บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) เขย่าแบบโรตารี ของบริษัท New Brunswich Scientific Co., USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat System Ultrasonics, USA.

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ larminar flow รุ่น ISSCO BV-128 ของ International Scientific Supply Co., Ltd. ประเทศไทย

SEP-PAK C18 Cartridge รุ่น classic ของบริษัท Waters, USA.

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) รุ่น GC-7AG ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- คอลัมน์ (column) ชนิด OV-17 ของบริษัท Shimadzu, Japan
- เครื่องตรวจสอบ (detector) ชนิด FID (Flame ionization detector)
- เครื่องบันทึก (recorder)
- กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe)
- แก๊สไนโตรเจน

ทินเลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี (thin layer chromatography)

- แผ่นอะลูมิเนียมชนิดซิลิกาเจล ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.25 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck, USA. (TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254})

- แทงค์โครมาโตกราฟฟี (Chromatography tank) ขนาด 22x27.5 เซนติเมตร

เครื่องชั่งรุ่น L2200 P และ A200S ของ Sartorius, U.S.A.

เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath shaker) รุ่น 1068 เขย่าแบบรีซิโปรคอล ของบริษัท Gesellschaft fur labortechnik (GEL), Germany.

เคมีภัณฑ์

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) (HCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.

กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.

เบนซีน (benzene) ของบริษัท E. Merck, Germany.

ไดออกเซน (dioxane) ของบริษัท E. Merck, Germany.

กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.

ไดเบนโซไธโอฟีน (dibenzothiophene) ของบริษัท Aldrich Chemical Company, Inc., USA.

นิวเตรียนท์ บรอท (nutrient broth) ของบริษัท Difco laboratories, USA.

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.

โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท E. Merck, Germany.

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ของบริษัท E. Merck, Germany.

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd. Poole, England

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.7H_2O$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

กลูโคส (glucose) ของบริษัท E. Merck, Germany.

เมทธานอล (methanol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล (2-hydroxybiphenyl) ของบริษัท Aldrich Chemical Company Inc., USA.

เบตา-นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (β - nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) ของบริษัท Sigma, USA.

โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ของบริษัท Sigma, USA.

เอทธิล อะซิเทต (ethyl acetate) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti,

เคซีน (casein) ของบริษัท Sigma, USA.

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แบคโต-เปปโทน (bacto-peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แบคโต-ทริปโตน (bacto-tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ไดเมทธิลฟอร์มาร์มิด (N,N-dimethylformamide) ของบริษัท Sigma, USA.

อะกาโรส (agarose) ของบริษัท FBC Bio Product, USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายกำมะถันอินทรีย์โดยใช้ไดเบนโซไธโอฟีน (dibenzothiophene, DBT) เป็นตัวแทนของกำมะถันอินทรีย์

1.1 ใส่ตัวอย่างดินจากสถานที่ต่าง ๆ คือ เหมืองแม่เมาะ จังหวัดลำปาง, บ่อน้ำพุร้อน แจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง, โป่งเดือด จังหวัดเชียงราย และบ่อน้ำพุร้อนแม่ขะจาน จังหวัดเชียงราย ประมาณ 1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปราศจากแหล่งกำมะถัน (sulfur-free mineral medium, SFMM) (Omori et al, 1992, ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ซึ่งเติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมและบ่มที่ภาวะเดิม โดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง

1.2 นำเชื้อจากข้อ 1.1 ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเตรียนท์ บรอท-สารสกัดจากยีสต์ (nutrient broth-yeast extract, NBYE) (Monticello et al, 1985, ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

1.3 นำเชื้อจากข้อ 1.2 มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นลดลงตามลำดับทีละ 10 เท่า (10-fold serial dilution) ใช้ปิเปตดูดเชื้อในแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. ใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NBYE ตามสูตรในภาคผนวก ก หมายเลข 2 (ซึ่งมีวุ้นผง 1.6 เปอร์เซ็นต์) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และมีผิวหน้าแห้งพอเหมาะ จากนั้นกระจาย (spread) เชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique)

1.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิมและบ่มที่ภาวะเดิม ปลูกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16 มม. x 150 มม. นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วย

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ผสมเชื้อที่ได้กับกลีเซอรอล (glycerol) เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:1 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยวิถี 4S โดยการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยทิน เลเยอร์ โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) (Omori et al,1992)

2.1 การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) โดยใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยว ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหารแข็ง NBYE (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ปลูกลงในอาหารเหลว NBYE ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในทดลองขนาด 16 มม. x 150 มม. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ในปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 5 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16 มม. x 150 มม. นำไปบ่มที่อุณหภูมิและภาวะเดิม เป็นเวลา 3 วัน

2.2 การสกัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยกิจกรรมของแบคทีเรีย

สกัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 2.1 โดยนำเชื้อที่ได้มาแยกเอาเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเท่ากับ 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) จากนั้นนำมาปริมาตร 5 มล. มาผ่านลงในคอลัมน์เซพแพค ซี 18 (Sep-Pak C18) แล้วชะคอลัมน์ด้วยเมทธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 1 มล. เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา เรียกสิ่งที่เตรียมได้นี้ว่า crude extract

วิธีเตรียมคอลัมน์เซพแพค ซี 18

คอลัมน์เซพแพค ซี 18 เป็นคอลัมน์สำเร็จรูปของบริษัท Water, USA มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 1.2 ซม. ภายในบรรจุคาร์บอน 18 จำนวน 360 มก. นำคอลัมน์ดังกล่าวมาล้างด้วยเมทธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตรประมาณ 10 มล. แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 15 มล. อีก 2 ครั้ง ก่อนใช้

2.3 การวิเคราะห์โดยวิธีทิน เลเยอร์ โครมาโตกราฟฟี

นำ crude extract ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร มาหยดในแนวระนาบ สูง 2 ซม. จากขอบล่างของแผ่นซิลิกา เจล (silica gel plate) ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.25 มม. ซึ่งมีสารเรืองแสงเป็นองค์ประกอบ เป่าด้วยเครื่องเป่าลมร้อนให้แห้ง แล้วนำมาใส่ในแทงค์ (tank) ขนาด 22x27.5 ซม. ที่มีเบนซีน (benzene) -ไดออกเซน (dioxane) -กรดอะซิติค (acetic acid) ในอัตราส่วน 90:25:4 โดยปริมาตร ปริมาตร 119 มล. บรรจุอยู่ ทิ้งไว้ให้สารละลายข้างต้นชะ crude extract และสารมาตรฐาน ขึ้นไปถึงระดับ 2 ซม. จากขอบแผ่นซิลิกาเจลด้านบน ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาตรวจดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แสงสีเหลืองอมเขียว) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ 2- ไฮดรอกซีไบฟีนิล (2-hydroxybiphenyl, 2-HBP) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ละลายในเมทธานอลเป็นสารมาตรฐาน หยดในปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ที่ตรวจพบ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ใน crude extract มาใช้ในการศึกษาต่อไป

3. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยกิจกรรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ด้วยแก๊ส โครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) ว่าเป็น 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล (Izumi และคณะ, 1994)

3.1 การเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหารแข็ง NBYE ปลูกลงในอาหารเหลว NBYE ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนน้ำใส นำเซลล์ที่ได้ใส่ในอาหารเหลว SFMM ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. แล้วใช้เป็นหัวเชื้อปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว SFMM ที่เติมไดเบน-โซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 200 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. โดยให้มีค่าความขุ่นเริ่มต้น (initial optical density) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เป็น 0.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิและภาวะเดิม เป็นเวลา 3 วัน

3.2 การสกัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนโดยกิจกรรมของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ 3.1 มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วสกัดด้วยเอทธิล อะซิเทต (ethyl acetate) ในปริมาตร 0.8 เท่าของปริมาตร เก็บเฉพาะชั้นเอทธิล อะซิเทต ซึ่งอยู่ด้านบนใส่ลงในขวดระเหยรูปกลม ขนาด 500 มล. นำมาระเหยเอทธิล อะซิเทตออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ละลายในเอทธิล อะซิเทตโดยการเติมเอทธิล อะซิเทตลงไป 1 มล. เขย่าให้ทั่ว แล้วดูดสารละลายที่ได้ใส่ในไมโครฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนจนเหลือปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ไมโครลิตร

3.3 การวิเคราะห์โดยแก๊ส โครมาโตกราฟฟี

นำสารที่สกัดได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยแก๊ส โครมาโตกราฟี ภาวะของแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ที่ใช้เป็นดังนี้

เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟฟี	:	รุ่น 7AG
คอลัมน์	:	OV-17, glass column ขนาด 3.3 มม. x 8 ฟุต, 5 เปอร์เซ็นต์ chromosorb
เครื่องตรวจสอบ	:	ชนิด FID (Flame Ionization Detector)
อุณหภูมิของ injector port	:	220 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ oven	:	140-220 องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	:	4 องศาเซลเซียสต่อนาที
อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน	:	50 มล.ต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE (ภาคผนวก ก หมายเลข 2)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 200 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็นอุณหภูมิ 25-30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ติดตามการเจริญของเชื้อจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 200 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็นอุณหภูมิ 25-30, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ติดตามวัดการเจริญของเชื้อจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

5. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

5.1 การหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารแต่ละชนิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) (Na_2HPO_4 0.22 เปอร์เซ็นต์, KH_2PO_4 0.08 เปอร์เซ็นต์, NH_4NO_3 0.30 เปอร์เซ็นต์, $FeCl_3$ $6H_2O$ 0.001 เปอร์เซ็นต์, $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 เปอร์เซ็นต์, $MgCl_2.7H_2O$ 0.001 เปอร์เซ็นต์, สารสกัดจากยีสต์ 0.005 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์) (น้ำหนัก/ปริมาตร)

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีการในข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ใน

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ติดตามวัดการเจริญของเชื้อจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และติดตามวัดค่าความเป็นกรดด่างตลอดการทดลอง โดยแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของสารอาหารแต่ละชนิด เมื่อให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารอาหารอื่นคงที่ตามสูตรอาหาร SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1)

5.1.1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต/โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4/KH_2PO_4) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.22/0.08, 0.44/0.16 และ 0.66/0.24 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.1.2 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.3, 0.6 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.1.3 เฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.001, 0.002, 0.005 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.1.4 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$) ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.001, 0.002, 0.005 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.1.5 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 .7H_2O$) ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.001, 0.002, 0.005 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.1.6 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.1.7 กลูโคส (glucose) ความเข้มข้นสุดท้าย 0, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.2 การศึกษาผลของชนิดของวิตามินต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีในข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่เติมวิตามินชนิดต่าง ๆ แทน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ลิตร ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างทุก ๆ วัน ตลอดการทดลอง ชนิดของวิตามินที่ใช้ทดสอบเป็นดังนี้คือ

5.2.1 พารา-อะมิโนเบนโซอิค แอซิด (p-aminobenzoic acid)

5.2.2 ไบโอติน (biotin)

5.2.3 แคลเซียมแพนโตธีเนท (calcium pantothenate)

5.2.4 กรดโฟลิค (folic acid)

5.2.5 ไอโนซิทอล (inositol)

5.2.6 กรดนิโคตินิก (nicotinic acid)

5.2.7 ไพริดอกซีน (pyridoxine)

5.2.8 ไรโบเฟลวิน (riboflavin)

5.2.9 ไทอามีน (thiamine)

5.2.10 ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin)

5.2.11 วิตามินรวม (vitamin mixture) ประกอบด้วยวิตามินชนิดต่าง ๆ ตามข้อ 5.2.1-5.2.10

5.3 การศึกษาผลของชนิดกรดอะมิโนต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีการในข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/ลิตร ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดต่างทุก ๆ วัน ตลอดการทดลอง ชนิดของกรดอะมิโนที่ทดสอบเป็นดังนี้

5.3.1 ดีแอล-อะลานีน (DL-alanine)

5.3.2 แอล-อาร์จีนีน (L-arginine)

5.3.3 ดีแอล-แอสพาร์ติก แอซิด (DL-aspartic acid)

5.3.4 แอล-กลูตามิค แอซิด (L-glutamic acid)

5.3.5 แอล-ฮิสติดีน (L-histidine)

5.3.6 แอล-ลิวซีน (L-leucine)

5.3.7 ดีแอล-ไลซีน ไฮโดรคลอไรด์ (DL-lysine HCl)

5.3.8 แอล-เมทไธโอนีน (L-methionine)

5.3.9 แอล-ฟีนิลอะนีน (L-phenylalanine)

5.3.10 แอล-โพลีน (L-proline)

5.3.11 ดีแอล-ซีรีน (DL-serine)

5.3.12 แอล-ทรีโอนีน (L-threonine)

5.3.13 ดีแอล-ทริปโตเฟน (DL-tryptophan)

5.3.14 แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)

5.3.15 ดีแอล-วาลีน (DL-valine)

5.3.16 กรดอะมิโนรวม ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดและปริมาณตามข้อ 5.3.1-5.3.15

5.4 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีในข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แต่เติมไนโตรเจนอินทรีย์โดยการแปรผันทั้งชนิดและความเข้มข้น อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 100 มล. บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วัดการเจริญของเชื้อจากค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันตลอดการทดลอง ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ทดสอบเป็นดังนี้

5.4.1 เคซีน (casein) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.01, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.4.2 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.4.3 เปปโตน (peptone) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

5.4.4 ทริปโตน (tryptone) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ชุดควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.005 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ตรวจพบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนได้เป็น 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล

6. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนและการสร้าง 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีการในข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมเคซีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แทนสารสกัดจากยีสต์ และเติมไดเบนโซไธโอฟีน แต่ลดความเข้มข้นสุดท้ายจากเดิม 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือ 2.714 มิลลิโมลาร์ ลงเป็น 0.125 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นปริมาณที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณไดเบนโซไธโอฟีน และ 2-ไฮดรอกซีไบฟีนิล ด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการในข้อ 3.2 และ 3.3

7. การศึกษาผลของ NADH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ (cell-free extract) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 (Izumi และคณะ, 1994)

7.1 การเตรียมเซลล์

เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ตามวิธีในข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SFMM (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.136 มิลลิโมลาร์ และเติมเคซีนความเข้มข้นสุดท้าย 0.20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. จำนวน 8 ขวด นำไปบ่มไว้บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาแยกเก็บเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) จำนวน 50 มล. เก็บเซลล์ที่ล้างแล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.2 การเตรียมสารสกัดจากเซลล์

นำเซลล์ที่เตรียมได้จากข้อ 7.1 หนักประมาณ 2 กรัม มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์โปแทสเซียมฟอสเฟต เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ปริมาตร 4 มล. นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นานครั้งละ 2 นาที เป็นเวลารวม 10 นาที โดยควบคุมให้เซลล์แบคทีเรียแช่อยู่ในน้ำผสมน้ำแข็ง

ตลอดเวลา จากนั้นนำมาแยกส่วนกากเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์

7.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์ โดยการวัดปริมาณการลดลงของไดเบนโซไธโอฟีน

เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Izumi และคณะ (1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งหมด 0.5 มล. ประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โปแทสเซียมฟอสเฟต ความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์, ไดเบนโซไธโอฟีนเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (N, N-dimethylformamide) เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดจากเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีน 1.5 มก. นำส่วนผสมนี้ไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเติมเฮกซิลอะซีเทตลงไป ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อสกัดไดเบนโซไธโอฟีน จากนั้นเก็บเอาเฉพาะชั้นของเฮกซิล อะซีเตท ซึ่งอยู่ด้านบน มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสมาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการระเหยด้วยแก๊สไนโตรเจน จนเหลือปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไดเบนโซไธโอฟีนด้วยวิธีแก๊ส โครมาโตกราฟฟี

7.4 การศึกษาผลของ NADH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไดเบนโซไธโอฟีนในสารสกัดจากเซลล์

ทำตามวิธีการในข้อ 7.3 โดยการเติม NADH ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ ลงไปในส่วนผสมของปฏิกิริยา

8. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ทางอนุกรมวิธาน

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 มาจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานในระดับจีนัส (genus) โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characteristics) และการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Characteristics) (Cowan, 1974)

I 17280612

8.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 โดยวิธี streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar; ภาคผนวก ก หมายเลข 3) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเดี่ยวที่ได้ นำโคโลนีเดี่ยวมาศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการย้อมสีกรัม และวิธีการย้อมสีสปอร์

8.2 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 3), อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโอ-เอฟ เบซัล (OF Basal medium; ภาคผนวก ก หมายเลข 4), อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฟีนอล เรด เบส (Phenol red broth base; ภาคผนวก ก หมายเลข 5)

ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังต่อไปนี้ กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) กิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสของเซลล์ว่าเกิดขึ้นโดยกระบวนการออกซิเดชันหรือกระบวนการเฟอร์เมนเตชัน (OF test) ปฏิกิริยาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวฟีนอล เรด เบส ว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้มีความเป็นกรดหรือมีความเป็นด่าง (Phenol red test)

9. การตรวจหาพลาสมิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ K10

วิธีการสกัดพลาสมิดชนิด covalent-closed circular จากแบคทีเรียสายพันธุ์ K10 โดยวิธีของ Kado และ Liu (1981) นำเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ K10 ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NBYE (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่เติมไดเบนโซไธโอฟีน ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นองค์ประกอบ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม. จำนวน 0.45 มล. ใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. ปั่นแยกเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ E (ภาคผนวก ข หมายเลข 20) จำนวน 0.15 มล. เติมสารละลายไลซิง (lysing solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 17) จำนวน 0.3 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม (phenol:chloroform) (ภาคผนวก ข หมายเลข 18) จำนวน 0.9 มล. ผสมให้เข้ากันอย่างนุ่มนวล (gently mix) ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายส่วนน้ำใสชั้นบนใส่ลงในหลอดไมโครฟิวจ์หลอดใหม่ ทำการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล:คลอโรฟอร์ม ซ้ำอีก 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเทตเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลาย

ดีเอ็นเอที่ได้ เติมเอทธานอลสัมบูรณ์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสุดท้าย แช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 1 มล. โดยไม่เขย่า ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งในโถดูดความชื้นภายใต้สูญญากาศ (vacuum desiccator) ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ความเป็นกรดด่าง 7.6 จำนวน 50 ไมโครลิตร กำจัดอาร์เอ็นเอ (RNA) โดยการเติมเอนไซม์ RNAase เข้มข้น 1 มก./มล. จำนวน 2 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของ RNAase เท่ากับ 0.04 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายบัฟเฟอร์เจลโลดดิง (gel loading) (ภาคผนวก ข หมายเลข 19) จำนวน 4 ไมโครลิตร ลงในสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจล อิเลคโตรโฟริซิส (agarose gel eletrophoresis) โดยใช้อะกาโรสชนิด SEA KEM ความเข้มข้นสุดท้าย 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ E และใช้พลาสมิดที่สกัดจาก *E. coli* V517 (Mocrina และคณะ,1978) โดยวิธีการเดียวกัน เป็นพลาสมิดเปรียบเทียบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย