บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์

- เครื่องเขย่าบ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker) รุ่น AG Rittergasse 27 บริษัท Infors. Ltd., Switzerland

- เครื่องเขย่าบ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker)รุ่น G-25 และ G-27 แบบ rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc.,N.Y.,USA.

- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)รุ่น spectronic-21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA.

- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น pH-M 82 standard pH meter ของบริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark. และรุ่น F-13 ของบริษัท Horiba

- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)รุ่น autosteam sterilizer HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ,Tokyo,Japan.

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Minor 35 MSE ของบริษัท MSE Ltd.,England

- เครื่องนับเม็ดเลือดแดง (haemacytometer)รุ่น neubauer bright line ของบริษัท Boeco West Germany

- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHA ของบริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan

- เครื่องเขย่า (vortex)รุ่น vortex-genis ของบริษัท Scientific Industries,Inc.,Bohemia, N.Y., USA.

- หลอดแสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TL20W/08 F20 T12 BLB บริษัท Philips,Holland.

- เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate PC-1o1 Corning Glass Works, Corning, N. Y., U.S.A

- เครื่องไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (high performance liquid chromatography ,HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC- 8A และ เครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation, Kyoto,Japan

- ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น IN-81 ของบริษัท Yamato Scientific Co.,Ltd. Japan.

- ตู้ถ่ายเชื้อ (clean bench)รุ่น VW-1300 NK system ของบริษัท Nippon Medical & Chemical Instruments Co.,Ltd.Japan

1.2 สารเคมี

- เพนนิซิลลิน จี โซเดียม (penicillin G sodium) ของบริษัท เอ็น แอนด์ เอ็ช แมนูแฟคเจอริ่ง จำกัด

- เพนนิซิลลิน วี (เพนวิซิล ดราย ซีรัน) ของบริษัท เอ็น แอนด์ เอ็ช แมนูแฟคเจอริ่ง จำกัด

- กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid) ของบริษัท E.Merck Damstadt,Germany.

- เมธานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merck Damstadt,Germany.

- เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N'-methyl-N-nitro-N-nitrosoquanidine , NTG)ของบริษัท Sigma Chemical Co.,U.S.A.

- กรดมาลิอิก (maleic acid) ของบริษัท E. Merck Damstadt, Germany.

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวมานี้ สั่งซื้อจากบริษัท B.D.H. ประเทศอังกฤษ บริษัท FLuka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ส่วนกลูโคส แลคโตส ผงวุ้น และน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เกรดทางการค้า

2 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา การเตรียม และ การเพาะเลี้ยง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

2.1.1 เชื้อรา P. chrysogenum สายพันธุ์ N-151 ซึ่งเป็นเชื้อที่ผ่านการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์จาก P. chrysogenum A-88

2.1.2 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (test microorganism) คือ เชื้อแบคทีเรีย Staphylococcus aureus สายพันธุ์ ATCC 6538 P.

2.2 การเก็บรักษา

2.2.1 การเก็บรักษาเชื้อรา P. chrysogenum N-151 และสายพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการทำกลายพันธุ์

เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา P. chrysogenum โดยใช้เข็มเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรส อาการ์ (potato dextrose agar, PDA ใน ภาคผนวกที่ 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 25° เซลเซียส นาน 7-10 วัน เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° เซลเซียส

2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย S. aureus

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารวุ้นเอียง (slant agar) (ภาคผนวกที่ 1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ° เซลเซียส

2.3 การเตรียมและการเพาะเลี้ยง

2.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum

เขี่ยสปอร์ P. chrysogenum จากการเก็บรักษา ข้อ 2.2.1 ลงในน้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปกระจายลงบนผิวอาหารวุ้น พี ดี เอ ในขวดแก้วขนาด 10x15x4 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 °เซลเซียส เป็นเวลา 7 -10 วัน จากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากขวดด้วยน้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อ กรองสปอร์แขวนลอยผ่านผ้ากรองที่ซ้อนกัน 3 ชั้นโดยวิธีการแบบปลอดเชื้อ เจือจางสปอร์ด้วยน้ำกลั่น

ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้จำนวนสปอร์/มิลลิลิตรตามต้องการ โดยนับด้วย haemacytometer

2.3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบ S. aureus

เขี่ย S. aureus ATCC 6538 P. จากการเก็บรักษา ข้อ 2.2.2 โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) จำนวน 1 ห่วง ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก 1.2)ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนวน(rotary shaker)เขย่า 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอยโดยอ่านค่าเป็นเปอร์เซนต์ transmission ด้วยเครื่อง photocolorimeter (spectophotometer) ความยาวคลื่นเท่ากับ 580 นาโนเมตร โดยเจือจางเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อ วัดให้ได้ 25 %

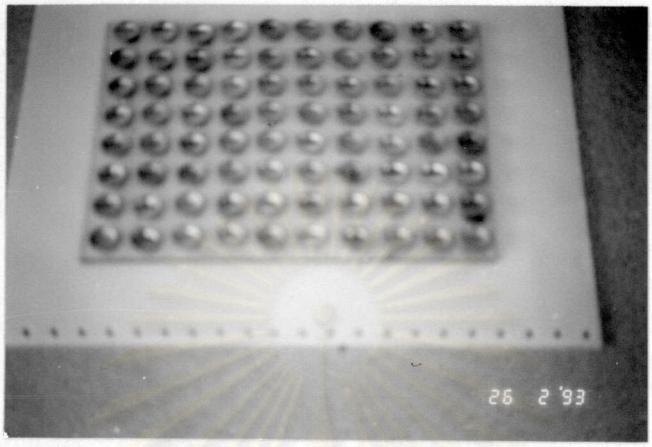
2.3.3 การเพาะเลี้ยง P. chrysogenum ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า เพื่อสร้างเพนนิซิลลิน จี

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum ตามวิธีในข้อ 2.3.1 ให้ได้ 5 x10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ใช้ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลวผลิตเพนนิซิลลิน จี (ภาคผนวก 1.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 ° เซลเซียส บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุนวน เขย่า 300 รอบ/นาที เติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดฟีนิลอะซิติก 1.25 % น้ำหนัก/ปริมาตรในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มต่อจนถึงชั่วโมงที่ 120 เก็บตัวอย่างโดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

3 การเตรียมเพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น

3.1 การเตรียมหลุมอะลูมิเนียมสำหรับอาหารวุ้นหลุม

ใช้หลุมอะลูมิเนียมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร สูง 4 มิลลิเมตร ติดบนแผ่นกระจกขนาด 19.5 x 14.5 เซนติเมตร โดยให้จุดศูนย์กลางของหลุมอะลูมิเนียมห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร กระจก 1 แผ่นติดหลุมอะลูมิเนียม 8 แถว แถวละ 10 หลุม (ดังแสดงในรูปที่ 11) กระจกวางในถาดแสตนเลสขนาด 20.5 x15.5 x1.5 เซนติเมตร มีฝาปิด (ดังแสดงในรูปที่ 12) โดยหนุนให้สูงจากก้นถาดด้วยหลุมอะลูมิเนียมทั้ง 4 มุม



รูปที่ 11 : แสดงการเตรียมหลุมอะลูมิเนียมบนแผ่นกระจก

รูปที่ 12 : แสดงการวางกระจกในถาดแสตนเลสมีฝาปิด

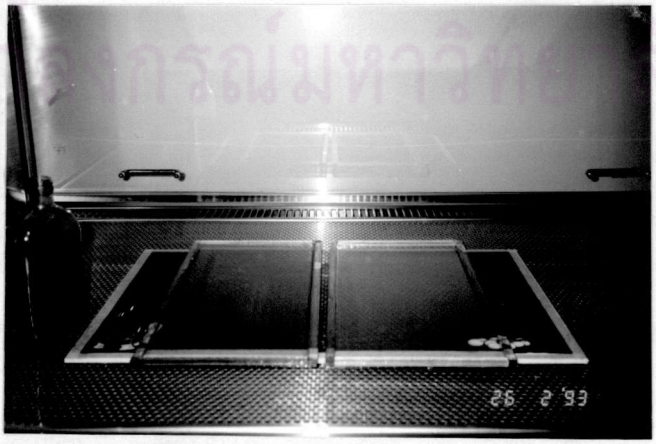
3.2 การเตรียมอาหารวุ้นหลุม

นำอุปกรณ์ ในข้อ 3.1 อบฆ่าเชื้อในหม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121° เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เปิดฝาถาดแสตนเลสแบบปลอดเชื้อ ใช้อาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขณะกำลังหลอมเหลวหยอดลงในถ้วยอะลูมิเนียม ด้วยปิเปตให้มีปริมาตรถ้วยละ 4 มิลลิลิตร หลังจากหยอดอาหารวุ้นเสร็จแล้วให้เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร ที่ก้นถาดแสตนเลส (เพื่อให้เกิดความชื้นและป้องกันการแห้งของอาหารวุ้นหลุม) ปิดฝาถาดแสตนเลสเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นบนอาหารวุ้นหลุม

3.3 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบ

3.3.1 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบบนกระจก

นำแผ่นกระจกใสขนาด 17.5 x28.5 x0.5 เซนติเมตร บรรจุในกล่องแสตนเลสปลอดสนิมมีฝาปิดขนาด 20x 20x 46 เซนติเมตร ซึ่งภายในทำเป็นชั้นบรรจุกระจกได้ 10 แผ่น ไปอบฆ่าเชื้อในหม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121° เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที นำอาหารวุ้นทดสอบ (ภาคผนวก 1.2) ที่หลอมเหลวและแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 45° เซลเซียส ปริมาตร 180 มิลลิลิตร มาผสมเชื้อจุลินทรีย์ จากข้อ 2.3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเทในกระจก ซึ่งกระจกแต่ละแผ่นวางอยู่บนกระจกแผ่นใหญ่ที่ปรับระดับแล้ว (ดังแสดงในรูปที่ 13) การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบดังกล่าวทำในสภาวะปลอดเชื้อ



รูปที่ 13 : แสดงการเทอาหารวุ้นทดสอบบนแผ่นกระจกที่ปรับระดับ

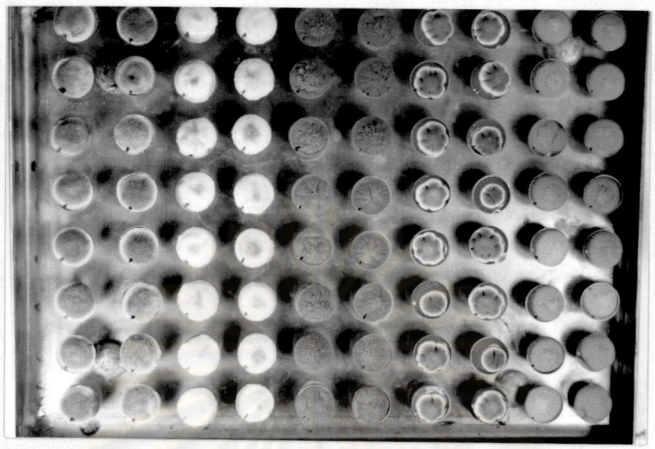
3.3.2 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเซลล์แขวนลอยของ S. aureus ที่เตรียม ตามข้อ 2.3.2 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงอีก 20 เท่า ใช้ 0.4 มิลลิลิตรของเซลล์แขวนลอยใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเทอาหารวุ้นทดสอบ (ภาคผนวก 1.2) ที่กำลังหลอมเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้เย็นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 ° เซลเซียส ผสมลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซ้าย-ขวา หลายรอบเพื่อให้เชื้อและอาหารผสมกัน ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ใช้ steel cork borer ที่ปลอดเชื้อและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหารวุ้นให้ได้ 4 หลุมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน

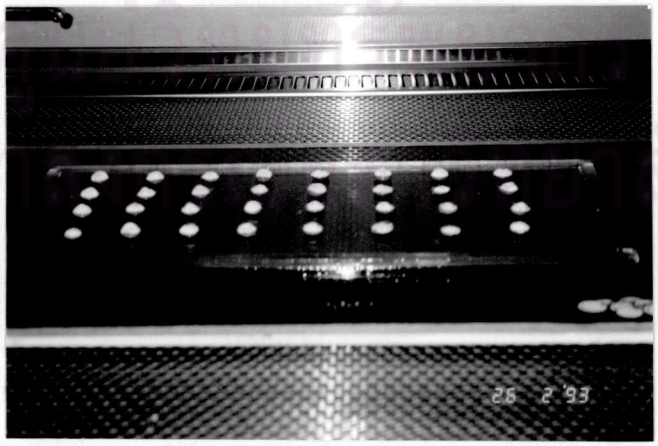
4 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของ P. chrysogenum

4.1 วิธีการตรวจสอบการสร้างเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น

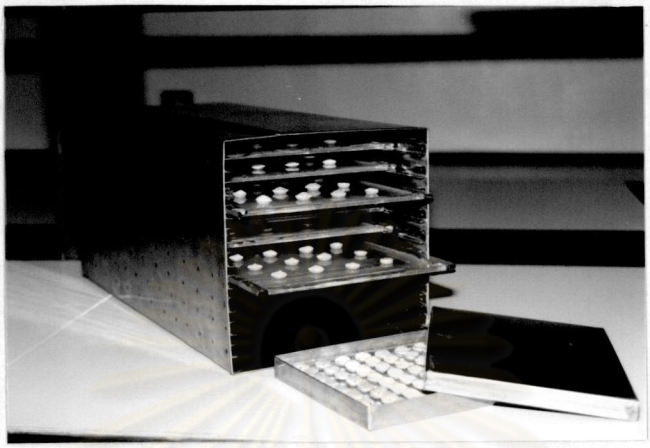
ถ่ายเชื้อ P. chrysogenum สายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารวุ้นหลุมซึ่งอยู่ในถาดแสตนเลส ตามวิธีในข้อ 3.2 ด้วยไม้ปลายแหลมที่ปราศจากเชื้อ โดยใช้ 1 โคโลนีต่ออาหารวุ้นหลุม 1 ถ้วย เมื่อถ่ายเชื้อจนครบทุกหลุม ปิดฝาถาดแสตนเลส และใส่ในถุงพลาสติกเพื่อกันการระเหยของน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 25 °เซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จะได้เชื้อเจริญบนอาหารวุ้นหลุม(ดังแสดงในรูปที่ 14) ทำการย้ายอาหารวุ้นหลุมออกจากหลุมอะลูมิเนียมด้วยไม้ปลายแหลมที่ปราศจากเชื้อ โดยย้ายมาวางเรียงบนอาหารวุ้นทดสอบ ซึ่งเตรียมตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยวางเรียงเป็น 4 แถว แถวละ 8 โคโลนี (ดังแสดงในรูปที่ 15) จากนั้นนำแผ่นกระจกวางเรียงในกล่องแสตนเลสมีฝาปิด (ดังแสดงในรูปที่ 16) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 17)



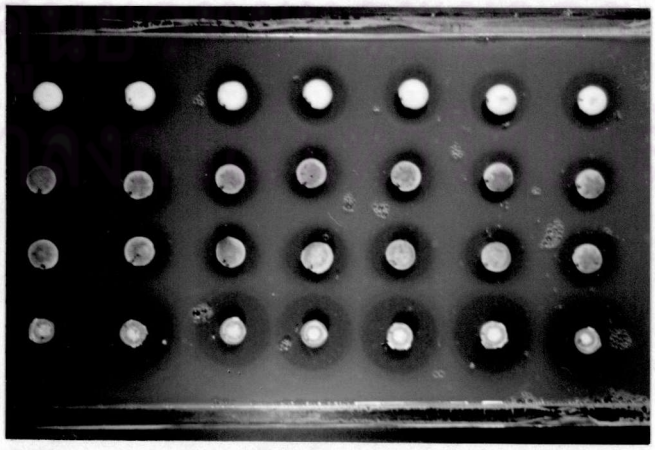
รูปที่ 14 : แสดงการเจริญของเชื้อราบนอาหารวุ้นหลุม



รูปที่ 15 : แสดงการย้ายอาหารวุ้นหลุมมาวางบนอาหารวุ้นทดสอบ



รูปที่ 16 : แสดงการวางเรียงแผ่นกระจกของอาหารวุ้นหลุมในกล่องแสตนเลสมีฝาปิด



รูปที่ 17 : แสดงความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

4.2 วิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum สายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 5 x10 ^{6} สปอร์/มิลลิลิตร ตามวิธีข้อ 2.3.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าตามวิธีข้อ 2.3.3 เก็บตัวอย่างที่กรองได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี

4.2.1 วิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีววิทยา (bioassay)

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 (ภาคผนวก 2.2) ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) หยด 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมบนอาหารวุ้นทดสอบ ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของ S. aureus (มิลลิเมตร) รอบหลุมที่เจาะไว้ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก 3.1) ความเข้มข้นของเพนนิซิลลิน จี ที่ได้มีหน่วยเป็น ยูนิต/มิลลิลิตร

4.2.2 วิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography , HPLC)

นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ Luengo (92) โดยนำส่วนใสที่กรองได้จากน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเพนนิซิลลิน วี มาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ชั่งเพนนิซิลลิน วี 0.6 กรัม ละลายในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.0 20 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน ใช้ 1 มิลลิลิตรมาปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ฉีด 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะดังนี้

คอลัมน์ : Zorbax C-8 ขนาด I.D. 4.6 มิลลิเมตร ยาว 25 เซนติเมตร

สารละลายตัวพา : 50 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4 pH 5.0 : methanol = 65:45 ปริมาตร/ปริมาตร (ภาคผนวกที่ 2.3)

อัตราการไหล : 1.2 มิลลิลิตร /นาที

ความดัน : 180-220 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

อุณหภูมิ : 25 ° เซลเซียส

เครื่องตรวจวัด : ความยาวช่วงคลื่นอุลตราไวโอเลต 220 นาโนเมตร

Attenuation : 1 mv/full scale

chart speed : 1.5 มิลลิเมตร /นาที

ค่า ratio ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟเพนนิซิลลิน จี หารด้วยพื้นที่ใต้กราฟเพนนิซิลลิน วี ที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 3.2) ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่ได้มีหน่วยเป็น กรัม/ลิตร

5 การทำกลายพันธุ์

5.1 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum สายพันธุ์ที่ต้องการทำกลายพันธุ์ ให้ได้จำนวนสปอร์ประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร (ตามวิธีในข้อ 2.3.1) ใส่ 1 มิลลิลิตรของสปอร์แขวนลอยลงในหลอดปั่นตกตะกอนที่ปราศจากเชื้อ (Eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิเมตร ปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) และทำให้เป็นสปอร์แขวนลอยใหม่ด้วย 0.5 โมลาร์ tris-maleic buffer pH 8.0 (ภาคผนวก 2.1) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ เติมสารละลาย NTG (NTG + 0.5 โมลาร์ tris-maleic buffer pH 8.0 ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว) ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (37,64,99,100) ปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงและล้าง 2 ครั้งด้วย 0.2 % โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่ทำให้ปราศเชื้อแล้ว (101) จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยที่ผ่านการทำกลายพันธุ์ด้วย NTG มาทำการกระจาย (spread plate) แบบปลอดเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งเลือกใช้ความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสม โดยหยด 0.1 มิลลิลิตรของสปอร์แขวนลอยกระจายลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อโพเทโต เดกซ์โตรส กระจายสปอร์แขวนลอยให้สปอร์กระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยแท่งแก้วซึ่งงอเป็นรูป 3 เหลี่ยม บ่มที่อุณหภูมิ 25 °เซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ คำนวณเปอร์เซนต์รอดตายในแต่ละความเข้มข้น NTG ที่ใช้ โดยให้ความเข้มข้น NTG = 0 เป็นหน่วยทดลองควบคุม และให้ถือว่าจำนวนโคโลนีรอดตายโดยเฉลี่ยต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อที่นับได้ของหน่วยทดลองควบคุม มีค่าเปอร์เซนต์รอดตายเท่ากับ 100 % วาดกราฟระหว่างความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (แกน x)

และเปอร์เซนต์รอดตาย (แกน y) เลือกเก็บเชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์จากการทดลองที่มีเปอร์เซนต์รอดตายประมาณ 11-22% (37)เพื่อทำการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิต่อไป

5.2 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย แสงอุลตราไวโอเลต (UV)

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum สายพันธุ์ที่ต้องการทำกลายพันธุ์ ให้ได้ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร (ตามวิธีในข้อ 2.3.1) ใส่ 3 มิลลิลิตรของสปอร์แขวนลอยที่เตรียมไว้ลงในจานเลี้ยงเชื้อ (pretri dish) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ซึ่งภายในจานเลี้ยงเชื้อมีใบกวนที่ทำจากลวดที่โค้งเป็นรูปตัว Z (เพื่อกวนสปอร์แขวนลอยในระหว่างการฉาย UV) นำจานเลี้ยงเชื้อวางบนเครื่องกวน (magnetic stirrer) ฉายแสงอุลตราไวโอเลต โดยใช้หลอดฉายแสงกำลังงาน 20 วัตต์ ระยะห่างจากแหล่งแสง 30 เซนติเมตร ด้วยความยาวคลื่นช่วงสั้น (254 นาโนเมตร) ที่เวลาต่าง ๆ กัน ให้แสงถูกกับสปอร์แขวนลอยโดยตรงและกวนด้วยใบกวนตลอดเวลาในระหว่างการฉายแสง จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยที่ผ่านการฉายด้วยแสงแล้วมาทำการกระจาย (spread plate)แบบปลอดเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเลือกใช้ความเจือจาง (dilution) ที่เหมาะสม โดยหยด 0.1 มิลลิลิตรของสปอร์แขวนลอยกระจายลงบนผิวหน้าอาหารวุ้น โพเทโต เดกซ์โตรส ให้กระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยแท่งแก้วซึ่งงอเป็นรูป 3 เหลี่ยม บ่มที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ เซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในที่ไม่มีแสงสว่าง นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ คำนวณเปอร์เซนต์รอดตายในแต่ละช่วงเวลาที่ใช้โดยให้เวลาที่ใช้ในการฉาย UV = 0 เป็นหน่วยทดลองควบคุม และให้ถือว่าจำนวนโคโลนีรอดตายโดยเฉลี่ยต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อที่นับได้ของหน่วยทดลองควบคุม มีค่าเปอร์เซนต์รอดตายเท่ากับ 100 % วาดกราฟระหว่างเวลาต่างๆ ในการฉาย UV (แกน x) และเปอร์เซนต์รอดตาย (แกน y) เก็บสายพันธุ์กลายพันธุ์จากการทดลองในช่วงเวลาที่ทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายประมาณ 1 - 5 % (87,88) เพื่อทำการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิต่อไป

6 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี ปริมาณสูงขึ้น

6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

คัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้จากการทำกลายพันธุ์ โดยตรวจสอบประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น ตามวิธีในข้อ 4.1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น เก็บสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น มาคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป

6.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

หมักสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ตามวิธีข้อ 4.2 นำน้ำหมักที่หมักได้มาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นโดยวิธีทางชีววิทยา ตามวิธีข้อ 4.2.1 นำน้ำหมักของสายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณเพนนิซิลลิน จี ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีข้อ 4.2.2 เก็บสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์รอบต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย