cellulose decomposers :				
Bacteroides succinogenes	Neg.	Rod	-	Succinate, acetate, formate
Butyrivibrio fibrisolvens	Neg.	Curved rod	+	Acetate, formate, lactate, butyrate, H_2CO_2
Ruminococcus albus	Pos.	Coccus	-	Acetate, formate, H_2, CO_2
Clostridium Iochheadil	Pos.	Rod(spores)	+	Acetate, formate, butyrate, H_2, CO_2
Starch decomposers :				
Bacteroides amylophilus	Neg.	Rod	-	Formate, acetate, succinate
Bacteroides ruminicola	Neg.	Rod	-	Formate, acetate, succinate
Selenomonas ruminantium	Neg.	Curved rod	+	Acetate, propionate, lactate
Succinomonas amylolytica	Neg.	Oval	+	Acetate, propionate, succinate
Streptococcus bovis	Neg.	Coccus	-	Lactate
Late decomposers :				
Selenomonas lactilytica	Neg.	Curved rod	+	Acetate, succinate
Peptostreptococcus elsdenil	Pos.	Coccus	-	Acetate, propionate, butyrate
Pectin decomposer :				
Lachnospira multiparus	Pos.	Curved rod	+	Acetate, formate, lactate, H_2, CO_2
Methane producer :				
Methanobrevibacter ruminantium	Pos.	Rod	-	CH_4 (from H_2 +CO_2 or formate)
Methanomicrobium mobile	Neg.	Rod	+	CH_4 (from H_2 +CO_2 or formate)

ที่มา : McKane (1996)

2.2.3.2 อิทธิพลของอาหาร ต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

จุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญมากในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยเฉพาะการย่อยสลายอาหารที่สัตว์กินเข้าไป ประชากรจุลินทรีย์นั้นจะมีความสัมพันธ์กับอาหารที่ได้รับ โดยปกติจุลินทรีย์จะเข้าเกาะยึดกับอาหารอย่างจำเพาะเจาะจง โดยปัจจัยทางกายภาพของอาหารก็เป็นข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งในการย่อยอาหารของจุลินทรีย์ อาหารจำพวกเมล็ดธัญพืชหรือการให้อาหารข้นสูง จะมีผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะหมัก จะทำให้มีการหมักในกระเพาะรูเมนอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะรูเมนลดลงอาจเหนี่ยวนำให้เกิดโรคทางโภชนาการได้เช่นโรคกระเพาะรูเมนเป็นกรด (Rumen acidosis) (McAllister *et al.* 1990) และส่งผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียซึ่งเป็นกลุ่มที่อาศัยอยู่มากที่สุด ส่วนอาหารหยาบจะเพิ่มรูปแบบของกระบวนการย่อยสลายในกระเพาะหมักอย่างช้าๆ ทำให้เกิดระบบนิเวศวิทยาในกระเพาะหมักมีระดับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนเซลลูโลไลติก แบคทีเรีย ระดับกลูโคส และเซลโลไบโอส เพิ่มขึ้น และทำให้ระดับความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอยู่ในระดับที่เหมาะสม (ศิวพร วรอนุ. 2543) และได้มีรายงานว่าค่าความเป็น

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างก็ส่งผลต่อชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งในกรณีที่สัตว์ได้รับอาหารข้นในปริมาณมาก ค่าความเป็นกรด-ด่างในรูเมนจะสูง ทำให้จำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้แป้ง กลุ่มที่ผลิตกรดและใช้กรด จะเพิ่มจำนวนมากขึ้น ขณะเดียวกันจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสก็จะมีจำนวนลดลง ในทางตรงกันข้ามเมื่อสัตว์ได้รับอาหารหยาบในปริมาณมาก ค่าความเป็นกรด-ด่างในรูเมนจะเพิ่มขึ้น ถ้าระดับความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 6 แบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลายเซลลูโลสก็จะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (Moat and Foster. 1995)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียต่อชนิดของอาหาร ในช่วงแรกจะให้ความสำคัญกับกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเยื่อใยเนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีปริมาณมากและมีความสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยาภายในกระเพาะรูเมนมากที่สุด (Minato *et al.* 1966 ; Minato *et al.* 1993) โดยพบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเยื่อใยที่พบมากที่สุด ได้แก่ พวก *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens* และ *Ruminococcus albus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยเซลลูโลส (Forsberg *et al.* 1997) และมีรายงานว่าสามารถพบ *Ruminococcus flavefaciens* ได้ในปริมาณมากที่สุดในบรรดาแบคทีเรียทั้งสามชนิด หลังจากที่โคได้รับการเลี้ยงดูโดยเปลี่ยนอาหารจากอาหารข้นเป็นอาหารหยาบ ได้แก่ หญ้าอัลฟาฟ่า และแกนข้าวโพด (Weimer *et al.* 1999)

Tajima et al. (2000) ได้ศึกษาประชากรของแบคทีเรียในรูเมนโดยใช้เทคนิค 16S rDNA clone libraries ในโคที่ได้รับการเปลี่ยนอาหารจากหญ้าเฮย์เป็นเมล็ดธัญพืช โดยสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน มาทำการสร้าง libraries โดย libraries ที่ 1 สร้างจากตัวอย่างที่เก็บก่อนการทดลองซึ่งได้รับหญ้าเฮย์เป็นหลัก พบว่าประมาณ 90.2 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ใน low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) จำนวน 3.9 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) อีก 3.9 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในกลุ่ม *Proteobacteria* และอีก 2.0 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ใน high G+C Gram-positive bacteria (HGCGPB) โดยแบคทีเรียส่วนมากที่พบจะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยเซลลูโลส เช่น *Ruminococcus flavefaciens* และ *Ruminococcus albus* เป็นส่วนใหญ่ ใน libraries ที่ 2 สร้างจากตัวอย่างที่เก็บหลังจากโคได้รับเมล็ดธัญพืช เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามี 72.4 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ใน low G+C Gram-positive bacteria จำนวน 22.4 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และอีก 5.2%จัดอยู่ในไฟลัมปี high G+C Gram-positive bacteria และใน libraries ที่ 3 สร้างจากตัวอย่างที่เก็บหลังจากโคได้รับเมล็ดธัญพืชเป็นเวลา 28 วัน พบว่ามี 95 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ใน low G+C Gram-positive bacteria โดยมีจำนวนประมาณครึ่งพบว่าอยู่ในกลุ่ม *Selenomonas-Succiniclasticum-Megasphaera* มีจำนวนจำนวนเพียง 1 โคลนจัดอยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และอีก 1 โคลนจัดอยู่ในกลุ่ม *Chlamydiales-Verrucomicrobia* โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบใน libraries ที่ 2 และ libraries ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 เป็นพวกที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตกรดและใช้กรด ได้แก่พวก *Lactobacillius ruminis, Selemonas ruminantium, Megasphaera elsdenii* และ *Butyrivibrio fibrisolvens*

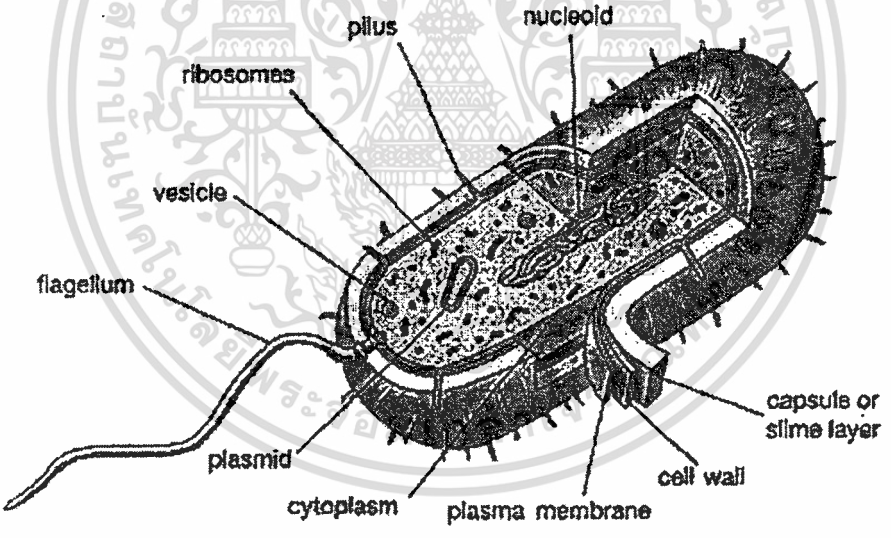
ต่อมา Tajima *et al.* (2001) ได้นำเทคนิค real time PCR เพื่อที่จะใช้ในการจำแนกชนิดและวัดปริมาณของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ โดยทำการศึกษาในโคนมที่มีการเปลี่ยนอาหารที่กิน จากหญ้าเฮย์เป็นเมล็ดธัญพืช ซึ่งได้ทำการจัดชุดสัตว์ทดลองเช่นเดียวกับงานทดลองของ Tajima *et al.* (2000) พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอของ *Fibrobacter succinogense* จะพบมากในกลุ่มโคนมที่ได้รับหญ้าเฮย์เป็นหลัก (วันที่ 0) แต่เมื่อให้โคนมได้รับเมล็ดธัญพืชเป็นเวลา 3 และ 28 วัน จะมีผลทำให้ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย กลุ่มนี้ลดลง 20 และ 57 เท่า ตามลำดับ สำหรับในกลุ่ม *Ruminococcus flavefaciens* พบว่าในวันที่ 3 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ จะลดลง 10 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับวันที่ 0 และจะคงระดับนี้ไปถึง วันที่ 28 ทั้งนี้ เป็นผลเนื่องมาจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน โดยเมื่อมีการให้หญ้าเฮย์แก่โคนม จะทำให้แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ มีปริมาณที่มาก แต่เมื่อมีการให้เมล็ดธัญพืชจะทำให้แบคทีเรียมีปริมาณลดลงได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Tajima *et al.* (2000) ที่พบว่าเมื่อให้เมล็ดธัญพืชจะทำให้ไม่สามารถวัดแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ (เนื่องจากการวัดได้จำกัดที่ประมาณต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์) ส่วนดีเอ็นเอของแบคทีเรียรูเมนในกลุ่ม prevotella มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามวันที่ได้รับเมล็ดธัญพืช โดยในวันที่ 3 *Prevotella ruminocola* และ *Prevotella bryanti* จะมีดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 7 และ 263 เท่าของวันที่ 0 ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 28 ดีเอ็นเอของ *Prevotella ruminocola* จะลดลง 3 เท่า แต่ *Prevotella bryanti* จะยังคงรักษาระดับของดีเอ็นเอได้ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า แบคทีเรียรูเมนในกลุ่ม prevotella จะทำหน้าที่ในการย่อยสลาย oligosaccharide และ xylanose ซึ่งพบมากในเมล็ดธัญพืช ดังนั้นจึงพบว่าแบคทีเรียสองชนิดนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อโคนมได้รับอาหารพวกธัญพืช

Koike *et al.* (2003) ได้ศึกษาประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนในกลุ่มที่สัมพันธ์กับอาหารประเภทเยื่อใย โดยทำการศึกษาในกลุ่มของแกะเจาะกระเพาะที่ได้รับการเลี้ยงดูโดยให้หญ้าออร์ชาร์ด (Orchardgrass hey) และหญ้าอัลฟาฟ่า (Alfalfa) พบว่าแบคทีเรียจำพวก *Fibrobacter succinogenes* และ *Butyrivibrio fibrisolvens* สามารถพบได้ทั้งสองกลุ่มทดลอง โดยที่แบคทีเรีย *Fibrobacter succinogenes* และ *Butyrivibrio fibrisolvens* นั้น เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยเซลลูโลส และย่อยเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นจึงสามารถพบได้ทั้งสองกลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเยื่อใยดังกล่าว และยังมีรายงานว่าในสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีเยื่อใยสูงจะมีแบคทีเรียแกรมลบมาก แต่ถ้าในสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นในปริมาณที่สูงจะมีแบคทีเรียแกรมบวกมาก (Hungate. 1966)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 พันธุศาสตร์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นเซลล์ประเภทโพรคาริโอต (Prokaryote) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กเซลล์เดียว (Unicellular) มีลักษณะการเจริญแบบหลายเซลล์ คือเจริญแบบเป็นโคโลนีหรืออยู่เป็นกลุ่มของเซลล์ และมีความหลากหลายสูง โครงสร้างที่พบในแบคทีเรียทั่วๆไป (ภาพที่ 2.3) เริ่มจากโครงสร้างส่วนนอกสุดคือผนังเซลล์ (Cell wall) และแคปซูล (Capsule) ส่วนของผนังเซลล์ และป้องกันส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหายจากผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายนอก นอกจากนี้ส่วนของผนังเซลล์ยังเป็นที่เกาะของแฟลกเจลลา (Flagellum) ซึ่งเจริญมาจากไซโทพลาซึมแล้วยื่นทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ และแคปซูลโครงสร้างที่อยู่ถัดเข้าไปจากผนังเซลล์ได้แก่ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ มีลักษณะเป็นโครงสร้างเรียกว่า Phospholipid bilayer ทำหน้าที่เลือกผ่านเฉพาะสารบางอย่างให้เคลื่อนที่เข้าหรือออกนอกเซลล์ได้ ภายในส่วนของไซโทพลาซึม เป็นที่อยู่ของสารพันธุกรรมคือดีเอ็นเอที่เรียกว่านิวคลีออยด์ (Nucleoid) ไรโบโซม และพวกแกรนูลต่างๆ (จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2550 ; Alberts *et al.* 1994)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของแบคทีเรีย

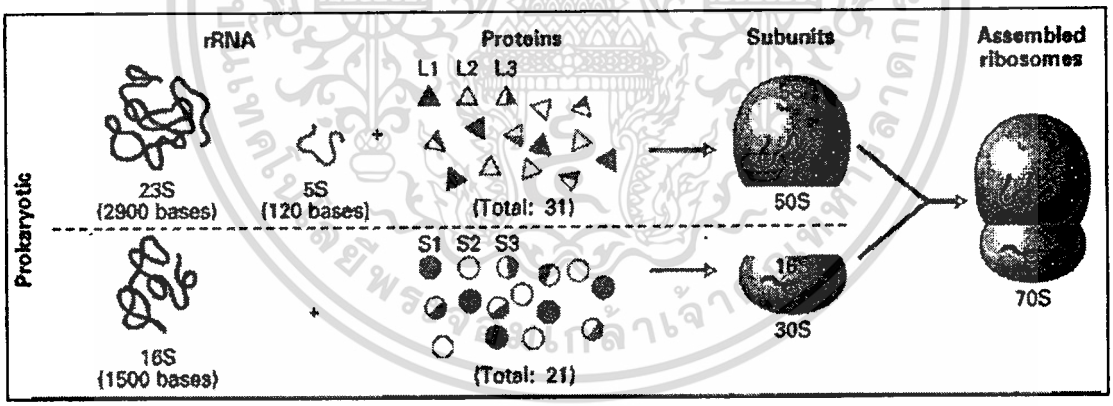
ที่มา : Becker *et al.* (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 อาร์เอ็นเอไรโบโซม (Ribosomal RNA; rRNA)

ไรโบโซม (ribosome) เป็นโครงสร้างภายในเซลล์ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีน ในโพรคาริโอตไรโบโซมจะกระจายอยู่ทั่วเซลล์ องค์ประกอบของไรโบโซมจะประกอบด้วยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (หัทยา กาวีวงศ์. 2546) โดยที่อาร์เอ็นเอไรโบโซม เป็นอาร์เอ็นเอที่มีการสร้างมากที่สุดในเซลล์ คือ ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นโครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอที่ไม่แปลรหัส แต่มีหน้าที่สำคัญในการทำงานเพื่อสังเคราะห์โปรตีนร่วมกับไรโบโซมอลโปรตีนหลายชนิดรวมเป็นโครงสร้างของไรโบโซม (สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ. 2547)

ไรโบโซมของโพรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit) และหน่วยย่อยขนาดเล็ก (Small subunit) (ภาพที่ 2.4) โดยหน่วยย่อยขนาดใหญ่จะมีไรโบโซมขนาด 50S ประกอบด้วยโมเลกุลของ rRNA 2 ชนิด คือ 23S rRNA มีขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ และ 5S rRNA มีขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ส่วนหน่วยย่อยขนาดเล็ก เป็นโรโบโซมขนาด 30S ประกอบด้วยโมเลกุลของ rRNA ชนิด 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์รวมอยู่กับไรโบโซมอลโปรตีน 21 ชนิด (หัทยา กาวีวงศ์. 2546; Alberts *et al.* 1994)

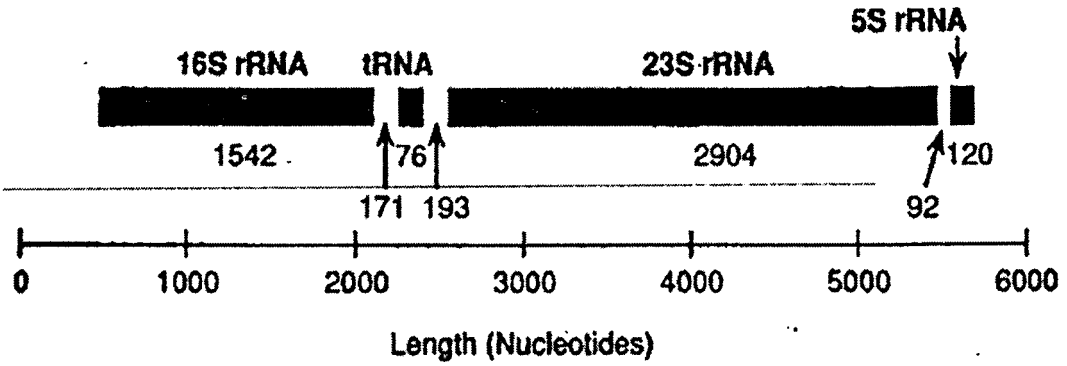


ภาพที่ 2.4 องค์ประกอบของไรโบโซมของโพรคาริโอต

ที่มา: Becker *et al.* (2004)

rRNA gene ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โมเลกุลของ rRNA ทุกชนิดนั้น จะอยู่ในสภาพเป็นกลุ่มหรือเป็นหน่วย ที่เรียกว่า rRNA transcription unit โดยที่ rRNA transcription unit ของโพรคาริโอต ประกอบด้วย 16S, 23S และ 5S rRNA gene เรียงต่อกัน โดยแต่ละ rRNA gene ถูกคั่นด้วยลำดับเบสขนาดสั้นๆที่ไม่ใช่ยีน เรียกว่า ช่องว่าง (spacer) (Eunjoon *et al.* 1990) (ภาพที่ 2.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่2.5 rRNA transcription unit ของโพรคาริโอต

ที่มา: Snustad and Simmons (2006)

2.3.2 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของแบคทีเรีย

การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ยอมรับกันโดยทั่วไป ได้แก่การจัดจำแนกตามหลักเกณฑ์ของ "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" ซึ่งฉบับพิมพ์ครั้งที่ 1 นั้น ได้จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 4 กลุ่ม โดยใช้สมบัติทางฟีโนไทป์ในการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย ตามลักษณะของการติดสีแกรม รูปร่างของเซลล์ การจัดเรียงเซลล์ การใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ คุณสมบัติในการใช้อาหารและเมแทบอลิซึม ต่อมาการจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรียได้มีการเปลี่ยนแปลงไปมาก โดยได้มีการนำข้อมูลจาก rRNA และ DNA มาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางไฟโลจีเนติกในการจำแนกแบคทีเรีย จึงทำให้ปัจจุบัน "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 2 ได้ใช้หลักเกณฑ์ทางด้านไฟโลจีเนติกมาใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย ออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

กลุ่มที่1 อาร์คีโอแบคทีเรียและยูแบคทีเรียบางกลุ่ม (*Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*) ตัวอย่างสกุลในกลุ่มนี้ได้แก่ *Chlorobium, Methanobacterium*

กลุ่มที่2 โพรทีโอแบคทีเรีย (*Proteobacteria*) ตัวอย่างสกุลในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pseudomonas, Vibrio, Haemophilus, Salmonella, Methylophilus*

กลุ่มที่3 แบคทีเรียแกรมบวกที่มี G+C ต่ำ (low G + C Gram-positive *Bacteria*; LGCGPB) ตัวอย่างสกุลในกลุ่มนี้ได้แก่ *Clostridium, Streptococcus, Bacillus, Staphylococcus, Eubacterium*

กลุ่มที่4 แบคทีเรียแกรมบวกที่มี G+C สูง (high G + C Gram-positive *Bacteria*; HGCGPB) ตัวอย่างสกุลในกลุ่มนี้ได้แก่ *Mycobacterium, Streptomyces, Corynebacterium*

กลุ่มที่5 แพลงค์โทไมซีต สไปโรจีต ไฟโบรแบคเตอร์ แบคทีรอยด์และฟูโซแบคทีเรีย (*Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres, Bacteroidetes* and *Fusobacteria*) หรือเรียกว่ากลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) ตัวอย่างสกุลในกลุ่มนี้ได้แก่ *Spirochaeta, Fibrobacter,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacteroides, *Prevotella*, *Flexibacter* และ *Cytophaga* เป็นต้น (จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2550; สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545)

2.4 การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย

การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ได้มีผู้ให้ความสนใจและทำการศึกษากันมากขึ้น โดยการศึกษาในเบื้องต้นได้ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture dependent methods) ซึ่งพบว่าต้องใช้เวลานาน หรือไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้เนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้ขีดความสามารถในการตรวจยังน้อยและมีข้อจำกัดอีกมาก (วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2548) จากความก้าวหน้าทางด้านอณูชีววิทยา ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยทำการวิเคราะห์ลักษณะที่มีการแสดงออก (Phenotypic) ร่วมกับลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic) โดยอาศัยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสใน 16S rRNA gene ที่จำเพาะเจาะจงเป็นมาตรฐานในการจำแนก โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการศึกษาจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมโดยตรงโดยไม่พึ่งพาการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Forster *et al.* 1997; Svetlana *et al.* 2001) โดยในยุคแรกนั้นใช้โมเลกุล 5S rRNA gene แต่เนื่องจากมีข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบและขนาดของโมเลกุลที่จำกัด ภายหลังจึงได้เปลี่ยนเป็นโมเลกุล 16S rRNA gene แทนเนื่องจาก

1. 16S rRNA gene สามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด เนื่องจากยีนดังกล่าวเป็นยีนโครงสร้าง (Structural gene) โดยที่ยีนนี้จะถูกถอดรหัสไปเป็น 16S rRNA ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไรโบโซมในแบคทีเรียทุกชนิด และยังไม่พบว่ามีการถ่ายโอนยีนในโมเลกุลของ rRNA ด้วย ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะสร้าง Phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิต ได้ถูกต้องที่สุด (Woese. 1987)

2. บางตำแหน่งของโมเลกุล 16S rRNA gene พบว่ามีการอนุรักษ์ไว้เป็นอย่างดี แม้ว่าจะผ่านกระบวนการวิวัฒนาการมาเป็นเวลานานก็ตาม ส่วนบริเวณที่แตกต่างกันนี้พบว่ามีความแตกต่างกันตั้งแต่ระดับสปีชีส์ไปจนถึงระดับโดเมน (Woese. 1987)

2.4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยเทคนิคที่ต้องอาศัยการเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent approach)

จากบทบาทของแบคทีเรียที่มีผลต่อกระบวนการย่อยและหมักอาหารที่อยู่ในกระเพาะรูเมนนั้น ทำให้มีนักวิจัยให้ความสำคัญและสนใจศึกษาจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมนมากขึ้น โดยในช่วงแรก Hungate (1966) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ทราบถึงนิเวศวิทยาในรูเมนเป็นสภาพไร้อากาศและมีประชากรอยู่หลายกลุ่มได้แก่ แบคทีเรียโปรโตซัว และเชื้อรา และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องตามความแตกต่างของอาหารที่ได้รับ จากการศึกษาแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดย Minato *et al.* (1989) ได้ทดสอบให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ฟางหมักแอมโมเนียในโคพบว่า จำนวนประชากรของ *Eubacterium ruminantium* เพิ่มมากขึ้น และนอกจากนั้น Orpin *et al.* (1985) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในกวางด้วยเทคนิคการเลี้ยงเชื้อพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยเยื่อใย *Butyrivibrio fibrisovent* มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลโดยในช่วงฤดูหนาวจะเพิ่มมากขึ้น

2.4.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-independent approach)

เนื่องจากการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยระยะเวลา และค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง จึงทำให้นักวิจัยให้ความสนใจและทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยวิเคราะห์ลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic) โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของ 16S rRNA gene ซึ่งเริ่มต้นขึ้นจากการศึกษาของ Whitford *et al.* (1998) ที่ได้ศึกษากลุ่มของประชากรแบคทีเรียในส่วนของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมที่เลี้ยงด้วย หญ้าแห้ง ข้าวโพดหมัก และอาหารข้น โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rRNA gene ด้วย PCR โดยได้ทดลองใช้จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ที่แตกต่างกัน ที่ 12 รอบ และ 30 รอบ ซึ่งจากการทดลองพบว่ากลุ่มของแบคทีเรียที่ตรวจพบส่วนใหญ่มีการกระจายตัวอยู่ในกลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และในกลุ่ม low G+C Gram-positive *Bacteria* ได้แก่พวก *Prevotella* ในทั้งสองกลุ่มการทดลองของการทำปฏิกิริยา PCR ที่ 12 รอบ และ 30 รอบ ในปีต่อมา Tajima *et al.* (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยนที่อดอาหาร 16 ชั่วโมง โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยวิธี PCR ที่ได้จากของเหลว และอนุภาคอาหารในกระเพาะรูเมน โดยพบว่าแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะอาหารมีการกระจายตัวอยู่ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive จำนวน 52.4 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่ม*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 38.1 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่ม *Proteobacteria* 4.7 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในกลุ่ม *Spirochaetes* 2.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 2.4 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มใดได้ ส่วนแบคทีเรียที่พบจากอนุภาคอาหารนั้นมีการกระจายตัวอยู่ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive จำนวน 71.4 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 26.2 เปอร์เซ็นต์ และอีก 2.4 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่มของ *Spirochaetes*

Koike *et al.* (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนกับอาหารประเภทเยื่อใย โดยทำการศึกษาในกลุ่มของแกะเจาะกระเพาะที่ได้รับการติดถุงไนลอนทดสอบการย่อย (Nylon bags) ที่บรรจุด้วยหญ้าออร์ชาร์ดสับ (orchardgrass hey) ให้ผ่านกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และหญ้าอัลฟาฟ่าสับ โดยให้ผ่านกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะเป็นเวลา 20 ชั่วโมง และนำหญ้าดังกล่าวมาสกัดหากลุ่มประชากร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
87072

แบคทีเรีย พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ในกลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และในกลุ่ม low G+C Gram-positive เป็นส่วนใหญ่ (43 เปอร์เซ็นต์ และ 44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

An *et al.* (2005) ศึกษาความหลากหลายของโพรคาริโอตในกระเพาะรูเมนของ Yak และโค Jinnan โดยพบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ 16S rRNA gene จำนวน 194 โคลน ของ library ในกระเพาะรูเมนของ Yak ส่วนใหญ่จัดเป็น 2 กลุ่มคือ อยู่ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive bacteria จำนวน 54.12 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนโคลนทั้งหมด และอยู่ในกลุ่ม *Bacteroidetes* 30.93 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นอีก 10.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ แต่มีความสัมพันธ์กับกลุ่ม rumen fibrolytic bacteria ในขณะที่จำนวน 197 โคลน ของ library ที่ได้จากโค Jinnan สามารถแยกออกเป็น 3 กลุ่มคือ อยู่ในกลุ่มของ *Bacteroidetes* 39.59 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่ม γ-*Proteobacteria* 26.9 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในกลุ่ม low G+C Gram-positive bacteria 22.34 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นอีก 4 เปอร์เซ็นต์ และ 17.8 เปอร์เซ็นต์ จัดอยู่ในกลุ่มที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลคือกลุ่ม fibrolytic และ amylolytic bacteria ตามลำดับ

Jeong *et al.* (2006) ศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองประเทศเกาหลีที่ได้รับการเจาะกระเพาะ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA และทำการโคลนยีน โดยใช้ตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนทั้งหมดสามส่วน ได้แก่ ของเหลวในกระเพาะรูเมน อนุภาคเศษอาหาร และเยื่อบุผนังรูเมน (Rumen Epithelium) ผลการศึกษาจากตัวอย่างกระเพาะรูเมนในส่วนของของเหลวในกระเพาะรูเมน พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 67.5 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม low G+C Gram-positive bacteria 30 เปอร์เซ็นต์ และ*Proteobacteria* 2.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างในของเหลวของอนุภาคเศษอาหาร มีแบคทีเรียส่วนมากอยู่ในกลุ่ม low G+C Gram-positive bacteria 75.5 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 10.8 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม *Proteobacteria* 5.4 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม high G+C Gram-positive bacteria 5.4 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่ม *Spirochaetes* 2.7 เปอร์เซ็นต์ และในส่วนของตัวอย่างของเหลวที่เยื่อบุผนังรูเมน มีแบคทีเรียอยู่ในสองกลุ่มใหญ่คือ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 94.4 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่ม low G+C Gram-positive bacteria 5.6 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบความหลากหลายและประเภทของแบคทีเรียที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมนของโคด้วยเทคนิค PCR นี้มีความรวดเร็วและมีความจำเพาะเจาะจงที่สูงมาก รวมทั้งสามารถตรวจสอบได้ แม้ว่าปริมาณแบคทีเรียที่มีอยู่จะมีปริมาณน้อย (McSweeney *et al.* 2007) วิธีดังกล่าวจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก และสามารถสรุปได้ว่ากลุ่มแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้ส่วนมากจะพบอยู่ในสองกลุ่มคือ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และ low G+C Gram-positive *Bacteria* และนอกจากนี้ยังพบอยู่ในกลุ่มอื่นๆ อีกเล็กน้อย ได้แก่ *Proteobacteria* , *Spirochaetes*

Kocherginskaya *et al.* (2001) และ Sadet *et al.* (2007) ได้ใช้เทคนิค Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ในการตรวจสอบความหลากหลายในกระเพาะรูเมน ซึ่งวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวเป็นการแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสภายในแตกต่างกันเพียง 1 หรือ 2 เบส โดยการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอเกลียวคู่ในโพลีอะคริลาไมด์ที่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ผสมอยู่ในความเข้มข้นที่ต่างกัน ซึ่งพบว่าไม่สามารถแยกแบคทีเรียในกลุ่มหลักได้ และมีขั้นตอนที่มีความซับซ้อนมาก

ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

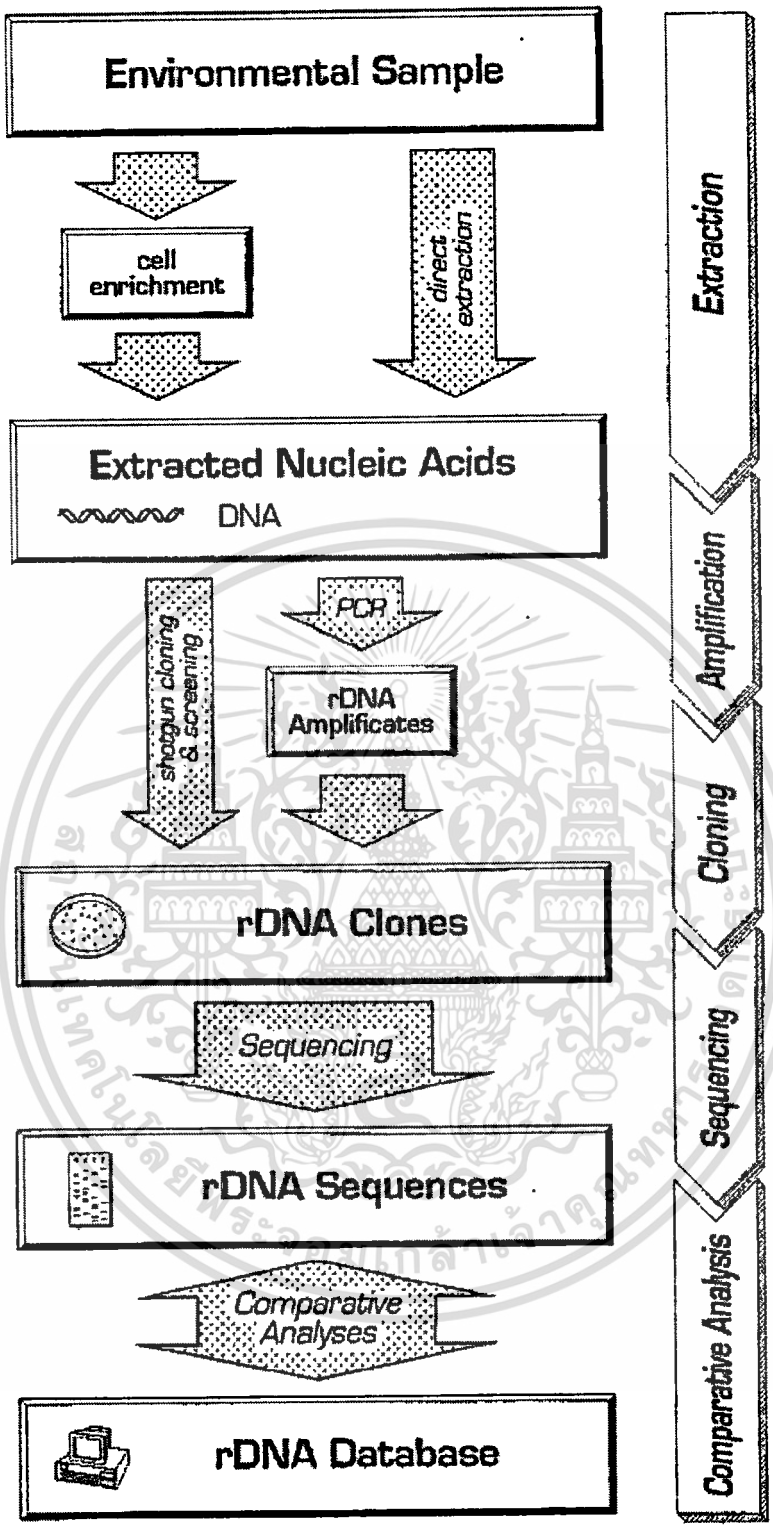
เทคนิค	การประยุกต์ใช้	ข้อดี	ข้อเสีย
16S rDNA clone libralies	- จำแนกจุลินทรีย์กลุ่มหลักในระบบนิเวศวิทยา	- แยกแบคทีเรียได้ทั้งแบบ Culture และ Unculture	- ไม่สามารถหาปริมาณได้
PCR-RFLP	- แยกลายพิมพ์ดีเอ็นเอประชากรแบคทีเรีย	- รวดเร็วในการจำแนก และจัดกลุ่มแบคทีเรีย	- การจำแนกยังไม่จำเพาะครอบคลุม
DGGE	- วิเคราะห์หารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	- แยกแบคทีเรียได้ทั้งแบบ Culture และ Unculture ได้ในระดับกลุ่ม และชนิด	- ใช้แรงงานมากและจำแนกได้เฉพาะกลุ่มหลัก
FISH	- หาจำนวนแบคทีเรียในสภาพแวดล้อม *in situ*	- หาประชากรแบคทีเรียที่สามารถเลี้ยงเชื้อได้และไม่ได้ในสภาพแวดล้อมควบคุม	-ใช้แรงงานมากและยากในการหาปริมาณ

ที่มา: ดัดแปลงจาก Deng *et al.* (2007)

2.4.3 เทคนิคทางด้าน 16S rRNA

เทคนิคทางด้าน 16S rRNA ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน หรือแบคทีเรียในสภาวะแวดล้อมทั่วไป (ภาพที่ 2.6) เริ่มจากขั้นตอนการสกัดกรดนิวคลีอิกของตัวอย่างออกมาในรูปของ ดีเอ็นเอ (DNA) แล้วนำมาทำการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยวิธีที่เรียกว่า "Cloning" โดยเป็นการรวมชิ้นส่วนของยีนที่สนใจเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector) และถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (host) จะได้เป็น 16S rRNA gene library (Amann *et al.* 1995; Dobrovol'skaya *et al.* 2001) เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเหล่านั้นและนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึง (BLAST) กับฐานข้อมูล GenBank หรือ Ribosomal Database Project (RDP) (http://www.cme.msu.edu) ก็จะทราบว่าแบคทีเรียที่พบเป็นชนิดหรือกลุ่มใดบ้าง (Deng *et al.* 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



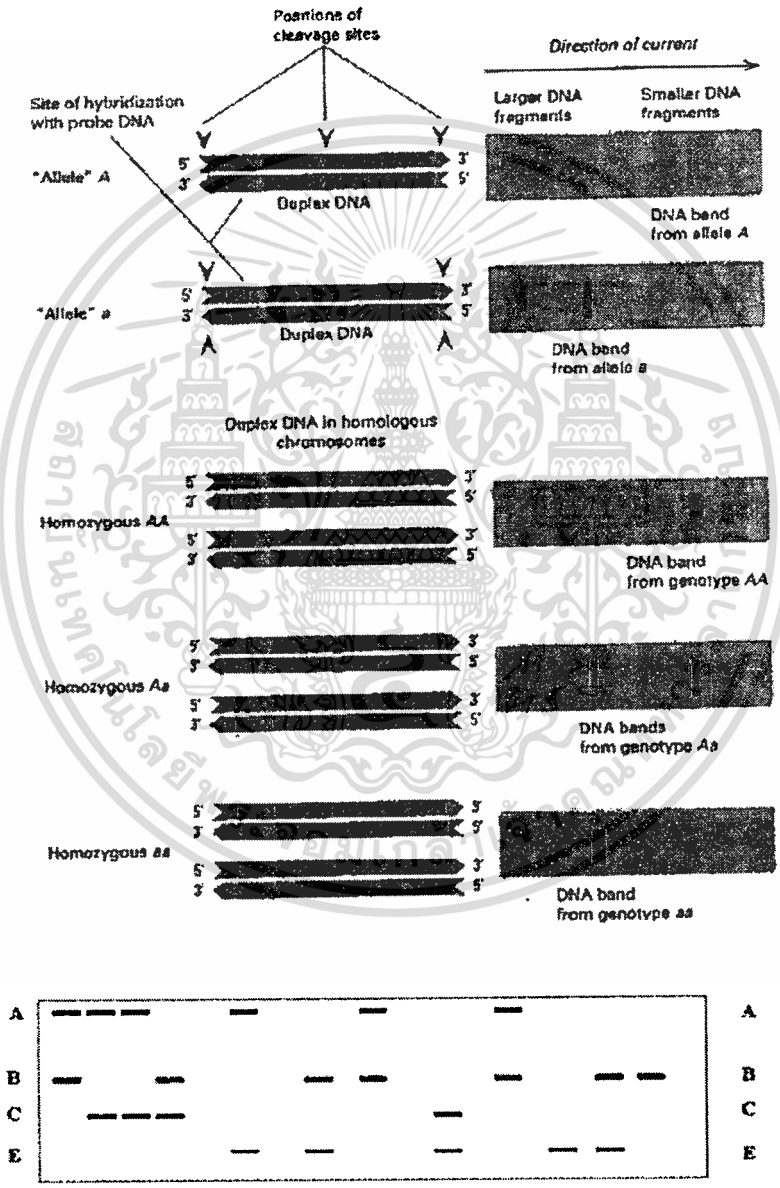
ภาพที่ 2.6 ขั้นตอนการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Amann *et al.* (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) หมายถึง ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งการทำ RFLP จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการจำแนกพันธุ์กรรมของสิ่งมีชีวิต การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และการศึกษาการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543)



ภาพที่ 2.7 แสดงหลักการและขั้นตอนการทำเทคนิค RFLP

ที่มา: สุรินทร์ ปียะโชคณากุล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

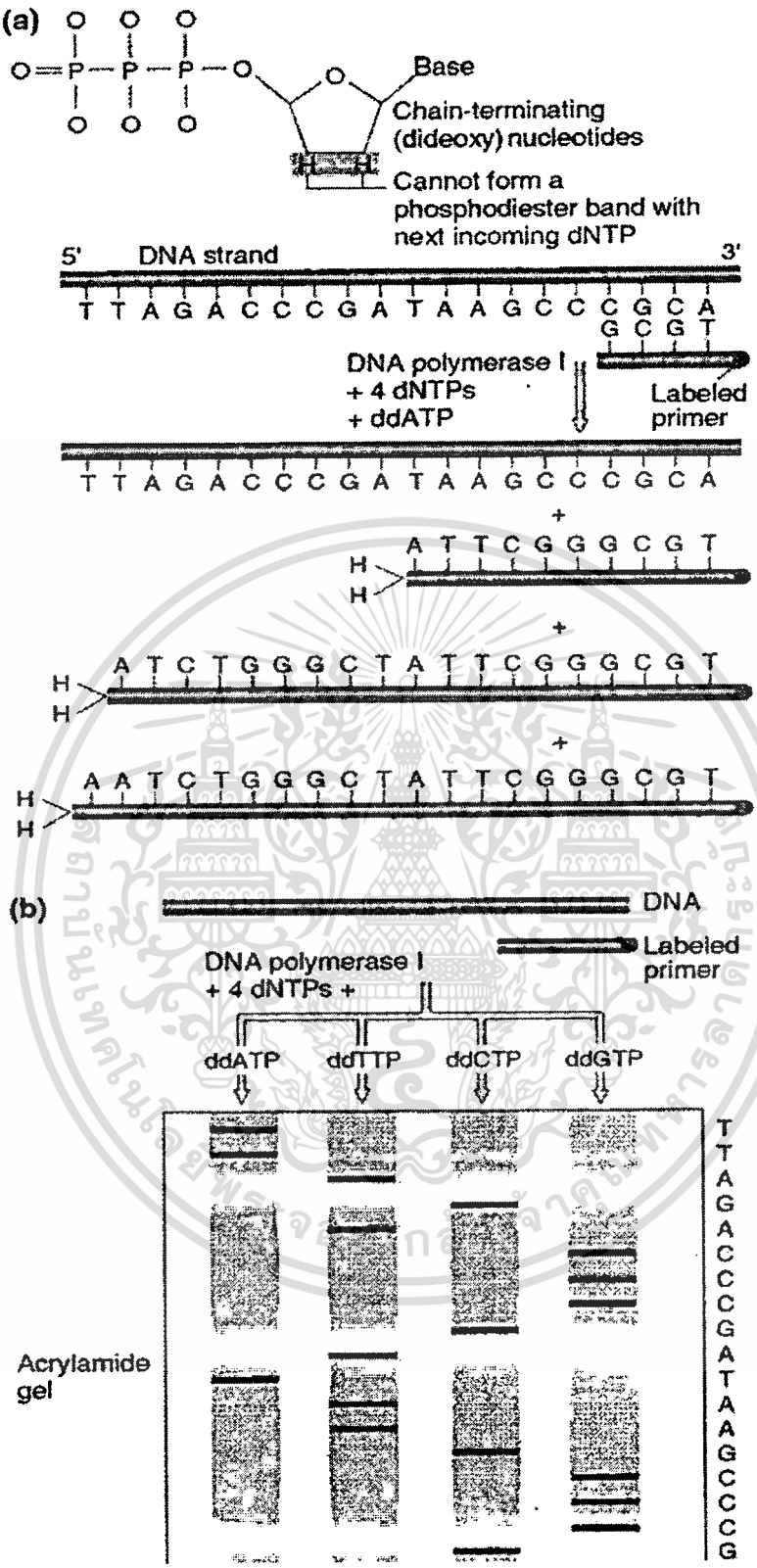
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอนั้น นับได้ว่าเป็นเทคนิคที่สำคัญที่สุดอีกเทคนิคหนึ่งสำหรับการศึกษาทางอณูชีววิทยา เนื่องจากทำให้เราทราบลำดับเบสที่ถูกต้องของดีเอ็นเอ อีกทั้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการศึกษาอนุกรมวิทยา (taxonomy) และการศึกษาทางพันธุกรรมประชากรศาสตร์ (population genetic) ด้วยเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาลำดับเบสนี้เริ่มขึ้นในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมา โดยมีการพัฒนาเทคนิคซึ่งมีความแตกต่างกันอยู่ 2 วิธีคือ

1) Dideoxy chain termination method โดย F. Sanger และ A.R. Coulson วิธีการนี้อาศัยหลักการการเลียนแบบกระบวนการ DNA replication คือการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะนำนิวคลีโอไทด์ปกติ (dGTp, dATP, dCTP และ dTTP) และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีมาสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สำหรับนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากมักใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น แต่ที่นิยมใช้คือ (^{32}P-dATP) การสิ้นสุดของดีเอ็นเอสายใหม่จะสิ้นสุดในตำแหน่งของ dideoxy nucleotide ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหมู่ 3' OH ทำให้ไม่สามารถสร้างพันธะ phosphodiester กับนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไปได้ ดังนั้นวิธีการดังกล่าวจึงเรียกว่า dideoxy chain termination

ต่อมาหลักการนี้ได้มีการพัฒนามาเป็นเครื่อง automated DNA sequencing โดยเครื่อง automated นี้ได้ใช้หลักการพื้นฐานเช่นเดียวกับ dideoxy chain termination แต่มีข้อแตกต่างกันบางประการ ได้แก่

- เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้จะเป็นชนิดทนความร้อน
- ใช้เทคนิค cycle sequencing ซึ่งอาศัยหลักการของ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturing, annealing และ extension
- ใช้สารเรืองแสงซึ่งมีอันตรายน้อยกว่าในการติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสารเรืองแสงนี้จะเรืองแสงของสีในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ กันสำหรับเบส 4 ตัว คือ G, A, T และ C เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์
- วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยเครื่อง automated DNA sequencing ใช้สารเลเซอร์เป็นพลังงานให้แก่สารเรืองแสง โดยมีเครื่องตรวจวัดความเข้มข้นของสารเรืองแสงส่งข้อมูลไปให้เครื่องคอมพิวเตอร์วิเคราะห์แล้วรายงานเป็นลำดับของดีเอ็นเอ (สุรางค์ นุชประยูร และคณะ. 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

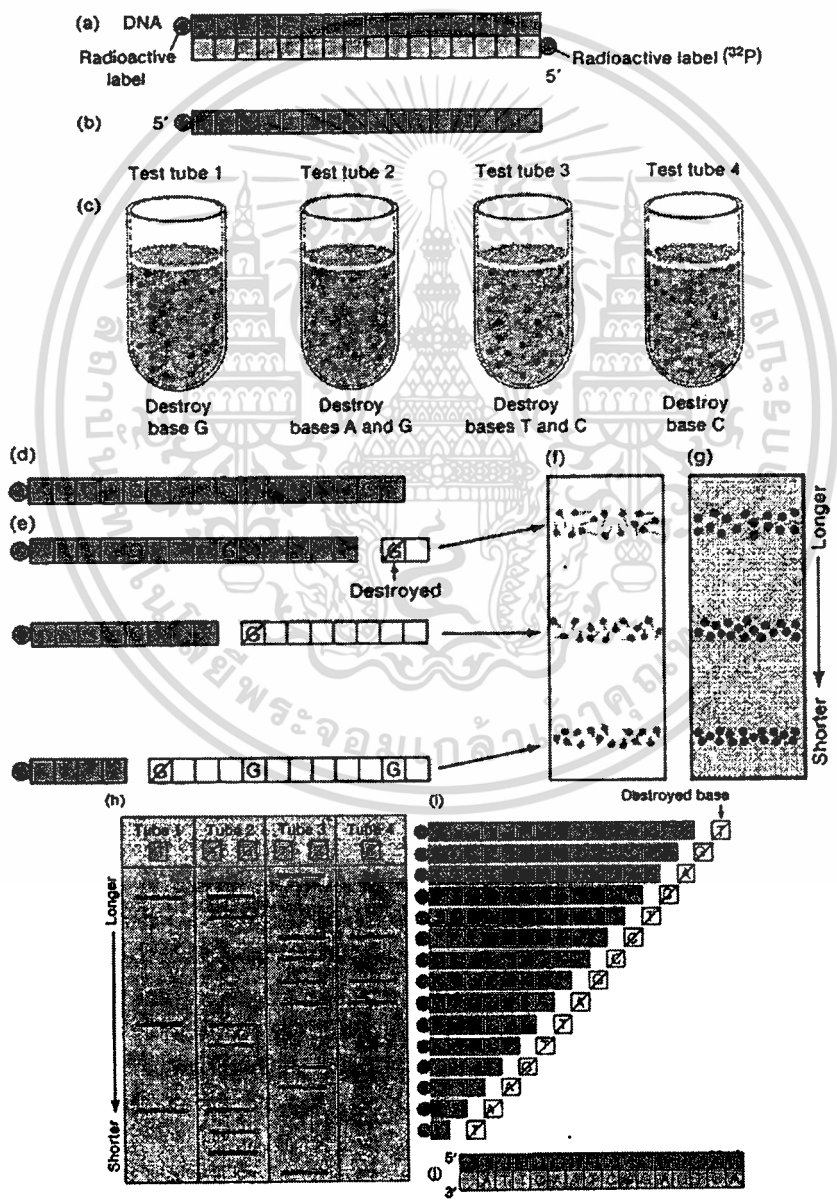


ภาพที่ 2.8 แสดงหลักการและขั้นตอนการทำ sequencing โดยวิธี chain termination method

ที่มา: สุรางค์ นุชประยูร และคณะ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) The Maxam-Gilbert Method ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย A. Maxam และ W. Gilbert โดยหลักการของการหาลำดับเบสของวิธีนี้เป็นการตัดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เฉพาะต่อนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว โดยสารเคมีจะไปปรับเปลี่ยนเบสของดีอ็นเอ เช่น การเติม methyl group ในตำแหน่งของลำดับเบสจำเพาะบางตำแหน่ง เบสที่ถูกปรับเปลี่ยนจะถูกทำลายไปเหลือเพียง deoxyribose ซึ่งจะถูกทำลายต่อไปจนทำให้เกิดการขาดของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของเบสดังกล่าว ซึ่งสามารถติดตามดีเอ็นเอโดยการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอสามารถแยกได้โดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis และอ่านลำดับเบสจากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม X-ray (สุรางค์ นุชประยูร และคณะ. 2546)



ภาพที่ 2.9 แสดงหลักการและขั้นตอนการทำ sequencing โดยวิธี Maxam-Gilbert

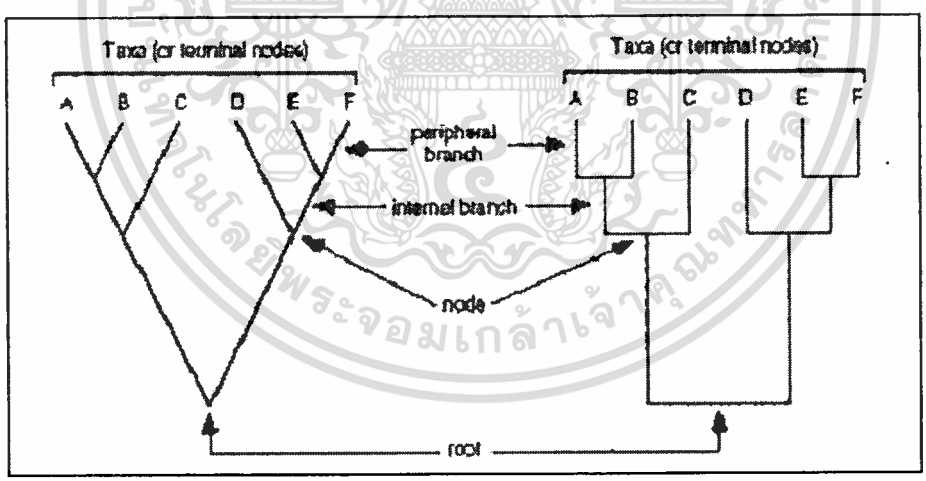
ที่มา: สุรางค์ นุชประยูร และคณะ (2546)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6 การสร้างวงศ์วานทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic)

การสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetics) คือ การศึกษาวิธีการสร้างแผนภูมิรูปต้นไม้ (tree diagram) เพื่อแสดงให้เห็นถึงแนวทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นดำเนินตามรูปแบบของการพัฒนาแตกกิ่งก้านสาขา (branching) และสิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการก็จะมีสืบทอดสายพันธุ์มาจากบรรพบุรุษร่วมที่ใกล้กันที่สุด (most recent common ancestor) เป้าหมายของการศึกษาทางวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeneticist) จึงเป็นการพยายามที่จะบอกให้ได้ถึงรูปแบบของการแตกกิ่งก้านสาขาดังกล่าว แล้วเสนอออกไปในรูปของแผนภูมิรูปต้นไม้ หรือที่เรียกว่า แผนภูมิเคลโดแกรม (cladogram) ที่บอกให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงจากสิ่งมีชีวิตที่ดั้งเดิมกว่าไปสู่สิ่งมีชีวิตที่พบอยู่ในปัจจุบัน (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545 ก)

แผนภูมิเคลโดแกรมจะแสดงในรูปของแผนภูมิการแตกกิ่งก้าน หรือแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree หรือ phylogeny) แต่ละแผนภูมิจะประกอบไปด้วย (ภาพที่ 2.9) ส่วนที่เป็นกิ่ง (branches) และ ส่วนที่เป็นปม (nodes) มีบริเวณที่เป็นกิ่งภายใน (internal branches) ซึ่งจะเป็นกิ่งที่เชื่อมต่อกับกิ่งอื่นๆ ที่ปมภายใน (internal nodes) และมีบริเวณที่เป็นกิ่งริมด้านนอก (peripheral branches) ซึ่งจะเป็นกิ่งที่เชื่อมระหว่างปมภายในกับปมปลาย (terminal nodes) ซึ่งเป็นตำแหน่งของชนิดของสิ่งมีชีวิต (นิยมเรียกว่า แท็กซ่า (taxa)) (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545 ข)

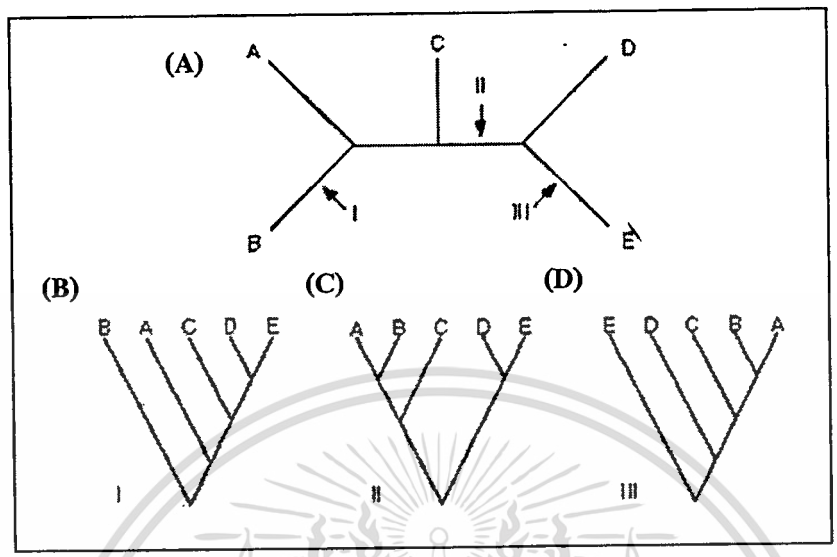


ภาพที่ 2.10 แสดงส่วนประกอบของแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ
ที่มา: เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ (2545 ข)

แผนภูมิต้นไม้เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการนั้นโดยมากจะเสนอในรูปแผนภูมิต้นไม้ได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบที่ถูกตรึงรากแล้ว (rooted trees) คือ มีปมใดปมหนึ่งที่ถูกกำหนดให้เป็นรากโดยแผนภูมิต้นไม้ที่ถูกตรึงรากแล้วจะบอกความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการโดยชี้ให้เห็นถึงทิศทางการเกิดวิวัฒนาการ และแบบที่ยังไม่ถูกตรึงราก (unrooted trees) โดยแผนภูมิต้นไม้ที่ยังไม่ถูกตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

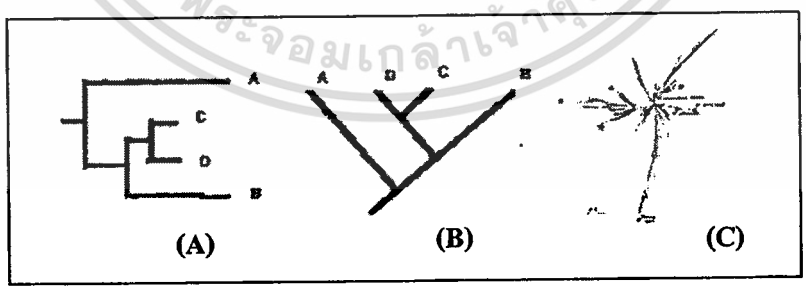
รากนั้นจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางวงศ์วานวิวัฒนาการโดยที่ไม่ได้บอกถึงทิศทางการเกิดวิวัฒนาการ (root) (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2547)



ภาพที่ 2.11 แสดงแผนภูมิต้นไม้แบบยังไม่ได้ตรึงราก (unrooted tree; รูป A) และที่ตรึงรากแล้ว (rooted tree; รูป B, C และ D)

ที่มา: เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ (2547)

สำหรับการวาดแผนภูมิต้นไม้เชิงวงศ์วานวิวัฒนาการนั้น สามารถทำได้หลายแบบ โดยที่ยังคงความหมายทางวิวัฒนาการเดิมอยู่ ตัวอย่างเช่น วาดเคลโดแกรมในรูปทรงแบบเหลี่ยมฉาก (rectangular) หรือ แบบเอียง (slanted) หรือ แบบวงกลม (circular) (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2547)



ภาพที่ 2.12 แสดงแผนภูมิต้นไม้ในรูปทรงแบบเหลี่ยมฉาก (rectangular; รูป A) แบบเอียง (slanted; รูป B) และแบบวงกลม (circular; รูป C)

ที่มา: เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์ (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.7 การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

Nei and Kumar (2000) ได้อธิบายการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมไว้ดังนี้

1) การจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (Alignment of DNA sequence) ให้จัดเรียง (Align) ลำดับของข้อมูลทั้งหมดจนกระทั่งมีระดับของความเหมือนกัน (Homology) สูงสุด

2) การสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Tree reconstruction) หลังจากจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างสายดีเอ็นเอ จากนั้นจึงทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

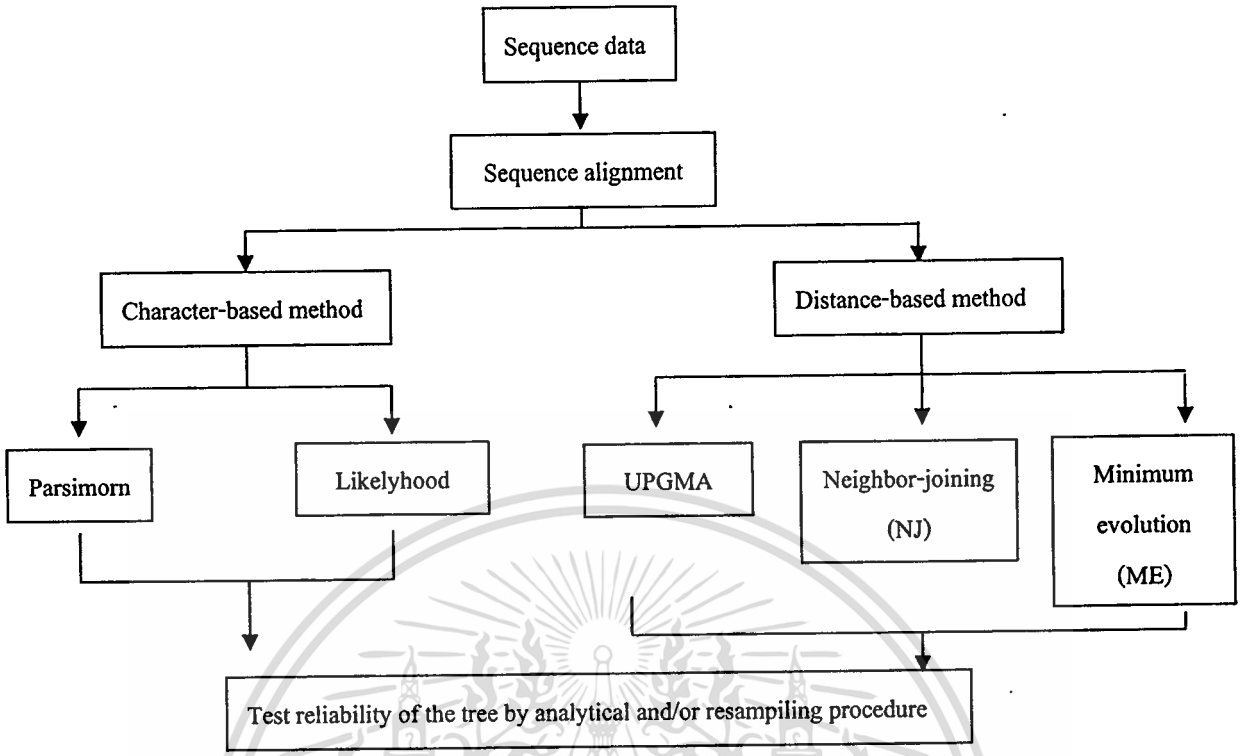
3) การตรึงรากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (Rooting the tree)ในขั้นตอนการค้นหาแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการนั้นแผนภูมิที่คำนวณได้จะอยู่ในรูปของแผนภูมิที่ไม่ได้ถูกตรึงรากก่อน จากนั้นจึงค่อยถูกตรึงราก (Rooted) หลังจากแผนภูมิที่สั้นที่สุดที่เป็นไปได้ทั้งหมดถูกค้นพบแล้ว โดยปม (Node) ของแผนภูมิที่ใกล้เคียงกับบรรพบุรุษร่วมของ Taxa ทั้งหมดที่ศึกษาจะถูกนำมาใช้เป็นจุดตรึงราก ขั้นตอนดังกล่าวจะทำให้ทิศทาง (Polarity) ของสมาชิกในกลุ่มที่ศึกษาซึ่งจะใช้สิ่งมีชีวิตอีกหนึ่ง Taxa หรือมากกว่านั้นที่เป็นกลุ่มพี่กลุ่มน้อง (Sister group) กันกับTaxa ที่กำลังศึกษาอยู่มาใส่เพิ่มเข้าไปในชุดข้อมูลเพื่อให้เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (Outgroup) ที่บอกโปรแกรมคอมพิวเตอร์ให้ทราบถึงตำแหน่งที่เหมาะสมในการตรึงราก จากนั้นจึงคำนวณหาแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมใหม่

4) Evolution distance (E_p) เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Homologus โดยที่ความยาวของ Branches ที่แยกสิ่งมีชีวิตออกจากกันเป็นสัดส่วนกับ E_p เช่น ถ้าสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันหรือมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงทำให้ระยะทาง (Distance) ในแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมสั้น

5) Bootstrap value เป็นค่าสนับสนุนทางสถิติในการทดสอบความน่าเชื่อถือของการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการทดลองสับเปลี่ยนค่าข้อมูลโดยการแทนที่ กล่าวคือ เริ่มจากการสุ่มดึงข้อมูลลักษณะบางอย่างออกจากตาราง Matrix แล้วทำให้ Matrix นั้นมีขนาดเท่าเดิมโดยการเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลลักษณะอื่นขึ้นมาแทนที่ จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิใหม่ขึ้นมา หลังจากที่ทำการทดลองดังกล่าวไปหลายๆ รอบ แผนภูมิทั้งหมดที่สร้างขึ้นมาใหม่นี้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความน่าเชื่อถือที่ Branches ต่างๆ บนแผนภูมิ ซึ่งโดยทั่วไปค่าที่มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ วิธี Bootsrap test ออกแบบโดย Felsenstein และเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการอ้างอิงในแผนภูมิของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ซึ่งวิธีการสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแบ่งได้ 2 ชนิดใหญ่ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของข้อมูล ดังแสดงไว้ในภาพที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



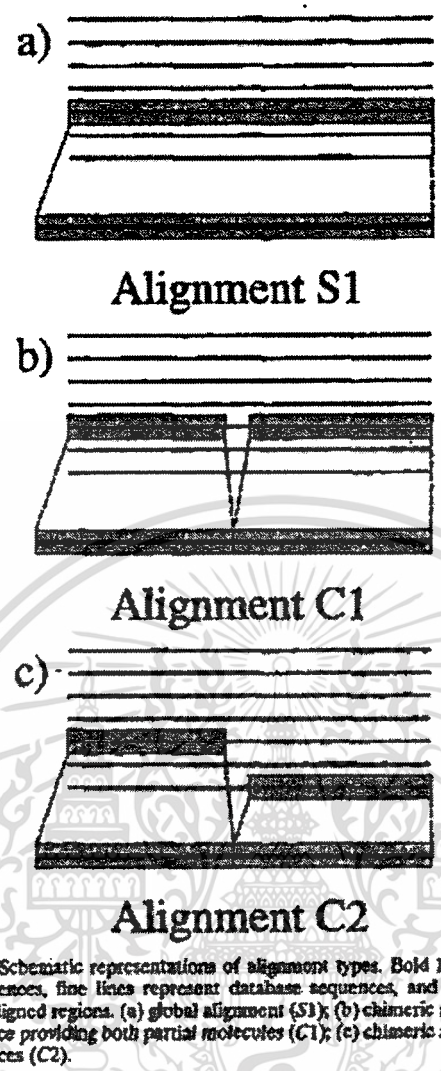
ภาพที่ 2.13 ขั้นตอนการสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม

ที่มา: Nei and Kumar (2000)

2.4.8 ลักษณะการเกิด Chimeric sequence

นับตั้งแต่มีการพัฒนาเทคนิคการศึกษาแบคทีเรียโดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และได้เปลี่ยนมาใช้การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจากแบคทีเรียทั้งหมดจากแหล่งที่สนใจศึกษานั้น ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้การเพิ่มปริมาณในส่วนของ 16S rDNA โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ซึ่งไพรเมอร์อาจจะไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของลำดับ 16S sequencing ของแบคทีเรียที่ต่างชนิดกันแล้วเกิดการข้ามสายพันธุ์มาจับคู่กันได้ ซึ่งจะทำให้เกิดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น Chimeric sequence รูปแบบของการเกิด Chimeric sequence นั้นมีรูปแบบดังนี้ ภาพที่ 2.14a เป็นรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่เชื่อมต่อกันได้ดี ภาพที่ 2.14b เป็นรูปแบบ Chimeric sequence ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่เชื่อมต่อกันไม่สมบูรณ์ ภาพที่ 2.14c เป็นรูปแบบ Chimeric sequence ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียต่างชนิดกัน (Komatsoulis and Waterman. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Schematic representations of alignment types. Bold lines represent query sequences, fine lines represent database sequences, and shaded boxes represent aligned regions. (a) global alignment (*S1*); (b) chimeric alignment with one sequence providing both partial molecules (*C1*); (c) chimeric alignment with two sequences (*C2*).

ภาพที่ 2.14 แสดงรูปแบบของการเกิด Chimeric sequence

ที่มา: Komatsoulis and Waterman (1997)

2.5 โปรแกรมชีวสารสนเทศในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต จะเป็นการบอกถึงประวัติทางวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตหรือกลุ่มสปีชีส์นั้นๆ ในปัจจุบันลำดับของสารพันธุกรรมโมเลกุลขนาดใหญ่เช่น สายดีเอ็นเอหรือโปรตีน เป็นข้อมูลที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ของสิ่งมีชีวิต การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลจะประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ เริ่มต้นจากการเปรียบเทียบลำดับข้อมูลระหว่างนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับข้อมูลของสายดีเอ็นเอ (Alignment) เพื่อสร้างแบบจำลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการสร้างแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และวิเคราะห์แผนภูมิที่ได้ (ปรีชา ประเทพา. 2543; Durbin *et al.* 2001; Gibas and Jamebeck. 2001) ซึ่งโปรแกรมชีวสารสนเทศที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งได้ ดังนี้

1) สำหรับการจัดการข้อมูลโดยทั่วไป ได้แก่ DNASIS, GENETYX

2) สำหรับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันอย่างง่าย (Homology search) จากฐานข้อมูลทางอินเตอร์เน็ต ได้แก่ BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)

3) สำหรับการทำ Alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ CLUSTAL W, Clustal X, DNASIS, GENETYX

4) สำหรับวิธีการวิเคราะห์การคำนวณ Algorithyms ได้แก่วิธี Distance matrix เช่น Unweighted pair-group method using arithmetric averages (UPGMA), Minimum evolution (ME), Neighbor-joining (NJ) หรือวิธี Maximum parsimony (MP) หรือวิธี Maximum likelihood (ML) ตัวอย่างโปรแกรมคำนวณ ได้แก่ MEGA, DNASIS, GENETYX, PHYLIP, PAUP เป็นต้น

2.5.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

BLAST หรือ Basic Local Alignment Search Tool คือโปรแกรมที่ทำหน้าที่ในการตรวจสอบความเหมือนหรือการซ้ำกัน(identity and similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลทั้งหมดใน GenBank (http://www.ncbi.hlm.nih.gov/Blast) (สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2547) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการออกแบบโปรแกรม ให้เลือกใช้งานตามแต่วัตถุประสงค์ของงานที่ต้องการศึกษา โดย blast ที่นิยมเลือกใช้งาน ได้แก่ blastn, blastp, blastx, tblastn และ tblastx ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันดังต่อไปนี้

- blastn ใช้สำหรับเปรียบเทียบ nucleotide sequence ที่เราสนใจกับ sequence ในฐานข้อมูล

- blastp ใช้สำหรับเปรียบเทียบ protein sequence ที่เราสนใจกับ sequence ในฐานข้อมูล

- blastx ใช้สำหรับเปรียบเทียบข้อมูลของ protein จากฐานข้อมูล กับข้อมูลที่มีโดยใช้ข้อมูลของ translated nucleotide ที่ต้องการเปรียบเทียบลงไป

- tblastn ใช้สำหรับเปรียบเทียบข้อมูลของ translated nucleotide จากฐานข้อมูล กับข้อมูลที่มีโดยใช้ข้อมูลของ protein ที่ต้องการเปรียบเทียบลงไป

- tblastx ใช้สำหรับเปรียบเทียบข้อมูลของ translated nucleotide จากฐานข้อมูล กับข้อมูลที่มีโดยใช้ข้อมูลของ translated nucleotide ที่ต้องการเปรียบเทียบลงไป (Supavadee. 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 Ribosomal Database Project (RDP-II)

RDP-II เป็นฐานข้อมูลที่ให้บริการเกี่ยวกับการจัดแบ่งกลุ่มของสิ่งมีชีวิต (http://rdp.cme.msu.edu/) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal RNA (rRNA) โดยที่ RDP-II จะรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์มาจากฐานข้อมูลสากล ได้แก่ GenBank, EMBL และ DDBJ มาทำการจัดเรียงข้อมูลและจำแนกหมวดหมู่ (Taxonomy) (Maidak *et al.* 1999) และในปี 2007 กลุ่มของ Cole *et al.* ได้รายงานว่า RDP-II (Release 9.42) มีข้อมูลของแบคทีเรียที่ได้รับการจัดเรียงและจำแนกหมวดหมู่แล้วทั้งสิ้น 262,030 sequences ในจำนวนนี้แบ่งเป็นแบคทีเรียที่มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวน 84,442 sequences และอีก 177,588 sequences มาจากแบคทีเรียที่อยู่ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป ซึ่งจากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดนี้พบว่ามีความยาวใกล้เคียงกับ full-length (≥ 1200 bp) อยู่จำนวน 101,877 sequences และ Wang *et al.* (2007) ได้รายงานว่า ตั้งแต่เดือนมกราคม 2007 เป็นต้นมา ฐานข้อมูล RDP-II มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นเฉลี่ยกว่า 5,000 sequences ต่อเดือน และปัจจุบันฐานข้อมูล RDP-II (Release 9.60) ได้เพิ่มข้อมูลล่าสุดเป็น 511,847 sequences ในวันที่ 22 เมษายน 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคและการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์วิเคราะห์ผล

3.1.1 การเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน (Rumen Fluid)

เก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน ที่ได้รับการเจาะกระเพาะรูเมนจำนวน 1 ตัว โดยสุ่มเก็บทั้งหมด 3 ครั้ง จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลองภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากนั้นใช้ผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อกรองแยกเศษอนุภาคของอาหารออก แยกเก็บส่วนที่เป็นของเหลวออกมาวิเคราะห์

3.1.2 การสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารและการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหยาบ และอาหารข้นที่ใช้ในการเลี้ยงโคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน ที่ได้รับการเจาะกระเพาะรูเมน โดยตัวอย่างของอาหารหยาบ (หญ้าขนและหญ้าพื้นเมือง ขึ้นตามธรรมชาติ) และอาหารข้น (อาหารทางการค้าผสมสำเร็จรูป เบทาโกร 004) จะถูกนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง และนำมาบดผ่านตะแกรงที่มีขนาด 1 มิลลิเมตร เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM) โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) และเถ้า (ash) ตามวิธีการของ AOAC (1985) และวิเคราะห์ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง (neutral detergent fiber, NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid detergent fiber, ADF) และลิกนินที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid detergent lignin, ADL) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) นำผลที่ได้มาทำการหาปริมาณโภชนะที่สัตว์ได้รับในแต่ละวัน ซึ่งคำนวณจากส่วนประกอบของโภชนะในอาหารสัตว์ทดลองได้รับกับสัดส่วนของอาหารข้นต่ออาหารหยาบ ซึ่งโคตัวดังกล่าวได้รับ 3 กิโลกรัม ต่อ 12 กิโลกรัม โดยการหาค่า เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส คำนวณตามวิธีการของ Van Soest (1983) (NDF – ADF = Hemicelluloses, ADF – ADL = Cellulose และ Hemicelluloses + Cellulose = เยื่อใยรวม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคและการทำจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมน (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคด้วยวิธีการดัดแปลงของ An *et al.* (2005) ร่วมกับวิธีการ freezing/thawing ของ Tajima *et al.* (1999) โดยนำตัวอย่างส่วนของเหลวจากกระเพาะรูเมน 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 2x Lysis buffer [100mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM EDTA (pH 8.0),100mM sodium phosphate (pH 8.0), 1.5M NaCl และ 1 เปอร์เซ็นต์ CTAB] 500 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สลับกับการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จนครบ 3 รอบ เพื่อทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ให้เซลล์แตกง่ายขึ้น นำมาเติม ProteinaseK (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ Lysozyme (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นเติม 20 เปอร์เซ็นต์ SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที นำไปปั่นหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่เก็บได้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาเติม Isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่เก็บได้ เขย่าให้เข้ากันเบาๆ (จะเห็นสายดีเอ็นเอ) จากนั้นนำไปปั่นหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา10 นาที เท Isopropanol ทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งส่วน 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ทิ้งไว้ให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรสเจล1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1x Tris-boric-EDTA (TBE buffer, ภาคผนวก ก) ที่ความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hind*III แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำ 5 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน (Gel documentation) นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Wizard® DNA Clean-Up System ตามวิธีการที่ปรากฏในคู่มือของบริษัท Promega (USA.) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ โดยเริ่มต้นจากเติม 1 มิลลิลิตร Wizard® DNA Clean-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

up Resin ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นติดไซริงค์ขนาด 3 มิลลิลิตร (ดึง Plunger ออกจากตัวไซริงค์ก่อน) กับ Minicolumn และใช้หลอดขนาด 2 มิลลิลิตร รอง Minicolumn ไว้ จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกับ Wizard® DNA Clean-up Resin ลงในไซริงค์ขนาด 3 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ ต่อมาใช้ Plunger ค่อยๆ ดันสายละลายลงดีเอ็นเอจะเกาะติดกับซิลิกาใน Minicolumn ส่วนของเหลวจะไหลออก ทิ้งส่วนของเหลวนั้นไป แล้วเติม 80 เปอร์เซ็นต์ Isopropanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างดีเอ็นเอ 2 ครั้ง (ก่อนที่จะเติม Isopropanol ถอดไซริงค์ ออกจาก Minicolumn ก่อน แล้วจึงดึง Plunger ออก หลังจากนั้นจึงติดไซริงค์กับ Minicolumn เข้าไปใหม่ เพื่อป้องกันสารละลายภายในย้อนกลับ) ถอดไซริงค์ออกจาก Minicolumn แล้วนำ Minicolumn ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ของเหลวส่วนที่ตกค้างอยู่ใน Minicolumn ออกให้หมด จากนั้นนำ Minicolumn ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ลงใน Minicolumn ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะสารละลายดีเอ็นเอที่จับอยู่กับเมมเบรน แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณ และคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ แล้วเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนเพื่อนำไปใช้งานต่อไป

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยก

เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260, 280 และ 230 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop ND1000) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) สำหรับดีเอ็นเอ 230 นาโนเมตร (A_{230}) สำหรับกรดฮิวมิค และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับโปรตีนตามลำดับ (Ray *et al.* 2006) คุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} และ A_{260}/A_{230} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดฮิวมิคที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกตามลำดับ ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.65-1.85 (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536)

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.3.1 การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 16S rDNA จากประชากรรวมของแบคทีเรียทั้งหมดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยเครื่อง PCR-thermal cycler (MJ Research) โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ BSF8/20 [5′ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3′] และ REVB [5′ GGTTACCTTGTTACGACTT 3′] (Kanokratana *et al.* 2004) ซึ่งเป็น universal primer ของแบคทีเรีย ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 4 reactions ต่อ 1 ตัวอย่าง (25 ไมโครลิตรต่อ reaction) ทำให้ได้ผล

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตทั้งหมด 100 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.5	1x
25 mM $MgCl_2$	2.0	2 mM
10 mM dNTP	1	400 µM
10 µM Primer BSF8/20	1	0.4 µM
10 µM Primer REVB	1	0.4 µM
5 U/µl Taq DNA polymerase	0.25	0.05 U
100 ng/µl DNA template	1	
น้ำกลั่น	16.25	
รวม	25	

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เริ่มจากการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.1 ในการทำพีซีอาร์ในแต่ละครั้งจะทำการผสมส่วนประกอบทั้งหมด (Master mixture) ยกเว้นดีเอ็นเอต้นแบบลงในหลอดเดียวกันในปริมาณที่พอเพียงกับจำนวนตัวอย่างก่อน แล้วจึงแบ่งใส่หลอดพีซีอาร์ ในแต่ละหลอด จากนั้นจึงเติมดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละตัวอย่างลงไป นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาภายในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
3) Primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4) Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที
   ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ
5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
6) เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (hold)

ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลโดยกระแสไฟฟ้า ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis ; Gel Mate 2000) ด้วยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ผ่านสารละลายตัวกลาง 1xTBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นย้อมเจลด้วยโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน (Gel documentation)

3.3.2 การแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอะกาโรสเจล

เมื่อทำการตรวจสอบพบดีเอ็นเอที่มีผลผลิตตามขนาดที่ต้องการ (ประมาณ 1500 bp) แล้ว จึงทำการตัดเจลแยกแถบดีเอ็นเอที่มีความยาวตามที่ต้องการออกจากเจล จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) โดยการเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (เช่น เจลน้ำหนัก 100 mg เติม buffer QG ปริมาตร 300 ไมโครลิตร) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกระทั่งเจลละลายหมด จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน QIAquick spin column ที่สวมทับด้วยหลอดเก็บปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปั่นหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ให้ของเหลวผ่าน column ไปอยู่ในหลอด แล้วเทของเหลวในหลอดทิ้งเนื่องจากดีเอ็นเอจะจับอยู่ที่เมมเบรน ล้างดีเอ็นเอที่เกาะอยู่ที่ column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้าย QIAquick spin column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ จากนั้นชะดีเอ็นเอที่อยู่บนเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ EB (Elution buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสรอใช้งานต่อไป

ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเจลด้วยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน และเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

3.4 การถ่ายทอดยีนและตรวจสอบโคลนที่ได้

3.4.1 การเชื่อมต่อโมเลกุลดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่แยกได้จากเจลมาเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ pTZ57R/T Vector (Fermentas) โดยใช้อัตราส่วนในการเชื่อมต่อดังนี้ T4 DNA Ligase (Fermentas) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, พลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (5 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10x Ligation buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, และดีเอ็นเอเป้าหมาย (Purified PCR fragment) ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ในปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยที่เวคเตอร์ดังกล่าวส่วนปลาย 5' มีการเติมของเบสไทมีน (Thymine) และดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (PCR product) จากการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas) ที่ส่วนปลาย 3' จะมีการเติมเบสอะดีนีน (Adenine) ทำให้เป็นเบสคู่สมกับปลายของ pTZ57R/T Vector ทำให้สามารถเชื่อมต่อเข้ากันได้โดยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA Ligase

3.4.2 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

นำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* DH5α โดยแบคทีเรียเจ้าบ้าน ถูกทำให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอจากภายนอก (competent cell) (ภาคผนวก ก.) ด้วยวิธีการของ Inoue *et al.* (1990) ทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่ competent cell (*E.coli* DH5α) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอสายผสมจากข้อ 3.4.1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากัน แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ย้ายไปแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไป spread ลงบน LB plate ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 0.8 โมลาร์ isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) และ 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ของ 5-bromo-4- chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ต่อมาคัดเลือกโคโลนีที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene ด้วยวิธี blue/white screening ซึ่งโคโลนีสีขาวเป็นโคโลนีเป้าหมายที่ถูกแทรกสอดด้วย 16S rRNA gene

3.4.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายในพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากโคโลนี (Colony PCR)

นำโคโลนีทั้งหมดที่ได้จาก 16S rDNA rumen fluid library มาตรวจสอบโคลนด้วยการทำเทคนิคพีซีอาร์จากโคโลนี โดยเขี่ย (pick up) โคโลนี และให้หมายเลขประจำโคโลนีเก็บไว้เป็น master plate และใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) สำหรับทำเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ M13F primer [5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'] และ M13R primer [5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'] ซึ่งส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา PCR แสดงดังตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2	1x
25 mM $MgCl_2$	1.6	2 mM
10 mM dNTP	0.4	200 µM
10 µM Primer M13F	0.4	0.2 µM
10 µM Primer M13R	0.4	0.2 µM
5 U/µl Taq DNA polymerase	0.1	0.025 U
น้ำกลั่น	15.1	
รวม	20	

โดยทำการกำหนดอุณหภูมิและเวลาภายในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3) Primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที

4) Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 50 วินาที

ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 29 รอบ

5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6) เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (hold)

ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้เทคนิคการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในเจลโดยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis ; Gel Mate 2000) ด้วยอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer เป็นเวลา 40 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA Ladder จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่องเจลดอคคิวเมนเทชัน (Gel documentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

3.5.1 การวิเคราะห์และการเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้

ทำการตรวจยืนยันชิ้นยีน16S rRNA ซึ่งถูกแทรกสอดสู่พลาสมิดเวคเตอร์ด้วยการวิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I (GCG↓C) (Fermentas) และ *Hha*I (GT↓AC) (Fermentas) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำปฏิกิริยาร่วมกันโดยในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x Buffer Tango (Fermentas) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร), เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร), ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จากโคโลนี (Colony PCR) ในข้อที่ 3.4.3 ปริมาตร3 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 -16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ low melting agarose ใน TBE buffer เป็นเวลา 90 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel documentation และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม GelComparII Cluster Analysis Module (Applied Maths) เพื่อช่วยในการจัดกลุ่มเบื้องต้นในการคัดเลือกตัวแทนของดีเอ็นเอไปสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.5.2 การสกัดพลาสมิด

นำตัวแทนของโคลนที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3.5.1 มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มโดยใช้เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เป็นอาหารเหลวทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) โดยเติม Resuspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วเติม Lysis Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม Neutralization Solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดของเหลวใสใส่ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม Wash Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง) เทของเหลวทิ้งและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย GeneJET™ spin column ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตัวแทนของโคลนที่ได้จากการคัดเลือกและนำมาเลี้ยงในอาหาร LB ในข้อ 3.5.2 ข้างต้น นำมาแบ่งทำ Glycerol stock โดยใช้ 30 เปอร์เซ็นต์ Glycerol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวแทนของโคลนที่เลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้สำรองใช้งานในกรณีที่โคลนที่ได้จากการคัดเลือกไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

3.6.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรีย

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน โดยการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งเป็นข้อมูลดิบที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการตรวจสอบว่าเป็น Chimeric sequence หรือไม่ โดยโปรแกรม Check_Chimera ในอินเตอร์เน็ตที่ Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu/docs/chimera_doc.html) วิเคราะห์โคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียใดในฐานข้อมูล โดยนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล GenBank ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อใช้ในการแบ่งกลุ่มหรือจำแนกโคลนออกเป็น division ต่างๆ หากพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ (Stackebrandt and Goebel. 1994) จัดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับฐานข้อมูล จากนั้นทำการจัดแบ่งกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มใด โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (RDP-II) ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://rdp.cme.msu.edu/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบโดยทำการ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 (http://www.megasoftware.net/; Tamura *et al.* 2007) โดยวิธี Distance matrix ด้วย Algorithm แบบ Neighbor-joining (NJ) method และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ (Nucleotide substitution) แบบ Kimura-2-parameter model เพื่อพิจารณาถึงความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งรวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4.0 ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ซึ่งกำหนดให้แสดง Bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในต้นไม้พันธุกรรม โดยให้ชื่อตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนด้วย CF จากนั้นตามด้วยหมายเลขโคลน และใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น Out group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของโภชนะในอาหารโคเพื่อดูแนวโน้มของกลุ่มแบคทีเรียกับอาหารที่สัตว์ได้รับ และทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนจากโคที่ได้รับการเจาะกระเพาะ วิเคราะห์ปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จากนั้นได้ใช้วิธีการเพิ่มจำนวนของ 16S rRNA gene จากของเหลวในกระเพาะรูเมน แล้วโคลนยีนที่ได้เข้าในเวคเตอร์ จากนั้นนำดีเอ็นเอสายผสมถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล เพื่อจัดแบ่งกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มใด จากนั้นจัดเรียงลำดับข้อมูลของสายดีเอ็นเอ (Alignment) แล้วทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MEGA 4 ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีดังนี้ คือ

4.1 ส่วนประกอบของโภชนะในอาหาร

ศึกษาองค์ประกอบของโภชนะในอาหารที่โคได้รับ จากตัวอย่างของอาหารหยาบ ได้แก่ หญ้าขนและหญ้าพื้นเมืองขึ้นตามธรรมชาติ และอาหารข้นซึ่งเป็นอาหารทางการค้าผสมสำเร็จรูป (เบทาโกร 004) โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการประกอบสูตรอาหารสัตว์ที่ระบุไว้ข้างฉลากถุงบรรจุอาหารประกอบไปด้วย ปลาป่นและหรือเนื้อกระดูกป่น, กากถั่วเหลืองและหรือกากถั่วลิสงและหรือกากถั่วดำ, มันสำปะหลัง, กากมะพร้าว, ข้าวโพดและหรือปลายข้าวและหรือข้าวฟ่างป่น, รำสกัดน้ำมันและหรือรำละเอียดและหรือรำหยาบ, กากน้ำตาล, ไขมันสัตว์และหรือน้ำมันพืช, แคลเซียมคาร์บอเนตและหรือไดแคลเซียมฟอสเฟต, เกลือ, วิตามิน, แร่ธาตุ กรดอะมิโน, สารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์ และสารปรุงแต่งอาหารสัตว์ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของโภชนะตามวิธีการของ AOAC (1985) และ Goering and Van Soest (1970) ได้ผลดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของโภชนะในอาหารที่โคได้รับ

โภชนะ (%)	วัตถุดิบ (Feedstuffs)	
	อาหารหยาบ	อาหารข้น
CP	8.95	16.56
EE	3.69	4.87
NDF	62.77	47.31
ADF	35.41	16.17
ADL	4.14	3.97
Ash	11.57	10.69

หมายเหตุ: CP = โปรตีนหยาบ, EE = ไขมัน, NDF = เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง, ADF = เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด, ADL = ลิกนินที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด และ Ash = เถ้า

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโภชนะในอาหารที่โคเจาะกระเพาะในการทดลองครั้งนี้ได้รับพบว่า อาหารหยาบมีค่าเฉลี่ยของ โปรตีนหยาบ 8.95 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 3.68 เปอร์เซ็นต์, NDF 62.77 เปอร์เซ็นต์, ADF 35.41 เปอร์เซ็นต์, ADL 4.14 เปอร์เซ็นต์, และAsh 11.57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดว่าเป็นหญ้าที่มีคุณภาพดีเนื่องจากอยู่ใกล้บริเวณคอกสัตว์ และมีน้ำล้างคอกบางส่วนไหลลงในแปลงหญ้าใช้เป็นปุ๋ยและให้ความชุ่มชื้นแก่แปลงหญ้าด้วย โดยจะใช้หญ้าจากแปลงนี้หมุนเวียนตัดมาให้โคกินประจำ ค่าโปรตีนที่วิเคราะห์ได้พบว่าอยู่ในช่วงค่าโปรตีนเฉลี่ยของหญ้าขนและหญ้าพื้นบ้านที่ กอบแก้ว (2535) และชาญชัย (2537) ได้รายงานไว้ว่าหญ้าขนและพืชอาหารสัตว์พื้นบ้านที่พบตามธรรมชาติมีค่าโปรตีน 8.79 และระหว่าง 3 - 12 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งตามลำดับ ส่วนอาหารข้นที่สัตว์ทดลองครั้งนี้ได้รับมีค่าเฉลี่ยของ โปรตีนหยาบ, ไขมัน, NDF, ADF, ADL, และ Ash เท่ากับ 16.58, 4.87, 47.31, 16.17, 3.97 และ 10.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับฉลากบนถุงอาหารสัตว์ ที่ระบุไว้ว่า โปรตีน ไม่น้อยกว่า 16 เปอร์เซ็นต์, ไขมันไม่น้อยกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ และ Ash ไม่มากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณโภชนะที่สัตว์ได้รับในแต่ละวัน คำนวณจากส่วนประกอบของโภชนะในอาหารที่สัตว์ทดลองได้รับในตารางที่ 4.1 และปริมาณอาหารที่สัตว์ได้รับในแต่ละวันซึ่งโคได้รับสัดส่วนของอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่ประมาณ 3 กิโลกรัม ต่อ 12 กิโลกรัม (คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 20 ต่อ 80) คำนวณวิธีการของ Van Soest (1983) โดยนำส่วนประกอบของโภชนะในอาหารที่โคได้รับในส่วนอาหารข้นนำมาคูณด้วย 20 หารด้วย 100 และในส่วนของอาหารหยาบนำมาคูณด้วย 80 หารด้วย 100 จากนั้นนำผลโภชนะในอาหารข้นและอาหารหยาบที่คำนวณแต่ละค่ามารวมกันแล้วคูณด้วย 15 (ปริมาณอาหารที่ได้รับทั้งหมดในหนึ่งวัน) หารด้วยผลรวมของโภชนะที่คำนวณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของโภชนะที่สัตว์ได้รับในแต่ละวัน ซึ่งจากการคำนวณปริมาณโภชนะต่างๆ พบว่า โคได้รับ Ash 14.02 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 4.75 เปอร์เซ็นต์, โปรตีนรวม 12.87 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใยรวม 68.85 เปอร์เซ็นต์ (แบ่งออกเป็น เซลลูโลส 34.34 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 34.51 เปอร์เซ็นต์) จะเห็นได้ว่าระดับโปรตีนที่สัตว์ได้รับอยู่ในระดับที่เพียงพอสำหรับการดำรงชีพ ดังที่ NRC (1989) ได้รายงานไว้ว่าโคนมในช่วงงดการให้นมระดับโปรตีนที่เหมาะสม คือ 11 เปอร์เซ็นต์โปรตีน

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโภชนะที่โคได้รับในแต่ละวัน

โภชนะ	ปริมาณโภชนะที่ได้รับต่อวัน (%)
CP	12.87
EE	4.75
Ash	14.02
CF	68.85
- Cellulose	34.34
- Hemicelluloses	34.51

หมายเหตุ: CP = โปรตีนหยาบ, EE = ไขมัน, Ash = เถ้า และCF = เยื่อใยรวม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค

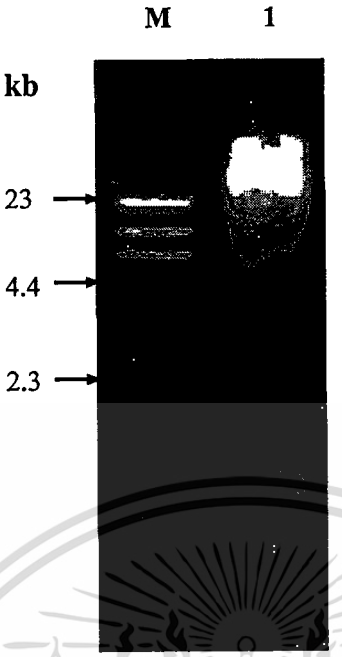
4.2.1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโค โดยดัดแปลงจากวิธีการของ An *et al.* (2005) และได้ใช้วิธีการ freezing/thawing ร่วมด้วย ซึ่งวิธีการดังกล่าว Tajima *et al.* (1999) ได้รายงานว่า ทำให้สามารถสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียพวก Gram-negative bacteria ซึ่งมีผนังเซลล์ที่หนา ออกมาได้ง่ายขึ้น จากนั้นนำมาตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 4.1) ทำการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณความเข้มข้น 2.28 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แต่เมื่อพิจารณาประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนที่ A_{260}/A_{280} พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.18 (ตารางที่ 4.3) ซึ่งวัฒนาลัย (2536) ได้รายงานว่าคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอที่ A_{260}/A_{280} หากน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลเจือปน การที่จีโนมิกดีเอ็นเอปนเปื้อนโปรตีนหรือกรดฮิวมิคอาจจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ได้ (Harry *et al.* 1999) ดังนั้นจึงต้องนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของจีโนมิกดีเอ็นเอก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง			คุณภาพดีเอ็นเอ		ปริมาณดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	
ดีเอ็นเอก่อนการทำให้บริสุทธิ์	0.61	0.45	0.23	1.18	0.75	2.28
ดีเอ็นเอหลังการทำให้บริสุทธิ์	0.32	0.58	0.28	1.84	1.42	1.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

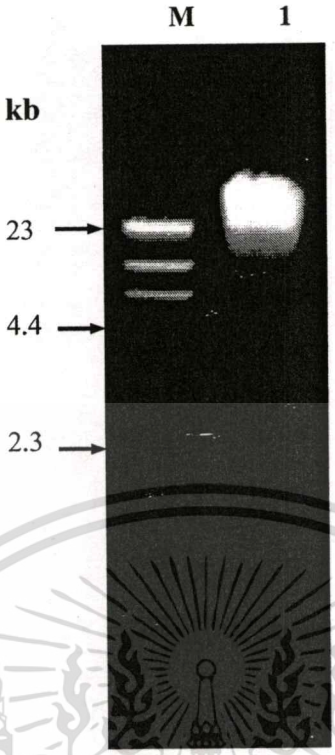


ภาพที่ 4.1 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hind*III และ Lane 1 คือจีโนมิกดีเอ็นเอจากของเหลวจากกระเพาะรูเมน

4.2.2 ผลการทำจีโนมิกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

จีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Wizard® DNA Clean-Up System (Promega) เพื่อลดการปนเปื้อนของโปรตีนหรือกรดฮิวมิคที่อาจจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 4.2) และเมื่อพิจารณาการประเมินความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีน พบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.84 (ตารางที่ 4.3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีโนมิกดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

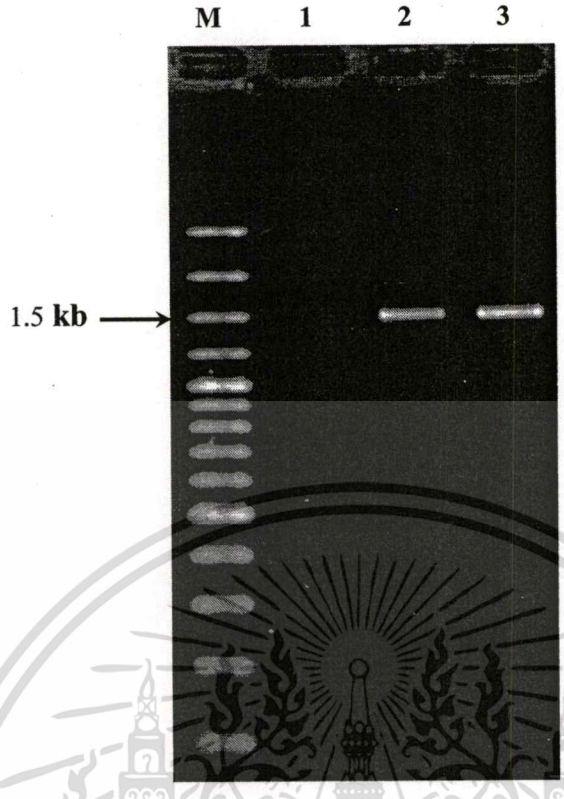


ภาพที่ 4.2 แถบจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/*Hind*III และLane 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคในตำแหน่งจำเพาะบริเวณ 16S rRNA gene โดยใช้คู่ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB (Kanokratana *et al.* 2004)ซึ่งเป็น universal primer ของแบคทีเรีย แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอตามที่ต้องการ (ประมาณ 1500 คู่เบส ดังภาพที่ 4.3) ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Kanokratana *et al.* (2004) และ Weimer *et al.* (1999) ได้แนะนำว่าการใช้ universal primer ในส่วนของ 16S rRNA gene นอกจากจะสามารถแยกความแตกต่างในส่วนของแบคทีเรียได้ชัดเจนมากขึ้นแล้ว ยังสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียได้อย่างหลากหลายอีกด้วย อย่างไรก็ตามผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ยังพบแถบของการปนเปื้อนอยู่บ้าง จึงทำการแยกแถบดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลต่อไป

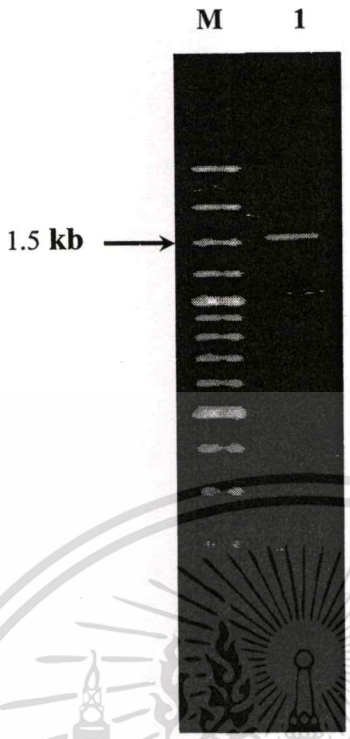
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน 16S rRNA gene แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder ส่วน Lane 1 คือ Negative control โดยใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแทนดีเอ็นเอต้นแบบ Lane 2 และ 3 คือดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทำเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

แยกแถบของดีเอ็นเอผลผลิตที่มีขนาดตามที่ต้องการด้วยการตัดออกจากเจล แล้วนำมาทำการสกัดแยกแถบดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีเพียงแถบเดียวและมีความคมชัดมากขึ้น (ภาพที่ 4.4) เหมาะสมที่จะนำไปทำการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pTZ57R/T แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* DH5α ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์จากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp DNA ladder หมายเลข และ Lane ที่ 1 คือดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์จากเจล

4.4 การถ่ายทอดยีนและตรวจสอบโคลนที่ได้

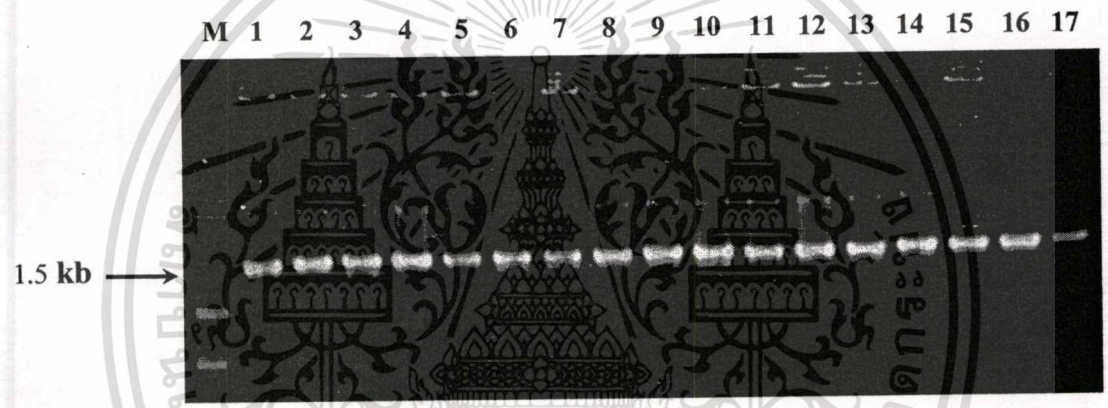
นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pTZ57R/T (Fermentas) แล้วถ่ายทอดเข้าสู่ *E.coli* DH5α จากนั้นนำโคลนที่ผ่านการคัดเลือกซึ่งหมายถึงโคโลนีสีขาวที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่ประกอบด้วย Ampicillin, X-Gai และ IPTG เนื่องจากพลาสมิด pTZ57R/T มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin และ *Lac* Z gene ที่ทำหน้าที่เป็น Selective gene โดยตำแหน่ง *Lac* Z gene เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการสอดใส่ดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นเมื่อมีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่ในส่วนของยีน *Lac* Z ตำแหน่งของยีนดังกล่าวจะถูกแยกออกจากกัน จึงสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเดิมแยกออกจากกัน โดยสารละลาย IPTG จะชักนำให้ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase เพื่อย่อย X-gal ได้เป็นตะกอนสีฟ้า แต่ถ้าโคโลนีที่มีการเชื่อมผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์จะไปหยุดการแสดงออกของ *Lac* Z gene ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543) จากนั้นนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคโลนีที่มีสีขาวมาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ที่ทำการสอดแทรกเพื่อหาโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการ (ประมาณ 1,500 คู่เบส)

4.4.1 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายในพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากโคโลนี (Colony PCR)

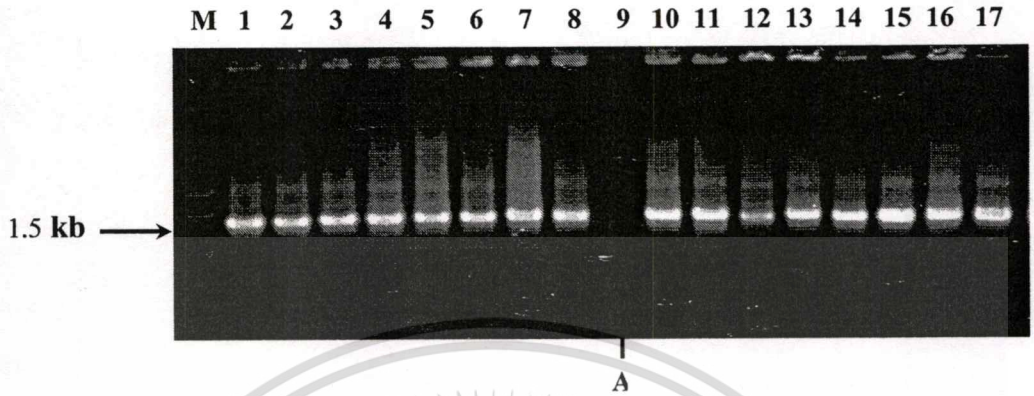
นำโคลนทั้งหมดจำนวน 297 โคลนที่ได้จากการทำ16S rDNA clone library จากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคมาตรวจสอบด้วยการทำเทคนิค Colony PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ M13F และ M13R เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่สอดแทรกเข้าไป ซึ่งหากเป็นโคลนที่ได้รับการสอดแทรกก็จะพบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มและชัดเจนเกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ซึ่งแสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค Colony PCR แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 40 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน100bp DNA ladder และ Lane ที่ 1 ถึง 17 เป็นดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทำเทคนิค Colony PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หากเป็นโคลนที่ไม่ได้รับการสอดแทรกจะเห็นว่าไม่พบแถบของดีเอ็นเอเกิดขึ้น (ตำแหน่ง A ในภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค Colony PCR แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 40 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดยตำแหน่ง A เป็นตำแหน่งที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น

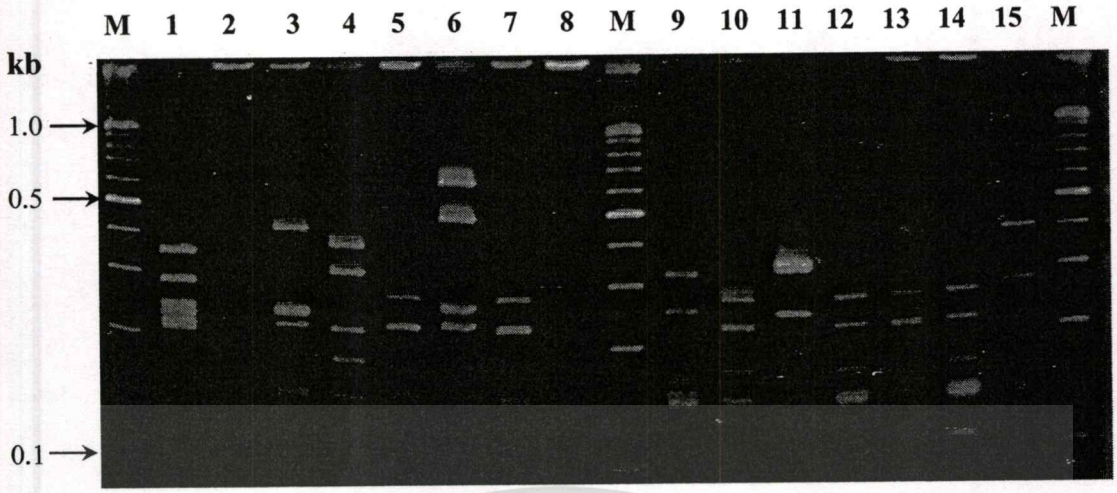
4.5 การวิเคราะห์และเปรียบเทียบดีเอ็นเอที่โคลนได้ด้วยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

ดีเอ็นเอผลผลิตที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็นโคโลนีที่ได้รับการสอดแทรกชิ้นยีนเป้าหมาย จะนำมาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี RFLP เพื่อนำไปจัดกลุ่มและคัดเลือกตัวแทนโดยใช้โปรแกรม GelComparII Cluster Analysis Module ต่อไป

4.5.1 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และ *Hha*I โดยทำปฏิกิริยาร่วมกัน พบว่าผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์จะเกิดแถบดีเอ็นเอหลากหลายขนาด โดยส่วนมากจะมีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 100 คู่เบส ถึง 1000 คู่เบส (ภาพที่ 4.7) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ Moyer *et al.* (1996) ได้รายงานว่าเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและให้ผลดีที่สุดในการจำแนกและแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียโดยใช้ความแตกต่างในส่วน small-subunit rRNA gene เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ตัดจำเพาะอื่นๆ อีก 7 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

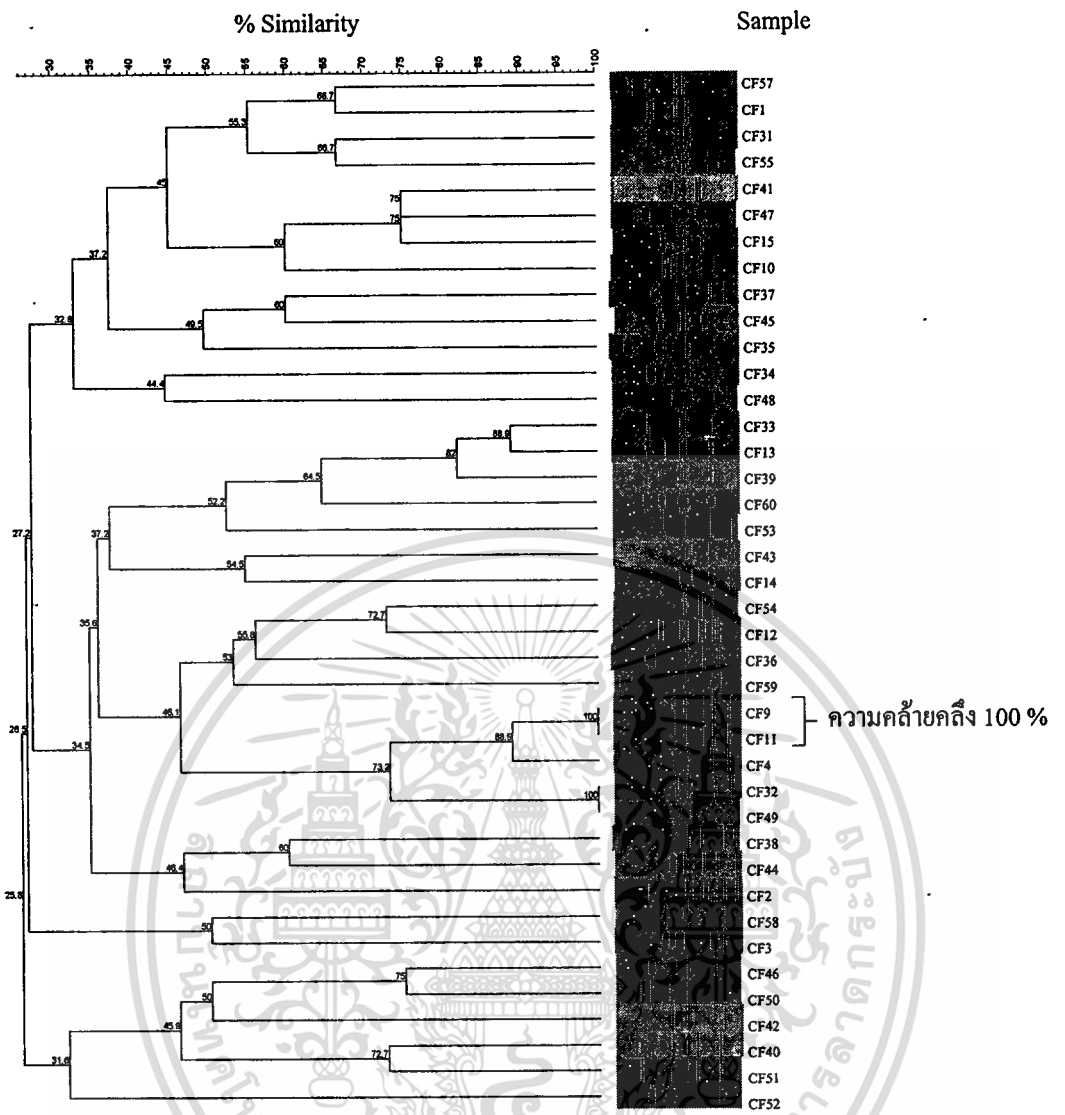


ภาพที่ 4.7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค RFLP ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ low melting agarose (LM) ใน TBE buffer เป็นเวลา 90 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน100bp DNA ladder ส่วน Lane ที่ 1 ถึง 15 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.5.2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างและจัดกลุ่มดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GelComparII Cluster Analysis Module

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เมื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอและจัดกลุ่มเบื้องต้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GelComparII (Applied Maths) พบว่าโคลนที่เหมือนกันจะพบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะขนาดเดียวกัน และผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมจะพบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.8) ซึ่งจากการเปรียบเทียบความแตกต่างและจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม GelComparII (Applied Maths) ของจำนวนโคลนทั้งหมด 297 โคลน พบจำนวนรูปแบบที่เกิดขึ้นทั้งสิ้น 188 phylotypes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

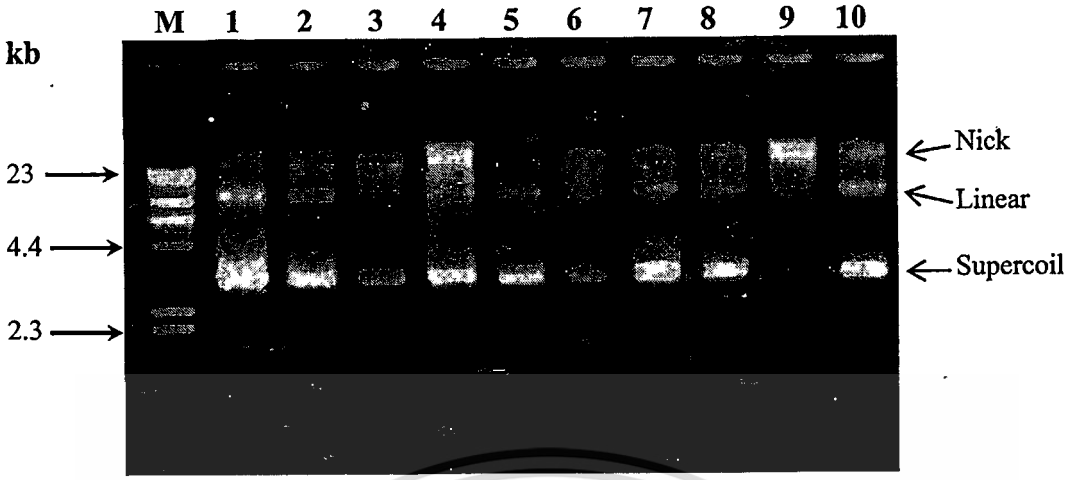


ภาพที่ 4.8 ตัวอย่างการเปรียบเทียบความแตกต่างและจัดกลุ่มดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม GelComparII Cluster Analysis Module

4.5.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำตัวแทนของโคลนที่ผ่านการคัดเลือกมาสกัดพลาสมิดเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ซึ่งผลที่ได้จากการสกัดพลาสมิด แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลจำนวนสามแถบ ซึ่งเป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่สามารถพบได้จากการสกัดพลาสมิด ได้แก่ วงแหวนเกลียวซ้อน (Supercoil) เส้นตรงปลายเปิด (Linear) และวงแหวนที่มีช่องเปิด (Nick circular) (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่4.9 แสดงแถบพลาสมิดดีเอ็นเอ ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟริซิส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดย Lane M เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA/HindIII และ Lane 1 ถึง 10 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้

4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โดยการส่งพลาสมิดวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้ในการแบ่งกลุ่มหรือจำแนกโคลนออกเป็น division ต่างๆ หากพบว่ามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับฐานข้อมูล (Stackebrandt and Goebel. 1994)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 188 Phylotypes ที่เป็นตัวแทนจากการจัดกลุ่มเบื้องต้นด้วยโปรแกรม GelComparII Cluster Analysis Module จากจำนวนทั้งสิ้น 297 โคลน ถูกนำมาทำการตรวจสอบ Chimeric sequence ด้วยโปรแกรม Check_Chimeraในอินเตอร์เน็ตที่ RDPII (http://rdp.cme.msu.edu/docs/chimera_doc.html; Cole *et al.*2007) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น Chimeric จำนวน 11 Phylotypes ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่จะนำไปใช้งานต่อจึงมีจำนวนทั้งสิ้น 177 Phylotypes ต่อมานำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Identity) โดยใช้โปรแกรม BLASTN ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล พบว่าจากจำนวนทั้งสิ้น 177 Phylotypes มีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลมากกว่า 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ หรือเป็นแบคทีเรียที่มีการรายงานมาแล้วจำนวน 94 Phylotypes (53.11 เปอร์เซ็นต์) และที่เหลือจำนวน 83 Phylotypes (46.89 เปอร์เซ็นต์) คาดว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน (ตารางที่ 4.4 และ ภาพที่ 4.10)

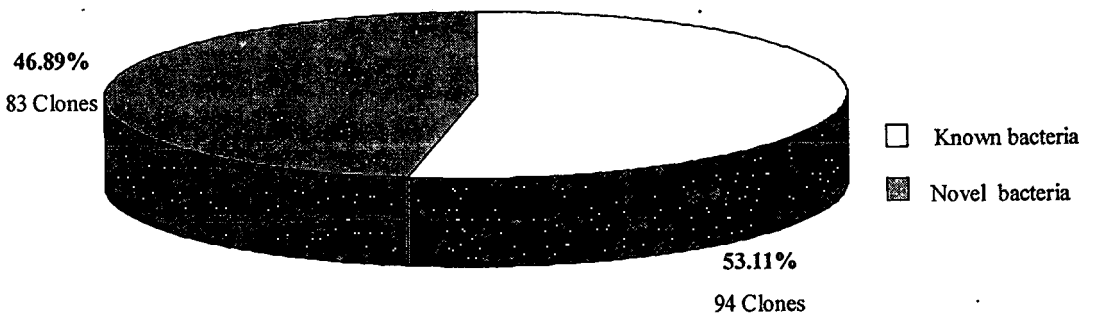
นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 177 Phylotypes มาจำแนกตามกลุ่ม division โดยโปรแกรม Sequence Match ในอินเตอร์เน็ตที่ RDPII (http://rdp.cme.msu.edu/doc.; Cole *et al.*2007) ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล ในการแบ่งกลุ่มหรือจำแนกโคลนออกเป็น ไฟลัมต่างๆ พบว่าอยู่ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive มากที่สุดจำนวน 73 Phylotypes คิดเป็น 41.81 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* จำนวน 50 Phylotypes คิดเป็น 28.25 เปอร์เซ็นต์ และ*Proteobacteria* จำนวน 31 Phylotypes คิดเป็น 17.51 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือจัดอยู่ในกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ Verrucromicrobia จำนวน 8 phylotypes คิดเป็น 4.52 เปอร์เซ็นต์, Cyanobacteria จำนวน6 Phylotypes คิดเป็น 3.39 เปอร์เซ็นต์ , SR1 จำนวน 3 Phylotypes คิดเป็น 1.69 เปอร์เซ็นต์, Fibrobacter จำนวน 2 Phylotypes คิดเป็น 1.13 เปอร์เซ็นต์, Spirochaeta จำนวน 1 Phylotypes คิดเป็น 0.56 เปอร์เซ็นต์, Tenericutes จำนวน 1 Phylotypes คิดเป็น 0.56 เปอร์เซ็นต์, Dictyoglomi จำนวน1 Phylotypes คิดเป็น 0.56 เปอร์เซ็นต์ และ Lentisphaerae จำนวน 1 Phylotypes คิดเป็น 0.56 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4 , ภาพประกอบที่ 4.11 และ 4.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

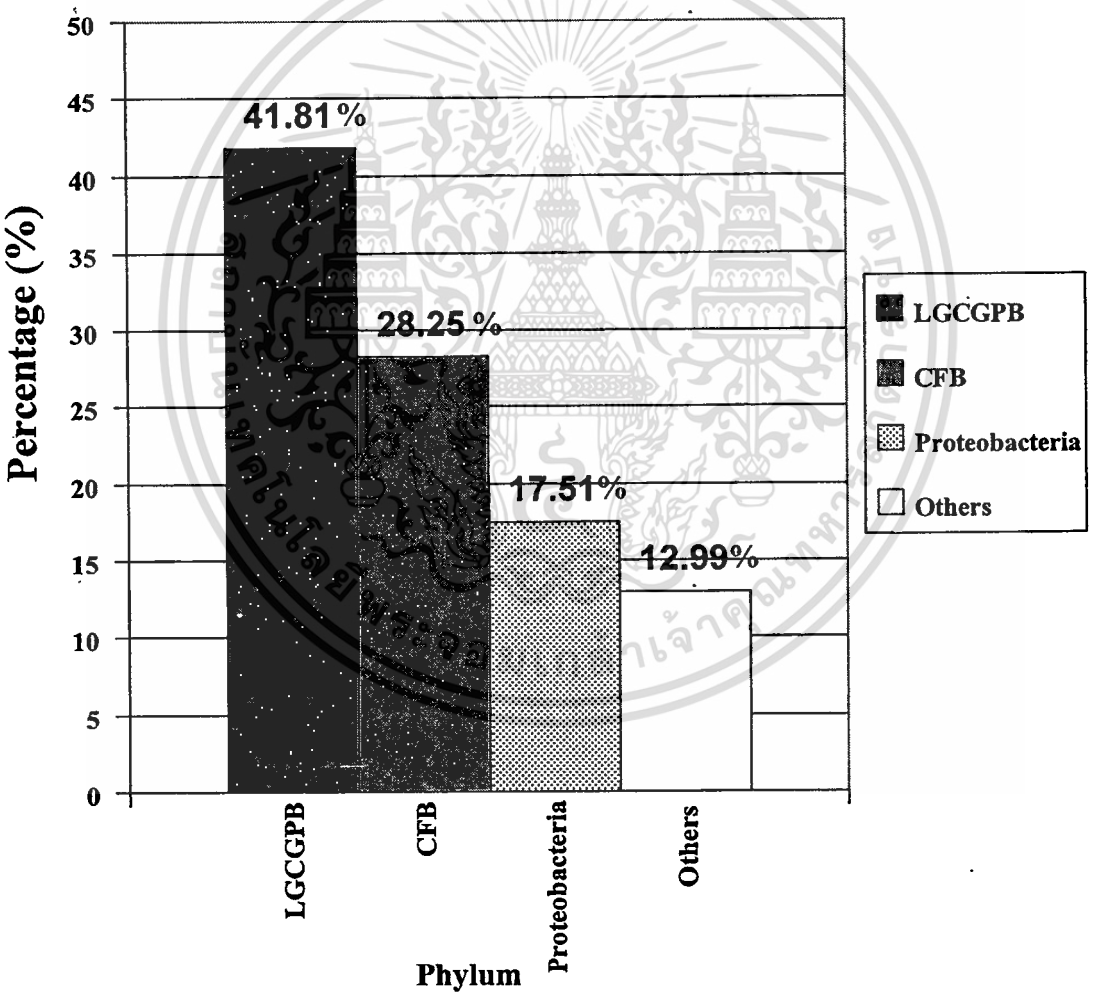
ตารางที่ 4.4 ประเภทของโคลนและ Phylotypes ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่มาจาก bovine rumen fluid library

Items	Clones		Phylotypes	
	No. of clones	% total clones	No. of Phylotypes	% total Phylotypes
Similarity				
≥ 97%	158	53.20	94	53.11
< 97%	139	46.80	83	46.89
Bacterial division/Bacterial subdivision				
Low G+C gram-positive bacteria	**131**	**44.11**	73	**41.81**
Unculture groups	131		73	
Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides	**97**	**32.66**	**50**	**28.25**
Unculture groups	97		50	
Proteobacteria	**42**	**14.14**	**31**	**17.51**
beta proteobacterium	1		1	
Ruminobacter amylophilus	6		4	
Unculture groups	35		26	
Verrucromicrobia	**8**	**2.70**	**8**	**4.52**
Unculture groups	8		8	
Cyanobacteria	**6**	**2.02**	**6**	**3.39**
Unculture groups	6		6	
SR1	**3**	**1.01**	**3**	**1.69**
Unculture groups	3		3	
Fibrobacter	**3**	**1.01**	**2**	**1.13**
Fibrobacter succinogenes	3		2	
Spirochaeta	**1**	**0.34**	**1**	**0.56**
Unculture groups	1		1	
Tenericutes	**1**	**0.34**	**1**	**0.56**
Unculture groups	1		1	
Dictyoglomi	**3**	**1.01**	**1**	**0.56**
Unculture groups	3		1	
Lentisphaerae	**1**	**0.34**	**1**	**0.56**
Unculture groups	1		1	
total	**297**		**177**	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

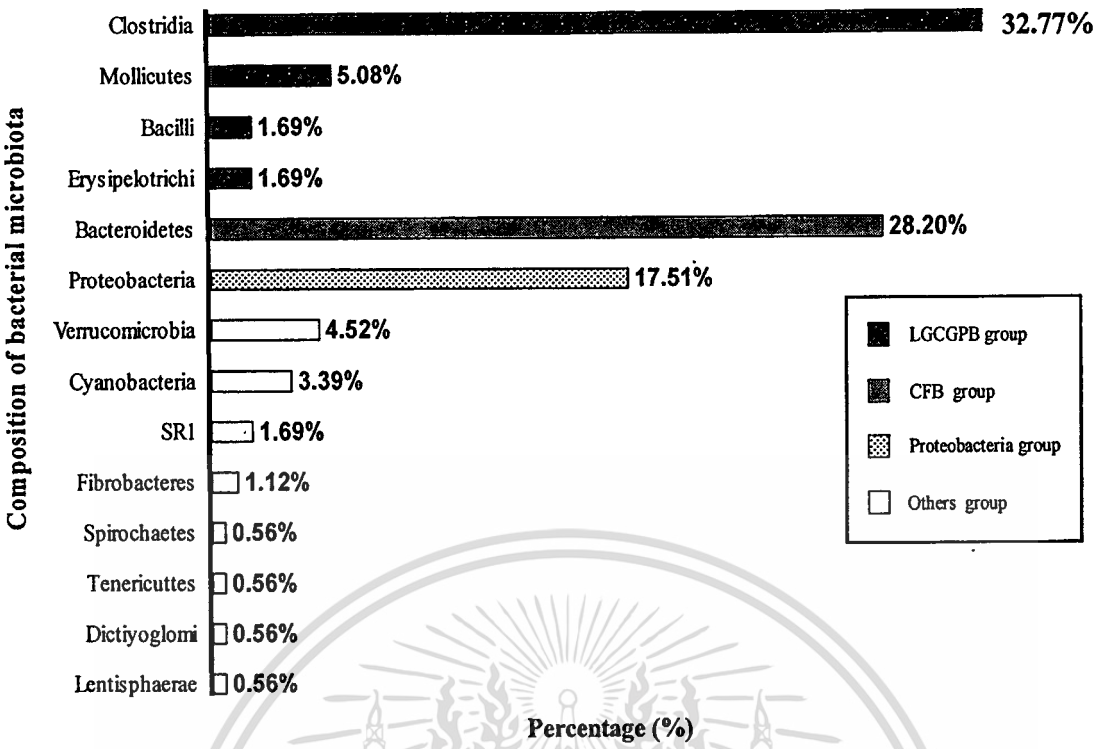


ภาพที่ 4.10 ผลความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับฐานข้อมูล (Know bacteria) ส่วนความคล้ายคลึงน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (Novel bacteria)



ภาพที่ 4.11 แสดงการแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

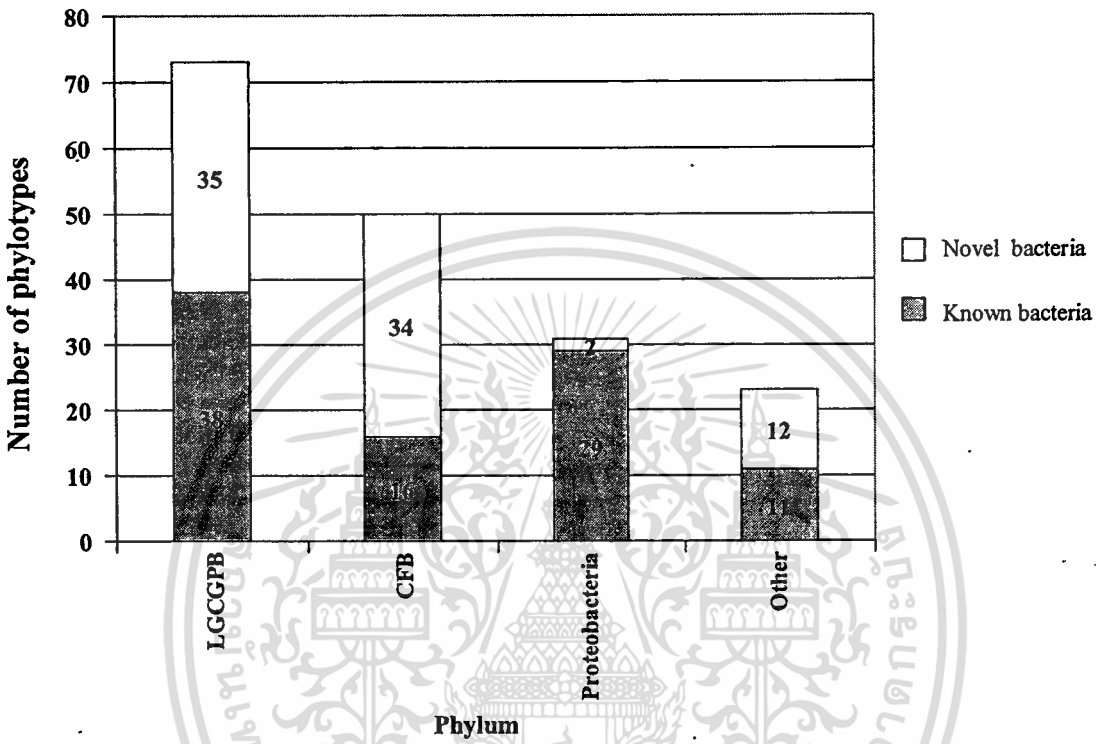


ภาพที่ 4.12 ชนิดของแบคทีเรียที่พบภายในกลุ่มต่างๆ จากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTN สามารถแบ่งออกเป็นสัดส่วนตามกลุ่มของแบคทีเรียที่พบ คือ ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive พบแบคทีเรียชนิดเดียวกับฐานข้อมูล จำนวน 38 Phylotypes เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่จำนวน 35 Phylotypes กลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* พบแบคทีเรียชนิดเดียวกับฐานข้อมูล จำนวน 16 Phylotypes เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่จำนวน 34 Phylotypes กลุ่ม *Proteobacteria* แบ่งเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับฐานข้อมูล 2 Phylotypes แบคทีเรียชนิดใหม่จำนวน 29 Phylotypes และแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ (Verrucromicrobia, Cyanobacteria, SR1, Fibrobacter, Tenericutes, Dictyoglomi, Spirochaeta และ Lentisphaerae) แบคทีเรียชนิดเดียวกันกับฐานข้อมูล 11 Phylotypes แบคทีเรียชนิดใหม่จำนวน 12 Phylotypes (ภาพที่ 4.13) ซึ่งจากผลที่ได้จากการแบ่งสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตามกลุ่มของแบคทีเรีย จะพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* เป็นกลุ่มที่พบแบคทีเรียที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนมากที่สุด และในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 177 Phylotypes จากฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความหลากหลายของแหล่งที่มาของแบคทีเรีย และสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้ดัง ภาพที่ 4.14 โดยมีความเหมือนกับแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมนของวัวนม (Cow rumen) มากที่สุดจำนวน 102 phylotypes รองลงมา คือจากสิ่งแวดล้อมทั่วๆไป ได้แก่ น้ำดื่ม ดิน และน้ำทะเลจำนวน 31 phylotypes เป็นต้น กลุ่มต่อมาที่พบมากอีกกลุ่มคือกระบือ

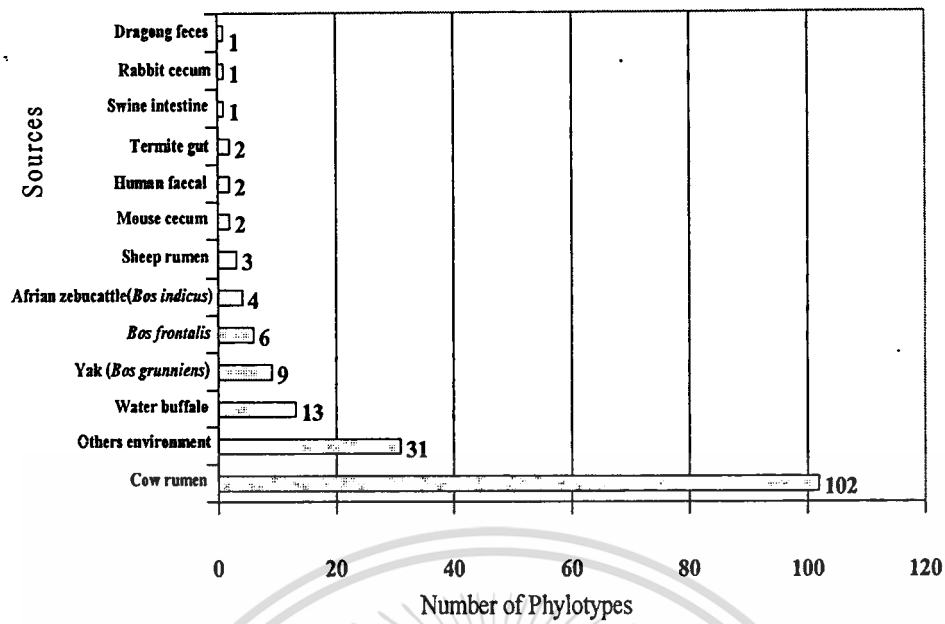
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม่น้ำ (Water buffalo) จำนวน 13 phylotypes และ โค Yak จำนวน 9 phylotypes ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีเรียบางส่วนมาจากแหล่งของแบคทีเรียอื่นๆ เพียงเล็กน้อย ได้แก่ โค African zebu cattle , กระเพาะรูเมนของแกะ, ไส้ติ่งของหนู, อุจจาระคน, ลำไส้ปลวก, ลำไส้สุกร และ ไส้ติ่งของกระต่าย อีกด้วย



ภาพที่ 4.13 จำนวน phylotype ของแบคทีเรียที่ได้จากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยกำหนดว่าความคล้ายคลึงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับฐานข้อมูล (Known bacteria) ส่วนความคล้ายคลึงน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ตามกลุ่มของแบคทีเรีย (Novel bacteria)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงแหล่งที่มาของแบคทีเรียต่าง ๆ ที่ได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง (จำนวน177 Phylotypes) กับฐานข้อมูล GenBank

4.7 ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบโดยทำการ alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees ด้วยโปรแกรม MEGA V4.0 โดยวิธี distance metrix ด้วย algorithms แบบ Neighbor-joining (NJ) method

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees (ภาพที่ 4.15) โดยวิธี distance metrix ด้วย algorithms แบบ Neighbor-joining (NJ) method และคำนวณ evolutionary distances แบบ Kimura 2-parameter method (Kimura. 1980) วิเคราะห์ค่าทางสถิติ bootstrap จำนวน 1,000 รอบ และใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น out group พบว่า Phylogenetic tree ที่ได้มีลักษณะการจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มหลักได้สามกลุ่ม คือ กลุ่ม low G+C Gram-positive (73 Phylotypes, 41.81 เปอร์เซ็นต์), กลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (61 Phylotypes, 33.90 เปอร์เซ็นต์), และกลุ่ม Proteobacteria (31 Phylotypes, 17.51 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ กลุ่ม SR1, กลุ่ม Cyanobacteria, กลุ่ม Lentisphaerae, กลุ่ม Spirochaeta, กลุ่ม Fibrobacter และกลุ่ม Verrucomicrobia ซึ่งผลที่ได้พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Kocherginskaya *et al.* (2001) และ An *et al.* (2005) ซึ่งได้รายงานว่าพบแบคทีเรียในกระเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูเมนอยู่ในสามกลุ่มหลักคือ กลุ่ม low G+C Gram-positive กลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* และกลุ่ม Proteobacteria

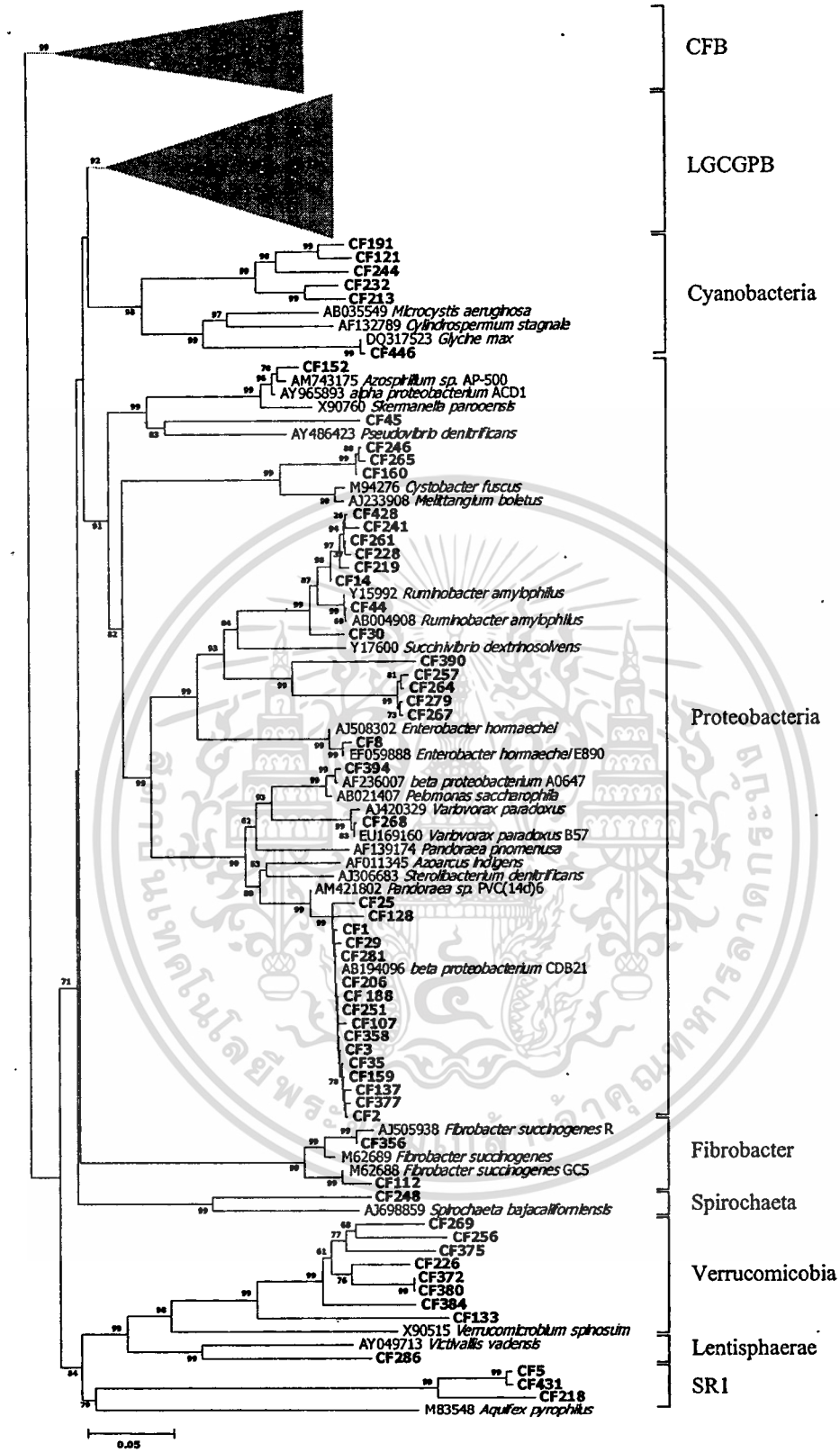
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees ของประชากรแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria (ภาพที่ 4.16) โดยวิธี distance metrix ด้วย algorithms แบบ Neighbor-joining (NJ) method และคำนวณ evolutionary distances แบบ Kimura 2-parameter method (Kimura. 1980) วิเคราะห์ค่าทางสถิติ bootstrap จำนวน 1,000 รอบ และใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น out group พบว่ามีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium ของ Holstein heifer และ Cow rumen เป็นส่วนใหญ่ โดยส่วนมากอยู่ในกลุ่มของ *Clostridia* ซึ่งประกอบด้วย Uncultured group II (CF166, CF123, CF357, CF17, CF283, CF234) กลุ่ม Uncultured group III (CF20, CF11, CF38) กลุ่ม Uncultured group IV (CF262, CF400, CF272, CF381) กลุ่ม Uncultured group V (CF270, CF419, CF33, CF392, CF34, CF18) และ Uncultured group VI (CF243, CF408, CF290, CF195) ทั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลที่ 91-99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่พบรองลงมาคือ กลุ่ม *Mollicutes* ประกอบด้วย Uncultured group I (CF288, CF235, CF389, CF344, CF227, CF387, CF203, CF378, CF42, CF258) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลที่ 91-97 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ยังไม่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อและมีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium ของ Holstein heifer และ Cow rumen นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์กับแบคทีเรียกลุ่มที่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้ออีกด้วย โดยโคลนที่ CF151 มีความคล้ายคลึงกับ *Ruminococcus flavefaciens* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลนที่ CF186 และ CF221 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Ruminococcus albus* ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ของ Tajima *et al.* (2000) และ Tajima *et al.* (2001) ซึ่งได้ศึกษาประชากรของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนม ที่ได้รับการเปลี่ยนอาหารจากหญ้าเฮย์หรืออาหารที่มีเยื่อใยสูงไปเป็นเมล็ดธัญพืช โดยพบว่าหากสัตว์ได้รับอาหารที่มีเยื่อใยสูงแบคทีเรียส่วนมากจะพบอยู่ในกลุ่ม low G+C Gram-positive bacteria ที่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อชนิด *Ruminococcus flavefaciens* (L76603) และ *Ruminococcus albus* (L76589) เนื่องมาจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยสลายอาหารเยื่อใยในกระเพาะรูเมน และมีรายงานว่าในสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีเยื่อใยสูงจะมีแบคทีเรียแกรมลบมาก (Hungate. 1966) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ยังสอดคล้องกับผลของปริมาณโภชนะที่สัตว์ได้รับในแต่ละวัน (ตารางที่ 4.2) โดยพบเยื่อใยรวมเป็นโภชนะที่สัตว์ได้รับมากที่สุด 68.85 เปอร์เซ็นต์ (แบ่งออกเป็น เซลลูโลส 34.34 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 34.51 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในโคลนที่ CF271 CF169 และ CF146 พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อชนิด *Succiniclasticum ruminis* (X81137) ที่ความคล้ายคลึง 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Van Gylswyk (1995) ซึ่งได้รายงานว่าแบคทีเรียชนิด *Succiniclasticum ruminis* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการหมักและย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ซึ่งพบในโคนมที่ได้รับหญ้าแห้งเป็นหลัก นอกจากนี้ในส่วนของโคลนที่ CF173 พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Eubacterium siraeum* (AB008552) ที่เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง 89 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่พบในไส้ติ่งของหนู (Rat) ที่มีความสามารถในการย่อยลิกโนเซลลูโลสที่มีสารประกอบลิกนินได้ โดย Tajima *et al.* (2000) ก็ได้รายงานว่าพบแบคทีเรียชนิดดังกล่าวในกระเพาะรูเมนเช่นกัน

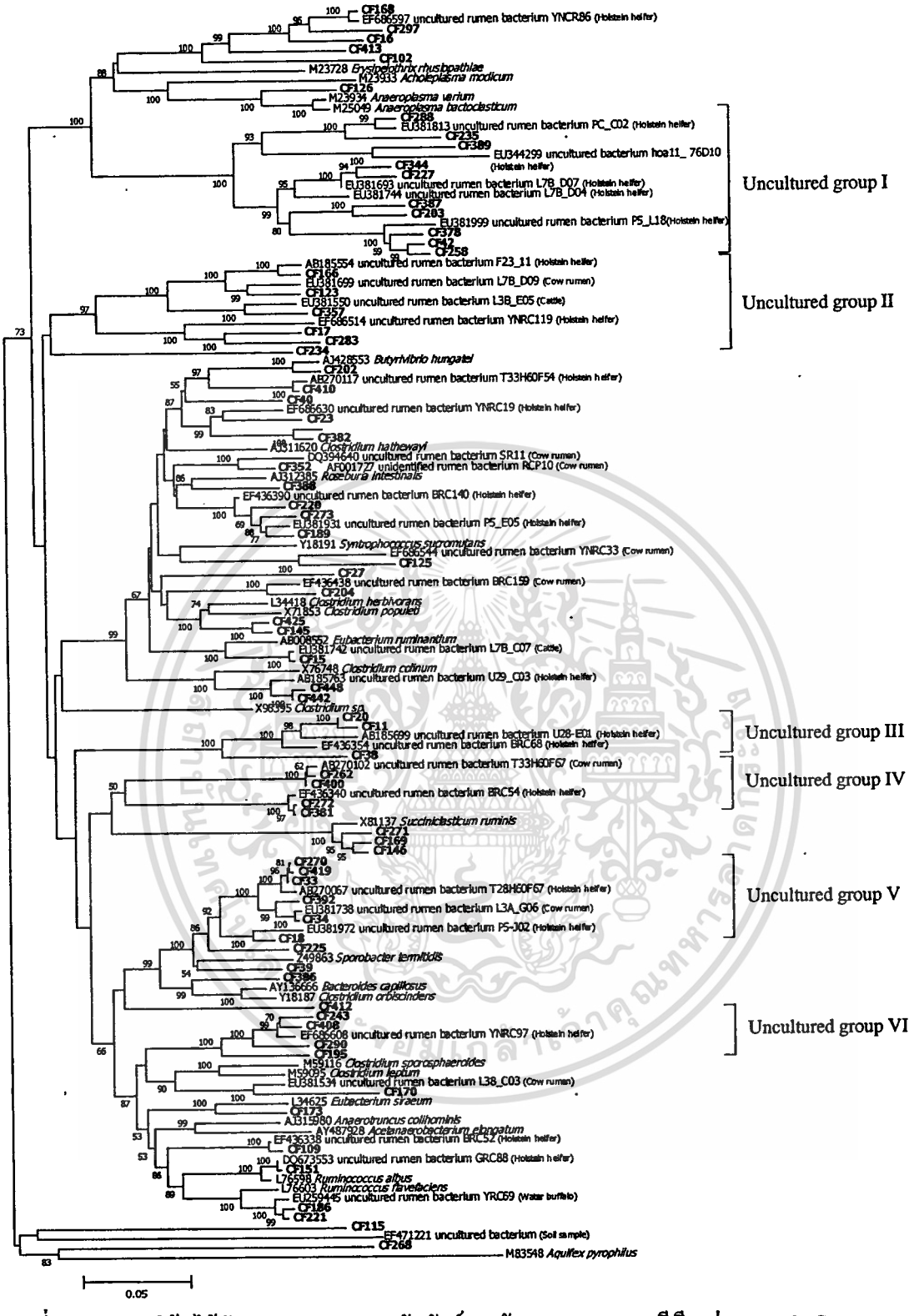
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees ของประชากรแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (ภาพที่ 4.17) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากรองลงมาจากกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria พบว่าส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับ Uncultured rumen bacterium ของ Holstein heifer และ Cow rumen โดยอยู่ในกลุ่มของ *Bacteroidetes* ซึ่งประกอบด้วย กลุ่ม Uncultured group VII (CF199, CF240, CF367, CF383, CF192, CF37, CF22, CF185, CF399, CF373, CF183, CF374, CF198) กลุ่ม Uncultured group VIII (CF114, CF443, CF231) กลุ่ม Uncultured group IX (CF359, CF259, CF376, CF105, CF364, CF230, CF353, CF223, CF10, CF180, CF196, CF363, CF296) และกลุ่ม Uncultured group X (CF214, CF135, CF414, CF253, CF245, CF31, CF174, CF12, CF343, CF215, CF236, CF398, CF247) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลที่ 89-99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ยังไม่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อ โดย Tajima *et al.* (2000) ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* พบว่ามี *Bacteroidetes* มากที่สุดในช่วงที่โคนมได้รับอาหารเยื่อใยสูง และ An *et al.* (2005) ก็ได้รายงานว่าพบ *Bacteroidetes* เป็นกลุ่มหลักในกระเพาะรูเมนของโค Yak ซึ่งอยู่ในกลุ่มสัตว์ป่าที่กินอาหารตามธรรมชาติที่มีเยื่อใยสูงมาก ที่น่าสนใจคือโคลนที่ CF294 พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อ โดยเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Prevotella* ที่ระดับเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Tajima *et al.* (2000) ที่พบว่าแบคทีเรียรูเมนในกลุ่ม *Prevotella* มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับเมล็ดธัญพืช ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า แบคทีเรียรูเมนในกลุ่ม *Prevotella* จะทำหน้าที่ในการย่อยสลาย oligosaccharide และ xylanose ซึ่งพบมากในเมล็ดธัญพืช ซึ่งผลที่ได้พบว่ามีความสอดคล้องกับผลของปริมาณโภชนะที่สัตว์ได้รับในแต่ละวัน (ตารางที่ 4.2) โดยพบเยื่อใยรวมเป็นโภชนะที่สัตว์ได้รับมากที่สุด 68.85 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งออกเป็น เซลลูโลส 34.34 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 34.51 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



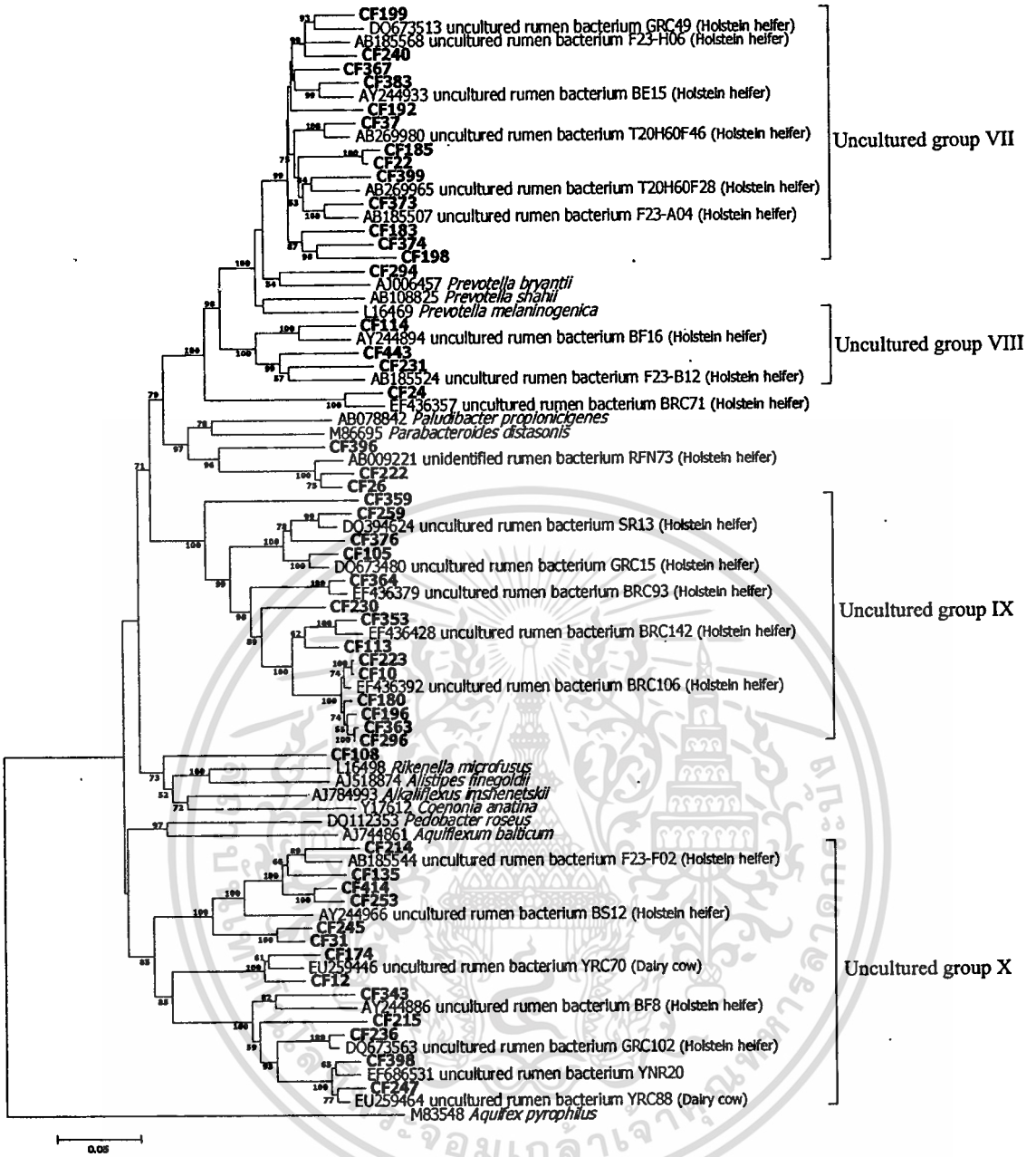
ภาพที่ 4.15 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และ คำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น Out group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C gram-positive bacteria ในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิธี Neighbor- joining (NJ) และ คำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น Out group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*)ในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิธี Neighbor- joining (NJ) และ คำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น Out group

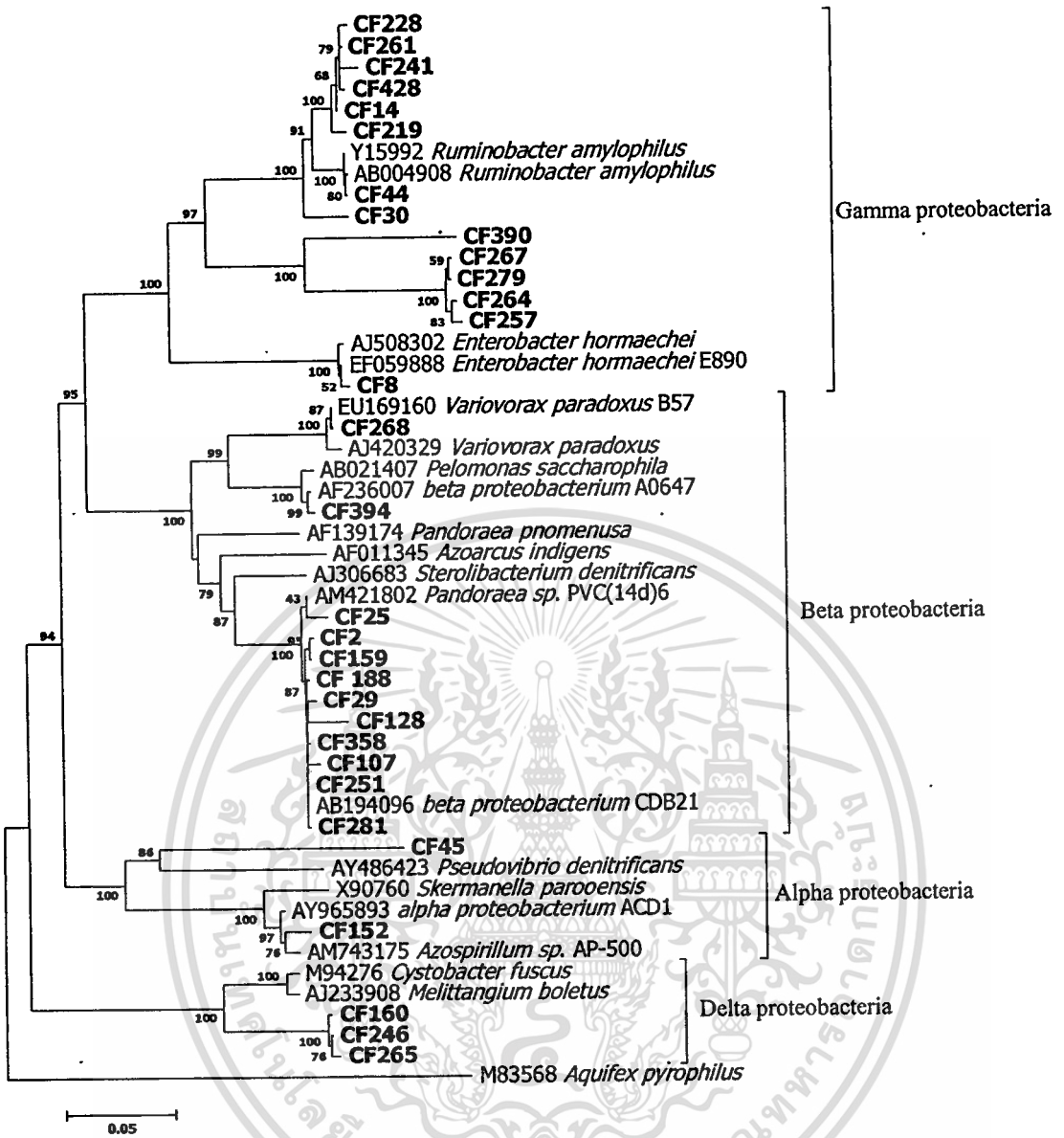
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง Phylogenetic trees ของประชากรแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่ม *Proteobacteria* (ภาพที่ 4.18) พบว่าส่วนมากมีความสัมพันธ์กับ Uncultured bacterium โดยอยู่ในกลุ่มของ *Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria* และ *Deltaproteobacteria* ซึ่งจากการที่พบ *Proteobacteria* อยู่ในระดับค่อนข้างสูง (17.51 เปอร์เซ็นต์) พบว่าสอดคล้องกับรายงานของKocherginskaya *et al.* (2001) ซึ่งได้รายงานว่า สัตว์ที่ได้รับการเลี้ยงดูโดยใช้ข้าวโพดในปริมาณที่สูงนั้น จะพบกลุ่มของ *Proteobacteria* ในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย โดย Kocherginskaya *et al.* (2001) ได้พบกลุ่มของ *Proteobacteria* คิดเป็น 27 เปอร์เซ็นต์ ของกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมด ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาหารข้นที่ใช้ในการเลี้ยงโคทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ (เบทาโกร 004) อาจจะมีส่วนประกอบของข้าวโพดในปริมาณที่สูงด้วย ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้พบว่าโคลนที่ CF44 มีความน่าสนใจคือ มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่มที่ทราบด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Ruminobacter amylophilus* (AB004908) ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ โดย Anderson (2002) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *Ruminobacter amylophilus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งได้แก่พวก amylase และใช้ประโยชน์จากน้ำตาลได้แก่พวก glycogen

นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ที่น่าสนใจคือ แบคทีเรียในกลุ่ม Fibrobacter โดยในโคลนที่ CF112 และ CF356 เป็นแบคทีเรียชนิด *Fibrobacter succinogenes* ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงที่ 97 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่ Tajima *et al.* (2000) และ Tajima *et al.* (2001) ได้รายงานว่า *Fibrobacter succinogense* จะพบมากในกลุ่มโคนมที่ได้รับหญ้าเฮย์เป็นหลัก เนื่องมาจากเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน และ Koike *et al.* (2003) ได้รายงานว่า *Fibrobacter succinogenes* บางชนิดทำหน้าที่เป็นแบคทีเรียพวก cellulolytic และ xylanolytic bacteria

จากการขอเลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ (Accession number) ของประชากรแบคทีเรียจำนวน 83 Phylotypes กับฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ตที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin. ซึ่งได้เลขทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ EU871342-EU871424

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิธี Neighbor- joining (NJ) และ คำนวณ Nucleotide substitution แบบ Kimura-2-parameter model ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ใช้ *Aquifex pyrophilus* (M83548) เป็น Out group

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค ที่ได้รับการเจาะกระเพาะจำนวน 1 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อาหารที่สัตว์ได้รับในแต่ละวันมีสัดส่วนของอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่ 3 กิโลกรัม ต่อ12 กิโลกรัม เมื่อเก็บตัวอย่างอาหารที่สัตว์ทดลองได้รับไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า สัตว์ได้รับโภชนะต่างๆ ในแต่ละวัน ดังนี้ ส่วนของ Ash 14.02 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 4.75 เปอร์เซ็นต์, โปรตีนรวม 12.87 เปอร์เซ็นต์, เยื่อใยรวม 68.85 เปอร์เซ็นต์ (แบ่งออกเป็น เซลลูโลส 34.34 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 34.51 เปอร์เซ็นต์) ในส่วนของการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค ได้ใช้หลักการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และในการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอโดยตรงจากตัวอย่างของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน และทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของ16S rRNA gene โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) จากจำนวนทั้งสิ้น 297 โคลนพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 177 phylotypes ในส่วนของผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank ซึ่งใช้ค่าความเหมือนที่ 97 เปอร์เซ็นต์ (Stackebrandt and Goebel. 1994) พบว่า 94 phylotypes (53.11 เปอร์เซ็นต์) เป็นแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูลมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 83 phylotypes (46.89 เปอร์เซ็นต์) เป็นกลุ่มแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่มีค่าความเหมือนกับฐานข้อมูลน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ยังไม่ได้รับการจำแนก และจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของประชากรแบคทีเรียของโคที่สร้างขึ้นโดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และกำหนดแบบจำลองของการแทนที่ (Nucleotide substitution) ด้วย Kimura-2-parameter model ซึ่งรวมอยู่ในโปรแกรม MEGA 4.0 ทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างต้นไม้พันธุกรรม ด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ พบว่า ประชากรแบคทีเรียกระจายอยู่ใน 3 กลุ่มหลัก โดยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ low G+C Gram-positive bacteria (41.81 เปอร์เซ็นต์) กลุ่มของ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (28.25 เปอร์เซ็นต์) และกลุ่ม *Proteobacteria* (17.51 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโภชนะของเยื่อใยรวม (68.85 เปอร์เซ็นต์) และสัดส่วนของอาหารหยาบที่สัตว์ได้รับ เนื่องมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของ LGCGPB และ CFB ที่พบในระดับสูงนั้น เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถนำไปสู่การค้นพบแบคทีเรียในรูเมนของโคที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนถึง 83 phylotypes และนำข้อมูลที่ได้เข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank ที่ Accession number EU871342-EU871424 นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การประยุกต์และคัดแยกแบคทีเรียจากกลุ่มต่างๆ ที่พบในกระเพาะรูเมน เพื่อไปพัฒนาหาผลผลิตของแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กอบแก้ว ตรงคงสิน. 2535. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน.** ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2550. **ระบบพันธุกรรมของจุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545 (ก). "ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ (systematics and phylogeny) เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา." วารสารวิทยาศาสตร์ ปีที่56 ฉบับที่3 หน้า168-175.

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545 (ข). **การสร้างวงษ์วานวิวัฒนาการขึ้นมาใหม่ขั้นพื้นฐาน. ใน หนังสือการประชุมวิชาการเรื่อง Molecular techniques for biodiversity research.** 11-12 ธันวาคม 2545, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2547. "วงศ์วานวิวัฒนาการเชิงโมเลกุล (molecular phylogenetics) อนุกรมวิธาน ระบบวิทยา และวงศ์วานวิวัฒนาการ." **จุลสารพันธุศาสตร์** ปีที่ 24 ฉบับที่1 หน้า 18-23.

ฉลอง วชิราภากร. 2541. **โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น.** ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชาญชัย มณีดุลย์. 2537. **ทุ่งหญ้าธรรมชาติและหญ้าพื้นเมืองของไทย.** การฝึกอบรมพืชอาหารสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: จังหวัดขอนแก่น.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2541. **โภชนะศาสตร์สัตว์.** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปรีชา ประเทพา. 2543. **พันธุศาสตร์ยุคใหม่: เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม.** มหาสารคาม: อภิชาติการพิมพ์.

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. **โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง.** กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่พลับลิชชิ่ง

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. "การแยกโครโมโซมจากแบคทีเรีย" หน้า 11.15-11.17. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. **เทคนิคทางอนูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม หนังสือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.

วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2548. **นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง.** ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2551. **โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง.** สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี [Online].Available:http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/Ruminant%20Nutrition/unit4.pdf [cited 17 Febuary 2008; 14:19 EST]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิวพร วรอนุ. 2543. "การศึกษาเปรียบเทียบระดับของอาหารหยาบและอาหารข้นที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก กระบวนการหมัก ผลผลิตสุดท้าย และปริมาณการกินได้ ในโคและกระบือปลักที่เลี้ยงด้วยฟางหมักยูเรีย." **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตวศาสตร์) บัณฑิตวิทยาลัย.** มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2547. **เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง.** กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ. 2547. **ชีวโมเลกุล.** กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. **วิทยาแบคทีเรีย.** สุรินทร์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสุรินทร์.

สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวรและ ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. 2546. **เวชศาสตร์โมเลกุล.** คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หัทยา กาวีวงศ์. 2546. **อณูพันธุศาสตร์.** เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Alberts, B., Bray, F., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. and Watson J. 1994. **Molecular Biology of the Cell. 3rd ed.** Cold Sping Harbor Press. USA.

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. "Phylogenetic identifcation and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." **Microbiol. Rev.** 59:143-149.

An, D., Deng, X. and Dong, Z. 2005. "Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos Taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses." **Anaerobe.** 11:207-215.

Anderson, K.L. 2002. "Purifcation and Analysis of a Membrane-associated Starch-degrading Enzyme from *Ruminobacter Amylophilus*." **Anaerobe.** 8: 269–276.

AOAC. 1985. **Official Method of Analysis.** Washington D.C. The Association of Official Analytical Chemists. U.S.A.

Baik, R.W., Ha, J.K., Kim, W.Y. and Han, In.K. 1997. "Effects of different levels of concentrate in complete rations on nutrient digestibilities and ruminant metabolites in sheep and growth performance in Gorean Native Bulls." **Asian-Aus. J. Anim Sci.** 10:371-382.

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J. and Hardin, J. 2004. **The World of the Cell. 6th ed.** Benjamin Cummings. San Fransisco. USA. 676p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blakely, J. and Bade, D.H. 1994. **The Science of Animal Husbandry. 6th ed.** Prentice Hall Career and Technology, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA. 626p

Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato, H. and Costerton, J.W. 1991. "Microbial ecology and physiology of feed degradation with in the rumen." **In:Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in ruminant**. Tsuda, T., Sasaki, Y. and Kawashima, Eds R. Tokyo: Academim Press.

Church, D.C. 1979. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. Vol 2. Portland: Metrepolitan printing Co, U.S.A.

Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideenl, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M. 2007. "The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data." **Nucl. Acids Res.** 35: D169–D172.

Dehority, B.S. and Orpin, C.G. 1988. "Development of, and natural fluctuation in, rumen microbial populations." **In Hobson P.N. (ed.) The rumen microbial ecosystem.** London : Elsevier Science Publishers.

Deng, W.D., Mao, H. and Wanapat, M. 2007. "The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review." **Mol Biol Rep.** 35:265–274.

Dobrovol'skaya, T.G., Lysak, L.V., Zenova, G.M. and Zvyagintsev, D.G. 2001. "Analysis of Soil Bacterial Diversity: Methods, Potentiality, and Prospects." **Microbiol.** 70(2): 119-132.

Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A. and Mitchison, G. 2001. **Biological sequence analysis Probabilistic models of proteins and nucleic acids**. Cambridge University Press.

Eunjoon, K., Hongik, K., Kook, K.H. and Yong, P.H. 1990. "Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Streptomyces griseus* subsp. griseus." **Nucl. Acids Res.** 19:1149.

Fonty, G., Govet, P., Jouany, A.P. and Senaud. 1987. "Establishment of microflora anaerobic fungi in the rumen of lambs." **J. Gen Microbiol.** 133:1835-1897.

Forsberg, C.W., Cheng, K.-J. and White, B.A. 1997. **Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: Gastrointestinal Microbiology.** (Mackie, R.I. and White, B.A. Eds.). New York: Chapman and Hall.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Froster, R.J., Gong, J. and Teather, R.M. 1997. "Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen." **Appl. Environ. Microbiol.** 63:1256-1265.

Gibas, C. and Jambeck, P. 2001. **Developing Bioingormatics Computer Skills.** O'Reilly.

Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. **Forage fiber analysis (Apparatus, Reagent, Procedures and some Applications).** Washington D.C. Agri. handbook. No. 397, ARS, USDA.

Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y. and Garnier-Sillam, E. 1999. "Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: interference with humic substances". **Analusis** 27:439–442

Hungate, R.E. 1966. **The rumen and its microbes.** New York : Academic Press.

Inoue H., Nojima, H. and Okayama, H. 1990. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." **Gene.** 1:23-28.

James, B.L. and Baker, M. C. 2003. **Introduction to Veterinary Science**. Thomson Learning : Canada.

Jarvis, G.N, Kurtovic, A., Hay, A.G. and Russell, J.B. 2001. "The physiological and genetic diversity of bovine *Streptococcus bovis* strains." **FEMS Microbiol. Ecol.** 35:49–56.

Jeong, C.S., Cho, K.M.E., Shin, C., Lim, W. J., Hong, S.Y., Choi, B.R., Kang, J.M., Lee S.M., Kim Y.H., Kim H. and Yun. H.D. 2006. "16S rDNA Analysis of Bacterial Diversity in Three Fractions of Cow Rumen." **J. Microbiol. Biotechnol.** 16(1):92–101.

Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of *Bacteria* and *Archaea* in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand." **J. Basic Microbiol.** 44: 430 – 444.

Kimura, M. 1980. "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." **J. Mol. Evolu.** 16:111-120.

Klieve, A.V., Heck, G.L., Prince, M.A. and Shu Q. 1999. "Genetic homogeneity and phage suspectibility of ruminal strains of *Streptococcus bovis* isolated in Australia." **Lett. Appl. Microbiol.** 29:108–112

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I. and White, B.A. 2001. "Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under two Different Diet Conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches." **Anaerobe.** 7: 119–134.

Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. "Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria." **FEMS. Microbiol. Letters.** 229: 23-30.

Komatsoulis, G.A. and Waterman, M.S. 1997. "A New Computational Method for Detection of Chimeric 16S rRNA Artifacts Generated by PCR Amplification from Mixed Bacterial Populations." **Appl. Environ. Microbiol.** 63:2338-2346.

Lane, D.J. 1991. **16S rRNA 23S rRNA sequencing. In: E. Stacke- brandt, Goodfellow , M. ed Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.** New York: John Wiley and Sons.

Maidak, B.L., Cole, J.R., Parker, C.T. Jr., Garrity, G.M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T.G., McCaughey, M.J., Olsen, G.J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M. and Woese, C.R. 1999 . "A new version of the RDP (Ribosomal Database Project)" **Nucl. Acids Rese.** 27(1):171-173.

McAllister, T.A., Cheng, L.M. Rode. and Buchanan-Smith, J.G. 1990. "Use of formaldehyde to regulated digestion of barley starch." **Can. J. Anim. Sci.** 70:581-594.

McKane, L. and Kandel, J. 1996. **Microbiology.** McGraw-Hill Inc. U.S.A.

McSweeney, C.S., S.E. Denman, A.-D. G. Wrigh, t and Z. Yu. 2007. "Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology." **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 20(2) : 283-294.

Minato, H., Endo, A., Ootomo, Y. and Uemura, T. 1966. "Ecologicatreatise of the rumen fermentation. II. The amylolytic and cellulolytic activities of the fractionated bacterial portions attached to the rumen solids." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 12:53-69.

Minato, H., Ishizaki, S., Adachi, Y. and Mitsumori, M. 1989. "Effect on rumen microbial populations of ammonia treatment of rice straw forage for steers." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 35 :113-124.

Minato, H., Mitsumori, M. and Cheng, K.-J. 1993. **Attachment of microorganisms to solid substrate in the rumen. In: Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation.** Tokyo: Uni Publishers.

Moat, A.G. and Foster, J.W. 1995. **Microbial Physiology. 3rd ed.** Printed in the U.S.A.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moyer, C.L., Tiedje, J.M., Cobbs, F.C. and Karl, D.M. 1996. "A Computer-Simulated Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Bacterial Small-Subunit rRNA Gene: Efficacy of Salected Tetrameric Restriction Enzymes for Studies of Microbial Diversity in Nature." **Appl Environ Microbiol.** 62 : 2501-2507.

Nei, M. and Kumer, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylgenetics**. New York: Oxford University Press,Inc.

NRC. 2001. **Nutrition Requirements of Dairy Cattle. 7th ed.** Washington. D.C. National Academic Press. U.S.A.

Orpin, C.G, Mathisen, S.D, Greenwood, Y. and Blix, A.S. 1985. "Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (Rangifer tarandus platyrhynchus)." **Appl Environ Microbiol.** 50 : 144-151.

Patterson, J.A. 1992. "Ruminal microbiology." **In: Encyclopedia of Microbiology vol.4.** Sandiego. Acedamic press. U.S.A.

Sadet, S., Martin, C., Meunier, B. and Morgavi, D.P. 2007. "PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium." **The Animal Consortium.** pp 939-944.

Stackebrandt N. and Goeble B.M. 1994. "Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in biotechnology." **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 846-849.

Stewart, C.S., Flint, H.J. and Bryant, M.P. 1997. **The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial. Ecosystem** (Hobson, P.N. and Stewart, C.S., Eds.). London: Blackie Academic and Professional Publishers.

Sunstad, D.P. and Simmons, M.J. 2006. **Principles of Genetics. 4th Ed.** John Wiley and Sons.

Supavadee, C. 2004. "Assessing Microbial Diversity from Local Soil Environments at Mahidol University, Salaya Campus and Bor Khlueng Hot Spring,Ratchaburi." **Thesis for the Degree of Master of Science (Molecular Genetic and Genetic Engineering).** Mahidol University.

Svetlana, A.K., Rustam, I.A. and Bryan, A.W. 2001. "Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under two Different Diet Conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical EcologyApproaches." **Anaerobe.** 7:119–134.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H. and Benno, Y. 1999. "Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries." **FEMS. Microbiol. Ecol**. 29: 159–169.

Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I. and Benno, Y. 2000. "Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet." **Anaerobe.** 6: 273-284.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Benno, Y. 2001. "Die-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real- time PCR." **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2766– 2774.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and K ,S. 2007. "MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis." **Mol.Bio.Evol.**24(8):1596-1599.

Van, Gylswyk, N.O. 1995. "*Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a Ruminal Bacterium Converting Succinate to Propionate as the Sole Energy-Yielding Mechanism." **Inter J. of Systematic Microbiol.** 45:297-300

Van Soest, P.J. 1983. **Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed.** O&B Book, INC: New York.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R. 2007. "Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy." **Appl Environ Microbiol.** 73(16): 5261–5267.

Wang, Y.L, Yang, R.H, Mao, A.J, Wang, J.Q. and Dong, Z.Y. 2005. **Phylogenetic diversity analyse of rumen bacteria using culture independentmethod.** [Online]. Available:http://www.ncbi.nlm.hin.gov/gvery.fcgi [cited 6 January 2007; 14:19 EST]

Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L. and Mertens, D.R. 1999. "Effect of Diet on Populations of Three Species of Ruminal Cellulolytic Bacteria in Lactating Dairy Cows." **J. Dairy Sci.** 82:122-134.

Whitford, M.F., Robert, J.F., Cheryl, E.B., Jianhua, G. and Ronald, M.T. 1998. "Phylogenetic Analysis of Rumen Bacteria by Comparative Sequence Analysis of Cloned 16S rRNA Genes." **Anaerobe.** 4:153 -163.

Woese, C. R. 1987. "Bacterial evolution." **Microbiol. Rev.** 51: 221-271.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Luria Bertani Agar Medium (LB agar)

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมสารละลายทุกตัวในน้ำกลั่นประมาณ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Luria Bertani (LB)

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมสารละลายทุกตัวในน้ำกลั่นประมาณ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto-tryptone	20.0	กรัม
Yeast-extract	5.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

เตรียมในอัตราส่วนน้ำ 1 ลิตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารเคมี

1. 1M Tris-HCl (pH 8.0) buffer

Tris-base	121.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris-base ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย HCl (conc.) แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2. 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1	กรัม
NaOH		

ละลาย EDTA ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 800 มิลลิลิตร ขณะเดียวกันเติม NaOH pellet คนจนกระทั่งสารที่เติมละลายจนหมดจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลาย 5M NaOH

3. Chloroform / isoamylalchohol

Chloroform	480	มิลลิลิตร
Isoamylalchohol	20	มิลลิลิตร

ผสม Chloroform และ isoamylalchohol เข้าด้วยกัน

4. DNA extraction buffer

CTAB	1	กรัม
NaCl	4.1	กรัม
1M Tris-HCl (pH 8.0)	5	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	2	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	2	มิลลิลิตร

ละลาย CTAB, NaCl, 1M Tris-HCl (pH 8.0) และ 0.5M EDTA (pH 8.0) ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงไป

5. สารละลาย TBE (5x TBE)

Tris base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5M EDTA(pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมสารทุตัวเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อใช้งานปรับความเข้มข้นสารเป็น 1 เท่า ด้วยน้ำ

6. สารละลาย loading buffer

Bromophenol blue	25%	
Glycerol	30 %	
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

7.สารละลาย TB

PIPES	10	มิลลิโมลาร์
$MnCl_2$	55	มิลลิโมลาร์
$CaCl_2$	15	มิลลิโมลาร์
KCl	250	มิลลิโมลาร์

3. การเตรียมCompetent cell (*E.coli* DH5α)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในฟลาสก์ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร SOB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่าประมาน 0.6 จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดเซ็นตริฟิวจ์แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง Competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4. อุปกรณ์

1) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow model: NUARE)

2) CO_2 incubator (model: Memmert)

3) ไมโครปิเปต (micropipette) และ Tip ฆ่าเชื้อ

4) เครื่องชั่งอิเลกโทรนิค (Monobloo PB3002-5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter model: METTLER TOLEDO MP220)

6) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge model: SORVALL pico)

7) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer model VORTEX-GENIE2)

8) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

9) เครื่องพีซีอาร์ (PCR model: MJ Research DYADAL 1244, USA)

10) เครื่องอิเลกโตรโฟริซิส (Electrophoresis model: Gel Mate2000)

11) เตาให้ความร้อน (Digital Dry Bath Incubater : BOEKEL)

12) ตู้ดูดควัน

13) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ

14) ตู้เลี้ยงเชื้อ (Innova 40 incubator Shaker Sewies)

5. สารเคมี

1) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ An *et al.* (2005) (ภาคผนวก ก)

2) สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ของบริษัท Fermentas Inc. (USA)

3) ชุดแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ Wizard® DNA Clean-Up System ของบริษัท Promega (USA.)

4) สารเคมีชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของบริษัทQIAGEN® (USA.)

5) ชุดโคลนนิ่ง (InsTAclone™ PCR Cloning Kit) พลาสมิด pTZ57R/T Vector ของบริษัท Fermentas Inc. (USA)

6) อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Luria-Bertani medium (LB medium) และ Agar plates (LB plate) (ภาคผนวก ก)

7) เอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Rsa*I (GCG↓C) และ *Hha*I (GT↓AC) ของบริษัท Fermentas Inc. (USA.)

8) สารเคมีชุดสกัดพลาสมิด (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของบริษัท Fermentas Inc. (USA.)

9) ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus และ Lambda DNA/HindIII Marker (ภาพที่ 3.1) ของบริษัท Fermentas Inc. (USA.)

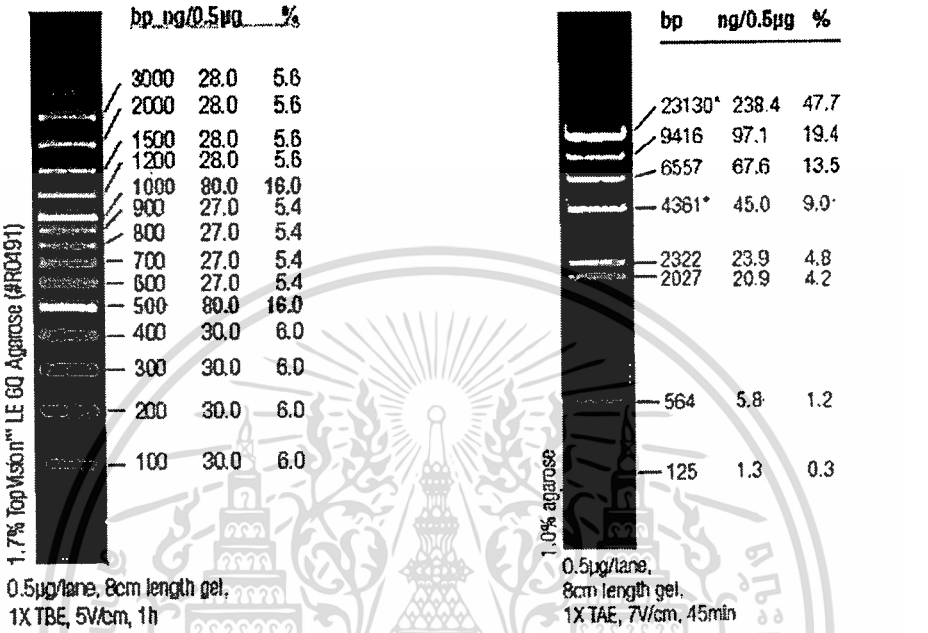
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

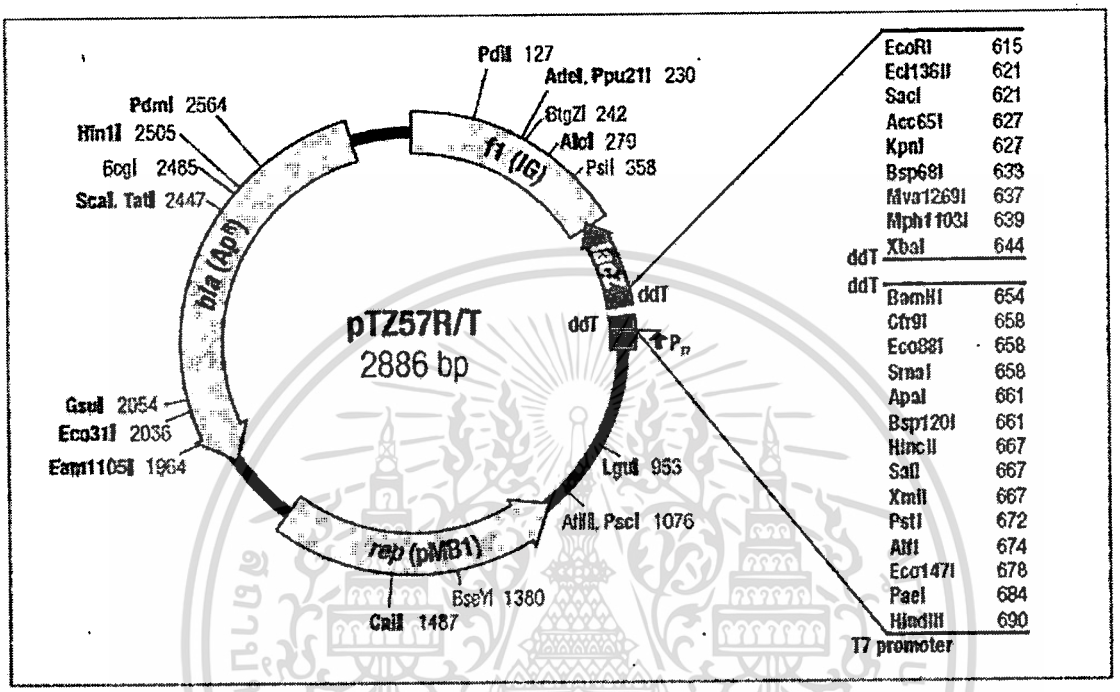
ภาพที่ ข.1 การเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนของโค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.2 แสดงขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานของ 100bp DNA Ladder และ Lambda DNA/*Hind*III Marker ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.3 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T Vector (Fermentas Inc., USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 ผลการ Classification ของโคลนจำนวน 177 โคลน โดยการใช้โปรแกรม BLAST ฐานข้อมูล GenBank และ Similarity Classifier จากฐานข้อมูล RDPII

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF2	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ subsurface water	DQ336969	1489	99%
CF5	SR1	URB/ Holstein heifer	EU381782	1449	99%
CF8	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	UB/surface-sterilized plant stem	AB114268	1502	99%
CF10	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	AB270091	1465	99%
CF11	LGCGPB/Clostridia	URB clone: U28-B02/ Holstein heifer	AB185668	1410	96%
CF12	CFB/Bacteroidetes	URB clone BS11/ cow rumen	AY244965	1441	96%
CF14	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	Ruminobacter amylophilus	Y15992	1350	97%
CF15	LGCGPB/Clostridia	URB clone L7B_C07/ Holstein heifer	EU381742	1458	99%
CF16	LGCGPB/Mollicutes	URB clone YNRC86 /Bos taurus	EF686597	1381	94%
CF17	LGCGPB/Clostridia	UBR clone 290/ gut proctodeal	EF454110	1324	91%
CF18	LGCGPB/Clostridia	URB clone: F23-B02/ Holstein heifer	AB185517	1460	97%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF20	LGCGPB/Clostridia	URB clone: U28-B02/ Holstein heifer	AB185668	1431	96%
CF22	CFB/Bacteroidetes	URB clone BF27/ cow rumen	AY244905	1415	93%
CF23	LGCGPB/Clostridia	URB clone SR20/ reindeer	DQ394641	1452	96%
CF24	CFB/Bacteroidetes	URB clone BRC71/ Bubalus bubalis	EF436357	1435	95%
CF25	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB EV818CFSSAHH4/ subsurface water	DQ336969	1481	98%
CF26	CFB/Bacteroidetes	UBR clone GRC37/ Bos frontalis	DQ673502	1457	98%
CF27	LGCGPB/Clostridia	URB clone: F24-F10 / Holstein heifer	AB185631	1400	95%
CF29	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB HOClCi25/ drinking water	AY328574	1477	99%
CF30	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	URB P5_D09/ Holstein heifer	EU382019	1487	99%
CF31	CFB/Bacteroidetes	URB clone YRC44/ Bos grunniens (yak)	EU259420	1355	90%
CF32	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	AB270033	1349	95%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF33	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	AB270067	1375	99%
CF34	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	EU381738	1483	99%
CF37	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	AB269980	1446	96%
CF38	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381670	1417	97%
CF39	LGCGPB/Clostridia	URB clone YRC47/ yak (*Bos grunniens*)	EU259423	1443	98%
CF40	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381927	1486	99%
CF42	LGCGPB/Mollicutes	URB/ Holstein heifer	EU381999	1461	96%
CF44	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	Ruminobacter amylophilus	Y15992	1493	99%
CF45	Proteobacteria/ Alphaproteobacteria	URB / Holstein heifer	EU381783	1353	93%
CF102	LGCGPB/Clostridia	UB / Dugong feces	AB218321	1379	94%
CF105	CFB/Bacteroidetes	URB/ Bos frontalis	DQ673480	1448	96%
CF107	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ drinking water	AY328574	1474	99%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF108	CFB/Bacteroidetes	URB/African zebucattle (*Bos inbicus*)	AB185570	1462	98%
CF109	LGCGPB/Clostridia	URB/ *Bubalus bubalis*	EF436338	1456	98%
CF112	Fibrobacteres	URB/ Holstein heifer	EU381839	1451	97%
CF113	Bacteroidetes	URB/ Yak (*Bos grunniens*)	EU259414	1442	96%
CF114	CFB/Bacteroidetes	URB/ Cow rumen	AY244894	1405	93%
CF115	LGCGPB/Clostridia	URB/ Cow rumen	AY570581	1404	90%
CF121	Cyanobacteria	UB/ Mouse cecum	EF602798	1384	93%
CF123	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381869	1434	95%
CF 125	LGCGPB/Bacilli	URB/ Cow rumen	EF686544	1384	92%
CF126	LGCGPB/Mollicutes	URB/ Holstein heifer	EU381913	1401	95%
CF128	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ Drinking water	AY328574	1461	98%
CF133	CFB/ Verrucomicrobia	uncultured eubacterium WCHB1-25	AF050559	1334	88%
CF135	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	EU381891	1391	93%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF145	LGCGPB/Clostridia	UB/ human faecal sample	AM277375	1434	97%
CF146	LGCGPB/Clostridia	URB/ Cow rumen	EF436396	1484	97%
CF151	LGCGPB/Clostridia	URB/ *Bos frontalis*	DQ673552	1462	99%
CF152	Proteobacteria/ Alphaproteobacteria	UB/ deep sea samples	AM743175	1422	98%
CF159	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ drinking water	AY328574	1482	99%
CF160	Proteobacteria/ Deltaproteobacteria	UB/ membrane bioreactor	EU015103	1453	97%
CF166	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	AB185758	1475	98%
CF168	LGCGPB/Mollicutes	URB/ Holstein heifer	EF686597	1466	98%
CF169	LGCGPB/Clostridia	*Bubalus bubalis*	EF436396	1494	98%
CF170	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381534	1384	93%
CF173	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	AM265444	1141	86%
CF174	CFB/Bacteroidetes	URB/ dairy cow rumen	EF445233	1428	95%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF180	CFB/Bacteroidetes	URB clone BRC106/ cow rumen	EF436392	1432	98%
CF183	CFB/Bacteroidetes	UBR/ dairy cow rumen	EF445231	1482	93%
CF185	CFB/Bacteroidetes	UBR/ cow rumen	AY244905	1491	92%
CF186	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381454	1391	98%
CF188	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ drinking water	AY328574	1484	98%
CF189	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381931	1487	97%
CF191	Cyanobacteria	UB/mouse cecum	EF602911	1474	93%
CF192	CFB/Bacteroidetes	UBR/ dairy cow rumen	AY244950	1498	95%
CF195	LGCGPB/Clostridia	UBR/*Bubalus bubalis*	EF686608	1494	92%
CF196	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EF686597	1481	92%
CF198	CFB/Bacteroidetes	UBR/ dairy cow rumen	AY244931	1476	92%
CF199	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	AB270026	1509	95%
CF201	Dictyoglomi	UB/ drinking water	AY328574	1417	100%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF202	LGCGPB/Clostridia	URB/ Cow rumen	EF686613	1483	98%
CF203	LGCGPB/Mollicutes	URB/ Holstein heifer	EU381546	1410	91%
CF204	LGCGPB/Clostridia	URB/*Bubalus bubalis*	EF436438	1431	96%
CF213	Cyanobacteria	URB/dairy cow rumen	EF445288	1424	95%
CF214	CFB/Bacteroidetes	URB/ cow rumen	AB185544	1414	94%
CF215	CFB/Bacteroidetes	URB/ cow rumen	EF686531	1363	90%
CF218	SR1	URB/ Holstein heifer	EU382051	1423	97%
CF219	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ subsurface water	DQ336969	1494	99%
CF220	LGCGPB/Clostridia	URB/ *Bubalus bubalis*	EF436391	1472	98%
CF221	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381454	1454	98%
CF222	CFB/Bacteroidetes	URB/ *Bos frontalis*	DQ673502	1453	97%
CF223	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	AB270091	1470	99%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF225	LGCGPB/Clostridia	URB clone L3A_E08/ Cow rumen	EU381461	1384	94%
CF226	Verrucomicrobia	URB/ Cow rumen	AB185519	1452	99%
CF227	LGCGPB/Mollicutes	URB/*Bos frontalis*	DQ673492	1492	97%
CF228	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ Subsurface water	DQ336969	1495	99%
CF230	CFB/Bacteroidetes	URB/ Reindeer	DQ394626	1401	93%
CF231	CFB/Bacteroidetes	URB/ cow rumen	AB185524	1371	91%
CF232	Cyanobacteria	URB/ Holstein heifer	AB270013	1435	96%
CF234	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	AY570590	1378	91%
CF235	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EU381813	1447	93%
CF236	CFB/Bacteroidetes	URB/ *Bos frontalis*	DQ673563	1463	98%
CF240	CFB/Bacteroidetes	URB/ Dairy cow rumen	EF445222	1421	95%
CF241	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	Ruminobacter amylophilus	Y15992.	1522	96%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF243	LGCGPB/Clostridia	URB/ Holstein heifer	EF686608	1451	97%
CF244	Cyanobacteria	URB / dairy cow rumen	AF544207	1392	93%
CF245	CFB/Bacteroidetes	URB/ yak (*Bos grunniens*)	EU259420	1351	89%
CF246	Proteobacteria/ Deltaproteobacteria	UB/ membrane bioreactor	EU015103	1492	97%
CF247	CFB/Bacteroidetes	URB/ yak (*Bos grunniens*)	EU259464	1434	97%
CF248	Spirochaetes	Hypersaline microbial mat	EU245551	1318	86%
CF253	CFB/Bacteroidetes	URB/ Dairy cow rumen	EF445218	1420	95%
CF256	Verrucomicrobia	URB/ Holstein heifer	EU381685	1366	93%
CF257	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	URB / Holstein heifer	AB185751	1509	98%
CF258	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	EU381999	1454	95%
CF259	CFB/Bacteroidetes	URB/ Dairy cow rumen	EF686513	1428	97%
CF261	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	UB CAP_aah97e03/ subsurface water	EU459455	1371	99%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF262	LGCGPB/Bacilli	URB / sheep rumen	AB239489	1479	99%
CF264	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	URB / Holstein heifer	AB185751	1488	99%
CF265	Proteobacteria/ Deltaproteobacteria	UB/ membrane bioreactor	EU015103	1443	97%
CF267	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	URB / Holstein heifer	AB185751	1494	99%
CF268	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ Soil	EF471221	1492	99%
CF269	Verrucomicrobia	URB/ Holstein heifer	EU381781	1398	91%
CF270	LGCGPB/Clostridia	URB/African Zebu cattle (*Bos indicus*)	AY854277	1471	98%
CF271	LGCGPB/Clostridia	URB/*Bubalus bubalis*	EF436395	1492	98%
CF272	LGCGPB/Clostridia	URB/*Bubalus bubalis*	EF436340	1472	98%
CF273	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	AB185616	1483	99%
CF279	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	URB / Holstein heifer	AB185751	1496	99%
CF281	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ subsurface water	DQ336969	1491	99%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF283	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	EF454110	1494	91%
CF286	Lentisphaerae	URB clone RFN4/ dairy cow rumen	AB009195	1376	97%
CF288	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	EU381813	1442	97%
CF290	LGCGPB/Clostridia	URB clone L3A_E08 / Holstein heifer	EF686608	1384	95%
CF294	CFB/Bacteroidetes	Uncultured Prevotella sp.	AM420056	1332	90%
CF296	CFB/Bacteroidetes	URB clone YNRC32/ Dairy cow rumen	EF686543	1432	98%
CF297	LGCGPB/Clostridia	URB clone YNRC86/ Dairy cow rumen	EF686597	1378	93%
CF342	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	EU381949	1403	95%
CF343	CFB/Bacteroidetes	URB/ *Bubalus bubalis*	EF436380	1378	91%
CF344	LGCGPB/Mollicutes	URB/*Bos frontalis*	DQ673492	1491	97%
CF352	LGCGPB/Clostridia	URB clone L7A_H10/ Holstein heifer	EU381593	1402	96%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF353	CFB/Bacteroidetes	URB clone YNRC54/ Dairy cow rumen	EF686565	1446	99%
CF356	Fibrobacteres	Fibrobacter succinogenes	AJ505938	1407	99%
CF357	LGCGPB/Clostridia	URB clone L3B_E05/ Holstein heifer	EU381550	1370	94%
CF358	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ subsurface water	DQ336969	1491	99%
CF359	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	EU381985	1454	97%
CF364	CFB/Bacteroidetes	URB/ yak (*Bos grunniens*)	EU259395	1464	98%
CF367	CFB/Bacteroidetes	URB clone NED5E4/ Environment sample	EF445263	1411	96%
CF369	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	EF686543	1398	98%
CF372	Verrucomicrobia	URB clone P5_J1/ Dairy cow rumen	EU381980	1354	98%
CF373	CFB/Bacteroidetes	URB clone BRC95/ Dairy cow rumen	EF436381	1420	97%
CF374	CFB/Bacteroidetes	URB/Dairy cow rumen	AB270064	1371	93%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF375	Verrucomicrobia	URB clone P5_L05/ Dairy cow rumen	EU381781	1372	93%
CF376	CFB/Bacteroidetes	URB clone GRC33/ Dairy cow rumen	DQ673498	1403	96%
CF251	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	UB/ drinking water	AY328574	1440	99%
CF378	LGCGPB/Mollicutes	URB clone RH_aaj91d03 / Holstein heifer	EU381999	1227	96%
CF380	Verrucomicrobia	URB clone P5_L05/ Holstein heifer	EU381980	1370	98%
CF381	LGCGPB/Clostridia	URB/ *Bubalus bubalis*	EF436340	1460	99%
CF382	LGCGPB/Clostridia	URB RCP10/ Dairy cow rumen	AF001727	1385	97%
CF383	CFB/Bacteroidetes	URB/ Cow rumen	AY244933	1436	95%
CF384	Verrucomicrobia	UB clone Z42	DQ353920	1346	90%
CF386	LGCGPB/Clostridia	UB/ rabbit cecum	EF445200	1420	94%
CF387	LGCGPB/Erysipelotrichi	UBclone RH_aaj91d03	EU461513	1227	95%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF388	LGCGPB/Clostridia	URB/ *Bubalus bubalis*	EF436450	1487	99%
CF389	LGCGPB/Mollicutes	UB/adult hoatzin crop	EU344299	1368	92%
CF390	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	URB clone P5_I03/ Holstein heifer	EU381934	1325	88%
CF392	LGCGPB/Clostridia	URB/ *Bubalus bubalis*	EF436306	1460	98%
CF394	Proteobacteria/ Betaproteobacteria	betaproteobacterium A0647	AF236007	1455	99%
CF396	CFB/Bacteroidetes	URB/ Swine intestine	AF371914	1332	91%
CF398	CFB/Bacteroidetes	URB/ Cow rumen	EF686519	1462	97%
CF399	CFB/Bacteroidetes	URB/ Holstein heifer	AB269965	1420	93%
CF400	LGCGPB/Bacilli	URB clone R-25 / sheep rumen	AB239489	1450	99%
CF408	LGCGPB/Clostridia	URB/ Yunnan Yellow Cattle (*Bos Taurus*)	EF686608	1460	97%
CF410	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	AB270117	1402	99%
CF412	LGCGPB/Clostridia	URB / Holstein heifer	AB185647	1345	89%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

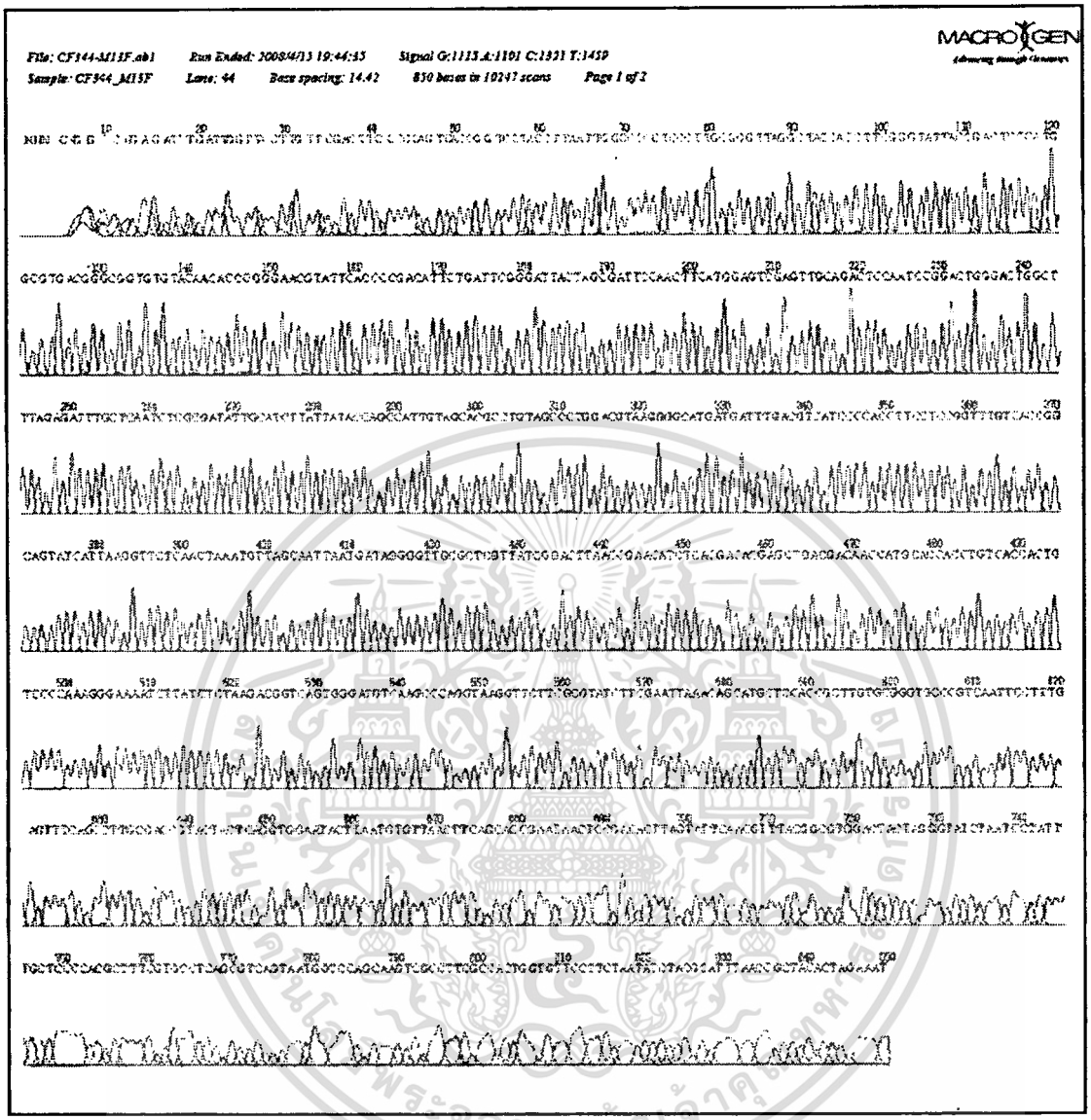
ตารางที่ ข.1 (ต่อ)

Clones No.	Bacterial division/subdivision	Nearest relative/sources	GenBank Accession No.	Length	% identity
CF413	LGCGPB/Erysipelotrichi	UB clone AE2_aaa04c07	EU471772	1269	96%
CF414	CFB/Bacteroidetes	URB/ Dairy cow rumen	EF445218	1414	95%
CF419	LGCGPB/Clostridia	URB/ African Zebu cattle (*Bos indicus*)	AY854277	1467	98%
CF425	LGCGPB/Clostridia	UB/ human faecal	AM277375	1439	97%
CF426	Tenericutes Mollicutes	URB clone P5_B24/ dairy cow rumen	EU381913	1341	94%
CF428	Proteobacteria/ Gammaproteobacteria	Ruminobacter amylophilus	Y15992	1414	97%
CF431	SR1	URB clone P5_E10/ dairy cow rumen	EU381859	1410	99%
CF442	LGCGPB/Clostridia	URB / Dairy cow rumen	AB185777	1366	98%
CF443	CFB/Bacteroidetes	URB/ Cow rumen	AF018497	1344	95%
CF446	Cyanobacteria	UB clone JSC9-J/ Mouse cecum	DQ532257	1414	98%
CF448	LGCGPB/Clostridia	URB / Dairy cow rumen	AB185777	1412	96%

LGCGPB: Low G+C Gram-positive bacteria, CFB: *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

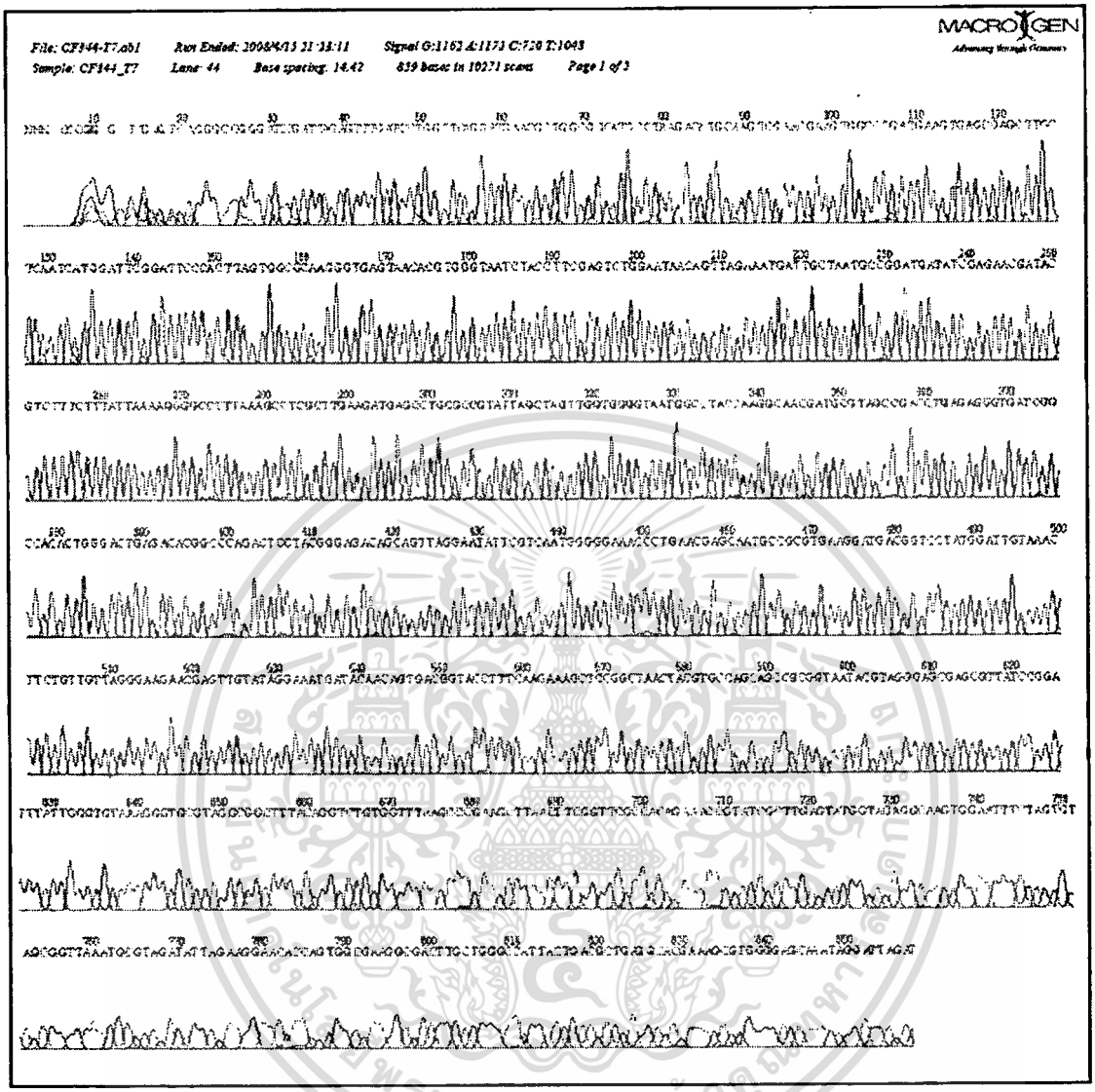
URB: Uncultured rumen bacterium, UB: Uncultured bacterium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



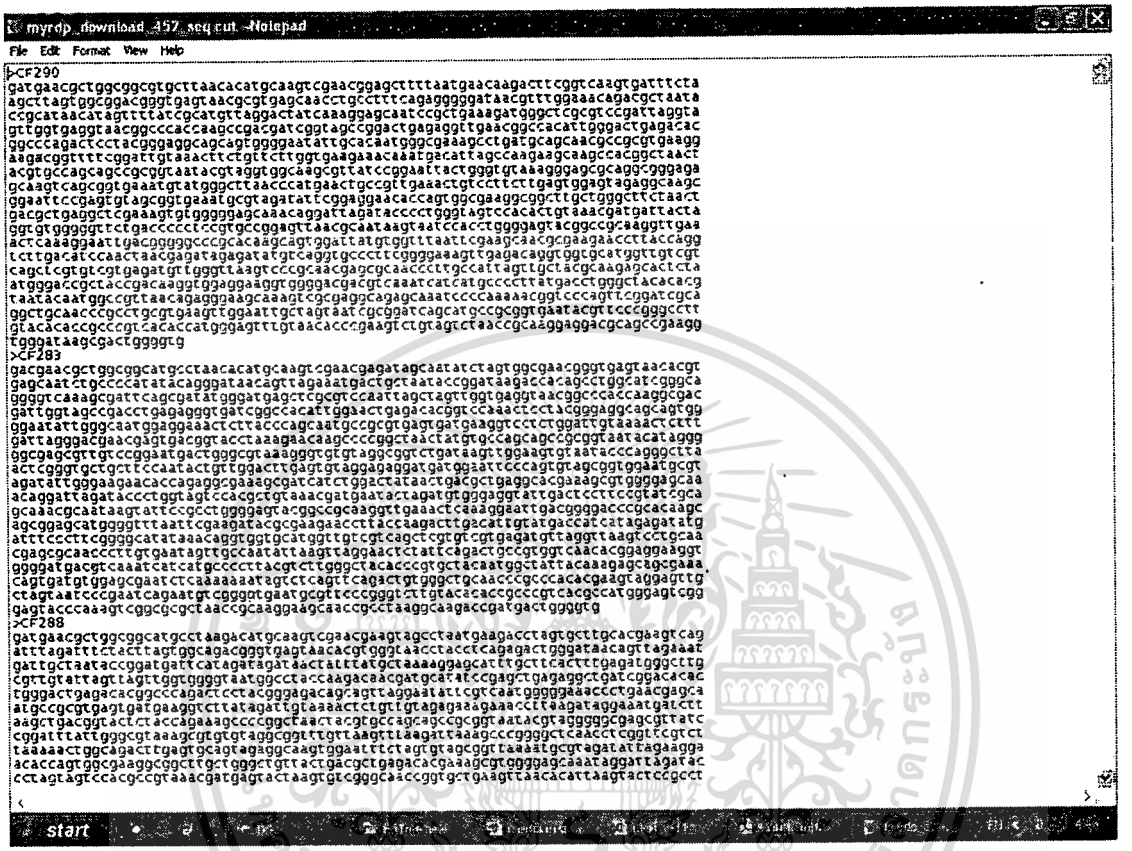
ภาพที่ ข.4 แสดง sequencing electropherogram ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ตัวอย่างที่ CF344 primer M13F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



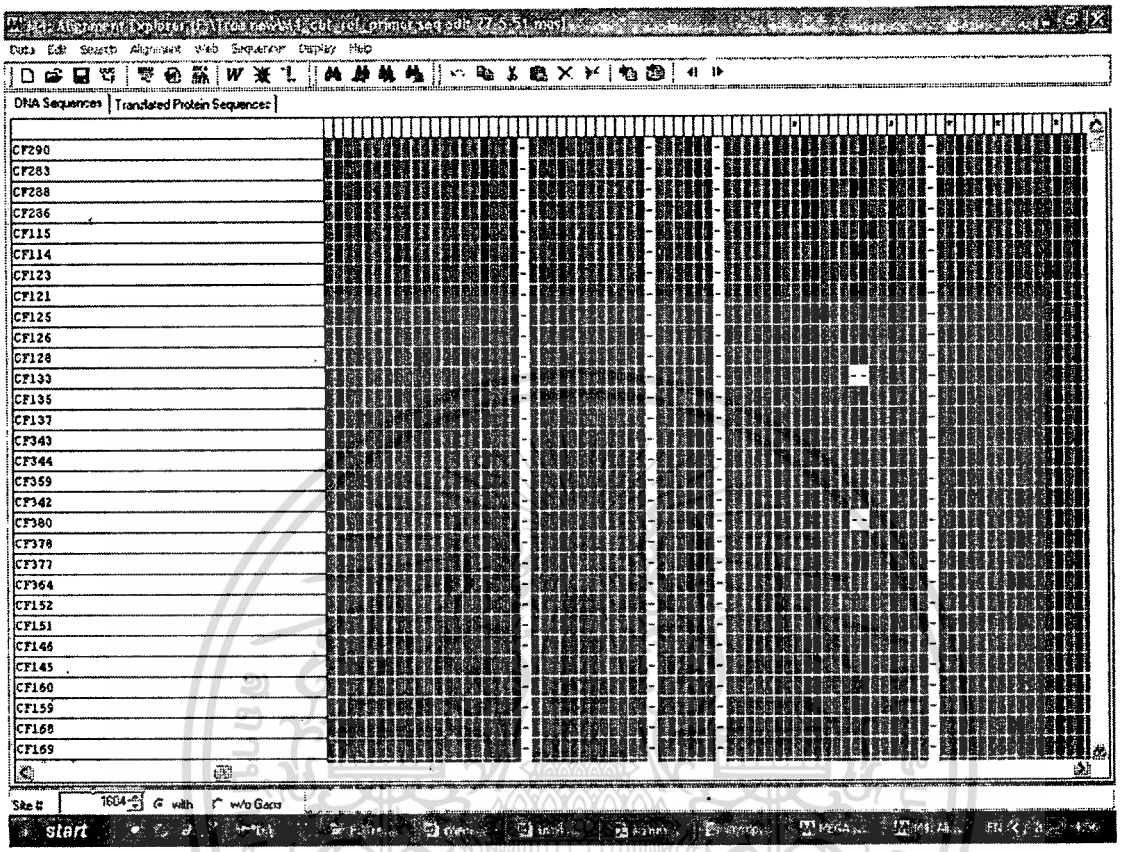
ภาพที่ ข.4 (ต่อ) แสดง sequencing electropherogram ของแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ตัวอย่างที่ CF344 primer T7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



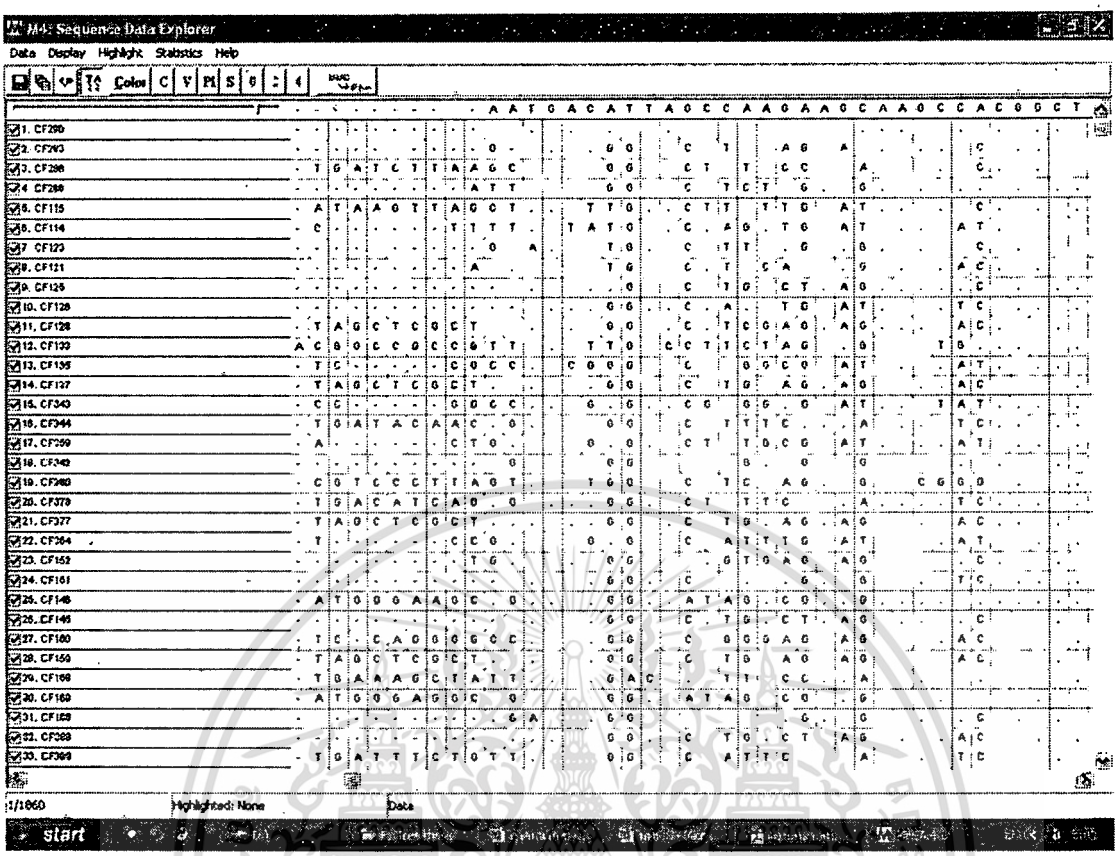
ภาพที่ ข.5 แสดงตัวอย่างรูปแบบการจัดเรียงข้อมูลเข้าโปรแกรมแบบ FASTA format

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.6 แสดงตัวอย่างลำดับเบสที่ถูกจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม Clustal W

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.7 แสดงรูปแบบของ MEG File ก่อนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	:	นายอภิชาติ พันชูกลาง
เกิดเมื่อ	:	วันที่ 15 มกราคม พ.ศ.2525
สถานที่เกิด	:	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	:	96/1 ม.3 ต.ห้วยไผ่ อ.เมือง จ.ราชบุรี 70000
การศึกษา	:	ระดับประถมศึกษา โรงเรียนวัดอรุณรัตนคีรี
	:	ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี
	:	ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สัตวศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 2) สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยา หันตรา

ประสบการณ์ทำงาน

พ.ศ. 2547	:	ผู้ช่วยนักวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
พ.ศ. 2548	:	เจ้าหน้าที่สัตวบาลฟาร์ม บริษัทฟาร์มกรุงไทย จำกัด
พ.ศ. 2548	:	เจ้าหน้าที่สัตวบาลฟาร์ม บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อุตสาหกรรมอาหาร จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้