บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุตุ๊บบ

ตัวอย่างตุ๊บบจากพื้นที่เฉพาะถูกต้องการเก็บตัวในจังหวัดสงขลา 2 ฟันที่ คือ ด. บางเหลียง อ. ความน้อย และ ด. ทุ่งหว้า อ. เมือง จำนวน 23 ปีบริเวณ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

- อุปกรณ์สำคัญคือสีสันชีวะที่อยู่ตัวสารเพราะ, พาร์-ดีหริบ ได้แก่ Mineral salt yeast-extract medium (MSYM)
- อุปกรณ์สำคัญคือสีสันชีวะที่อยู่ตัวสารเพราะ, พาร์-ดีหริบตามวิธีการของ Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984) และ ควบคุม ทับ ซิท (2537)
(รายละเอียดและวิธีการเตรียมแหล่งในภาคผนวก ข.)

3. สูตรเคมี

- สูตรมาตรฐานอยู่ในดอกไม้ ได้แก่ สารเพราะ, พาร์-ดีหริบ (1,1,1-Trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane) 99% Aldrin (AR grade)
- สูตรสำคัญคือสาร เพราะ, พาร์-ดีหริบในตัวอย่างตุ๊บบ ได้แก่ แต้มคอล ดอกฟอร์ม เสือ
- สูตรสำคัญคือสารเพราะ,พาร์-ดีหริบตามวิธีการของ Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Noel, 1984) และ ควบคุม ทับ ซิท (2537)
(รายละเอียดและวิธีการเตรียมแหล่งในภาคผนวก ข.)

4. อุปกรณ์

- Centrifuge and Microcentrifuge
- Dessicator
- Gas chromatography-Micro Electron capture detector (GC-µECD)
- Gel electrophoresis apparatus
- Incubator and Shaking incubator
- Laminar air flow cabinet
- pH meter
- Rotary evaporator
- Thermocycler
- UV-visible spectrophotometer
- UV transilluminator
- Vortex mixer

5. วิธีการวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ตัดแปลงจากวิธีของ Stoscheck, 1990)

นำด้วยอ่าน 1 มิลลิลิตร น้ำมันเกลือที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ว
แช่ร้อนโดยใช้เตาClinton ที่ความร้อน 0.85 ถึง 0.88 อย่าง 2 ครั้ง ให้เป็นส่วนใหญ่ เทิมไนโตรเจนไว้
ครอบใส่แล้วให้ความเข้มข้น 0.1 นอร์โมล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 90
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ผ่านนี้จะทำให้เกิดการ 100 มิลลิลิตร ตีน reagent A
(สารละลายโปรตีนชนิด 3 ส่วน) ไข่เหลืองไว้ครั้งที่ 1 นอร์โมล 1 ส่วนและสารละลาย
ไข่เหลืองไข้ต้มข้น 1 ส่วน) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ตีนไว้ที่อุณหภูมิ 10 นาที
จากนั้นเพิ่มสารละลายฟิโลน (Folin reagent) 0.2 นอร์โมล ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
(ที่ใน 96 well-plate) แล้วไว้ 30 นาที แล้วล้างดุกตักสารพิษความยาวคดี 750 นาโนเมตร ด้วย
Microplate reader เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานปริมาณโดยใช้ Bovine serum
albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร,พาว`-ดีทีด้วยวิธีเกลือกระดาษที่ (ตัดแปลงจากวิธีของบุญ
เสริม ช่ว.อ, 2540; ทิฆม ละออ คลีฟล์ส และ อธิบีนท์ หนุนทัพ, 2542)

เครื่องเกลือกระดาษที่ใช้เครื่องตรวจจับ (Detector) ชนิด 63Ni Micro Electron capture
detector (µECD) โดยใช้เทคนิคแบบ capillary HP-35 (35% crosslinked methyl phenyl siloxane)
ความยาว 30 เมตร ID 0.25 ในไมโครเดอร สาระของเครื่องใช้ยูเที่ยมขุนของ Injector 250 องศา
เซ็นเซอร์ Det 320 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่ม
อุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงอุณหภูมิที่ 250
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้สัดส่วนเป็นแก๊สพา (carrier gas) อัตราเร็ว 2 มิลลิเมตรต่อนาที และ
ในโครงกรอบเป็น make up แก๊สอัดตราเร็ว 60 มิลลิเมตรต่อนาที
วิเคราะห์สารโดยติดสารละลายมาตรฐานของพระรา-ศิลป์ที่ 1 ไมโครกริด เชื้อกริต เกี่ยวกับเวลส์ค่ายกริด ได้รับความสูงมุมทางของสารมาตรฐาน เมื่อตั้งตัวอย่างที่เครื่องไวส์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอสุดพืชกับโครงกริดสารละลายมาตรฐาน ซึ่งคำว่าเทนเช่นซี (Retention time) จะบอกให้ทราบถึงขนาดของสาร ที่ได้กราฟและความสูงของที่จะบอกถึงปริมาณสาร สำหรับความขั้นของสารที่วิเคราะห์

6. วิธีการทดลอง

6.1 ศึกษาปริมาณสารพระรา-ศิลป์ในตัวอย่างดินที่ป่าเบญจ

6.1.1 การเก็บตัวอย่างดินที่ป่าเบญจ (วิธีทดลอง ที่ระบาย, 2541)

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณคิ้วตันในสถานที่แปลงเพราะปลูกซึ่งเป็นต้นที่มีประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช โดยใช้หลักเมื่อซึ่งสูงถึงระดับ 0 - 15 เซนติเมตร ซึ่งเป็นความสูงระดับใจร้อน ตัดดินขึ้นมาปกครองต้นข้างอาลกุนที่ 2 ชั่ว เก็บดินแล้วก่อนให้ลูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บดิน 3 - 4 จุลินแดนแปลง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารพระรา-ศิลป์ที่_Texture และเพื่อคัดเลือกคุณสมบัติที่จริงในดินที่มีการเก็บเบญจกลับไป

การเตรียมดินก่อนวิเคราะห์ น้ำวิจัยด้วยสารอาลกกันเป็น 1 ดิวอย่าง ผสมให้เข้ากันตึงให้เท่งกลางเดาจากนั้นนำ้งาระดับตะวันออกจนขนาด 10 mesh เพื่อกระจายเสิ่งแปลงปลอมออก

6.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพระรา-ศิลป์ที่ตัวอย่างดิน (ตัดแปลงจากวิธีของบุญเสริม เจริญ, (2540))

น้ำตัวอย่างดิน 100 กรัม ตกดับตัวอย่างซี (100 มิลลิลิตร เขย่านเครื่องเขย่านเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรัมแล้ววิ่งส่วนสารละลายใช้ให้ตกดับเครื่องตกซึ่ง'eckum พวกน้ำส่วน 1:1 บริเวณ 100 มิลลิลิตร เขย่าอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง รวมส่วนสารละลายได้ตั้งก้นแล้วตกดับเครื่องออกซิค 500 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในกรวยแลกสารทั้งส่วนน้ำ ส่วนสารละลายลุกความชั่ว ดวิสสารละลายโดมิคั้นเพิ่มเติมปราสาทข้ามจากนั้นนำระดับตะวันออก Rotary evaporator เพื่อระเหยน้าออกเซสเครื่องวิปริต 1 มิลลิลิตร ทำการ clean up สารที่ตกด้วย Florisil แล้วขั้นใดใดจะต่อ โคลนนิวแทน 40 มิลลิลิตร ระเหยออกเครื่องวิปริต Rotary evaporator จากนั้นแลกวิธีเครื่องรองรับของเดิมดินน้ำบอล สกินอินวิปริต 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารพระรา-ศิลป์ที่ Texture ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 5.2
6.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญบนสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ (ตั้งเป็นทางวิธีการของ Bidlan และ
Manonmani, 2002)

6.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Selective enrichment method

น้ำด้วายอย่างเดิม 10 กรัม ใส่ลงในอาหาร MSYM ที่ผสมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ความเข้มข้น 25 ที่
เพิ่มปริมาณ 100 มิลลิลิตร เข้าเกี่ยวกับความร้อน 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำข้อที่บ่มไว้ปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหาร MSYM ที่ผสมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ความเข้มข้น 25 ที่เพิ่มปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมใหม่ แล้วนามาน้ำควบคุมจากการล้าง ทำ
การล้างจากข้อที่ความเข้มข้นต่างๆ และ spread plate ลงบนอาหารแข็ง MSYM ผสมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ความเข้มข้น 25 ที่เพิ่ม คัดเลือกใกล้จิ้มเจลๆ นำใส่หลอดทดลองบรรจุอาหาร MSYM ผสม
สารอาหาร,หาร'
---คิดที่ความเข้มข้น 25 ที่เพิ่มเติมเก็บรักษา ทำการย้อมในอาหารใหม่ 3 - 4 ครั้ง นำ
ข้อที่คัดเลือกได้ไปทดสอบความสามารถในการย้อมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ในขั้นตอนต่อไป

6.2.2 การคัดเลือกข้อที่ยังมีความสามารถในการย้อมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่

โดยการเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA) ที่มีความเข้มข้นของสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ต่างๆ
คือ 25, 50 และ 100 ที่เพิ่ม จำนวนน้ำเชื้อที่หมักที่คัดแยกได้ในข้อ 6.2.1 มาเชื่อมรวมอาหารที่
เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่งคัดแยกสรุปๆ โดยนิว ซึ่งแสดง
ถึงลักษณะการใช้สารอาหาร,หาร'
---คิดที่ เลือก接近ได้ดังกล่าวทางทดสอบในขั้นตอนต่อไป

6.3 คัดเลือกข้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย้อมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่

น้ำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.2.2 นำเข้าข้อที่คัดเลือกทดสอบจากกลุ่มที่เก็บรักษา อยู่ใน
หลอดอาหาร Nutrient broth (NB) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้
culture suspension ที่วัดค่าอุณหภูมิ 600 นาโนแกรม เข้าเกี่ยวกับความร้อน 0.5 เพื่อไข่ไข่ขึ้นเริ่มต้น นำเข้า
ปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว MSYM ที่เสริมสารอาหาร,หาร'
---คิดที่ความเข้มข้น 25 ที่
เพิ่มปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมใหม่ ลงในอาหารแข็ง 250 มิลลิลิตร เข้าเกี่ยวกับความร้อน 150 รอบต่อนาที บ่ม
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อนามานำความร้อน
ปริมาณเซลล์โดยการวัดปริมาณโปรตีน ฟิโอซ ซึ่งปริมาณสารอาหาร,หาร'
---คิดที่โดย GC-ECD เลือกข้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการย้อมสารอาหาร โดยพิจารณาจากอัตราการย้อมสารและ
การเจริญของเชื้อ โดยหาอัตราการย้อมสารจากสูตร

\[ \text{อัตราการย้อมสาร} = \frac{A - B \times 100}{A} \]
A = ความเข้มข้นสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้นในอาหารเลี้ยงชีวอ (พิทั่วถิ่น)
B = ความเข้มข้นสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้นในอาหารเลี้ยงชีวอ (พิทั่วถิ่น)

6.3.1 การสกัดสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้นอาหารเลี้ยงชีวอ
นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงชีวอ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างสารพารา, ตระกูล' เลือกตัวอย่าง Rotary evaporator และล้างล้านสารพารา, ตระกูล' ปริมาณ 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น GC-ECD ตามวิธีการในข้อ 5.2

6.4 ผลการวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น
นำตัวอย่างอาหารมันฝรั่งที่เป็นตัวอย่างข้อ 6.3 โดยเข้าใจจากหลายตัวอย่างข้อ 1 ถูกล้างในอาหารเหลว NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลือกตัวอย่างที่ถูกต้องที่ 30 องศาเซลเซียส วัดความวุ่นที่ความยาระดับ 660 นาโนแวร์ จนถึงระดับ 0.5 เพื่ออภิปรายเป็นตัวอย่างเริ่มต้น

6.4.1 ผลการวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น
นำตัวอย่างอาหารมันฝรั่งที่เป็นตัวอย่างข้อ 6.3 โดยเข้าใจจากหลายตัวอย่าง MSYM ที่มีสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น ความเข้มข้น 25 พิทั่วถิ่น นักชีวจุลชีวที่ถูกต้องที่ 25, 30, 37, และ 45 องศาเซลเซียส เจอที่ความวุ่น 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง ใช้อาหาร MSYM ที่เสริมสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น 25 พิทั่วถิ่น และไม่มีการเติมเข้าร่วมต้นสู่การเป็นผุคลิ่ง วัดการเจริญขยายน้อยการวิเคราะห์โปรตีน ปิโตร วิเคราะห์ปริมาณสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้นโดยทำเครื่อง GC-ECD ตัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น GC-ECD เป็นต้น ทำการวิเคราะห์จากชุดและผลการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น

6.4.2 ผลการวิเคราะห์ที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น
นำตัวอย่างอาหารมันฝรั่งที่เป็นตัวอย่างข้อ 6.3 โดยเข้าใจจากหลายตัวอย่าง MSYM ที่มีสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น ความเข้มข้น 25 พิทั่วถิ่น ปรับที่เข้าใจที่เป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, และ 8.0 โดยใช้อากาศที่ไม่ปรับที่เข้าใจเป็นชุดความคู่ เจอที่ความวุ่น 150 รอบต่อนาที ปรับตัวอย่างที่ถูกต้องที่กัดออกได้ในข้อ 6.4.1 เบี่ยงเวลา 10 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง วัดการเจริญขยายน้อยการวิเคราะห์โปรตีน ปิโตร วิเคราะห์ปริมาณสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้นโดยทำเครื่อง GC-ECD ตัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น GC-ECD เป็นต้น จากชุดและผลการย่อยสารพารา, ตระกูล' -ดีเล็กต้น
6.4.3 ศึกษาผลของสารอาหารที่เหมาะสมต่อประสิทธิภาพในการย่อยอ่อนยานสารอาหาร, ทร้า'-คลีที
ปิดโดยเริ่มต้นที่เตรียมไว้มาวันละ 10 ใส่ลงในอาหาร SYM ที่เสริมสารอาหาร, ทร้า'-
คลีที 25 ฟิวซึม โดยเติมสารอาหารดังต่อไปนี้
• ขั้นที่ 1 กลูโคส ร้อยละ 0.5
• ขั้นที่ 2 ซูโครส ร้อยละ 0.5
• ขั้นที่ 3 ชักจิตสี (เกลือโซเดียม) ร้อยละ 0.5
• ขั้นที่ 4 อะซิเตต (เกลือโซเดียม) ร้อยละ 0.5
• ขั้นที่ 5 กลิ่นหอม ร้อยละ 0.5
• ขั้นที่ 6 ซิลิคก์ ร้อยละ 0.5

ใช้อาหาร SYM ที่เสริมสารอาหาร, ทร้า'-คลีที 25 ฟิวซึมและไม่มีการเติมชีวเริ่มต้นลง
ไปเป็นชุดควบคุม โดยใช้อาหารเลือกที่สอดคล้องได้จากข้อ 6.4.1 และ 6.4.2 เหล่านี้ที่ความเร็ว 150
รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง วัดการเจริญชัยลักษณะการวิเคราะห์
ปริมาณ พืช, วัคเวอร์ร่าปริมาณสารอาหาร, ทร้า'-คลีทีที่ลดลง คัดเลือกสารอาหารที่เหมาะสมที่สุด
ไปศึกษาในขั้นต่อไป

6.4.4 ศึกษาผลของบริโภคสารอาหาร, ทร้า'-คลีทีต่อประสิทธิภาพในการย่อยอ่อนยานโดย
สุนัขรีย์ที่กัดเลือกได้
ปิดโดยเริ่มต้นที่เตรียมไว้มาวันละ 10 ใส่ลงในอาหาร SYM ที่เสริมสาร
อาหาร, ทร้า'-คลีทีขั้นต่ำ 10, 15, 20 และ 25 ฟิวซึม โดยใช้อาหาร SYM ที่เสริมสารอาหาร, ทร้า'-
คลีทีขั้นต่ำ 25 ฟิวซึม และไม่มีการเติมชีวเริ่มต้นลงไปเป็นชุดควบคุม เช่นที่ความเร็ว 150
รอบต่อนาที ปิดขั้นต่ำอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง
การเจริญชัยลักษณะการวิเคราะห์ปริมาณ พืช, วัคเวอร์ร่าปริมาณสารอาหาร, ทร้า'-คลีทีที่ลดลงเพื่อศึกษา
ความเข้มข้นสูงสุดที่ซื้อสามารถย่อยอ่อนยานสารอาหาร, ทร้า'-คลีที ได้สูงสุด

6.5 จำนวนชนิดของเชื้อที่สามารถย่อยอ่อนยานสารอาหาร, ทร้า'-คลีที
เตรียมเชื้อเริ่มต้นเชื้อในขั้นต่ำ 6.4 จากนั้นนำไปเจาะชนิดเชื้อ ดังนี้
6.5.1 ทดสอบทางอินทรีย์ โดยการขีดแกรม, ฐานปร่าง, ขนาดและสารเรียบตัวของเชื้อ
6.5.2 ทดสอบทางเขียน (ตำรับการขีดแกรม Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Noel,
1984))
ทดสอบกลาตาแลส (Catalase test) การผลิตอินโดล (Production of indole) การทดสอบ
Methyl red test การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) ทดสอบการใช้ในเวฟ (Citrate utilization
test) การทดสอบการสร้างแก๊สไฮโดรเจนซิลเฟด (Hydrogen sulfide production test) การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test) การทดสอบกลาตาส (Catalase test) การคัดแยกความสามารถในการเคลื่อนที่ (Motility test) การทำให้เจลติดผึ้ง (Gelatin liquifaction) กระบวนการเปลี่ยนในเคราะห์ (Nitrate reduction) การทดสอบการออกซิไดซ์และการหมัก (Oxidation-fermentation test)

6.5.3 การลำดับยีนของ 16S rDNA

6.5.3.1 การสะกัดคิลิเคาน์ของยีน (วิธี Boiling method คลัดแปลงจาก Yamada และคณะ (2002))

โดยเขี่ยเชื้อจากหลอดที่เก็บรักษาเชื้อในอาหาร NB ที่เก็บอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ปั่นเพื่อชั่วคราว 1 นาที ผลิตภัณฑ์ Microcentrifuge น้ำในปั่นเหนือที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นในส่วนต่อ Scienc แล้ว.join ด้วย TE buffer 2 ครั้ง แล้วกลับหลังกระดาษ TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปกับตัวอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที สลักกับการเชื้อหนึ่งนาที นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปในวิวกระจดด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเดี่ยวคีย์วิธี Polymerase chain reaction (PCR)

6.5.3.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA (คลัดแปลงจากวิธีการของ Blackall (1999) และ Lee และคณะ (2003))

ใช้ primer เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA ดังแสดงในตารางที่ 2 เดิมสารสำหรับทำ PCR ดังนี้ 10xPCR buffer 5 ไมโครลิตร สารประกอบ dNTPs ความเข้มข้นชนิดละ 0.2 มิลลิโมล primer ทั้งสองชนิด ชนิดละ 2 ไมโครลิตร ตัวอย่างเชื้อแยกประเทียกได้ 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ Taq polymerase 2.5 Units และน้ำประชันกลิ่นที่เชื้อแบ่งปลายน้ำให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการ Denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้คือระยะ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อว่าที่ได้ไปวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ขนาดโดยปริมาณที่เข้มของ Molecular marker

น้ำเชื้อว่าที่เขี่ยเชื้อเพิ่มจำนวนแล้วนำไปสำหรับวิวชุดด้วย PCR purification kit (QIAGEN, Inc.) ก่อนส่งไปทำด้วยเครื่อง sequencer ด้วยการเพิ่มปริมาณของลำดับแบบที่ได้เก็บข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
<table>
<thead>
<tr>
<th>Primer</th>
<th>sequence (5’-3’)</th>
<th>Tm (°C)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>27F</td>
<td>AGAGTTTGATCCTGGCTCAG</td>
<td>60.4</td>
</tr>
<tr>
<td>63F</td>
<td>CAGGCCTAACACATGCAAGTC</td>
<td>54.4</td>
</tr>
<tr>
<td>339F</td>
<td>CTCCTACGGGAGGCAGCAG</td>
<td>66.6</td>
</tr>
<tr>
<td>785F</td>
<td>GGATTAGATACCCCTGGTAGTC</td>
<td>60.6</td>
</tr>
<tr>
<td>1099F</td>
<td>GCAACGAGCGCAACCC</td>
<td>61.8</td>
</tr>
<tr>
<td>531R</td>
<td>TACCGCGGCTGCTGGCA</td>
<td>66.7</td>
</tr>
<tr>
<td>802R</td>
<td>TACCAAGGTATCTAATCC</td>
<td>55.3</td>
</tr>
<tr>
<td>1115R</td>
<td>AGGGTTGCGCTCGTTG</td>
<td>59.3</td>
</tr>
<tr>
<td>1492R</td>
<td>ACGGCTACCTTGTACGAC</td>
<td>60.6</td>
</tr>
</tbody>
</table>