บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว

: บีกเกอร์ (beaker) ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร กระบอกตวง (cylinder) แท่งแก้วคน จานเพาะเชื้อ (petri dish) หลอดหยดสาร (dropper) หลอดทดลอง (tube) หลอดทดลองฝาเกลียว หลอดดักก๊าซ (durham tube) กระจกสไลด์ (slide glass) ขวดสารเคมี

2. เครื่องมือ

ตู้อบ (Hot air oven) บริษัท Binder

เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น BP2100S บริษัท Sartorius

เตาเผา (Furnace) บริษัท FisherScientific

ไมโครเวฟ (Microwave)

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 1010 บริษัท Heidolph Instrument

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Model 250 บริษัท Denver Instrument

เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) รุ่น VORTEX GENIE 2 บริษัท Scientific Industries

หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) บริษัท Diamond, Taiwan

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) รุ่น Clean Model บริษัท Lab service ltd., part

เครื่องนับโคโลนี บริษัท Funke Gerber

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น DR/2010 บริษัท HACH และ บริษัท Hewlett packard

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท EHRET

เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย (Microcentrifuge) รุ่น Biofuge pico บริษัท Sorvall

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (PCR) รุ่น PTC-100™ บริษัท MJ Research

ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า (Electrophoresis) บริษัท Biorad

เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (Power supply) บริษัท Biorad

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท GFL

3. อื่นๆ

: ถุงพลาสติก ถ้วยอลูมิเนียม (aluminium dish) ถ้วยเซรามิกส์ทนร้อนสูง (crucible) ช้อนตักสาร กระดาษฟอยล์ (foil) ปากคีบ ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ไปเปตอัตโนมัติ (micropipet) ไปเปตทิป (pipet tip) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากกาเคมี พาราฟิล์ม (parafilm) ถุงมือยาง กระบอกน้ำกลั่น ไม้จิ้มฟัน ไฟแช็ค กระดาษกรอง (filter paper) กระบอกอบจานเพาะเชื้อ กล่องสูญญากาศ (anaerobic jar) หลอดเอพเพนดอร์ฟ (eppendorf tube)

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar (Schalau)

Nutrient broth (Difco)

Nitrate agar

Nitrate broth

2. สารละลาย (solution) และสารทดสอบ (reagent)

สีและน้ำยาที่ใช้ในการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain)

Sulfanilic acid (Schalau, Spain)

α-naphthylamine reagent

Nessler's reagent

Tetramethyl-para-phenylenediamine dihydrochloride

3% Hydrogen peroxide solution

3. สารที่ใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

Sodium dodecyl sulfate

CTAB/Sodium chloride solution

Chloroform/Isoamyl alcohol

Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol

PCR buffer

TBE buffer

Loading buffer

Tris บริษัท USB

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

dNTP mixed บริษัท Bio Basic Inc.

Primer บริษัท Bio Basic Inc.

Ethidium bromide บริษัท Sigma

Agarose บริษัท Research organic, Inc

EDTA บริษัท Sigma

Isoamyl alcohol บริษัท Carlo erba reagent

Hydroxyquinoline บริษัท Fluka

β-mercaptoethanol บริษัท Pharmacia Biotech

Isopropanol บริษัท Carlo erba reagent

Bovine serum albumin

4. <u>เอนไซม์</u>

Proteinase K บริษัท USB

Taq polymerase บริษัท Finnzymes

*Hae*III บริษัท Promega

*Hha*I บริษัท Promega

*Msp*I บริษัท Promega

5. <u>ชุดทดสอบ (kit)</u>

API 20NE บริษัท BioMerieux

API Staph บริษัท BioMerieux

API Coryne บริษัท BioMerieux

QIAquick Gel Extraction Kit บริษัท QIAgen

6. <u>สารเคมีอื่นๆ</u>

Acetic acid (CH_3COOH) บริษัท BDH

Agar powder

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) บริษัท MAY & BAKER LTD.

Glucose บริษัท Merck

Potassium iodide (KI) บริษัท Merck

Potassium nitrate (KNO_3) บริษัท Merck

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Merck

Mercuric chloride ($HgCl_2$) บริษัท Carlo erba reagent

Potassium hydroxide (KOH) บริษัท Scharlau

ผงสังกะสี (Zn) บริษัท Scharlau

Sodium Chloride (NaCl) บริษัท Merck

Ethanol (C_2H_5OH)

7. ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ตามแนวพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี กองการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานทหารพัฒนา หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา จังหวัดกาญจนบุรี 3 ครั้งๆ ละ 5 ตัวอย่างดิน จากพื้นที่ที่มีลักษณะต่างๆกัน 3 ลักษณะ คือ พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5 ซึ่งมีลักษณะเป็นป่าไผ่ 1 ตัวอย่าง พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 3 ซึ่งมีลักษณะเป็นชายป่า 1 ตัวอย่าง และพื้นที่บริเวณริมแม่น้ำแควน้อย 3 ตัวอย่าง โดยเก็บดินที่ความลึก 15 เซนติเมตร ปริมาณ 500 กรัม เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาศึกษา เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 9 มีนาคม 2545 ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 13 กรกฎาคม 2545 และครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2546

กำหนดให้ตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ มีสัญลักษณ์ ดังนี้

	พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5	มีสัญลักษณ์เป็น	Axy
	พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 3	มีสัญลักษณ์เป็น	Bxy
และ	พื้นที่บริเวณริมแม่น้ำแควน้อย	มีสัญลักษณ์เป็น	Cxy

โดยที่ x คือ ครั้งที่เก็บตัวอย่าง

y คือ ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 5 บริเวณเก็บตัวอย่างในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 5

ภาพที่ 6 บริเวณเก็บตัวอย่างในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่ 3

ภาพที่ 7 บริเวณเก็บตัวอย่างบริเวณริมแม่น้ำแควน้อย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน</u>

1.1 เปอร์เซ็นต์ความชื้น

อบถ้วยอลูมิเนียม (aluminium dish) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล (A กรัม) จากนั้นชั่งดินหนัก 10 กรัม ใส่ลงไปในถ้วย บันทึกน้ำหนักของดินรวมกับถ้วย (B กรัม) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล สุดท้ายนำดินไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกว่าน้ำหนักของดินรวมกับถ้วยจะคงที่ ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล (C กรัม) แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{B - C}{C - A} \times 100$$

1.2 เปอร์เซ็นต์สารอินทรีย์ในดิน

เผา crucible ที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนัก crucible แล้วบันทึกผล (A กรัม) นำดินที่อบแห้งแล้วจากการหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นใส่ลงใน crucible ที่เผาแล้ว ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล (B กรัม) จากนั้นนำ crucible ที่บรรจุดินไปเผาที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในdessicator ชั่งน้ำหนักและบันทึกผล (C กรัม) แล้วนำดินไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารอินทรีย์ในดิน ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์สารอินทรีย์ในดิน} = \frac{B - C}{B - A} \times 100$$

1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

ชั่งดิน 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ลงในดินที่ชั่งไว้ ใช้แท่งแก้วคนให้ดินและน้ำเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที คนดินเป็นครั้งคราว วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารแขวนลอยของดิน (soil suspension) แล้วบันทึกผล จากนั้นตั้งดินทิ้งไว้จนตกตะกอน วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของส่วนใส (soil supernatant) แล้วบันทึกผล นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่มดีไนทริฟายเออร์จากดิน</u>

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total count)

ทำ soil dilution plate count ที่ความเจือจาง 10^{-3}-10^{-5} บนอาหาร nutrient agar โดยปิเปตน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้ว ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใส่ในหลอดทดลองที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลอดละ 9 มิลลิลิตร เพื่อให้เป็น water blank ชั่งตัวอย่างดินหนัก 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปิเปตน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ใส่ลงไป เขย่าให้เข้ากันดี จะได้ดินที่มีความเจือจางเป็น 10^{-1} เมื่อปิเปตดินที่ความเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน water blank จะได้ดินที่มีความเจือจางเป็น 10^{-2} จากนั้นปิเปตดินที่ความเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน water blank จะได้ดินที่มีความเจือจางเป็น 10^{-3} และเมื่อปิเปตดินที่ความเจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน water blank จะได้ดินที่มีความเจือจางเป็น 10^{-4} ปิเปตดินที่ความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน nutrient agar plate (ภาคผนวก ก.) ความเจือจางละ 3 plate แล้วเกลี่ยให้ทั่ว (spread plate) จะได้ดินที่มีความเจือจางเป็น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ นำไปบ่มโดยการกลับด้านล่างของจานเพาะเชื้อไว้ข้างบนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แล้วบันทึกผล

การนับจำนวนแบคทีเรีย ให้เลือกชุดจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ประมาณ 30-300 โคโลนี จากความเจือจางเดียวกัน นำจำนวนโคโลนีที่นับได้มารวมกันแล้วหารด้วยจำนวนซ้ำของความเจือจางนั้น จะได้จำนวนเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 ความเจือจาง ต่อจานเพาะเชื้อ จากนั้นคำนวณปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งมีหน่วยเป็น CFU (Colony Forming Unit) ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร ดังสมการ

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด = จำนวนเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ x ความเจือจาง (เท่า)

2.2 การทดสอบคุณสมบัติการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชันของแบคทีเรีย

ทำการทดสอบปฏิกิริยาดีไนทริฟิเคชัน (Denitrification test) โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่บรรจุ nitrate broth (ภาคผนวก ก.) และหลอดดักก๊าซไว้ภายใน ผสมให้เข้ากันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเกิดฟองก๊าซหลังจากบ่มทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นทำการทดสอบไนไตรท์ และแอมโมเนีย โดยใช้น้ำยาทดสอบ ถ้าในหลอดใดไม่พบไนไตรท์จึงทำการทดสอบไนเตรทต่อไป (ภาคผนวก ข.)

2.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเจริญบน nitrate agar ในภาวะไร้ออกซิเจน

ทำการ streak แบคทีเรียลงบน nitrate agar แล้วบ่มเชื้อไว้ในภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจสอบว่ามีเชื้อใดบ้างที่สามารถเจริญเติบโตบน nitrate agar ได้ แล้วบันทึกผล

2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (identification of bacteria)

2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบแล้วว่ามีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ดังต่อไปนี้

2.4.1.1 การย้อมสีแบบแกรม (gram's stain) (ภาคผนวก ข.)

2.4.1.2 การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) (ภาคผนวก ข.)

2.4.1.3 การทดสอบคาตาเลส (Catalase test) (ภาคผนวก ข.)

จากนั้นนำผลที่ได้ไปใช้ในการเลือกชุดทดสอบ API เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในข้อ 2.4.2

2.4.2 การทดสอบทางชีวเคมี โดยใช้ชุดทดสอบ API (ภาคผนวก ค.)

2.5 การทดสอบความสามารถในการลดปริมาณไนเทรตใน nitrate broth ของแบคทีเรียที่มีสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน

ถ่ายเชื้อลงใน nutrient broth นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เตรียม nitrate broth แล้ววัดปริมาณไนไตรท์และไนเตรท โดยใช้ spectrophotometer และผงทดสอบ nitriver 3 และ nitraver 5 ตามลำดับ (ภาคผนวก ค.) บันทึกผลเป็นวันที่ 0 จากนั้นแบ่ง nitrate broth ใส่ลงใน flask ให้มีปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วปิเปตหัวเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไป โดยเว้นไว้ 1 flask ไม่ต้องใส่หัวเชื้อ เพื่อกำหนดให้เป็น blank นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการวัดปริมาณไนไตรท์และไนเตรทในวันที่ 3, 7, 10 และ 14 แล้วบันทึกผล

3. <u>การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการเกิดกระบวนการดีไนทริฟิเคชัน</u>

3.1 **การสกัดดีเอ็นเอ** (Ausubel และคณะ, 1996)

ถ่ายเชื้อลงใน nutrient broth แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเชื้ออิ่มตัว นำเชื้อที่อิ่มตัว 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกระทั่งเกิดตะกอนขึ้น ทิ้งส่วนใสแล้วนำตะกอนมาทำให้แขวนลอยอีกครั้งใน TE buffer ปริมาตร 567 ไมโครลิตร เติม 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม NaCl ความเข้มข้น 5 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม CTAB/NaCl solution ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม Chloroform/Isoamyl alcohol ปริมาตรเท่ากันโดยประมาณ ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นด้วย microcentrifuge เป็นเวลา 4-5 นาที นำส่วนใสไปใส่ microcentrifuge tube อันใหม่ เติม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol ปริมาตรเท่ากันลงไป แล้วนำไปปั่นด้วย microcentrifuge เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.6 เท่าของปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าหลอดไปข้างหน้าและข้างหลัง จนกระทั่งเริ่มเห็นสายดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยง ทิ้งส่วนใส แล้วเติมเอธานอล 70% เพื่อล้าง CTAB ออก จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสออกอย่างระมัดระวัง แล้วทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว จากนั้นละลายตะกอนของดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.2 **การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค** Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *nirK* และ *nirS* ด้วยไพรเมอร์ (primer) 2 คู่ (Braker และคณะ, 1998) ดังต่อไปนี้คือ

คู่ที่ 1 : nirK1F- nirK5R สำหรับยีน *nirK* มีลำดับเบส ดังนี้

nirK1F (5'——> 3') 17 bp

GGAATGGTGCCCTGGCA

nirK5R (5' ——> 3') 18 bp

GCCTCGATCAGATTATGG

คู่ที่ 2 : nirS1F- nirS6R สำหรับยีน *nirS* มีลำดับเบสดังนี้

nirS1F (5' ——> 3') 18 bp

CCTACTGGCCGCCACAAT

nirS6R (5' ——> 3') 16 bp

CGTTGAACTTACCGGT

โดยในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) 200 ไมโครโมลาร์ *Taq* polymerase 1.0 U ไพรเมอร์สายละ 1 ไมโครโมลาร์ bovine serum albumin 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และตัวอย่างดีเอ็นเอ 10-100 นาโนกรัม หลังจาก denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้ว ก็ทำ touch down PCR 35 รอบ ประกอบไปด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing step 1 นาที และ extension step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ในระหว่าง 10 รอบแรก อุณหภูมิของ annealing step จะลดลงรอบละ 0.5 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ 56 องศาเซลเซียส จนถึง 51 องศาเซลเซียส จากนั้นอีก 25 รอบ อุณหภูมิจะคงที่ที่ 54 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 35 รอบ แล้วก็บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ต่อไปอีก 7 นาที ดังนี้

denaturation step	95 °C	5 นาที	
touch down PCR			
denaturation step	95 °C	1 นาที	35 รอบ
annealing step	56 – 51 °C	1 นาที →10 รอบ	35 รอบ
	54°C	1 นาที	35 รอบ
extension step	72 °C	1 นาที	35 รอบ
incubation	72 °C	7 นาที	

วิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ และย้อมด้วย ethidium bromide ชิ้นส่วนของยีน *nirK* จะมีขนาด 514 bp ส่วนชิ้นส่วนของยีน *nirS* จะมีขนาด 890 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกมา แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit (QIAgen) (ภาคผนวก ค.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 **การศึกษา** RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ 3.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยตัดชิ้นส่วนของยีน *nirK* ด้วยเอนไซม์ *Hae*III และ *Msp*I และตัดชิ้นส่วนของยีน *nirS* ด้วยเอนไซม์ *Hha*I และ *Msp*I เอนไซม์แต่ละชนิดทำปฏิกิริยาแยกจากกัน โดยในปฏิกิริยา 10 µl ประกอบด้วย 10x buffer 1 µl, bovine serum albumin 0.1 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอ 7 ไมโครโมลาร์ วิเคราะห์ผลโดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 3% agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ และย้อมด้วย ethidium bromide

3.4 **การวิเคราะห์ผล** RFLP

หาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้โดยใช้โปรแกรม แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Phylip Version 3.6 beta ซึ่งใช้สมการของ Nei และ Li (1979) ในการคำนวณ แล้วสร้าง Phylogenic tree ขึ้นมาด้วยโปรแกรม TreeView (win32) Version 1.6.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย