

6. ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ดำเนินการตามขอบเขตของการใช้พื้นที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีดำเนินการดังนี้

6.1 สถานที่วิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ใช้พื้นที่ปลูกถั่วเหลืองในแปลงทดลองทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก ซึ่งตั้งอยู่ที่ละติจูด 16 องศาเหนือ 44.003 ลิปดา และลองจิจูด 100 องศาตะวันออก 11.810 ลิปดา พื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 48 เมตร โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ผลทางสรีรวิทยาบางประการ ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเมล็ด ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

6.2 พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการวิจัย

ถั่วเหลืองไทย (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชไร่ที่เลือกใช้สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากเป็นพืชตระกูลถั่วที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงมาก และผู้วิจัยได้ตัดสินใจเลือกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์เดียวสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ถั่วเหลืองที่ให้ผลผลิตและคุณค่าทางด้านสารอาหารสูง คือ มีโปรตีน 43.8 เปอร์เซ็นต์ น้ำมัน 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตสูงเฉลี่ย 280-350 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่นของสายพันธุ์คือ ทนทานต่อโรคราสนิม โรคใบด่าง และไวรัสใบด่าง และนิยมปลูกในภาคเหนือตอนล่างมากที่สุด โดยเฉพาะจังหวัดพิษณุโลก (กรมวิชาการเกษตร, 2555)

6.3 ระยะเวลาการวิจัย

การศึกษาผลกระทบระยะยาวของระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกันในช่วงฤดูเพาะปลูกที่มีต่อผลผลิตและคุณภาพสารอาหารในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) พันธุ์เชียงใหม่ 60 โดยควบคุมระดับอุณหภูมิที่กำหนด 3 ระดับใน 3 ชุดการทดลอง (3 ซ้ำ) ในแต่ละชุดทดลอง 5 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งแต่ 10.00-15.00 น. โดยทำการปลูก 2 รุ่นดังนี้

ปลูก รุ่นที่ 1 ตั้งแต่เดือนมกราคม 2552 – มีนาคม 2552

นำผลผลิตจากรุ่นที่ 1 มาต่อเนื่องในรุ่นที่ 2 ตั้งแต่เดือนมกราคม 2554 - มีนาคม 2554

เพื่อวิเคราะห์ผลทางสรีรวิทยาบางประการ ได้แก่ การเจริญเติบโตด้านความสูง ดัชนีพื้นที่ใบ และปริมาณ รงควัสดุในใบ (คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์) จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเมล็ด และวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม ใน

การปลูกครั้งที่ 1 เดือนมิถุนายน 2552 – ธันวาคม 2552 และครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายน 2554 – ธันวาคม 2554

6.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldatech digestion unit และ distillation unit)
2. ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Extraction System Model B-811)
3. ชุดวิเคราะห์เยื่อใย (Fiber Analyzer)
4. ชุดวิเคราะห์เถ้า (Futname Thermolyne sybron Tye 48000 Furnace)
5. เครื่อง Spectrophotometer พร้อม cuvette 1 ชุด Model DR 4000
6. ตู้อบลมร้อน
7. Hot plate
8. เครื่องเซนตริฟิวจ์
9. เครื่อง Evaporator

วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
2. Chamber ขนาดกว้าง 1.5 เมตร สูง 1.7 จำนวน 9 ตู้
3. โกร่งบดตัวอย่างใบพืช
4. เครื่องแก้ว ประกอบด้วย
 - 4.1 ชุดเครื่องแก้ววิเคราะห์คลอโรฟิลล์
 - 4.2 ชุดเครื่องแก้ววิเคราะห์โปรตีน
 - 4.3 ชุดเครื่องแก้ววิเคราะห์ไขมัน
 - 4.4 ชุดเครื่องแก้ววิเคราะห์เยื่อใย
 - 4.5 โถดูดความชื้น
 - 4.6 ชุดถ้วย moisture can วิเคราะห์ความชื้น
 - 4.7 ชุดถ้วยกระเบื้องวิเคราะห์เถ้า
5. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 70 มิลลิเมตร
6. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 6 เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลายกรดซัลฟูริก เข้มข้น 0.128 โมล
3. สารละลายกรดซัลฟูริก เข้มข้น 0.1 นอร์มอลิตี
4. สารละลายต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์
5. สารละลายต่างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.223 โมล
6. สารละลายบอริกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
7. ซิลิเนียม

8. อินดิเคเตอร์ (methyl red และ methylene blue)
9. เอ็น-ออกทานอล
10. อะซีโตน เข้มข้น
11. ปีโตรเลียมอีเทอร์
12. เมทานอล
13. Boron Trifluoride
14. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
15. Hexane

6.5 การควบคุมสภาวะจำลองเพื่อควบคุมอุณหภูมิในพื้นที่ปลูกถั่วเหลือง

(1) Open Top Chamber

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะประยุกต์ใช้ Open top chamber (ห้องระบบเปิดด้านบน) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ดัดแปลงมาจาก Drake et al.(1989) ซึ่งขณะนี้ ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัย เรื่อง การประเมินผลกระทบของระดับก๊าซโอโซนที่เพิ่มขึ้นในบรรยากาศต่ออัตราผลผลิตและคุณภาพของสารอาหารในถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยซึ่งเป็นโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2550 (ภาพที่ 1) โดยในงานวิจัยนี้จะพัฒนารูปแบบการใช้งานโดยการเปิดด้านบนไม่มีหลังคา เพื่อให้ถั่วเหลืองได้รับน้ำฝนและความชื้นตามธรรมชาติ และ ลักษณะของ Open top chamber ในงานวิจัยนี้จะคลุมด้วยพลาสติกใสรูปทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เมตร สูง 1.7 เมตร เปิดหลังคาด้านบน และติดระบบหมุนเวียนอากาศ โดยติดตั้งพัดลมด้านหน้าของ ตู้ทดลอง





ภาพที่ 1 Open Top Chamber ที่ประยุกต์ใช้ในการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 ห้องสมุดงานวิจัย
 วันที่..... - 7 ส.ค. 2555
 เลขทะเบียน..... 190949
 เลขเรียกหนังสือ.....

(2) การควบคุมระดับอุณหภูมิในห้องทดลอง

1.1 การสร้างตู้ทดลองชนิดเคลื่อนย้ายได้ การศึกษาวิจัยใช้ตู้ทดลองพลาสติกใสรูปทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เมตร สูง 1.7 เมตร เปิดระบายอากาศด้านบน และมีหลังคาพลาสติกใสด้านบนเพื่อกันน้ำฝน ตู้ทดลองนี้จะใช้เพื่อควบคุมอุณหภูมิในระดับที่กำหนดใน แพลงปลุกและควบคุมระดับอุณหภูมิไว้ซึ่งใช้จำนวนตู้ทดลองทั้งหมด 9 ตู้

1.2 การควบคุมอากาศและลดอุณหภูมิในตู้ทดลอง ดำเนินการโดยการติด พัดลมดูดอากาศบริเวณด้านล่างของด้านหน้าตู้ทดลองเพื่อดูดอากาศเข้า อากาศที่ถูกดูดเข้ามาจะผ่านแผ่นกรองกักขมลพิษอื่นๆ โดยการใช้ถ่านกัมมันต์ เป็นตัวกรองและผ่านแผ่นกรองฝุ่นอีก 1 ชั้น

1.3 การควบคุมระดับอุณหภูมิในตู้ทดลองใช้ระบบการควบคุมด้วยอิเล็กทรอนิกส์โดยมีเครื่องบันทึกอุณหภูมิด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ในห้องทดลองซึ่งส่งสัญญาณต่อเชื่อมกับระบบควบคุมการปล่อยน้ำอัตโนมัติโดยสั่งเปิด ปิดน้ำตามสายวงบริเวณด้านข้างห้องทดลอง โดยระบบจะการควบคุมให้วาล์วปล่อยน้ำเพื่อลดอุณหภูมิในกรณีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นกว่าระดับที่ต้องการ ขณะเดียวกันระบบจะการควบคุมให้วาล์วปิดระบบการปล่อยน้ำเมื่ออุณหภูมิลดลงถึงระดับที่กำหนดไว้ ซึ่งการควบคุมระบบนี้ใช้การอ่านค่าอุณหภูมิด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์และสั่งคำสั่งไปปล่อย-หยุดปล่อยน้ำ นั้นเอง (ดังภาพที่ 2)

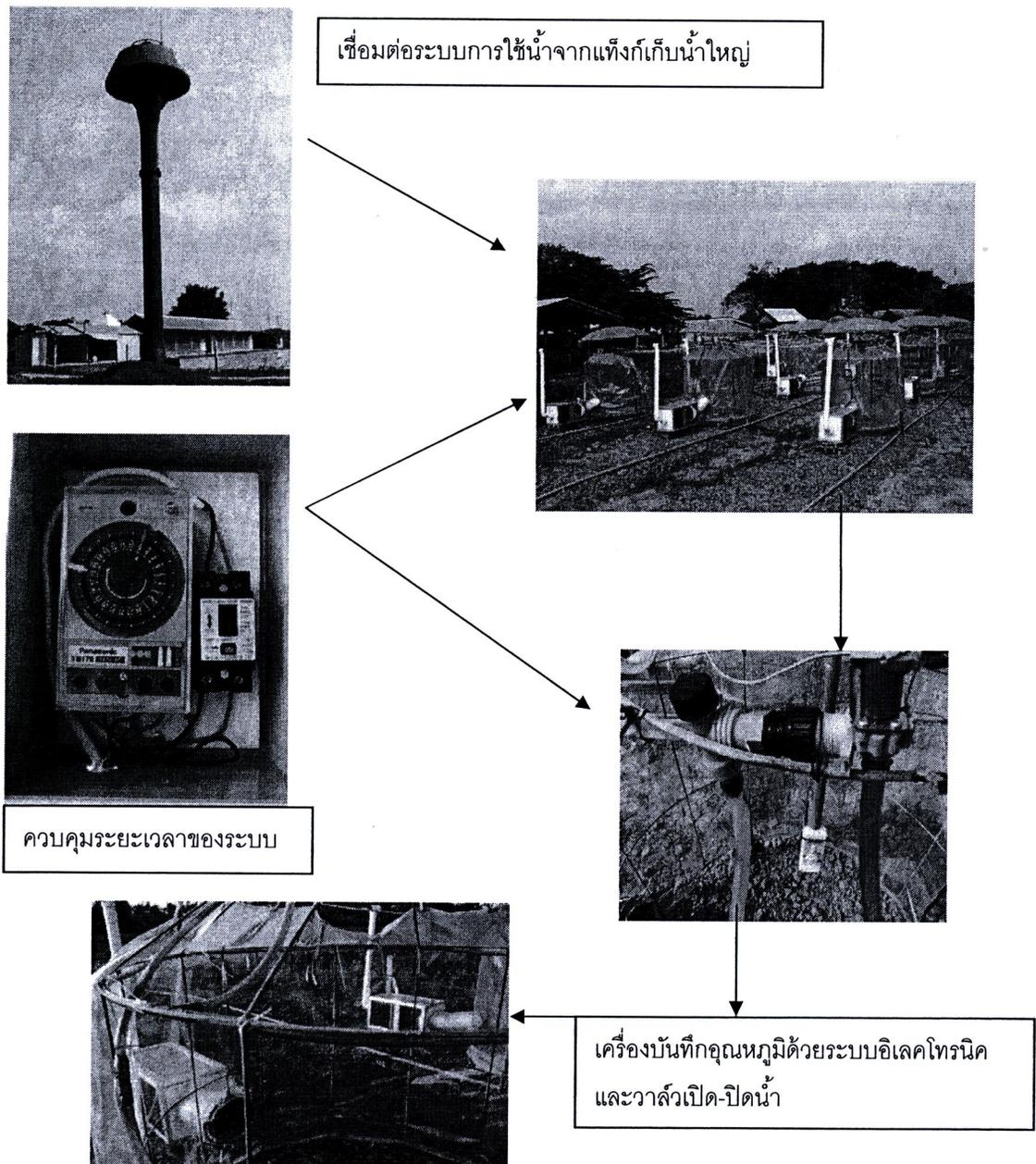
6.6 การวางแผนการทดลอง

เนื่องด้วยในการศึกษากำหนดให้มีการควบคุมชุดทดลองทั้งหมด 3 ชุดทดลอง (3 Treatments) จึงกำหนดชุดทดลองและกำหนดชื่อดังนี้

1) ชุดทดลอง LT (Lower Air Temperature) ควบคุมให้ต่ำกว่าระดับอุณหภูมิธรรมชาติภายนอกตู้ทดลองระหว่างการวิจัย

2) ชุดทดลอง AT (Ambient Air Temperature) ควบคุมให้ใกล้เคียงกับระดับอุณหภูมิภายนอกตู้ทดลองระหว่างทำวิจัย

3) ชุดทดลอง HT (Higher Air Temperature) ควบคุมให้สูงกว่าระดับอุณหภูมิธรรมชาติภายนอกตู้ทดลองระหว่างการวิจัย



ภาพที่ 2 แผนผังการติดตั้งระบบควบคุมต่างๆ ในแปลงทดลอง

ซึ่งกำหนดแผนการทดลอง แบบ Random Completed Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ทั้ง 3 ชุดการทดลอง ดังกล่าว ดังนั้น จำนวนตู้ Open Top Chamber จะมีทั้งหมด 9 ตู้ทดลอง

6.7 การจัดการปลูกถั่วเหลืองและการตอบสนองต่อผลกระทบจากอุณหภูมิในระดับที่ต่างกัน

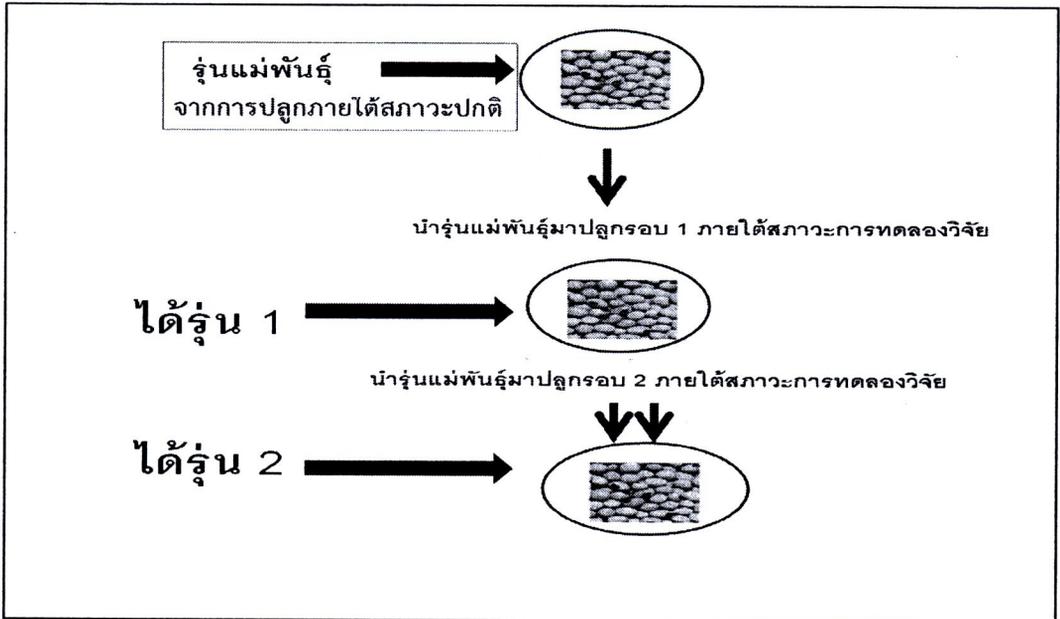
1) การศึกษาจะทำการควบคุมระดับอุณหภูมิที่กำหนด 3 ระดับใน 3 ชุดการทดลอง (3 ซ้ำ) ในแต่ละตู้ทดลอง 5 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งแต่ 10.00-15.00 น.

2) การศึกษาถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 โดยการปลูกในแปลงปลูก กว้าง 17 เมตร ยาว 20 เมตร ระยะห่างระหว่างหลุม 20 เซนติเมตร การทดลองจะเริ่มตั้งแต่การเพาะเลี้ยงต้นกล้าให้มีความสูง 3 เซนติเมตร จากนั้นนำตู้ทดลองมาครอบในแปลงปลูก และเริ่มควบคุมอุณหภูมิตลอดจนถึงช่วงเก็บเกี่ยว ซึ่งเป็นระยะประมาณเวลา 3 เดือน

3) การปลูกใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Completed Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ดังได้อธิบายในหัวข้อ 6.6

4) จำนวนรุ่นของการปลูกวางแผนการศึกษาการปลูกถั่วเหลืองจะปลูกเพื่อให้ได้ผล ในรุ่นที่ 3 โดยกำหนดว่ารุ่นที่ 1 คือเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากแม่พันธุ์ที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ (ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้ขอความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์นี้จากศูนย์วิจัยพืชไร่ วังทอง อ.วังทอง จ.พิษณุโลก) เมื่อนำมาปลูกภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ในรอบการปลูกครั้งที่ 1 จะได้ผลผลิต คือเมล็ดพันธุ์รุ่นที่ 2 และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์รุ่นที่ 2 มาปลูก ในรอบที่ 2 ภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันอีกครั้ง จะได้ผลผลิตครั้งสุดท้ายคือรุ่นที่ 3 ดังภาพที่ 3 ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้จะเน้นศึกษาถั่วเหลืองที่ได้รับผลกระทบภายใต้การปลูกในระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนั้นจะเป็นการทดสอบดัชนีชีวิตต่างๆ ในเชิงสรีรวิทยา ผลผลิต และลักษณะทางพันธุกรรม ในการปลูกของรอบที่ 1 และรอบที่ 2 เท่านั้น





ภาพที่ 3 แสดงวิธีการวางแผนการปลูกเพื่อศึกษาผลกระทบระยะยาวของถั่วเหลือง 2 ระยะการปลูก

6.8 ปัจจัยด้านสภาพภาพในบรรยากาศ

วัดปัจจัยด้านสภาพภาพในบรรยากาศดังนี้

1. ระดับอุณหภูมิ
2. ความชื้นสัมพัทธ์
3. ระดับคาร์บอนไดออกไซด์

6.9 การตรวจสอบดัชนีชี้วัดที่มีต่อถั่วเหลืองในด้านต่างๆ

1) การตรวจสอบ ผลกระทบจากอุณหภูมิในระดับที่ต่างกันที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง

ในการวิจัยกำหนดการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ผล โดยมีปัจจัยซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดผลกระทบในช่วงระยะของอายุถั่วเหลืองในระยะต่าง ๆ ดังนี้

1.1 การเจริญเติบโตทางลำต้น (ความสูง)

วิเคราะห์จากการเจริญเติบโตทางลำต้น โดยวัดความสูง ตามวิธีของสมชาย บุญประดับ, 2543 โดยการวัดทางด้านความสูงที่ระยะ V3, R1, R3, R6, และ R8 ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ 26, 36, 75 และ 89 วัน ตามลำดับ

1.2 ดัชนีพื้นที่ใบ (Leaf area index : LAI)

Leaf area index ระยะ R1, R3, R6 และ R8 ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ 36, 47, 75 และ 89 วัน ตามลำดับ ตามวิธีของ Jones *et al.* (1991) โดยคำนวณได้จากสูตร $LAI = \frac{\text{พื้นที่ใบรวมทั้งหมด}}{\text{พื้นที่ดินที่พืชขึ้นขึ้นอยู่}}$

2) การตรวจสอบ ผลกระทบจากอุณหภูมิในระดับที่ต่างกันที่มีต่อปริมาณรงควัตถุของ ถั่วเหลือง

เก็บตัวอย่างใบที่ระยะ V3, R1, R3, R6 และ R8 ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ 26, 36, 47, 75, และ 89 วันตามลำดับ ตามวิธีของ Yoshida (1976) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุในใบชนิด คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์

3) การตรวจสอบผลกระทบจากอุณหภูมิในระดับที่ต่างกันที่มีต่อผลผลิตถั่วเหลือง

เก็บตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง ที่ระยะ R8 (Full maturity Stage) ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ 89 วัน ตามวิธีของ สมิตรา ปิ่นทองคำ (2533) โดยเลือกองค์ประกอบที่ชี้วัดผลผลิตที่สำคัญ ได้แก่ จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนัก 100 เมล็ด

4) การตรวจสอบผลกระทบจากอุณหภูมิในระดับที่ต่างกันที่มีต่อคุณภาพสารอาหารของผลผลิตในเมล็ดถั่วเหลือง 2 รอบการปลูก

เก็บตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองจากระยะ R8 และนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยการวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใย และความชื้น ตามวิธีของ AOAC, 1995

6.10 วิเคราะห์ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม ใช้เทคนิคด้วยวิธี AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ในใบอ่อน 2 ครั้ง ใน 2 รอบการปลูก ของถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์คือ ในการปลูกครั้งที่ 1 และการปลูกครั้งที่ 2 ดังรายละเอียด

1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Phenotype) ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์ถั่วเหลือง ที่ใช้ในการทดลองโดยเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละสายพันธุ์โดยเลือกเก็บจากตัวอย่างในระยะเก็บเกี่ยว จำนวน 2 generations

2) วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบถั่วเหลือง

2.1 การเตรียมอุปกรณ์ : นำโกร่ง (mortar) และสาก (pestle) แช่ในตู้เย็น -80°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2.2 นำสารละลาย 1.5X CTAB (dilute จาก 3X CTAB) ต้มในน้ำเดือด 10 นาที

2.3 นำตัวอย่างใบถั่วเหลืองมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งที่เตรียมไว้ เติม liquid nitrogen จนท่วมตัวอย่าง แล้วบดให้ละเอียด ตักใส่หลอด 1.5 ml ประมาณครึ่งหลอด

2.4 เติม 1.5X CTAB 700 μl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C ประมาณ 1 ชั่วโมง

2.5 เติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) ลงในหลอดตัวอย่าง ในอัตราส่วน 1 : 1 ผสมเบาๆ ให้เข้ากันนาน 20 นาที

- 2.6 นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ดึงส่วนใสด้านบนใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่
- 2.7 เติม 10% CTAB 1/10 เท่า (ของปริมาตรของสารที่ดึงมาได้) และ Chloroform : Isoamyl (24 : 1) 1 เท่า (ของปริมาตรของสารที่ดึงมาได้) ผสมให้เข้ากันนาน 20 นาที นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm 15 นาที
- 2.8 ย้ายส่วนบนใสในหลอด 1.5 ml (จะได้สารละลายประมาณ 400 μ l) เติม CTAB precipitation (dilute จาก 4X CTAB เป็น 1X CTAB) 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 20 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง พยายามอย่าให้ตะกอนตกลงมาด้วย
- 2.9 เติม 1M NaCl 500 μ l ละลายตะกอนที่อุณหภูมิ 37 oC นาน 2 – 3 ชั่วโมง
- 2.10 เติม 95% EtOH ที่แช่เย็นจัด ประมาณ 2 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ จะเห็น DNA จับตัวเป็นก้อน นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง
- 2.11 เติม 70% EtOH 500 μ l กลับหลอดขึ้น-ลง 2-3 ครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm 5 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
- 2.12 เท EtOH ออกให้หมด ทำให้ตะกอนแห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 oC เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ให้ละลายตะกอนด้วย dH₂O ประมาณ 100 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 oC นาน 1 ชั่วโมง หรือจนตะกอนละลายหมด เก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ในตู้เย็น จนกระทั่งถึงเวลาที่จะนำมาใช้งาน
- 2.13 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

4X CTAB	500	ml
CTAB	20	g
1M Tris-Cl pH 8.0	20	ml
0.5 M EDTA pH 8.0	8	ml
เติม d H ₂ O ให้ครบ	500	ml

3X CTAB (500 ml)		
CTAB	15	g
1M Tris-Cl pH 8.0	75	ml
0.5 M EDTA pH 8.0	30	ml
5M NaCl	210	ml
เติม d H ₂ O ให้ครบ	500	ml

