บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Baush & Lomb, USA.

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

4. เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.

5. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ(refrigerated centrifuge)รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, W.Germany.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Z320 ของบริษัท HERMEL, USA.

- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifige) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan.

6. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator)

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

- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ชนิดอ่าง) รุ่น FS4000 ของบริษัท Decon Ultra-sonics Ltd., England.

7. เครื่องปั่น (homogenizer) รุ่น AM-T ของบริษัท Nihon Seiki Kaisha, Japan.

8. เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries, USA

9. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ(rotary vacuum evaporator) รุ่นN ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.

10. ชุดเครื่องมือสำหรับเลี้ยงหอยทราย

- ตู้กระจก ขนาดกว้าง 10 นิ้ว ยาว 18 นิ้ว และสูง 12 นิ้ว
- เครื่องปั๊มลม รุ่น Giant Pump ของบริษัท Nissei Sangyo Co.,Ltd, Japan.
- ชุดกรองอากาศ รุ่น ACRO 50 ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Gelman
- หัวทราย (Air stone)
- สายยางให้อากาศ

11. ชุดเครื่องมือทดสอบกับเนื้อเยื่อ

- ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture flask) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.
- จานพลาสติกที่มีหลุมขนาดเล็ก 96 หลุม(96-well microtiter plate) ของบริษัท Nunc, Denmark.
- หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกขนาด 15 มล. (plastic centrifuge tube) ของบริษัทBecton Dickinson and Company, USA.
- กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) รุ่นC.K ของบริษัท Olympus, Japan.
- ปิเปต (pipet) และปิเปตเอด (pipet aid)
- เครื่องนับเซลล์ (haemacytometer).

12. SEP-PAK C_{18} cartridge รุ่น classic ของบริษัท Waters, USA.

13. หัวกรอง ขนาดความกว้างของรู 0.45 ไมครอน รุ่น HV ของบริษัท Nihon Millipore Tokyo K.K., Japan.

14. ชุดเครื่องมือทำลิควิดโครมาโตกราฟฟี-แมสเปคโตเมตรี(liquid chromatography-mass spectrometry)

- ลิควิดโครมาโตกราฟี(liquid chromatography) รุ่น626ของบริษัทWaters, USA.
- ชุดควบคุม (controller) รุ่น 600 S Controller ของบริษัท Waters , USA.

- เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) รุ่น VG TRIO 2,000 ของบริษัท Fisons instruments, USA.

15. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์กรดอะมิโน

- เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟฟี (liquid chromatography) รุ่น 501 ของบริษัท Waters, USA.

- คอลัมน์(column) C18Novapak ขนาด 30 ซม.x3.9 มม.ของบริษัท Waters, USA.

- ปั๊ม (pump) รุ่น 501 ของบริษัท Waters , USA.

- เครื่องตรวจสอบ (UV detector) spectrophotometer รุ่น486 ของบริษัท Waters ซึ่งตั้งความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร

- เครื่องประมวลผล (integration) การประมวลผลของโครมาโตแกรมใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ 801 Baseline version 3.31

16. ชุดเครื่องมือทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

- แผ่นเซลลูโลสอะซิเตต รุ่น Sepraphore III ขนาด 2.5x15.2 เซนติเมตร ของบริษัท Gelman Science, USA

- เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของบริษัท LKB, Sweden

- แชมเบอร์ (chamber)

- ชุดตรวจสอบ ประกอบด้วย

  - เครื่องพ่น (spray)

  - เครื่องเป่า (dryer)

  - ตู้อบ (hot air oven)

  - เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-lamp) รุ่น UVL-21 ของบริษัท UVP, USA.

17.ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

- เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- คอลัมน์ (column) Senshu Pak ODS-3251-D,stainless steelขนาด8.0x250 มม. บริษัท Senshu Scientific, Japan.

- ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) รุ่น 2IK 6GN-Aของบริษัท Orental Motor Co.,Ltd.,Japan

- เครื่องตรวจสอบ (detector) fluoromonitor รุ่น RF-530 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- เครื่องบันทึก (recorder) Chromatopac รุ่นR-111ของบริษัท Shimadzu, Japan.

เคมีภัณฑ์

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. โพติโอสเพปโตนหมายเลข 3.(proteose peptone No.3) ของบริษัทDifco Laboratories, USA.
3. โพลีเพปโตน (polypeptone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.
4. กลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck, Germany.
5. ไฟโตน (phytone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.
6. วิตามิน บี 12 (vitamine B12) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
7. ไบโอติน (biotin) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.
8. ทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) อะมิโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma Chemical,USA.
9. ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ของบริษัท Gibco, USA.
10. เมทธานอล (CH_3OH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
11. เอทธานอล (C_2H_5OH) ของบริษัท E.Merck , Germany.
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
13. กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E.Merck, Germany.
14. อะซิโตไนทริล (CH_3CN) ของบริษัท E.Merck, Germany.
15. สารมาตรฐาน เทโทรโดทอกซินของบริษัท Sigma Chemical, USA.
16. ฟีตัลโบวีนซีรัม (fetal bovine serum) ของบริษัท Gibco, USA.
17. RPMI 1640 ของบริษัท Gibco, USA.

18. วอบาย (ouabain) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

19. เวอราตริดีน (veratridine) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

20. ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน(penicillin-streptomycin) ของบริษัท Gibco, USA.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยเป็นสารเคมีในระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade)

จุลินทรีย์

1. *Vibrio alginolyticus* ที่แยกจากหอยทรายบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (Juntongjin et al., 1993)

2. *Bacillus cereus* ที่แยกจากหอยทรายบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (วิชญา, 2536)

3. *Corynebacterium matruchotii* ที่แยกจากทราย บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (วิชญา, 2536)

4. *C. paurometabolum* ที่แยกจากหอยกระปุกบริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (วิชญา, 2536)

5. *Tetraselmis* sp. จากห้องปฏิบัติการสถานีวิจัยเกาะสีชัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียและหาเวลาที่เหมาะสมที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูงสุดภายในเซลล์

นำแบคทีเรียที่แยกจากหอยทราย หอยกระปุก และทราย มาทดสอบสมบัติการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยทำการทดลองต่อไปนี้

1.1 การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวเพื่อนำไปสกัดสารพิษ

เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็งORI (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) (Simidu et al., 1983) จำนวน 1 ลูป ปลูกลงในอาหารเหลว L-medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) (Juntongjin et al., 1993) ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 $^{\circ}$ซ นาน 24 ชั่วโมง นำหัวเชื้อมาวัดค่าความขุ่น (turbidity) ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและเจือจางหัวเชื้อให้ได้ O.D. 0.5 จากนั้นนำหัวเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 15 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวชนิดเดิมปริมาตร 150 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. จำนวน 5 ขวด นำไปเขย่า โดยใช้ภาวะเดิม เก็บเชื้อที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงตามลำดับ และนำเชื้อมาวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และการเจริญ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทำการนับจำนวนแบคทีเรียทุกช่วงเวลาโดยใช้วิธีนับบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) ที่มีอาหารแข็ง ORI ส่วนที่เหลือนำไปสกัดสารพิษจากเซลล์

1.2 การสกัดสารพิษจากเซลล์

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวจากข้อ1.1 มาแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ4°ซ เก็บเฉพาะส่วนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ภาวะเดิม เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้งและทำเช่นเดิมซ้ำอีกครั้ง แขวนลอยส่วนที่เป็นเซลล์ในกรดอะซิติก 0.1% (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 10-20 มล. จนได้ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4 ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) นาน 6 นาที ซึ่งระหว่างทำให้เซลล์แตกต้องควบคุมให้เซลล์อยู่ในอุณหภูมิต่ำ โดยการแช่หลอดที่บรรจุเซลล์ในน้ำแข็งตลอดเวลา และนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บเฉพาะส่วนน้ำใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) ส่วนผงที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย นำไปชั่งน้ำหนักแห้งทั้งหมดและเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

1.3 การตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ (tissue culture assay) อธิบายตามวิธีของ Kogure และคณะ (1988) ดังนี้

1.3.1การเตรียมตัวอย่างสารสกัดเพื่อใช้ตรวจสอบสารกีดขวางช่องโซเดียม

นำสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียในข้อ1.2 ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก และละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ โดยให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มก.ต่อ 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำมาตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ

1.3.2 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ที่ใช้ในการตรวจสอบ

เลี้ยงเซลล์ประสาทหนู (mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2A ATCC CCL 131) ในขวดพลาสติกชนิดคอเอียงสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture canted flask) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติมโบวีนซีรัม 10% (ภาคผนวก ก หมายเลข4) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ จนมีปริมาณเซลล์มากพอและสภาพเซลล์สมบูรณ์จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดจนแห้ง และเติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.3) ปริมาตร 2 มล. ดูดทิ้งเพื่อล้างเซลล์ไม่ดีออก เติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอปริมาตร 3 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ใช้มือเคาะข้างขวดหรือเป่าด้วยปิเปตเอดเบาๆ เพื่อให้เซลล์ที่ติดอยู่บนผิวขวดหลุดออกมา เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มล.เขย่าเบาๆ ดูดเซลล์ที่แขวนลอยใส่หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มล. ลงในหลอด ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆครั้ง เพื่อกระจายเซลล์ ดูดส่วนหนึ่งไปตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเครื่องนับเซลล์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) ใช้กำลังขยาย 200 เท่า และเจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 1.0-1.5 x 10^5 เซลล์ต่อมล.

1.3.3 วิธีการตรวจสอบสารกีดขวางช่องโซเดียม

นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมได้ (ความเข้มข้น1.0-1.5 x 10^5 เซลล์ต่อ มล.) ใส่ในหลุมจานพลาสติก (96-well microtiter plate) หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจดูสภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ ก่อนนำไปใช้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมๆละ 40 ไมโครลิตร และเติมตัวอย่างสารสกัดหลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและกวนเบาๆ เติมสารละลายวอบาย (ouabain) เข้มข้น 10 mM (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) หลุมละ 20 ไมโครลิตร และสารละลายเวอราตริดีน (veratridine) เข้มข้น 1 mM (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.2) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที ทำการทดลองสามซ้ำในแต่ละตัวอย่างและทำการทดลองชุดควบคุมควบคู่ไปด้วย โดยใช้สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซินของบริษัท Sigma Chemical USA. โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 0, 0.009, 0.017, 0.034, 0.069, 0.138, 0.275 และ 0.550 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ นำไปบ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro 2A ที่ยังมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดในแต่ละหลุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับกำลังขยาย 200 เท่า โดยสังเกตลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตจะมีรูปร่างรีหรือกลมผิวเซลล์เรียบและมองเห็นขอบเซลล์ชัดเจนส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีชีวิตจะมีรูปร่างกลมบวม ผิวเซลล์ขรุขระและมองเห็นขอบเซลล์ไม่ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะปรับระยะชัดของกล้อง (ภาคผนวก ค หมายเลข 2)

คำนวณหาร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิต แล้วนำไปหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากปริมาณ เทโทรโดทอกซินมาตรฐาน และจำนวนร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิต (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) โดยกำหนดให้เทโทรโดทอกซินมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวแทนสารในกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียม

ผลการทดลองจะนำมาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในปริมาณสูง 1 สายพันธุ์ และแบคทีเรียที่ไม่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมอีก 1 สายพันธุ์ เพื่อใช้สำหรับเลี้ยงหอยทรายในการวิจัยขั้นต่อไปโดยเลือกเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อช่วงที่มีการสะสมสารพิษในเซลล์สูงสุด

2. การตรวจหาระดับความเป็นพิษในเนื้อหอยทรายในช่วงหอยพิษสูง และพิษต่ำ ก่อนการเลี้ยงด้วยแบคทีเรีย

2.1 การเก็บตัวอย่างหอยทราย

การเก็บตัวอย่างหอยทราย แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือระยะหอยทรายมีพิษสูงและระยะหอยทรายมีพิษต่ำ จากบริเวณเกาะสีชังด้านที่ติดกับแผ่นดินใหญ่จังหวัดชลบุรีในสองระยะเวลาคือระยะหอยทรายมีพิษสูงเดือนมกราคม-มิถุนายน (Saitanu et. al., 1992) ได้เก็บในเดือนมีนาคม พ.ศ.2538 โดยเก็บตัวอย่างในเวลาที่น้ำเริ่มลง เลือกเก็บเฉพาะหอยทรายที่มีขนาดลำตัวใกล้เคียงกันกว้างระหว่าง 3.0-3.5 ซม. และยาวระหว่าง 5.0-5.5 ซม. ในระยะต่อมาเป็นระยะหอยทรายมีพิษต่ำระหว่างเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม (Saitanu et. al., 1992) ได้เก็บในเดือนสิงหาคม พ.ศ.2538 ที่บริเวณเดียวกันกับที่เก็บหอยทรายในระยะพิษสูงโดยเก็บหอยที่มีขนาดความกว้างและความยาวใกล้เคียงกับหอยที่เก็บในระยะหอยทรายมีพิษสูง นอกจากนี้ได้เก็บทรายบริเวณเดียวกันเพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงหอยทรายในห้องปฏิบัติการต่อไปนำหอยทรายใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาดและรีบนำมาทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทันที

2.2 การตรวจพิษในตัวอย่างเนื้อหอยทราย

นำหอยทรายมาล้างบริเวณเปลือกด้านนอกด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้อ แยกเนื้อหอยออก และปั่นด้วยเครื่องปั่น (homogenizer)ใช้ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทุกขั้นตอนทำแบบปราศจากเชื้อ แบ่งส่วนหนึ่งมานับจำนวนแบคทีเรียโดยทำการนับจำนวนบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) โดยใช้อาหารเข้ง ORI อีกส่วนหนึ่งเติมเมทธานอลที่มีกรดน้ำส้มผสมอยู่ 0.1% ปริมาตร 30 มล. แล้วทำให้อนุภาคแตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 12 นาที ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เก็บชั้นเมทธานอล ส่วนตะกอนของเนื้อหอยนำมาเติมเมทธานอลที่มีกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 30 มล. เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษและนำไปปั่นที่สภาวะเดิมเก็บส่วนเมทธานอล ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง เก็บรวบรวมส่วนเมทธานอลในการสกัดทั้ง 3 ครั้ง ใส่ขวดระเหยรูปกลม นำไประเหยเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator)

ที่อุณหภูมิ 60°ซ เติมเมทธานอลที่มีกรดน้ำส้ม 0.1%ลงไปอีก 30 มล.เขย่าและปั่นแยกตะกอนเพื่อเก็บชั้นเมทธานอลและระเหยเมทธานอลออกที่ภาวะเดิมทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนตะกอนมาเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 80 มล.เขย่าด้วยมือนาน 5 นาทีเพื่อสกัดไขมันและกรองคลอโรฟอร์มออกด้วยแผ่นกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ระเหยคลอโรฟอร์มที่ติดค้างอยู่โดยวางแผ่นกรองในเครื่องดูดความชื้น(desicator) นำส่วนตะกอนบนแผ่นกรองมาละลายด้วยกรดน้ำส้ม 0.1% ปริมาตร 15 มล. และผ่านในคอลัมน์สำเร็จรูปเซพแพค ซี 18 (ภาคผนวก ค ข้อ 3) เพื่อให้สารละลายมีความบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน และนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งจะอยู่ในลักษณะผงชั่งน้ำหนักสารสกัดนี้และนำบางส่วนไปตรวจระดับความเป็นพิษโดยนำสารสกัดจากเนื้อหอยทรายใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก(microtube)และละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มก.ต่อ 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดส่วนตะกอนที่อาจมีขึ้น และนำส่วนน้ำใสมาตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ

3. การเลี้ยงหอยทรายด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

3.1 การเตรียมอาหารเพื่อนำไปเลี้ยงหอยทราย

อาหารที่ใช้เลี้ยงหอยทรายประกอบด้วยอาหารแบบต่าง ๆ ดังนี้

3.1.1 แบคทีเรียสร้างพิษ และแบคทีเรียไม่สร้างพิษ

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างพิษ และแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่สร้างพิษ ซึ่งคัดเลือกได้ในข้อ 1 ได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารของหอย โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว (วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1) แบ่งมาตรวจดูความขุ่นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับO.D.ให้มีค่าเท่ากับ 1.8 ปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บเฉพาะส่วนเซลล์แบคทีเรีย และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสทิ้งและทำเช่นเดิมซ้ำอีกครั้ง ละลายตะกอน เซลล์ในน้ำทะเลปราศจากเชื้อปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.1.2 สาหร่ายไม่สร้างพิษที่เป็นอาหารตามธรรมชาติของหอยทราย

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลปราศจากเชื้อที่มีอาหารเหลว Walne' s medium 1มล.ต่อน้ำทะเล 1000 มล. (Walne, 1974) ให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด(maximum density) โดยนับเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์(haemacytometer) ให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ $5.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1000 มล.

3.1.3 สาหร่ายไม่สร้างพิษผสมกับแบคทีเรียสร้างพิษ

นำสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ผสมกับแบคทีเรียสร้างพิษโดยเตรียมสาหร่ายวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 และแบคทีเรียสร้างพิษวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แล้วละลายตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียสร้างพิษใน 1000 มิลลิลิตร ของสาหร่ายไม่สร้างพิษ

3.2 การเตรียมการเลี้ยงหอยทราย

3.2.1 การเตรียมทราย และน้ำทะเล

นำทรายที่เก็บจากที่อยู่ของหอยทรายบริเวณเกาะสีชัง ล้างให้สะอาดด้วยน้ำทะเลนำไปผึ่งแดดให้แห้งสนิท แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติกถุงละ 7 กิโลกรัม จำนวน 5 ถุง พรมน้ำทะเลให้มีความชื้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 121 ปอนด์ 30 นาที จากนั้นนำทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วไปอบแห้งที่ 80°ซ นาน 48 ชม. แบ่งบางส่วนมาสกัดสารพิษก่อนนำมาทำการทดลอง

นำน้ำทะเลมาปรับความเค็มด้วยน้ำประปาให้มีความเค็ม 30ppt และเก็บน้ำในถังพลาสติกให้คลอรีนในน้ำระเหยออกให้หมด เป็นเวลา 48 ชม. แบ่งน้ำทะเล ออกเป็น 5 ชุด ชุดละ 4 ลิตร จากนั้นนำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 121 ปอนด์ 15 นาที แบ่งบางส่วนมาสกัดสารพิษก่อนนำมาทำการทดลอง

3.2.2 การเตรียมภาชนะ และอุปกรณ์การให้อากาศ

นำตู้กระจกจำนวน 5 ตู้ สำหรับเลี้ยงหอยทรายมาล้างให้สะอาด เช็ดตู้ด้วยเอทธานอล 70% แล้วแช่ไว้นาน 24 ชม. โดยปิดฝาตู้ให้สนิท เช็ดเอทธานอลที่เหลือด้วยสำลีปราศจากเชื้อ นำหัวทราย และสายยางให้อากาศที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาต่อเข้ากับชุดกรองอากาศ และเครื่องให้อากาศ จากนั้นเติมทราย และน้ำทะเลปริมาตร 4 ลิตร ลงในตู้กระจก พ่นอากาศในน้ำทะเลในตู้ไว้นาน 24 ชม. ก่อนนำหอยทรายใส่ลงไปเพื่อทำการทดลอง

3.2.3 การเตรียมหอยทรายเพื่อใช้เลี้ยงในการทดลอง

นำหอยทรายมาล้างเปลือกภายนอกด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้อซึ่งปรับความเค็ม 30 ppt จากนั้นจึงนำหอยลงไปแช่ในน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อที่ความเค็มดังกล่าวเป็นเวลา24ชม.โดยไม่ให้อาหารเพื่อให้หอยถ่ายเทอาหารเดิมในกระเพาะ รวมทั้งแบคทีเรียภายในตัวออก

4. การเลี้ยงหอยทรายด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

นำหอยที่ล้างกระเพาะแล้วลงเลี้ยงในทราย และน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 โดยใส่ลงตู้ ๆ ละ 60 ตัวจำนวน 5 ตู้ แต่ละตู้ทำการทดลองให้อาหารต่างกันดังนี้

- แบคทีเรียสร้างพิษ
- แบคทีเรียไม่สร้างพิษ
- สาหร่ายไม่สร้างพิษที่เป็นอาหารตามปกติของหอย
- สาหร่ายไม่สร้างพิษผสมกับแบคทีเรียสร้างพิษ
- ไม่มีการให้อาหาร

ให้อาหารชนิดต่าง ๆ ดังกล่าว ในวันแรกของวันที่ทำการทดลอง เก็บตัวอย่างหอย 7 ตัวหลังให้อาหาร ในแต่ละวันต่อมาจนกระทั่งครบ 8 วัน

หมายเหตุ การเตรียมอาหารเพื่อนำไปเลี้ยงหอยทรายในข้อ 3.1 จะต้องแบ่งบางส่วนนำมาสกัดสารพิษด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.2 และหาปริมาณสารพิษโดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ

4. วิเคราะห์ระดับความเป็นพิษในเนื้อหอยทราย หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารในข้อ 3.1 โดยวิธีทดสอบกับเนื้อเยื่อ

นำเนื้อหอยที่เก็บ 7 ตัวในแต่ละวันมาสกัดสารพิษ และตรวจวัดระดับความเป็นพิษในเนื้อหอยทรายโดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.2 รวมทั้งตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียในน้ำทะเลในแต่ละตู้ที่ทำการทดลองเลี้ยงหอยทราย และในเนื้อหอยทรายที่เก็บตัวอย่างในแต่ละวัน โดยทำการนับจำนวนบนจานเพาะเชื้อ (viable plate count) ที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดสังเกตความแตกต่างของโคโลนี และสุ่มบางส่วนมาตรวจสอบการติดสีแกรม และความสามารถในการสร้างสารพิษ

5. วิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยจากพิษที่เกิดขึ้นในหอยที่ให้อาหารด้วยแบคทีเรียโดยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิส

ตรวจสอบและวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยในหอยทรายก่อน และหลังการทดลองเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ในระยะพิษสูงและพิษต่ำโดยหยดสารมาตรฐาน และสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ลงบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate membrane) ของบริษัทGelman Sciences, USA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดคือชุดการวิเคราะห์อนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน และชุดการวิเคราะห์อนุพันธุ์พิษอัมพาตจากหอยได้แก่กอนิออทอกซิน1,2และ3 โดยใช้สารละลายอิเลคโตรไลท์บัฟเฟอร์ (electrolyte buffer) คือทริสบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7 (ภาคผนวก ข หมายเลข 6.1) ใช้ระบบกระแสคงที่ (constant current system) โดยให้กระแสไฟ 0.8 มิลลิแอมแปร์ (mA) ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต 1 ซม. เป็นเวลานาน 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตที่ได้นี้มาปล่อยให้แห้งชุดแรกนำมาพ่นด้วย10เปอร์เซนต์โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์(ภาคผนวก ข หมายเลข 6.2) สำหรับการวิเคราะห์อนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน ส่วนอีกชุดหนึ่งนำมาพ่นด้วย 1 เปอร์เซนต์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(ภาคผนวก ข หมายเลข 6.3) สำหรับการ

วิเคราะห์อนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอยนำไปอบที่160°ซ นาน 3-5 นาที แล้วตรวจดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

6.การวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซินและพิษอัมพาตจากหอยในสารสกัดจากหอยทรายภายหลังการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษโดยวิธีเอช พี แอล ซี

นำสารตัวอย่างที่สกัดได้จากหอยทรายภายหลังจากการเลี้ยงด้วยแบคทีเรียสร้างพิษมาวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกีดขวางช่องโซเดียม ซึ่งระบบในการวิเคราะห์มี 2 ระบบคือระบบสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) และระบบสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์ทำให้โดย Professor Massaki Kodama จากLaboratory of Marine Biological Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku, Iwate 022-01, Japan.

1. ระบบการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน

การวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่มเทโทรโดทอกซินตามวิธีของYasumoto และ Michishita (1985) ระบบของเอช พี แอล ซี ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography)	:	รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
คอลัมน์ (column)	:	Senshu Pak ODS-3251-D, stainless steel ขนาด8.0x250 มม. บริษัท Senshu Scientific, Japan.
ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump)	:	รุ่น 2IK 6GN-Aของบริษัท Orental Motor Co.,Ltd.,Japan
เครื่องตรวจสอบ (detector)	:	fluoromonitor รุ่น RF-530ของ บริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องบันทึก (recorder)	:	Chromatopac รุ่น R-111 ของบริษัท Shimadzu, Japan.
โมบายเฟส (mobile phase)	:	อะซีโตไนทริล เข้มข้น 3% ที่มีกรดเฮปตาฟลูออโรบิวไทริก เข้มข้น 0.005 นอร์มัล และกรดอะซีติคเข้มข้น 0.05 นอร์มัล ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.1.1) และมีอัตราการไหล(flow rate) 0.6 มล.ต่อนาที
ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent)	:	สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 นอร์มัล (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.1.2) และมีอัตราการไหล 0.5 มล. ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1-15 ไมโครลิตร โดยใช้เข็มฉีดขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.สารที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์จะทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ในหลอดเทฟลอน (teflon tube) ที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม.ความยาว 10 เมตร โดยเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 ^{0}ข และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งก่อนเข้าสู่เครื่องตรวจสอบฟลูออเรสเซนซ์ และเครื่องบันทึกผล

2. ระบบการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย

สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย ประกอบด้วยอนุพันธ์ที่สำคัญ 2 กลุ่มย่อยคือ

- ซัคซิทอกซิน (saxitoxins, STXs)
- กอนิออทอกซิน (gonyautoxins, GTXs)

วิธีการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอยตามวิธีของ Oshima และคณะ (1989) สารทั้งสองกลุ่มย่อยใช้ระบบการวิเคราะห์ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography)	:	รุ่น L-6200 ของบริษัท Hitachi, Japan.
คอลัมน์ (column)		Develosil ODS-5,stainless steelขนาด 4.6 x 250 มม. ของบริษัท Nomura Chemical, Japan.
ปั๊มแรงดันสูง(high pressure pump)	:	double head reaction pump รุ่น 655A-13 ของบริษัท Hitachi, Japan.
เครื่องตรวจสอบ (detector)	:	fluoromonitor ซึ่งตั้งค่า excitation และ emission wavelength 330 และ 390 นาโนเมตร ตามลำดับ
เครื่องบันทึก(recorder และ integrator):		chromato-integrator รุ่น D-2000 ของบริษัท Hitachi, Japan.
โมบายเฟส (mobile phase)		
ก. สำหรับวิเคราะห์ STX, dSTX และ neoSTX		: สารละลาย ก ผสมกับอะซีโตไนทริล ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.2.1) และมีอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อ นาที
ข. สำหรับวิเคราะห์ GTX 1, 2, 3, 4 และ 5		: 1-เฮปเทนซัลโฟเนต เข้มข้น 2 mM. ในแอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 7.2 (ภาคผนวก ข

หมายเลข 7.2.2) และมีอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที

ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) : กรดเปอร์ไอออดิก เข้มข้น 7 mM ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 mM ปรับค่าความเป็นกรดด่าง9.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 7.2.3)และมีอัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

สารละลายปรับความเป็นกรดด่าง (acidifying reagent) : กรดอะซีติคเข้มข้น 0.5M (ภาค ผนวก ข หมายเลข 7.2.4) และมีอัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์และเมื่อสารผ่านออกมาจากคอลัมน์จะทำปฏิกิริยากับ ตัวออกซิไดซ์ในหลอดเทฟลอน ที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ยาว 10 เมตร ที่อุณหภูมิ 65 ^{o} ซ ปรับความเป็นกรดด่างด้วย acidifying reagent ก่อนเข้าเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์และเครื่องบันทึกผล

<u>หมายเหตุ</u> ในการฉีดวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี แต่ละครั้งต้องฉีดสารมาตรฐานจนได้ค่า retention time คงที่ก่อนฉีดตัวอย่างสารที่วิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ และเมื่อฉีดสารตัวอย่างประมาณ 4-5 ตัวอย่าง ต้องฉีดสารมาตรฐานอีก 1 ครั้ง เพื่อเทียบว่า retention time เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ รวมทั้งต้องฉีดสารมาตรฐานครั้งสุดท้ายเมื่อเลิกทำการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสารตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกีดขวางช่องโซเดียมในแต่ละกลุ่มที่ตรวจพบในหอยทรายหลังจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียสร้างพิษ

7. วิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยจากสารสกัดภายในเซลล์แบคทีเรียสร้างพิษ และในสารสกัดของหอยจากการให้อาหารด้วยแบคทีเรียโดยวิธีลิควิดโครมาโตรกราฟฟี-แมสเปคโตรเมตรี

ตรวจสอบ และวิเคราะห์อนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของเทโทรโดทอกซิน และพิษอัมพาตจากหอยในสารสกัดภายในเซลล์ของแบคทีเรียสร้างพิษ และในสารสกัดของหอยทรายก่อนและหลังการให้แบคทีเรียสร้างพิษ ได้รับความช่วยเหลือในการวิเคราะห์จากภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยระบบการวิเคราะห์ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography)	: รุ่น 626 pump ของบริษัท Waters , USA.
ชุดควบคุม (controller)	: รุ่น 600 S Controller ของบริษัท Waters , USA.
เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ (mass spectrometer)	: รุ่น VG TRIO 2,000 ของบริษัท Fisons instruments, USA.
โมบายเฟส (mobile phase)	: อะซิโตไนทริล

ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยการฉีดสารตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตร ปรับโมบายเฟสให้มีอัตราเร็ว 1 มล.ต่อนาที ผ่านคอลัมน์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°ซ ผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างทำให้ทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ปรากฏในสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในแบคทีเรียสร้างพิษ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียไม่สร้างพิษ

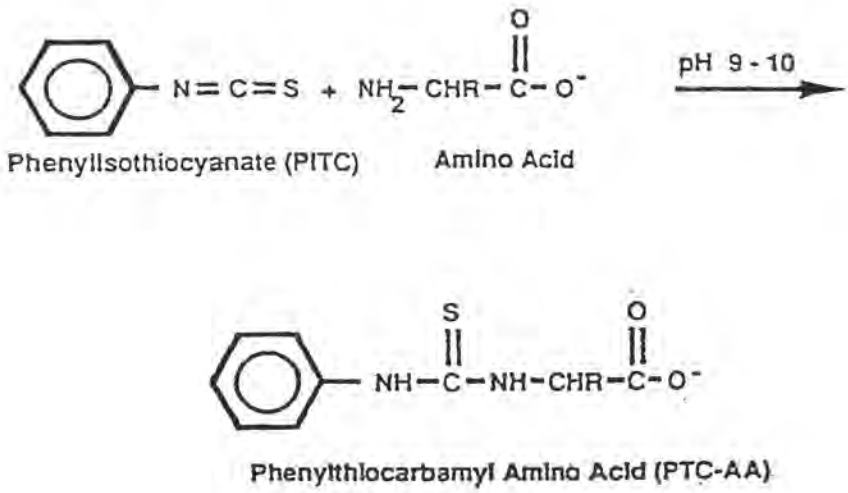
วิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิด ด้วยวิธีการทำอนุพันธ์กรดอะมิโนกับฟีนิลไอโซไธโอไซยาเนต (phenylisothiocyanate) (Heinrikson and Meredith, 1984) โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ตามวิธีการข้อ 1.1 แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง ชั่งเซลล์แห้ง (0.1 กรัม) ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิดบุด้วยเทฟลอน เติม 2 มล. ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (6 โมลาร์) ซึ่งมี 0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของฟีนอลละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนและปิดขวดภายใต้ก๊าซไนโตรเจน

นำไปให้ความร้อน112-116°ซเป็นเวลา24ชั่วโมงก่อนนำไปทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ (derivatization) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Drying step เป็นขั้นตอนการขจัดสารละลาย และสารระเหย เช่นกรดไฮโดรคลอริค ที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยสลาย โดยการทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ

2. Redry step เติมสารละลายรี-ดราย (redry solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 5.1) 10 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน และทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศเพื่อปรับให้ตัวอย่างมีความเป็นกลาง

3. Coupling step เติมสารละลายดีริเวอร์ไทซิ่ง(derivatizing solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 5.2) 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ โดยสารตัวอย่างจะอยู่ในรูปอนุพันธ์ของฟีนิลไธโอคาร์บามิล (phenylthiocarbamyl derivatives) แสดงดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ปฏิกิริยาของ Phenylisothiocyanate กับกรดอะมิโน

นำสารตัวอย่างที่อยู่ในรูปฟีนิลไธโอคาร์บามิลอะมิโนแอซิด (Phenylthiocarbamyl Amino Acid) (PTC-AA) มาวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์โดยวิธีเอช พี แอล ซี ซึ่งใช้ระบบการวิเคราะห์ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟฟี (liquid chromatography)	: รุ่น 501ของบริษัท Waters, USA.
คอลัมน์ (column)	: C18Novapak ขนาด30ซม.x3.9 มม. ของบริษัท Waters,USA.
ปั๊ม (pump)	: รุ่น 501 ของบริษัท Waters
เครื่องตรวจสอบ (UV detector)	: รุ่น 486 ของบริษัท Waters ซึ่งตั้งความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร
เครื่องประมวลผล (integration)	: โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ 801 Baseline version 3.31
ตัวชะ (eluents)	: สารละลาย A และสารละลาย B (ภาคผนวก ค ข้อ 6.3)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 40 ^{o}ซ (temperature module, waters)

ทำการวิเคราะห์ PTC - AA โดยการผ่านตัวชะ A ด้วยอัตราเร็ว 1 มล. ต่อนาที ผ่านคอลัมน์ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 40^{o}ซ และล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายB เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยวิธีเอช พี แอล ซี เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของกรดอะมิโนที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับphenylisothiocyanate ทำให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบในแบคทีเรียทั้งชนิดที่สร้าง และไม่สร้างพิษ