หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

1. อุปกรณ์การศึกษา

1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างและศึกษาสมบัติทางกายภาพของดิน

1. กล้องถ่ายรูป
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
3. ตู้กำจัดความชื้น
4. ตู้อบ
5. เตาเผาอุณหภูมิสูง 1100^{0}c
6. ถุงพลาสติกใสขนาด 6x10 นิ้ว
7. ถ้วยกระเบื้อง
8. พลั่วขุดดิน
9. พีเอชมิเตอร์
10. เออร์เลนเมเยอร์ฟลาส

2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง

1. เข็มเขี่ยเชื้อ
2. เครื่องเขย่าสาร
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า
4. จานเลี้ยงเชื้อ
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. ตู้บ่มเชื้อ
7. ตู้อบ
8. ตู้เขี่ยเชื้อ
9. หลอดดักก๊าซ
10. หลอดทดลอง
11. ห่วงเขี่ยเชื้อ
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า
14. Acetone
15. Acid fuchsin
16. Agar
17. Alpha naphthol
18. Ammonium oxalate
19. Arabinose
20. Beef extract
21. Bacto-peptone
22. Bromthymol blue
23. Carbon fuchsin
24. Crystal violet

25. Dextrose
26. Dimethyl-alpnaphthylamine
27. Dipotassium phosphate
28. Disodium phosphate
29. DL-Phenylalanine
30. 95% Ethyl alcohol
31. Ferric chloride
32. Gelatin
33. Glucose
34. Iodine
35. Magnesium sulfate
36. Malachite green
37. Mannitol
38. Methyl red
39. Methylene blue
40. Monoammonium phosphate
41. Phenol red
42. Potassium iodine
43. Potato dextrose medium
49. Potassium nitrate
50. Polypeptone, buffer peptone
51. Potassium hydroxide pellets
52. Safranine
53. Sodium citrate
54. Sodium chloride
55. Sodium hydroxide
56. Sulfanilic acid
57. Starch
58. Soytone peptone
59. Trypticase
60. Tryptose
61. Urea
62. Xylose
63. Yeast extract
64. Zinc dust

1.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

1. ชุดทำ electrophoresis แบบ Horizontal
2. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette)
3. เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า
5. ตู้แช่แข็ง (-20°c)
6. Ammonium per sulphate
7. Agarose
8. Bromphenol blue
9. Chloroform
10. CTAB
11. Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)
12. Ethidium Bromide
13. EDTA
14. 99.5% Ethanol
15. Glycerol
16. Isoamyl alcohol

17. $MgCl_2$
18. Oligonucleotide primer
19. PCR Machine
20. 10xPCR buffer
21. Phenol
22. Microtube
23. Microcentrifuge
24. Tris (hydroxy methyl Aminomethane)
25. Sodium Acetate
26. Rnase-A
27. Spectrophotometer
28. Taq Gold DNA polymerase
29. TEMED (Tetramethyl etherlene diamine)
30. UVP-Transilluminator
31. Xylenecyanol

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การศึกษาจำนวนแบคทีเรียจากดินในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน และศึกษาสมบัติทางกายภาพของดิน

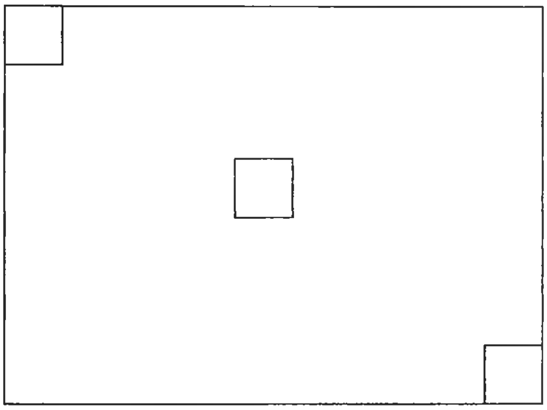
1.1.1 แหล่งของ *B. subtilis* ได้จากดินแหล่งต่างๆ ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ (บ้านป่าสักงาม) ดิน 5 ตัวอย่าง

1. ดินจากแปลงป่าสักธรรมชาติ
2. ดินจากแปลงป่าปลูกฟื้นสภาพ
3. ดินจากแปลงขยายพันธุ์
4. ดินจากแปลง 2
5. ดินจากแปลง 52

เก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 วันที่ 4 ธันวาคม 2542
ครั้งที่ 2 วันที่ 3 มิถุนายน 2543
ครั้งที่ 3 วันที่ 9 ตุลาคม 2543

เก็บดินตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษา 5 แปลง แปลงละ 3 จุด คือบริเวณมุมแต่ละพื้นที่ 2 จุดตรงกันข้ามกัน และกึ่งกลางพื้นที่อีก 1 จุด ที่ช่วงระดับความลึก 7-15 เซนติเมตร



ภาพที่ 1 ตำแหน่งเก็บดินจากพื้นที่แปลงศึกษาตามแนวทะแยงมุม

1.1.2 การวัดค่าความเป็นกรดด่างของดิน (Kim, 1996) ชั่งดินตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในบีคเกอร์ เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง นาน 15 นาที นำไปวัดค่า พีเอช ด้วยเครื่องวัด pH-meter ที่ปรับค่ามาตรฐานด้วย pH buffer 4.01, 7.02 เรียบร้อยแล้ว ทำการวัด 3 ซ้ำ

1.1.3 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของตัวอย่างดิน (Martin, 1993) นำตัวอย่างดินมาชั่งหาน้ำหนักโดยละเอียด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักดินคงที่ แล้วย้ายตัวอย่างดินที่อบจนแห้งมาใส่ใน dessicator รอจนกระทั่งเย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาชั่งแล้วคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น

เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน =
100x[น้ำหนักดินเปียก+porcelain crucible)-(น้ำหนักดินแห้ง+porcelain crucible)]/น้ำหนักดินแห้ง

1.1.4 การหาปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน (Martin, 1993) ชั่งดินตัวอย่าง 2 กรัมจากข้อ 3.2 มาใส่ใน high-form porcelain crucible ซึ่งผ่านการอบแล้ว นำไปเผาที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้ายมาใส่ใน desicator จนกระทั่งเย็นนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณหาปริมาณอินทรีย์วัตถุ ดังนี้

Ash, กรัม/100กรัม = $[(a-c) / (b-c)] \times 100$

a=น้ำหนัก porcelain crucible และ Ash

b=น้ำหนัก porcelain crucible และ ตัวอย่างดินแห้ง

c=น้ำหนัก porcelain crucible หลังเผา

เปอร์เซ็นต์อินทรีย์วัตถุ = 100 - % mineral content (ash)

1.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากดินในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

1.2.1 เตรียมตัวอย่างดินแขวนลอย เข้มข้น 10^{-1} โดยชั่งน้ำหนักดิน 11 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปลอดจากเชื้อปริมาตร 99 มิลลิลิตร เขย่าขวดประมาณ 20 ครั้งทำให้ได้สารแขวนลอยดินเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำให้สารแขวนลอยดินเจือจางเพิ่มขึ้นเป็นชุดๆ ชุดละ 10 เท่า จนได้ความเจือจาง 10^{-6} โดยใช้น้ำกลั่นปลอดจากเชื้อ เป็นของเหลวเจือจาง (Sirokin และ Cullimore, 1969)

1.2.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ใช้ตัวอย่างดินเจือจาง ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5}, และ 10^{-6} มาทำการนับปริมาณแบคทีเรียโดยวิธี dilution pour plate โดยใช้สารแขวนลอยดิน 1 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ใช้ความเจือจางละ 3 ซ้ำ และใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ค) (Sitockin และ Cullimore, 1969) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด บันทึกและแปรผลการทดลอง

2. การศึกษาชนิดของ *Bacillus* ในพื้นที่ศูนย์ศึกษาพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

2.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ จากข้อ 1.1.2 จากจานเพาะเชื้อที่ใช้แยกเชื้อ โดยเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันโดยสังเกตรูปร่าง ขนาด สี ความทึบแสง ลักษณะผิวและเนื้อโคโลนี เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าจะเป็น *B. subtilis* จากนั้นทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้ Loop เขี่ยโคโลนีเดี่ยวๆ นำมาทำ cross streak ลงบนจานอาหาร NA บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวมา streak ลงบนอาหาร NA ซ้ำอีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อ โดยตรวจลักษณะทางสันฐานวิทยาของเซลล์จากการติดสีแกรม (ภาคผนวก ค) นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ได้ มาเลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บในตู้เย็น Stock culture และถ่ายเชื้อลงในอาหาร NA ใหม่ทุกๆ 30 วัน (ศรีสุดา กวยาสกุล 2542)

2.2 การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* โดยการจัดจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี ตามกระบวนการจัดจำแนกของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ดังต่อไปนี้

2.2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเขี่ยเชื้อลงบน NA แล้วตรวจรูปร่าง ขนาด สี ความทึบแสงลักษณะผิว และเนื้อโคโลนี

2.2.2 การศึกษาลักษณะการติดสีแกรม (ภาคผนวก ข)

2.2.3 การศึกษาลักษณะเอนโดสปอร์ (ภาคผนวก ข)

2.2.4 การตรวจการเคลื่อนที่ (ภาคผนวก ก)

2.2.5 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ Catalase (Gunther and White, 1961) (ภาคผนวก ก)

2.2.6 การทดสอบการย่อยแป้ง (ภาคผนว ก)

2.2.7 การทดสอบการผลิตกรดจากกลูโคส (ภาคผนวก ก)

2.2.8 การทดสอบการผลิตกรดจาก Mannital (ภาคผนวก ก)

2.2.9 การทดสอบการผลิตกรดจาก Xylose (ภาคผนวก ก)

2.2.10 การทดสอบการผลิตกรดจาก Arabinose (ภาคผนวก ก)

2.2.11 การใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก)

2.2.12 การทดสอบ Voges – Proskauer (VP) (ภาคผนวก ก)

2.2.13 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ gelatinase (Mac Faddin, 1980) (ภาคผนวก ก)

2.2.14 การศึกษาสมบัติในการย่อยเคซีน (ภาคผนวก ก)

2.2.15 การศึกษาการ Reduce Nitrate (Mac Faddin, 1980) (ภาคผนวก ก)

2.2.16 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 55 องศาเซลเซียสโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญโดยสังเกตว่า อาหารขุ่น เป็นฝ้าหรือตกตะกอนหรือไม่ ทุกวันจนครบ 7 วัน

2.2.17 การทดสอบการเจริญในอาหารที่เป็นกรด ที่มีพีเอชน้อยกว่า 5.7 โดยเลี้ยงเชื้อใน NB ซึ่งปรับให้พีเอชเป็น 5.7 ตรวจผลเช่นเดียวกับข้อ 2.2.16

2.2.18 การทดสอบการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 7 เปอร์เซ็นต์ ตรวจการเจริญเช่นเดียวกับข้อ 2.2.17

2.2.19 ทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในสภาพที่ไม่มีอากาศ (ภาคผนวก ก)

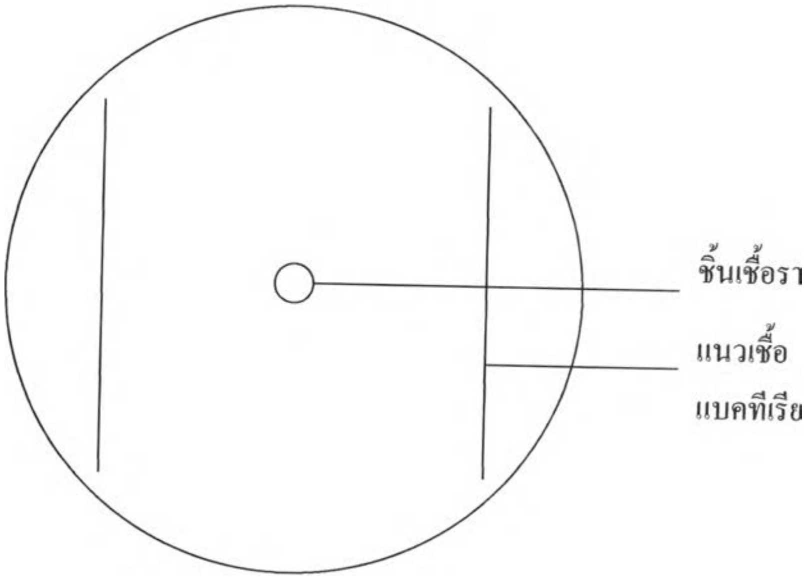
3. การศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* ที่คัดแยกได้ โดยทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืช

3.1 เชื้อราสาเหตุของโรค 6 ชนิด คือ *Bipolaria oryzae* (DOA-PPF 43-21) *Fusarium oxysporum* (DOA-PPF 43-138) *Collectotrichum glyosporioides* (DOA-PPF 43-136) *Phytopthora palmivora* (DOA-PPF 38-4) *Phytopthora parasitica* (DOA-PPF 30-1) และ *Pyricularia grisea* (DOA-PPF 43-108) เป็นเชื้อที่ใช้ในการศึกษามีสาเหตุทำให้เกิดโรครากเน่าใน ข้าว ถั่วลันเตา กาแฟ วานิรา ส้ม และข้าว ตามลำดับ ได้รับความอนุเคราะห์จากกองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เก็บรักษาไว้ใช้ตลอดการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนอาหาร Potato Dexdrose Agar (PDA) (ภาคผนวก) เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเก็บหลอดเชื้อในตู้เย็น

3.2 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* ต่อการเจริญของเชื้อรา *B. oryzae* รหัส DOA-PPF 30-1 *F. oxysporum* รหัส DOA-PPF 43-138 *C. gloeosporioides* รหัส DOA-PPF 43-136 *P. palmivora* รหัส DOA-PPF 38-4 *P. parasitica* รหัส DOA-PPF 30-1 และ *P. grisea* รหัส DOA-PPF 43-108 บนอาหารวุ้น ทำการทดลองโดยเทอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง ปลูกเชื้อรา *B. oryzae F. moniliforme* และ *C. gloeosporioides P. palmivora P. parasitica* และ *P. grisea* ที่มีอายุ 3-5 วัน โดยใช้ที่เจาะจุกยาง (cork borrer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เจาะเชื้อราบริเวณขอบโคโลนี แล้วใช้เข็มเขี่ยย้ายมาวางบริเวณใจกลางจานอาหาร PDA แล้วปลูกกล้าเชื้อ *B. subtilis* ที่ต้องการทดสอบ ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อมาลากให้เป็นแนวขนานกัน 2 ข้างชิ้นเชื้อรา (ดังภาพที่ 2) โดยให้แนวการลากห่างจากเชื้อราไม่น้อยกว่า 2 เซนติเมตร ตรวจความเป็นปฏิปักษ์เมื่ออายุ 3 วัน โดยวัดระยะห่างระหว่างขอบโคโลนีของ *B. subtilis* เปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่เจริญปกติ แล้วนำไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{[\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเปรียบเทียบ} - \text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่ถูกยับยั้ง}]}{\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเปรียบเทียบ}} \times 100$$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ชิ้นเชื้อรา
แนวเชื้อ
แบคทีเรีย

ภาพที่ 2 วิธีการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อรา

4. การเตรียมดีเอ็นเอและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกริยา RAPD-PCR

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

4.1.1 เพาะเลี้ยง *B. subtilis* บนอาหาร 2xTY agar โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อป้ายแบคทีเรียมาขีดบนผิวหน้าของอาหารให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.1.2 เตรียมดีเอ็นเอโดยนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.1 มาใส่ 0.6 มิลลิลิตร ของ Saline – EDTA และนำ 3.0 มิลลิลิตร ของแบคทีเรียที่อยู่ในรูปแขวนลอยลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ ทำให้เซลล์กระจายโดยใช้เครื่องผสมสาร นำมาเติม 15 มิลลิกรัม ของ lysozyme powder ผสมกันให้ดี นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใน waterbath shaker หลังจากนั้นเติม 0.3 มิลลิลิตร ของ DNA extracting buffer และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือรอจนกระทั่งสารละลายใส เติม 3.0 มิลลิลิตร ของ ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) เขย่าให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอด เซ็นตริฟิวจ์ใหม่ ทำซ้ำ 5-6 ครั้ง (ถ้าสารละลายไม่ใส) เติม 3 M sodium acetate pH 5.2 ลงไป 1/10 เท่า ของปริมาตรสารละลาย ค่อยๆเติมเอธานอลที่เย็นอีกลงไป 2 เท่า ของปริมาตรสารละลาย ล้าง ดีเอ็นเอ ด้วย 70 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ เอธานอลตามลำดับ ทำให้ตะกอนแห้งโดยเปิดฝาหลอด แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอ ใน TE buffer 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ Rnase A ปั่นผสมจนสารละลายใส และเก็บสารละลายดีเอ็นเอ ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.1.3 การตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาเจือจางลงแล้ววัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยใช้ Spectrophotometer และทำการเปรียบเทียบค่า OD_{260} และ OD_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.7-2.0 (Romimus, Parker and Morgan, 1997)

4.1.4 นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้เจือจางแล้ววัดค่า OD_{260} แล้วจึงคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้อง (Vettori et al., 1996) ตามสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu g/ml) = (OD_{260}) \times (\text{dilution factor}) \times (50 \mu g/ml)$$

4.2 การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิและช่วงเวลาในขั้นตอน Annealing ร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของเอ็นไซม์ Taq Polymerase และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อปฏิกริยา RAPD-PCR

4.2.1 สารละลายดีเอ็นเอ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณ โดยเทคนิค RADP-PCR (Williams et al., 1990) ซึ่งการเพิ่มปริมาณ จะทำในเครื่อง 2400 thermal cycle (Perkin Elmer) เตรียมปฏิกิริยา amplification PCR/RAPD ผสมในปริมาตร 25 μl โดยในแต่ละหลอดจะมีส่วนผสมของปริมาณความเข้มข้นของเอ็นไซม์ Taq Polymerase และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ต่างกันดังนี้คือปริมาณเอ็นไซม์ Ampli Taq Polymerase ที่ใช้มีระดับความเข้มข้น 0.625 U (Vettori และคณะ, 1996) 1 U (Batinic และคณะ 1998) และ 1.25 U (Romimus, Parker and Morgan, 1997) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1247 = 5$'$- AAGAGCCCGT-3$'$ ที่ระดับ 12.5 pmol และ 25 pmol ความเข้มข้นความเข้มข้นอื่นๆ เตรียมตามวิธีของ Batinic et al. (1998) ส่วนสภาวะของอุณหภูมิ และเวลาที่เลือกใช้ในขั้นตอน Annealing คือที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15 วินาที ที่ 36 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 20 วินาที 32 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 20 วินาที และ 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 20 วินาที

4.2.2 ทำการวิเคราะห์ PCR-products โดย gel electrophoresis โดยนำเอา 20 ไมโครลิตร (18 ไมโครลิตร ในแต่ละ PCR reaction และ DNA marker 2 ไมโครลิตร ของ Loading buffer) load บน 1.8% (W/V) agarose gel ใน TBE electrophoresis buffer (89 mmol/L Tris base, 89 mmol/L boric acid, 2 mmol/L EDTA) แล้วทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย 0.5 μg/ml ของเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วล้างสีด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จากนั้นนำไปอ่านผลโดยการผ่านแสง ultraviolet ถ่ายรูป ของแถบดีเอ็นเอ โดยเครื่อง UV-Transilluminator โดยเครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม Gene tools match and Gene Directory (syngene)

4.3 การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของ Taq Polymerase และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อปฏิกริยา RAPD-PCR

4.3.1 จากสภาวะของอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในข้อ 4.2 นำมาศึกษาร่วมกับปริมาณของ $MgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 3 mM 4 mM และ 4.5 mM ที่ Amphi Taq Polymerase 0.625 U . 1 U และ 1.25 U และความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1247 = 5$'$- AAGAGCCCGT-3$'$ ที่

ระดับ 12.5 pmol และ 25 pmol ความเข้มข้นความเข้มข้นอื่นๆ เตรียมตามวิธีของ Batinic et al. (1998) และโปรแกรมที่ทำพีซีอาร์ คือ predenature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที แล้วตามด้วย 35 รอบของ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วตามด้วย poste extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

4.3.2 ทำการวิเคราะห์ PCR-products โดย gel electrophoresis เช่นเดียวกับข้อ 4.2.2

5. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* โดยวิธี RAPD-PCR

5.1 สารละลายดีเอ็นเอ ถูกนำมาเพิ่มปริมาณ โดยเทคนิค RADP-PCR (williams et al., 1990) ซึ่งการเพิ่มปริมาณ จะทำในเครื่อง 2400 thermal cycle (Perkin Elmer) เตรียมปฏิกิริยา amplification PCR/RAPD ผสมในปริมาตร 25 µl โดย 1 หลอด มีส่วนผสมดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมความเข้มข้นของปฏิกิริยา RAPD-PCR

	สารที่ใช้	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1.	PCR buffer	2.5 µl	10X
2.	MgCl2	2.0 µl	4 mM
3.	dNTP	2.5 µl	100 µmol/l
4.	Primer	1.0 µl	25 pmol/l
5.	DNA-Template	1.0 µl	50 ng
6.	Taq. Polymerase	0.1 µl	1 Unit
7.	distill. Water	15.9 µl	
	Total	25.0 µl	

โดยเลือกใช้ไพร์เมอร์ 8 ชนิด คือไพรเมอร์ OPR-1 = 5′-TGCGGGTCCT-3′ OPR-2 = 5′-CACAGCTGCC-3′ OPR-13 = 5′-GGACGACAAG-3′ OPR-15 = 5′-GGACAACGAG-3′ OPR-16 = 5′-CTCTGCGCGT-3′ OPR-20 = 5′-ACGGCAAGGA-3′ 1247 = 5′- AAGAGCCCGT-3′ 1252 = 5′-GCGGAAATAG-3′ และ 1253 = 5′-GTT TCC GCC C-3′ (Vettori el al., 1996) จาก 10

ชนิด และเตรียมความเข้มข้นของปฏิกิริยาโดยวิธีของ Batinic et al. (1998) โปรแกรมที่ทำพีซีอาร์ คือ predenature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที แล้วตามด้วย 35 รอบของ denature 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วตามด้วย poste extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

5.2 ทำการวิเคราะห์ PCR-products โดย gel electrophoresis โดยนำเอา 20 ไมโครลิตร (18 ไมโครลิตร ในแต่ละ PCR reaction และ DNA marker 2 ไมโครลิตร ของ Loading buffer) load บน 1.8% (W/V) agarose gel ใน TBE electrophoresis buffer (89 mmol/L Tris base, 89 mmol/L boric acid, 2 mmol/L EDTA) แล้วทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย 0.5 µg/ml ของเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วล้างสีด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จากนั้นนำไปอ่านผลโดยการผ่านแสง ultraviolet ถ่ายรูป และวัดขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยเครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม Gene tools match and Gene Directory (syngene)

6. การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม และการวิเคราะห์กลุ่มของ *B. subtilis* 35 ไอโซเลท โดยข้อมูล RAPD-PCR ด้วยวิธี cluster analysis

นำแถบ ดีเอ็นเอ มาเปรียบเทียบความแปรผันทางพันธุกรรม และจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการนับการปรากฏ (1) หรือไม่ปรากฏ (0) แถบ ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ ทำเครื่องหมายบนตำแหน่ง แถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏแต่ละแถบ (Burr และ Pepper, 1997) คำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ระหว่างสายพันธุ์ โดยวิธี Jaccard ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $S = n_{ab}/(n_a + n_b)-n_{ab}$ เมื่อ n_a และ n_b แทนจำนวนแถบ ดีเอ็นเอ ทั้งหมดที่พบใน lane a และ b ตามลำดับ และ n_{ab} คือแถบ ดีเอ็นเอ ที่พบเหมือนกันทั้ง 2 พันธุ์ โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ทั้งสองพันธุ์ไม่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ ที่เหมือนกันเลย และ S = 1 คือทั้งสองพันธุ์มีแถบ ดีเอ็น เอ เหมือนกันทั้งหมด dendrogram สร้างโดย คอมพิวเตอร์โปรแกรม RAPDistance, Version 1.04 ซึ่งพัฒนาโดย Armstrong, J. S., Gibbs, A.J., and Weiller,G. (ANU, Camberra, ACI 2601, Australia)