บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1. อุปกรณ์ที่สำคัญและเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2 - 21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc. , USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb , USA.

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (Fraction Collector) รุ่น Frac. 200 ของบริษัท Phamacia Fine Chemical , Japan.

เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น G 560E ของบริษัท Scientific Industries , Inc. , USA.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA - 36 ของบริษัท Hirayama Mamufacturing Corporation , Tokyo , Japan.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS - 325 ของบริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. , Tokyo , Japan.

กระดาษกรอง (Millipore Membrane) รุ่น GS ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation , USA

2.1.2 เคมีภัณฑ์

แบคโตเปปโตน (Bacto - Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

แบคโตทริปโตส (Bacto - Tryptose) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

โพลีเปปโตน เปปโตน (Polypeptone peptone) ของบริษัท Becton Dickinson , USA.

ไฟโตน เปปโตน (Phytone peptone) ของบริษัท Becton Dickinson , USA.

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรดแอสคอร์บิก (L - Ascorbic acid) ของบริษัท Ajax Chemicals , Australia.

บีตา - ไกลเซอโรฟอสเฟต (β - glycerophosphate) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

แลคโตส (Lactose) ของบริษัท E. Merck , Darmstadt , Germany.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Fluka Chemical , Switzerland.

โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) ของบริษัท BDH Chemicals Ltd., England.

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck , Darmstadt , Germany.

ซีเอ็ม - เซลลูโลส (CM - Cellulose) ของบริษัท Sigma Chemical Co., USA.

เซฟาเดกซ์ จี - 50 (Sephadex G - 50) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals AB , Sweden.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆเป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

2.2 จุลินทรีย์

1. *Streptococcus spp.* จำนวน 38 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ
2. *Streptococcus cremolis* TISTR 456 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
3. *Streptococcus lactis* TISTR 457 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. *Bacillus cereus* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. *Listeria monocytogenes* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. *Pseudomonas aeruginosa* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
8. *Salmonella typhi* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. *Salmonella typhimurium* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10. *Staphylococcus aureus* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การแยกเชื้อ *Streptococcus* spp. จากน้ำนมดิบ

2.3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Streptococcus* spp.

นำตัวอย่างนมดิบที่ได้จากฟาร์มต่างๆ 4 แห่งจำนวน 2 ตัวอย่างต่อฟาร์ม มาเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Azide Dextrose Agar (Difco., 1984) ในสภาพไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อที่แยกได้จากข้างต้น โดยเพาะเชื้อทุกโคโลนีลงบนอาหารแข็ง Yeast Glucose Agar หรือ M 17 (Skinner และ Quesnel ., 1978)บ่มที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยว

2.3.2 การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ลักษณะทางชีวเคมีบางประการ

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะการเจริญ และ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียโ ดยยึดแนวจัดจำแนกแบคทีเรีย ตามหนังสือ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology

2.3.2.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสารมีสี (pigment) ของโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง

2.3.2.1.1 การติดสีแกรม (Gram stain)

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อายุ 24 ชั่วโมง นำไปย้อมแกรม ดูรูปร่าง และ การจัดเรียงตัว ของเซลล์

2.3.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Collins และ Lyne ., 1989 ; Gerhardt และคณะ , 1981)

2.3.3.1 การไฮโดรไลซ์ aesculin (Aesculin Hydrolysis)

เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่เติม aesculin 0.01% และ ferric citrate 0.05% บ่มเชื้อข้ามคืน จุลินทรีย์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ aesculin จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำตาลดำ

2.3.3.2 การเกิดแอมโมเนียจากอาร์จินีน (*Ammonia from Arginine*)

เลี้ยงเชื้อในอาหาร Arginine broth เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลโดยใช้ Nessler reagent สังเกตจากการเกิดตะกอนสีเหลือง - ส้ม ของอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

2.3.3.3 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Agar slant) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจผลโดยหยด 3% Hydrogen peroxide (H_2O_2) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

2.3.3.4 การตรวจสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolysis test)

เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง Blood agar base จากนั้นเททับผิวหน้าอาหารด้วยอาหารแข็ง Blood agar บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

2.3.3.5 การไฮโดรไลซ์ Hippurate (Hippurate Hydrolysis)

เตรียมสารละลาย 1% ของ sodium hippurate ในน้ำกลั่น ใส่ในหลอดทดสอบหลอดละ 0.4 ml. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อต้องการทดสอบจะนำสารละลายดังกล่าวมาทำให้ละลายและผสม กับเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งจำนวน 1 loop จะพบว่าสารละลายจะขุ่นขึ้น จากนั้นบ่มเชื้อไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม ninhydrin reagent (ninhydrin 3.5 กรัม ในส่วนผสมระหว่าง acetone และ butanol ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 ml.) 0.2 ml. ห้ามเขย่า นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที จุลินทรีย์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ hippurate จะทำให้เกิดสีม่วงเข้มที่ผิวหน้าของสารละลาย

2.3.3.6 การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท (Carbohydrate fermentation test)

ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacilli MRS base broth (ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อและน้ำตาลกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบมี 19 ชนิด ได้แก่ กาแลคโตส กลูโคส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล ซาลิซิน ซูโครส ไซโลส ทีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส เมลิซิโทล เมลิไบโอส แมนนิทอล แมนโนส แรฟฟิโนส ไรโบส แลคโตส อะราบิโนส และ อินอซิทอล โดยเติมลงไป 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ บรอมคลีซอลเพอร์เพิล 0.05% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นตัวบ่งสี (indicator) บ่มที่ 37 °C บันทึกผลภายใน 7 วัน สังเกตการสร้างกรด ถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรทได้จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีบรอมคลีซอลเพอร์เพิลเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

2.3.3 การเกิดเคิร์ดน้ำนมพร่องมันเนย

ถ่ายเชื้อ Streptococci อายุ 18 ชั่วโมงจากอาหารเหลวลงในน้ำนมพร่องมันเนย (skim milk) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งนมเคิร์ด และถ่ายเชื้อลงในนมพร่องมันเนยหลอดใหม่ไปเรื่อยๆ

2.4 การคัดเลือก *Streptococcus* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

นำเชื้อ *Streptococcus* sp. มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17 broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผ่านแผ่นกรอง (Millipore Membrane Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (อาภัสรา , 2537) นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อทดสอบ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* , *Escherichia coli* , *Listeria monocytogenes* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhi* , *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus*

2.4.1 การทดสอบเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็ง

นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางให้เชื้อมีความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mc. Farland ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.175% ปริมาตร 0.5 ml. ผสมกับ Sulfuric acid (1%) 0.36 N ปริมาตร 99.5 ml.) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 7.0 (ฐิติพงศ์ , 2539) หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar 0.1 มล. ใช้ลำลีพันปลายไม้ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. เจาะลงบนวุ้นเพาะเชื้อจำนวน 4 หลุม/จานเลี้ยงเชื้อ โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร หยดส่วนน้ำใสที่ได้จาก *Streptococcus* spp. แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้ 80 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

2.4.2 การทดสอบ *Streptococcus* spp.ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว

นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mc. Farland จากนั้นเตรียม 1.0 มล.ของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยง *Streptococcus* spp. ที่ปั่นแยกเซลล์ออกมา เติม 2.0 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อทดสอบ ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพ ทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่ระยะ

เวลาต่างๆจนถึง 36 ชั่วโมง และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Doubling Time) ของเซลล์จุลชีพ ในน้ำเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์

2.5 การคัดเลือก *Streptococcus* spp. ที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ

นำ *Streptococcus* spp. มาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว M17 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล แล้วจึงกรองด้วยแผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

2.6 การเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ

เตรียมหัวเชื้อ ของ *Streptococcus* spp. โดยเขี่ยจากหลอดอาหารแข็ง M17 ลงในอาหารเหลว M17 ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร.) ลงในอาหารเหลวและสภาวะเดิมอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสมาปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45ไมโครเมตร จึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารเหลว

2.7 การทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์

2.7.1 การแยกเซลล์ *Streptococcus* spp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

หลังจากการเลี้ยง *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถสารต่อต้านจุลชีพได้ตามต้องการแล้ว จึงนำมาแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกน้ำใสส่วนบนมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 โดย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปสกัดต่อในขั้นตอนต่อไป

2.7.2 การแยกสารต่อต้านจุลชีพโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]

หลังจากแยกเซลล์ *Streptococcus* spp. ออกจากน้ำหมักในข้อ 2.7.1 แล้ว ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนสารต่อต้านจุลชีพออกจากน้ำหมัก โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 0-60% , 60-70% และ 70-80% ตามลำดับ และแยกตะกอนสารต่อต้านจุลชีพแต่ละช่วง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนใน 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 (Davey และ Richardson., 1981) ปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนได้ นำไปไดอะไลส์ในสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือออก นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยการตรวจสอบในอาหารเหลวและหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry และ คณะ., 1951)

2.7.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส (CM- Cellulose)

ชั่งซีเอ็ม - เซลลูโลส ประมาณ 5.0 กรัม ในน้ำ 500 มล. เมื่อพองตัวเต็มที่แล้วกำจัดส่วนที่เป็นผงละเอียดออก โดยค่อยๆเทส่วนชั้นน้ำทิ้งไป ทำซ้ำหลายๆครั้ง ต่อจากนั้นนำมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตรมากเกินพอ พร้อมทั้งกวน 30 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นหลายๆครั้ง จนกระทั่งส่วนน้ำใสมีค่าความเป็นกรด - ด่าง ประมาณ 8.0 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้เป็นกลางด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วล้างน้ำกลั่นหลายๆครั้งจนค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 7.0 จึงนำมาแช่ในสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำจัดฟองอากาศออกโดยใช้เครื่องปั๊ม แล้วจึงนำเจลมาบรรจุลงในคอลัมน์ แก้วขนาด 1.7 x 20 ซม. (Davey และ Richardson ., 1981) ผ่านสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ลงในคอลัมน์ข้ามคืนจนเจลอยู่ในภาวะสมดุล มีอัตราการไหล 17 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 70- 80% 1 มล. จากข้อ 2) ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ติดตามโปรตีนใกล้ศูนย์ จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับเจลออกด้วย 0-1.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ เกรเดียนท์ ใน 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 เก็บลำดับส่วนละ 3 มล. ติดตามโปรตีนโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลอดที่มีโปรตีนในยอด (peak) ไปผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารเหลว และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (Lowry., 1951)

2.7.4 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี 50

ชั่งเซฟาเด็กซ์ จี 50 ประมาณ 3 กรัม แช่ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำไปไล่อากาศออกจากรูเจลโดยใช้เครื่องปั๊ม บรรจุเจลที่ได้ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.7 x 20 ซม. ผ่านสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาณเจลด้วยอัตราการไหล 8 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม - เซลลูโลส 1 มล. จากข้อ 3) หยดลงบนผิวหน้าเจลเบาๆเก็บลำดับส่วนละ 1 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำหลอดที่มีโปรตีนในยอด ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ในอาหารเหลว และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (Lowry., 1951)

2.7.5 การทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (SDS Gel Electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli., 1970)

โดยใช้เซพาเรตติงเจล (separating gel) ที่มีเจลความเข้มข้น 20 % และใช้สแตกกิงเจล (stacking gel) ที่มีเจลความเข้มข้น 5.0 % นำโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ และโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส หยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำอิเลคโตรโฟริซิสที่ 30 มิลลิแอมแปร์ (Bollag และ Edelstein., 1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปแผนภาพขั้นตอนการทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์

น้ำนมดิบที่นำมาเจือจางด้วยความเข้มข้นต่างๆ

↓ Azide Dextrose Agar

โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Streptococcus* spp.

↓ M 17 Agar

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M17 ที่เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.*

↓ 37°C 36 ชั่วโมง
8,000 รอบ/นาที,20 นาที,4°C

ส่วนน้ำใส

↓ ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5
ด้วย 1N โซเดียมไฮดรอกไซด์

ส่วนน้ำใส

↓ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตใช้ความเข้มข้น
0-40,40-70,70-90% ตามลำดับ , ปั่นเหวี่ยง
8,000 รอบ/นาที 20 นาที 4°C

ตะกอน

↓ ละลายตะกอนแต่ละส่วนใน 10 mM ซิเตรทบัฟเฟอร์
ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ,กรองผ่านกระดาษกรอง
ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

เก็บส่วนที่ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ

ผ่านลงบนคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส

↓

ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับกับเม็ดเจลออกด้วย
10 mM ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0

↓

ชะโปรตีนส่วนที่จับกับเม็ดเจลออกด้วย
0 - 1.0 M โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์

↓

เก็บส่วนที่ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ

↓

ผ่านลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี 50

↓

ชะโปรตีนในคอลัมน์ออกด้วย 10 mM ซิเตรท
บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0

↓

เก็บส่วนที่ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ

↓

การทำอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย