บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

แบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักดองของประเทศไทย

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองพื้นเมืองของไทยแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ (Tanasupawat และ Komakata, 1995) คือ ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ ปลาส้ม ปลาเจ่า ปลาจ่อม ส้มฟัก เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเกลืออยู่ต่ำกว่า 8% โดยมีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.9 ถึง 6.1 และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 2.4×10^5 ถึง 6.0×10^{10} cells/g ส่วนน้ำปลา กะปิ ไตปลา และปลาร้า เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือมากกว่า 8% และ pH อยู่ระหว่าง 4.7 ถึง 6.6 และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1.8×10^2 ถึง 8.9×10^7 cells/g ประเภทที่ 2 คือผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีเกลือต่ำประมาณ 1-4% โดยมี pH อยู่ระหว่าง 3.8 ถึง 4.6 และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 3.2×10^7 ถึง 5.3×10^{10} cells/g ประเภทที่ 3 คือผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง ได้แก่ ผักกาดดอง ผักขมดอง ผักหนามดอง ผักเสี้ยนดอง ถั่วงอกดอง หอมดอง และหน่อไม้ดอง ส่วนผลไม้ดองทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์หมักในน้ำเกลือ

แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (วิลาวัณย์, 2539)

1. Homofermentative lactic acid bacteria

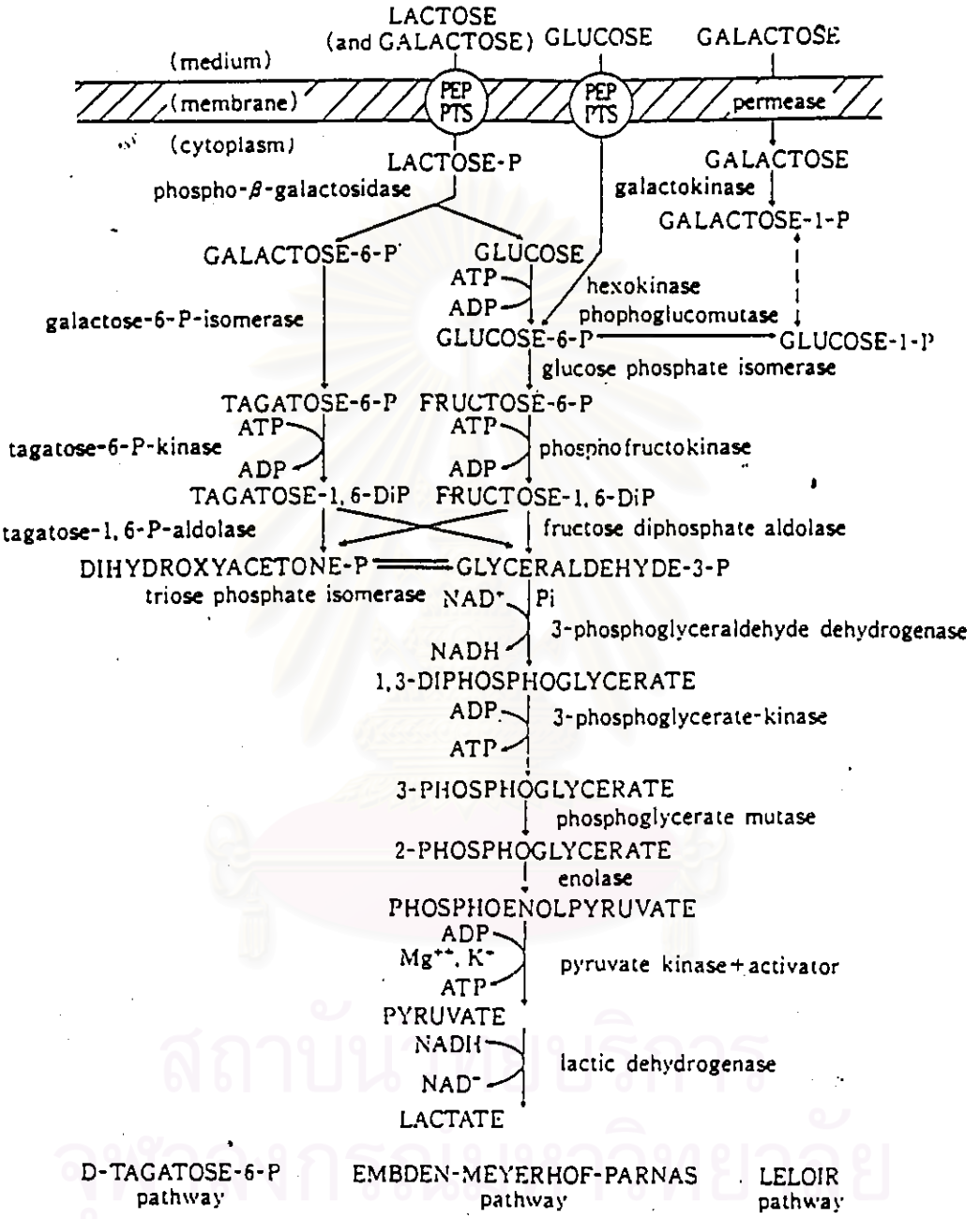
คือแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติก 85-95 % ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอ็นไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม ที่เรียกว่า Phosphoenol-Pyruvate-Dependent Phosphotransferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) อยู่ในรูป lactose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเอ็นไซม์ phospho-β-galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น Galactose-6-Phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านกระบวนการต่างๆ ของ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway : EMP Pathway จนได้เป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอ็นไซม์ lactic dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ใน D-tagatose-6-phosphate pathway ได้เป็นtagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone-phosphate ท้ายสุดโดยเอ็นไซม์ tagatose-1,6-aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอ็นไซม์ triose phosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP Pathway และเปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอ็นไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP Pathway ได้เป็น Lactate ในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลเมมเบรนได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอ็นไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir Pathway จะได้เป็น glucose-1-phosphate จากนั้นจะถูกเอ็นไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP Pathway เปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด (Lawrence และ Terence,1979) ดังแสดงในรูปที่ 1 แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *L.bulgaricus,L.casei,L.plantarum* และ *L.acidophilus* เป็นต้น

2. Heterofermentative lactic acid bacteria

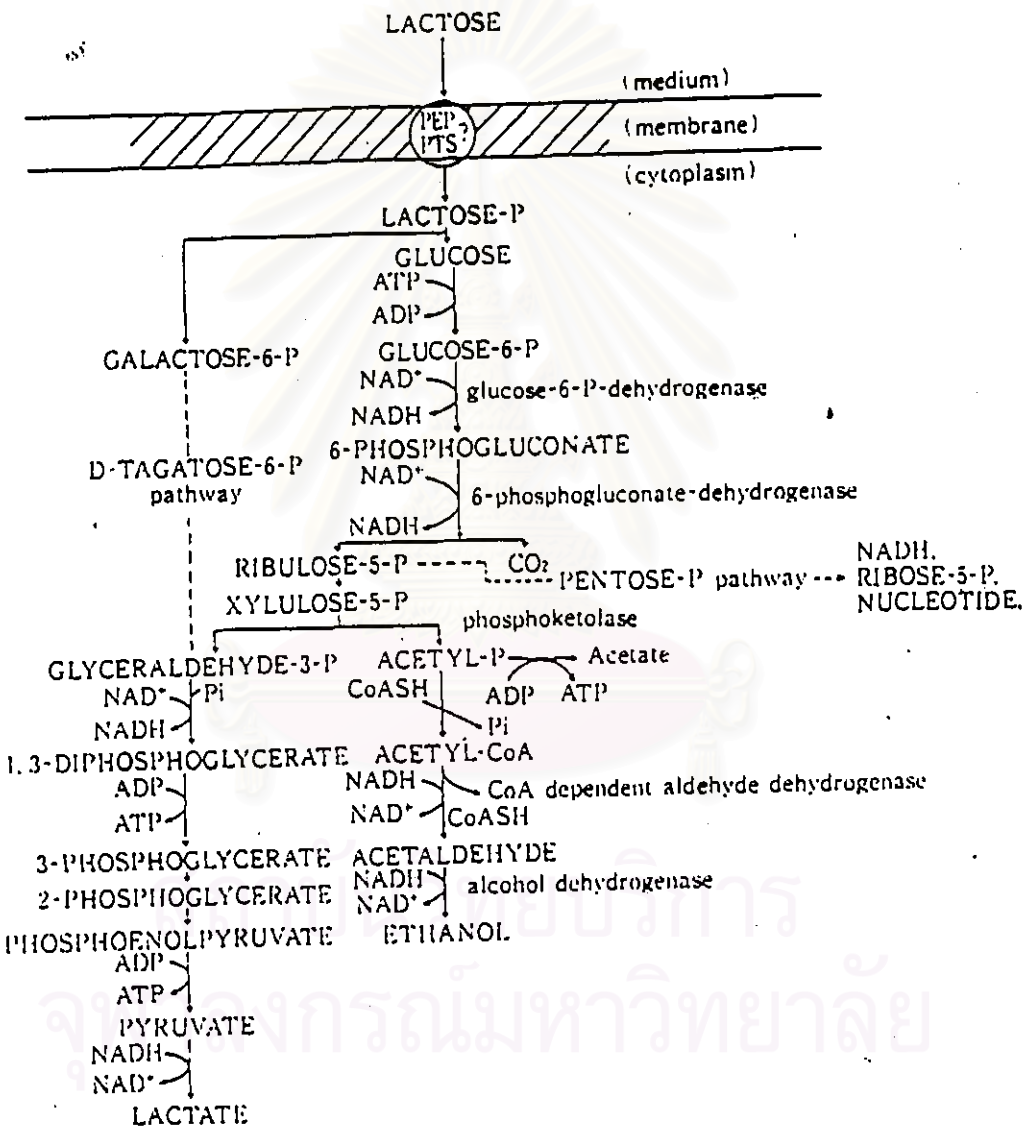
คือแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติกประมาณ 50 % ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก และเอธิลอัลกอฮอล์ 20-25 % และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 % ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Tamine, 1981) แบคทีเรียแลคติกในกลุ่มนี้จะไม่มีเอ็นไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์หนึ่งในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate ได้เป็น triose-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง pentose-phosphate จะแตกตัวเป็น triose-phosphate และ acetyl-phosphate โดยเอ็นไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosphate จะเปลี่ยนเป็น lactate ได้ ส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetaldehyde และ ethanol (Lawrence และ Terence,1979) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจจะใช้กระบวนการอื่นๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 2)

ในปี ค.ศ. 1983 และ 1992 Tanasupawat และ Daengsubha ได้ทดลองแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองหลายชนิด เช่น กะปิ ปลาร้า กุ้งจ่อม แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น และพบพวก homofermentative ได้แก่ *Lactobacillus pentosus L. plantarum L. sake* พวก heterofermentative ได้แก่ *L. vaccinostercus L. fermentum L. brevis L. confusus* และพบ *Pediococcus pentosaceus P. acidilactici P. urinaeequi* ส่วน *P. halophilus* พบในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูงเป็นส่วนใหญ่เช่น ปลาร้า น้ำปลา เป็นต้น จากผลการทดลองแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองในครั้งนั้นพบว่าแบคทีเรียที่พบมากคือ *L. pentosus L. plantarum P. pentosaceus* และ *P. halophilus* โดยชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่จะเจริญเติบโตขึ้นมาในอาหารแต่ละชนิดและแต่ละช่วงระยะเวลาการหมักขึ้นอยู่กับ ความชื้นในอาหาร pH ความเข้มข้นของเกลือ



รูปที่ 1 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก Homofermentative lactic acid bacteria

ที่มา : คัดลอกจาก Lawrence และ Terence (1979)



รูปที่ 2 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก Heterofermentative lactic acid bacteria

ที่มา : คัดลอกจาก Lawrence และ Terence (1979)

หอสมุดกลาง สถาบัน วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุณหภูมิ และองค์ประกอบของสารอาหารที่มีอยู่ โดยมีบทบาทในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในอาหารให้เป็นกรดแลคติกและอาจผลิตกรดชนิดอื่นออกมาบ้าง เช่น กรดอะซิติก กรดซัคซินิก เป็นต้น ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวและ pH ลดต่ำลงซึ่งป้องกันไม่ให้เชื้อที่ไม่เกี่ยวข้องกับการหมัก เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดการเน่าเสียหรือพวกที่ทำให้เกิดโรคเจริญเติบโตขึ้นมา แบคทีเรียแลคติกนอกจากจะทำหน้าที่ผลิตกรดแลคติกแล้วพบว่าบางสายพันธุ์ยังผลิตสารที่มีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Gould, 1991) เช่น bacteriocin (nisin และ lactacin) สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและทำให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น (Lewus และคณะ, 1991) สำหรับ *L. acidophilus, L. sake, L. plantarum, P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ผลิตสาร lactacin, sakacin, plantaricin, lactostrepcin และ pediocin (Gould, 1991 และ Lewus และคณะ, 1991) โดยปกติกระบวนการเกิดการหมักในอาหารหมักดองพื้นเมืองของไทยจะเป็นระบบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติคือมีเชื้อหลายชนิดที่มีอยู่แล้วในอาหารและ มีบทบาทร่วมกันในระหว่างการหมัก หรืออาจเรียกว่าเป็น mixed-culture fermentations และได้มีโครงการวิจัยหลายโครงการที่พยายามนำเอาหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์มาใช้เป็น starter culture สำหรับใช้ในการหมักอาหารหมักดองพื้นเมืองหลายชนิด เพื่อเป็นการปรับปรุงมาตรฐานและกระบวนการผลิตให้ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและสามารถส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้

<u>โครโมโซมของแบคทีเรีย</u>

แบคทีเรียมีโครโมโซมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่อยู่รวมกับโปรตีนหลายชนิดคล้ายกับในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เป็นกลุ่มเรียกว่า นิวคลีออยด์ (nucleoid) โปรตีนเท่าที่ทราบตอนนี้มีอยู่ไม่กี่ชนิด และรายละเอียดเกี่ยวกับการจับตัวกับกรดนิวคลีอิกอย่างไรนั้นทราบน้อยมาก ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* มีโปรตีนบางชนิดที่คล้ายกับฮีสโตน (histone) ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงคือโปรตีน HU โปรตีนนี้มีขนาดใกล้เคียงกับฮีสโตน H2B มีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) พอๆ กัน และยังมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) ที่คล้ายคลึงกันด้วย อีกชนิดหนึ่งคือโปรตีน H ซึ่งมีปริมาณมาก และคล้ายคลึงกับฮีสโตน H2A ในส่วนที่มีไลซีนอยู่มาก รวมทั้งคุณสมบัติการจับตัวกับดีเอ็นเอด้วย (สุรินทร์, 2536) เมื่อรวมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ แล้วโครโมโซมของแบคทีเรียก็อาจมีการจัดเรียงตัวคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั่นเอง

ดีเอ็นเอ (DNA)

ความสำคัญของดีเอ็นเอ

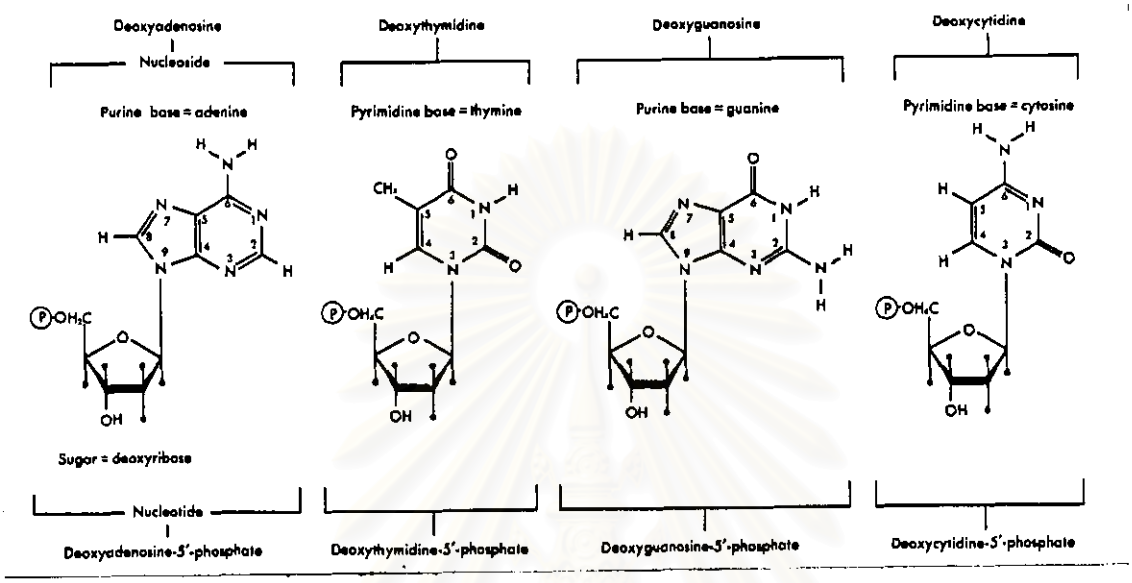
ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอเป็นตัวควบคุมกิจกรรมต่างๆภายในเซล การถ่ายทอดข้อมูลจากเซลหนึ่งไปสู่อีกเซลหนึ่ง การแสดงออกหรือการแสดงกิจกรรมของยีนใดยีนหนึ่งในเซลต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต จะส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การถ่ายทอดข้อมูลเกิดจากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจากหนึ่งโมเลกุลเป็นสองโมเลกุลที่มีลำดับเบสเหมือนกันในขณะที่มีการแบ่งเซล เรียกว่า การจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) การแสดงกิจกรรมของยีนนั้นจะมีการส่งผ่านข้อมูลจาก DNA มาสู่ RNA โดยกระบวนการลอกรหัส (transcription) แล้วจึงมีการแปลรหัสจาก RNA เป็นกรดอะมิโน ในที่สุดจะได้สารโพลีเพพไทด์ ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เป็นเอ็นไซม์ หรืออื่นๆ ภายในเซล ส่งผลให้เซลและสิ่งมีชีวิตมีลักษณะต่างๆ ปรากฏขึ้น

องค์ประกอบทางเคมีของดีเอ็นเอ

หน่วยย่อยของ DNA และ RNA คือนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีส่วนประกอบย่อย 3 ส่วน คือ สารประกอบพวกเบส น้ำตาล และหมู่ฟอสเฟต เบสมี 2 ประเภทคือ พิวรีน (purine) ได้แก่ adenine (A), guanine (G) และไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ cytosine (C), thymine (T) ซึ่งพบเฉพาะใน DNA และ uracil (U) ซึ่งพบเฉพาะใน RNA เบสนี้จะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose) ในกรณีของ DNA หรือน้ำตาลไรโบส (ribose) ในกรณีของ RNA (รูปที่ 3) แล้วมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างตำแหน่ง 5' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับตำแหน่ง 3' ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่ง ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (รูปที่ 4) ทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นมีทิศทางปลายหนึ่งเป็นปลาย 5' และอีกปลายหนึ่งเป็นปลาย 3' (Fritsch และคณะ, 1989)

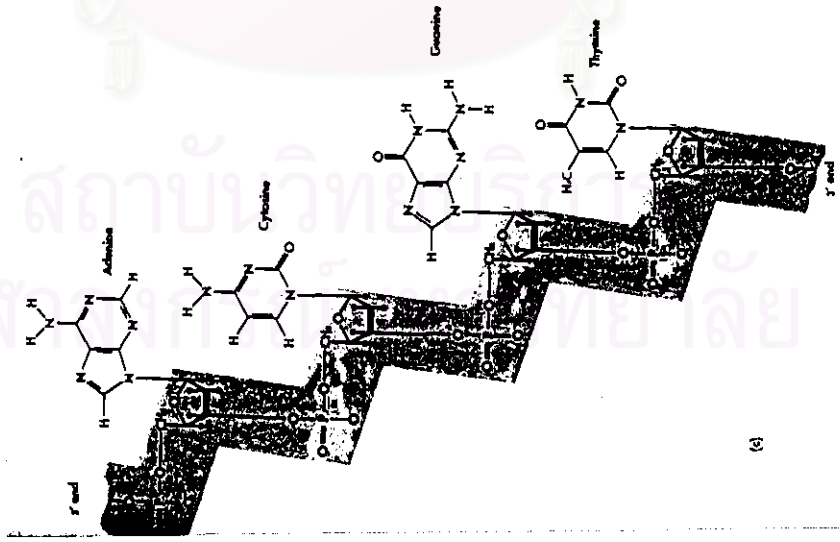
โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ

ในปี ค.ศ. 1953 Watson และ Crick ศึกษาโครงสร้างของดีเอ็นเอโดยใช้เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรคชัน (X-ray diffraction) พบว่าโครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นเส้นยาวมีลักษณะซ้ำๆ กันสม่ำเสมอ ไม่ขึ้นกับองค์ประกอบและลำดับของเบส มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix) เกิดจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สาย เรียงตัวขนานและกลับทิศทางกัน (antiparallel) มีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตอยู่รอบนอกของโมเลกุล เบสซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนจะจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน A จับคู่กับ T มี 2 พันธะ และ G คู่กับ C มี 3 พันธะ (รูปที่ 5) อยู่ในแนวระนาบเกือบตั้งฉากกับแกนของเกลียว เกลียวจะหมุนครบรอบยาว 3.4 นาโนเมตร (nm) ทุกๆ 10 คู่เบส ทำให้เบสแต่ละคู่อยู่ห่างกัน 0.34



<u>รูปที่ 3</u> ส่วนประกอบย่อยของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ

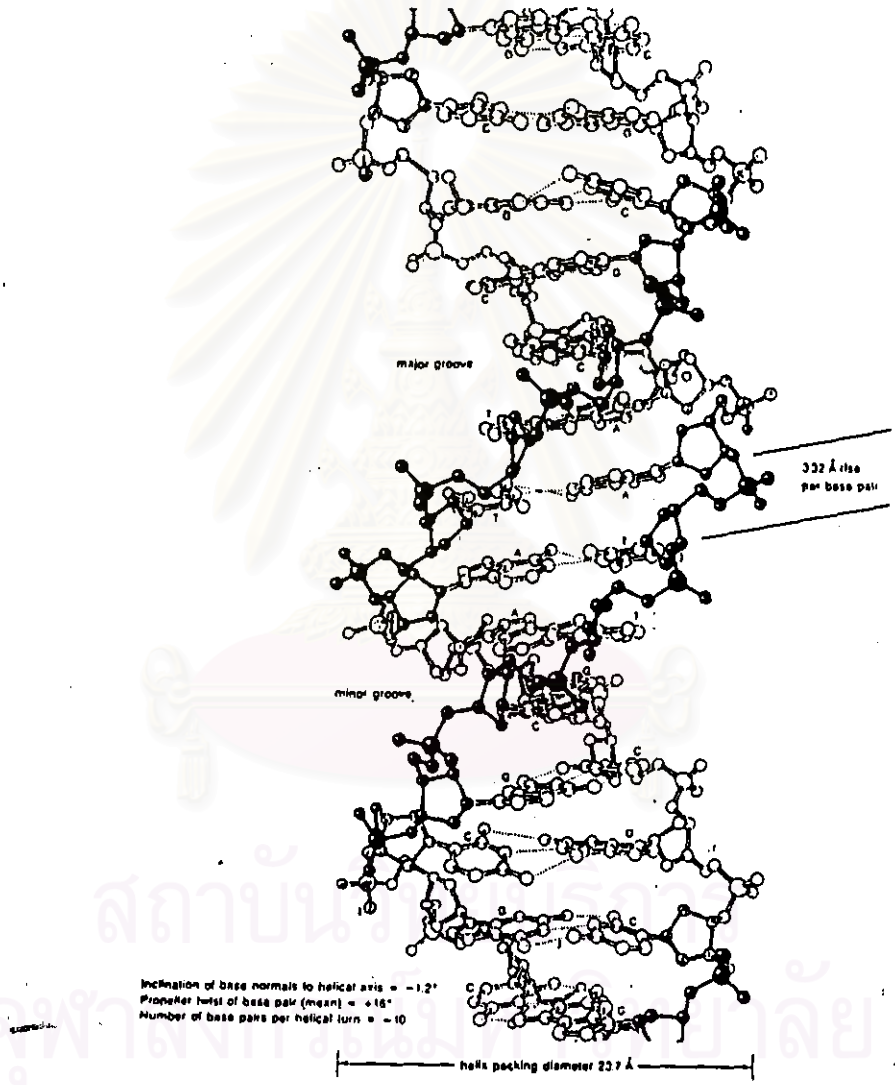
<u>ที่มา</u> : คัดลอกจาก Watson (1970)



<u>รูปที่ 4</u> โครงสร้างของดีเอ็นเอ แสดงทิศทางปลาย 5' และ 3'

<u>ที่มา</u> : คัดลอกจาก Watson (1970)

นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของเกลียวคู่ มีค่าเท่ากับ 2 นาโนเมตร การพันเกลียวทำให้เกิดร่อง 2 ขนาด เรียกว่า major groove และ minor groove (Drlica, 1992)



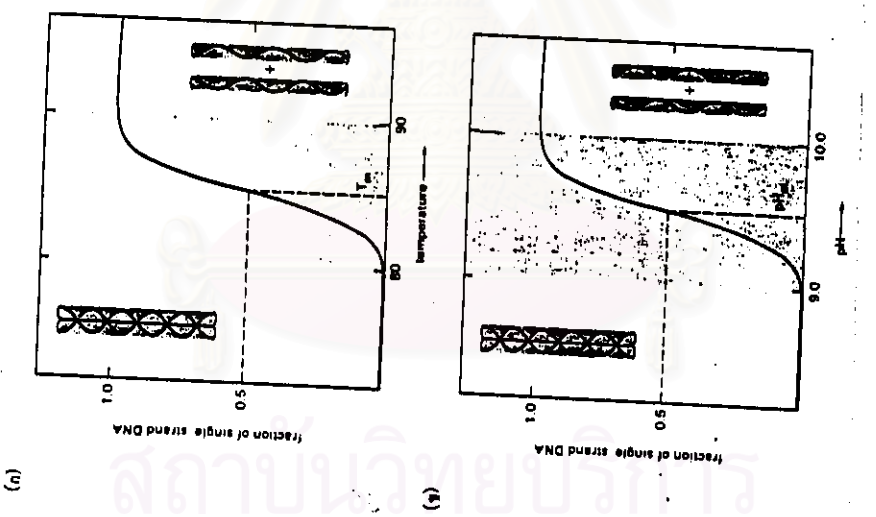
<u>รูปที่ 5</u> โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอ

<u>ที่มา</u> : คัดลอกจาก Fritsch และคณะ (1989)

การเสียสภาพและการคืนสภาพของดีเอ็นเอ

เกลียวคู่ของดีเอ็นเอยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส ซึ่งเป็นพันธะที่อ่อน ใช้พลังงานไม่มากนักก็เพียงพอสำหรับแยกสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายออกจากกัน กระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า การเสียสภาพ (denaturation) หรือการหลอมตัว (melting)

สารละลายดีเอ็นเอเมื่อได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิหนึ่ง เกลียวคู่จะค่อยๆ แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดการเสียสภาพ อุณหภูมิที่ทำให้เกลียวของดีเอ็นเอคลายออกครึ่งหนึ่งเรียกว่า อุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature หรือ Tm) (รูปที่ 6ก) นอกจากอุณหภูมิแล้ว pH สูงมากๆ ก็ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพได้ (รูปที่ 6ข) และมีปัจจัยร่วมอื่นๆ ที่ทำให้การเสียสภาพเกิดได้เร็วขึ้น



รูปที่ 6 กราฟแสดงการเสียสภาพของดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มอุณหภูมิ (ก) และการเพิ่ม pH (ข)

ที่มา : คัดลอกจาก สุรินทร์ (2536)

หรือช้าลง เช่น ความเข้มข้นของไอออนบวกที่มีวาเลนซีหนึ่งหรือสอง (monovalent หรือ divalent cation) ถ้าความเข้มข้นมากขึ้นค่า Tm จะเพิ่มขึ้น สารประกอบบางชนิด เช่น ยูเรีย formamide ทำให้ค่า Tm ลดลง

เนื่องจากการสลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส A และ T ซึ่งมี 2 พันธะใช้พลังงานน้อยกว่าการสลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส G และ C ซึ่งมี 3 พันธะ ไม่ว่าจะใช้ความร้อนหรือความเป็นกรดเป็นด่างก็ตาม ดังนั้นค่า Tm หรือ pHm จึงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบส ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส G และ C มากจะมีค่า Tm หรือ pHm สูง ดีเอ็นเอทั่วๆ ไปมีค่า Tm อยู่ระหว่าง 85 ถึง 95 ^{0}C โดยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเบส GC ขึ้นทุกๆ 1% ค่า Tm ของดีเอ็นเอจะสูงขึ้น 0.4 ^{0}C (สุรินทร์, 2536) ตัวอย่างเช่นดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส GC 40% มีค่า Tm ประมาณ 87 ^{0}C ส่วนดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยเบส GC 60% จะมีค่า Tm ประมาณ 95 ^{0}C เป็นต้น

การเสียสภาพของดีเอ็นเอเป็นกระบวนการที่ย้อนกลับได้ กล่าวคือดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยวนั้นอาจกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนกลายเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่อีกครั้งหนึ่ง เรียกว่าการคืนสภาพ (renaturation หรือ annealing) ซึ่งจะเกิดขึ้นได้เมื่อลดอุณหภูมิลง ถ้าค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะกลับมาจับกันอย่างถูกต้องได้เป็นเกลียวคู่ที่เหมือนกับตอนเริ่มต้น แต่ถ้าลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว จะเกิดการจับคู่ระหว่างเบสในตำแหน่งที่จับคู่กันได้เพียงบางส่วน หรือการจับคู่ระหว่างเบสบางตำแหน่งในสายเดียวกัน ทำให้ไม่สามารถที่จะกลับมาเป็นเกลียวคู่ที่สมบูรณ์เหมือนกับตอนเริ่มต้นได้

การคืนสภาพของดีเอ็นเอเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง เกิดจากดีเอ็นเอสายหนึ่งจะเข้ามาจับคู่กับอีกสายหนึ่งโดยสุ่ม และถ้าเบสที่อยู่ถัดมาเข้าคู่กันได้ก็จะเกิดพันธะไฮโดรเจนในช่วงสั้นๆ ก่อน แล้วจึงค่อยขยายออกไปคล้ายกับซิป คุณสมบัติการคืนสภาพของดีเอ็นเอนี้นำมาประยุกต์ใช้ได้โดยนำดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกัน มาทำให้จับคู่กันใหม่ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า hybridization

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ</u>

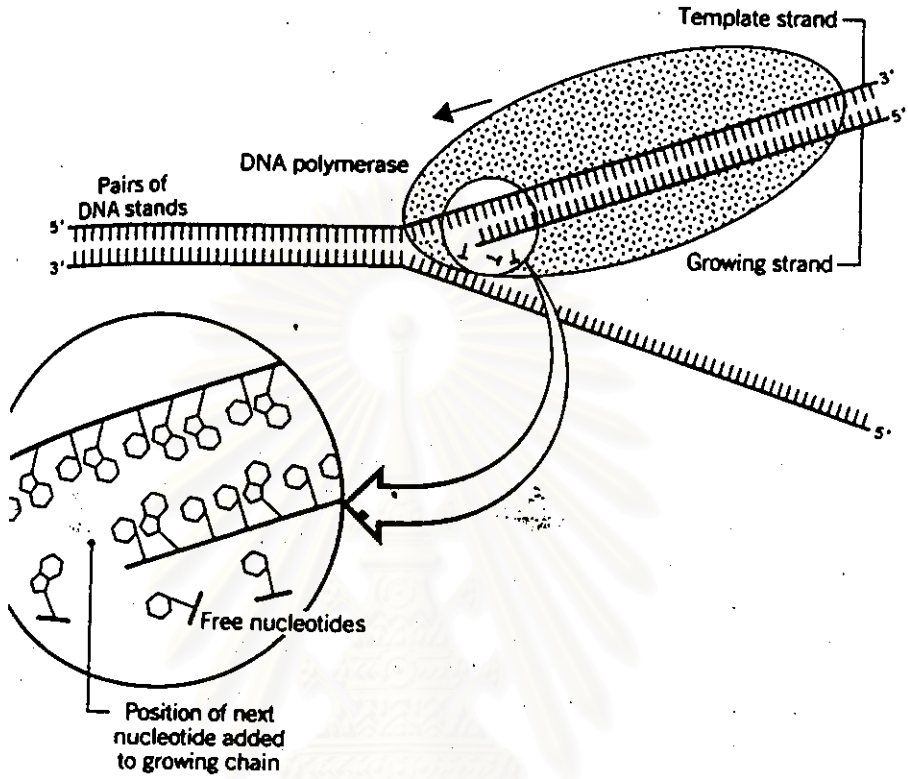
เบสพิวรีน และไพริมิดีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอนั้นสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ โดยจุดสูงสุดอยู่ที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงนี้เรียกว่า absorbance (A) หรือ optical density (O.D.) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตรนี้สามารถนำมาใช้ในการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้เนื่องจากสารละลายดีเอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นสายของนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ความเข้มข้น 1 mg/ml จะมีค่า $O.D._{260}$ เป็น

20 ดังนั้นเมื่อนำสารละลายของดีเอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เจือจางมาวัดค่า $O.D._{260}$ ได้ค่าเท่าไรก็สามารถคำนวณกลับไปได้ว่าสารตั้งต้นนั้นมีความเข้มข้นเท่าไร และถ้าทราบปริมาตรของสารตั้งต้นก็สามารถคำนวณปริมาณเนื้อสารทั้งหมดได้

<u>การจำลองตัวของดีเอ็นเอ</u> (DNA replication)

กระบวนการจำลองตัวของดีเอ็นเอ สรุปได้ดังรูปที่ 7 เริ่มจากเอ็นไซม์ helicase ทำหน้าที่สลายพันธะไฮโดรเจน เพื่อให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้น single strand DNA binding protein จะเข้ามาเกาะเพื่อป้องกันไม่ให้สายดีเอ็นเอกลับมาจับเป็นเกลียวคู่อีก แล้วเอ็นไซม์ DNA gyrase จะคลายปมเหนือจุดแยกนั้น โดยตัดดีเอ็นเอสายหนึ่งออก เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวออกได้แล้วจึงต่อกลับเข้าดังเดิม บริเวณที่มีการคลายเกลียวของดีเอ็นเอนั้นเป็นจุดเริ่มของการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ RNA primase จะสังเคราะห์ RNA primer เป็นจุดตั้งต้น แล้ว DNA polymerase III จึงทำหน้าที่เติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ RNA primer สายที่มีทิศทางการสร้างเป็นตามทิศทางการคลายเกลียวจะได้เส้นที่ต่อเนื่องเป็นสายนำ ส่วนอีกสายหนึ่งที่มีทิศทางตรงกันข้ามจะได้สายสั้นๆ ไม่ต่อเนื่อง เมื่อมีการคลายเกลียวต่อไปอีกก็จะมีการสร้าง primer ใหม่ และ DNA polymerase III จะนำนิวคลีโอไทด์มาต่อ ทำให้ได้เส้นสั้นๆ เรียกว่า Okazaki fragments มีความยาวประมาณ 1000-2000 นิวคลีโอไทด์ (ดังรูปที่ 7) เส้น Okazaki เหล่านั้นจะเชื่อมต่อกันได้ โดย DNA polymerase I จะตัดส่วน RNA primer ออก โดยปฏิกิริยาของ 5'⟶3' exonuclease ขณะเดียวกันก็จะเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ ปลาย 3' ของดีเอ็นเอที่อยู่ถัดขึ้นมาต่อจากสายของนิวคลีโอไทด์ที่สร้างโดย DNA polymerase IIIทำให้มีการแทนที่ RNA primer ด้วยดีเอ็นเอ และจุดที่มีรอยขาดก็จะเคลื่อนไปทางปลาย 3' (nick translation) เมื่อกำจัด RNA ออกหมดแล้ว ก็จะมีการเชื่อมจุดที่ขาดด้วยเอนไซม์ DNA ligase ได้เป็นสายยาว

บริเวณที่เกลียวคู่แยกตัวออกจากกันและเกิดกระบวนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่อยู่นั้น จะเกิดเป็นจุดแยก (replication fork) ถ้าการสังเคราะห์ DNA เกิดขึ้นโดยจุดแยกเคลื่อนที่ไปทางเดียว เรียกว่า unidirectional replication แต่ถ้าจุดแยกเคลื่อนที่ไปทั้งสองทาง แสดงว่า มีการสังเคราะห์ทั้งสองทิศทาง (bidirectional replication) จากการใช้เทคนิคออโตเรดิโอกราฟของไข่แมลงหวี่ พบว่ากระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นแบบสองทิศทางแต่มีจุดเริ่มต้นหลายจุดพร้อมๆ กัน จุดเริ่มต้นหนึ่งๆ จะเป็นหน่วยหนึ่งของการสังเคราะห์เรียกว่า replicon ใน *E. coli* มีจุดเริ่มต้นเพียงจุดเดียวบนโครโมโซม จะมี 1 replicon อัตราการสังเคราะห์ประมาณ 50000 เบสต่อนาที สิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้นในจีโนมจะมีหลาย replicon แต่อัตราการสังเคราะห์ต่ำกว่า



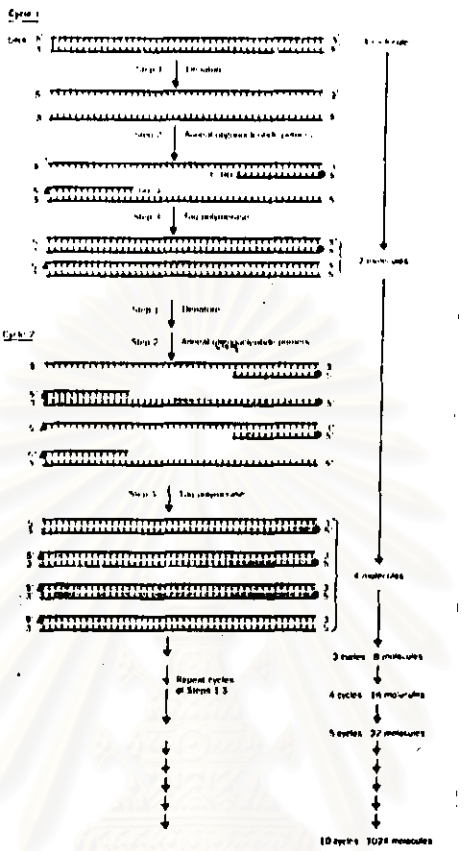
รูปที่ 7 การจำลองตัวของดีเอ็นเอ

ที่มา : คัดลอกจาก Drlica (1989)

หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือที่นิยมเรียกสั้นๆว่า PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบวงจรในหลอดทดลองโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อน (Taq Polymerase) PCR ค้นพบโดย Mullis ในปี ค.ศ. 1985 ทำให้เกิดวิธีการใหม่ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อเสาะแสวงหายีน เพื่อวินิจฉัยโรคและเพื่อการศึกษาความรู้พื้นฐานต่างๆ

PCR มีหลักและวิธีการที่ง่ายจึงได้รับความนิยมแพร่หลาย ปฏิกิริยามีองค์ประกอบ 4 อย่างคือ DNA template, primer, substrates ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ deoxynucleoside triphosphate (dNTP) และ $MgCl_2$ และ Taq polymerase โดย DNA template เมื่อเริ่มต้นเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่ถูกแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวด้วยความร้อน เมื่ออุณหภูมิลดลง primer ซึ่งเป็น oligonucleotide ขนาด



<u>รูปที่ 8</u> การเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

<u>ที่มา</u> : คัดลอกจาก McPherson และคณะ (1991)

ประมาณ 20-30 เบส ซึ่งมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสใน DNA template ก็จะเข้ามาจับที่ตำแหน่งเบสคู่สม ทำให้ Taq Polymerase สามารถเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3'-end ของ primer ดังแสดงในรูปที่ 8 เกิดดีเอ็นเอเส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 2 ชุด เมื่อถูกความร้อนดีเอ็นเอ 2 ชุดก็จะแยกเป็นดีเอ็นเอเส้นเดียว 4 เส้น เมื่อลดอุณหภูมิลงก็จะจับกับ primer ซึ่งมีอยู่ในปริมาณมาก ทำให้ Taq Polymerase สามารถเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3'-end ของ primer จนเกิดดีเอ็นเอเส้นคู่ชุดใหม่จำนวน 4 ชุด เมื่อถูกความร้อนดีเอ็นเอดังกล่าวจะแยกเป็นเส้นเดี่ยว 8 สายซึ่งจะจับกับ primer สร้างเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ 8 ชุดในรอบการเกิดปฏิกิริยารอบที่ 3 เมื่อถึงรอบที่ 4 ก็จะได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ 16 ชุด เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบทวีคูณในปริมาณ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของ

ปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอจำนวน 2^{20} ชุด หรือประมาณ 1 ล้านเท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้น

ปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิ 3 อย่างได้แก่ denaturation temperature เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเส้นคู่แยกเป็นเส้นเดี่ยว ปกติจะอยู่ประมาณ 90-95 °C ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของดีเอ็นเอ อุณหภูมิที่ 2 ได้แก่ annealing temperature เป็นอุณหภูมิที่ primer จะจับกับ DNA template ซึ่งแยกเป็นเส้นเดี่ยวมาแล้ว ปกติจะอยู่ประมาณ 40-50 °C ขึ้นกับอุณหภูมิการแยกตัว (Td)ของ primer โดย Td ของ primer อาจหาได้จากสูตรง่ายๆ คือ 2(A+T) + 4(G+C) อุณหภูมิที่ 3 ได้แก่ extension temperature เป็นอุณหภูมิซึ่ง Taq Polymerase จะเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะ phosphodiester ได้ดีที่สุด โดยเฉลี่ยจะเป็นอุณหภูมิประมาณ 70-75 °C

PCR เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ในอัตรา 2^n ดังนั้นอัตราส่วนประกอบทั้ง 4 ชนิดเป็นปัจจัยควบคุมอัตราการเพิ่ม 2^n เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจะมี DNA เพิ่มขึ้นโดย DNA ที่เพิ่มดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็น template ดังนั้นปริมาณ template จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการลดปริมาณของ primers และ substrate ลง นั่นคืออัตราส่วนของ DNA template ต่อ primers จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนในที่สุด template เมื่อมีปริมาณมากย่อมจะจับคู่กันเองทำให้มี template จับคู่กับ primer น้อยลง อันจะทำให้การเพิ่มมิได้เป็นไปตามอัตรา 2^n แต่จะมีอัตราลดน้อยลงจนในที่สุดก็จะไม่มีการเพิ่มเกิดขึ้น เรียกว่า เกิด plateau นอกจากนี้แล้วการเพิ่มและลดอุณหภูมิหลายๆ ครั้งติดต่อกันเป็นผลทำให้เอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase ลดประสิทธิภาพลงตามลำดับ ก็จะไปมีผลให้อัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอลดลงไม่เป็นไปตามอัตรา 2^n เช่นกัน จะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR นั้นจะเพิ่ม DNA ได้ในขอบเขตจำกัด

<u>การเปลี่ยนแปลงปริมาณโมเลกุลในปฏิกิริยา PCR</u>

ปฏิกิริยา PCR ถ้าเริ่มต้นประกอบด้วย DNA template 10^{-6} pmole primers อย่างละ 10 pmole dNTP ทั้ง 4 ชนิดๆ ละ 20 nmole และ Taq polymerase 0.1 pmole ดังนั้นจะเห็นว่าเมื่อเริ่มต้นจะมีปริมาณ primers มากกว่า template ประมาณ 10 ล้านเท่า มี dNTP มากกว่า primers ประมาณ 2 ล้านเท่า และมีเอ็นไซม์มากกว่า template ประมาณ 1 แสนเท่า เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ (2^{20} หรือ 1 ล้านโดยประมาณ) จะมี DNA เพิ่มขึ้นกลายเป็น 1 pmole มี primers เหลืออย่างละ 9.0 pmole มี dNTP เหลือมากมายเหมือนเดิม ถึงตอนนี้จะเห็นว่าปริมาณเอ็นไซม์ซึ่งมีอยู่ 0.1 pmole จะเริ่มเป็นตัวจำกัด นั่นคือถึงแม้จะมี DNA-primer complex ได้ถึง 1 pmole แต่จะมีส่วนที่เอ็นไซม์จับได้เพียง 0.1 pmole ถ้า Taq polymerase ไม่หลุดจาก DNA เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพบว่าจะมีการเพิ่ม DNA ได้เพียง 0.1 pmole แทนที่จะเพิ่มได้ 1 pmole นั่นก็คือจะมีการเพิ่ม DNA ได้ปริมาณ 10% ของ template

ทั้งหมด ซึ่งจะเป็นเหตุให้ปฏิกิริยาเข้าลักษณะ plateau กล่าวคือจะมีการเพิ่มที่เป็นลักษณะคูณครั้งละ 0.1 pmole แทนที่จะเป็นทวีคูณ 1 pmole เป็น 2 pmole และเป็น 4 pmole ในรอบที่ 20 ถึง 22 ตามลำดับ

ปัจจัยที่มีผลต่อความแม่นยำของปฏิกิริยา PCR

1. ชนิดของเอ็นไซม์ polymerase

ถึงแม้ว่าเอ็นไซม์ DNA polymerase จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยมีพื้นฐานทางกลไกที่เหมือนกันแต่ก็มีความแตกต่างกันทางด้านคุณสมบัติทางชีวเคมีรวมทั้งความแม่นยำ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ให้ผลแม่นยำและดีที่สุดอยู่ที่การใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติ 3'→ 5' proofreading exonuclease เพื่อที่จะกำจัด nucleotides ซึ่งไม่ถูกต้องในระหว่างที่สังเคราะห์ออกไปซึ่งเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ซึ่งทั้งคุณสมบัติ polymerase และ 3'→ 5' exonuclease มีตำแหน่งของยีนอยู่บนสาย polypeptide เดียวกัน แต่เอ็นไซม์เหล่านี้แตกต่างกันในเรื่องของประสิทธิภาพในการ proofreading โดย T4 และ T7 DNA polymerase มีประสิทธิภาพสูงและมีความเที่ยงตรงทั้งทางด้าน base substitution และ one base frameshift mutations แม้ว่าในปฏิกิริยาจะมีความเข้มข้นของ dNTP สูงก็ตาม เอ็นไซม์ Klenow polymerase ก็มีคุณสมบัติ 3'→ 5' exonuclease แต่ประสิทธิภาพในการ proofreading ต่ำกว่า T4 และ T7 มาก จากผลการทดลองพบว่าความเที่ยงตรงของเอ็นไซม์ Klenow จะมีประสิทธิภาพมากเมื่อใช้ความเข้มข้นของ dNTPs 1μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ proofread error แต่อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นของ dNTPs สูงขึ้นปฏิกิริยา polymerization จะมากกว่าปฏิกิริยา exonuclease เป็นผลทำให้ความแม่นยำถูกต้องในการสังเคราะห์ลดลง

เอ็นไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ในปฏิกิริยาทั่วไปจะต้องเป็นชนิดที่มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิสูงแต่ไม่มีคุณสมบัติ 3'→ 5' proofreading exonuclease เช่น Taq polymerase ทั้งนี้เนื่องจาก T4, T7 และ Klenow นั้นไม่ทนต่อความร้อนโดยจะเสียสภาพและสูญเสียคุณสมบัติ polymerase ไป โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ระดับ 37 °C ซึ่งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่อุณหภูมินี้มีโอกาสที่จะเพิ่ม non-specific hybridization ของ primers กับบริเวณอื่นที่ไม่เป็นเบสคู่สมกัน และที่อุณหภูมินี้ DNA template จะเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ ทำให้ primer ไม่สามารถเข้าไปจับกับ DNA template ได้ เป็นผลทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งสาย ในทางตรงกันข้ามเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่ได้จากแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermostable bacteria) จะสามารถรักษาเสถียรภาพได้ที่อุณหภูมิสูงและสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูงขึ้น (70-80 °C) ซึ่งไม่เพียงแต่จะลดการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของดีเอ็นเอเท่านั้น ยังทำให้ไม่เกิดการจับกันของ primer ด้วย

คุณสมบัติของเอ็นไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงนี้มีประโยชน์มากในการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

2. ความเข้มข้นของ dNTPs

ความเข้มข้นของ dNTP และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ dNTP กับสารอื่นในปฏิกิริยามีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิด base substitution error และจากผลการทดสอบความเข้มข้นของ dNTP ตั้งแต่ระดับ 1 ถึง 1000 เท่า โดยแปรเวลาในการใช้เอ็นไซม์สังเคราะห์ดีเอ็นเอระดับต่างๆจากผลการทดลองพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของ dNTP สูงขึ้นจะมีผลให้อัตราของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ผิดพลาดมากขึ้น โดยไปผลักดันปฏิกิริยาในทิศทางการสังเคราะห์มากขึ้น ในทางกลับกันที่ระดับความเข้มข้นของ dNTP ต่ำจะมีแนวโน้มไปเพิ่มความเที่ยงตรงในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ของเอ็นไซม์มากขึ้น

3. ความเข้มข้นของ $MgCl_2$

ความเที่ยงตรงแม่นยำของ Taq polymerase สามารถปรับปรุงได้โดยการลดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ให้สัมพันธ์กับปริมาณของ dNTP รวมที่มีอยู่ในปฏิกิริยา จากผลการทดลองของ McPherson และคณะ (1991) พบว่า ในปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ dNTP คงที่ ความแม่นยำจะสูงสุดที่ความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ (equimolar) ความเข้มข้นของ dNTP รวมในปฏิกิริยา

4. อุณหภูมิและ pH

ความแม่นยำของ Taq polymerase ถูกตรวจสอบที่อุณหภูมิช่วงเหนือ 50 ^{0}C อัตราการเกิดความผิดพลาดเนื่องจาก base substitution และ frameshift เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 23-30 ^{0}C ถึง 70-80 ^{0}C ผลของอุณหภูมิที่แท้จริงที่มีต่อความแม่นยำอาจจะต่ำกว่าที่คาดไว้ (underestimate) เนื่องจากที่ช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 50 ^{0}C pH ของ tris buffer ที่ใช้ในปฏิกิริยาจะลดลงมากกว่า 2 unit และความแม่นยำจะสูงขึ้นที่ pH ต่ำ

การปล่อยให้ดีเอ็นเออยู่ที่อุณหภูมิสูงและ pH ต่ำ จะทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายเป็นผลให้ mutation มีโอกาสเกิดมากขึ้น การถูกทำลายของดีเอ็นเอที่พบมากที่สุดคือ deamination ของ cytosine และให้เป็น uracil และเนื่องจาก uracil มีรหัสทางพันธุกรรมที่ให้ผลเหมือนกับ thymine ทำให้เกิดการสังเคราะห์เบสที่ผิดขึ้นคือ C:G⟶T:A ในปฏิกิริยา PCR ความเสี่ยงที่จะเกิด cytosine deamination คือในช่วงการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C การเกิด denaturation ของ cytosine ในดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะมีอัตราคงที่ประมาณ 1×10^{-8} /วินาที เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 95 ^{0}C การเกิดภาวะที่

ดีเอ็นเอถูกทำลายอีกอย่างหนึ่งคือ การเกิด spontaneous base release ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิด hydrolysis ของพันธะ N-glycosylic bond โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิสูงและ pH ต่ำ อัตราการเกิด depurination ของดีเอ็นเอที่ pH 7.4 และอุณหภูมิ 70 ^{0}C อยู่ประมาณ 4×10^{-9} /วินาที ในขณะที่อัตราการเกิด depyrimidination จะน้อยกว่าประมาณ 20 เท่า แต่อย่างไรก็ตามการปลดปล่อย pyrimidine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 95 ^{0}C เช่นเดียวกันอัตราการเกิด depurination (pH 5.0) เพิ่มขึ้น 2 เท่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 45 ^{0}C เป็น 80 ^{0}C ในที่สุดเมื่อ pH ลดต่ำลงจะไปเพิ่มอัตราการเกิด spontaneous purine ทำให้ purine สลายไปจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ ตามด้วยการเกิด spontaneous base hydrolysis ทำให้ apurinic/apyrimidinic (AP) site ในโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ของเอ็นไซม์ polymerase ได้

โดยสรุปการใช้อุณหภูมิสูงในปฏิกิริยาการเพิ่มดีเอ็นเอโดย PCR จะมีผลไปเพิ่มทั้งความผิดพลาดทั้งการทำงานของ Taq polymerase และการที่ดีเอ็นเอถูกทำลาย ดังนั้นปฏิกิริยา PCR ควรใช้เวลาน้อยที่สุดที่มีการใช้อุณหภูมิสูงส่วนในเรื่องการเปลี่ยนแปลง pH ภาวะการณ์จะซับซ้อนมากยิ่งขึ้นเนื่องจากความแม่นยำของ Taq polymerase จะสูงขึ้นเมื่อ pH ลดต่ำลง แต่ที่ pH ต่ำนี้จะไปมีผลทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายได้มากขึ้น

<u>วิธีการและการประยุกต์ใช้ PCR</u>

วิธีการทำ PCR มีมากมาย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตผลที่ต้องการซึ่งมีความหลากหลาย ผลิตผลจาก PCR อาจเป็นยีน เป็นส่วนดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เป็นดีเอ็นเอเพื่อใช้บ่งบอกการวินิจฉัยหรือความหลากหลาย

<u>PCR สำหรับการโคลนยีน</u> การโคลนยีนเป็นวิธีการแยกยีนออกมาจากองค์ประกอบ แล้วนำมาเพิ่มขยายให้ได้ปริมาณมากจนเป็นชนิดบริสุทธิ์ ในอดีตการโคลนยีนอาศัยดีเอ็นเอพาหะ (vector DNA) เช่น พลาสมิดดีเอ็นเอ กล่าวคือ จะนำยีนต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะซึ่งเมื่อดีเอ็นเอพาหะเพิ่มปริมาณในเซล ยีนที่ต่ออยู่ก็จะเพิ่มปริมาณ การนำ PCR มาใช้ในการโคลนยีนเป็นการสร้าง primers เพื่อเพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลอง โดยปกติ primers ก็จะมีเบสเป็นคู่สมกับเบสในส่วนต้นและปลายของยีน โดยปกติยีนจะมีขนาด 1-3 Kb ดังนั้นจะต้องใช้ปฏิกิริยา PCR พอเหมาะแก่การสร้าง ดีเอ็นเอขนาดใหญ่ เช่นในเวลาการเติมเบส (Extension) ที่ปลาย 3'-end ของ primers ค่อนข้างยาว(เช่น2-3นาที) เป็นต้น

Inverse PCR เป็นการใช้เทคนิค PCR เพื่อการค้นหาดีเอ็นเอซึ่งขนาบข้างดีเอ็นเอที่รู้ลำดับเบส แล้ว เนื่องจากเมื่อเราทราบลำดับเบสในชิ้นดีเอ็นเอก็จะใช้สร้าง primers เพื่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วนที่อยู่นอกลำดับเบสที่รู้แล้วได้

Asymmetric PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายหนึ่งสายใดในปริมาณมาก เปรียบเสมือนเป็นการเพิ่มดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว โดยการใช้ปริมาณ primers ที่แตกต่างกัน เช่น อัตราส่วนของ pirmer 1 และ primer 2 อาจเป็น 100 ซึ่งจะทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวมากกว่าเส้นคู่ ดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวที่ได้อาจนำไปใช้เป็น template ในการหาลำดับเบส โดยวิธี Sanger หรือเป็น single-stranded DNA probe เป็นต้น

Nested PCR เป็นการเพิ่มดีเอ็นเอภายในดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว เป็นการสร้างความจำเพาะในปฏิกิริยา PCR ทั้งนี้เพราะผลิตผล PCR จาก primers ชุดด้านนอกอาจมีดีเอ็นเออื่นที่คล้ายคลึงกันปนอยู่ เมื่อใช้ primers ชุดที่ 2 ดีเอ็นเอที่ถูกต้องเท่านั้นที่จะถูกเพิ่มปริมาณ เนื่องจาก primers ชุดที่ 2 นี้จะมีเบสเป็นคู่สมกับผลิตผลที่ถูกต้องเท่านั้น

Booster PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณ template เริ่มต้นน้อยมาก เช่น 10-100 โมเลกุล โดยเริ่มการทำ PCR ใช้ primers น้อยกว่าปกติ เช่น 0.1 pmole แทน 10 pmole เมื่อ PCR ดำเนินไปได้ประมาณ 10 รอบ จะมีปริมาณ template เพิ่มขึ้นประมาณ 1000 เท่า จึงเติม primers ส่งไปให้ได้ปริมาณ 10 pmole ก็จะทำให้ได้ดีเอ็นเอในปริมาณมาก

Hot-start PCR เป็นการเริ่ม PCR ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิของ annealing temperature เพื่อลดปริมาณผลิตผล PCR ที่อาจเกิดจาก primers ไปจับกับ DNA template ในตำแหน่งอื่น ทั้งนี้เพราะถ้าเริ่ม PCR ที่อุณหภูมิต่ำกว่า annealing temperature อาจมี primers ไปจับกับ template ในตำแหน่งอื่น และเกิดผลิตผล PCR ขึ้น ซึ่งผลิตผลดังกล่าวจะกลายเป็น template ที่ถูกต้องในรอบ PCR ต่อๆ ไป ทำให้ได้ผลิตผล PCR ที่ไม่ถูกต้องในปริมาณมาก hot-start PCR จะทำโดยการเติม Taq DNA Polymerase เพื่อเริ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง

Two-temperature PCR เป็นการทำ PCR โดยปราศจาก extension temperature ทั้งนี้เพราะในขณะที่เพิ่มอุณหภูมิจาก annealing temperature ขึ้นไปหา denaturation temperature นั้น Taq DNA Polymerase สามารถเร่งปฏิกิริยาการเพิ่มเบสไปแล้ว เพราะ Taq DNA Polymerase สามารถทำงานเร่งปฏิกิริยาได้แม้อุณหภูมิจะต่ำกว่า extension temperature มากก็ตาม เช่นที่ extension temperature เอ็นไซม์จะเร่งปฏิกิริยาได้ 60 เบสต่อวินาที แต่ที่ 55 ^{0}C จะเร่งปฏิกิริยา ได้ 24 เบส และ 37 ^{0}C ได้ 1.5 เบส เป็นต้น การเพิ่มอุณหภูมิในการทำ PCR มักจะมีอัตราเพิ่มประมาณ 1 ^{0}C/วินาที ดังนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มเบสแล้ว วิธีนี้เหมาะสมสำหรับการเพิ่มดีเอ็นเอขนาดเล็ก

Alu PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ primers ซึ่งจับคู่ที่ Alu sequence ซึ่งเป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำซ้อน และอยู่กระจัดกระจายทั่วไปใน genomic DNA ดังนั้นจะเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ genomic DNA วิธีหนึ่ง

Allele specific PCR เป็นวิธีหา point mutation ใน allele ต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจาก Taq DNA Polymerase เป็นเอ็นไซม์ซึ่งขาด 3'-exonuclease ดังนั้นจะไม่สามารถให้ปฏิกิริยาการตรวจความถูกต้องในการสร้างดีเอ็นเอ (proof reading) เมื่อปลาย 3'-end ของ primer มิใช่เบสซึ่งจับแบบคู่สม (complementary base pairing) กับเบสใน DNA template จะทำให้ Taq DNA Polymerase ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงไม่มีผลผลิต PCR ออกมา ถ้าปลาย 3'-end ของ primer จับคู่สมกับ DNA template ก็จะได้ผลผลิต PCR จึงสามารถใช้แยกความแตกต่างในเบสได้ ปกติปฏิกิริยานี้จะต้องใช้ substrate ในปริมาณต่ำกว่าปกติ เพราะถ้ามีมากเกินไป Taq DNA Polymerase อาจเร่งปฏิกิริยาจนได้ผลผลิต PCR ได้

In situ PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ในเนื้อเยื่อโดยตรงโดยการใช้เอ็นไซม์พวกโปรตีเอสทำลายเนื้อเยื่อเพื่อให้ Taq DNAPolymerase และ primers ทะลุลอดไปจับกับดีเอ็นเอได้ แต่ไม่ทำลายมากเกินไปจนเนื้อเยื่อเสียสภาพไป วิธีนี้จะทำให้ทราบตำแหน่ง ของดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อได้

ลักษณะและวิธีการที่ใช้แยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติก

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยดูรูปร่างเซล การจัดเรียงตัวของเซล ดูการเคลื่อนที่ การย้อมสีแกรม ดูการสร้างแคปซูล แฟลกเจลล่า ในจีนัส *Pediococcus, Lactococus, Streptococcus* และ *Enterococcus* พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน สามารถแยกออกจากจีนัสอื่นได้ ในขณะที่เชื้อในจีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ Lactobacillus มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา แตกต่างไปจากเชื้อในจีนัส *Streptococcus* (*Lactococcus, Enterococcus*) และ *Bifidobacterium* ในทางปฏิบัติพบว่าภาวะการเจริญและระยะการเจริญของเซล จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะรูปร่างของเซล

2. ลักษณะทางสรีระวิทยา

จะเกี่ยวกับความต้องการออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ และ hydrostatic pressure ความแตกต่างระหว่างเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* พบว่าเชื้อ *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือบนอาหารแข็ง acetate แต่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.0 (Hammers และคณะ, 1991) สำหรับแยกความแตกต่าง

ห้องสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยใช้วิธีการทดสอบทางสรีระวิทยา อาจจะไม่เพียงพอ โดยอาจจะต้องใช้การทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ดูรูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต ร่วมด้วย

3. รูปแบบการหมักคาร์โบไฮเดรต

เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกชนิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารแตกต่างกันมาก เราจึงใช้จำแนกเชื้อได้เป็นสายพันธุ์ต่างๆ การศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตุการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด การเกิดก๊าซ เกิดสารบางชนิด เป็นต้น ดังตัวอย่างในตารางที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ของ *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *Pediococci*

ตารางที่ 1 ลักษณะความแตกต่างระหว่าง *L. pentosus* และ *L. plantarum*

ที่มา : Hammers และคณะ (1991)

	L. pentosus	*L. plantarum*
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน
glycerol	+	-
xylose	+	-
ribose	+	+
L-arabinose	+	d
D-fructose	+	+
D-maltose	+	+
D-melibiose	+	+
D-melezitose	d	+
raffinose	+	+
L-rhamnose	+	-

หมายเหตุ + หมายถึงสามารถใช้ glycerol และน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้

- หมายถึงไม่สามารถใช้ glycerol และน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้

d หมายถึงมีจำนวนเชื้อที่สามารถใช้ glycerol และน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้ 11-89%

ตารางที่ 2 ลักษณะความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ของ *Pediococci*

ที่มา : Hammers และคณะ (1991)

	P. pentosaceus	*P. acidilactici*	*P. damnosus*	*P. dextrinicus*	*P. halophilus*	*P. inopinatus*	*P. pavulus*	*P. urinaeequi*
รูปร่าง	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม
maltose	+	-	d	+	+	+	+	+
melezitose	-	-	d	-	+	-	-	-
growth at 50 °C	-	+	-	-	-	-	-	-
growth at 40 °C	+	+	-	+	-	-	-	+
growth at pH 4.2	+	+	+	-	-	-	+	-
growth with 6.5% NaCl	+	+	-	-	+	d	+	+

หมายเหตุ + หมายถึงสามารถใช้ glycerol และน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้

- หมายถึงไม่สามารถใช้ glycerol และน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้

d หมายถึงมีจำนวนเชื้อที่สามารถใช้ glycerol และน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้ 11-89%

4. Cell Wall Composition

การจำแนกโดยวิธีนี้ จะดูว่ามี หรือไม่มีสาร meso-diaminopimelic acid ในผนังเซล ซึ่งสารนี้ใช้เป็น key parameter ในการทดสอบ โดยใช้วิธี thin-layer chromatography วิธีนี้สามารถจำแนกเชื้อจำนวนมากออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Kandler และ Weiss, 1986)

ผนังเซลของแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย peptidoglycan ชนิดต่าง ๆ (Schleifer และ Kandler, 1972) และพบว่า peptidoglycan ชนิด Lys-D-Asp จะเป็นลักษณะเด่นของเชื้อในจีนัส Lactobacillus วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของ peptidoglycan นี้ เป็นวิธีการที่เร็วที่สุดที่จะจำแนกเชื้อ *L. reuteri* และ *L. fermentum* ออกจากกันได้

5. Electrophoretic Mobility of Lactic Acid Dehydrogenase

วิธี Electrophoretic Mobility of Lactic Dehydrogenase (LDH)ใน starch gel หรือ polyacrylamide gel (Hensel และคณะ, 1977) เป็นวิธีที่พบว่ามีประโยชน์ และเชื่อถือได้ในการจำแนกความแตกต่างของฟีโนไทป์ของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาก เช่น *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* และ *L. johnsonii* (Fujisawa และคณะ, 1992)

6. Sodium dodecyl sulphate - Polyacrylamide gel electrophoresis of Whole Cell Protein

หลักการของวิธีนี้ คือ เชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน ทำให้เราสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยใช้ sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าวิธีนี้มีความแน่นอนในระดับสปีชีส์ และ/หรือในระดับ subspecies (Pot และคณะ, 1993a) การจำแนกแบคทีเรียแลคติกโดยวิธีนี้สามารถใช้จำแนกเชื้อที่มีปัญหาได้ เช่น Lactococci (Jarris และ Wolff, 1979) *L. kefir*, *L. reuteri* (Dicks และ Van Vuuren, 1987) และ Leuconostoc (Barreu และ Wagener, 1990)

การจำแนกเชื้อโดยวิธี SDS-PAGE นี้ จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และเชื่อถือได้ มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มของเชื้อที่มีเป็นจำนวนมาก เชื้อที่จำแนกแล้วอาจนำไปทดสอบยืนยันเพิ่มเติมโดยวิธีการทางจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ ต่อไปได้

7. Serology

เป็นวิธีการที่สำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในสายพันธุ์ Streptococci โดย Lancefield (1993) ได้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม และใช้ตัวอักษรแทนในแต่ละกลุ่มนั้นๆ กลุ่มแอนติเจนเฉพาะที่มีโพลีแซคคาไรด์อยู่รวมในส่วนของผนังเซล จะเรียกว่า group A, B, C, E, F และ G หรือ ที่มี teichoic acid อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซล และผนังเซลชั้นใน (group D และ N) การจำแนกโดยวิธีนี้ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง pathogenic β-haemolytic Streptococci จากโรคติดเชื้อของมนุษย์ และสัตว์ แต่ไม่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ non-haemolytic หรือ α - haemolytic ชนิดต่างๆ

วิธีการทางพันธุศาสตร์ที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก

1. DNA : DNA hybridization (Boehringer Mannheim, 1995)

วิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่าสายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันจะสามารถจับคู่กันได้ โดยดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกันและสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้

เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรืออาจใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันได้จะปรากฏเป็นสัญญาณ (signal) ขึ้นมา ซึ่งการตรวจสอบจะใช้เครื่องมือที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของ

2. การตรวจสอบลำดับเบสบน 16S rRNA (Collins และคณะ 1990)

ทำโดยตรวจสอบลำดับเบสบนสาย RNA ของไรโบโซมขนาด 16S โดยจะมีบริเวณที่ประกอบด้วยยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะพื้นฐานประจำพันธุ์อยู่ ซึ่งจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงไปจากบรรพบุรุษ การตรวจสอบลำดับเบสบริเวณนี้จึงสามารถบอกได้ว่าเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันหรือไม่

3. Plasmid profiling (Pouwels และ Leer, 1993)

แบคทีเรียแลคติกบางสปีชีส์จะมีพลาสมิดอยู่ในเซลซึ่งควบคุมคุณสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีขนาดและลำดับเบสเหมือนกัน เมื่อแยกพลาสมิดจากเซลแล้วนำมาตัดโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน แล้วนำมาทำ gel electrophoresis จะได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนของพลาสมิด ซึ่งสามารถนำรูปแบบที่ได้นี้มาเปรียบเทียบกันได้โดยถ้าเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันก็จะมีรูปแบบที่เหมือนกัน

4. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Hertel และคณะ 1993)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างในระดับสปีชีส์ โดยนำดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) ของเซลมาตัดย่อยโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน โดยเอ็นไซม์จะตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันดีเอ็นเอจะถูกตัดได้ขนาดชิ้นต่างๆ เหมือนกัน การตรวจสอบขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดนี้ทำโดยวิธี gel electrophoresis

5. Random Amplified Polymorphic DNA (Williams และคณะ 1991)

เป็นการใช้ primers ที่ไม่จำเพาะเจาะจงในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อการตรวจหาดีเอ็นเอ ที่ให้ลักษณะ polymorphic ใช้สำหรับจำแนกสายพันธุ์ หรือตรวจตามการถ่ายทอดพันธุกรรม

<u>การนำวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลคติก</u>

วิธี Random Amplified Polymorphic DNA นิยมเรียกว่า RAPD คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มซึ่งอาศัยปฏิกิริยา PCR แต่วิธีนี้จะใช้ oligonucleotide primer สายสั้นๆที่มีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนใดยีนหนึ่งบนสาย DNA template เรียกว่า arbitrary primer และไม่จำเป็นต้องทราบ

ลำดับเบสบนสาย DNA template ก่อน โดย primer นี้จะเข้าไปสุ่มจับกับสาย DNA template ณ. ตำแหน่งต่างๆที่เบสสามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้นเชื้อที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกันมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเหมือนกันก็จะถูกสุ่มจับโดย primer นั้นๆ ณ. ตำแหน่งเดียวกัน เมื่อปฏิกิริยา PCR ดำเนินผ่านไปก็จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่เหมือนกันออกมาเป็นจำนวนล้านๆเท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยปกติคุณสมบัติของ primer ที่ต้องการคือ มี G+C content อยู่ระหว่าง 50-80 % และไม่มีลักษณะ palindromic sequence (Williams และคณะ, 1990) เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอมาแบ่งแยกโดยทำ gel electrophoresis ซึ่งสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอได้ตามขนาด ผลที่ได้จากการทำ gel electrophoresis นี้คือรูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งจะสังเกตเห็นเป็นแถบ (band) ต่างๆเรียงตัวในแนวดิ่ง เรียกรูปแบบนี้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint pattern) โดยแบคทีเรียที่มี DNA fingerprint pattern คล้ายกันจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากเทคนิคดังกล่าวนี้ ในปี ค.ศ. 1992 Cancilla และคณะ ได้นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อระบุความแตกต่างของเชื้อ Lactococci 2 สปีชีส์ คือ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* จำนวน 4 strains และ *Lactococcuc lactis* subsp. *cremoris* จำนวน 3 strains ผลการวิจัยพบว่า primer M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') สามารถให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่างระหว่างเชื้อทั้งสองซับสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน และสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละ strain ที่อยู่ในซับสปีชีส์เดียวกันได้ด้วย การศึกษาครั้งนี้คณะผู้ทดลองได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับการใช้วิธี pulsed-field gel electrophoresis และวิธีติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารฟอสฟอรัสไอโซโทป (^{32}P) ผลการทดลองพบว่าทั้งสามวิธีให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งคณะผู้ทดลองได้ให้คำแนะนำไว้ว่าวิธี RAPD เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพเพียงพอและให้ความสะดวกรวดเร็วกว่าการทำ pulsed-field gel electrophoresis การติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารกัมมันตภาพรังสีฟอสฟอรัส (^{32}P) ซึ่งก่อนหน้านี้ Anolles และคณะ (1991) ก็ได้นำวิธีการใช้ arbitrary primer มาศึกษาหารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ คือ ไวรัส (lambda phage C1857 Sam7), ยีสต์ (*Candida albicans*), พืช (*Cornus florida* C.V. Barton), กระต่าย (*Oryctolagus cuniculus*) และลิง (*Macaca mulatta*) ผลการวิจัยพบว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว

<u>วัตถุประสงค์ของงานวิจัย</u>

เพื่อศึกษาการนำเอาวิธี Random Amplified Polymorphic DNA มาใช้ในการระบุและจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง ระหว่างเชื้อ *Lactobacillus pentosus* กับ *Lactobacillus plantarum* และแยกความแตกต่างระหว่างจีนัส *Lactobacillus* กับ *Pediococcus*