อุปกรณ์และวิธีการ

1. แบคทีเรียเปรียบเทียบ

แบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* KY9002 (Wild type) สำหรับเปรียบเทียบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี และ *Corynebacterium glutamicum* KY9714 (Lysozyme and temperature-sensitive mutant) สำหรับเปรียบเทียบการสร้างกรดกลูตามิค ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ได้รับมาจาก Prof. K. Matsushita มหาวิทยาลัย Yamaguchi ประเทศญี่ปุ่น

2. การเก็บตัวอย่าง ชนิด และลักษณะของตัวอย่างที่เก็บ

เลือกเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะแห้ง ร่วน ไม่เปียกชื้น บันทึกสถานที่เก็บ และลักษณะของตัวอย่าง โดยชนิดตัวอย่างที่เก็บมีดังนี้

2.1 มูลสัตว์ปีก และมูลสัตว์ปีกปนดิน
- 2.1.1 มูลไก่
- 2.1.2 มูลเป็ด
- 2.1.3 มูลนก

2.2 ดิน

2.3 ปุ๋ย เช่น ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก เป็นต้น

2.4 อื่นๆ เช่น พืชผักผลไม้ เป็นต้น

3. การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* กลุ่มที่ผลิตกรดกลูตามิค

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* เบื้องต้นโดยใช้ลักษณะโคโลนี

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 0.5 กรัมใส่ลงในอาหารเหลว D2 (Atlas, 1995) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม nalidixic acid (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ NaN_3 (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ภาคผนวก ก) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาทำให้มีความเจือจางที่เหมาะสม โดยได้ปิเปตซัสเพนชั่นของตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ความเจือจาง 10 เท่า; 1: 10) ปิเปตซัสเพนชันที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตรลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง D2 ที่เติม nalidixic acid (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ NaN_3 (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ภาคผนวก ก) เกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเชื้อ สังเกตลักษณะโคโลนีที่ขึ้นทุกวัน เลือกโคโลนีขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อนที่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* ใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อเก็บโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวลงบนอาหารแข็ง A1 (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบในข้อ 3.2 ต่อไป

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Corynebacterium* ในขั้นที่สองโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการติดสีแกรม

นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง A1 จากข้อ 3.1 มาย้อมแกรม และสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus model CHK) เปรียบเทียบการติดสี และลักษณะรูปร่างการเรียงตัวของเซลล์กับ *Corynebacterium glutamicum* KY9002 (แบคทีเรียเปรียบเทียบ) ซึ่งติดสีแกรมบวก มีรูปร่างไม่แน่นอนไม่สร้างสปอร์ การเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่รูปตัววีหรือเป็นกลุ่มเรียงตัวต่อกันเป็นรั้ว นำไป restreak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ลงใน A1 slant ฝาเกลียวเททับด้วยพาราฟินเหลวปราศจากเชื้อ เพื่อใช้เป็น stock culture และเก็บลงใน A1 slant

3.3 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* โดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี

การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* โดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

3.3.1 ระดับจีนัส

การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (Gelatin liquefication test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา18-24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nutrient gelatin medium (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการแข็งของอาหาร เมื่อนำหลอดไปแช่ในตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาทีเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ใส่เชื้อ ถ้าอาหารมีลักษณะเหลว แสดงว่า สามารถย่อยเจลาติน ให้ผลเป็นบวก

3.3.2 ระดับสปีชีส์

3.3.2.1 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Urease test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงลงบนอาหาร Christensen's urea agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพูบานเย็น แสดงว่า สร้างเอนไซม์ยูรีเอส ให้ผลเป็นบวก

3.3.2.2 การทดสอบการย่อยเอสคูลิน (Esculin hydrolysis test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงลงบนอาหาร esculin hydrolysis (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเทาเป็นสีดำ แสดงว่าสามารถย่อยเอสคูลิน ให้ผลเป็นบวก

3.3.2.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงลงในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต (ภาคผนวก ก) เช่นน้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส แมนโนส ฟรุกโตส กาแลกโตส และแลกโตส เป็นต้น บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าสามารถสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต ให้ผลเป็นบวก

3.3.2.4 การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate reduction test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงลงในอาหาร Nitrate medium (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยหยด Sulfanilic acid 2-3 หยดและ α-napthylamine 2-3 หยด สังเกตการเกิดสีแดงปนตะกอน แสดงว่าสามารถรีดิวซ์ไนเตรตจึงให้ผลบวก แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไป ถ้าไม่เกิดสี แสดงว่ามีไนเตรตให้ผลเป็นบวก

3.3.2.5 การทดสอบ MR (MR test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงลงในอาหาร MR-VP (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยหยด methyl red 2-3 หยด สังเกตการเกิดสีแดง แสดงว่าการทดสอบให้ผลเป็นบวก

3.3.2.6 การทดสอบการย่อยเคซีน (Casein digestion test)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบน A1 slant เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (point inoculum) ลงบนอาหาร Sodium caseinate agar (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเกิดวงใสที่เกิดขึ้นรอบๆโคโลนี แสดงว่าสามารถย่อยเคซีน ให้ผลเป็นบวก

3.3.2.7 การทดสอบการเจริญที่ pH 6.0 (Growth at pH 6.0)

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญในอาหารเหลว A1 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารเหลว A1 ที่ปรับ pH เป็น 6.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญเป็นเวลาประมาณ 4-5 วัน เมื่อสังเกตพบการเจริญ ให้ผลเป็นบวก

3.3.2.8 การทดสอบการเจริญในอาหารที่มีกรดแลกติก และกรดซักซินิกเป็นแหล่งคาร์บอน

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญในอาหารเหลว A1 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารเหลว Minimal medium ที่มีกรดแลกติกและกรดซักซินิก (ภาคผนวก ก) เป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญเป็นเวลาประมาณ 4-5 วัน เมื่อสังเกตพบการเจริญ ให้ผลเป็นบวก

3.3.2.9 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญในอาหารเหลว A1 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารเหลว A1 medium (ภาคผนวก ก) เป็นแหล่งคาร์บอน เขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญเป็นเวลาประมาณ 4-5 วัน เมื่อสังเกตพบการเจริญ ให้ผลเป็นบวก

ผลการทดสอบที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของทั้ง 4 สปีชีส์ คือ *C. glutamicum, C. callunae, C. ammoniagenes* และ *C. efficiens* ที่รวบรวมจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่มที่ 2 และ Fudou *et al.,* 2002

3.4 การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Corynebacterium* โดยใช้การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA

นำไอโซเลตทั้งหมดที่ผ่านขั้นตอนข้อ 3.3 ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส และจัดจำแนกโดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้กับข้อมูลจากฐานข้อมูล โดยการวิเคราะห์ได้ส่งให้กับหน่วยบริการจัดจำแนกแบคทีเรีย หน่วยปฏิบัติการ KU-Vector ศูนย์พัฒนา และถ่ายทอดเทคโนโลยีรัฐร่วมเอกชน (ศรอ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ขั้นตอนของการหาลำดับเบสอย่างคร่าวๆ มีดังนี้ ทำการเพิ่มจำนวน16S rDNA จาก genomic DNA โดยเทคนิค polymerize chain reaction (PCR) ใช้ primer 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1389R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') แทน M ด้วย A หรือ C เมื่อได้ PCR product ขนาด 1362 bp นำไปทำปฏิกิริยา sequencing ซึ่งอาศัย

หลักการ dideoxy chain terminating method ของ Sanger คือใช้ 2', 3'-dideoxyribonucleotide (ddNTP) 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP และ ddCTP) ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรเซนต์สี่สีที่ต่างกัน และ primer ที่ใช้ คือ 520 F (5'-ATTGGATCCCAGCMGCCGCGGTAA-3') แทน M ด้วย A หรือ C เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยาแล้ว นำ DNA ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำไปทำอิเลกโทรโฟรีซีสด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (DNA sequencer (ABI 377)) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบลำดับเบส และแก้ไขให้ถูกต้องโดยใช้โปรแกรม DNASIS V3.7 นำลำดับเบสในส่วนของ variable ความยาวประมาณ 550 เบสไปใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA จากฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTn สำหรับฐานข้อมูลที่ใช้เปรียบเทียบ เช่น GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และ DDBJ (http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome.html.) เป็นต้น

4. <u>การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง</u>

นำไอโซเลตจากข้อ 3.4 มาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 35, 37, 39, 40, 41, 42, 43 และ 45 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อที่เจริญใน A1 slant เป็นเวลา 24 ชั่วโมงลงในอาหารเหลว A2 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น วัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Jenway รุ่น 6405 UV/Vis) ถ่ายใส่อาหารเหลว A2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.2 นำไปเขย่าที่ 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35, 37, 39, 40, 41, 42, 43 และ45 องศาเซลเซียสด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Bio-Shaker รุ่น BR-300L) เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้สายตาเทียบกับหลอดควบคุม บันทึกผลเป็น +++ เมื่อมีการเจริญดี, ++ เมื่อมีการเจริญปานกลาง, + เมื่อมีการเจริญน้อย และ – เมื่อไม่มีการเจริญ เลือกไอโซเลตที่มีการเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสมาทดสอบในข้อ 5 ต่อไป

5. <u>การศึกษาคุณสมบัติทางด้านการเจริญ และการสร้างกรดกลูตามิคของแบคทีเรีย *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้</u>

5.1 การเลี้ยงเชื้อ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว A1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น วัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ถ่ายใส่อาหารเหลว A2 ซึ่งเป็นอาหารสำหรับการสร้างกรดกลูตามิค ปริมาตร 250 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร โดยปรับให้ค่า OD_{600} เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 นำไปเขย่าที่ 220 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 41, 42 และ 43 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนั้นๆ เจริญได้จากข้อ 4) เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงต่างๆ นำมาวัดการเจริญและวิเคราะห์กรดกลูตามิคในอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 5.2

5.2 การวัดการเจริญ และวิเคราะห์กรดกลูตามิคในอาการเลี้ยงเชื้อ

5.2.1 การวัดการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

5.2.2 การวิเคราะห์การสร้างกรดกลูตามิค โดยวิธี paper chromatography (ภาคผนวก ข) ซึ่งการวิเคราะห์ใช้ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยเครื่องแยกสารแบบปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Sigma รุ่น 1-15K sartorius) ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

6. <u>การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Corynebacterium* สายพันธุ์ทนอุณหภูมิสูงโดยใช้เทคนิค Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)</u>

6.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี phenol/chloroform (Ausubel *et al*., 1995)

6.1.1 ละลายเซลล์ใน TE buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

6.1.2 เติม 50 mg/ml lysozyme ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

6.1.3 เติม 20 mg/ml proteinase K ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 10% SDS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 100 mg/ml RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6.1.4 เติม 5M NaCl (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.1.5 เติม 10% CTAB/0.7 M NaCl (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 55 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.1.6 เติม chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

6.1.7 นำเฉพาะส่วนใสถ่ายใส่ eppendrof ใหม่ ทำซ้ำข้อ 6.1.6

6.1.8 เติม phenol/chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

6.1.9 นำเฉพาะส่วนใสถ่ายใส่ eppendrof ใหม่

6.1.10 เติม isopropanal ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนใส

6.1.11 ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

6.1.12 ทำซ้ำข้อ 6.1.11

6.1.13 ทิ้งส่วนใส และทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

6.1.14 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสำหรับการเก็บในระยะเวลาสั้นหรือ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับการเก็บในระยะเวลานานขึ้น

6.2 การเพิ่มจำนวนส่วนของ 16S rDNA โดยวิธี PCR (Amplification 16S rDNA by PCR)

6.2.1 การทำ PCR 1 reaction ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Ex-*Taq* polymerase (TAKARA)	0.25	ไมโครลิตร
10x Ex-*taq* buffer (TAKARA)	5.0	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP mixture (TAKARA)	4.0	ไมโครลิตร
10 pmol/µl 27F และ 1389R primers	5.0 , 5.0	ไมโครลิตร
DNA template solution	5.0	ไมโครลิตร
Steriled DDW	25.75	ไมโครลิตร

Forward primer คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ reverse primer คือ 1389R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') แทน M ด้วย A หรือ C ซึ่ง primers นี้เป็น universal primers สำหรับ eubacteria ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ 16S rDNA

6.2.2 ตั้งโปรแกรม PCR-thermal cycler ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยรอบดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ใช้จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

6.2.3 นำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR-thermal cycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research) และเก็บตัวอย่างเมื่อครบเวลา เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ ในน้ำแข็ง

6.2.4 ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose 1 เปอร์เซ็นต์

6.3 การตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis

6.3.1 ละลาย agarose 1 กรัม ด้วย 0.5x TBE buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดด้วย wrap ให้ความร้อนจากไมโครเวฟจนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส

6.3.2 แล้วเทเจลลงบน tray ที่เสียบหวี โดยให้มีเจลความหนา 3-5 มิลลิเมตร รอจนกระทั่งแข็ง ประมาณ 30-45 นาที ค่อยๆเอาหวีออกจากเจล แล้วนำเจลไปแช่ไว้ใน electrophoresis tank ที่บรรจุ 0.5x TBE buffer

6.3.3 เตรียมตัวอย่างบนแผ่น parafilm ประกอบด้วย PCR product 2 ไมโครลิตร 6x loading buffer (TAKARA) 1 ไมโครลิตร และ 0.5x TBE buffer 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ mixture ลงในแต่ละหลุมของเจลและใส่ size standard marker (λ*Hind*III +ϕX174 *Hae*III digest, Promega) ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอความยาวตั้งแต่ 310, 603, 872, 1078, 1353, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 และ 23130 bp ตามลำดับ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในตำแหน่งหลุมแรกหรือ/และหลุมสุดท้ายของเจล หลังจากนั้นปิดฝา tank และเปิดเครื่องที่ความต่างศักย์ 100 V รอจนกระทั่งไม่มีแถบสีส้มปรากฏบนเจล ประมาณ 30 นาที ปิดเครื่อง

6.3.4 ทำการย้อมเจลโดยแช่ใน 0.5 µg/ml Ethidium bromide (Nacalai Tesque) ประมาณ 15-30 นาที ย้ายเจลลงในน้ำประมาณ 5 นาที ตรวจสอบแถบ PCR product ที่เกิดขึ้นซึ่งคาดว่า ควรมีความยาวประมาณ 1362 bp ภายใต้แสง ultraviolet ด้วยเครื่อง UV-transilluminator (Bioinstrument-ATTO,Yamato) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำให้สามารถเห็นแถบของดีเอ็นเอ

6.4 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (PCR purification) โดยใช้ MiniElute PCR purification kit (QIAGEN) ซึ่งมีขั้นตอนการใช้ตามคู่มือที่แนบมาจากบริษัทผู้ผลิต ดังนี้

6.4.1 เติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่าของ PCR product (PCR product 48 ไมโครลิตร ใส่ PB buffer 240 ไมโครลิตร)

6.4.2 ใส่ตัวอย่างทั้งหมดลงในคอลัมน์ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ DNA เกาะ ทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์

6.4.3 เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง ทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ และ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง ย้ายคอลัมน์ลงใน eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6.4.4 เติม EB buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางเมมเบรน ทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์

6.5 การตัดโมเลกุล 16S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Digestion with restriction enzyme)

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่นิยมใช้ในการหาความหลากหลายจะเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส (4 base cutter) ในการทดลองนี้ใช้ เอนไซม์ *Hha*I (GCG/C) และ *Hae*III (GG/CC)

6.5.1 สำหรับการตัด purified PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใน 1 reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10x M buffer (TAKARA)	2.0	ไมโครลิตร
10 U/μl *Hha*I หรือ *Hae*III (TAKARA)	0.5	ไมโครลิตร
Steriled DDW	7.5	ไมโครลิตร
purified PCR product	10.0	ไมโครลิตร

6.5.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.5.3 ตรวจสอบรูปแบบที่ได้จากการตัดด้วย agarose gel electrophoresis ดังในวิธีข้อ 6.3 โดยใช้ agarose 3 เปอร์เซ็นต์ และใช้ ตัวอย่าง 12 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading buffer (TAKARA) 2.5 ไมโครลิตร และ 0.5x TBE buffer 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ mixture ลงในแต่ละหลุมของเจล และใส่ size standard marker (λ*Hind*III + ϕX174 *Hae*III marker, Promega) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในตำแหน่งหลุมแรกหรือ/และหลุมสุดท้ายของเจล ปิดฝา tank เปิดเครื่องที่ความต่างศักย์ 100 V รอจนกระทั่งไม่มีแถบสีน้ำเงินปรากฏบนเจล เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทำการย้อมเจลโดยแช่ใน Ethidium bromide (0.5 μg/ml) ประมาณ 15-30 นาที ย้ายเจลลงในน้ำ

ประมาณ 5 นาที ตรวจสอบแถบที่เกิดจากการตัด purified PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะภายใต้แสง ultraviolet