

การแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ Oxidative phosphorylation
และ Tight junction และสัณฐานวิทยาของ Tight junction ในลำไส้เล็ก
ส่วนกลางในไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่างกัน



นางสาวสุกฤตา กองทุ่งมน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2567

GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN OXIDATIVE PHOSPHORYLATION,
TIGHT JUNCTION PATHWAY AND TIGHT JUNCTION MORPHOLOGY
OF JEJUNUM OF DIFFERENT FEED EFFICIENCY
IN KORAT CHICKEN

SUKRITTA KONGTHUNGMON



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2024

การแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ Oxidative phosphorylation
และ Tight junction และสัณฐานวิทยาของ Tight junction ในลำไส้เล็ก
ส่วนกลางในไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่างกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษานำฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(รศ. ดร. สจี กัณหาเรียง)

ประธานกรรมการ



(รศ. ดร. อมรรัตน์ โมฬี)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(ผศ. น.สพ. ดร. ภคนิจ คุปพิทยานันท์)

กรรมการ



(ผศ. ดร. วิทวัช โมฬี)

กรรมการ



(Asst. Prof. Dr. Satoshi Kubota)

กรรมการ



(รศ. ดร. ยุพาพร รักสกุลวัฒน์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและประกันคุณภาพ



(ศ. ดร. หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

สุกฤตา กองทุ่งมน : การแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ Oxidative phosphorylation และ Tight junction และสัณฐานวิทยาของ Tight junction ในลำไส้เล็กส่วนกลางในไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่างกัน (GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN OXIDATIVE PHOSPHORYLATION, TIGHT JUNCTION PATHWAY AND TIGHT JUNCTION MORPHOLOGY OF JEJUNUM OF DIFFERENT FEED EFFICIENCY IN KORAT CHICKEN) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ โมฬี, 56 หน้า.

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีนและโปรตีน/Tight junction/ประสิทธิภาพการใช้อาหาร/ลำไส้เล็กส่วนกลาง/Oxidative phosphorylation/ไก่โคราช

ไก่โคราชเป็นไก่ชนิดโตช้าที่เกิดจากแม่พันธุ์ มทส. และพ่อพันธุ์เหลืองหางขาวซึ่งเป็นไก่พันธุ์พื้นเมือง มีลักษณะของคุณภาพเนื้อที่มีปริมาณโปรตีนและคอลลาเจนในเนื้อสูง ไขมันต่ำ อย่างไรก็ตามไก่โคราชมีน้ำหนักตัวถึงน้ำหนักตลาดและอัตราการเจริญเติบโตต่ำ เช่น Feed conversion ratio (FCR) และ Residual feed intake (RFI) สูงเมื่อเทียบกับไก่สายพันธุ์ทางการค้า จึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์กรรมไก่ในด้านประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชเพื่อช่วยลดต้นทุนค่าอาหารในการเลี้ยงไก่โคราช ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ oxidative phosphorylation และ tight junction และสัณฐานวิทยาของ tight junction ในลำไส้เล็กส่วนกลางในไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่างกัน เพื่อนำข้อมูลในการศึกษาค้นคว้าไปทำการออกแบบโปรแกรมการคัดเลือกไก่โคราชที่เหมาะสมในการปรับปรุงพันธุ์กรรมไก่โคราชให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดียิ่งขึ้น ไก่โคราชถูกแบ่งกลุ่มตามประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยใช้ดัชนี RFI คือกลุ่ม LRFI และ HRFI และถูกนำมาเก็บตัวอย่างด้วยวิธีการลอกภายในลำไส้เล็กส่วนกลางตั้งแต่ชั้น Submucosa เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์และเทคนิคเวสเทอร์นบล็อต ผลของระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานในกระบวนการ oxidative phosphorylation ไม่พบความแตกต่างระหว่างไก่ทั้งสองกลุ่ม แต่อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการดูดซึมและรักษาสสมดุลภายในลำไส้ในกระบวนการ tight junction พบการแสดงออกของยีน *ACTN1* และ *TUBA3E* สูงในไก่กลุ่ม LRFI ส่งผลให้มีการดูดซึม ป้องกัน ซ่อมแซม และรักษาสภาพสมดุลภายในลำไส้ที่ดีกว่าไก่ในกลุ่ม HRFI และลักษณะสัณฐานวิทยาของ tight junction ได้ทำการศึกษาดูด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน พบลักษณะของ tight junction ที่ดีในไก่กลุ่ม LRFI ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าไก่กลุ่ม LRFI มีการรักษา สภาวะสมดุลภายในลำไส้ การทำงานของเซลล์เยื่อบุผิว และการดูดซึม

สารอาหารที่ดีกว่า ดังนั้นความรู้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกไก่โคราช เพื่อปรับปรุงพันธุ์กรรมของประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชได้



สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา สุกฤตา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [Signature]

SUKRITTA KONGTHUNGMON : GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN OXIDATIVE
PHOSPHORYLATION, TIGHT JUNCTION PATHWAY AND TIGHT JUNCTION
MORPHOLOGY OF JEJUNUM OF DIFFERENT FEED EFFICIENCY IN KORAT CHICKEN.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. AMONRAT MOLEE, Ph. D., 56 PP.

Keyword: FEED EFFICEINCY/GENES AND PROTEIN EXPRESSION/JEJUNUM/MORPHOLOGY/
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION/TIGHT JUNCTION/KORAT CHICKEN

The objective of this thesis was to investigate genes and protein expressions in oxidative phosphorylation, tight junction pathway, and tight junction morphology of jejunum of different feed efficiency in Korat (KR) chicken for the purpose of designing a suitable selection program and contributing to breeding more efficient chickens. Thirty 10 weeks old male KR chickens separated by RFI (Residual feed intake) into two groups, with 15 chickens per group. Chickens were fed ad libitum during the experiment. The submucosa layer was peeled and collected from the jejunum of the LRFI and HRFI chickens, and genes and protein expressions were determined by real time polymerase chain reaction and western blot analysis. A transmission electron microscope was used to determine the morphology of jejunum. The results revealed that RFI and FCR clearly showed a significant difference between the two groups. The expression of the energy production genes in oxidative phosphorylation was not different between the two groups. However, the expression of genes involved in the balance of the efficiency of the tight junction showed that increased levels of *ACTN1* and *TUBA3E* in the LRFI group have better absorption, protection, repair, and balance of the tight junction than the HRFI chickens, and a healthy morphology of the tight junction was observed in the LRFI group as well. These results indicated that LRFI chickens have better intestinal tract balance, epithelial function, and nutrient absorption. Thus, this knowledge can be applied to selection programs to improve the genetic production of KR chickens.

School of Animal Technology and Innovation Student's Signature Sukritta
Academic Year 2024 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมฬี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้การสนับสนุน รวมถึงให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านการดำเนินงานวิจัย ด้านวิชาการ ด้านทุนการศึกษา ด้านทุนการวิจัย และที่สำคัญยิ่งขอขอบคุณเป็นอย่างสูงยิ่งที่ท่านให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สละเวลาเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ดำเนินงานวิจัย ตลอดจนบุคลากรฟาร์มมหาวิทยาลัยที่คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่างๆระหว่างการดำเนินงานวิจัย จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตลอดจนบุคลากรที่อาคารเครื่องมือที่อำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาไก่เนื้อโคราช และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัยในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ และให้ทุนสนับสนุนการศึกษาจนทำให้ผู้วิจัยสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณเพื่อน พี่ น้องนักศึกษาบัณฑิตศึกษา และนักศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาทำการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดา คุณป้า ตลอดจนญาติพี่น้องทุกท่านซึ่งเป็นที่รักและเคารพ ยิ่งและเป็นกำลังใจที่สำคัญของผู้วิจัย รวมถึงครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในการเรียนระดับบัณฑิตศึกษา

สุกฤตา กองทุ่งมน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	4
2 ปรัชณวกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 สถานการณ์การบริโภคเนื้อไก่ในปัจจุบันและคุณภาพเนื้อไก่โคราช.....	5
2.2 ประสิทธิภาพการใช้อาหารระหว่างไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าและไก่โคราช.....	5
2.3 ยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร.....	7
2.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค q-PCR การแสดงออก ของโปรตีนโดยเทคนิค Western blot และ ทำการศึกษา Morphology ของลำไส้เล็กส่วนกลางโดยใช้เทคนิค TEM (Transmission electron microscope).....	12
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	15
3.1 สัตว์ทดลองและการจัดการสัตว์ทดลอง.....	15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2	การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ATP5J, ATP5H, ATP5D, ACT1, SLC9A3R1 และ TUBA3E ระหว่างโกโคราขกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้ อาหารสูงและโกโคราขกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ โดยเทคนิค q-PCR.....	20
3.3	Western blotting.....	19
3.4	การศึกษา Morphology ของ Tight junction ระหว่าง Enterocyte ของ Villi ในลำไส้เล็ก ส่วน Jejunum ในโกโคราข ด้วยเทคนิค Transmission electron microscope (TEM).....	20
3.5	การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	21
4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	22
4.1	ข้อมูลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร.....	22
4.2	ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน.....	23
4.3	ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ Tight junction เทคนิคกล้อง จุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน Transmission electron microscope (TEM) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของ Tight junction.....	28
4.4	Principal component (PC) analysis ของการแสดงออกของยีนและ โปรตีน ACTN1 สัณฐานวิทยาของ tight junction และ ประสิทธิภาพการ ใช้อาหาร (RFI).....	31
5	สรุปและข้อเสนอแนะ.....	33
5.1	บทสรุป.....	33
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	33
	รายการอ้างอิง.....	35
	ภาคผนวก.....	42
	ประวัติผู้เขียน.....	56

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การใช้เทคนิค PCR และ qPCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	12
3.1 ตารางแสดงข้อมูลการแบ่งกลุ่มของไคโคราชที่อายุ 10 สัปดาห์.....	16
3.2 ตารางแสดง Primer สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q-PCR ของยีน.....	18
4.1 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของไคโคราชเพศผู้ที่อายุ 10 สัปดาห์.....	22
4.2 ผลของระยะห่างของ Tight junction ที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารในไคโคราช กลุ่ม LRFI และ HRFI.....	28
ก.1 SDS-Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE)	46

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ATP Synthase Structure..... 9
2.2	Mechanisms of paracellular permeability 10
2.3	Transmission electron microscopic epithelial characterization 14
4.1	ผลของประสิทธิภาพการใช้อาหารของโกโคราซที่แตกต่างกันต่อระดับการแสดงออก ของยีน ATP5D, ATPH และ ATPJ ในกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน 24
4.2	ผลของประสิทธิภาพการใช้อาหารของโกโคราซที่แตกต่างกันต่อระดับการแสดงออก ของยีน ACTN1, SLC9A3R1 และ TUBA3E ในกระบวนการไทด์จังก์ชัน..... 26
4.3	ผลของประสิทธิภาพการใช้อาหารของโกโคราซที่แตกต่างกันต่อระดับการแสดงออก ของโปรตีน ACTN1 ในกระบวนการไทด์จังก์ชัน..... 27
4.4	ผลลักษณะสัณฐานวิทยาของ Tight junction (TEM, x 89,000) ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ระหว่างไก่อกลุ่ม LRFI (A, C, E) และ HRFI (B, D, F) ในโกโคราซ
ก.1	การแยกมวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 45
ก.2	การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Blotting) 47
ก.3	Primer Efficiency ของยีน GAPDH ในลำไส้เล็กส่วนกลาง 48
ก.4	Primer Efficiency ของยีน TUBA3E ในลำไส้เล็กส่วนกลาง 49
ก.5	Primer Efficiency ของยีน ATP5H ในลำไส้เล็กส่วนกลาง 49
ก.6	Primer Efficiency ของยีน SLC9A3R1 ในลำไส้เล็กส่วนกลาง 50
ก.7	ภาพประกอบเพื่อดูการแสดงออกของยีน GAPDH ในลำไส้เล็กส่วนกลางของโกโคราซ..... 50
ก.8	ภาพประกอบเพื่อดูการแสดงออกของยีน TUBA3E ในลำไส้เล็กส่วนกลางของโกโคราซ 51
ก.9	ภาพประกอบเพื่อดูการแสดงออกของยีน GAPDH ในลำไส้เล็กส่วนกลางของโกโคราซ..... 51
ก.10	ภาพประกอบเพื่อดูการแสดงออกของยีน SLC9A3R1 ในลำไส้เล็กส่วนกลางของโกโคราซ 52
ก.11	Melting Curve ของยีน GAPDH กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับ อุณหภูมิ โดยใช้ SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ด้วย เครื่อง Real Time PCR..... 52

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ก.12 Melting Curve ของยีน TUBA3E กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับอุณหภูมิ โดยใช้ SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ด้วยเครื่อง Real Time PCR.....	53
ก.13 Melting Curve ของยีน GADPH กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับอุณหภูมิ โดยใช้ SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ด้วยเครื่อง Real Time PCR.....	53
ก.14 Amplification of Jejenum TUBA3E gene expression threshold of real-time PCR reaction	54
ก.15 Amplification of Jejenum SLC9A3R1 gene expression threshold of real-time PCR reaction.....	55
ก.16 ภาพแสดงถึงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่ผิดปกติและความผิดปกติของ Tight junction (ลูกศรสีแดง) ไมโครคอนเดรียภายในเซลล์บวม (ลูกศรสีแดง) ไม่สามารถวัดระยะห่างของ Tight junction ระหว่างเซลล์ในภาพนี้ได้	55
ก.17 ภาพแสดงระยะห่างของ Tight junction (ลูกศรสีดำ) มีระยะห่างเกินจากปกติ.....	55

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADG	=	Average daily gain
ACTN1 gene	=	Alpha actinins
ATP5D gene	=	ATP synthase F1 subunit delta
ATP5H gene	=	ATP synthase subunit d
ATP5J gene	=	ATP synthase-coupling factor 6
BWG	=	Body weight gain
CIA	=	Chloroform: Isoamyl-alcohol 24:1
EBV	=	Estimated breeding value
FCR	=	Feed conversion ratio
FE	=	Feed efficiency
FI	=	Feed intake
HRFI	=	Hight residual feed intake
KR chicken	=	Korat chicken
LRFI	=	Low residual feed intake
Real-time PCR	=	Real time - polymerase chain reaction
RFI	=	Residual feed intake
SLC9A3R1 gene	=	Solute carrier family 9, subfamily A
TUBA3E gene	=	Tubulin alpha-3E

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

ไก่โคราชเป็นไก่ชนิดโตช้าที่พัฒนามาจากแม่พันธุ์ มทส. และพ่อพันธุ์เหลืองหางขาว (ไก่พันธุ์พื้นเมือง) และมีลักษณะของคุณภาพเนื้อที่มีปริมาณโปรตีน คอลลาเจนในเนื้อสูง ไชมันต่ำ (Ketemala et al., 2021; Sangsawad et al., 2016) และยังมีปริมาณฟิวรีนที่เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคเกาต์ต่ำ เมื่อเทียบกับเนื้อไก่ทั่วไป (Kubota et al., 2019) แต่เนื่องจากไก่โคราชเป็นไก่ชนิดโตช้า น้ำหนักตัวถึงน้ำหนักตลาด (ประมาณ 1.2 กก.-1.3 กก.) ภายในอายุ 9 ถึง 10 สัปดาห์ (Hang et al., 2018) มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าไก่ทั่วไป คือ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) และปริมาณอาหารที่คาดเคลื่อนจากความต้องการสูง (Residual feed intake; RFI) ทำให้การเลี้ยงไก่โคราชใช้ระยะเวลาและต้นทุนในการเลี้ยงสูงกว่าเมื่อเทียบกับไก่สายพันธุ์ทางการค้า (Kubota et al., 2019) ประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ต่ำกว่าของไก่โคราชถือเป็นข้อเสียที่สำคัญสำหรับเกษตรกร

ที่ผ่านมาทีมงานวิจัยที่ให้ความสำคัญกับการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Ravindran, 2021) ของไก่เพื่อลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์เป็นแก้ปัญหาดังกล่าว โดยทำการคัดเลือกไก่โดยพิจารณาจากลักษณะบ่งชี้ประสิทธิภาพการใช้อาหารได้แก่ FCR และ RFI ซึ่งทั้งสองลักษณะถือเป็นลักษณะที่อาศัยกลไกในร่างกายของไก่จากการใช้อาหารมาเป็นข้อพิจารณา อย่างไรก็ตาม FCR จัดเป็นค่าดัชนีรวมซึ่งแสดงถึงปริมาณอาหารที่กินได้เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำหนักตัวโดยไม่คำนึงถึงการใช้ประโยชน์ด้านการดำรงชีวิต ในขณะที่เดียวกับการคัดเลือกสัตว์จากค่า FCR อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อสองลักษณะ FI และ BWG (Body weight gain) ทำให้ไม่สามารถชี้วัดประสิทธิภาพการใช้อาหารได้อย่างแม่นยำ จากเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ค่า FCR (Yi et al., 2018) ในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ RFI เป็นดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยคำนวณจากผลต่างระหว่างอาหารที่กินได้จริง (actual feed intake) และอาหารที่ควรได้รับจากการคำนวณ (expected feed intake) หากไก่กินอาหารต่ำกว่ามาตรฐานที่คำนวณได้แสดงว่าอาหารถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (RFI ต่ำ) และไม่มีผลกระทบต่อทำให้ผลผลิต จากผลการวิจัยของ Zamani et al. (2008) ชี้ให้เห็นว่าลักษณะ RFI มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นดัชนีประสิทธิภาพการใช้อาหาร และยังสามารถใช้วิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางด้านผลผลิตต่างๆ ได้โดยวิเคราะห์ในรูปของดัชนีการคัดเลือก (selection index) ดังนั้น RFI จึงเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการปรับปรุงประสิทธิภาพการให้พลังงานในสัตว์ปีก (Xu et al., 2016; Willems et al., 2013) เพื่อนำไปปรับปรุงพันธุ์กรรมและใช้ในการคัดเลือกสัตว์รายตัวต่อไป

การเพิ่มความสามารถทางพันธุกรรมของไก่ในด้านประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร จากการศึกษาของ Yang et al. (2020) ได้ทำการศึกษายีนและ Pathway สำคัญที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่พื้นเมืองจีนพบว่ามียีน *D2*, *ND4*, *CYTb*, *RAC2*, *VCAM1*, *CTSS* และ *TLRU* ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร และ Oxidative phosphorylation pathway และ pathway อื่นๆ ซึ่งมีความสำคัญและส่งผลให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่พื้นเมือง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sinpru et al. (2021) ซึ่งพบ immune response, glutathione metabolism, vitamin transport and metabolism, lipid metabolism, and neuronal และ cardiac maturation pathway ต่างๆ ในกลไกการทำงานในระดับโมเลกุลในลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) ที่ส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของ Jejunum และยังสอดคล้องกับ Kaewsatuan et al. (2022) ได้ทำการศึกษา Proteomic ถึงความแตกต่างของประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชซึ่งพบโปรตีน *ATP5J*, *ATP5H*, *ATP5D*, *ACNT1*, *SLC9A3R1* และ *TUBA3E* ที่มีความสำคัญกับการทำงานของ Oxidative phosphorylation pathway และ Tight junction pathway ซึ่งการทำงานของ pathway ดังกล่าวมีผลต่อกระบวนการสร้างพลังงาน (ATP) และกระบวนการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกายส่งผลต่อความแตกต่างของประสิทธิภาพการใช้อาหารในไก่โคราช

การผลิตพลังงานส่วนใหญ่ของเซลล์ยูคาริโอตเกิดขึ้นจากปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Bottje et al., 2006) ขั้นตอนสุดท้ายของการ Oxidative phosphorylation ดำเนินการโดย ATP synthase หรือ Complex V ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนโดยโปรตีน *ATP5J*, *ATP5H* และ *ATP5D* ทำหน้าที่เป็นโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่อยู่ใน ATP Synthase มีหน้าที่สร้างพลังงานในกระบวนการ Oxidative phosphorylation เพื่อนำพลังงานมาใช้ในการดำรงชีวิตและการสร้างผลผลิต ก่อนหน้านี้นี้มีรายงานว่าโปรตีนชนิดเดียวกันมีอยู่มากในกระเพาะรูเมนของ L-RFI steer (Kong et al, 2016) และในกล้ามเนื้ออกของไก่ L-RFI (Yang et al., 2020) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังเป็นที่รู้จักในฐานะแหล่งสำคัญของชนิดออกซิเจนที่เกิดปฏิกิริยา ROS (reactive oxygen species) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) ผลิตโดยห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างกระบวนการ oxidation phosphorylation และ Kaewsatuan et al. (2022) ได้พบว่า ไก่ที่มีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำไม่สามารถขจัด ROS ที่มากเกินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับไก่ที่มีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง และ Tight junction เกี่ยวข้องกับการทำงานทางสรีรวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีผลต่อการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก (Choct, 2009) ความคงตัวของ Tight junction นั้นมีผลกระทบต่อความสามารถในการซึมผ่านของสิ่งกีดขวางในลำไส้ การวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าความสมบูรณ์ของ Tight junction และการซึมผ่านของพาราเซลล์ลาร์นั้นสัมพันธ์กับการควบคุมโครงร่างของ Actin และความแข็งแรงของการยึดเกาะระหว่างเซลล์ (Bruewer et al., 2004) ในการศึกษาของ

Kaewsatuan et al. (2022) พบโปรตีน *ACTN1*, *SLC9A3R1* และ *TUBA3E* ซึ่งโปรตีนทั้งสามเกี่ยวข้องกับ Tight junction pathway

อย่างไรก็ตามเพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่ทำงานในกระบวนการ Oxidative phosphorylation pathway และ Tight junction pathway รวมถึงสัญญาณวิทยาของ Tight junction ภายในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราชต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่ทำงานในกระบวนการ Oxidative phosphorylation pathway และ Tight junction pathway ในไก่โคราชเพื่อยืนยันว่าการแสดงออกของยีนและโปรตีนเหล่านี้ที่แตกต่างกันส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราช และต้องการศึกษาลักษณะสัญญาณวิทยาของ Tight junction ในลำไส้เล็กส่วนกลางว่ามีผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชด้วยหรือไม่ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์เชิงลึกของการทำงานในระดับโมเลกุลที่มีผลมาจากระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราช และลักษณะสัญญาณวิทยาของ Tight junction เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์กรรมไก่โคราช ให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน ในกระบวนการ Oxidative phosphorylation และกระบวนการ Tight junction ระหว่างไก่โคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงและไก่โคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราช

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนต่อสัญญาณวิทยาของ Tight junction ต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราช

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 พบความแตกต่างของระดับของการแสดงออกของยีนและโปรตีน ในกระบวนการ Oxidative phosphorylation และกระบวนการ Tight junction ในลำไส้เล็กส่วนกลางระหว่างไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่แตกต่างกัน

1.3.2 ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ Tight junction มีผลต่อความแตกต่างของสัญญาณวิทยาของ Tight junction ในลำไส้เล็กส่วนกลางและส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราช

1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความแตกต่างของระดับของการแสดงออกของยีนและโปรตีนโปรตีนในกระบวนการ Oxidative phosphorylation และกระบวนการ Tight junction ในลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) ระหว่างไก่โคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงและไก่โคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ โดยไก่โคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงได้มาจากพ่อและแม่พันธุ์ที่มีค่า EBV (Estimated breeding value) ของน้ำหนักตัวสูง และไก่โคราชกลุ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำได้มาจากพ่อและแม่พันธุ์ที่มี EBV ของน้ำหนักตัวต่ำ

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

พบว่าการแสดงออกของยีนและโปรตีนในการศึกษาครั้งนี้ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราช และพบว่าผลของความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ Tight junction ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชเช่นเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการพิสูจน์ว่ายีนและโปรตีนเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นยีนหรือโปรตีนเครื่องหมายได้ และนำความรู้ไปใช้ในการสร้างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหรืออาจนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่เพื่อใช้ในการคัดเลือกไก่โคราช เพื่อปรับปรุงพันธุ์กรรมของไก่โคราชให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดียิ่งขึ้น

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สถานการณ์การบริโภคเนื้อไก่ในปัจจุบันและคุณภาพเนื้อไก่โคราช

เนื้อไก่เป็นเนื้อสัตว์ที่ประชากรทั่วโลกให้การยอมรับและนิยมรับประทาน (Godfray et al., 2010) คาดว่าในปี 2050 ประชากรทั่วโลกจะต้องการอาหารเพิ่มมากขึ้น 70–100% และ UNDESA et al. (2015) คาดว่าผู้สูงอายุในประชากรโลกจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งผู้สูงอายุเป็นกลุ่มผู้บริโภคที่ให้ความสนใจกับลักษณะเชิงคุณภาพของอาหารที่รับประทานมีความต้องการบริโภคเนื้อไก่ที่มีคุณภาพดีและมีประโยชน์ต่อร่างกาย (Yang et al., 2015) ซึ่งเนื้อของไก่โคราชสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคกลุ่มนี้ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเนื้อไก่โคราชที่อายุจับขาย (8 – 10 สัปดาห์) เปรียบเทียบกับไก่เนื้อทั่วไปที่อายุจับขาย 6 สัปดาห์ ในด้านคุณสมบัติทางเคมีพบว่าเนื้อไก่โคราชมีปริมาณ ปริมาณ Crude Protein ในเนื้อไก่โคราชทั้งเนื้ออกและเนื้อสะโพกมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าเนื้อไก่ทั่วไป แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งชี้ว่าเนื้อไก่โคราชสามารถให้พลังงานได้สูงกว่าเนื้อไก่ทั่วไปเมื่อรับประทานในปริมาณที่เท่ากัน ปริมาณ Total lipid ในเนื้อไก่โคราชทั้งเนื้ออกและเนื้อสะโพกต่ำกว่าในเนื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณคอเลสเตอรอล เนื้อไก่โคราชทั้งเนื้ออกและเนื้อสะโพกมีปริมาณคอเลสเตอรอลน้อยกว่าเนื้อไก่ทั่วไป แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณคอเลสเตอรอล โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประเภทหนึ่ง สามารถสรุปได้ว่าเนื้อไก่โคราชขนาด market size มีคุณภาพที่ดี คุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้ไก่โคราชสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้

2.2 ประสิทธิภาพการใช้อาหารระหว่างไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าและไก่โคราช

เนื่องจากไก่โคราชเป็นไก่ชนิดโตช้า ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างไก่พันธุ์ไทยเพศผู้ (เหลื่องหางขาว) และแม่พันธุ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.) ซึ่งไก่โคราชเมื่อถึงระยะการจับขายตลาดจะมีน้ำหนักตัว 1.2 - 1.7 กิโลกรัม เมื่ออายุ 67 - 84 วัน มี FCR 2.25 - 2.32 และ Feed Intake 2.8 - 4.1 กิโลกรัม (Kubota et al., 2019) ซึ่งแตกต่างจากไก่สายพันธุ์ทางการค้าที่ใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเพียง 25-30 วันเพื่อให้ได้น้ำหนัก 1.7-2.6 กิโลกรัม และมี FCR เพียง 1.35-1.47 เท่านั้น (Francher, 2014) ไม่เพียงแต่ระยะเวลาในการเลี้ยงที่ไก่โคราชมีระยะเวลาในการเลี้ยงยาวนานกว่าไก่สายพันธุ์ทางการค้าแต่ต้นทุนตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงยังมากกว่าอีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้ว่าไก่โคราชมีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ต่ำกว่าไก่สายพันธุ์ทางการค้า

ซึ่งจากการสำรวจข้อมูลก่อนหน้านี้พบว่าต้นทุนในการเลี้ยงสัตว์ปีก 60-70 % เป็นต้นทุนของค่าอาหารสัตว์ และจากการสำรวจยังพบอีกว่าราคาอาหารสัตว์มีแนวโน้มที่จะมีราคาสูงขึ้นอีก เนื่องจากราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีราคาเพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากพื้นที่ในการเพาะปลูกวัตถุดิบอาหารสัตว์ลดลง และสภาพอากาศแปรปรวนไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกทำให้ผลผลิตวัตถุดิบอาหารสัตว์มีปริมาณลดลง (ThaiFeedMeal.com, 2023) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าต้นทุนค่าอาหารสัตว์กลายเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อต้นทุนในการเลี้ยงไก่ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ได้รับผลตอบแทนลดลงจากการศึกษาของ Xiao et al. (2021) พบว่าการปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ให้ดีขึ้นจะสามารถลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ในการเลี้ยงไก่ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมามีงานวิจัยหลายงานที่ให้ความสำคัญกับการพัฒนาปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed efficiency) ของไก่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา (Ravindran and Abdollahi., 2021) การปรับปรุงพันธุกรรมประสิทธิภาพการใช้อาหารสามารถทำได้โดยการคัดเลือก โดยพิจารณาจากลักษณะบ่งชี้ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ได้แก่ ลักษณะอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) และลักษณะปริมาณอาหารที่คลาดเคลื่อนจากความต้องการ (Residual feed intake; RFI) ซึ่งทั้งสองลักษณะถือเป็นลักษณะที่อาศัยกลไกในร่างกายของไก่จากการใช้อาหารมาเป็นข้อพิจารณา อย่างไรก็ตาม FCR จัดเป็นค่าดัชนีรวมซึ่งแสดงถึงปริมาณอาหารที่กินได้เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำหนักตัวโดยไม่คำนึงถึงการใช้ประโยชน์ด้านการดำรงชีวิต ในขณะที่เดียวกันการคัดเลือกสัตว์จากค่า FCR ค่าจะสัมพันธ์กับการมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเมื่อไก่โตเต็มวัย จากเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ค่า FCR (Yi et al., 2018) ในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ RFI เป็นดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยคำนวณจากผลต่างระหว่างอาหารที่กินได้จริง (actual feed intake) และอาหารที่ได้รับจากการคำนวณ (expected feed intake) หากไก่กินอาหารต่ำกว่ามาตรฐานที่คำนวณได้แสดงว่าอาหารถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (RFI ต่ำ) ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อทำให้ผลผลิต จากผลการวิจัยของ Zamani et al. (2008) ชี้ให้เห็นว่าลักษณะ RFI มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นดัชนีประสิทธิภาพการใช้อาหารและยังสามารถใช้วิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางด้านผลผลิตต่างๆ ได้โดยวิเคราะห์ในรูปแบบของดัชนีการคัดเลือก (selection index) เพื่อนำไปปรับปรุงพันธุกรรมและใช้ในการคัดเลือกสัตว์รายตัวต่อไป การลดต้นทุนอาหารโดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ลักษณะ RFI จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการใช้ RFI มาเป็นลักษณะในการคัดเลือกพันธุกรรมไก่โคราชเพื่อเพิ่มความสามารถทางพันธุกรรมของไก่โคราชในด้านการใช้ประโยชน์จากอาหารอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อช่วยลดต้นทุนอาหาร

การคำนวณค่า RFI (Koch et al., 1963)

$$RFI_i = \text{Total feed intake for week} - (b_0 + b_1 MMWi + b_2 BWGi)$$

เมื่อ BWG_i is the body weight gain (g), $week_i$ and MMW_i the metabolic weight estimated from mean body weight at week_i, i.e., $(\text{Initial body weight} + \text{Final body weight})^{0.75}$, b_0 is the intercept, and b_1 and b_2 are partial regression coefficients.

2.3 ยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร

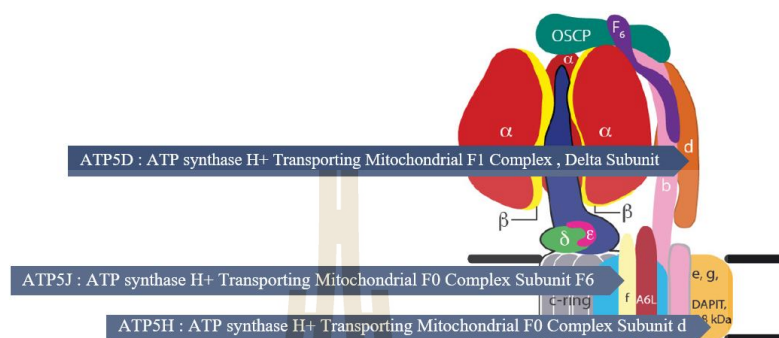
การเพิ่มความสามารถทางพันธุกรรมของไก่ในด้านการใช้ประโยชน์จากอาหารอย่างมีประสิทธิภาพหรือการปรับปรุงพันธุกรรมไก่ให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดีขึ้นจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามียีนหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร จากการศึกษาของ Poompramun et al. (2021) ได้ทำการศึกษาโดยทำการศึกษา molecular pathways และยีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FE) และคุณภาพเนื้อสะโพกของไก่โคราชที่โตช้า โดยวิธีการหาค่าการกินได้และน้ำหนักตัวของไก่แต่ละตัวโดยการเก็บรวบรวมเป็นรายสัปดาห์ทุกสัปดาห์จนไก่มีอายุครบ 10 สัปดาห์ เพื่อคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และปริมาณอาหารที่เหลือ (RFI) วัดองค์ประกอบทางชีวเคมีและพารามิเตอร์คุณภาพเนื้อสัตว์ บนพื้นฐานของค่า FCR ที่อายุ 10 สัปดาห์ คัดเลือกไก่ 9 และ 12 ตัวจากกลุ่ม FCR สูงและต่ำตามลำดับ และทำการตรวจสอบ transcriptomes โดยใช้ microarray ไก่ขนาด 8 × 60 K Agilent การวิเคราะห์เครือข่ายการแสดงออกของยีนแบบ weighted ได้ทำการวิเคราะห์เพื่อกำหนดความสัมพันธ์ระหว่างโมดูลยีนที่แสดงออกร่วมกันกับประสิทธิภาพการใช้อาหารและคุณภาพของเนื้อสะโพก หรือทั้งสองอย่าง เพื่อตรวจสอบยีนและกระบวนการระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหารและคุณภาพเนื้อของไก่โคราช ซึ่งพบว่าไก่อกลุ่มที่มีค่า FE ต่างกันก็มี Nucleotide, Lipid และ Protein ในกล้ามเนื้อสะโพก โดยรวมแล้วมีการระบุยีนที่แสดงออกร่วมกัน 38 Modules และ 12 Modules มีความสัมพันธ์กับ FE และลักษณะคุณภาพเนื้อสัตว์บางส่วน การวิเคราะห์เชิงฟังก์ชันเน้นย้ำถึงหน้าที่เสริมหลายอย่าง เช่น กระบวนการทางชีววิทยา กระบวนการเมตาบอลิซึม เมแทบอลิซึมของ Nucleotide และการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ปัจจัยระดับโมเลกุลหลายอย่างมีส่วนเกี่ยวข้องในปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FE กับคุณภาพเนื้อสัตว์ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Sinpru et al. (2020) ได้ทำการศึกษา Transcriptomic Profiling ระหว่างไก่โคราชที่มี FCR ต่างกัน พบกระบวนการสำคัญที่ส่งผลและเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของ FCR ระหว่างไก่ทั้งสองกลุ่ม คือกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เมแทบอลิซึมของกลูตาไธโอน การขนส่งและเมแทบอลิซึมของวิตามิน เมแทบอลิซึมของไขมัน และการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทและหัวใจ การพัฒนา และการเจริญเติบโต ซึ่งกระบวนการดังกล่าวบ่งชี้ว่าสิ่งเหล่านี้เป็นกลไกสำคัญที่ควบคุมการเปลี่ยนอาหารของลำไส้เล็กในไก่โคราช และจากการศึกษาของ Yang et al. (2020) ได้ทำการศึกษายีนและกระบวนการสำคัญที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่พื้นเมืองโดยทำการศึกษาด้วยเทคนิค Transcriptome

พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่พื้นเมืองคือ *D2*, *ND4*, *CYTB*, *RAC2*, *VCAM1*, *CTSS* และ *TLR4* ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารและ phagosome, cell adhesion molecules (CAM), citrate cycle (TCA cycle) และ Oxidative phosphorylation ซึ่งเป็น Pathway สำคัญที่ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่พื้นเมือง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kaewsatun et al. (2022) ได้ทำการศึกษา Proteomic ถึงความแตกต่างและความเป็นไปได้ของประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FE) ในไก่โคราชเพศผู้ โดยศึกษาจากไก่โคราชเพศผู้สองกลุ่มการทดลองกลุ่มแรกคือไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงและกลุ่มที่สองคือไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ พบโปรตีน *ATP5J*, *ATP5H*, *ATPD*, *ACTN1*, *SLC9A3R1* และ *TUBA3E* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของ Oxidative phosphorylation และ Tight junction ซึ่งพบว่าแสดงออกมากในไก่โคราชที่เป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง

2.3.1 Oxidative phosphorylation กับประสิทธิภาพการใช้อาหาร

การผลิตพลังงานส่วนใหญ่ของเซลล์ยูคาริโอตเกิดขึ้นจากกระบวนการ Oxidative phosphorylation ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Bottje et al., 2006) ขั้นตอนสุดท้ายของการ Oxidative phosphorylation ดำเนินการโดย ATP synthase หรือ Complex V ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนโดยโปรตีน *ATP5J*, *ATP5H* และ *ATP5D* ทำหน้าที่เป็นโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่อยู่ใน ATP Synthase (ภาพที่ 2.1) มีหน้าที่สร้างพลังงานในกระบวนการ Oxidative phosphorylation เพื่อนำพลังงานมาใช้ในการดำรงชีวิตและการสร้างผลผลิต โดยปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation อิเล็กตรอนจะถูกขนส่งจากตัวให้อิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอน เช่น ออกซิเจนในปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งปฏิกิริยารีดอกซ์เหล่านี้ปลดปล่อยพลังงานให้ถูกใช้เพื่อสร้าง ATP ในยูคาริโอต ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างพลังงานของไมโทคอนเดรีย รวมถึงการขนส่งอิเล็กตรอนกับการหายใจระดับเซลล์ และการสังเคราะห์ ATP ไม่เพียงผลิตพลังงานเซลล์ส่วนใหญ่เท่านั้น ยังเกี่ยวข้องกับการมีชีวิตของเซลล์อีกด้วย โปรตีน 3 ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในช่องโปรตอนของการสังเคราะห์ ATP ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการไหลของอิเล็กตรอนผ่านสายโซ่ทางเดินหายใจและให้พลังงานสำหรับการสังเคราะห์ ATP มีรายงานว่าโปรตีนชนิดเดียวกันมีอยู่มากในกระเพาะรูเมนของ L-RFI steer (Kong et al., 2016) และในกล้ามเนื้ออกของไก่ L-RFI (Yang et al., 2020) นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังเป็นที่รู้จักในฐานะแหล่งสำคัญของชนิดออกซิเจนที่เกิดปฏิกิริยา Radical oxidative stress เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ผลิตโดยห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างกระบวนการ oxidation phosphorylation และ Kaewsatun et al. (2022) พบว่า ไก่ที่มีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำไม่สามารถขจัด ROS ที่มากเกินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับไก่ที่มีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง ดังนั้นจึงมีโอกาสได้รับความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าไก่ที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง มีรายงานว่าเมแทบอลิซึมของ Peroxisome ซึ่งสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรียและการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันนั้นมีความสำคัญต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้

อาหารในสัตว์ปีก (Di Cara et al., 2019; Xiao et al., 2021) นอกจากนี้ความสามารถในการกำจัด ROS ที่ไม่ดีจะนำไปสู่การอักเสบในลำไส้และการติดเชื้อที่ไม่มีประสิทธิภาพ (Mishra and Jha, 2019)



ภาพที่ 2.1 ATP Synthase Structure.

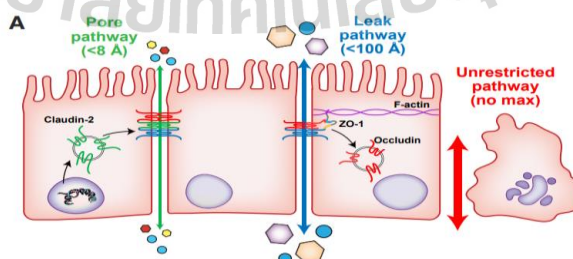
ที่มา: ดัดแปลงรูปภาพจาก Neupane et al. (2019).

2.3.2 กระบวนการทำงานของ Tight junction

จากการศึกษาของ Kaewsatun et al. (2022) ในไก่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้ อาหารสูงพบโปรตีน *ACTN1*, *SLC9A3R1* และ *TUBA3E* ที่มีการแสดงออกสูง เป็นผลให้เกิดความแตกต่าง ของประสิทธิภาพของการใช้อาหารของไก่โคราช ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีผลต่อการทำงานของ Tight junction โดยทำหน้าที่ควบคุมสารสื่อผ่านเมมเบรน (ภาพที่ 2.2) และทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมต่อระหว่าง integral membrane และ cytoskeletal proteins และทำหน้าที่ยึดติด actin เข้ากับผนังเซลล์อีกด้วย กระบวนการ Tight junction pathway มีหน้าที่ในการป้องกันการรั่วไหล (leakage) ของตัวถูกละลาย และน้ำที่กำลังถูกขนส่ง และปิดเส้นทางของเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน (paracellular pathway) Tight junction อาจเป็นเส้นทางรั่วซึม (leaky pathways) ผ่านการสร้างช่องเลือกผ่าน (selective channels) สำหรับให้แคตไอออน (cations), แอนไอออน (anions) ที่มีขนาดเล็ก และน้ำผ่าน (Panwar et al., 2021) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yang et al. (2022) ได้ทำการศึกษการเสริม Butyrate ร่วมกับการเสริม forskolin เพื่อบรรเทาอาการอักเสบของลำไส้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและปรับปรุงคุณภาพซาก พบว่าการทำงานของ Tight junction ที่ทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่าง epithelial cells มีความสำคัญต่อการ ป้องกันและก่อให้เกิดอุปสรรคทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่สำคัญของลำไส้และสิ่งแวดล้อมภายนอก เพื่อ รักษาภาวะสมดุลภายในลำไส้ และจากการศึกษาของ Panwar et al. (2021) ได้ทำการศึกษผลกระทบ ของการทำงานของ Tight junction ต่อ Mucosal Immune Homeostasis พบว่าการทำงานของ Tight junction ส่งผลต่อระยะห่างของ epithelial cell โดยจากภาพที่ 3 พบว่าระยะห่างที่มากกว่า $8 \text{ \AA}$ สามารถคัดเลือกโมเลกุลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า $8 \text{ \AA}$ และ ระยะห่างที่มากกว่า $100 \text{ \AA}$ มีความ

สามารถในการคัดเลือกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ต่ำ ส่งผลให้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โมเลกุลของแบคทีเรีย ผ่านเข้าสู่พื้นที่ใต้ epithelial cell ได้ ทำให้ช่องทางผ่านเกิดการเสียหายได้

ซึ่งการเสียหายของช่องทางผ่านจะส่งผลต่อการอักเสบของลำไส้ และส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ จากการศึกษากของ Peng et al. (2017) พบว่าการอักเสบของลำไส้ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ โดยพบว่าลำไส้มีบทบาทสำคัญในการย่อยและดูดซึมอาหาร เป็นอวัยวะแรกๆ ที่สัมผัสกับปัจจัยภายนอก ที่ส่งผลต่อสุขภาพสัตว์ปีก Intestinal epithelial barrier ทำหน้าที่เป็นแนวป้องกันแรกๆ ระหว่างสภาพแวดล้อมภายในลำไส้และปัจจัยภายนอก ประกอบด้วย monolayer ต่อเนื่องของ Intestinal epithelial cell ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซลล์ ซึ่งลดช่องว่างระหว่างเซลล์ที่อยู่ติดกัน ดังนั้นจึงป้องกันการผ่านของตัวถูกละลายและน้ำโดยอิสระผ่าน paracellular pathway. Tight junction เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีความสำคัญต่อความสมบูรณ์และการทำงานของ Intestinal epithelial barrier เนื่องจากทำหน้าที่เชื่อมเซลล์ที่อยู่ติดกันแต่ยังสร้างช่องที่ช่วยเกิดการซึมผ่านระหว่างเซลล์ ส่งผลให้ epithelial cell มีความตึงตัวแตกต่างกัน องค์ประกอบโมเลกุลโครงสร้างพื้นฐาน และหน้าที่ของ Tight junction ถูกควบคุมแตกต่างกันออกไปตามสิ่งเร้าทางสรีรวิทยา มีการศึกษาพบว่าความสมบูรณ์ของ Tight junction ที่ลดลงส่งผลให้เกิดสภาวะลำไส้รั่ว (Leaky gut) การสูญเสียนี้ยังส่งผลให้การเคลื่อนตัวของ Antigen (จุลินทรีย์ สารพิษ) สามารถผ่านเยื่อเมือก (epithelial) เข้าสู่ร่างกายได้ ซึ่งปกติแล้วจะต้องอยู่แยกกัน และต่อมาจะทำลายสภาวะสมดุลของเยื่อเมือกในลำไส้ ซึ่งเกิดขึ้นพร้อมกับความไวต่อการติดเชื้อในลำไส้ การอักเสบ และการดูดซึมผิดปกติ มีหลักฐานแสดงถึงความผิดปกติของลำไส้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคของแบคทีเรียในลำไส้บางชนิด ซึ่งเชื้อโรคบางชนิดสามารถทำให้เกิดข้อบกพร่องในการซึมผ่านของ epithelial cell ในลำไส้ เช่น แบคทีเรียที่จำเพาะต่อไก่เป็นพิเศษ เช่น *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *E. maxima* และ *Clostridium perfringens* เป็นต้น และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ballard et al. (1995) ซึ่งพบว่าสรีรวิทยาของ Tight junction ใน Intestinal epithelial โครงสร้างโมเลกุลของ Tight junction รูปร่าง ตลอดจน Tight junction ทางกายภาพและเคมีมีอิทธิพลต่อการดูดซึมในลำไส้



ภาพที่ 2.2 Mechanisms of paracellular permeability.

ที่มา: Panwar et al. (2021).

2.3.3 Tight junction และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการซึมผ่านของสารอาหารในลำไส้

Tight junction เกี่ยวข้องกับการทำงานทางสรีรวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีผลต่อการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก (Choct, 2009) ความคงตัวของ Tight junction นั้นมีผลกระทบต่อความสามารถในการซึมผ่านของสิ่งกีดขวางในลำไส้ คุณสมบัติของ Tight junction และการซึมผ่านของพาราเซลล์นั้นสัมพันธ์กับการควบคุมของโครงร่างของ Actin และความแข็งแรงของการยึดเกาะระหว่าง epithelial cell (Bruewer et al., 2004) ในการศึกษาของ Kaewsatun et al. (2022) พบโปรตีน *ACTN1*, *SLC9A3R1*, *TUBA3E* ซึ่งโปรตีนทั้งสามเกี่ยวข้องกับ Tight junction partway *ACTN1* และสาย tubulin alpha-3E (*TUBA3E*) มีปริมาณมากในไ้กลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง ซึ่งบอกได้ว่าไ้ที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงมีความสมบูรณ์ของลำไส้และการทำงานของเยื่อบุผิวมากกว่าไ้ที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ ซึ่งอาจส่งผลให้การซึมผ่านของสารอาหารในเซลล์ดีขึ้นด้วย Tight junctions ไม่เพียงแต่มีบทบาทสำคัญในการดูดซึมสารอาหาร แต่ยังสร้างเกราะป้องกันทางกายภาพต่อสภาพแวดล้อมภายนอกของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้เพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งมีชีวิตที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แอนติเจน และสารพิษไม่ให้เข้าสู่ลำไส้ (Groschwitz and Hogan, 2009) สร้างความเสียหายต่อเยื่อบุผิวในลำไส้ซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบได้ (De Meyer et al., 2019) Solute carrier family 9, subfamily A (*SLC9A3R1*) มีมากในกลุ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ *SLC9A3R1* เกี่ยวข้องกับเส้นทางการส่งสัญญาณหลายอย่าง เช่น phosphorylation ที่อาศัย cAMP ที่เหนี่ยวนำให้เกิด phosphorylation ของ claudin ซึ่งเป็นโปรตีน Tight junction ซึ่งเป็นตัวกำหนดหลักของฟังก์ชัน (Chiba et al., 2008) ที่เกี่ยวข้องกับเรื่องนี้ cAMP ช่วยยกระดับการทำงานของสิ่งกีดขวางผ่านวิถีทางที่ขึ้นกับ Protein Kinase A (PKA) และเส้นทางที่ไม่ขึ้นกับ PKA ซึ่งช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อรอยต่อของ claudin และเปลี่ยนการทำงานของสิ่งกีดขวางของโปรตีน Tight junction (Chiba et al., 2008) เป็นไปได้ว่าการผลิตโปรตีน *SLC9A3R1* มากเกินไปอาจเกี่ยวข้องกับการปรับตัวทางสรีรวิทยาของ Tight junction เพื่อป้องกันความล้มเหลวของการทำงานของสิ่งกีดขวางเยื่อบุผิวในลำไส้เมื่อสุขภาพของลำไส้ถูกทำลาย (Kaewsatun et al., 2022)

ดังที่กล่าวมาการควบคุมของ Tight junction protein เป็นองค์ประกอบสำคัญของการซ่อมแซม epithelial barrier หลังจากลำไส้ได้รับบาดเจ็บ อย่างไรก็ตาม Tight junction มีความสามารถพิเศษในการทำงานได้ขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ พันธุกรรม และอายุ เป็นต้น (Pasternak et al., 2015)

2.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค q-PCR การแสดงออกของโปรตีนโดยเทคนิค Western blot และ ทำการศึกษา Morphology ของลำไส้เล็กส่วนกลางโดยใช้เทคนิค TEM (Transmission electron microscope)

2.4.1 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค q-PCR

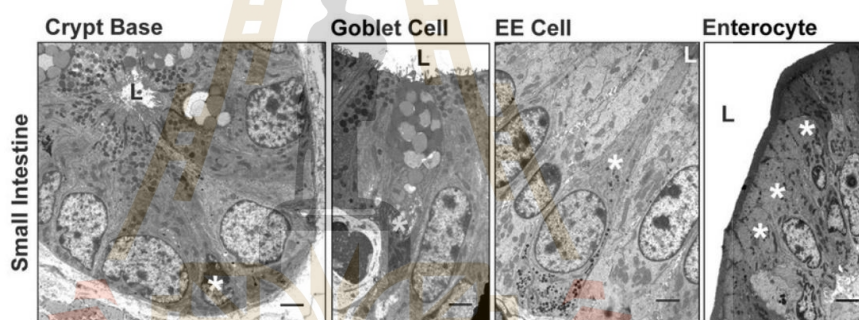
การศึกษาถึงการแสดงออกของยีนมีหลากหลายวิธี โดยวิธีการที่นิยมใช้เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนคือวิธี PCR (Polymerase chain reaction) และ q-PCR (Real Time - Polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พบว่ามีผู้สนใจนำเทคนิคมาใช้ค่อนข้างมาก PCR และ q-PCR เป็นกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ในหลอดทดลอง ซึ่งกระบวนการนี้เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ DNA ในสิ่งมีชีวิต ใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจ โดยการจำลองดีเอ็นเอสามารถเกิดขึ้นได้จากเอนไซม์รีเอเจนต์หลักสองชนิดคือ Primer ซึ่งเป็นชิ้นส่วน DNA สายเดี่ยวสั้นที่รู้จักกันในชื่อ โอลิโกนิว คลีโอไทด์ซึ่งเป็นลำดับเสริมของบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมาย และ DNA polymerase

ตารางที่ 2.1 การใช้เทคนิค q-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

Breed	Organ	Technique	Gene	Describe	Ref
Korat chicken	muscle tissues	qPCR	<i>CAPN1</i> and <i>ADSL</i>	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนและปริมาณคาร์โนซีน	Kubota et al. (2019)
Laying Japanese quail	small intestinal (Duodenum, Jejunum and Ileum)	qPCR	<i>SGLT1</i> and β -actin	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนและประสิทธิภาพการผลิตและคุณภาพของไข่ไก่	Abou-Elkhair et al. (2020)
Korat chicken	ลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum)	RT-qPCR	<i>LY6E</i> , <i>PLAC8</i> , <i>LOC771880</i> , <i>MLKL</i> , <i>ADV</i> , <i>IFI6</i> , <i>PLA2G4B</i> , and <i>LBFABP</i>	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนและประสิทธิภาพการเจริญเติบโต	Sinpru et al. (2021)
Broiler chicken	small intestinal (Duodenum, Jejunum and Ileum)	qPCR	<i>CLDN-5</i> , <i>MUC-2</i> , <i>GAPDH</i> and <i>TLR4</i>	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนและประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกัน	Tayebe et al. (2021)

ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเหมาะที่จะนำมาทำการศึกษา Tight junction ใน Jejunum ซึ่งที่ผ่านมามีการศึกษาที่นำเทคนิคนี้มาทำการศึกษาเกี่ยวกับ Tight junction (Saito et al., 2021) ได้ทำการศึกษาหน้าที่ระดับโมเลกุลของโปรตีน Tight junction และ Tricellulin ต่อการทำงานของ Tight junction จึงได้ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของ Tight junction โดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน ที่ Tight junction ของเซลล์ เยื่อหุ้มพลาสมาของเซลล์ที่อยู่ติดกัน และทางเดิน paracellular เพื่อศึกษาทางเดินของของไหลและตัวทำละลาย Jing et al. (2019) การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Tight junction claudin-1 และ 4 ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ epidermal barrier ของ

หนึ่งกำพร้าชั้นในจึงใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยาของ Tight junction เมื่อการแสดงออกของโปรตีน Tight junction claudin-1 และ 4 ลดลง และการศึกษาการประเมินพัฒนาการของสัณฐานวิทยาของเยื่อบุผิว lamina ในลำไส้เล็กส่วน ileum ของไก่เนื้อโดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน และเทคนิค TEM ยังถูกใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนซิลิเนียมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมถูกสังเคราะห์โดย *Bacillus subtilis* ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วน ileum และสัณฐานวิทยาของ Tight junction ในลำไส้เล็กส่วนต้น ดังนั้นในการศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนต่อสัณฐานวิทยาของ Tight junction ในการศึกษาครั้งนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่านในการศึกษาการส่องผ่านลักษณะเฉพาะของเยื่อบุผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงลักษณะโครงสร้างพิเศษและลักษณะเฉพาะของลำไส้เล็กของสุกรและเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ เซลล์ทุกชนิดมีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 2.3 Transmission electron microscopic epithelial characterization

(*'L' หมายถึงลูเมน ,**ภาพลำไส้เล็ก แถบมาตราส่วน 2 นาโนเมตร)

ที่มา: Liara et al. (2013)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สัตว์ทดลองและการจัดการสัตว์ทดลอง

3.1.1 คำชี้แจงจริยธรรม

การทดลองได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมด้านการใช้สัตว์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย ใบอนุญาตใช้สัตว์ เลขที่ SUT-IACUC-001/2021

การจัดการสัตว์ทดลอง

งานทดลองครั้งนี้ทำการศึกษาในไก่โคราชเพศผู้ทั้งหมดจำนวน 115 ตัว เลี้ยงในโรงเรือนระบบเปิดตั้งแต่อายุ 1 วัน ถึงอายุ 10 สัปดาห์ และได้รับการทำวัคซีนตามโปรแกรมวัคซีนไก่ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การให้อาหารเป็นแบบให้รายตัวและให้กินแบบเต็มที่ (*ad libitum*) เลี้ยงไก่แบบแยกกรงเดี่ยว (*individual*) เก็บข้อมูลปริมาณอาหารเหลือและชั่งน้ำหนักไกรายตัวทุกสัปดาห์ โดยกำหนดสูตรอาหารตามปริมาณโปรตีนต่อช่วงอายุไก่อดังนี้ ช่วงอายุแรกเกิด – 3 สัปดาห์ ให้อาหารโปรตีน 21, ช่วงอายุ 3 – 6 สัปดาห์ ให้อาหารโปรตีน 19 % และ ช่วงอายุ 6 – 10 สัปดาห์ ให้อาหารโปรตีน 17%

การเก็บข้อมูล

เก็บข้อมูลด้านสมรรถภาพการผลิตของไก่ทำโดยการชั่งน้ำหนักไก่อและน้ำหนักอาหารไก่อเป็นรายตัวเพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักตัว (*Body weight*) และอาหารที่กิน (*Feed intake*) บันทึกข้อมูลอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (*Feed Conversion Ratio: FCR*) ของแต่ละตัวที่อายุ 1 ถึง 10 สัปดาห์ เมื่ออายุครบ 10 สัปดาห์แล้วทำการแยกกลุ่มไก่อ ที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง จำนวน 30 ตัว ซึ่งไก่อแต่ละตัวจะมีน้ำหนักตัวตั้งแต่ 1200 กรัม ถึง 1600 กรัม โดยใช้ค่าการคำนวณ *Residual feed intake (RFI)* กลุ่มที่มี *RFI* ระหว่าง 165.490 ถึง 388.364 คือไก่อกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (*HRFI*) และไก่อที่มีค่า *RFI* ระหว่าง -292.779 ถึง -148.976 คือไก่อกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง (*LRFI*) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

3.1.4 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างในลำไส้เล็กส่วนกลาง (*Jejunum*) โดยวิธีการลอกภายในลำไส้เล็กส่วนกลางตั้งแต่ชั้น *Submucosa* เก็บในหลอดทดลอง (*Microtube*) เก็บตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปแช่ในตู้อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส สำหรับการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค

q-PCR (Real Time - Polymerase chain reaction) และสำหรับทำการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot และเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนกลางที่ถัดจากตำแหน่ง Meckel's Diverticulum ยาวขนาด 1 เซนติเมตร สำหรับนำไปวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของ Tight junction ด้วยเทคนิค Transmission electron microscope (TEM)

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงข้อมูลการแบ่งกลุ่มของไก่โคราชที่อายุ 10 สัปดาห์

Group	ID	BW (g.)	RFI (g.)	MBW0.75 (g.)
LRFI Group	L1	1376	-292.779	225.924
	L2	1299	-280.557	216.374
	L5	1599	-274.757	252.863
	L3	1223	-245.982	206.809
	L7	1504	-230.028	241.510
	L9	1475	-225.899	238.009
	L8	1455	-217.500	235.584
	L4	1339	-212.728	221.535
	L26	1353	-198.031	223.086
	L14	1302	-187.139	216.749
	L20	1446	-183.539	234.491
	L24	1346	-178.609	222.220
	L22	1244	-167.287	209.466
	L15	1404	-149.791	229.364
	L11	1520	-148.976	243.434
HRFI Group	H8	1573	388.364	249.773
	H10	1444	339.851	234.247
	H9	1373	316.903	225.555
	H7	1521	263.182	243.554
	H3	1287	243.182	214.874
	H2	1470	216.516	237.403
	H5	1535	207.340	245.234
	H4	1432	205.411	232.786
	H1	1498	194.649	240.787
	H16	1427	189.274	232.176
	H12	1493	181.660	240.184
	H17	1488	181.430	239.580
	H18	1523	180.430	243.795
	H19	1225	176.093	207.062
	H14	1468	165.490	237.161

* LRFI: Low Residual feed intake, HRFI: Hight Residual feed intake, BW: Body weight, MBW0.75, g: Metabolic body weight 0.75 g. and RFI: Residual feed intake

3.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *ATP5J*, *ATP5H*, *ATP5D*, *ACT1*, *SLC9A3R1* และ *TUBA3E* ระหว่างไคโครاخกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงและไคโครاخกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ โดยเทคนิค q-PCR

3.2.1 การสกัด Total RNA

- 1) ใส่ตัวอย่างลำไส้เล็ก ส่วน Jejunum ที่ลอกมาจากภายในลำไส้เล็กส่วนกลาง ตั้งแต่ชั้น Submucosa ประมาณ 0.5 g. ใส่ในหลอดทดลอง (screw cap tube) ขนาด 1.5 ml. จากนั้นใส่เม็ดบีด และทำการเติม Trizol ปริมาณ 700 μ l นำไปใส่ในเครื่อง Bead-beating ปั่นเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- 2) จากนั้นเติม CIA ปริมาณ 200 μ l และทำการผสมโดยใช้ Vortex และทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge (Hettich MIKRO 220) 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
- 3) จากนั้นดูดส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนประมาณ 400 μ l ย้ายไปยังหลอดใหม่ (Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 ml) เติม Trizol 500 μ l ผสมโดยวิธีการกลับหลอดไปมา ทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติม CIA ปริมาณ 500 μ l ผสมโดยการกลับหลอดไปมา และทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดย Centrifuge 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
- 4) เตรียม 3 M NAOAc 50 μ l + 2-Propanal 500 μ l ในหลอด Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 ml. และผสมโดยการเขย่าหลอด
- 5) หลังจากปั่นเหวี่ยงโดย Centrifuge ดูดย้ายส่วนใสปริมาณ 400-500 μ l ไปยังหลอดที่เตรียมไว้ และผสมโดยการกลับหลอดไปมา
- 6) นำไปพักในตู้ -20°C เป็นเวลา 15-20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง Centrifuge 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
- 7) ทิ้งส่วนของเหลวในหลอดทั้งหมด เก็บตะกอนไว้ โดยดูดส่วนของเหลวออกให้มากที่สุด แล้วเติม 75% Ethanol 1000 μ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง Centrifuge 12,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
- 8) เทหรือดูดส่วนของเหลวออกให้มากที่สุดเหลือไว้เพียงตะกอน พักไว้จนตะกอนมีสีใส แล้วจึงเติม Nuclease free water ปริมาณ 30-40 μ l
- 9) นำ Total RNA ไปวัดความเข้มข้นของ RNA ที่ค่าดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer รุ่น nanodrop 2000 (Thermo Scientific, U.S.A)

3.2.2 การสังเคราะห์ First strand cDNA

การสังเคราะห์ First strand cDNA จาก Total RNA มีวิธีการดังนี้ การเตรียม RNA จาก Total RNA จากนั้นสังเคราะห์ First strand cDNA ด้วยชุดสังเคราะห์ First strand cDNA สำเร็จรูป (Thermo fisher scientific, U.S.A.) โดยมีการเตรียมสารละลายสำหรับสังเคราะห์ First strand cDNA ดังนี้ Total RNA 2 μ l, 10x RT random Hexamer 1 μ l, 25x dNTP mix 1 μ l, Nuclease free water 6 μ l, Transcriptor RT reaction buffer 10x 2 μ l, 0.1 MDTT 2 μ l, RNase Out 1 μ l, 25 MM $MgCl_2$ 4 μ l และ Superscript III RT 1 μ l โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25°C 10 นาที จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C 120 นาที และทำลายเอนไซม์โดยการบ่มที่ 85°C 5 นาที เก็บตัวอย่าง First strand cDNA ไว้ที่ -20°C

3.2.3 ระดับปริมาณการแสดงออกของยีน

นำ First strand cDNA 2 μ l ผสม nuclease free water 6 μ l, SYBR Green I (Master 10 μ l SYBR™ Power SYBR™ Green PCR Master Mix) และ Primer forward และ Primer reward ของยีนดังแสดงในตารางที่ 1 อย่างละ 1 μ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง Real time PCR (Roche Light Cycler® 480) เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีน โดยทำให้เป็นมาตรฐานควบคู่กับยีน GAPDH โดยคำนวณค่าการแสดงออกของยีนตามสมการ $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001)

3.2.4 การออกแบบ Primers

ค้นหาลำดับ amino acid ของยีน *ATP5D*, *ATP5H*, *ATP5J*, *ACTN1*, *TUBA3E* และ *SLC9A3R1* จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: NCBI จากนั้นนำไปเปรียบเทียบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันที่ถูกแปลรหัสในทุกเฟรมโดยฟังก์ชัน tBlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของยีนในการออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกออกแบบไพรเมอร์ให้มีความยาว 60-200 คู่เบส, มีปริมาณ GC 50-60% และ มีค่า Tm 55-65°C

ตารางที่ 3.2 Primer สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q-PCR ของยีน

Gene	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')	Product Length (BP)	Annealing Temperature	Amplification efficiency (%)
ATP5D	5'- GCTGTCGCGATAGGCGCT-3' 5'- TGTTTACCCGCGGCGTTTC-3'	102	58°C	98.707
ATP5H	5'-GCGCCAGAGGACGGTAGTGG-3' 5'-CTCCTCGTTCCGCTCAGCTCC-3'	70	60°C	102.594
ATP5J	5'-GAAGCGCAGCGCCTACTTCC -3' 5'-ATGACGGCACCGACGCTTTA-3'	162	62°C	98.80%
ACTN1	5'-TGTTTACCCGCGGCGTTTC-3' 5'-TCA GCCGCCTTC ATT TCC-3'	60	60°C	98.141
SLC9A3R1	5'-AGGGCCCGGACGGGTA -3' 5'-CCACGTTTCGTTCCGTCCACC-3'	147	56°C	99.09%
TUBA3E	5'-CAAGGATGTCAACGCTGCTA TTGC-3' 5'-TGGCTAGGTCACCACCAGGAAC-3'	171	60°C	103.63%

3.3 Western blotting

1) ตัวอย่างลำไส้เล็ก ส่วน Jejunum ที่ลอกมาจากภายในลำไส้เล็กส่วนกลางตั้งแต่ชั้น Submucosa ประมาณ 0.5 g. ใส่ในหลอดทดลอง (screw cap tube) ขนาด 1.5 ml ถูกสกัดด้วย สารละลาย RIPA Lysis Buffer (Strong) (MedChemExpress, USA) ปริมาณ 1000 μ l ต่อตัวอย่าง จากนั้น Homogenize เป็นเวลา 5 นาที และ centrifuge 1200 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที วัด ปริมาณโปรตีนด้วยค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometry โดยใช้เทคนิค lowry assay (Lowry et al., 1951)

2) ประกอบชุดเจล electrophoresis จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber จากนั้นทำการโหลดตัวอย่างที่เตรียม 4 ไมโครลิตร ต่อชุด electrophoresis เข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้า (power supply) ที่ขั้วแอโนด และแคโทดด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ จนสีของโบโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ถึง running gel (ประมาณ 30 นาที) แล้วเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ จนสีของโบโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ถึงจนเกือบสุดปลายกระจกจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3) ย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างส่วนเกินออก ด้วยสารละลาย Destaining solution เพื่อตรวจสอบปริมาณการหยอดและการแยกของโปรตีน ตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล

4) ประกอบเจลและเมมเบรนลงใน Mini Trans-Blot และเติมทรานเฟอร์บัฟเฟอร์ (Transfer buffer) ลงไปในแชมเบอร์พร้อมใส่น้ำแข็ง ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยัง Nitrogen membrane ด้วยกระแสไฟฟ้า 350 mA. นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการย้ายโปรตีนด้วยการนำเมมเบรนไปแช่ใน 0.1 % ponceau S (w/v) ใน 5% acetic acid (v/v) นาน 5 ชั่วโมง ล้าง Ponceau Solution ด้วย 0.1 M NaOH ล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น

5) นำเมมเบรนแช่ 5% non fat dried milk ใน Tris buffer salin (TBS) ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อบล็อกโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย Tris buffer salin with tween 20 (TST) 200 มิลลิตร ประมาณ 5 วินาที

6) แช่เมมเบรนในแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (Primary Antibody Rabbit) in 3% non fat dried milk ใน TST อัตราส่วน 1:1,000 นาน 2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าในอุณหภูมิห้อง ล้างเมมเบรนด้วย TST 200 มิลลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่องเขย่า

7) แช่เมมเบรนในแอนติบอดีตัวที่สอง secondary goat anti-rabbit antibody (1:2000 final dilution) in 3% non fat dried milk ใน TST อัตราส่วน 1:5,000 นาน 2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าในอุณหภูมิห้อง ล้างเมมเบรนด้วย TST 200 มิลลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

8) ล้างเมมเบรนด้วย TBS 200 มิลลิตร 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1 นาที แช่เมมเบรนด้วย chemiluminescence reagent นาน 5 นาที Exposed membrane ด้วย hyperfilm นาน 4 ชั่วโมง

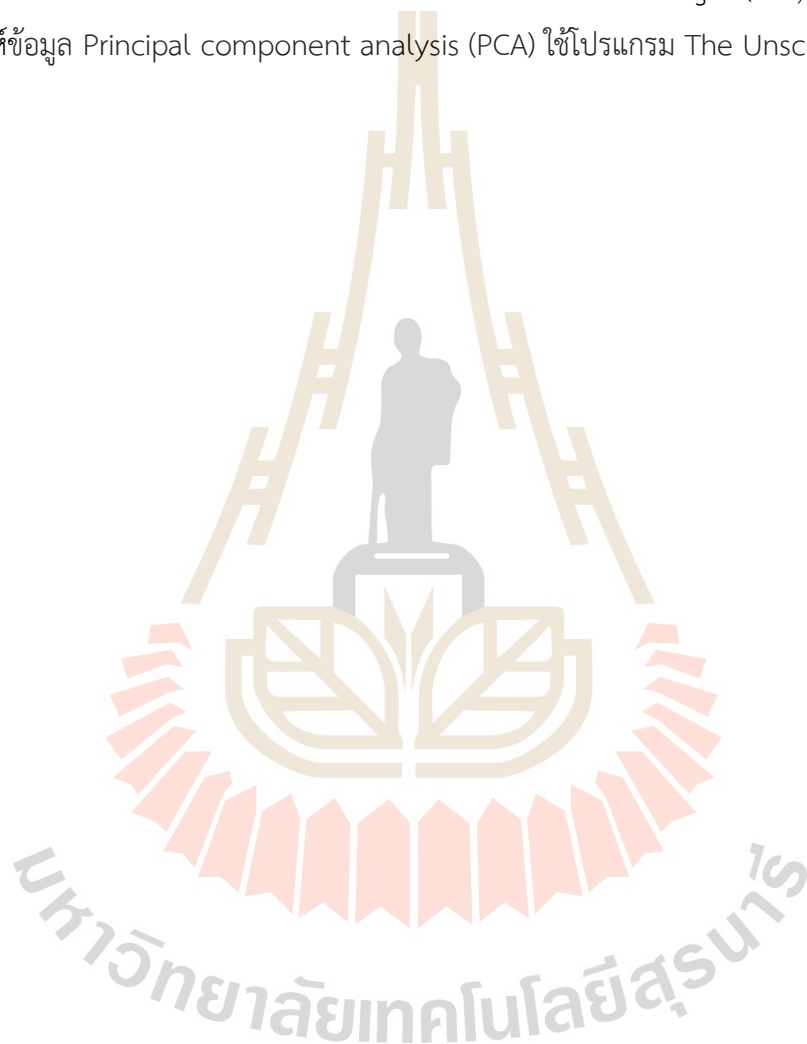
9) นำฟิล์มไปทำให้เกิดภาพในน้ำยา Developer นาน 45 วินาทีและหยุดปฏิกิริยาการเกิดภาพในน้ำยา Fixer นาน 20 วินาที วัดขนาดของแถบโปรตีนโดยนำแผ่นฟิล์มไปสแกนด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) รุ่น G 700 ของ Bio rad ด้วยโปรแกรม Molecular analysis V. 1.4 และวิเคราะห์รูปด้วยโปรแกรม

3.4 การศึกษา Morphology ของ Tight junction ระหว่าง Enterocyte cell ของ Villi ในลำไส้เล็ก ส่วน Jejunum ในไก่โคราช ด้วยเทคนิค Transmission electron microscope (TEM)

- 1) นำตัวอย่างลำไส้เล็กส่วน Jejunum ที่ตัดมาในช่วงถัดจากตำแหน่ง Meckel's Diverticulum ยาวขนาด 2 เซนติเมตร ล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- 2) แช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M PBS เก็บไว้ที่ 4°C
- 3) หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ 1x1 mm แล้ว Fixed 1 % Osmium Tetroxide ใน 0.1 M (PBS) ที่ 4°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M (PBS) ที่ 4°C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- 4) จากนั้นจึงนำไปผ่านกระบวนการขจัด น้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ (Dehydrate by ethyl alcohol) 70% 80% 90% 95% 2 ครั้ง และ 100% 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ
- 5) Infiltrated ด้วย propylene oxide (PO) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที PO: Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 hr. และ (1:2) นาน 12–14 hrs. จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 24 ชั่วโมง จนกลายเป็นบล็อกพลาสติกแข็ง (เกิดปฏิกิริยา polymerization) เมื่อได้ตัวอย่างที่ฝังอยู่ในพลาสติกแข็งแล้ว ตัวอย่างจะถูกนำไปตัดให้เป็นแผ่น บางประมาณ 50-70 nm ด้วยเครื่องตัด Ultramicrotome (Leica รุ่น Leica Ultracut R)
- 6) เมื่อได้แผ่นตัวอย่างที่มีความบางเหมาะสมแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีซึ่งเป็นโลหะหนักที่มีคุณสมบัติสามารถดูดจับอิเล็กตรอนได้ดีขึ้น ซึ่งการย้อมสีจะช่วยให้ได้ภาพที่มีความคมชัดมากขึ้น
- 7) จากนั้นจึง นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องทะลุผ่านต่อไป ด้วยเครื่อง TEM Philips รุ่น TECNAI 20

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติดำเนินการผ่านการทดสอบ T-Test แบบ Independent sample T-Test โดยใช้โปรแกรม SPSS (An IBM Company version IBM SPSS Statistics 25.0) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ข้อผิดพลาดมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p \leq 0.05$) สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลภาพถ่ายการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Western blot ใช้โปรแกรม ImageJ (NHI, USA) และในการวิเคราะห์ข้อมูล Principal component analysis (PCA) ใช้โปรแกรม The Unscrambler X 10.5



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ข้อมูลการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร

จากผลการศึกษาพบว่า ไก่ทั้งสองกลุ่มมีประสิทธิภาพการใช้อาหาร Residual feed intake (RFI) ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัว (BW) และ Metabolic weight (MBW0.75, g) ของไก่ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังแสดงในตารางที่ 4.1)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ RFI เป็นดัชนีในการวัดค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้สัตว์อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน และมีน้ำหนักเริ่มต้นในการทดลองใกล้เคียงกันเนื่องจากน้ำหนักที่ต่างกันส่งผลต่อค่าเฉลี่ยความต้องการในการดำรงชีวิตและที่สำคัญ คือ เพื่อประสิทธิภาพในการคำนวณ RFI ให้ได้ค่าที่แม่นยำ (Koch et al., 1963) จากการศึกษาของ Elolimy et al. (2020) พบว่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร (RFI, FCR) ที่แตกต่างกันเกิดจากการแตกต่างของปริมาณการกินได้ (FI: Feed intake) และมีน้ำหนักตัว (BW) และ Metabolic weight ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Yang et al. (2020) และ Bai et al. (2022) พบว่าประสิทธิภาพการใช้อาหารแตกต่างกันแต่ MBW0.75, g ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่พบว่ามีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่แตกต่างกัน (RFI) แต่ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักตัว (BW) และ Metabolic weight ระหว่างไก่ทั้ง 2 กลุ่ม

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้ค่าดัชนี RFI จากการคำนวณสามารถแบ่งไก่โคราชเป็น 2 กลุ่มตามประสิทธิภาพการใช้อาหารคือ ไกโคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง (LRFI) และไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (HRFI) ได้อย่างแม่นยำ โดยที่ไม่ส่งผลกระทบต่อ น้ำหนักตัว(BW) และ Metabolic weight ระหว่างไก่ทั้ง 2 กลุ่ม

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชเพศผู้ที่อายุ 10 สัปดาห์

Traits	HRFI group, n = 15	LRFI group, n = 15	P-value
BW	1450.466 ± 90.573	1392.333 ± 103.153	0.1244
MBW0.75, g	234.945 ± 11.506	227.816 ± 13.094	0.1245
FI, g	3501.800 ± 186.147	3032.300 ± 189.055	$P < 0.001$
RFI, g	230.017 ± 65.549	-212.907 ± 44.297	$P < 0.001$
FCR	2.508 ± 0.064	2.23 ± 0.065	$P < 0.001$

* HRFI: High Residual feed intake, LRFI: Low Residual feed intake, BW: Body weight, MBW0.75, g: Metabolic body weight 0.75 g., FI: Feed intake, RFI: Residual feed intake, FCR: Feed Conversion Ratio

** Mean ± SD

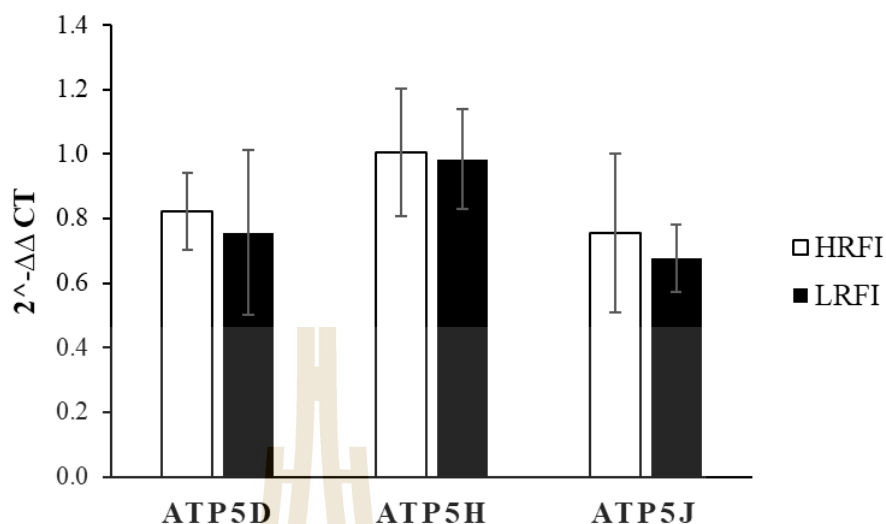
4.2 ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน

4.2.1 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ oxidative phosphorylation

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *ATP5D*, *ATP5H* และ *ATP5J* ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ oxidative phosphorylation ในลำไส้เล็กส่วนกลางพบว่าไก่อโคราชเพศผู้ที่อายุ 10 สัปดาห์จากกลุ่ม LRFI และกลุ่ม HRFI มีระดับการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$; ภาพที่ 4.1)

การผลิตพลังงานส่วนใหญ่ของเซลล์ยูคาริโอตเกิดขึ้นจากปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย (Bottje et al., 2006) ขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ Oxidative phosphorylation ดำเนินการโดย ATP synthase หรือ Complex V ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนโดยยีนและโปรตีน *ATP5J*, *ATP5H* และ *ATP5D* ทำหน้าที่เป็นโปรตีนคอมเพล็กซ์ที่อยู่ใน ATP Synthase เพื่อนำพลังงานมาใช้ในการดำรงชีวิตและการสร้างผลผลิต ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างพลังงานของไมโทคอนเดรียรวมถึงการขนส่งอิเล็กตรอนกับการหายใจระดับเซลล์ (energy metabolism) (Bottji et al., 2006) และปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation ยังสัมพันธ์กับกระบวนการ Metabolic weight คือกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการนำสารอาหารไปใช้ในการสร้างพลังงาน เพื่อการดำรงชีวิตและสร้างผลผลิต จากการรายงานของ Wu et al. (2021) รายงานว่ากระบวนการทำงานของ oxidative phosphorylation ใน ไมโทคอนเดรียเป็นกระบวนการสำคัญในกระบวนการนำสารอาหารไปใช้ในการสร้างพลังงาน (Mitochondria metabolic process) สอดคล้องกับ Vincent et al. (2015) พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนและการทำงานของระดับเซลล์ (energy metabolism) มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการใช้อาหาร (RFI) และจากการศึกษาของ Kaewsatun et al. (2022) ก่อนหน้านี้ในไก่อโคราชพบว่า การแสดงออกของโปรตีน *ATP5D*, *ATP5H* และ *ATP5J* ในกระบวนการ oxidative phosphorylation สูงในไก่อกลุ่ม HRFI ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพการใช้อาหารในระดับโมเลกุล และก่อนหน้านี้มีรายงานว่าในกลุ่ม LRFI มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้จำนวนมากในกระเพาะรูเมนของวัว (Kong et al., 2016) และในกล้ามเนื้อของไก่ (Yang et al., 2020) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่เป็นไปตามสมมติฐานโดยพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ATP5J*, *ATP5H* และ *ATP5D* ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ระหว่างไก่ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน และเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้ระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวส่งผลให้ Metabolic weight (MBW0.75, g) ระหว่างไก่ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน (ตาราง 4.1)

ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า การทำงานของยีน *ATP5D*, *ATP5H* และ *ATP5J* ในกระบวนการ oxidative phosphorylation สัมพันธ์กับกระบวนการสร้างพลังงาน ส่งผลให้ Metabolic weight (MBW0.75, g) ระหว่างไก่อโคราชที่ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.1 ผลของการแสดงออกของยีน *ATP5D*, *ATP5H* และ *ATP5J* ในกระบวนการ Oxidative Phosphorylation ในไโคโรราขกลุ่ม LRFI และ HRFI ต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารเมื่อ *ATP5D* คือ ATP Synthase F1 Subunit Delta, *ATP5H* คือ ATP synthase H+ Transporting Mitochondrial F0 Complex Subunit d, *ATP5J* คือ ATP synthase H+ Transporting Mitochondrial F0 Complex Subunit F6, LRFI คือ Low Residual feed intake และ HRFI คือ Hight Residual feed intake.

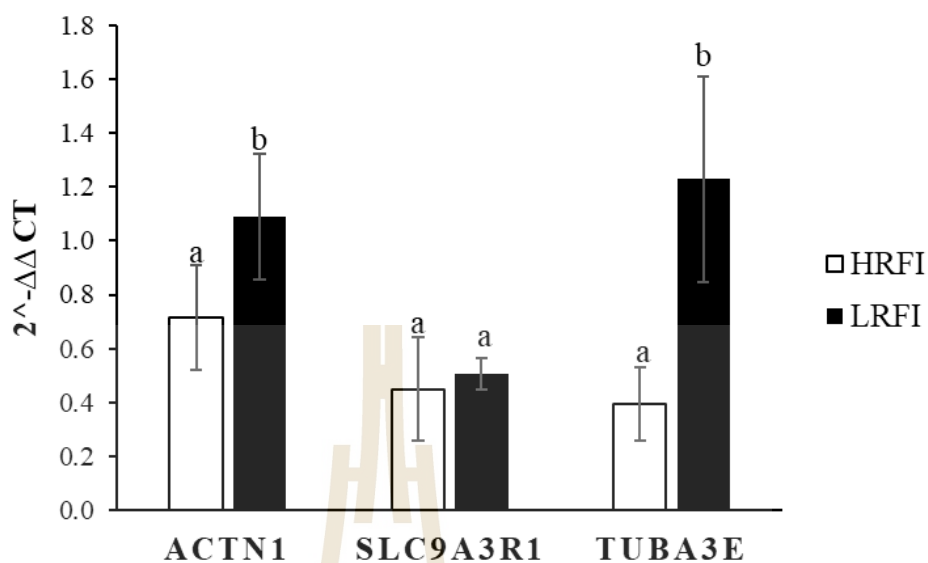
4.2.2 ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ Tight junction

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในกระบวนการ Tight junction พบว่าไโคโรราขจากกลุ่ม LRFI มีการแสดงออกของยีน *ACTN1* และ *TUBA3E* ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HRFI แต่การแสดงออกของยีน *SLC9A3R1* ไม่แตกต่างกันระหว่างไโคทั้ง 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.2) และการแสดงออกของโปรตีน *ACTN1* ในกระบวนการ Tight junction ระหว่างไโคโรราขที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่างกันพบว่า ไโคโรราขจากกลุ่ม LRFI มีการแสดงออกของโปรตีน *ACTN1* สูงกว่าไโคโรราขกลุ่ม HRFI ($P < 0.05$; ภาพที่ 4.3A, 4B)

กระบวนการ Tight junction เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานทางสรีรวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีผลต่อการดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็ก (Choct, 2009) ความคงตัวของ Tight junction นั้นมีผลกระทบต่อความสามารถในการซึมผ่านของสิ่งกีดขวางในลำไส้ ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ Proteomic ในไโคโรราขพบการแสดงออกของโปรตีน *ACTN1* และ *TUBA3E* ใน tight junction pathway ที่สูงในไโคกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี (Kaewsatuan et al. 2022) การเพิ่มขึ้นของยีนและโปรตีน 2 ชนิดนี้จะส่งผลให้เกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพของการใช้อาหารของไโค อาจเกิดจากการที่ยีนทั้งสองพยายามป้องกันหรือซ่อมแซม

สรีรวิทยาของเยื่อผิวภายในลำไส้ และเพื่อรักษาประสิทธิภาพการทำงานของ tight junction ไม่ให้เกิดการเสียสมดุลระหว่างสารชีวเคมีที่สำคัญของโฮสต์และสิ่งแวดล้อมภายนอกที่อยู่ในลำไส้ (Osseleare et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของยีน *SLC9A3R1* ระหว่างโกโคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าความสมบูรณ์ของ Tight junction และการซึมผ่านของพาราเซลล์นั้นสัมพันธ์กับการควบคุมโครงสร้างของ Actin และความแข็งแรงของการยึดเกาะระหว่างเซลล์ (Bruewer et al., 2004) *ACTN1* เป็นยีนและโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของโครงสร้างการยึดเกาะระหว่างเซลล์และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ และ *ACTN1* ยังเป็นยีนและโปรตีนที่มีหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการ Tight junction (Chen et al., 2006; Geiger et al., 1979 and Nakatsuji et al., 2008) *TUBA3E* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับเส้นใย actin และ tubulin มีความสำคัญในการสร้าง nucleus และ โครงสร้างพื้นฐานในการประกอบ microtubule ภายในเซลล์ จากการศึกษาของ Kong et al. (2016) ได้ทำการศึกษา transcriptome ในเนื้อพบบินดังกล่าวแสดงออกสูงในกลุ่ม LRFI ยีน *SLC9A3R1* เป็นยีนที่อยู่ในตระกูล *SLC9* ของ Na^+/H^+ exchangers (NHEs) มีบทบาทสำคัญในการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนของ Na^+/H^+ ในลำไส้ของสัตว์ (Moeser et al., 2008) เช่นเดียวกันกับการดูดซึมและการหลั่งของ epithelia ในระบบย่อยอาหาร (Chen et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลต่อการทำงานของกลไกการขนส่งและส่งผลต่อการเพิ่มหรือการตายของเซลล์ (Puthey et al., 2003) การเกาะติดเมทริกซ์ภายนอกเซลล์และการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และยังมีหน้าที่ในการควบคุมสมดุลสภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ (Donowitz et al., 2009) ยังพบรายงานอีกว่ายีน *SLC9A3R1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับสิ่งกีดขวางภายในลำไส้ (intestinal barrier) (Chiba et al., 2008) การทำงานของ tight junction ไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารอาหารเท่านั้น ยังส่งผลต่อความแตกต่างของประสิทธิภาพการใช้อาหารและปรับปรุงคุณภาพซาก (Li et al., 2022) รวมถึงการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือสารพิษภายในลำไส้ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์ให้ดีขึ้นด้วย (Groschwitz and Hogan, 2009)

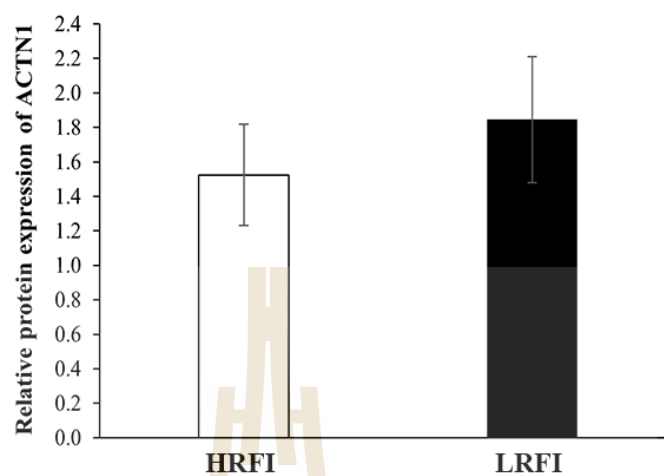
ดังนั้นการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของยีน *ACTN1*, *TUBA3E* และโปรตีน *ACTN1* ในไก่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงมีความสัมพันธ์ และส่งผลให้มีความสมบูรณ์และการทำงานของเยื่อบุลำไส้ในการใช้อาหารที่ดี มีประสิทธิภาพมากกว่า และส่งผลให้การซึมผ่านของสารอาหารภายในลำไส้เพื่อนำส่งสู่กระบวนการสร้างพลังงานได้ดีกว่าไก่ที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ



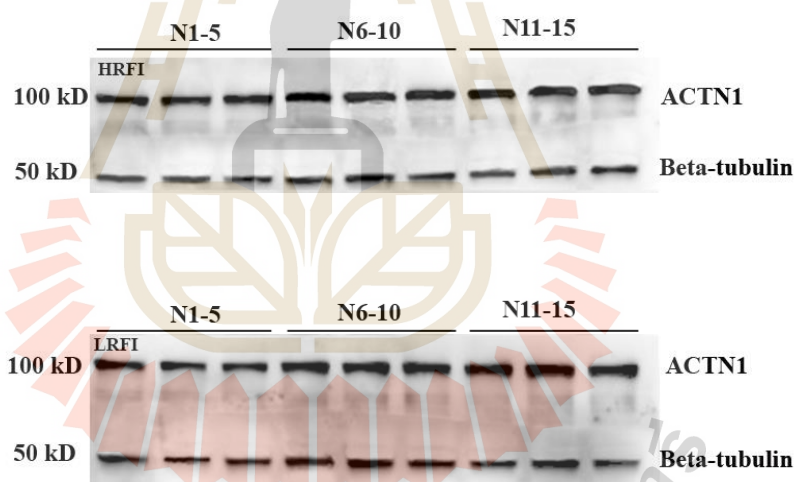
ภาพที่ 4.2 ผลของการแสดงออกของยีน ACTN1, SLC9A3R1 และ TUBA3E ในกระบวนการ Tight junction ในไก่อโคราชกลุ่ม LRFI และ HRFI ต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารเมื่อ ACTN1 คือ Alpha-actinin-1, SLC9A3R1 คือ Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1, TUBA3E คือ Tubulin Alpha 3e, LRFI คือ Low Residual feed intake และ HRFI คือ Hight Residual feed intake.



A



B



ภาพที่ 4.3A และ B ผลการแสดงออกของโปรตีน ACTN1 ในกระบวนการ Tight junction ในไก่โคราชกลุ่ม LRFI และ HRFI ต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารเมื่อ ACTN1 คือ Alpha-actinin-1, LRFI คือ Low Residual feed intake และ HRFI คือ Hight Residual feed intake.

4.3 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ Tight junction ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน Transmission electron microscope (TEM) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของ Tight junction

ตารางที่ 4.2 ผลของระยะห่างของ Tight junction ที่แตกต่างกันต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารในไก่โคราชกลุ่ม LRFI และ HRFI

Sample	Mean (sample) (Nanometer.)	Mean $\pm$ SEM (Nanometer.)	P-value
LRFI	9.523	9.305 $\pm$ 0.472	0.0272
	8.763		
	9.630		
HRFI	15.583	13.058 $\pm$ 2.366	
	10.890		
	12.703		

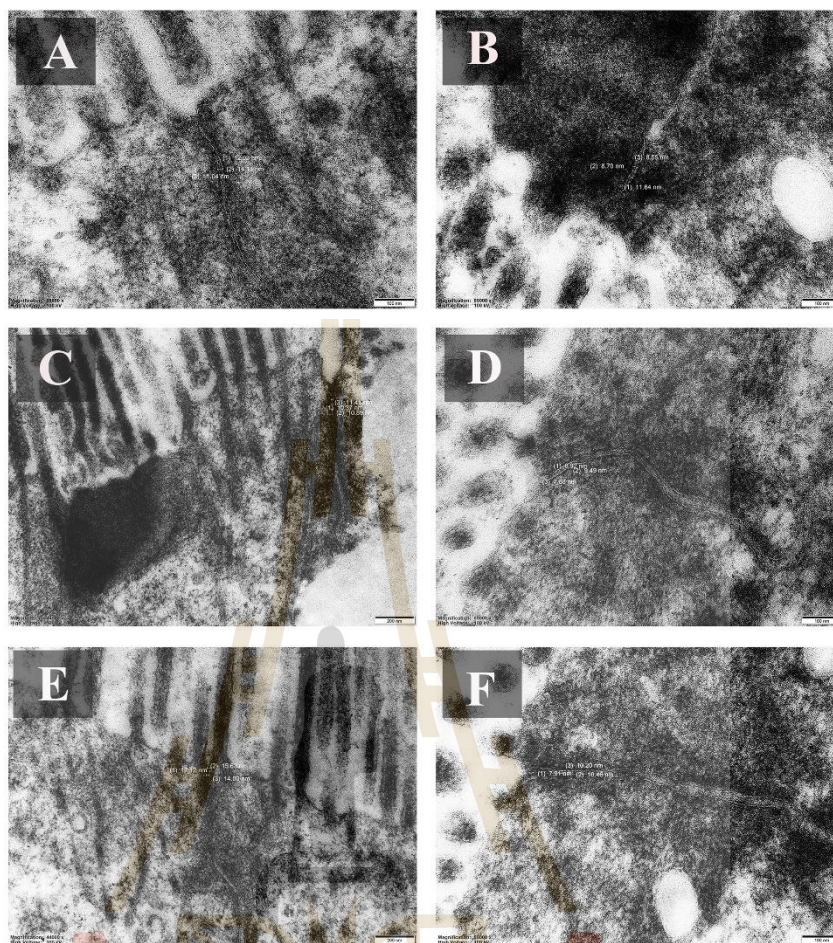
โครงสร้างสัณฐานวิทยาของ tight junction ระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวภายในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราชเพศผู้อายุ 10 สัปดาห์ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า tight junction ในไก่กลุ่ม LRFI (A,C,E) มีลักษณะของเซลล์และ tight junction ที่มีลักษณะสมบูรณ์และมีความกว้างของ tight junction 9.305 ± 0.472 nm. และในไก่กลุ่ม HRFI (B,D,F) มีลักษณะเสียหายของเซลล์ ลำไส้อักเสบ และมีความกว้างของ tight junction เฉลี่ย 13.058 ± 2.366 nm. แตกต่างกับไก่กลุ่ม LRFI อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลลัพธ์ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของ Tight junction ภายในลำไส้เล็กส่วนกลางส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารที่แตกต่างกันของไก่โคราช

การศึกษาโครงสร้างสัณฐานวิทยาของ tight junction ระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวภายในลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) พบว่าระยะห่างระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวหรือความกว้างของ tight junction ภายใน Jejunum ในไก่ทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.4) ผลลัพธ์ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของ tight junction ภายใน Jejunum เกี่ยวข้องกับอาหารการแสดงออกของโปรตีนและส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้ที่แตกต่างกันในไก่โคราช ซึ่งการทำงานของ tight junction สร้างช่องทางเพื่อให้เกิดการซึมผ่านระหว่างเซลล์เยื่อบุผิว ส่งผลให้ความแน่นหนาระหว่างเซลล์แตกต่างกัน (Di Pierro et al.,2001) ความคงตัวของ tight junction นั้นมีผลกระทบต่อความสามารถในการซึมผ่านของสิ่งกีดขวางในลำไส้ ความสมบูรณ์ของ tight junction และการซึมผ่านของพาราเซลล์นั้น

สัมพันธ์กับการควบคุมของโครงร่างของ Actin และความแข็งแรงของการยึดเกาะระหว่างเซลล์ (Bruewer et al., 2004) รวมถึงการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของความสามารถในการต้านทานเชื้อโรคของเซลล์เยื่อบุผิว ดังนั้นการทำงานของ tight junction เป็นสาเหตุหลักที่มีผลต่อระยะห่างของ enterocyte ระยะห่างที่มากกว่าไม่สามารถคัดเลือกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ได้ ส่งผลให้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โมเลกุลของแบคทีเรียผ่านเข้าสู่พื้นที่ใต้ epithelial cell ได้ ทำให้ช่องทางผ่านเกิดการเสียหายได้ (Panwar et al., 2021) พบว่าภายในลำไส้ของไก่โคราชกลุ่ม HRFI ถูกทำลายโดยเชื้อโรคทำให้ลำไส้บริเวณดังกล่าวเกิดการอักเสบ การค้นพบดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า epithelial cell ที่ถูกทำลายโดยเชื้อโรคไม่เพียงแต่ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้เท่านั้นแต่ยังสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนได้อีกด้วย (Hetch, 2001) ซึ่งการเสียหายของช่องทางผ่านทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ และยังสามารถส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ (Peng et al., 2017) และการทำงานดังกล่าวของ tight junction ถูกควบคุมโดยโปรตีน tight junction ภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน (ซึ่งอธิบายไว้ในหัวข้อ 4.2.2)

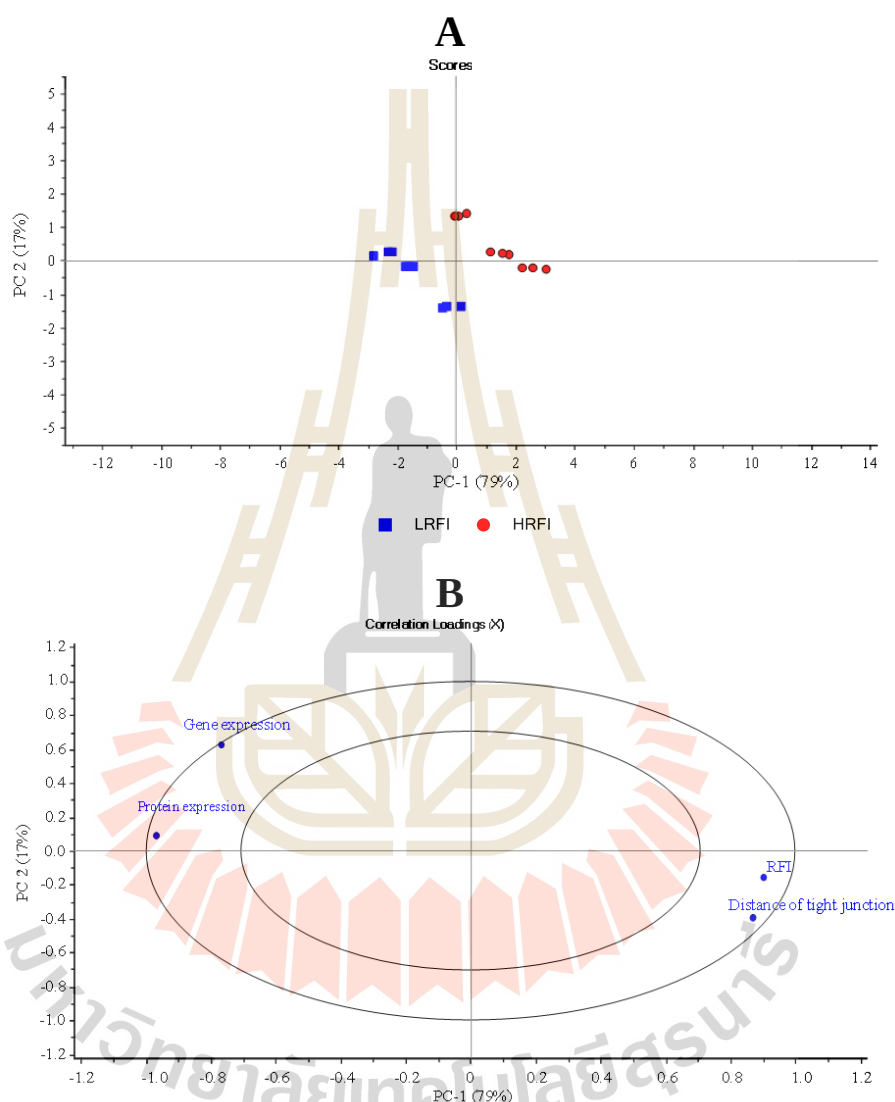
ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของ tight junction ภายในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราชเกี่ยวข้องกับระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน *ACTN1* และส่งผลให้ไก่โคราชกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่สูงมีการทำงานของเยื่อบุผิวและการดูดซึมสารอาหารดีกว่าเมื่อเทียบกับไก่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ต่ำส่งผลให้ไก่ทั้งสองกลุ่มมีประสิทธิภาพการใช้อาหารแตกต่างกัน





ภาพที่ 4.3 ผลลักษณะสัณฐานวิทยาของ Tight junction (TEM, $\times 89,000$) ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ระหว่างไคกลุ่ม LRFI (A, C, E) และ HRFI (B, D, F) ในไคโคราช LRFI คือ Low Residual feed intake และ HRFI คือ High Residual feed intake ระยะห่างของ tight junction ถูกวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านดังแสดงในวิธีดำเนินการ มาตรฐานเท่ากับ 100 นาโนเมตร

4.4 Principal component (PC) analysis ของการแสดงออกของยีนและโปรตีน *ACTN1* สัมพันธ์กับวิทยาของ tight junction และ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (RFI)



ภาพที่ 4.5 Principal component (PC) analysis ของระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนในไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง (LRFI) และไก่โคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (HRFI) score plot PC1 กับ PC2 (ภาพA) และ correlation loading plot PC1 กับ PC2 (ภาพB)

หมายเหตุ: ผลการทดลองแสดงค่า $\pm$ ความคาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard Error of measurement: SEM) (n=15). *, $P < 0.05$.

Principal component (PC) analysis นำมาใช้เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนและโปรตีน *ACTN1* กับลักษณะสัณฐานวิทยาของ tight junction และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (RFI) ของไกโคราช (แสดงในรูปที่ 4.6A และ B) แผนภาพนี้แสดงให้เห็นว่า Principal component (PCs) สามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้ 17% โดย PC1 อธิบายได้มากที่สุด (79%) ในการทดลองครั้งนี้พบว่าในไกโคราชกลุ่ม LRFI เป็นไกโคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงพบว่ามีค่า RFI ต่ำ และในไกโคราชกลุ่ม HRFI เป็นไกโคราชที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ พบว่ามีค่า RFI สูง (Koch et al., 1963) และระดับการแสดงออกของยีน *ACTN1* ในไกทั้งสองกลุ่มสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของโปรตีน *ACTN1* ไกที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง (LRFI) มีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Tight junction สูง แต่ไกกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (HRFI) มีระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Tight junction ต่ำ (Hetch, 2001) RFI มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญกับระดับการแสดงออกของยีน ($P < 0.05$) ซึ่งกระบวนการ Tight junction เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารภายในลำไส้ จึงสามารถยืนยันได้ว่าไกกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง (LRFI) มีประสิทธิภาพในการดูดซึมภายในลำไส้สูงกว่าไกกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (HRFI) (Kaewsatuan et al., 2022) และสอดคล้องกับผลการศึกษาระยะห่างระหว่าง enterocyte พบว่าในไกกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง (LRFI) ระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Tight junction มีระดับการแสดงออกสูง ระยะห่างของ Tight junction สั้น แต่ในไกกลุ่มที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ (HRFI) ระยะห่างของ Tight junction enterocyte ยาว ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งเกิดจากการทำงานของยีนและโปรตีน *ACTN1* ซึ่งเป็นยีนและโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับแอกตินกับเยื่อหุ้มเซลล์ (F-actin) (Groschwitz and Hogan, 2009) ทำให้เซลล์ดูดซึมยึดเกาะกันอย่างแน่นหนาลดการอักเสบของพื้นผิวลำไส้จากการติดเชื้อของเชื้อโรคที่เข้าสู่พื้นที่ภายใต้ subepithelial cell (Peng et al., 2017)

ดังนั้นการใช้ Principal component (PC) analysis จึงสามารถยืนยันได้ว่าแสดงออกของยีนและโปรตีน *ACTN1* กับลักษณะสัณฐานวิทยาของ tight junction และประสิทธิภาพการใช้อาหาร (RFI) ของไกโคราชมีความสัมพันธ์กัน

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

ระดับการแสดงออกของยีน *ATP5J*, *ATP5H* และ *ATP5D* ในกระบวนการ Oxidative phosphorylation ระหว่างไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงและไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ โดยเทคนิค q-PCR ไม่พบความแตกต่างกัน เป็นผลมาจากไมโทคอนเดรียทั้งสองกลุ่มมีประสิทธิภาพการสร้างพลังงานในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันซึ่งเห็นได้ว่าคุณค่า Metabolic body weight ในประสิทธิภาพการเจริญเติบโตก็ไม่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากระดับการแสดงออกของยีน แต่อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *ACTN1* และ *TUBA3E* ในกระบวนการ tight junction ระหว่างไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงและไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำแต่ไม่พบความแตกต่างของยีน *SLC9A3R1* และยังพบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของโปรตีน *ACTN1* ในกระบวนการ tight junction ซึ่งยีนและโปรตีนดังกล่าวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเยื่อหุ้มภายในลำไส้ และการดูดซึมของสารอาหารภายในเซลล์ และการแสดงออกของยีนและโปรตีน *ACTN1* ในกระบวนการ tight junction มีความสัมพันธ์กับลักษณะสัณฐานวิทยาของ tight junction และส่งผลให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารแตกต่างกัน

ทั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่สูงมีประสิทธิภาพการดูดซึมที่ดีกว่าไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ ซึ่งผลของการแสดงออกของยีนและโปรตีนในกระบวนการ Tight junction สอดคล้องกับผลของการศึกษาสัณฐานวิทยา tight junction ภายในลำไส้เล็กซึ่งพบว่าในไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงมีลักษณะของ tight junction ที่สมบูรณ์กว่าไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ และยังสรุปได้ว่ายีน *ACTN1* และ *TUBA3E* ในกระบวนการ Tight junction สามารถใช้เป็นยีน marker ในการคัดเลือกไมโทคอนเดรียที่มีประสิทธิภาพการดูดซึมภายในลำไส้เล็กส่วนกลางเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการใช้อาหารของไมโทคอนเดรียให้ดีขึ้นได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาของ Kaewsatean et al., 2022; Poompramun et al., 2021; Sinpru et al., 2021 และ Kubota et al., 2019 ทำให้มั่นใจได้ว่าการทำงานระดับโมเลกุลส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหาร การเจริญเติบโตของไมโทคอนเดรีย และในการศึกษาครั้งนี้ยัง

ได้ข้อมูลที่แน่ชัดว่ายีนและโปรตีนที่แสดงออกในกระบวนการ tight junction และสัญญาณวิทยาของ tight junction ใน Intestinal epithelial cell ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราชส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่โคราชซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปสู่การคัดเลือกไก่โคราชเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กรรมไก่โคราชให้มีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดียิ่งขึ้นและผู้วิจัยคาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์กับทุกภาคส่วนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไก่โคราช โดยเฉพาะเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่โคราชที่จะมีต้นทุนในการผลิตไก่โคราชลดลง ร้านอาหารที่จะนำผลิตภัณฑ์ไก่โคราชไปปรุงอาหารเพื่อจำหน่ายได้ในราคาที่ลดลงและได้กำไรสูงขึ้น ตลอดจนไปถึงผู้บริโภคที่จะได้ประโยชน์จากการรับประทานเนื้อไก่ที่มีคุณภาพในราคาที่จับต้องได้ และยังมีข้อมูลที่น่าสนใจที่เป็นประโยชน์กับนักวิจัยที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการใช้อาหารในไก่ชนิดโตช้า แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมเพิ่มมากขึ้นและศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะปรากฏโดยตรง เช่นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะสัญญาณวิทยาของ Tight junction ซึ่งเป็นลักษณะปรากฏที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ควรศึกษาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สามารถเก็บตัวอย่างได้โดยไม่ต้องฆ่าสัตว์เพิ่มเติม เพื่อเป็นวิธีการในการคัดเลือกไก่ต่อไปได้ เช่น การเจาะเลือด เป็นต้น



เอกสารอ้างอิง

- สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียนรู้มหาวิทยาลัยมหิดล. (2558). **กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน**. [ออนไลน์]. สืบค้นได้จาก <http://www.il.mahidol.ac.th/emedial/nano/Page/Unit4-5.html>. (สืบค้นวันที่4 กรกฎาคม 2565)
- สมาคมผู้ผลิตอาหารสัตว์ไทย. (2565). **สถานการณ์ราคาวัตถุดิบอาหารสัตว์**. [ออนไลน์]. สืบค้นได้จาก : <https://unglobalcompact.org/what-is-gc/participants/140790-Thai-Feed-Mill-Association>. (สืบค้นวันที่10 ตุลาคม 2565)
- Aggrey, S. E., Karnuah, A. B., Sebastian, B., and Anthony, N. B. (2010). **Genetic properties of feed efficiency parameters in meat-type chickens**. *Genetics Selection Evolution*, 42(1), 1–5.
- Alex Pasternak, C. Kent-Dennis, Van, A. G., and Wilson, H. L. (2015). **Claudin-4 Undergoes Age-Dependent Change in Cellular Localization on Pig Jejunal Villous Epithelial Cells, Independent of Bacterial Colonization**. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–14.
- Awad, W. A., Hess, C., and Hess, M. (2017). **Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens**. *Toxins*, 9(2), 60.
- Azizi, T., Mohsen Daneshyar, Manoochehr Allymehr, Ali Shalizar Jalali, and Hamed Khalilvandi Behroozyar. (2021). **The impact of deoxynivalenol contaminated diet on performance, immune response, intestine morphology and jejunal gene expression in broiler chicken**. *Toxicon*, 199, 72–78.
- Balda, M. S., Gonzalez-Mariscal, L., Matter, K., Cereijido, M., and Anderson, J. M. (1993). **Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol**. *Journal of Cell Biology*, 123(2), 293–302.
- Ballard, S. T., Hunter, J. H., and Taylor, A. E. (1995). **Regulation of Tight-Junction Permeability During Nutrient Absorption Across the Intestinal Epithelium**. *Annual Review of Nutrition*, 15(1), 35–55.
- Barfull, Garriga, C., Montserrat Mitjans, and Planas, J. M. (2002). **Ontogenetic expression and regulation of Na⁺-d-glucose cotransporter in jejunum of**

- domestic chicken.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 282(3), G559–G564.
- Bottje, W., Pumford, N. R., Ojano-Dirain, C., Iqbal, M., and Lassiter, K. (2006). **Feed Efficiency and Mitochondrial Function.** *Poultry Science*, 85(1), 8–14.
- Bruewer, M., Hopkins, A. M., Hobert, M. E., Asma Nusrat, and Madara, J. L. (2004). **RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(2), 327–335.
- Chiba, H., Makoto Osanai, Murata, M., Kojima, T., and Sawada, N. (2008). **Transmembrane proteins of tight junctions.** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(3), 588–600.
- Choct, M. (2009). **Managing gut health through nutrition.** *British Poultry Science*, 50(1), 9–15.
- de Verdal, H., Mignon-Grasteau, S., Jeulin, C., Le Bihan-Duval, E., Leconte, M., Mallet, S., Martin, C., and Narcy, A. (2010). **Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines divergently selected for digestive efficiency.** *Poultry Science*, 89(9), 1955–1961.
- Di Cara, F., Andreoletti, P., Trompier, D., Vejux, A., Bülow, M. H., Sellin, J., Lizard, G., Cherkaoui-Malki, M., and Savary, S. (2019). **Peroxisomes in Immune Response and Inflammation.** *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3877.
- Filip De Meyer, Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Dhaenens, M., Daled, S., Annelike Dedeurwaerder, M. de Gussem, Haesebrouck, F., Dieter Deforce, and Filip Van Immerseel. (2019). **Host intestinal biomarker identification in a gut leakage model in broilers.** *Veterinary Research*, 50(1).
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., and Toulmin, C. (2010). **Food Security: the Challenge of Feeding 9 Billion People.** *Science*, 327(5967), 812–818.
- Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., and Magness, S. T. (2013). **Cell lineage identification and stem cell culture in a porcine model for the study of intestinal epithelial regeneration.** *PloS One*, 8(6), e66465.

- Groschwitz, K. R., and Hogan, S. P. (2009). **Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3–20.
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. (1991). **Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(8), 3460–3464.
- Günzel, D., and Yu, A. S. L. (2013). **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** *Physiological Reviews*, 93(2), 525–569.
- Huang, J., Liu, T., Li, K., Song, X., Ren, Y., Xu, L., and Li, X. (2018). **Proteomic analysis of protein interactions between Eimeria maxima sporozoites and chicken jejunal epithelial cells by shotgun LC-MS/MS.** *Parasites and Vectors*, 11(1).
- Jesaitis, L., and Goodenough, D. (1994). **Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein.** *Journal of Cell Biology*, 124(6), 949–961.
- Jing, H., Wang, S., Wang, Y., Shen, N., and Gao, X. (2020). **Environmental contaminant ammonia triggers epithelial-to-mesenchymal transition-mediated jejunal fibrosis with the disassembly of epithelial cell-cell contacts in chicken.** *Science of the Total Environment*, 726, 138686–138686.
- Kaewsatun, P., Poompramun, C., Kubota, S., Yongsawatdigul, J., Molee, W., Uimari, P., and Molee, A. (2022). **Comparative proteomics revealed duodenal metabolic function associated with feed efficiency in slow-growing chicken.** *Poultry Science*, 101(6), 101824.
- Kubota, S., Vandee, A., Keawnakient, P., Molee, W., Yongsawatdikul, J., and Molee, A. (2019). **Effects of the MC4R, CAPN1, and ADSL genes on body weight and purine content in slow-growing chickens.** *Poultry Science*, 98(10), 4327–4337.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J biol Chem*, 193(1), 265–75.
- Li, J., Li, Q., and Geng, S. (2019). **All-trans retinoic acid alters the expression of the tight junction proteins Claudin-1 and -4 and epidermal barrier**

- function-associated genes in the epidermis. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(4), 1789–1805.
- Liu, Y., Hyde, A. S., Simpson, M. A., and Barycki, J. J. (2014). **Emerging Regulatory Paradigms in Glutathione Metabolism.** *Advances in Cancer Research*, 122, 69–101.
- Liu, Y., Song, M., Che, T. M., Almeida, J. A. S., Lee, J. J., Bravo, D., Maddox, C. W., and Pettigrew, J. E. (2013). **Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*.** *Journal of Animal Science*, 91(11), 5294–5306.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.** *Methods*, 25(4), 402–408.
- Mabelebele, M., Alabi, O. J., Ng'ambi, J. W., Norris, D., and Ginindza, M. M. (2014). **Comparison of Gastrointestinal Tracts and pH Values of Digestive Organs of Ross 308 Broiler and Indigenous Venda Chickens Fed the Same Diet.** *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(1), 71–76.
- Mishra, B., and Jha, R. (2019). **Oxidative Stress in the Poultry Gut: Potential Challenges and Interventions.** *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 60.
- Mònica Torras-Llort, Torrents, D., Soriano-García, J. F., Josep Lluís Gelpí, Raúl Estévez, Ferrer, R., PalacínM., and Moretó, M. (2001). **Sequential Amino Acid Exchange across b₀,+ -like System in Chicken Brush Border Jejunum.** *The Journal of Membrane Biology*, 180(3), 213–220.
- Nain, S., Renema, R. A., Zuidhof, M. J., and Korver, D. R. (2012). **Effect of metabolic efficiency and intestinal morphology on variability in n-3 polyunsaturated fatty acid enrichment of eggs.** *Poultry Science*, 91(4), 888–898.
- Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N., and Bhattarai, H. K. (2019). **ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition.** *Biomolecular Concepts*, 10(1), 1–10.
- Osselaere, A., Lies De Bock, Eeckhaut, V., Patrick De Backer, Jan Van Bocxlaer, Koen Boussery, and Siska Croubels. (2013). **Hepatic and intestinal CYP3A expression and activity in broilers.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), 588–593.

- Panwar, S., Sharma, S., and Tripathi, P. (2021). **Role of Barrier Integrity and Dysfunctions in Maintaining the Healthy Gut and Their Health Outcomes.** *Frontiers in Physiology*, 12, 715611.
- Peng, D., Jin, W., Li, J., Xiong, W., Pei, Y., Wang, Y., and Li, Y. (2017). **Adsorption and Distribution of Edible Gliadin Nanoparticles at the Air/Water Interface.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2454–2460.
- Poompramun, C., Hennequet-Antier, C., Thumanu, K., Sinpru, P., Pengsanthia, S., Molee, W., Molee, A., Le Bihan-Duval, E., and Juanchich, A. (2021). **Revealing Pathways Associated with Feed Efficiency and Meat Quality Traits in Slow-Growing Chickens.** *Animals*, 11(10), 2977.
- Prakash, A., Saxena, V. K., and Singh, M. K. (2020). **Genetic analysis of residual feed intake, feed conversion ratio and related growth parameters in broiler chicken: a review.** *World's Poultry Science Journal*, 76(2), 304–317.
- Ravindran, V., and Abdollahi, M. R. (2021). **Nutrition and Digestive Physiology of the Broiler Chick: State of the Art and Outlook.** *Animals*, 11(10), 2795.
- Reham A. I. Abou-Elkhair, Heba Abdo Basha, El, A., Ajarem, J. S., Maodaa, S. N., Allam, A. A., and Mohammed. (2020). **Effect of a Diet Supplemented with the Moringa oleifera Seed Powder on the Performance, Egg Quality, and Gene Expression in Japanese Laying Quail under Heat-Stress.** *Animals*, 10(5), 809–809.
- Rougière, Gomez, J., Sandrine Mignon-Gasteau, and Carré, B. (2009). **Effects of diet particle size on digestive parameters in D+ and D- genetic chicken lines selected for divergent digestion efficiency.** *Poultry Science*, 88(6), 1206–1215.
- Saito, A., Higashi, T., Yugo Fukazawa, Otani, T., Masashi Tauchi, Higashi, A. Y., Mikio Furuse, and Chiba, H. (2021). **Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function.** *Molecular Biology of the Cell*, 32(8), 722–738.
- Sangsawad, P., Kiatsongchai, R., Chitsomboon, B., and Yongsawatdigul, J. (2016). **Chemical and Cellular Antioxidant Activities of Chicken Breast Muscle Subjected to Various Thermal Treatments Followed by Simulated Gastrointestinal Digestion.** *Journal of Food Science*, 81(10), 2431–2438.

- Sasikan Katemala, Amonrat Molee, Kanjana Thumanu, and Jirawat Yongsawatdigul. (2021). **Meat quality and Raman spectroscopic characterization of Korat hybrid chicken obtained from various rearing periods.** *Poultry Science*, 100(2), 1248–1261.
- Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D., and Turner, J. R. (2011). **Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo.** *Annual Review of Physiology*, 73(1), 283–309.
- Sina-Catherine Siegerstetter, Schmitz-Esser, S., Magowan, E., Wetzels, S. U., Qendrim Zebeli, Lawlor, P. G., Niamh O'Connell, and Metzler-Zebeli, B. U. (2017). **Intestinal microbiota profiles associated with low and high residual feed intake in chickens across two geographical locations.** *PLOS ONE*, 12(11), e0187766–e0187766.
- Sinpru, P., Riou, C., Kubota, S., Poompramun, C., Molee, W., and Molee, A. (2021). **Jejunal Transcriptomic Profiling for Differences in Feed Conversion Ratio in Slow-Growing Chickens.** *Animals*, 11(9), 2606.
- So, A., and Thorens, B. (2010). **Uric acid transport and disease.** *Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1791–1799.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., and Goodenough, D. A. (1986). **Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia.** *The Journal of Cell Biology*, 103(3), 755–766.
- Wei, G., Yi, S., Yong, D., Shaozhuang, L., Guangyong, Z., and Sanyuan, H. (2018). **miR-320 mediates diabetes amelioration after duodenal-jejunal bypass via targeting adipoR1.** *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 14(7), 960–971.
- Willems, O. W., Miller, S. P., and Wood, B. J. (2013). **Aspects of selection for feed efficiency in meat producing poultry.** *World's Poultry Science Journal*, 69(1), 77–88.
- Xiao, C., Deng, J., Zeng, L., Sun, T., Yang, Z., and Yang, X. (2021). **Transcriptome Analysis Identifies Candidate Genes and Signaling Pathways Associated With Feed Efficiency in Xiayan Chicken.** *Frontiers in Genetics*, 12, 607719.
- Xu, Z., Ji, C., Zhang, Y., Zhang, Z., Nie, Q., Xu, J., Zhang, D., and Zhang, X. (2016). **Combination analysis of genome-wide association and transcriptome**

- sequencing of residual feed intake in quality chickens. *BMC Genomics*, 17(1), 1–14.
- Yang, Q., Chen, B., Robinson, K., Thiago Sakomoto Belem, Lyu, W., Deng, Z., Ramanathan, R., and Zhang, G. (2022). **Butyrate in combination with forskolin alleviates necrotic enteritis, increases feed efficiency, and improves carcass composition of broilers.** *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1).
- Yi, Z., Li, X., Luo, W., Xu, Z., Ji, C., Zhang, Y., Nie, Q., Zhang, D., and Zhang, X. (2018). **Feed conversion ratio, residual feed intake and cholecystokinin type A receptor gene polymorphisms are associated with feed intake and average daily gain in a Chinese local chicken population.** *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 1–9.
- Zamani, P., Seied Reza Miraei-Ashtiani, and Hosein, M. (2008). **Genetic Parameters of Residual Energy Intake and Its Correlations with Other Traits in Holstein Dairy Cattle.** *DergiPark (Istanbul University)*, 32(4), 255–261.
- Zhang, L., Wang, X., Huang, S., Huang, Y., Shi, H., and Bai, X. (2023). **Effects of dietary essential oil supplementation on growth performance, carcass yield, meat quality, and intestinal tight junctions of broilers with or without Eimeria challenge.** *Poultry Science*, 102(9), 102874.
- Zhang, S., Qiao, S., Ren, M., Zeng, X., Ma, X., Wu, Z., Thacker, P., and Wu, G. (2013). **Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs.** *Amino Acids*, 45(5), 1191–1205.
- Zhu, F., Yuan, J., Zhang, Z.-H., Hao, J., Yang, Y.-R., Hu, S., Yang, F., Qu, L., and Hou, Z. (2015). **De novotranscriptome assembly and identification of genes associated with feed conversion ratio and breast muscle yield in domestic ducks.** *Animal Genetics*, 46(6), 636–645.
- Zou, Y., Xiong, J., Ma, K., Wang, A.-Z., and Qian, K.-J. (2017). **Rac2 deficiency attenuates CCl4-induced liver injury through suppressing inflammation and oxidative stress.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94, 140–149.



ภาคผนวก
วิธีดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการ

การเตรียมสารเคมี

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. EDTA 0.5 M pH 8.0 ละลาย EDTA 16.81 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมสารละลายกรด HCl เข้มข้นให้ได้ pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Deionized ให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที
2. Tris-Basic-EDTA buffer 10x (TBE) ละลาย Tris base 108 กรัม boric acid 55 กรัม ในสารละลาย EDTA 0.5 M pH 8.0 40 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที
3. Tris-Basic-EDTA buffer 1x (TBE) ละลาย Tris-Basic-EDTA buffer 10x (TBE) 1 ส่วน ต่อ น้ำ Deionized 9 ส่วน ก่อนนำไปใช้ในการทำเป็น electrophoresis buffer ในการทำ gel electrophoresis
4. PBS pH 7.4 ละลาย NaCl 8.0 กรัม KCl 0.2 กรัม Na_2HPO_4 1.44 กรัม และ KH_2PO_4 0.24 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลาย NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ Deionized ให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที
5. Sodium dodecyl sulphate (SDS) 10% ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำ Deionized 90 มิลลิลิตร วางบน hot plate 56°C คนจนละลายหมด วางจนเย็น แล้วปรับ pH ให้เป็น 7.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Deionized ให้ครบ 100 มิลลิลิตร
6. CIA เตรียม Isoamyl-alcohol 1 ส่วน ต่อ Chloroform 24 ส่วน
7. สารละลาย BSA มาตรฐาน ละลาย Bovine serum albumin 1.0 มิลลิกรัม ในน้ำ Deionized 10 มิลลิลิตร และเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำ Deionized ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายได้ (Soluble Protein)

โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A: คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

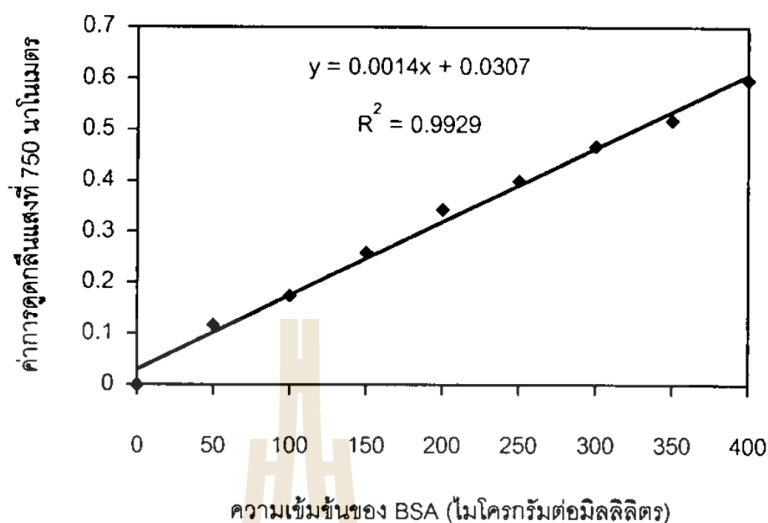
2. สารละลาย B: โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate $4\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
3. สารละลาย C: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
4. Folin-ciocalteu reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย WS1 และ WS2 ใหม่ก่อนใช้งานทุกครั้ง
 WS1: สารละลายผสมของสารละลาย A: สารละลาย B: สารละลาย C ในอัตราส่วน 1:1:98 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)
 WS2: สารละลาย Folin-ciocalteu reagent เจือจางในน้ำ Deionized ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
2. เติมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม (5-100 ไมโครกรัม) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลาย WS1 ในปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร ปั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลาย WS2 ในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปั่นผสมทันทีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
5. นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ส่วน Blank วิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกัน แต่ใช้น้ำ Deionized แทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

1. ละลาย Bovine serum albumin 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Deionized ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่เป็น Stock solution ที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เจือจางสารละลาย Bovine serum albumin (Stock solution) ให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำ Stock solution ปริมาตร 0, 0.5 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ตามลำดับมาปรับปริมาตร ของแต่ละหลอดให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ Deionized
3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น
4. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ Bovine serum albumin



ภาพที่ ก.1 การแยกมวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตามวิธีการของ Laemmli (1970)

สารเคมี

1. 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 (Bio-rad)
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
4. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เก็บในอุณหภูมิห้อง
5. Stock sample buffer (SDS reducing buffer) ประกอบด้วย

น้ำ Deionized	3.8 มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1.0 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8 มิลลิลิตร
10% SDS	1.6 มิลลิลิตร
เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล	0.4 มิลลิลิตร
1% โบโรไมฟีนอลบลู	0.4 มิลลิลิตร
6. 5X electrode running buffer , pH 8.3

Tris-base 9 กรัม
ไกลซีน 43.2 กรัม
SDS 3 กรัม
ละลายในน้ำ Deionized ให้ได้ 500 มิลลิลิตร
7. Catalyst ประกอบด้วย

2% (w/v) Ammonium Persulphate เตรียมก่อนใช้

8. สีย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R 250

9. Straining solution เตรียมโดยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R 250 0.04 กรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร ทำให้ละลายแล้วเติม glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำ Deionized 85 มิลลิลิตร

10. Destaining solution เมทานอล 500 มิลลิลิตร และ Acetic acid 200 มิลลิลิตร ในน้ำ Deionized 1300 มิลลิลิตร

11. วิธีการเตรียมตัวอย่าง

12. ทำการผสมสารละลายตัวอย่างและ Sample buffer, laemmli 2x Concentrate ในอัตราส่วน 1:1 ทำการต้มสารละลายที่ได้ในอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำตัวอย่างไปใส่ในเจล

13. การเตรียมองค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-Page ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ ก.1 SDS-Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE)

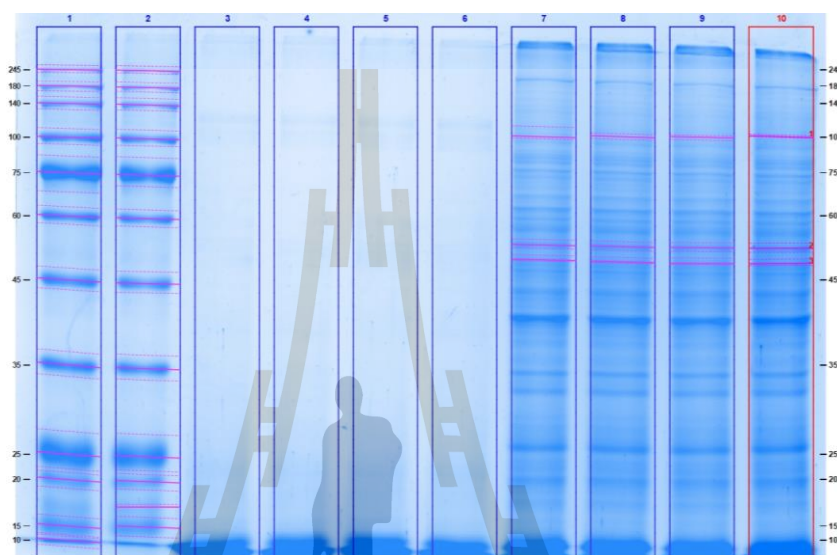
Stracking		Separating	
Gel percentage (%)	4 %	Gel percentage (%)	10 %
40% Polyacrylamide	625 μ l.	40% Polyacrylamide	2500 μ l.
1.5M Tris(pH6.8)	625 μ l.	1.5M Tris(pH8.8)	2500 μ l.
10% Ammonium persulfate	50 μ l.	10% Ammonium persulfate	100 μ l.
10% SDS	50 μ l.	10% SDS	100 μ l.
TEMED	5 μ l.	TEMED	4 μ l.
H ₂ O	3650 μ l.	H ₂ O	4800 μ l.
Total volume	5000 μ l.	Total volume	10000 μ l.

วิธีการ run gel electrophoresis (running gel)

ประกอบชุดเจล electrophoresis จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber จากนั้นทำการโหลดตัวอย่างที่เตรียม 4 ไมโครลิตร ต่อชุด electrophoresis เข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้า (power supply) ที่ขั้วแอโนด และแคโทดด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ จนสีของโบมอฟีนอล บลู เคลื่อนที่ถึง running gel (ประมาณ 30 นาที) แล้วเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ จนสีของโบมอฟีนอล บลู เคลื่อนที่ถึงจนเกือบสุดปลายกระຈก จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

วิธีการย้อมเจล

ย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงล้างส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining solution เพื่อตรวจสอบปริมาณการหยอดและการแยกของโปรตีนตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล

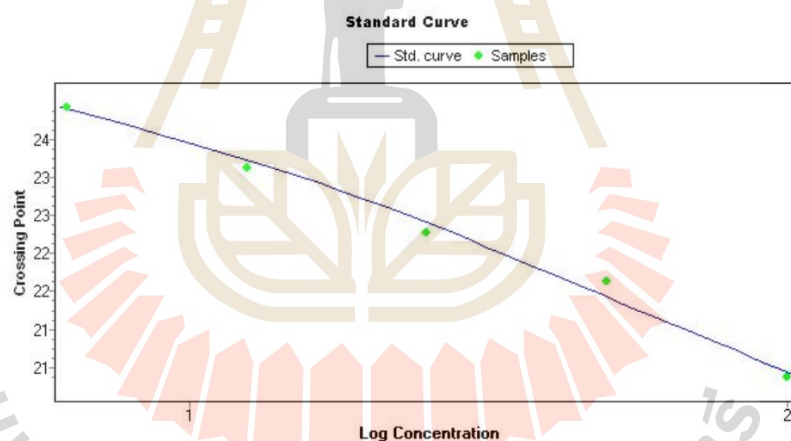


ภาพที่ ก.2 การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Blotting)

1. ประกอบเจลและเมมเบรนลงใน Mini Trans-Blot และเติมทรานเฟอร์บัฟเฟอร์ (Transfer buffer) ลงไปในแชมเบอร์พร้อมใส่น้ำแข็ง
2. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังเมมเบรนด้วยกระแสไฟฟ้า 350 mA. นาน 1 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบการย้ายโปรตีนด้วยการนำเมมเบรนไปแช่ใน 0.1 % ponceau S (w/v) ใน 5% acetic acid (v/v) นาน 5 ชั่วโมง
4. ล้าง Ponceau Solution ด้วย 0.1 M NaOH
5. ล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น
6. นำเมมเบรนแช่ 5% non fat dried milk ใน Tris buffer saline (TBS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อบล็อกโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง
7. ล้างเมมเบรนด้วย Tris buffer saline with tween 20 (TST) 200 มิลลิลิตร ประมาณ 5 วินาที
8. แช่เมมเบรนในแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (anti-parvalbumin) ใน 3% non fat dried milk ใน TST อัตราส่วน 1:1,000 นาน 2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าในอุณหภูมิห้อง
9. ล้างเมมเบรนด้วย TST 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่องเขย่า

10. แช่เมมเบรนในแอนติบอดีตัวที่สอง (Anti-Rabbit IgG 1:5,000) in 3% non fat dried milk ใน TST อัตราส่วน 1:5,000 นาน 2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าในอุณหภูมิห้อง
11. ล้างเมมเบรนด้วย TST 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
12. ล้างเมมเบรนด้วย TBS 200 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 1 นาที
13. แช่เมมเบรนด้วย chemiluminescence reagent นาน 5 นาที
14. Exposed membrane ด้วย hyperfilm นาน 4 ชั่วโมง
15. นำฟิล์มไปทำให้เกิดภาพในน้ำยา Developer นาน 45 วินาทีและหยุดปฏิกิริยาการเกิดภาพในน้ำยา Fixer นาน 20 วินาที
16. วัดขนาดของแถบโปรตีนโดยนำแผ่นฟิล์มไปสแกนด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (Densitometer) รุ่น G 700 ของ Bio rad ด้วยโปรแกรม Molecular analysis V. 1.4 และวิเคราะห์รูปด้วยโปรแกรม

Standard curve Standard Curve Ct vs Log cDNA dilution



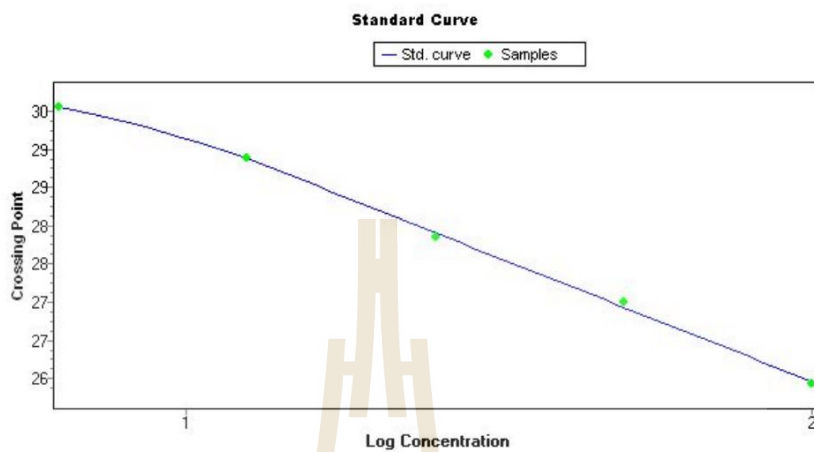
Efficiency: 2.025

Slope: -3.264

Efficiency of primers (E) = 102.48%

ภาพที่ ก.3 Primer Efficiency ของยีน GAPDH ในลำไส้เล็กส่วนกลาง

Standard curve Standard Curve Ct vs Log cDNA dilution



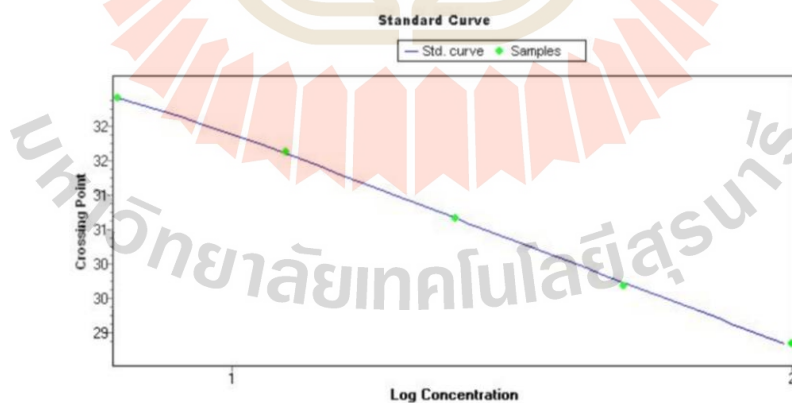
Efficiency: 2.036

Slope: -3.238

Efficiency of primers (E) = 103.63%

ภาพที่ ก.4 Primer Efficiency ของยีน TUBA3E ในลำไส้เล็กส่วนกลาง

Standard curve Standard Curve Ct vs Log cDNA dilution



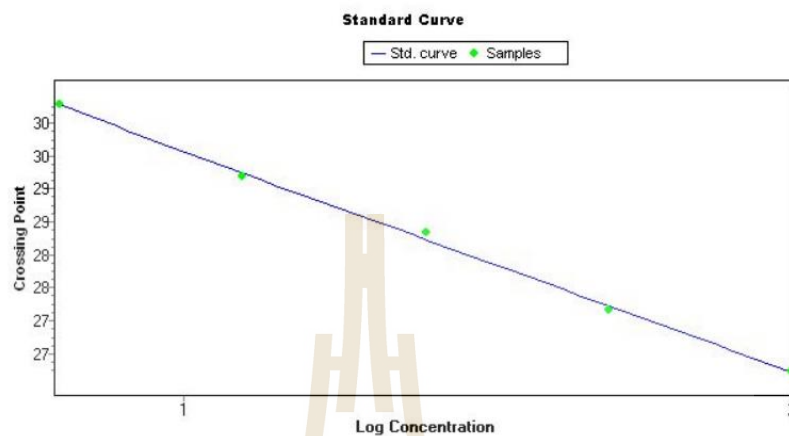
Efficiency: 2.104

Slope: -3.095

Efficiency of primers (E) = 110.43%

ภาพที่ ก.5 Primer Efficiency ของยีน ATP5H ในลำไส้เล็กส่วนกลาง

Standard curve Standard Curve Ct vs Log cDNA dilution

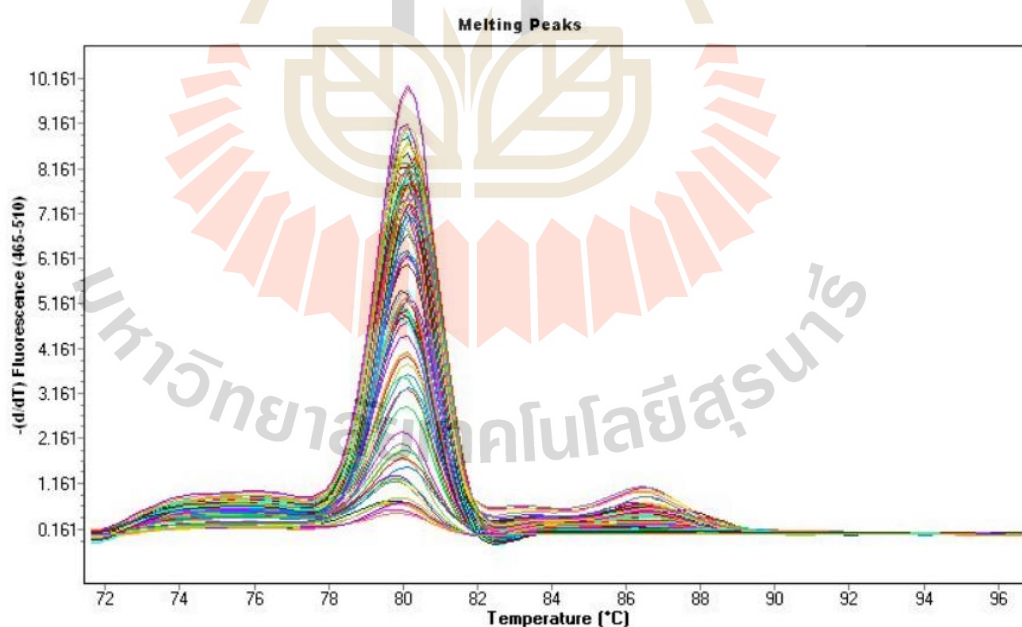


Efficiency: 2.104

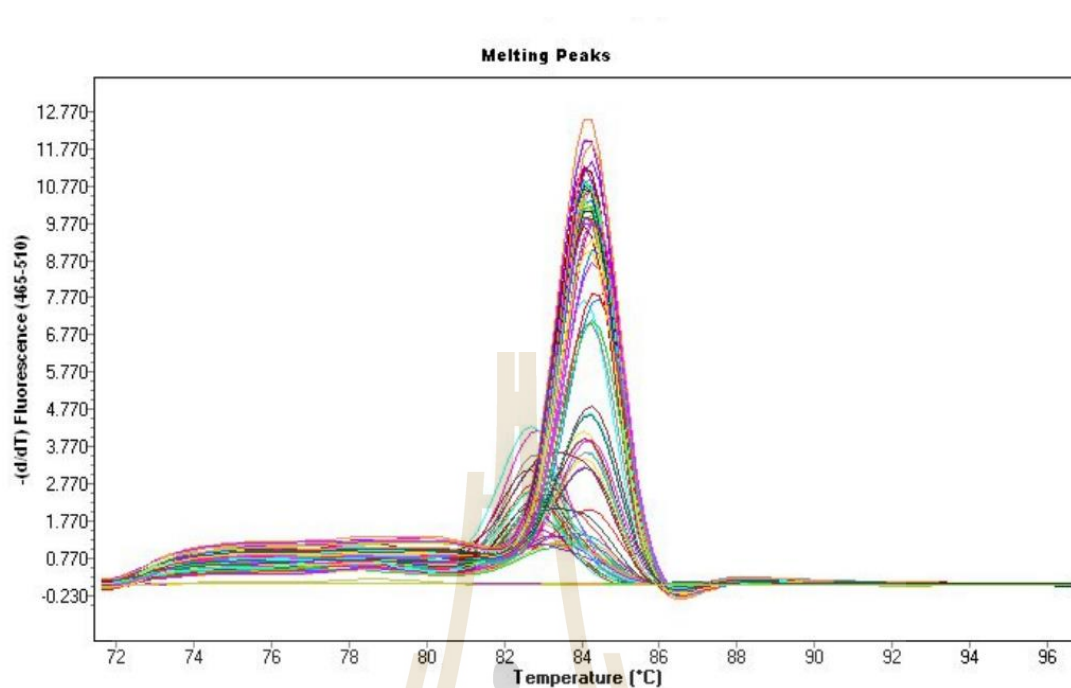
Slope: -3.344

Efficiency of primers (E) = 99.09%

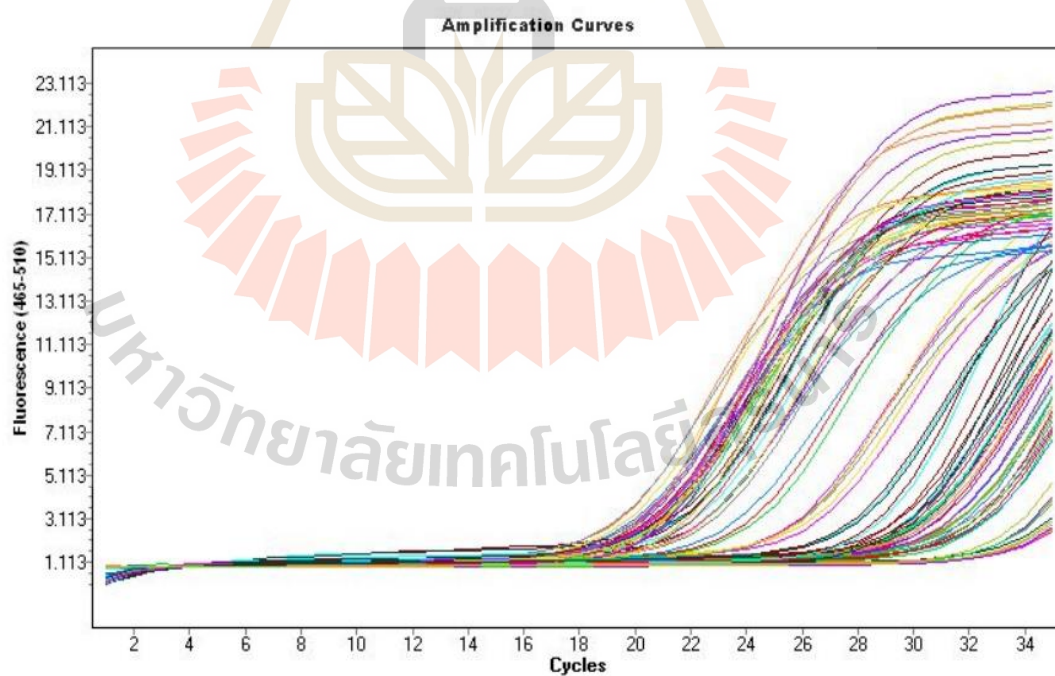
ภาพที่ ก.6 Primer Efficiency ของยีน SLC9A3R1 ในลำไส้เล็กส่วนกลาง



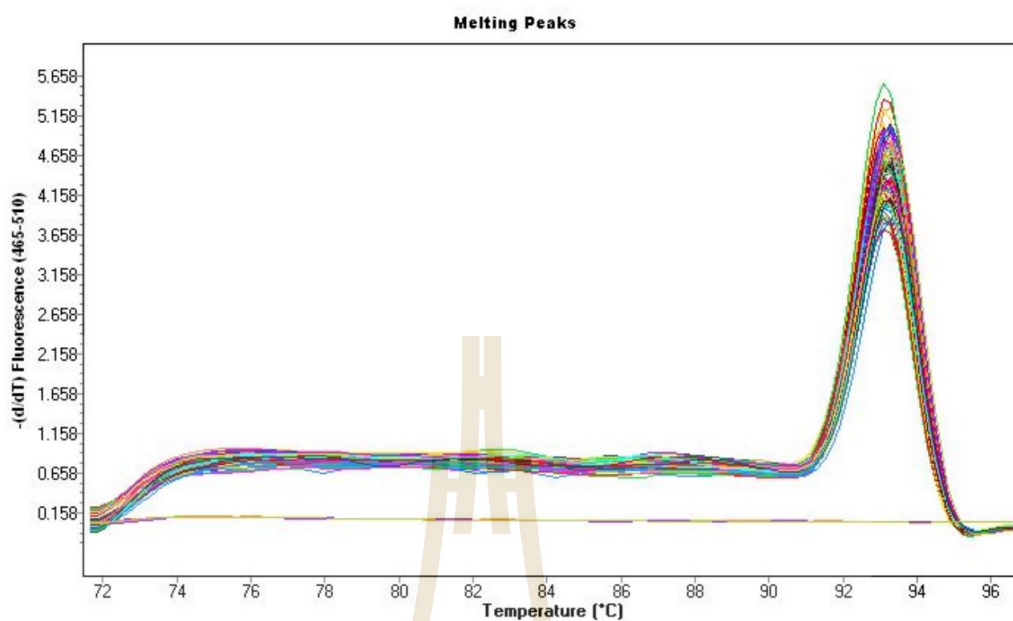
ภาพที่ ก.7 ภาพประกอบเพื่อดูการแสดงออกของยีน GADHP ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราช



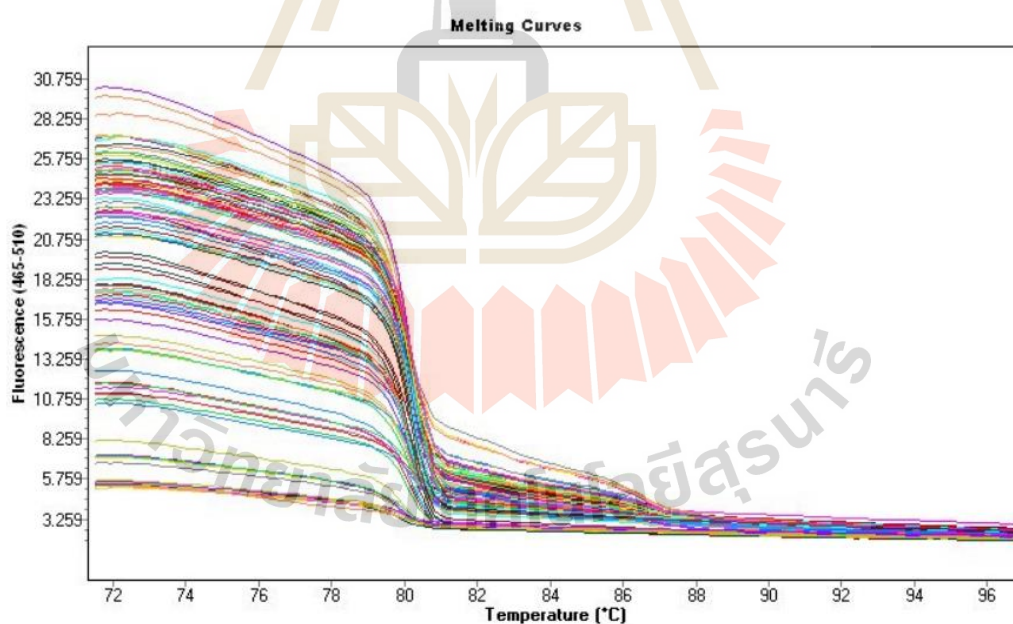
ภาพที่ ก.8 ภาพประกอบเพื่อแสดงออกของยีน TUBA3E ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราช



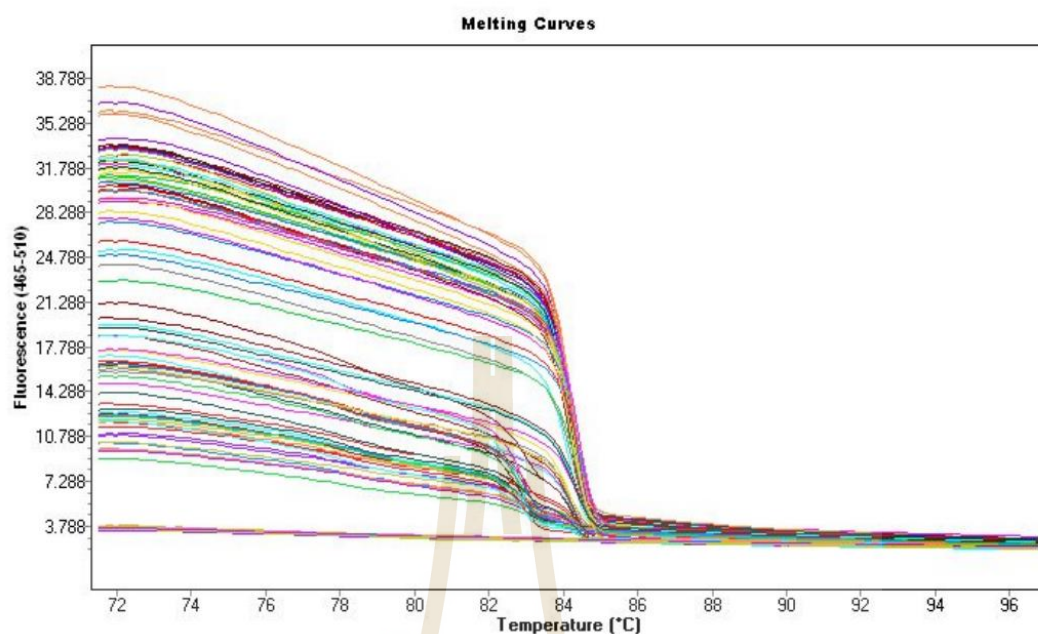
ภาพที่ ก.9 ภาพประกอบเพื่อแสดงออกของยีน GADPH ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราช



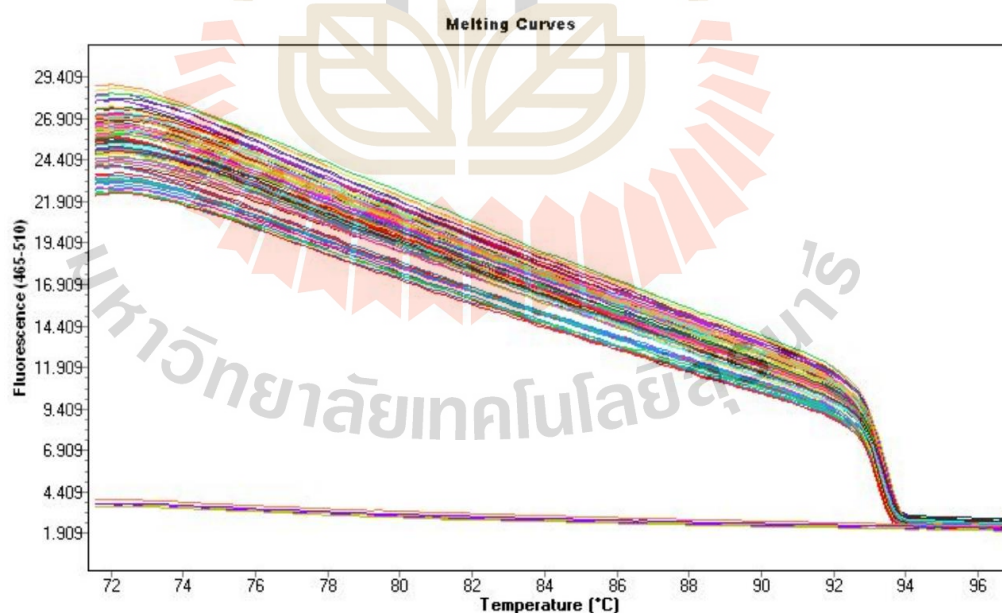
ภาพที่ ก.10 ภาพประกอบเพื่อการแสดงออกของยีน SLC9A3R1 ในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่โคราช



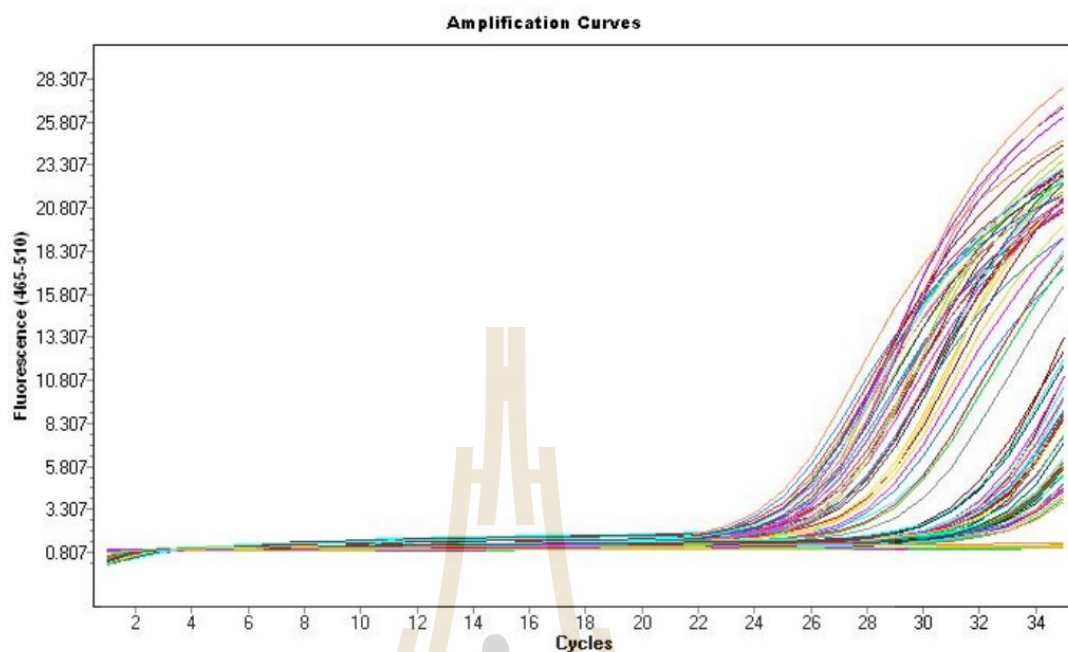
ภาพที่ ก.11 Melting Curve ของยีน GADPH กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับอุณหภูมิ โดยใช้ SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ด้วยเครื่อง Real Time PCR



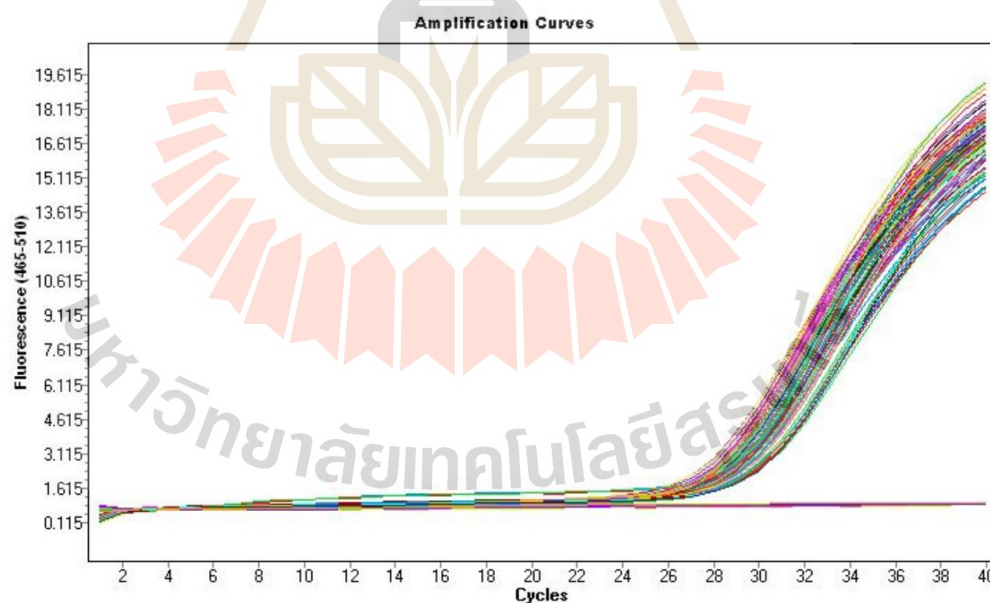
ภาพที่ ก.12 Melting Curve ของยีน TUBA3E กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับอุณหภูมิ โดยใช้ SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ด้วยเครื่อง Real Time PCR



ภาพที่ ก.13 Melting Curve ของยีน GADPH กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence กับอุณหภูมิ โดยใช้ SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) ด้วยเครื่อง Real Time PCR



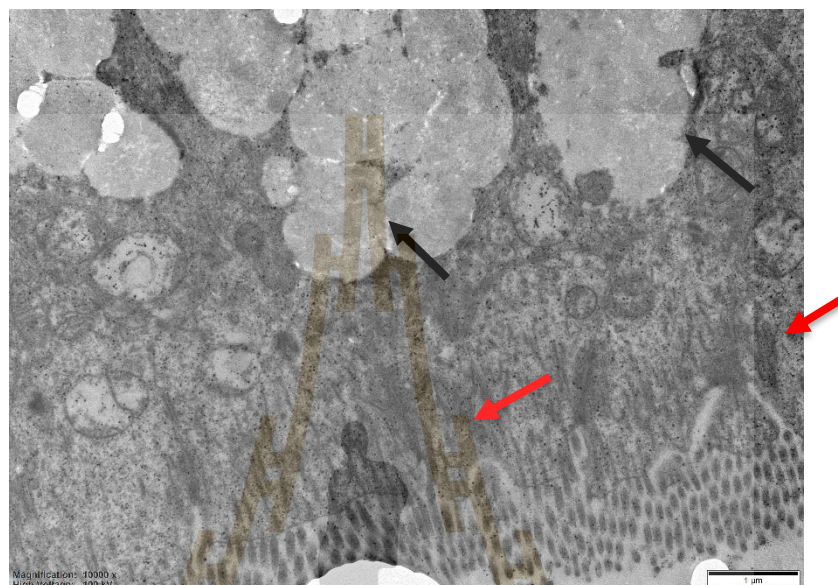
ภาพที่ ก.14 Amplification of Jejunum TUBA3E gene expression threshold of real-time PCR reaction



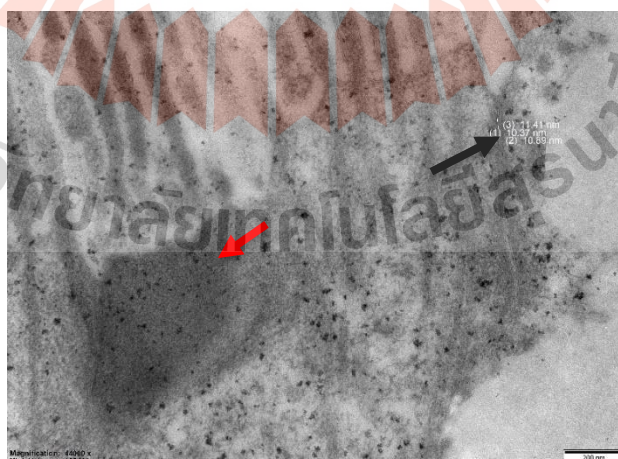
ภาพที่ ก. 15 Amplification of Jejunum SLC9A3R1 gene expression threshold of real-time PCR reaction

ลักษณะสัณฐานวิทยา

เทคนิคกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องผ่าน Transmission electron microscope (TEM) เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของไทด์จังก์ชัน



ภาพที่ ก.16 ภาพแสดงถึงช่องว่างระหว่างเซลล์ที่ผิดปกติและความผิดปกติของ Tight junction (ลูกศรสีแดง) ไมโทคอนเดรียภายในเซลล์บวม (ลูกศรสีดำ) ไม่สามารถวัดระยะห่างของ Tight junction ระหว่างเซลล์ในภาพนี้ได้



ภาพที่ ก. 17 ภาพแสดงระยะห่างของ Tight junction (ลูกศรสีดำ) มีระยะห่างเกินจากปกติ บริเวณที่มีสีดำเข้ม คือ บริเวณที่สันนิษฐานว่าลำไส้อักเสบ (ลูกศรสีแดง)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุกฤตา กองทุ่งมน เกิดวันที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ.2541 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย ชัยภูมิ อ.เมือง จ.ชัยภูมิ และสำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนชัยภูมิภักดีชุมพล อ.เมือง จ.ชัยภูมิ เข้ารับการศึกษาในระดับปริญญาตรี ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำเร็จการศึกษาเมื่อ พ.ศ.2563 จากนั้นเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2564 และมีโอกาสได้เข้าทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยทุนโครงการผู้ช่วยวิจัยในสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอนแห่งประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในเดือน กันยายน พ.ศ.2564 ถึงตุลาคม พ.ศ.2566 เป็นระยะเวลา 2 ปี



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี