

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างดินเพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท

เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มเพื่อนำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จำนวน 6 จุด คือ ดินบริเวณตึกโดม ดินแปลงนาข้าวบริเวณตึกโดม ดินบริเวณป่าข้างตึกวิทยบริการ ดินบริเวณนาข้าวข้างหอพักอินทนิล ดินบริเวณแปลงทดลองข้างตึกโดม และดินบริเวณฟาร์มโคนม โดยใช้พลั่วตักดินเกลี่ยผิวหน้าดินออกเล็กน้อย ตักดินที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร ใส่ถุงพลาสติก รัดปากถุง บันทึกแหล่งที่เก็บและลักษณะดินที่เก็บ จากนั้นนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำดินตัวอย่างที่แห้งมาบดให้ละเอียด ละลายดินด้วยน้ำกลั่นในขวดเก็บตัวอย่าง ปิดฝาแล้วเขย่า ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาทีให้ดินตกตะกอน นำส่วนใสมาวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.2 วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดิน

ศึกษาวิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากดิน โดยเปรียบเทียบวิธีการในการแยก 3 วิธีการ

วิธีที่ 1 นำตัวอย่างดินมาตากไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำดินที่ตากไว้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด แล้วเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจางที่เหมาะสม

วิธีที่ 2 เจือจางตัวอย่างดินที่ความเจือจาง 1:10 ในสารละลายผสมของ yeast extract ความเข้มข้น 6% และ SDS ความเข้มข้น 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 40°C นาน 20 นาที จากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งได้ความเจือจางที่เหมาะสม (Nonomura และ Hayakawa, 1988)

วิธีที่ 3 แช่ตัวอย่างดินที่ความเจือจาง 1:10 ด้วยสารละลาย phenol ความเข้มข้น 1.5% นาน 30 นาที ที่ 30°C จากนั้นเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งได้ความเจือจางที่เหมาะสม

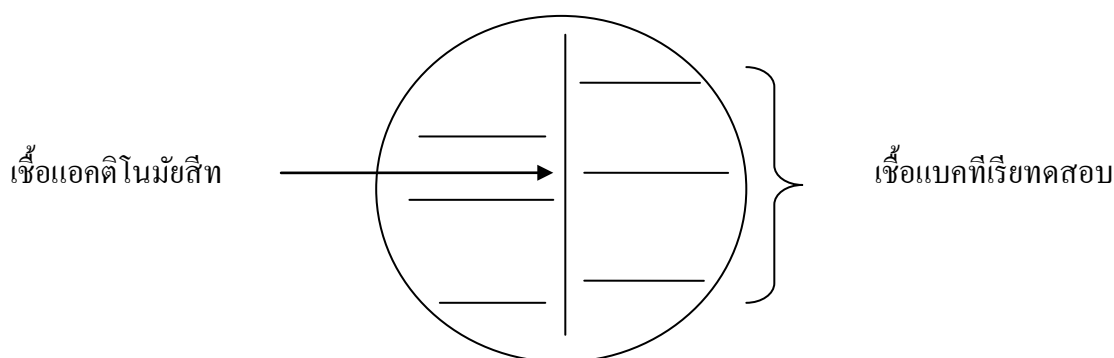
จากนั้นนำตัวอย่างดินที่เตรียมไว้ด้วยวิธีการทั้ง 3 วิธี ปริมาณ 0.1 ml ที่ระดับความเจือจางต่างกัน มาทำการ spread plate บนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ starch casein agar (SCA), Oat meal (OMA) และ Humic acid-salts-vitamin agar (HVA) ที่เติมยา nystatin 50 µg/ml และ nalidixic 20 µg/ml เกลี่ยจนกระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน ทำการตรวจหาเชื้อแอคติโนมัยสีท โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแห้ง ด้าน เป็นปุยคล้ายกำมะหยี่ มีเส้นใยเหนือผิวอาหาร และมีเส้นใยใต้ผิวอาหารฝังแน่นในจานอาหารแข็ง คัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยนำมาโคโลนีที่คัดเลือกล้างบนอาหาร ISP-2 agar ซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งได้เชื้อแอคติโนมัยสีทที่บริสุทธิ์

จากนั้นทำการย้อมแกรม เพื่อดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นใย หรือเลือกลักษณะของแอคติโนมัยสิท เก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงในอาหารวุ้นแข็ง ISP2 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อ และทำการเก็บรักษาสายพันธุ์แอคติโนมัยสิทโดยเก็บรักษาโคโลนีบริสุทธิ์ของแอคติโนมัยสิทในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 % ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ -20 °C หรือ -80 °C

3.3 การคัดกรองความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเบื้องต้น

3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Cross streak

ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยการ streak บนอาหาร Glucose yeast extract agar (GYA) ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อแอคติโนมัยสิทเจริญ นำเชื้อที่ต้องการทดสอบซึ่งประกอบด้วย Clinical ได้แก่ *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, Coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS), *A. baumannii* และ Labstrains ได้แก่ *Salmonella* sp., *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *Klebsiella* sp., *S. cerevisiae* มา streak ในแนวตั้งฉากกับแนวการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสิทเดิม 1 มม. (ภาพที่ 3.1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณที่ยับยั้ง (Inhibition zone) ของจุลินทรีย์ทดสอบ คัดเลือกแอคติโนมัยสิทที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยพิจารณาจากความกว้างของบริเวณยับยั้ง จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยสิทไอโซเลตที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Malt Broth (YM broth) และ Bennet's broth เพื่อทดสอบฤทธิ์โดยวิธี disc diffusion ต่อไป



ภาพที่ 3.1 ลักษณะการขีดเชื้อเพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

3.3.1.1 ทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method

เลี้ยงแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว Yeast Malt Broth (YM broth) และ Bennet's broth ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที นาน 14 วัน ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion method โดยละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบในสารละลาย 0.85% NaCl ปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้ไม้พ่นสำลี (นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว) จุ่มแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ กวาดลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) ให้ทั่วจาน โดยกวาดซ้ำ 3 ระบาย ทั้งให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จึงหยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทเหลวปริมาตร 40 μ L ลงบนกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มม. นำมาวางบนอาหาร NA ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นทดสอบ ถ้าพบวงใสเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดนั้นสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Agar plug

เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลต โดยนำมาฉีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP2 ละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบใน 0.85% NaCl ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5 ใช้ไม้พ่นสำลีที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วจุ่มแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แล้วกวาดลงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) ให้ทั่วจาน โดยกวาด 3 ระบาย ทั้งให้ผิวหน้าแห้ง ใช้ปากคีบ คีบชิ้นวุ้นที่เจาะ มาวางบนอาหาร NA ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแอคติโนมัยสีท ถ้าพบวงใสเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทชนิดนั้นสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยสีทไอโซเลตที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี Agar plug มาสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate โดยเลี้ยงฉีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารแข็ง ISP2 ใช้ปากคีบ คีบชิ้นวุ้นที่เจาะไว้จำนวน 3 ชิ้นถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Broth (YM broth) ปริมาตร 100 มล. เขย่าด้วยเครื่องเขย่า Rotatory Shaker 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Broth (YM

broth) มาปั่นแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน ด้วยความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที สกัดส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต โดยใช้กรวยแยก โดยใช้ปริมาตรเอทิลอะซิเตตต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เก็บสารสกัดของชั้นเอทิลอะซิเตตไว้ นำส่วนของเส้นใยที่จากการปั่นแยกออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อนั้น มาบดด้วยโกร่งบดยาเพื่อให้เซลล์แตกจากนั้นสกัดเส้นใยด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 30 มล. เก็บชั้นของเอทิลอะซิเตตไว้ เปรียบเทียบสารสกัดส่วนที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนที่ได้จากเส้นใยที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนที่ได้จากเส้นใย ระบุเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 35 °C จนสารสกัดแห้ง ละลายตะกอนสารด้วยสารละลาย 20% DMSO ปริมาตร 3 มล. เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C เพื่อนำไปทดสอบการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบต่อไป

3.3.2.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method

ละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบใน 0.85% NaCl ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่นิ่งมาเชื้อแล้วจุ่มแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แล้วกวาดลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) ให้ทั่วจาน โดยกวาดซ้ำ 3 ระบายทิ้งให้ผิวหน้าแห้ง หยดสารสกัดปริมาตร 40 µL ลงบนกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มม. แล้วนำมาวางบนอาหาร NA ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆแผ่นทดสอบ ถ้าพบวงใสเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดนั้นสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมา

3.3.2.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Agar well

ละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบใน 0.85% NaCl ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 ใช้ไม้ปั่นสำลีที่นิ่งมาเชื้อแล้วจุ่มแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แล้วกวาดลงบนอาหาร Muller Hinton agar (MHA) ให้ทั่วจาน โดยกวาด 3 ระบายทิ้งให้ผิวหน้าแห้ง ใช้ cork borer เจาะลงบนจานอาหารแข็ง MHA แล้วนำชิ้นวุ้นออก หยดสารสกัดปริมาตร 80 µL ลงในหลุมที่เจาะไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงวัดผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

3.3.2.3 การหาค่า MIC ของสารสกัดด้วยวิธี Broth microdilution

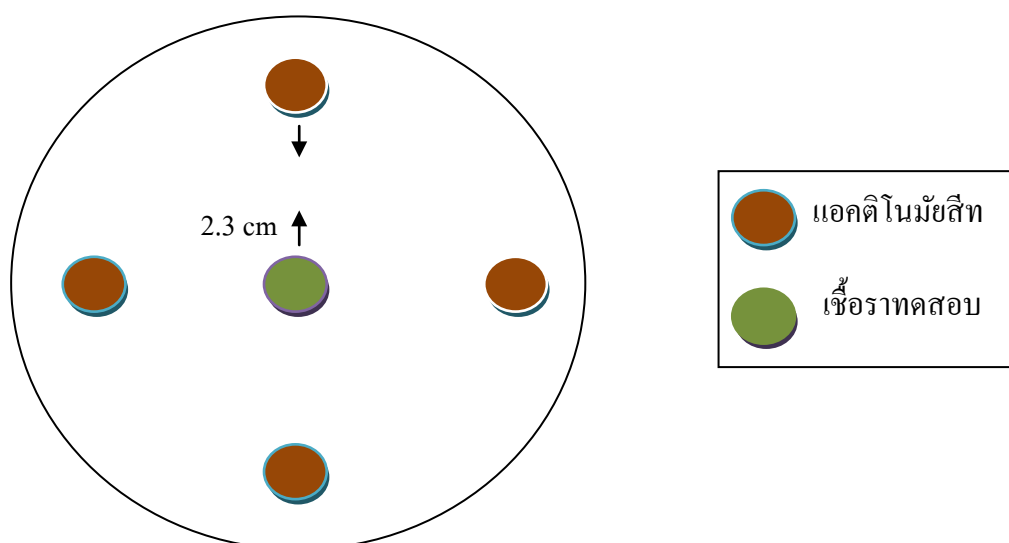
เติมอาหาร Muller Hinton Broth (MHB) ลงใน microtiter plate (96 well plate) ปริมาตรหลุมละ 50 µL เจือจางสารสกัดหยาบแบบ 2-fold dilution ในอาหาร MHB (หลุมละ 50 µL) ใน microtiter plate (96 well plate) ให้ได้เป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 เตรียมเชื้อทดสอบให้มีความขุ่น McFarland no.0.5 (10^8 cfu/ml) จากนั้นเจือ

จาก 1:100 (10^6 cfu/ml) เพื่อเติมในหลุมสารละลายยาเชื้อจากหลุมละ 50 μ L (5×10^4 cell/well) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C 16-18 ชั่วโมง สังเกตการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละหลุมและบันทึกผล

3.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านเชื้อรา โดยวิธี Dual culture

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคพืชบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน และเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนจานอาหารแข็ง YM หรือ ISP2 เป็นเวลา 3-7 วัน จากนั้นใช้ Cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะเชื้อราก่อโรคพืชบนอาหารแข็ง PDA ที่มีอายุ 7 วัน โดยเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา และใช้ Cork borer เจาะแอคติโนมัยสีทที่โตบนอาหารแข็งที่มีอายุ 5 วัน ใช้เข็มเย็บเชื้อเชื้อขึ้นวุ้นที่มีเชื้อราทดสอบจำนวน 1 ชิ้น วางลงตรงจุดกึ่งกลางบนอาหาร PDA agar ด้านตรงข้ามเชื้อราทั้งสี่ด้านของจานอาหารใช้เข็มเย็บขึ้นวุ้นที่มีเชื้อแอคติโนมัยสีท วางตรงข้ามกับเชื้อรา ห่างจากเชื้อราทดสอบ 2.3 ซม. (ดังภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี Dual culture

บ่มจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเจริญปกคลุม (over-growth) โคโลนีเชื้อราเป็นเวลา 5 วัน บันทึกระยะกว้างของรัศมีโคโลนีของเชื้อราโรคฟิชที่เติบโตจากจุดที่เพาะไปจนถึงขอบโคโลนีแนวที่ถูกยับยั้ง และบันทึกระยะกว้างของรัศมีโคโลนีจากจุดที่เพาะไปจนถึงขอบโคโลนีของเชื้อราโรคฟิชในจากควบคุม จากนั้นนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{สูตรการคำนวณคือ \% ยับยั้งการเจริญ} = (R1-R2) \times 100 / R1$$

โดย R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ

3.4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดด้วยวิธี disc diffusion method

หยดสารสกัดปริมาตร 40 μL ลงบนกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 มม. ทิ้งไว้ 15 นาที ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะลงบนโคโลนีของเชื้อราทดสอบ ใช้ปากคีบคีบชิ้นวุ้นที่เจาะ มาวางบนอาหาร PDA โดยวางเชื้อราทดสอบไว้ตรงกลาง และวางกระดาษกรองที่มีสารสกัดของเชื้อแอคติโนมัยสิท ห่างจากเชื้อราทดสอบเป็นระยะ 2.3 มม. (ภาพที่ 3.2) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบวันที่ 5 หลังจากวันที่ทำการทดลอง บันทึกบริเวณการยับยั้ง

3.5 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้

3.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการแบ่งกลุ่มโดยใช้ลักษณะสีโคโลนี สีสปอร์ ลักษณะเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และการสร้างสารสี โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยสิทบนอาหาร ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกลักษณะโคโลนี สีสปอร์ ลักษณะเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ และการสร้างสารสี เริ่มการทดลองโดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อลากเชื้อแอคติโนมัยสิทลงบนอาหาร ISP2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วันแล้วใช้ปากคีบคีบกระຈกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปักลงบนบริเวณรอยลากที่เชื้อมีการเจริญ จากนั้นบ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วันเมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วสร้างสปอร์ใช้ปากคีบคีบกระຈกปิดสไลด์ออกมาเชื่อมด้วยสี crystal violet ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่าโดยให้ไหลผ่านเบาๆ เพื่อไม่ให้สปอร์หลุดออกมา ชั้บกระຈกปิดสไลด์ให้แห้ง นำไปศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อและสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะของเส้นใยและสปอร์

3.5.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอในอาหาร ISP1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำเซลล์แอคติโนมัยซีท 4 มล. มาปั่นเหวี่ยงที่ (12,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก ล้างด้วย 500 μ L TE buffer นำไปปั่นเหวี่ยงที่ (12,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก เติม 500 μ L TE buffer แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกจากตู้เย็น -80°C ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวไปต้มเป็นเวลา 20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เป็นเวลา 5 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ (12,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใส 300 μ L ใส่ในหลอดที่สะอาด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อเป็น template สำหรับปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain- Reaction (PCR) โดยนำ DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาผสมกับ reaction mixture PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM MgCl_2 , 200mM dNTP, ใช้ Taq polymerase (2U/ml;Sigma-Aldrich) 1 มิลลิลิตร, universal primer 1525r 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') และ 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) (10 pM) แล้วนำ PCR เข้าโปรแกรม ประกอบด้วย pre-denaturation ที่ 95°C 5 นาที หลังจากนั้นสำหรับ denaturation at 95°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 52°C เป็นเวลา 40 วินาที elongation ที่ 72°C เป็นเวลา 90 วินาที รวมทั้งหมด 25 รอบ และ post-elongation ที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบ ผลผลิต PCR ใน 1% agarose gel ด้วยวิธี electrophoresis