# บทที่ 3

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Nigro, Thailand
2. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ชนิดอ่าง รุ่น FS4000 บริษัท Decan Ultrasonics, England
3. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 บริษัท New Brunswick Scientific, USA
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (Digital Dry Bath Model) รุ่น D1100 บริษัท Labnet International, Inc., USA
5. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
6. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 บริษัท Kubota, Japan
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น MIKRO20 บริษัท Hettich, Germany
9. เครื่องตรวจสอบเจล (Gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer, USA และ รุ่น MJ Mini™ Personal Thermal Cycler บริษัท Biorad,USA
11. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) บริษัท Kakusan, Japan
12. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-160A บริษัท Shimadzu, Japan
13. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 บริษัท Corning, USA
14. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาดความกว้างรู 0.2 ไมโครเมตร บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
15. ชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)

    เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent Technologies, USA

    คอลัมน์ (column) ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร

    ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย เฟนนิล เมทิล ไซโลเซน ความเข้มข้น 5%

หนา 0.25 ไมโครเมตร

เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID)

เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) ขนาด 10 ไมโครลิตร

16. ชุดเครื่องมือ Minigel migration trough รุ่น i-mupid บริษัท COSMO BIO, Japan
17. ชุดแซนวิชตรวจสอบโปรตีน บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
18. ชุดเครื่องมือ DCode™ system บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA
19. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น HT-122.5 บริษัท International Scientific supply, Japan
20. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –70°ซ รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ –20°ซ รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
22. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE800, Germany
23. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
24. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
25. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
26. 96 well-plate ชนิดก้นแบน บริษัท Corning, USA
27. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของ 96 well-plate (96 well-plate reader) รุ่น $EL_x800$ บริษัท BIO-TEK Instruments, Inc., USA
28. เครื่องผสมสาร (compact Rocker) รุ่น CR300 บริษัท Finemould precision. Ind. Co., Korea
29. เครื่องผสมสาร (Rotator) บริษัท FINEPCR, Korea
30. หลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง (cryotube) บริษัท Nalgene, USA
31. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น digital water bath SB-1000 บริษัท Eyela, Japan

**เคมีภัณฑ์**

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
2. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo ERBA, France
5. ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
7. แคลเซียมไนเตรต ($Ca(NO_3)_2$) บริษัท Merck, Germany
8. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
9. เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) บริษัท Merck, Germany
10. แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$) บริษัท Merck, Germany
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Merck, Germany
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) บริษัท Merck, Germany
13. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) บริษัท Merck, Germany
14. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท BDH Chemicals, Australia
15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
16. แบคโตอะการ์ (bacto agar) บริษัท Difco, USA.
17. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organics, Inc., USA
18. ฟีแนนทรีน (phenanthrene) บริษัท Sigma, USA
19. เมทธานอล ($CH_3OH$) บริษัท Merck, Germany
20. นอร์มัลเฮกเซน ($C_6H_{14}$) บริษัท Merck, Germany
21. ไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide, DMF) บริษัท BIOBASIC, INC., USA
22. ไดเอทธิลอีเทอร์ ($(C_2H_5)O$) บริษัท Merck, Germany
23. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (anhydrous $Na_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
24. อะซิโตน (acetone) บริษัท Merck, Germany
25. Triton X-100 บริษัท Sigma, USA
26. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan
27. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial $CH_3COOH$) บริษัท Merck, Germany
28. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany

29. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) บริษัท Fluka, Germany
30. 100 base pair DNA ladder บริษัท New England Biolabs, USA
31. Lambda *Hin*dIII บริษัท New England Biolabs, USA
32. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) บริษัท Nacalal tesque, Japan
33. เรสทริกชันเอนไซม์ บริษัท Promega, USA และ บริษัท Fermentas, USA
34. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) บริษัท Sigma, USA
35. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 2H_2O$) บริษัท Sigma, USA
36. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) บริษัท Nacalal tesque, Japan
37. Ribonuclease A (RNase A) บริษัท Fermentas, USA
38. Proteinase K บริษัท US. Biological, USA
39. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC., Canada
40. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) บริษัท BIO BASIC INC., Canada
41. *Taq* DNA polymerase บริษัท TAKARA, Japan บริษัท Fermentas, USA บริษัท New England Biolabs, USA บริษัท Qiagen, Germany และบริษัท BioExcellence, Thailand
42. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen, Germany
43. ชุด PCR purification kit QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen, Germany
44. ชุด Glass powder for Recovery of DNA EASYTRAP$^{TM}$Ver.2 บริษัท TAKARA, Japan
45. ชุด PCR cloning kit pGEM-T Easy Vector System II บริษัท Promega, USA
46. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad Laboratories Inc., USA

    Formamide (Deionized)

    40% Acrylamide/Bis solution, 37.5:1 (2.6% C)

    Urea

    Ammonium persulfate

    TEMED (N,N,N′,N′-Tetra-methyl-ethylenediamine)

    50xTAE

    Dye solution

    Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

I25978071

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.1 เก็บตัวอย่างดิน วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน

#### 3.1.1 เก็บตัวอย่างดิน

เลือกเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งดินเปรี้ยวในธรรมชาติจากจังหวัดนครนายก ซึ่งเป็นจังหวัดหนึ่งที่มีพื้นที่ดินเปรี้ยวอยู่เป็นจำนวนมาก เพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งดินเปรี้ยวที่มีการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในภายหลัง และเลือกเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งที่มีความเป็นกรดน้อยกว่าเพื่อเป็นตัวแทนของแหล่งดินที่ถูกปนเปื้อนด้วยน้ำทิ้งที่เป็นกรดที่ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน โดยเก็บจากผิวดินลึกลงไปประมาณ 10 ซม. ผึ่งลมไว้ข้ามคืน แยกเศษหินออก แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดรู 1.18 มม. (เบอร์16) เก็บตัวอย่างดินไว้ที่ 4°ซ จนกว่าจะทำการทดลอง โดยสถานที่เก็บตัวอย่างดินจำนวน 7 แหล่ง แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างดินที่ใช้ในการสร้างระบบนิเวศจำลอง

| ลำดับที่ | ตัวย่อ | สถานที่เก็บตัวอย่างดิน |
|---|---|---|
| 1 | NY1 | ใต้ต้นไม้ใหญ่ ต.อาษา อ.บ้านนา จ.นครนายก |
| 2 | NY2 | ใต้ต้นไม้ใหญ่ ต.บ้านพริก อ.บ้านนา จ.นครนายก |
| 3 | NY3 | ที่นา ม. 2 ต.ทองหลาง อ.บ้านนา จ.นครนายก |
| 4 | NY4 | ที่นา ม. 4 ต.ทองหลาง อ.บ้านนา จ.นครนายก |
| 5 | PJ | สวนผลไม้ ต. ไม้เค็ด อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี |
| 6 | RB1 | อุทยานธรรมชาติวิทยา ต.สวนผึ้ง อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี |
| 7 | RB2 | อุทยานธรรมชาติวิทยา ต.สวนผึ้ง อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี |

### 3.1.2 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดินและการปนเปื้อนของฟีแนนทรีน

#### 3.1.2.1 วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

นำตัวอย่างดินส่งตรวจที่กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) สภาพการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity) สารอินทรีย์ (Organic Matter) ปริมาณความชื้น (Moisture Content) ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน (Cation Exchange Capacity) ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity) อินทรีย์คาร์บอน (Organic carbon) ไนโตรเจน (Nitrogen) ฟอสฟอรัส (Phosphorus) โพแทสเซียม (Potassium) แคลเซียม (Calcium) แมกนีเซียม (Magnesium) และลักษณะเนื้อดิน (Texture) ตามวิธีที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 วิธีการวิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของดิน

| สมบัติของดิน | วิธีการวิเคราะห์ |
|---|---|
| ความเป็นกรดด่าง | ดิน : น้ำ = 1 : 1 และวัดโดยอิเล็กโทรด |
| สภาพการนำไฟฟ้า | ดิน : น้ำ = 1 : 5 และวัดโดยอิเล็กโทรด |
| สารอินทรีย์ | Walkley-Black Method |
| ปริมาณความชื้น | Physical method |
| ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุหรือไอออน | $NH_4^+$ saturation and distillation |
| ความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำ (%) | Comparison between wet weight and dried weight |
| อินทรีย์คาร์บอน (%) | Wet oxidation method |
| ไนโตรเจน (%) | % OM X 0.05 |
| ฟอสฟอรัส | Bray II |
| โพแทสเซียม | $NH_4^+$ acetate 1 N pH 7.0 extraction |
| แคลเซียม | $NH_4^+$ acetate 1 N pH 7.0 extraction |
| แมกนีเซียม | $NH_4^+$ acetate 1 N pH 7.0 extraction |
| ลักษณะเนื้อดิน | Hydrometer method |

3.1.2.2 **วิเคราะห์การปนเปื้อนของฟีแนนทรีน**

ตรวจสอบการปนเปื้อนของฟีแนนทรีนในตัวอย่างดินโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatiography, GC) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

## 3.2 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Most Probable Number (MPN)

### 3.2.1 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) 9 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน ดูดส่วนน้ำใส 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ชนิดก้นแบนซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 180 ไมโครลิตร และเจือจางตั้งแต่ $10^{-2}$-$10^{-8}$ (serial dilution) โดยทำ 5 หลุมพร้อมกัน นำไปบ่มที่ 30°ซ นาน 2 วัน แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร (Joner และคณะ, 2002) นับจำนวนหลุมที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ของแต่ละความเจือจาง (dilution) และนำไปเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวนหาจำนวนจุลินทรีย์

โดยในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในตัวอย่างดิน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 7.0 และ 4.0 และในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในระบบนิเวศจำลอง ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0

### 3.2.2 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ที่มี pH 4.0 (ภาคผนวก ก) 9 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน ดูดส่วนน้ำใส 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate ชนิดก้นแบนซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว basal salt ที่มี pH 4.0 180 ไมโครลิตร และฟีแนนทรีน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ppm และเจือจางตั้งแต่ $10^{-2}$-$10^{-8}$ (serial dilution) โดยทำ 5 หลุมพร้อมกัน บ่มที่ 30°ซ นาน 7 วัน แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (Joner และคณะ, 2002) นับจำนวนหลุมที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ของแต่ละความเจือจาง (dilution) และนำไปเทียบกับตาราง MPN เพื่อคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์

### 3.3 สร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะเป็นกรดที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยฟีแนนทรีน

สร้างระบบนิเวศจำลองดินที่มีภาวะกรดโดยใช้ดินเปรี้ยวโดยธรรมชาติ และดินที่เป็นกรดน้อยกว่า ปรับ pH ดินทั้ง 2 ชุดให้ใกล้เคียง 4.0 เพื่อเปรียบเทียบผลกระทบของปัจจัยภายในดินที่มีต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีน และในระบบนิเวศจำลองแต่ละชุดดินได้เปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติมสารอาหารอื่นที่มีผลกระทบต่อการย่อยสลายฟีแนนทรีนในระบบ

#### 3.3.1 สร้างระบบนิเวศจำลองดินชุด NY (NY1-NY4)

3.3.1.1 บรรจุดินจำนวน 250 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว แบ่งเป็นชุดควบคุมและชุดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อชุดควบคุมที่ 121°ซ 30 นาที 3 ครั้ง โดยระหว่างการฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 วัน จึงฆ่าเชื้อครั้งต่อไป นำทั้ง 2 ชุดการทดลองมาเติมฟีแนนทรีนในอะซิโตน (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ให้อะซิโตนระเหย เติมอาหารเหลว carbon free mineral (CFMM) (ภาคผนวก ก) เพื่อปรับอัตราส่วนระหว่าง คาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้ใกล้เคียง 100 : 8 : 2 ปรับความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เป็น 60% และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 4.0 เพื่อให้ใกล้เคียงกับดินที่มีภาวะเป็นกรดมากที่สุดในการทดลองนี้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุก 7 วัน เพื่อรักษาความชื้นโดยพิจารณาจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 8 สัปดาห์ ดังนี้

ก. 6 กรัม สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีที่ระบุ ในข้อ 3.4

ข. 1 กรัม สำหรับตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ตามที่ระบุในข้อ 3.5

ค. 1 กรัม สำหรับแยกแบคทีเรียที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.7

3.3.1.2 บรรจุดิน NY1 จำนวน 6 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว แบ่งเป็นชุดควบคุมและชุดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อชุดควบคุมที่ 121°ซ 30 นาที 3 ครั้ง โดยระหว่างการฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 วัน จึงฆ่าเชื้อครั้งต่อไป นำทั้ง 2 ชุดการทดลองมาเติมฟีแนนทรีนในอะซิโตน (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนให้อะซิโตนระเหย เติมอาหารเหลว basal

salt (ภาคผนวก ก) เพื่อปรับอัตราส่วนระหว่าง คาร์บอน : ไนโตรเจน : ฟอสฟอรัส (C:N:P) ให้ใกล้เคียง 100 : 8 : 2 และแบ่งเป็น 3 ชุดทดลอง

ชุดทดลองที่ 1 เติมสารสกัดจากยีสต์ (ภาคผนวก ก) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 200 ppm

ชุดทดลองที่ 2 เติมเปลือกถั่ว 6% ของน้ำหนักดิน

ชุดทดลองที่ 3 เติมสารสกัดจากยีสต์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 200 ppm และเปลือกถั่ว 6% ของน้ำหนักดิน

โดยเปลือกถั่วที่ใช้ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ 30 นาที 3 ครั้ง และระหว่างฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1วัน จึงจะฆ่าเชื้อครั้งต่อไป

ปรับความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เป็น 60% และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 4.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุก 7 วัน เพื่อรักษาความชื้นโดยพิจารณาจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 12 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างดินชุดละ 3 ขวด ในแต่ละขวดชั่งตัวอย่างดินเพื่อนำมาวิเคราะห์ดังนี้

ก. 2 กรัม สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

ข. 1 กรัม สำหรับตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5

ค.1 กรัม สำหรับตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มี pH 4.0 ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.1

ง. 1 กรัม สำหรับตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.2.2

### 3.3.2 สร้างระบบนิเวศจำลองดินชุด PJ และ RB (RB1 และ RB2)

3.3.2.1 บรรจุดินจำนวน 6 กรัม ในขวดแก้วฝาเกลียว แบ่งเป็นชุดควบคุมและชุดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อชุดควบคุมที่ 121°ซ 30 นาที 3 ครั้ง โดยระหว่างการฆ่าเชื้อแต่ละครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 1 วัน จึงฆ่าเชื้อครั้งต่อไป นำทั้ง 2 ชุดการทดลองมาเติมฟีแนนทรีนในอะซิโตน (ภาคผนวก ข) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 300 ppm ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนให้อะซิโตนระเหย เติมอาหารเหลว basal salt (ภาคผนวก ก) เติมสารสกัดจากยีสต์ (ภาคผนวก ก) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในดินเป็น 200

ppm ปรับความจุสูงสุดในการอุ้มน้ำด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้เป็น 60% และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 4.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มัล และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อทุก 7 วัน เพื่อรักษาความชื้นโดยพิจารณาจากน้ำหนักที่หายไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 12 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างดินชุดละ 3 ขวด ในแต่ละขวดชั่งตัวอย่างดินเพื่อนำมาวิเคราะห์ดังนี้

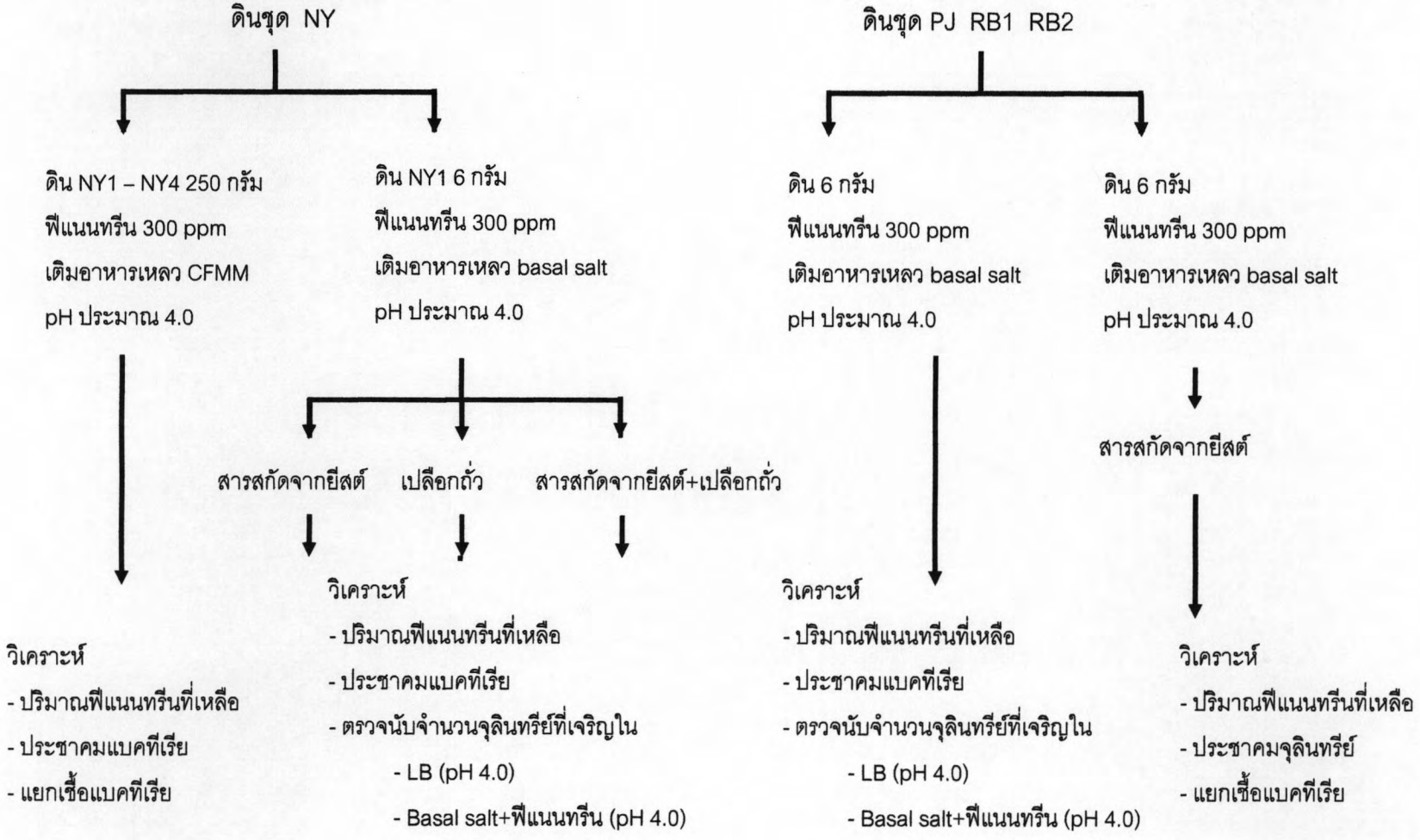
ก. 2 กรัม สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลือโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.4

ข. 1 กรัม สำหรับตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมแบคทีเรียโดยวิธี DGGE ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5

ค. 1 กรัม สำหรับแยกแบคทีเรียที่เจริญได้โดยใช้ฟีแนนทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.7

3.3.2.2 สร้างระบบนิเวศจำลองเช่นเดียวกับวิธีที่ระบุในข้อ 3.3.2.1 แต่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เก็บตัวอย่างดินทุก 2 สัปดาห์ นาน 12 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างดินชุดละ 3 ขวด ในแต่ละขวดชั่งตัวอย่างดินเพื่อนำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับ 3.3.1.2

จากขั้นตอนการสร้างระบบนิเวศจำลอง และการวิเคราะห์ตัวอย่างดินในระบบนิเวศจำลองที่ได้ สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 3.1




รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสร้างระบบนิเวศจำลองและการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

## 3.4 วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่ในระบบนิเวศจำลอง

วิเคราะห์ปริมาณฟีแนนทรีนที่เหลืออยู่โดยใช้ *n*-hexane ในการสกัดด้วยตัวทำละลาย ทำโดยเติม *n*-hexane ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และ 15% TritonX-100 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน 2 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งนาน 24 ชั่วโมงเพื่อให้ส่วนของดินจับตัวกัน เติม anhydrous $Na_2SO_4$ ที่ผ่านการอบข้ามคืนและทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อกำจัดน้ำออกจากส่วนของชั้น *n*-hexane แล้วนำส่วนของ *n*-hexane กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมโครเมตร

วิเคราะห์สารที่สกัดได้ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี โดยชุดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น 6890N (บริษัท Agilent Technologies, USA) คอลัมน์ชนิด HP-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 320 ไมโครเมตร ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วยเฟนนิลเมทิลไซโลเซน ความเข้มข้น 5% หนา 0.25 ไมโครเมตร เครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

วิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| อุณหภูมิเริ่มต้น | 80°ซ | | | |
| อุณหภูมิขั้นที่ 1 | 25°ซ ต่อนาที | จนอุณหภูมิ 160°ซ | hold | 3 นาที |
| อุณหภูมิขั้นที่ 2 | 3°ซ ต่อนาที | จนอุณหภูมิ 220°ซ | hold | 2 นาที |
| อุณหภูมิขั้นที่ 3 | 40°ซ ต่อนาที | จนอุณหภูมิ 300°ซ | hold | 7 นาที |

โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาไหลด้วยอัตราเร็ว 1.7 มิลลิลิตรต่อนาที

เปรียบเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานของฟีแนนทรีน ดังแสดงในภาคผนวก ค

## 3.5 ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

### 3.5.1 สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

ชั่งดิน 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ เติม DNA extraction buffer 900 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เติมโปรตีนเนสเค (proteinase K) 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37°ซ นาน 30

นาที เติม 20% SDS (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 65°ซ นาน 2 ชั่วโมง โดยผสมให้เข้ากัน ทุก 20 นาที ทำการเยือกแข็ง-ละลาย (freeze-thaw) 3 ครั้ง โดยเยือกแข็งที่ -80°ซ นาน 30 นาที และละลายที่ 65°ซ นาน 3-5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 10°ซ นาน 30 นาที

เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ สกัดด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข) 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 2-3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 10°ซ นาน 10 นาที

เก็บส่วนน้ำใสและเติมคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) (ภาคผนวก ข) เท่ากับปริมาตรของส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 2-3 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 10°ซ นาน 10 นาที

เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 0.8 เท่าของปริมาตรส่วนน้ำใส ผสมให้เข้ากันอย่างช้าๆ นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 10°ซ นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล (ภาคผนวก ข) ระเหยเอธานอลออกจากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (ภาคผนวก ข) 50 ไมโครลิตร ที่ผสมกับ RNase 0.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.5.2 ตรวจความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้และกำจัด humic acid โดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส

โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.9% (ภาคผนวก ข) ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลที่ได้ลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนืออะกาโรสเจล 2-3 มม. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกหยอดด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda *Hin*dIII ที่ผสมกับสีติดตามแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 60 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ TAE นาน 10 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

ตัดส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอจากเจล และทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วย Glass powder for Recovery of DNA EASYTRAP$^{TM}$Ver.2 (TAKARA BIO INC, Japan) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยนำเจลที่ตัดได้ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ และชั่งน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจลโดยหักออกจากน้ำหนัก

หลอดเปล่า เติม NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นอะกาโรสเจล บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ จนกระทั่งอะกาโรสเจลละลายหมด เติม glass powder ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ glass powder ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสออก แล้วเติม washing buffer ปริมาตรมากกว่า 5 เท่าของปริมาตร glass powder ที่เติมลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปต นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสออกจนหมด ตั้งทิ้งไว้จน washing buffer ระเหยแห้ง เติม TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1-2 เท่าของปริมาตร glass powder ที่เติม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ นาน 2-5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเออยู่เก็บไว้ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.5.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.5.3.1 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ($A_{260}$ และ $A_{280}$) คำนวณค่า $A_{260}$ ต่อ $A_{280}$ โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่านี้น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260}$ X 50 X dilution factor

3.5.3.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรีย

โดยใช้ไพรเมอร์ 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ซึ่งมี GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTG G–3') (Muyzer และคณะ, 1993) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ V-3 region ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 200 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยา เป็นดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ (เมื่อใช้ *Taq* DNA polymearase ของ Takara Fermentas และ Qiagen) หรือความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ (เมื่อใช้ *Taq* DNA polymearase ของ New England Biolabs) หรือความเข้มข้น 3.0

มิลลิโมลาร์ (เมื่อใช้ *Taq* DNA polymearase ของ BioExcellence) สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1x*Taq* DNA polymearase ปริมาณ 2.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณปลายทั้งสองด้านของสายดีเอ็นเอแม่แบบ forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมล (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.2 ประมาณ 100 ng ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและเก็บส่วนผสมทั้งหมดในน้ำแข็ง หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
   - 2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที
   - 2.2 Annealing step อุณหภูมิ 65°ซ เวลา 1 นาที
     (อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5°ซ ในแต่ละรอบ)
   - 2.3 Extension step อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 55°ซ เวลา 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5.2

3.5.3.3 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer ของยูคาริโอต

โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') (White และคณะ, 1990) ซึ่งมี GC clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCA

CGGGGGG-3') (Heuer และคณะ, 1997) เชื่อมต่อบริเวณ 5' และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC–3') (White และคณะ, 1990) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR มีความยาวประมาณ 500 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังที่ระบุในข้อ 3.5.3.2 หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Biorad,USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 5 นาที
2. Touchdown program จำนวน 20 รอบ
   - 2.1 Denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที
   - 2.2 Annealing step อุณหภูมิ 58°ซ เวลา 1 นาที
     (อุณหภูมิลดลงทีละ 0.5°ซ ในแต่ละรอบ)
   - 2.3 Extension step อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 2 นาที
3. Denaturation step อุณหภูมิ 94°ซ เวลา 1 นาที
4. Annealing step อุณหภูมิ 48°ซ เวลา 1 นาที
5. Extension step อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 2 นาที
6. ทำขั้นตอนที่ 3-5 จำนวน 30 รอบ
7. Final extension อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 10 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่าโดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5.2

### 3.5.4 วิเคราะห์ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ใช้อุปกรณ์ของ DCode™ system (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ในการวิเคราะห์ DGGE โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 20 – 70% (ภาคผนวก ข) (100% denaturant ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% formamide) ซึ่งทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant โดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เมื่อทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลแล้ว เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำ

ชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 7 ลิตร ที่ผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิประมาณ 60°ซ ผสมผลิตภัณฑ์ PCR กับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ความต่างศักย์ 130 โวลต์ ที่ 60°ซ นาน 5 ชม. และย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) นาน 20 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)

## 3.6 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอเด่นจากโปรไฟล์ของ DGGE

### 3.6.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์เพื่อการโคลน

ตัดชิ้นเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอเด่นใส่ลงในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร แช่ดีเอ็นเอไว้ที่ 4°ซ ประมาณ 2-3 วัน เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมาในน้ำให้มากที่สุด เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยที่ซนิดและความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเหมือนกับที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับทำ DGGE แต่ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่ใช้ไม่ต้องเชื่อมต่อด้วย GC clamp บริเวณ 5' หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Initial denaturation step | อุณหภูมิ 96°ซ เวลา 2 นาที | |
| Denaturation step | อุณหภูมิ 96°ซ เวลา 30 วินาที | 30 รอบ |
| Annealing step | อุณหภูมิ 55°ซ เวลา 30 วินาที | |
| Extension step | อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 1 นาที | |
| Final extension | อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 6 นาที | |

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer ของยูคาริโอต ตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| Initial denaturation step | อุณหภูมิ 96°ซ เวลา 2 นาที | |
| Denaturation step | อุณหภูมิ 96°ซ เวลา 30 วินาที | 30 รอบ |
| Annealing step | อุณหภูมิ 48°ซ เวลา 30 วินาที | |
| Extension step | อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 1 นาที | |
| Final extension | อุณหภูมิ 72°ซ เวลา 6 นาที | |

และทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์ PCR ผสมให้เข้ากันแล้วดูดลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่ –20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.6.2 โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

3.6.2.1 ไลเกทชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.6.1.2 เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยไลเกส (ligase) (Promega, USA) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

| | |
|---|---|
| 2x ไลเกชันบัฟเฟอร์ | 5 ไมโครลิตร |
| พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T Easy (50 นาโนกรัม) | 1 ไมโครลิตร |
| ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.5.1.2 (ประมาณ 150 นาโนกรัม) | 3 ไมโครลิตร |
| T4 DNA ligase (3 หน่วยต่อไมโครลิตร) | 1 ไมโครลิตร |

ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 16-18 ชั่วโมง

3.6.2.2 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นยีนที่ต้องการอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก

การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์โดยวิธี Calcium chloride (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยลงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Ψb (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 4 ชั่วโมง จนกระทั่ง $OD_{600}$ มีค่าเท่ากับ 0.3-0.5 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ψb ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน arm flask นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่ง $OD_{600}$ มีค่าเท่ากับ 0.5 เมื่อเซลล์เจริญจนถึงค่า $OD_{600}$ ที่ต้องการ ให้ถ่ายเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ต้องทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ตลอด) เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง เติมสารละลาย TfbI (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 40 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbI (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย TfbI ในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย TfbII (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์อีกครั้ง กระจายตะกอนให้เข้ากับสารละลาย TfbII แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที หรือมากกว่านั้น แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ปลอดเชื้อที่เย็น ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บคอมพีเทนต์เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70°ซ มาแช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ ใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ไลเกทไว้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* JM109 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มในอ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที heat shock ที่อุณหภูมิ 42°ซ นาน 45-50 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ (transformant) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) ทำโดยนำสารละลายแขวนลอยของ *E. coli* JM109 ที่ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งผ่านการเกลี่ยด้วย X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์ เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไว้ในที่มืด หลังจากเกลี่ยเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 – 24 ชั่วโมง

### 3.6.3 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยเลี้ยง *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก) ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16-18 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ในหลอดไมโครฟิวจ์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แขวนลอยเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารแขวนลอยเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที เติมสารละลาย N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนขาว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนน้ำใสลงใน QIAprep spin column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำใสทิ้งก่อนปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดส่วนน้ำใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อหรือบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ให้ลงตรงแผ่นกรอง ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายพลาสมิดอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.6.4 การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกภายในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ โดยทำส่วนผสมของปฏิกิริยา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตร) ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy | 1 | ไมโครลิตร |
| 10x บัฟเฟอร์ | 1 | ไมโครลิตร |
| เอนไซม์ *Eco*RI | 0.5 | ไมโครลิตร |
| น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ | 7.5 | ไมโครลิตร |

ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 2 - 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5.2

### 3.6.5 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ผ่านทางบริษัท Ward Medic Ltd., Part โดยบริษัทนี้ใช้ระบบ LI-COR® NEN 4200 Global IR2 DNA Sequencing และเครื่อง ABI® PRISM DNA Sequencers ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการสอดแทรกอยู่ โดยสกัดจาก *E. coli* JM109 ด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย แล้วละลายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ M13R (5' GGATAACAATTTCACACAGG 3') ซึ่งจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

## 3.7 แยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ในภาวะกรด

เจือจางตัวอย่างดิน 1 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM (ภาคผนวก ก) หรือ basal salt (ภาคผนวก ก) ที่มี pH 4.0 ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมในระบบนิเวศจำลองให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM หรือ basal salt pH 4.0 แล้วพ่นทับด้วย 2% ฟีแนนทรีนในไดเอทธิลอีเทอร์ (ภาคผนวก ข) บ่มที่ 30°ซ จนกระทั่งพบบริเวณใสรอบโคโลนีแบคทีเรีย

### 3.8 ตรวจติดตามส่วนของยีนไดออกซิจีเนสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

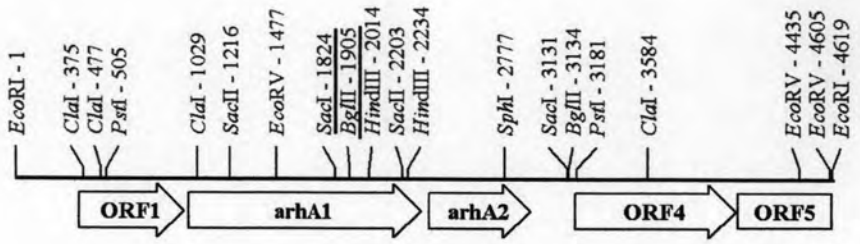
ทำโดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ Rieske ของยีนไดออกซิจีเนส ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs โดยใช้ดีเจเนอเรตไพรเมอร์ Rieskel F (TGYMGICAYMGIGG) และ Rieskel R (CCAICCRTGRTAISWRCA) (Cigolini และคณะ, 1997) โดยนำดีเอ็นเอของ *Alteromonas macleodii* BP-PH (Fuse และคณะ, 2003) ซึ่งสกัดโดยวิธีของ Sambrook และ Russell (2001) มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวด้วย เพื่อใช้เป็น positive control และดีเอ็นเอแม่แบบของตัวอย่างที่ใช้ในการติดตามส่วนของยีนไดออกซิจีเนสนั้น ผ่านการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ตามที่ระบุไว้ในข้อที่ 3.6.1 เพื่อตรวจสอบว่ามีดีเอ็นเอที่สามารถนำมาเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ก่อนที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ Rieske ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีความยาว 78 bp โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังที่ระบุในข้อ 3.5.3.2 หลังจากนั้นดำเนินปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

| | | | |
|---|---|---|---|
| Initial denaturation step | อุณหภูมิ 94°ซ | เวลา 5 นาที | |
| Denaturation step | อุณหภูมิ 94°ซ | เวลา 30 วินาที | 35 รอบ |
| Annealing step | อุณหภูมิ 48°ซ | เวลา 30 วินาที | |
| Extension step | อุณหภูมิ 72°ซ | เวลา 30 วินาที | |
| Final extension step | อุณหภูมิ 72°ซ | เวลา 5 นาที | |

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.5.2

หรือตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟเรซิส โดยเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 10.5% (ภาคผนวก ข) ในชุดแซนวิชเตรียมเจล แล้วเสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิชโดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปล่อยให้พอลิอะคริลาไมด์แข็งตัว นำชุดเจลแซนวิชใส่ลงในแชมเบอร์ที่มีบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตามหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกหยอดสารละลายพลาสมิด pPC1 (กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl*II และ *Sac*I ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ซึ่งมีชิ้นส่วนขนาด 81 bp ผสมกับสีติดตามเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 200 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมพอลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ในบัฟเฟอร์ TAE นาน 20 นาที นำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV)




รูปที่ 3.2 แสดงบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bgl*II และ *Sac*I บน pPC1 (กรองกาญจน์ สายพิณ, 2549)

หลังจากนั้นโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.2 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM-T Easy ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.3 และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิสดังเช่นที่กล่าวมาข้างต้น

เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและจัดจำแนกชนิดของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)