บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการสกัด chromosomal DNA จากแบคทีเรียแลคติก

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dudley Ed (1995) และ Ausubel และคณะ (1987) พบว่าสามารถช่วยแก้ปัญหาของทั้ง 2 วิธีได้เป็นอย่างดี เนื่องจากตามวิธีการของ Dudley Ed (1995) นั้นไม่มีการใช้สารละลายผสมของ hexadecyl trimethylammonium bromide (CTAB)/sodium chloride (NaCl) ซึ่งสามารถจับกับเศษผนังเซลและสารประกอบ polysaccharide (ซึ่งเกิดจากสายของ peptidoglycan ที่ถูกย่อยโดยเอ็นไซม์ lysozyme และ mutanolysin) และตกตะกอนเมื่อทำการสกัดด้วย chloroform/isoamyl alcohol จึงเป็นเหตุให้ chromosomal DNA ที่สกัดได้จากวิธีการของ Dudley Ed (1995) ค่อนข้างที่จะไม่บริสุทธิ์มีสารประกอบอื่นๆ ที่กล่าวข้างต้นปนอยู่มาก ดังจะเห็นได้จากผลการ run gel electrophoresis (ดังแสดงในรูปที่ 26) ซึ่งจะพบลักษณะ smear ตลอดการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดซึ่งก็คือสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อน แต่วิธีการของ Dudley Ed (1995) นี้มีข้อดีคือมีการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ TES ที่มีน้ำตาล sucrose ซึ่ง sucrose นี้จะไปทำหน้าที่รักษาสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายนอกและภายในเซลในขณะที่เอนไซม์ย่อยผนังเซล เป็นผลทำให้เซลไม่แตกออกอย่างรุนแรงและดีเอ็นเอไม่แตกออกเป็นท่อนสั้นๆ ซึ่งจะสังเกตได้หลังจากตกตะกอนโดยใช้ 95% ethanol จะปรากฏเส้นใยดีเอ็นเอตกตะกอนลงมาที่ก้นหลอด ส่วนวิธีการของ Ausubel และคณะ (1987) ไม่มีการใช้ sucrose ในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นผลให้เซลแตกออกอย่างรุนแรงเมื่อถูกเอ็นไซม์ย่อย เนื่องจากไม่มีสมดุลแรงดันออสโมติกระหว่างภายนอกและภายในเซล ทำให้เมื่อตกตะกอนดีเอ็นเอโดย 95% ethanol แล้ว ไม่ปรากฏเส้นใยดีเอ็นเอให้เห็น ต้องนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิต่ำ (4^{0} C) จึงสามารถสังเกตเห็น pellet ของดีเอ็นเอที่ก้นหลอด แต่วิธีนี้มีการใช้ CTAB/NaCl จึงทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีสารปนเปื้อนน้อยซึ่งจะสังเกตได้หลังจาก run gel electrophoresis แล้วไม่พบลักษณะ smear ของสารปนเปื้อน แต่จะพบว่าแถบของดีเอ็นเอที่ได้ไม่คมชัดจะเห็นเป็นแถบค่อนข้างกว้างและมี smear จางๆ ซึ่งเกิดจากชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอท่อนสั้นๆ นั้นมีโอกาสที่จะได้รหัสพันธุกรรมไม่ครบทั้งจีโนม ถึงแม้ว่าเริ่มต้นปฏิกิริยา PCR จะใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากพอควรคือ 3.0 ng ซึ่งได้ท่อนดีเอ็นเอสั้นๆ ซึ่งแต่ละท่อนเมื่อนำมาเรียงต่อกันอาจได้รหัสพันธุกรรมครบทั้งจีโนมก็ตาม แต่อาจจะมีผลให้ตำแหน่งการจับของ primer นั้นแตกต่างไปจากการจับกับเส้นดีเอ็นเอสายยาวที่ครบทั้งจีโนม จึงมีโอกาสที่จะได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

<u>รูปที่ 26</u> ภาพถ่าย chromosomal DNA ของแบคทีเรียแลคติก strain ต่างๆ ที่ได้จากการใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Dudley Ed (1995)

ที่แตกต่างกันแม้ว่าจะเป็นเชื้อ strain เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ยังไม่พบลักษณะดังกล่าว ส่วนวิธีการที่ดัดแปลงขึ้นมาใหม่นี้เป็นการนำเอาข้อดีของทั้ง 2 วิธีมารวมกันคือมีการใช้ทั้งสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี sucrose เป็นองค์ประกอบและการใช้สารละลายผสมของ CTAB/NaCl ซึ่งทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีดังอธิบายไว้ในข้อ 1 บทที่ 3

2. <u>ภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR</u>

การศึกษาภาวะและปฏิกิริยาของ PCR ที่เหมาะสมที่ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองศึกษาหาองค์ประกอบ 3 อย่างที่มีอิทธิพลมากต่อรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอ ปริมาณเอนไซม์ Taq DNA Polymerase และปริมาณ $MgCl_2$ ซึ่งจากผลการทดลองของ Weeden และคณะ (ไม่ปรากฏปีที่แต่ง) เกี่ยวกับการนำวิธี RAPD มาใช้ในการตรวจสอบและปรับปรุงเมล็ดพันธุ์องุ่นและเมล็ดธัญพืชชนิดอื่นๆ ยืนยันชัดเจนว่าองค์ประกอบทั้ง 3 นี้เป็นปัจจัยหลักที่

มีอิทธิพลมากต่อรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอนั้นมีอิทธิพลมากที่สุด โดย Weeden และคณะพบว่าถ้านำตัวอย่างดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์พืชชนิดเดียวกันมาหารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเริ่มต้นปฏิกิริยา PCR นั้นแปรปริมาณดีเอ็นเอต่างๆ กันพบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เหมือนกันแต่จำนวนและตำแหน่งของ marker ที่ได้นั้นมีบางตำแหน่งที่ปรากฏไม่ตรงกัน และบางตำแหน่งที่ความเข้มจางต่างกัน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับคำอธิบายของ Eckert และ Kunkel (1991) ซึ่งอธิบายไว้ในหนังสือ PCR A Practical Approach จากเหตุผลดังกล่าวนี้จึงทำให้ต้องมีการทดสอบปริมาณขององค์ประกอบของปัจจัยทั้ง 3 ชนิดนี้จากภาวะเริ่มต้นที่ได้ดัดแปลงมา โดย Tailliez (1996) และ Williams (1991) นั้นใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นปริมาณ 25 ng ส่วน Hosaka (1994) นั้นใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 ng ผลจากการทดลองขั้นต้นนี้พบว่าแม้ว่าจะใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น 5 ng แต่ก็พบว่ายังคงมากเกินไปสำหรับภาวะและปฏิกิริยาที่ดัดแปลงมาใช้นี้ โดยพบว่า genomic DNA ไม่ถูกเพิ่มปริมาณและไม่เกิดรูปแบบการเคลื่อนที่ได้ (polymorphism) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เกิดจากการที่ primer ไม่สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบได้เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินไป ทำให้โครงสร้างทุติยภูมิ (2^{nd} structure) ขดตัวเกี่ยวพันแน่นหนาแม้ว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการ denaturation ที่ 94^{0} C ก็ยังไม่สามารถทำให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวอย่างสมบูรณ์ เป็นผลทำให้ทั้ง primer และเอ็นไซม์ไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ผลจากการทดลองต่อมาพบว่าการใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ 1.5 ng/µl มีความเหมาะสมโดยสามารถทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอออกมา ส่วนปริมาณเอ็นไซม์และ $MgCl_2$ นั้นมีผลน้อยกว่าปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยพบว่าที่ระดับการใช้เอ็นไซม์และ $MgCl_2$ ที่ใกล้เคียงกันจะไปมีผลต่อความเข้มและความจางของ distinct band และการปรากฏกับการไม่ปรากฏของ minor band เท่านั้น โดยผลการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับผลการทดลองของ Weeden และคณะเช่นกัน สำหรับการใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ให้เหมาะสมกับปริมาณเอ็นไซม์นี้ Eckert และคณะได้ทำการทดลองและให้คำแนะนำไว้ว่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ของเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase จะสูงสุดเมื่อในปฏิกิริยามีองค์ประกอบของ $MgCl_2$ ในปริมาณที่เท่ากับ (equimolar) ปริมาณของ dNTPs ซึ่งในปฏิกิริยานี้ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 20 mM ส่วน dNTP รวม 4 ชนิดความเข้มข้น 4 mM ซึ่งคิดเป็นปริมาณ 5 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากทั้งดีเอ็นเอ dNTPs และโปรตีนที่อาจปนเปื้อนมาในปฏิกิริยาสามารถที่จะจับกับ Mg^{++} ได้ ดังนั้นปริมาณ Mg^{++} อิสระที่มีอยู่ในปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับปริมาณเอนไซม์จะต้องอาศัยการสังเกตจากผลการทดลองที่ได้ (Weeden และคณะ) ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ของปฏิกิริยานั้นเป็น minor effect ซึ่งมีผลน้อยมากกับรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้

สำหรับภาวะและปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลองนี้มีข้อพึงระวังในการนำไปใช้ ทั้งนี้เนื่องจาก PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง (high sensitivity) ดังนั้นเงื่อนไขทุกประการจะต้องตรงกับที่ระบุไว้คือ

- ความเข้มข้นเริ่มต้นของ DNA template โดยผลจากการทดลองของ Weeden และคณะ และจากการทดลองนี้พบว่า ถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเปลี่ยนไปจะมีผลทำให้ได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนไปด้วย แม้ว่าองค์ประกอบอื่นๆของปฏิกิริยาจะคงที่ก็ตาม ซึ่งได้สรุปไว้ว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น เป็น major effect ที่มีผลต่อรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้

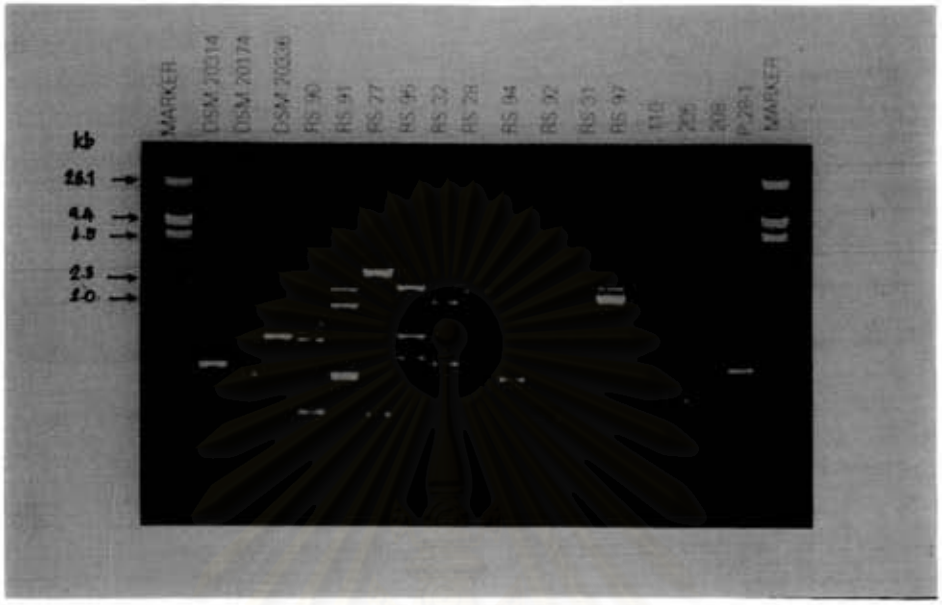
- ปริมาณเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase โดยจากการผลทดลองพบว่าประสิทธิภาพ และ activity ของเอ็นไซม์ของผู้ผลิตแต่ละบริษัทไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอ็นไซม์ (ได้มาจากเชื้อสายพันธุ์ใด) และวิธีการในการทำให้เอ็นไซม์บริสุทธิ์

- เครื่องที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) จากบริษัทต่างกันก็ จะให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพในการเพิ่มและการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งจะไปมีผลต่อการจับของ primer เข้ากับสายดีเอ็นเอและมีผลต่อช่วงระยะเวลาที่เอ็นไซม์จะทำงานให้ได้ประสิทธิภาพที่สูงสุด ดังนั้นการรายงานภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR จะต้องระบุชนิดและรุ่นของเครื่องเสมอ

3. <u>arbitrary primer ที่เหมาะสมในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก</u>

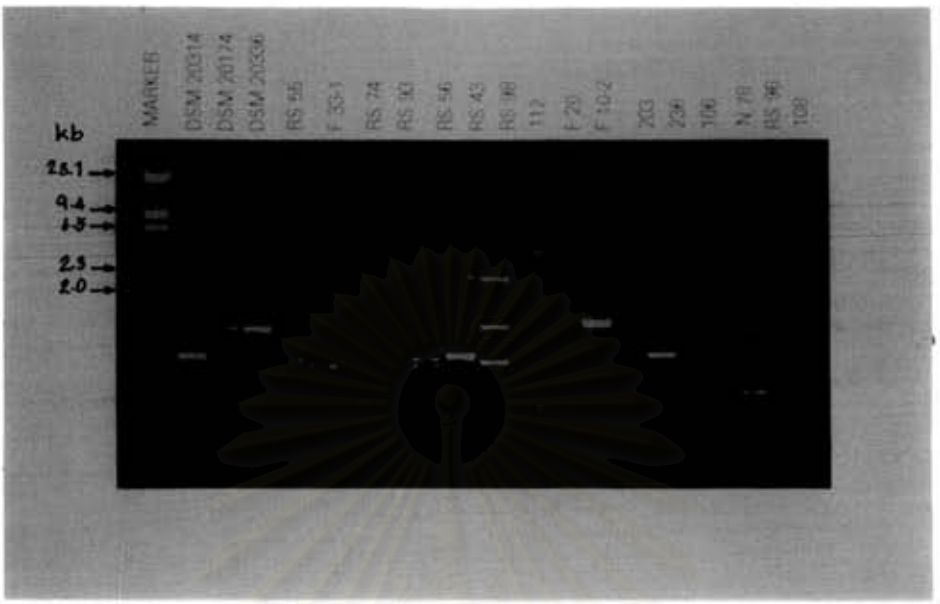
การทดลองศึกษาหาภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ในข้อ 2 นั้นได้มีการทดลองใช้ arbitrary primer จำนวน 2 primers คือ OPB 06 (5'-TGCTCTGCCC-3') และ OPB 08 (5'-GTCCACACGG-3') ตามการรายงานของ Tailliez และคณะที่กล่าวว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *L. pentosus* และ *L. plantarum* ได้นั้น ผลจากการนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง type strain ทั้ง 3 ชนิดในการทดลองนี้พบว่าได้ตำแหน่งของ marker ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28 ซึ่งตำแหน่งของ marker ที่ได้มีบางตำแหน่งที่ยังไม่ชัดเจน (ไม่เป็น distinct band) คือตำแหน่ง 3.97, 2.30 และ 2.10 kb ของ type strain of *L. plantarum* DSM 20174 ที่เกิดจาก primer OPB 08 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง type strain of *P. pentosaceus* DSM 20336 นั้นพบว่าได้ตำแหน่ง marker เพียง 1 ตำแหน่งคือ 2.07 kb ซึ่งไม่สามารถที่จะใช้บอกระดับความเหมือนหรือความแตกต่างภายในสปีชีส์นี้ได้ และเมื่อนำ primer ทั้ง 2 มาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 58 strains พบว่าได้รูปแบบลายพิมพ์ที่ค่อนข้างกระจัดกระจายจัดกลุ่มสายพันธุ์ได้ยาก ดังนั้นจึงต้องทำการสรรหา primer ใหม่โดยทดสอบ primer จำนวนทั้งสิ้น 100 primers ดังการทดลองในข้อ 3 ซึ่งผลการทดลองสามารถสรรหา primer ได้จำนวน 4 primers คือ OPA 03, OPA 11, OPC 05 และ OPC 20 ซึ่งสามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ (polymorphism) ของทั้ง 3 สปีชีส์โดยได้ตำแหน่งของ marker ที่แตกต่างกันจึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง สปีชีส์และภายในสปีชีส์เดียวกันได้ (ดังผลการทดลองรูปที่ 18 ถึง 21) โดยพบว่า primer ทั้ง 4 นี้สามารถระบุสายพันธุ์ของ

เชื้อได้ตรงกันเป็นส่วนใหญ่ ส่วนเชื้อที่ primer ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้นั้นจะให้รูปแบบที่ไม่เหมือนกับ type strain ทั้ง 3 ชนิด ของทั้ง 4 primers ดังได้อธิบายในผลการทดลองข้อ 3

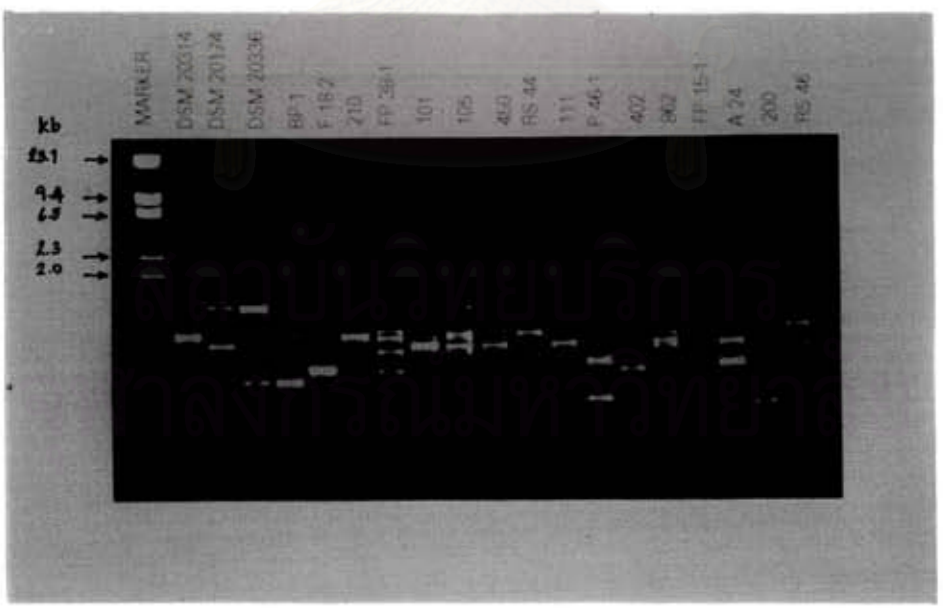


รูปที่ 27 ก ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 06

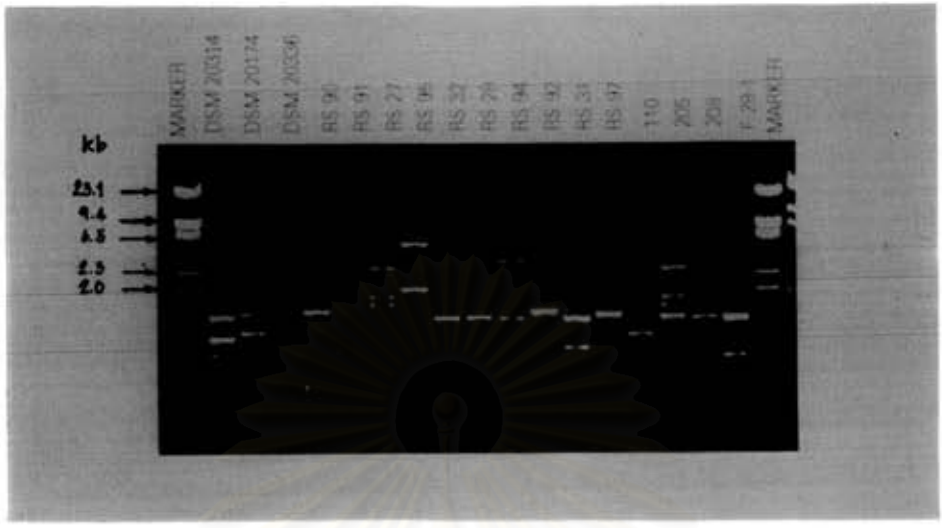
รูปที่ 27 ข ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 06



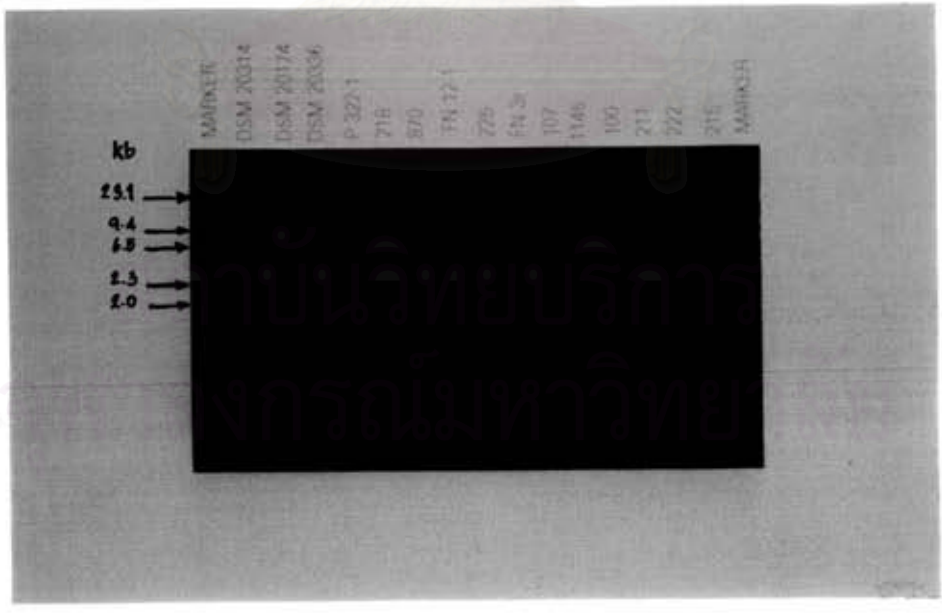
รูปที่ 27 ค ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 06



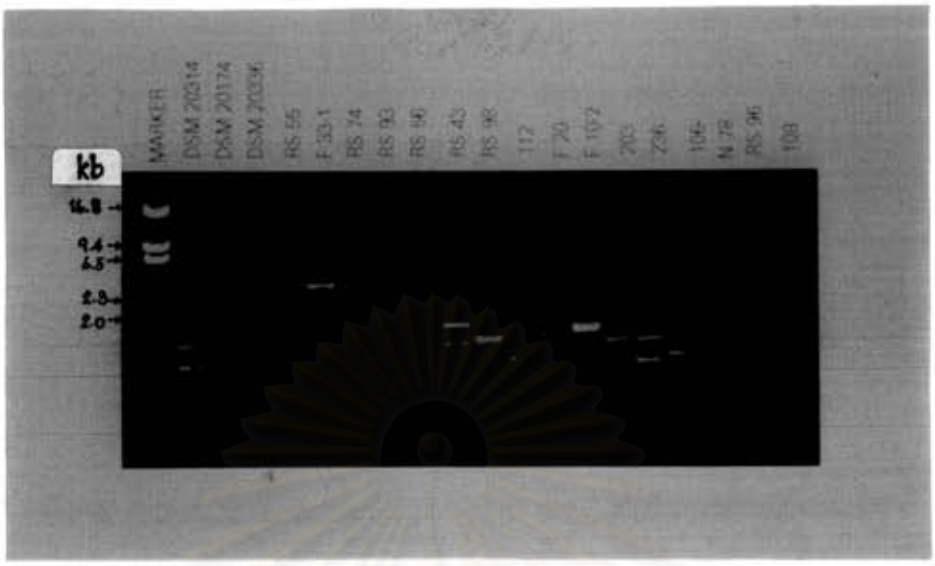
รูปที่ 27 ง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 06



<u>รูปที่ 28 ก</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 08



<u>รูปที่ 28 ข</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 08



รูปที่ 28 ค ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 08

รูปที่ 28 ง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมืองที่เกิดจากการใช้ primer OPB 08

4. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลคติก 58 strains ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นเมือง

รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้วิธี RAPD ดังผลการทดลองข้อ 4 จะเห็นได้ว่ามีรูปแบบที่ไม่ซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็นต้น ซึ่งวิธีต่างๆ เหล่านี้ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีรายละเอียดมาก คือมีจำนวน band ของดีเอ็นเอมากซึ่งบางตำแหน่งก็ไม่ได้เป็น marker ที่สำคัญ (ไม่ใช่ marker ที่ใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์) ทำให้เกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์ผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าไม่มีเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพเพียงพอช่วยในการวิเคราะห์ (เช่น computer software และอุปกรณ์ที่ช่วยในการอ่านค่า M.W. ตำแหน่งของ band) อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในระหว่างการวิเคราะห์ได้ง่ายซึ่งจะนำไปสู่การสรุปผลการทดลองที่ไม่ตรงกับความเป็นจริง แต่สำหรับวิธี RAPD นี้จะเห็นได้ว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จะได้ตำแหน่งของ marker ไม่มากเท่ากับวิธีต่างๆ ดังกล่าวและไม่น้อยจนเกินไปจนกระทั่งไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อได้ การวิเคราะห์ผลจึงทำได้ง่ายและสะดวกกว่า โอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ผลจึงมีน้อย แต่อย่างไรก็ตามจากการค้นคว้าข้อมูลและจากรายงานต่างๆ ในเรื่องของจำนวน marker ที่เกิดขึ้นนี้ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนว่าจำนวนตำแหน่งของ marker ที่เกิดขึ้นควรมีเท่าใดจึงจะเหมาะสม แต่ก็มีข้อแนะนำไว้ว่าควรดูจากรูปแบบ (polymorphism) ของ marker ที่เกิดขึ้นว่าสามารถที่จะทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ได้หรือไม่ คือแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์และบอกระดับความเหมือนหรือความแตกต่างภายในสปีชีส์ได้หรือไม่

5. การวิเคราะห์และสรุปผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 58 strains ที่เกิดจากการใช้ primer ทั้ง 4 primers นั้นพบว่าค่า % S.I. กับ type strain นั้นแตกต่างกันไปตามชนิดของ primer (ดังแสดงในตารางที่ 9) ทั้งนี้เนื่องจาก primer แต่ละ primer จะไปสุ่มเพิ่มปริมาณ (random amplified) ณ. ตำแหน่งที่แตกต่างกันบนสายดีเอ็นเอซึ่งแล้วแต่ว่าลำดับเบสบริเวณใดบ้างบนสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเบสคู่สม (complementrary) กับ primer นั้นๆ เป็นผลให้ได้ตำแหน่งและจำนวน marker ที่แตกต่างกันของเชื้อในสายพันธุ์เดียวกัน และมีข้อน่าสังเกตคือ เชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีค่า %S.I. กับ type strain ในระดับที่มากกว่า 50% นั้น primer ทั้ง 4 สามารถระบุและจัดจำแนกสปีชีส์ได้ตรงกัน (ดังแสดงในตารางที่ 9) โดยในกลุ่มของ *L. plantarum* พบว่า strain 111, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, 862, 107, FP 15-1, 105, 106, 108, 112, 450, RS 44, RS 46, 100, F 33-1 และ 110 นั้นพบว่า primer ทั้ง 4 สามารถระบุสปีชีส์ได้ตรงกันยกเว้น RS 94 ซึ่งมีค่า %S.I. กับ type strain ที่ระดับ 51% แต่ primer OPA 03 ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น *L. pentosus* หรือ *L. plantarum* โดยมีค่า %S.I. กับ type strain ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ระดับ 6% ส่วน strains 101, RS 43,

RS 91, RS 95, RS 98 และ RS 97 พบว่ามีค่า %S.I. กับ type strain ในระดับต่ำกว่า 50% ลงมานั้น พบว่า primer ทั้ง 4 ระบุสปีชีส์ได้ต่างกัน ซึ่งทำให้ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นสปีชีส์ใดหรืออาจเป็นไปได้ว่าอยู่ในระดับซับสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกับทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนกลุ่มของ *L. pentosus* พบว่า strains 236, 222, 210, 870, RS 28, 215, F 18-2, FP 38-1, 211, F 10-2, RS 31, F 28-1, 205, 218, 208, 203, RS 27 และ FN 3r ที่มีค่า %S.I. กับ type strain ตั้งแต่ระดับ 40% ขึ้นไปนั้น primer ทั้ง 4 สามารถระบุสปีชีส์ได้ตรงกัน ส่วน strain RS 32 และ 200 นั้นพบว่า primer OPA 11 ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน และกลุ่มของ *P. pentosaceus* พบว่าทั้ง 7 strains นั้น primer ทั้ง 4 สามารถระบุสปีชีส์ได้ตรงกัน ส่วน P 46-1, P 322-1, 1145 และ 402 นั้นจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า primer ทั้ง 4 ระบุสปีชีส์ได้ไม่ตรงกัน

ส่วนเหตุผลที่ต้องมีการใช้ตำแหน่งของ marker ที่เกิดจาก primer ทั้ง 4 primers มารวมกันในการสรุปผลก็เนื่องจากตามหลักการทางสถิติพบว่าการใช้ primer หนึ่ง primer ใดในการสรุปผลนั้นอาจให้ข้อสรุปที่ผิดพลาดได้ทั้งนี้เนื่องจาก primer นั้นๆอาจจะไปสุ่มจับบนสายดีเอ็นเอกระจายหนักไปทางด้านใดด้านหนึ่งของจีโนม ในกรณีเช่นนี้อาจทำให้ส่วนที่ไม่ถูกสุ่มจับไม่ได้รับการตรวจสอบโดย primer นั้น เป็นผลทำให้ยีนที่อยู่บริเวณดังกล่าวซึ่งอาจเป็นยีนที่สำคัญหรือยีนเด่นของเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ ไม่ได้รับการตรวจสอบ ผลคือตำแหน่งของ marker ที่สำคัญบางตำแหน่งขาดหายไป ดังนั้นการสรุปผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD นี้จึงต้องมีการใช้ primer มากกว่า 1 primer เพื่อให้สามารถเพิ่มความมั่นใจว่าข้อสรุปที่ได้มาจากการวิเคราะห์ทั้งจีโนมอย่างแท้จริง แต่อย่างไรก็ตามยังเป็นข้อถกเถียงกันในกลุ่มของนักพันธุศาสตร์ว่าควรใช้จำนวน primer และให้ได้ตำแหน่งของ marker เท่าใดจึงจะสรุปผลได้อย่างถูกต้องที่สุด โดยบางท่านเสนอแนะว่าควรจะรวมตำแหน่งของ marker ของแต่ละ primer จนกระทั่งค่าความสัมพันธ์ (% S.I.) ของเชื้อแต่ละ strain ที่มีต่อ type strain มีการเปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุด ซึ่งการทดลองนี้ได้ปฏิบัติตามคำแนะนำดังกล่าวและพบว่าเมื่อรวมตำแหน่ง marker ของ primer จนครบทั้ง 4 primers จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าความสัมพันธ์กับ type strain ออกเป็น 4 กลุ่ม(ดังแสดงในตารางที่ 9) กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงน้อยได้แก่ 111, RS 55, RS 56, RS 74, RS 93, 862, 108, 112, 100, F33-1, 110, RS 94, 236, 222, 210, 870, RS 28, 215, F 18-2, FP 38-1, RS 31, RS 90, 225, N 78, F 20, RS 96 และ RS 92 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของค่า %S.I. เมื่อรวมตำแหน่ง marker ของ primer ที่ 4 เข้าไปอยู่ที่ระดับ 0% ถึง 9% กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความสัมพันธ์อยู่ในระดับปานกลาง ได้แก่ 107, FP 15-1, 105, 211, A 24, F 10-2 และ BP-1 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของค่า %S.I. เมื่อรวมตำแหน่ง marker ของ primer ที่ 4 เข้าไปอยู่ที่ระดับ 10% และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ยังคงมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความสัมพันธ์สูง ได้แก่ 106, 450, RS 44, RS 46, F 28-1, 205, 218, 208, 203, RS 27, RS 32, FN 3r และ 200 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของค่า %S.I. เมื่อรวมตำแหน่ง marker ของ primer ที่ 4 เข้าไปอยู่ที่ระดับ 17% ถึง 24%

6. เปรียบเทียบผลการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกระหว่างวิธี RAPD กับวิธีทางชีวเคมี

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ระหว่างวิธี RAPD กับวิธีทางชีวเคมีพบว่า ในกลุ่มของ *L. pentosus* ให้ผลการทดสอบที่ตรงกันทั้ง 2 วิธี แต่มีบาง strains คือ 203, 205, 208, 218, F 28-1, FN 3r และ RS 27 ที่ผลจากวิธี RAPD ให้ค่า %S.I. กับ type strain ค่อนข้างต่ำคือที่ระดับ 40 % (ดังแสดงในตารางที่ 8) ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากวิธีชีวเคมีทดสอบคุณสมบัติหรือการแสดงออกของยีนเฉพาะบางยีนที่คาดว่าจะเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะเด่นของสปีชีส์นี้คือ การใช้ glycerol และ xylose และการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ อีก 8 ชนิด ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นเพียงการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนบางแหล่งเท่านั้น ส่วนวิธี RAPD ในที่นี้ใช้จำนวน primer ถึง 4 primers ในการสรุปผลซึ่งจะกระจายสุ่มตรวจครอบคลุมครอบคลุมอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งจีโนม ข้อสรุปที่ได้จึงควรมีความถูกต้องตามหลักทางสถิติมากกว่าวิธีชีวเคมี จากเหตุผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าถึงแม้ว่าทั้ง 2 วิธีจะระบุสปีชีส์ของเชื้อดังกล่าวข้างต้นได้ตรงกัน แต่วิธี RAPD ระบุว่ามีความเหมือนกับ type strain เพียง 40 %S.I. เท่านั้น ทำให้ยังไม่อาจสรุปผลได้อย่างแน่นอนว่าเป็น *L. pentosus*

ส่วนกลุ่มของ *L. plantarum* พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันมากกว่ากลุ่มของ *L. pentosus* คือสามารถระบุสปีชีส์ได้ตรงกัน และวิธี RAPD ให้ผลการทดสอบของเชื้อส่วนใหญ่ มีค่า %S.I. กับ type strain สูงกว่า 50 % ยกเว้น strain 101 ที่มีค่า %S.I. กับ type strain เพียง 34 % เท่านั้น โดยเหตุผลเช่นเดียวกับในกลุ่มของ *L. pentosus* แต่กลุ่ม *L. plantarum* นี้มีเชื้ออยู่ 1 strain คือ 110 ซึ่งให้ผลการทดสอบที่ไม่ตรงกันกล่าวคือ วิธี RAPD ระบุว่าเป็น *L. plantarum* โดยมีค่า %S.I. กับ type strain ค่อนข้างสูงคือที่ระดับ 51 % แต่วิธีชีวเคมีให้ผลการทดสอบออกมาเป็น *L. pentosus* เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากการทดสอบทั้ง 2 วิธีกระทำต่างเวลาและใช้เชื้อที่มาจากการเจริญเติบโตที่ไม่ใช่ครั้งเดียวกัน จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่เชื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไป หรืออาจเกิดความผิด-พลาดขณะเก็บและนำเชื้อมาเจริญเติบโตใหม่ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ตรงกัน

และกลุ่มของ *P. pentosaceus* พบว่าผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกันมาก โดยสามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อทั้ง 7 strains ได้ตรงกัน และยังพบว่าผลการทดสอบจากวิธี RAPD มีค่า %S.I. กับ type strain อยู่ในระดับสูงคือตั้งแต่ 58 ถึง 94 % ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าคุณสมบัติต่างๆ ที่

ตารางที่ 9 ค่า %S.I. ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 58 strains ที่มีต่อ type strain ทั้ง 3 ชนิด เมื่อรวมตำแหน่ง marker ของ primer ทั้ง 4 primers

STRAIN	111			RS 55			RS 56			RS 74			RS 93			862		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03		100			100			100			100			100			100	
OPA 11		100			91			91			91			80			72	
OPC 05		32			52			52			52			52			52	
OPC 20		71			100			100			100			100			100	
OPA 03+OPA 11		100			95			95			95			87			75	
OPA 03+OPA 11+ OPC 05		97			91			91			91			87			79	
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20		92			92			92			92			92			86	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	107			FP 15-1			105			106			108			112		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03		74			74			100			74			74			74	
OPA 11		72			72			60			60			60			60	
OPC 05		83			83			56			93			78			52	
OPC 20		100			93			93			85			85			85	
OPA 03+OPA 11		81			75			72			66			66			72	
OPA 03+OPA 11+OPC 05		72			72			66			52			72			66	
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20		82			82			76			76			76			71	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	450			RS 44			RS 46			100			F 33-1			110		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03		100			74			33			100			86			74	
OPA 11		100			100			100			60			60			60	
OPC 05		52			52			52			25			32			32	
OPC 20		52			64			64			60			60			65	
OPA 03+OPA 11		100			81			81			66			66			66	
OPA 03+OPA 11+OPC 05		91			84			84			52			52			52	
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20		69			65			65			51			60			51	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	RS 94			101			RS 43			RS 91			RS 95			RS 98		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03	6	6			100			74		6	6		6	6		44		
OPA 11		60		55			51					14			10	26		
OPC 05		71			25			39			39			32			32	
OPC 20		40			52		45					35	51			51		
OPA 03+OPA 11		50			36			36		12			12			33		
OPA 03+OPA 11+OPC 05		52			41			41			21		18			18		
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20		51			34			34			23			23			23	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	RS 97			236			222			210			870			RS 28		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03	6	6		85			100			89			68			68		
OPA 11			7	82			93			82			51			51		
OPC 05		32		86			31			31			24			24		
OPC 20		40		87			81			81			60			60		
OPA 03+OPA 11	12			84			96			88			46			46		
OPA 03+OPA 11+OPC 05	18			83			75			79			64			64		
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20		23		85			78			78			65			65		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	215			F 18-2			FP 38-1			211			A 24			F 10-2		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03	52			52			27			52			68			44		
OPA 11	51			51			55			51				15		26		
OPC 05	31			31			31			31			31			31		
OPC 20	51			51			65			71			76			91		
OPA 03+OPA 11	49			49			70			46			23			33		
OPA 03+OPA 11+OPC 05	62			62			51			40			40			40		
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20	62			62			52			50			50			50		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	RS 31			F 28-1			205			218			208			203		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03	35			72			52			63			44			44		
OPA 11	35			51			38			74			35			35		
OPC 05	31			53			53			53			53			53		
OPC 20	60			100			45			45			51			51		
OPA 03+OPA 11	42			46			46			59			33			33		
OPA 03+OPA 11+OPC 05	46			23			23			23			23			23		
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20	48			40			40			40			40			40		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	RS 27			RS 32			FN 3r			200			P 46-1			P 322-1		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03	52			6	6		44			44				33			33	
OPA 11	35					14	35			5	5				10			7
OPC 05	53			53			24			69			47				25	
OPC 20	45			58			45			45			-	-	-	-	-	-
OPA 03+OPA 11	46			12			33			33				21			14	
OPA 03+OPA 11+OPC 05	23			23			23			23			-	-	-		21	
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20	40			40			40			40			-	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	RS 90			225			F 20			N 78			RS 96			BP-1		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03			100			100			89			100			78			78
OPA 11			100			89			54			81			71			81
OPC 05			100			76			58			58			58			58
OPC 20			70			74			81			81			81	-	-	-
OPA 03+OPA 11			100			95			63			87			87			84
OPA 03+OPA 11+OPC 05			100			89			63			77			77			77
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20			94			84			72			72			72			67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRAIN	RS 92			402			1145			FN 12-1		
PRIMERS	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*	*L. pentosus*	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
OPA 03			100	-	-	-	68			27		
OPA 11			42		15				14	5	5	
OPC 05			58			17	24			12		
OPC 20			35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA 03+OPA 11			67	-	-	-	23				15	
OPA 03+OPA 11+OPC 05			63	-	-	-	23			-	-	-
OPA 03+OPA 11+OPC 05+OPC 20			58	-	-	-	-	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทดสอบกับเชื้อ *P. pentosaceus* โดยวิธีชีวเคมีสามารถครอบคลุมคุณสมบัติที่สำคัญของสปีชีส์นี้ได้ดีกว่าสปีชีส์ *L. pentosus* และ *L. plantarum*

สำหรับ strains 1145, FN 12-1 และ P 46-1 ที่วิธี RAPD ไม่สามารถระบุสปีชีส์แต่วิธีชีวเคมีระบุว่าเป็น *L. plantarum*, *L. plantarum* และ *L. pentosus* ตามลำดับนั้น เนื่องจากเชื้อทั้ง 3 strains มีรูปแบบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเหมือนกับเชื้อที่อยู่ใน 2 สปีชีส์นี้ แต่ข้อสรุปจากวิธี RAPD มีความน่าเชื่อถือมากกว่าดังเหตุผลที่ได้กล่าวในตอนต้น ถ้าจะให้ข้อสรุปจากวิธีชีวเคมีมีน้ำหนักมากยิ่งขึ้นควรมีการทดสอบการใช้สารอาหารชนิดอื่นๆ ด้วยนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอน เช่น การใช้วิตามิน และแร่ธาตุชนิดต่างๆ เป็นต้น เช่นเดียวกับ *L. sake* 402 ที่ถูกระบุว่าเป็น *L. plantarum* เนื่องจากมีรูปแบบการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 10 ชนิดเหมือนกับ strain อื่นๆ ที่อยู่ในสปีชีส์นี้เช่นกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย