ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การวิเคราะห์แบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction(PCR)

Using PCR technique for identification of lactic acid bacteria

จัดทำโดย

วรากร แก่นศึกษา รหัสนักศึกษา 58080134

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..../...../.....

(ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การวิเคราะห์แบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction(PCR) Using PCR technique for identification of lactic acid bacteria
ชื่อนักศึกษา	วรากร แก่นศึกษา รหัสนักศึกษา 58080134
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกหรือจุลินทรีย์อื่นๆจำเป็นต้องมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ เพื่อการยืนยันสายพันธุ์ที่ถูกต้องของจุลินทรีย์นั้นๆ ในการวิจัยนี้ได้ทำการจำแนกแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 ,*Wisella cibraria* SI21 ,*Lactobacillus plantarum* SKI2 และ *Lactobacillus plantarum* SS7

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเลียแลคติกด้วยการย้อมแกรม จากนั้นมีการตรวจสอบถึงระดับดีเอ็นเอเพื่อให้สามารถระบุสายพันธุ์ โดยอาศัยเทคนิค PCR โดยศึกษาวิธีการในการเตรียมดีเอ็นเอของตัวอย่าง2 วิธีการ คือ วิธี heat shock และ วิธี pick up colony เพื่อเปรียบเทียบและให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ และศึกษาชนิดของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแลคติก ผลการศึกษาพบว่า การตรวจสอบแค่เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดออกจากกันได้เนื่องจากสีของแกรมและรูปร่างคล้ายคลึงกันและเมื่อทำการตรวจสอบโดยอาศัยเทคนิค PCR พบว่า วิธีการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ แบบ heat shock ให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่า วิธี pick up colony เนื่องจากสามารถเห็นแถบของดีเอ็นเอบนเจลและสามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกได้ ในส่วนของวิธี pick up colony นั้นไม่สามารถจำแนกได้เนื่องจาก ไม่มีการปรกฏของแถบดีเอ็นเอบนเจล

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับจะสำเร็จนี้สำเร็จลุล่วงมิได้ หากไม่ได้ได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ อพัชชา จินดาประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำเสนอแนะ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด จนเสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ทำให้รายงานฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนการจัดทำสัมมนาชิ้นนี้ ทั้งด้านต้นแบบการจัดทำสัมมนา รวมถึงการจัดทำรูปเล่ม

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ในการเป็นกำลังใจและคอยสนับสนุนการทำงานชิ้นนี้มาโดยตลอด รวมถึงขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในคณะ ที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจในการทำงานเสมอ ทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วรากร แก่นศึกษา

24 กรกฎาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญรูป	ง
ประมวลศัพท์และคำย่อ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานสัมนา	1
1.2 ขอบเขตของงานสัมนา	1
1.3 วัตถุประสงค์ของงานสัมนา	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
2.1 แบคทีเรียแลคติก(Lactic acid bacteria)	2
2.2 เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR)	5
2.2.1 หลักการของ PCR	5
2.2.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวของในปฏิกิริยา PCR	5
2.2.3 ขั้นตอนในการทำ PCR	6
2.2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ในด้านการแพทย์	7
2.3 เทคนิค electrophoresis	7
บทที่ 3 การวิเคราะห์กลุ่มของจุลินทรีย์ในเมล็ดและต้นอ่อนด้วยวิธี T-RFLP	11
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	11
3.2 ขั้นตอนและวีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	17
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	17
5.1 สรุปผล	17
5.2 ข้อเสนอแนะ	17
เอกสารอ้างอิง	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.2 แสดงหลักการทำงานของเทคนิค PCR 4

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของ
เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 11

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *wisella cibraria* 11

รูปที 4.3 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *lactobacillus plantarum* SKI2 11

รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *lactobacillus plantarum* SS7 12

รูปที่ 4.5 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติก 12

รูปที่ 4.6 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่าง
โดยวิธีการ heat shock ด้วย ไพรเมอร์ OPA-3 13

รูปที่ 4.7 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่าง
โดยวิธีการ pick up colony ด้วย ไพรเมอร์ OPA-3 14

รูปที่ 4.8 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่าง
โดยวิธีการ heat shock ด้วยไพรเมอร์ BSF8/20, REVB 15

รูปที่ 4.9 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่าง
โดยวิธีการ pick up colony ด้วย ไพรเมอร์ BSF8/20, REVB 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมวลศัพท์และคำย่อ

PCR	=	Polymerase Chain Reaction
mL	=	Millilitre
µL	=	Microlitres

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาพิเศษ

แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) หรือท่อน (rods) ไม่ สร้างสปอร์ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและพบได้ในอาหารหลายๆประเภท เช่น ผัก ผลไม้ แป้ง นม เป็นต้น แบคทีเรียบางชนิดก่อให้เกิดการเสื่อเสียในอาหาร แบคทีเรียบางชนิดก้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น แบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีความสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นกรดแลคติกและ แบคเทอริโอซิน ซึ่งมีผลต่อกลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์อาหาร แบคทีเรียแลคติกสามารถจำแนกออกได้เป็นหลายกลุ่ม ซึ่งการจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยพิจารณารูปร่าง อุณหภูมิในการเจริญไม่สามารถจำแนกได้อย่างแม่นยำและชัดเจน แต่การจำแนกด้วยการศึกษาถึงระดับดีเอ็นเอจะช่วยให้สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกได้อย่างถูกต้องและชัดเจน

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1.2.1 เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค PCR

1.2.2 เพื่อศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ในการตรวจวิเคราะห์กลุ่มของแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค PCR

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถหาวิธีการและสภาวะที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างเหมาะสม

1.3.2 สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลคติก(Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) หรือท่อน (rods) ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก microaerophilic หรือ facultative anaerobe ไม่มีไซโตโครม (cytochrome) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และมีค่า G + C content น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยจีนัสต่างๆ ได้แก่ *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Carnobacterium, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Oenococcus* และ *Weissella* แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้ เป็นกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล อะเซโทอิน (acetoin) และกรดอินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหาร และถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติม แบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (starter culture) เติมลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุมตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Carnobacterium* กลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้มักแยกมาจากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมา ใช้ในการประยุกต์ทางด้านอาหาร การสร้างแบคทีริโอซินนี้มีข้อดีแก่แบคทีเรียแลคติกเองคือแบคทีริโอซินสามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารนั้นๆ แบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง การนำแบคทีริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อน ทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหาร ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการ เนื่องจากมีความปลอดภัย มีรสชาติสดใหม่ และพร้อมรับประทาน

2.2 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) (Klanrit, 2014)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) คือ PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณ (amplify) ดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจ (DNA or gene of interest) อย่างจำ เพาะเจาะจงได้ ในปริมาณที่ มากกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลองและในเวลาอันรวดเร็ว เทคนิค PCR ได้ถูกริเริ่มและพัฒนาขึ้น ในปี ค.ศ. 1983 (พ.ศ. 2526) โดย Dr. Kary Banks Mullis และคณะนักวิจัยจากบริษัท Cetus Corporation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 หลักการของ PCR

• เทคนิค PCR อาศัยหลักการแบบเดียวกันกับการจำลองตัวเองของ ดีเอ็นเอโมเลกุล (DNA replication) ที่พบในสิ่งมีชีวิต

• เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase

• เทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดย ใช้ไพรเมอร์ (primers) 1 คู่ ร่วมกับสารเคมีและสารตั้งต้นที่สำคัญหลายชนิด

2.2.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

1) DNA template คือดีเอ็นเอต้นแบบที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

2) PCR buffer ประกอบด้วย Tris-Cl และ KCl pH 8.3

3) dNTP mix หรือ deoxynucleotides (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP)

4) ไพรเมอร์(Primers) คือนิวคลีโอไทด์สายสั้นที่ถูกออกแบบเพื่อใช้เป็น จุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจ

5) $MgCl_2$ จะทำหน้าที่เป็น co-factor เพื่อส่งเสริม การทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

6) Thermostable DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการ เชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์กับไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.2.3 ขั้นตอนในการทำ PCR (ภาพที่ 2.2)

1.) Denaturation

• ใช้อุณหภูมิสูง 90-95°C

• แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว

2.) Annealing

• ใช้อุณหภูมิในช่วง 40-65°C

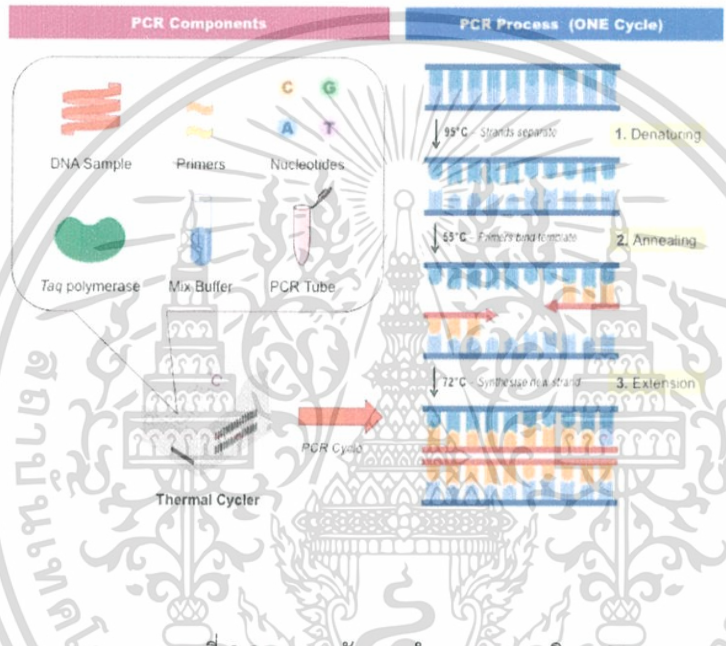
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

• ไพรเมอร์สามารถเกาะกับดีเอ็นเอสาย เดี่ยวได้ตรงบริเวณที่เป็นเบสคู่สม

3.) Extension

• เอนไซม์ DNA polymerase จะ สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทาง จาก 5' → 3'

• ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72°C



ภาพที่ 2.2 แสดงหลักการทำงานของเทคนิค PCR

ที่มา : http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html

2.2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR

ในงานด้านการแพทย์

1.การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่างๆ ที่อาจเกิดจากไวรัส หรือแบคทีเรีย (Infectious diseases) เช่น มาลาเรีย โรคเอดส์ วัณโรค ไข้หวัดนก เป็นต้น

2.การตรวจหายีนก่อมะเร็ง (Cancer) เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การตรวจวินิจฉัยโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Genetic disorders) เช่น โรคเซลล์เม็ดเลือดแดงรูปเคียว (Sickle cell anemia) โรคโลหิตไหลไม่หยุด (Haemophilia) เป็นต้น

ในงานด้านการเกษตร

1.การตรวจหาเชื้อโรคพืช (Detection of pathogens)

2.การปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบพันธุ์พืช ความสามารถในการต้านทานโรค

3.ช่วยให้เข้าใจพันธุกรรมของพืชและเชื้อโรคพืช ซึ่ง สามารถประยุกต์ใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล เช่น ผู้ต้องหากรณีข่มขืน หรืออื่นๆ เหยื่อที่ประสบภัยพิบัติ เช่น สึนามิ และความสัมพันธ์ทางสายเลือดเป็นต้น

2.3 เทคนิค electrophoresis

Electrophoresis เป็นวิธีการแยกสารที่ผสมกันอยู่ให้ออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า หลักการของ electrophoresis คือ เมื่อเราวางโมเลกุลที่มีประจุลงในสนามไฟฟ้าที่เกิดจากขั้วไฟฟ้า 2 ขั้วที่อยู่ใต้สารละลาย โมเลกุลของสารนั้นจะมีการเคลื่อนย้ายจากขั้วหนึ่งไปสู่ขั้วหนึ่ง โดยที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ ในขณะที่โมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้ารวมเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก การเคลื่อนที่ในลักษณะนี้เราเรียกว่า electrophoresis ความเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการคือ แรงผลักดันซึ่งเกิดโดยสนามไฟฟ้ากระทำต่อโมเลกุลนั้นๆ ปัจจัยอีกประการหนึ่งคือ แรงต้านทานการเคลื่อนที่ ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่โมเลกุลนั้นเคลื่อนย้ายเข้าไปในตัวกลาง
เมื่อเราเริ่มเปิดสนามไฟฟ้า โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ด้วยความเร่ง จนกระทั่งถึง ความเร็วที่สมดุลย์กับแรงต้านทาน จากนั้นโมเลกุลจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ และเนื่องจากโมเลกุลของสารต่างๆ จะมีความแตกต่างกันทั้งขนาด รูปร่าง และ ประจุไฟฟ้า ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน จึงสามารถแยกออกจากกันได้ การแยกสารโดยวิธี electrophoresis นี้จึงเป็นประโยชน์และเป็นที่นิยมอย่างมาก ในทางอณูชีววิทยานิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ในการแยกขนาดของ DNA และโปรตีน (ลีณา ลีลาศวัฒนกิจ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

3.1.2 *Wisella cibraria* SI21

3.1.3 *Lactobacillus plantarum* SKI2

3.1.4 *Lactobacillus plantarum* SS7

3.2 สารเคมี

3.2.1 ดีเอ็นเอแม่แบบ

3.2.2 nuclease free water

3.2.3 10X PCR buffer

3.2.4 $MgCl_2$

3.2.5 dNTPs

3.2.6 ไพรเมอร์ OPA-3

3.2.7 ไพรเมอร์ BSF8/20-REVB

3.2.8 ไพรเมอร์ REVB

3.2.9 Taq DNA polymerase

3.2.10 Ethidium bromide staining solution

3.2.11 Agarose powder

3.2.12 DNA marker

3.2.13 DNA loading dye

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.14 Tris-EDTA buffer

3.2.15 Trypticase soy agar (TSA)

3.2.16 Tryptic Soy Broth (TSB)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 Thermal cycle

3.3.2 Micro pipette พร้อม tip

3.3.4 PCR tubes

3.3.5 Centrifuge

3.3.6 Heat block

3.3.7 Lamimar air flow

3.3.8 Spin down centrifuge

3.3.9 Electrophoresis

3.3.10 Microwave

3.3.11 Microcentrifuge tube

3.3.12 Vortex mixture

3.3.13 เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ ภาพ Gel Doc XR system

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก

เขี่ยเชื้อตัวอย่าง 1 ลูป ลงใน อาหาร TSB 10 mL. ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงในหลอดทดลอง มาทำการครอสสตีก ลงในจานเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 48 ชั่วโมง

3.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1) หยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที

2) ล้างสีออกด้วยน้ำจากกระบอกฉีดน้ำ ที่เปิดให้ไหลเบาๆ แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนหั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที

3) ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วย acohol 95% ซึ่งทำได้โดยการจับสไลด์ในลักษณะทำมุม 45 องศา หยด alcohol 95% ที่ปลายด้านบนสไลด์ โดยให้ alcohol ไหลผ่านผิวหน้ารอยสเมียร์จนกระทั่ง alcohol ที่ไหลลงมาไม่มีสี ไม่ควรใช้เวลานานเกิน 2 วินาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำทันที

4) ย้อมทับด้วยสี safranin ซึ่งทำได้โดยหยดสี safranin ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที

5) ล้างออกด้วยน้ำ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้งด้วยอากาศหรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ

3.2.3 การเตรียมตัวอย่าง DNA ด้วย 2 วิธีการ

1.การเตรียมดีเอ็นเอ (DNA) โดยวิธีการให้ความร้อน (Packeiser และคณะ,2556) นาโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก มาผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 ไมโครลิตร นำไปให้ความ ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นให้ถังน้ าแข็งนาน 3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้ส่วนใสด้านบน ปิเปตส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ของเชื้อแบคทีเรียแลคติมา สังเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพเมอร์OPA-3 (5' - AGTCAGCCAC-3 ') (Oneca et al., 2003) ที่จำเพาะกับ แบคทีเรียแลกติกเข้าจับแบบสุ่ม ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

2. วิธีการ pick up colony

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือก Pick up โคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแลคติก 1-2 colony ใส่ลงใน PCR master mix หลังจากนั้นนำไปเข้าสู่เครื่อง PCR ตามสภาวะที่กำหนด เพื่อทำปฏิกริยา PCR เพิ่มปริมาณ DNA

3.2.3.การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้อ 3.2.2 มาผสมกับไพรเมอร์OPA-3 (5′-AGTCAGCCAC-3′) แล้วนำไปสังเคราะห์เพื่อเพิ่มจำนวนโดยใช้โปรแกรม วงจรที่ประกอบด้วย 5 นาที เริ่มต้นขั้นตอนการทำให้เสียสภาพจากดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว ที่ 94°C และลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ 94°C 30 วินาที , 36°C 1 นาที , และ 72°C 1 นาที ทั้งหมด 34 รอบและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขั้นสุดท้าย 1 นาทีที่ 72°C

และสำหรับไพรเมอร์ BSF8/20 (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) REVB (5′- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′) สังเคราะห์เพื่อเพิ่มจำนวนโดยใช้โปรแกรม วงจรที่ประกอบด้วย 3 นาทีเริ่มต้นขั้นตอนการทำให้เสียสภาพจากดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว ที่ 94°C และลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ 94°C 1 วินาที , 50°C 1 นาที , และ 72°C 1.45 นาที ทั้งหมด 34 รอบและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขั้นสุดท้าย 10 นาทีที่ 72°C

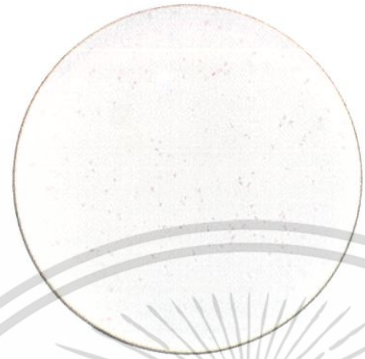
หลังจากสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA แล้ว นำ DNA ตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Electrophoresis เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ ด้วยขนาดของ DNA ที่ปรากฏบนเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติก



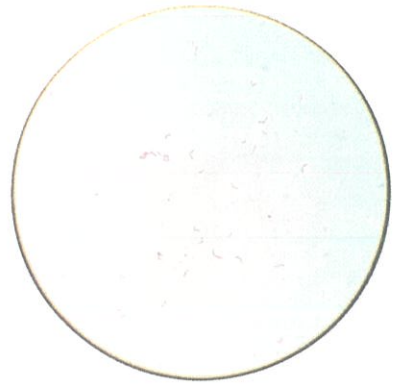
ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536

ลักษณะของเชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 ที่ผ่านการย้อมสีแกรมแล้ว เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x พบว่า มีรูปร่างกลม (cocci) และ ติดสีม่วงของแกรมบวก (gram-positive)

ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *Wisella cibraria* SI21

ลักษณะของเชื้อ *Wisella cibraria* SI21 ที่ผ่านการย้อมสีแกรมแล้ว เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x พบว่า มีรูปร่างกลม (cocci) และ ติดสีม่วงของแกรมบวก (gram-positive)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2

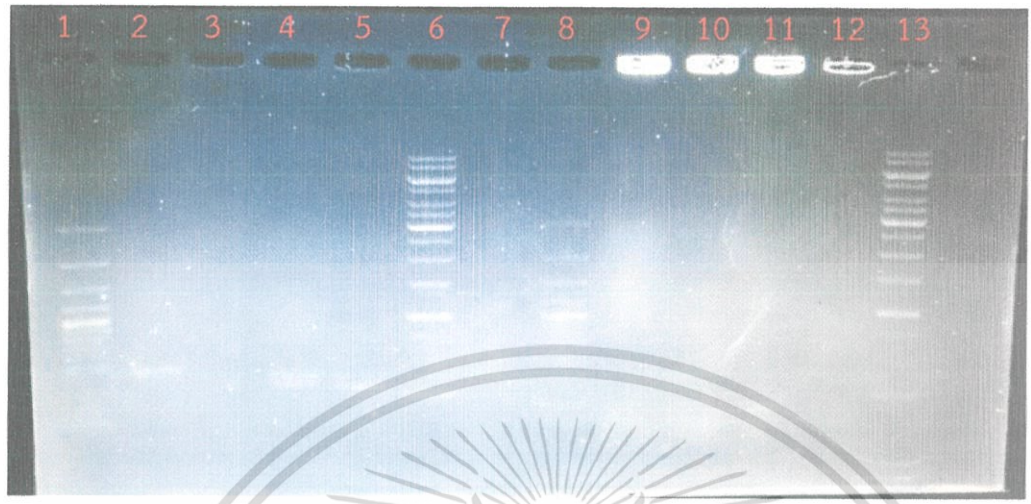
ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2 ที่ผ่านการย้อมสีแกรมแล้ว เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 100x พบว่า มีรูปร่างเป็นท่อน (rods) และ ติดสีม่วงของแกรมบวก (gram-positive)

ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะรูปร่างและสีจากการย้อมแกรมของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7

ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ผ่านการย้อมสีแกรมแล้ว เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 100x พบว่า มีรูปร่างเป็นท่อน (rods) และ ติดสีม่วงของแกรมบวก (gram-positive)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติก



ภาพที่4.5 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ช่องที่ 1,8 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp ladder plus

ช่องที่ 2,9 คือ เชื้อ *lactobacillus plantarum* SS7

ช่องที่ 3,10 คือ เชื้อ *lactobacillus plantarum* SKI2

ช่องที่ 4,11 คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536

ช่องที่ 5,12 คือ เชื้อ *wisella cibraria* SI21

ช่องที่ 6,13 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb ladder

จากภาพที่ 4.5 ช่องที่ 2-5 คือการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี heat shock ช่องที่ 9-12 คือตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีการ pick up colony ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมด้วยวิธี heat shock ปรากฏแถบของดีเอ็นเอบนเจลในช่องที่ 2 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ขนาด 500 bp ช่องที่ 4 คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536 ที่ขนาด 400 bp และช่องที่ 5 คือ เชื้อ *Wisella cibraria* SI21 ที่ขนาด 300 bp แต่ในส่วนของการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี pick up colony ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการ heat shock ด้วย ไพรเมอร์ OPA-3

ช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp ladder plus

ช่องที่ 2 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7

ช่องที่ 3 คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536

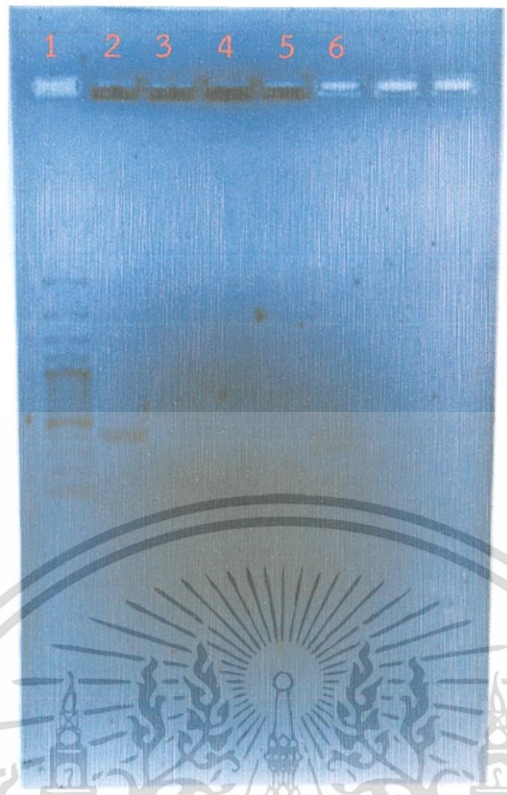
ช่องที่ 4 คือ เชื้อ *Wisella cibraria* SI21

ช่องที่ 5 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2

ช่องที่ 6 คือ negative control

จากภาพที่ 4.6 เป็นการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ heat shock และใช้ไพรเมอร์OPA-3 เมื่อนำไปทดด้วยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอปรากฏที่ช่องที่ 2 เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7 ที่ขนาด 400 bp ที่ช่องที่ 4 เชื้อ *Wisella cibraria* SI21 ที่ขนาด 500 bp และ ช่องที่ 5 เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2 ที่ขนาด 500 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการ pick up colony ด้วย ไพรเมอร์ OPA-3

ช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp ladder plus

ช่องที่ 2 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7

ช่องที่ 3 คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536

ช่องที่ 4 คือ เชื้อ *Wisella cibraria* SI21

ช่องที่ 5 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2

ช่องที่ 6 คือ negative control

จากภาพที่ 4.7 เป็นการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ และใช้ไพรเมอร์OPA-3 เมื่อนำไปทดด้วยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอปรากฏที่ช่องที่ 2 เชื้อ *ศ Lactobacillus plantarum* SS7 แต่ไม่พบในช่องอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการ heat shock ด้วยไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB

ช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp ladder plus

ช่องที่ 2 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7

ช่องที่ 3 คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536

ช่องที่ 4 คือ เชื้อ *Wisella cibraria* SI21

ช่องที่ 5 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2

ช่องที่ 6 คือ negative control

จากภาพที่ 4.8 เป็นการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ heat shock และใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB เมื่อนำไปทดด้วยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนและระบุขนาดไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.9 ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการ pick up colony ด้วย ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB

ช่องที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp ladder plus

ช่องที่ 2 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SS7

ช่องที่ 3 คือ เชื้อ *Pediococus pentosaceus* TISTR 536

ช่องที่ 4 คือ เชื้อ *Wisella cibraria* SI21

ช่องที่ 5 คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* SKI2

ช่องที่ 6 คือ negative control

จากภาพที่ 4. เป็นการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธีการ pick up colony และใช้ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB เมื่อนำไปทดด้วยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจนและระบุขนาดไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากผลการทดลองการจำแนกแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค PCR และเตรียมตัวอย่างด้วย 2 วิธีการคือ heat sock และวิธีการ pick up colony พบว่า วิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ heat shock ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าเนื่องจากเป็นวิธีการที่มีการสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้นก่อนนำตัวอย่างไปสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จึงทำให้มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นบนเจล แต่ในส่วนของวิธีการ pick up colony นั้น ไม่มีการสกัดหรือทำให้ได้มาซึ่งดีเอ็นเอในการเตรียมตัวอย่าง เมื่อนำไปสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจึงไม่เกิดการสังเคราะห์ขึ้น และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นบนเจล

ในส่วนของการศึกษาไพรเมอร์และสภาวะนั้น พบว่าไพรเมอร์ OPA-3 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแลคติกเนื่องจากทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เป็นอย่างดี แต่ในส่วนของไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB ให้ผลลัพธ์ที่ไม่ค่อยชัดเจน

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองข้างต้นได้ผลที่ยังไม่ชัดเจนนัก ควรมีการทดลองที่ต่อเนื่องและระยะเวลามากขึ้นเพื่อช่วยในการปรับปรุงสภาวะที่ใช้ตลอดจน เทคนิคเฉพาะตัวของผู้ทำการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

พัชรีย์ วิชยานุวัติ.(2015). เทคนิคในการหา DNA sequence ค้นเมื่อ 27 พฤศจิกายน 2561,จาก https://www.baanjomyut.com/library_2/extension2/techniques_in_molecular_biology/13.html

เมษิณี นาขวัญ, จารุมาศ ยี่เจริญ, ประภาศรี ศุภกุล, เรนุกา เพชรฤทธิ์ และ รุจิรา มีสวัสดิ์. (2012). เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA ค้นเมื่อ 25 พฤศจิกายน 2561,จาก https://sites.google.com/site/biology2012science/what-is-dna/thekhnikh-pcr-ni-kar-pheim-canwn-dna

ลีณา ลีลาศวัฒนกิจ.(2013). Capillary Electrophoresis for Food Analysis ค้นเมื่อ 27 พฤศจิกายน 2561.จาก
Retrieved November 25, 2018, from www.appliedbiosystems.com

Klanrit P. (2014). Polymerase Chain Reaction (PCR). ค้นเมื่อ 25 พฤศจิกายน 2561, จาก http://qsds.go.th/newqsds/file_upload/2014-07-04-7.pdf

Asmahan Azhari Ali , 2010. Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health: A Review. Research Journal of Microbiology, 5: 1213-1221.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้