บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์สเตอร์รีโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) Olympus รุ่น CK2 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) รุ่น JEM-T220 บริษัท Jeol, Japan
- กล้องถ่ายรูป Olympus รุ่น C5050 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) Memmert รุ่น BE600 บริษัท Jebsen and Jebsen
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) Hepa Class 100 รุ่น 311 บริษัท Thermo electron corporation
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) Memmert รุ่น D06063 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) Memmert รุ่น UE600 บริษัท Jebsen and Jessen, Germany
- ตู้อบแห้งภายใต้สุญญากาศ (vacuum oven) Hotpack รุ่น บริษัท Hotpact Corporation, USA.
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- เครื่องชั่งน้ำหนัก (digital scale) บริษัท Mettler Toledo
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA
- เครื่องดูดจากปิเปตต์ (Pipette aid) ยี่ห้อ Drummond

- เครื่องถ่ายรูปเจล (Gel Doc) ยี่ห้อ Vilber Lourmat
- เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
- เครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) รุ่น 77520 บริษัท Labconco, U.S.A.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) Mettler-Toledo รุ่น S20-k บริษัท Mettler Toledo
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท Takara Bio, Inc. Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-6010 บริษัท Hslangtai
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene บริษัท Profuge
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader) รุ่น Elx 800 บริษัท Bio-tek instrument
- เครื่อง Electrophoresis chamber set รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 ซ รุ่น ULT 1786 บริษัท FORMA Scientific, USA
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20 ซ
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima, Japan
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร), P10 (0.5-10 ไมโครลิตร), P20 (2-20 ไมโครลิตร), P100 (20-100 ไมโครลิตร), P1000 (0.2-1 มิลลิลิตร) บริษัท Gilsson France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวป์ (microtubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Corning Incorporated, USA

- หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) บริษัท Corning Incorporation, USA
- ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well) ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- หัวกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ Pore size 0.22 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Corning บริษัท Corning Incorporated, USA
- กระดาษกรอง (cellulose acetate membrane filter) Pore size 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Sartorius, Germany
- ถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) รุ่น 34 HC ยี่ห้อ Taylor-Wharton Cryogenics บริษัท Harsco Corporation, USA
- ปิเปตต์แก้ว (seropipatte) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ขนาด 0.0025 มิลลิเมตร^2 ยี่ห้อ Loptik Labor บริษัท Boeco
- TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F_{254} บริษัท Merck, Germany

3.2 สารเคมี

- กาแลคโตส (*D*-galactose) บริษัท Merck. Germany
- กลูตามีน (*L*-glutamine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- กลูโคส (glucose)
- เคซีน (casein)
- เจลาติน (gelatin)
- ซูโครส (sucrose) บริษัท Merck. Germany
- ไซโลส (xylose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- ไซแลน (xylan)
- โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) บริษัท Merck. Germany
- โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) บริษัท Merck. Germany
- เด็กซ์แทรน (dextran) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ทรีฮาโลส (threhalose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไทโรซีน (tyrosine)

- ธีโอนีน (*L*-theonine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- แป้ง (starch)
- โพรลีน (*L*-proline) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- โพแทสเซียม ไนเตรท (potassium nitrate) บริษัท Merck. Germany
- ฟรุกโตส (*D*-fructose) บริษัท Merck. Germany
- ฟีนิลอะลานีน (*L*-phenylalanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- เมทไธโอนีน (*L*-methionine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แมนนิทอล (*D*-mannitol) บริษัท Difco Laboratory.
- แมนโนส (*D*-mannose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แรมโนส (*L*-rhamnose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แลคโตส (*D*-lactose) บริษัท Merck. Germany
- วาลีน (*L*-valine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- มีโซ-อินโนสิทอล (meso-inositol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- อะราบิโนส (*L*-arabinose) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- อะลานีน (*L*-alanine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- อาจินีน (*L*-arginine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แอสปาราจีน (*L*-asparagine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A
- ฮิสทิดีน (*L*-histidine) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- Agar
- Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
- Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$
- Bacto peptone
- Bacto tryptone
- Bato soytone
- Beef extract
- Cetyltrimethylammonum bromide (CTAB) บริษัท Serva
- Copper sulphate ($CuSO_4.7H_2O$)
- Dimethylsulfoxide (DMSO) บริษัท Sigma, U.S.A.
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau
- Ferric chloride ($FeCl_3$)
- Ferrous sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)

- Fetal Bovine Serum (FBS) Hyclone บริษัท Hyclone
- Glycerol
- Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Merck. Germany
- Isopropanol alcohol บริษัท Merck. Germany
- Isoamyl alcohol บริษัท Carbo erba
- Manganes chloride ($MnCl_2$)
- Magnesium sulfate ($MgSO_4$)
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylterazolium bromide)] บริษัท Bio Basic inc, Canada
- Di-Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)
- Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- Potascium nitrate (KNO_3)
- Sodium caseinate
- Trypsin-EDTA บริษัท Hyclone
- Trypan blue 0.5% w/v บริษัท Biochrom AG, Germany
- Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
- Yeast extract
- Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$)
- อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 บริษัท Hyclone
- 2-Mecaptoethanol บริษัท Sigma, U.S.A.
- 10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10x TBE buffer)
- Methanol
- Ethanol
- Ethylacetate
- Hexane
- Cycloheximide
- Streptomycin
- Nystatin

3.3 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดน่าน ตัวอย่างละประมาณ 50 – 100 กรัม บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะ และสีของดิน บดให้ละเอียด ใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างดิน

ทำการบันทึกสมบัติของดินและวัดหาค่า pH ของดิน โดยการผสมดินและน้ำด้วยอัตราส่วนของดินต่อน้ำเท่ากับ 1:2 (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) และวัดด้วยเครื่อง pH meter

3.5 การแยกแอกติโนมัยซีทีสจากดินตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างดิน 3 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 27 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ได้สารแขวนลอยดินระดับการเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นเพิ่มระดับการเจือจางเป็น 10^{-2} - 10^{-5} (serial ten fold dilution) ปิเปตสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตรที่ระดับการเจือจางเท่ากับ 10^{-3} - 10^{-5} เกลี่ย (spread) บนอาหาร Sodium Caseinate Agar (SCA) (ภาคผนว ก หมายเลข 1) โดยเติม cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อลิตร ผสมกับ nystatin 50 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7–14 วัน คัดเลือกแอกติโนมัยซีตที่โคโลนีมีลักษณะแตกต่างกัน ขีดลาก (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SCA เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยว ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารผิวเอียง Oat Meal Agar (OMA) (ภาคผนว ก หมายเลข 17) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บสปอร์โดยทำเป็นสปอร์แขวนลอยในสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 การเก็บรักษาแอกติโนมัยซีทีส

ขีดแอกติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อผิวเอียง Oat Meal Agar หรือ Mannitol Mungbean Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-14 วัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 1-2 เดือน สำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์บนอาหารมากพอ เติมสารละลาย 20% กลีเซอรอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดออก แล้วกรองสปอร์แขวนลอยด้วย

สำลีปลอดเชื้อ ปิเปตต์สารแขวนลอยสปอร์ที่กรองแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ (micro tube) เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 1 ปี

3.7 การทดสอบเพื่อค้นหาแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

นำแอกติโนมัยซีทีสจากอาหารผิวเอียงในข้อ 3.6 ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Oat Meal Agar (OMA) หรือ Mannitol Mungbean Agar (MBA) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.7.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

ใช้ที่เจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งในข้อ 3.7.1 จำนวน 3 จุด ใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ทั้ง 3 ชิ้นถ่ายลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Malt Extract Broth (MEB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 29) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบโรตารี (rotary shaker) 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นจึงนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายต่อไป

3.7.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลาย

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.7.2 มากรองแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วย เอททิลแอซิเตต (ethyl acetate) โดยใช้กรวยแยก โดยใช้ปริมาตรเอททิลแอซิเตตต่อปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เก็บสารสกัดส่วนของชั้นเอททิลแอซิเตตไว้ แล้วทำการสกัดส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำด้วยเอททิลแอซิเตตอัตราส่วนเท่าเดิมอีกครั้ง นำส่วนของเอททิลแอซิเตตที่ได้ทั้งสองครั้งมารวมกัน แล้วนำมาระเหยเอททิลแอซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายคราบสารสกัดด้วยสารละลาย 25%DMSOปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวบ์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบและยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ต่อไป

3.7.4 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ (test organism)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus cereus ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Candida albicans ATCC 10231

Saccharomyces cerevisiae ATCC 5169

Aspergillus niger ATCC 6275

3.7.4.1 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบขีดลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยว 4-5 โคโลนี ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^{-8} CFU/ml

3.7.4.2 การเตรียมยีสต์ทดสอบ

นำยีสต์ทดสอบขีดลงบนอาหาร Sabouraud Agar (SBA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีเดี่ยว 2-3 โคโลนี ละลายใน 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบด้วยด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ $1x10^{-6}$ - $3x10^{-6}$ CFU/ml

3.7.4.3 การเตรียมราเส้นใยสำหรับทดสอบ

เลี้ยงราในอาหารผิวเอียง PDA (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) 3-5 วัน หรือจนมีการสร้างสปอร์ เติมสารละลาย 0.85% NaCl ใช้ลูปขูดสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองสปอร์ด้วยสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1x10^{-6}$ - $3x10^{-6}$ CFU/ml โดยการเจือจางสปอร์ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl แล้วนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.7.4.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Agar well (Murray และ Baron, 1999)

ใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดทดลองที่มีสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.7.4.1 - 3.7.4.3 บิดสำลีกับข้างหลอดพอหมาด ๆ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ และรา โดยป้ายให้ทั่วในลักษณะสามทิศทาง ทิ้งจานอาหารไว้เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ที่เจาะรูไม้คอร์กเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนอาหารแข็ง แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะออกโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ทำการควบคุมให้หลุมที่เจาะมีปริมาตรเท่ากันโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิเปตสารสกัดจากข้อ 3.7.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบ, บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับราเส้นใย หลังจากนั้นวัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยชุดควบคุมบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย คือ streptomycin, ยีตส์ คือ nystatin และราเส้นใย คือ cycloheximide และชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อและผ่านขั้นตอนการสกัดเหมือนกันทุกประการ

3.7.4.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้ถ้วยสเตนเลส

ใช้ไม้พันสำลีที่ม่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดทดลองที่มีสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เตรียมได้ตามวิธีข้อ 3.7.4.1 - 3.6.4.3 บิดสำลีกับข้างหลอดพอหมาด ๆ ป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Agar สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ และรา โดยป้ายให้ทั่วในลักษณะสามทิศทาง ทิ้งจานอาหารไว้เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำถ้วยสเตนเลสที่ผ่านการม่าเชื้อแล้ว วางบนผิวหน้าอาหาร โดยควบคุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบและปริมาตรอาหารในจานเลี้ยงเชื้อให้เท่ากัน ปิเปตสารสกัดจากข้อ 3.7.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในถ้วยสเตนเลส ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ *Aspergillus niger* หลังจากนั้นวัดบริเวณที่เกิดวงใส (clear zone) โดยชุดควบคุมบวกสำหรับเชื้อแบคทีเรีย คือ streptomycin, ยีตส์ คือ nystatin และราเส้นใย คือ cycloheximide และชุดควบคุมลบคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมหัวเชื้อและผ่านขั้นตอนการสกัดเหมือนกันทุกประการ

3.7.4.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทดสอบโดยวิธี Dual Culture (Aghighi และคณะ, 2004)

การทดลองนี้ทำการทดสอบเฉพาะแอกติโนมัยซีทีสที่ได้ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นแล้ว โดยราก่อให้เกิดโรคพืช จากกรมวิชาการเกษตร ดังนี้

Alternaria porri DOAC 1756

Collectotrichum capsici DOAC 1196

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* DOAC 0874

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* DOAC 0893

Pythium aphanidermatum DOAC 1662

Phytophthora parasitica DOAC 0005

เตรียมราทดสอบโดยใช้ที่เจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของราทดสอบ แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะออกโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ นำชิ้นวุ้นของราทดสอบที่ได้ วางลงตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP2 (ภาคผนวก ก หมายเลข 16) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-6 วัน

เตรียมแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบโดยใช้ที่เจาะรูไม้คอร์กเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อโดยผ่านเปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอกติโนมัยซีทีสที่เจริญอยู่บนอาหารแข็งในข้อ 3.6.1 นำชิ้นวุ้นที่มีแอกติโนมัยซีทีส วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP2 ในจานเลี้ยงเชื้อที่จะใช้ทดสอบ โดยวางให้มีระยะห่างจากจุดที่จะวางชิ้นวุ้นราทดสอบ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 วัน จากนั้นใช้ที่เจาะรูไม้คอร์กเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนโคโลนีของราทดสอบที่เตรียมไว้ข้างต้นชนิดละ 2 ชิ้น ชิ้นแรกนำมาวางในระนาบเดียวกันในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแอกติโนมัยซีทีส เป็นชุดทดสอบ ชิ้นที่ 2 วางลงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ISP2 เป็นชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 วันสำหรับ *Pythium aphanidermatum* และ ประมาณ 4-6 วัน สำหรับรบทดสอบอื่น ทำการบันทึกระยะทางที่เส้นใยของราทดสอบถูกยับยั้งในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีทีส ($\Delta\gamma$) โดยใช้สูตร

$$\Delta\gamma = \gamma_0 - \gamma$$

γ_0 คือ รัศมีของเส้นใยที่เจริญแผ่ออกมาของราในชุดควบคุม

γ คือ รัศมีของเส้นใยของราในชุดทดสอบที่เจริญในระนาบเดียวกับแอกติโนมัยซีทีส

3.8 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงและสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

3.8.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

เตรียมหัวเชื้อแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ตามวิธีการในข้อ 3.7.1 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB ตามวิธีการในข้อ 3.7.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

3.8.2 การทดสอบเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ทำการแปรผันอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 6 ชนิด คือ Yeast-Malt Extract Agar (ISP2) Sodium Caseinate Broth (SCB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) Sodium Caseinate Yeast Extract Broth (SCYB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) Nutrient Broth (NB) Malt Extract Broth (MEB) และ Soluble Starch Broth (SSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ โดยปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 3.8.1 ใส่ในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละชนิด ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดทำจำนวน 3 ชุด บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นกรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารแต่ละชนิด ทั้ง 3 ชุด มาสกัดด้วยตัวทำละลายโดยทำการแปรผันตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน (hexane), เอททิลแอซิเตต (ethyl acetate) และ เมททานอล (methanol) โดยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิดชุดแรก ทำการสกัดโดยใช้ เฮกเซน ชุดที่สองและชุดที่สาม ทำการสกัดโดยใช้เอททิลแอซิเตตและเมททานอลตามลำดับ ในกรณีที่ตัวทำละลายคือ เฮกเซน และ เอททิลแอซิเตต ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.7.3 ในกรณีที่ตัวทำละลายคือ เมททานอล ทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) จนน้ำเลี้ยงเชื้อแห้งและมีลักษณะเป็นผง จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 100 มล. ลงไปเพื่อสกัดสาร เก็บส่วนที่เป็นชั้นของตัวทำละลายนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายสารออกมาด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้วิธีการใช้ถ้วยอะลูมิเนียมเป็นภาชนะรองรับสารสกัดตามวิธีการในข้อ 3.7.4.5 นำผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ ไปทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

3.9 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์ของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2

3.9.1 การเตรียมหัวเชื้อ (seed inoculum)

เตรียมหัวเชื้อแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 6.2 ตามวิธีการในข้อ 3.7.1 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ตามวิธีการในข้อ 3.7.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

3.9.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งจุลินทรีย์

ปิเปตหัวเชื้อจากข้อ 3.9.1 ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Soluble Starch Broth (SSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใส่หัวเชื้อฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าด้วย เครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ กรองเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ และทำการบันทึกผลน้ำหนักของกระดาษกรองเอาไว้แล้ว นำเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักของเส้นใยในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำไปสกัดโดยใช้ตัวทำละลายคือ เมททานอล โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (lyophilizer) จนน้ำเลี้ยงเชื้อแห้งและมีลักษณะเป็นผง จากนั้นเติมเมททานอลปริมาตร 100 มล. ลงไปเพื่อสกัดสาร กรองเอากากตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 เก็บส่วนที่เป็นตัวทำละลายนำมาทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายสารออกมาด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีการในข้อ 3.7.4.5 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและน้ำหนักแห้งของเซลล์ และความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและปริมาณสารปฏิชีวนะ

3.10 การแยกสารสกัดเบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ใช้แผ่น TLC aluminium sheet รุ่น Silica gel60 F_{254} และใช้ตัวทำละลาย เช่น เมท ทานอล, เอททิลแอซิเตต, และ เฮกเซน เป็นตัวชะเพื่อเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะเบื้องต้น โดยหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ออกจากสารอื่น ๆ ที่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง การตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC หลังจาก develop แล้วมีหลายวิธี เช่น อบแผ่น TLC ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือส่องภายใต้รังสี ยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือพ่นด้วยสาร anisaldehyde ในกรดซัลฟิวริก หรือจุ่มด้วยสารละลายวานิลลิน (vanillin) แล้วพ่นลมร้อน สีของสารจะปรากฏ จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารและคำนวณหาค่า retention factor (Rf)

3.11 การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography) (Zitouni และคณะ, 2005)

หลังจากที่ develop แผ่น TLC ด้วยระบบของตัวชะที่เหมาะสมแล้ว นำแผ่น TLC ออกมาจากภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวชะ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวชะระเหยออกไปจนหมด หลังจากนั้นนำแผ่น TLC มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ด้านล่างนำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.7.4.1 - 3.7.4.3 มาทดสอบการยับยั้งบนแผ่น TLC โดยปิเปตเชื้อทดสอบในปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ (semi solid) ขณะอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นของเหลวที่อุณหภูมิ 42-45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายอย่างสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นทำการเทอาหารทับลงบนแผ่น TLC ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแบคทีเรียทดสอบ คือ Mueller-Hinton Agar และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับยีสต์และราเส้นใยคือ Sabouraud Agar หลังจากอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซีย เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นราเส้นใย ตรวจสอบบริเวณใสบนแผ่น TLC และวัดหาค่า Rf ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิด ในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบมีชุดควบคุมบวกคือแผ่น TLC ที่ spot สารสกัดจากแอกติโนมัยซีสแต่ไม่ได้ทำการชะด้วยตัวทำละลายและชุดควบคุมลบคือ แผ่น TLC ที่ไม่ได้ spot สารสกัดจากแอกติโนมัยซีส

3.12 การทดสอบเพื่อคัดเลือกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

เซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ (Human tomour cell lines) ที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

A375	(Human malignant melanoma)	ATCCno.CRL-1619
SW620	(Human colorectal adenocarcinoma)	ATCCno.CCL-227
KatoIII	(Human gastric carcinoma)	ATCCno.HTB-103
HepG2	(Human hepatocellular carcinoma)	ATCCno.HB-8065
BT474	(Human ductal carcinoma)	ATCCno.HTB-20
Jurkat	(Human acute T cell leukemia)	ATCCno.CRL-2063

3.12.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

นำเซลล์มะเร็งที่ถูกเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาละลาย โดยแช่หลอดเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ในอ่างน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส ทันที แกว่งหลอดไปมาให้น้ำแข็งละลายอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีสารละลาย 1XPBS (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ PRMI-1640 (complete media) (ภาคผนวก ก หมายเลข 32) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ปิเปตอาหารขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นปิเปตถ่ายเซลล์แขวนลอยทั้งหมดใส่ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์ ตรวจดูสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-4 วัน หรือเมื่อเห็นว่าอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จนกว่าเซลล์จะเจริญหนาแน่น

3.12.2 การเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์

ในกรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นชนิดเซลล์เกาะผิว ได้แก่ A375, SW620, KatoIII, HepG2 และ BT474 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยดูดอาหารเก่าทั้งหมดออกแล้วเติมอาหารใหม่ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เข้าไปแทน ในกรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นชนิดเซลล์แขวนลอย ได้แก่ Jurkat ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม complete media

ปริมาตร 7 มิลลิลิตรลงไป ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ รอจนเซลล์เจริญหนาแน่นจึงถ่ายเซลล์สู่จานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมต่อไป

3.12.3 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำไปทำการทดสอบ

นำเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.12.1 ที่อยู่ในระยะ exponential phase ถ่ายลงในจานเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม ในกรณีที่เซลล์มะเร็ง Jurkat ATCCno.CRL-2063 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย ถ่ายเซลล์โดยการดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้ตะกอนของเซลล์ กรณีที่เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์เกาะผิว ถ่ายเซลล์โดยการดูดอาหารในภาชนะเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วยการเติมสารละลาย 1XPBS (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เอียงภาชนะไปมา 5-6 ครั้ง แล้วดูดสารละลายออก เติม trypsin-EDTA ความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 2 นาที สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเคาะภาชนะด้านข้างเบา ๆ เมื่อเซลล์เริ่มหดตัวและแขวนลอยอยู่ในอาหาร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ดูดอาหารขึ้นลงชะเซลล์ที่เหลือให้หลุดออกจากผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ ดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งได้ตะกอนของเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ complete media ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หลังจากนั้นเจือจางเซลล์ให้มีจำนวน $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่ลงในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ในปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ $5x10^4$ เซลล์ต่อหลุม บ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบกับสารสกัดด้วยวิธี MTT ต่อไป

3.12.4 การนับจำนวนเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์ที่มีชีวิตโดยย้อมด้วยสี trypan blue

ปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.11.3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสี tryphan blue ความเข้มข้น 0.5% w/v ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับโดยนับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ 4 มุม ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมไม่ติดสีของ tryphan blue โดย

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับได้} \times 10^4 \times 2}{4}$$

3.12.5 การทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งทดสอบโดยวิธี MTT assay

(Palaga และคณะ, 1996)

หลังจากบ่มเซลล์ในข้อ 3.11.3. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว หยดสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสที่ได้จากข้อ 3.6.3 ลงไปในหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ โดยหยดปริมาตรหลุมละ 5 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ โดยหยดสารละลาย MTT (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย MTT เท่ากับ 0.5 mg/ml สารละลาย MTT จะทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ mitochrondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สารละลาย MTT ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงไม่ละลายน้ำ เรียกว่าผลึก formazan ซึ่งปริมาณ dehydrogenase ในเซลล์หนึ่ง ๆ จะคงที่ ดังนั้น ปริมาณผลึก formazan ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์มีชีวิต โดยมีชุดควบคุมลบคือหลุมที่หยดด้วยสารละลาย 25%DMSO และ Blank คือหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์มะเร็ง เมื่อหยดสารละลาย MTT แล้ว บ่มเซลล์ที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติม 0.04 N HCl ใน isopropanol (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วทำการปิเปตของเหลวขึ้นลงหลายครั้งด้วย multi channel pipette เพื่อละลายผลึกสีม่วง หลังจากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ (%viability) โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{(\text{ODtest average} - \text{ODblank average}) \times 100}{\text{OD negative control average} - \text{ODblank average}}$$

ODtest average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ใช้ทดสอบด้วยสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีส

ODcontrol negative control average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลาย 25%DMSO

ODblank average = ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์

3.12.6 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

ในเซลล์ชนิดเกาะผิวทำการลอกเซลล์ที่เกาะกับภาชนะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin-EDTA ได้เซลล์แขวนลอย ในเซลล์ชนิดแขวนลอยสามารถดูดเซลล์ออกมาได้เลย โดยดูดสารแขวนลอยเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 + 1%DMSO (ภาคผนวก ก หมายเลข 33) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเก็บเซลล์ (cryotube) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทันที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดเก็บเซลล์ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถเก็บเซลล์ไว้ได้เป็นเวลานาน

3.13 การศึกษาผลของสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสต่อการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ไลน์มะเร็งมนุษย์โดยวิธีย้อยด้วย DNA dry Hoechst 33342 (สายพิณ, 2549)

ประเภทเซลล์แขวนลอย ได้แก่เซลล์มะเร็ง Jurkat

เตรียมเซลล์ Jurkat แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ compleat media ให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม จำนวน 3 หลุม โดยหลุมแรกหยดด้วยสารสกัดจากแอกติโนมัยซีทีสปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลุมที่สองหยดด้วยสารละลาย 25%DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเป็นชุดควบคุมลบ และหลุมที่สามหยดสาร etoposide ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นชุดควบคุมบวก เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเซลล์ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่สภาวะเดิมเทส่วนใสทิ้ง เติม 1% glutaraldehyde ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต 1% glutaraldehyde ทิ้ง ปั่นล้างเซลล์ด้วย 1XPBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เทส่วนใสทิ้ง เติม 1XPBS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสี Hoechst 33342 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ลงบนกระจกสไลด์ ปิดด้วย cover slip ใช้น้ำยาทาเล็บเคลือบรอบ ๆ ด้านข้างของ cover slip ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิสโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์อะพอพโทซิส} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เกิด apoptotic nuclei x 100}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

3.14 การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

จำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา เช่น การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างรงควัตถุเมลานิน การทอดสอบทางชีวเคมี การย่อยสลายสาร ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ความสามารถในการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ตามวิธีที่รายงานโดย (Williams และคณะ, 1989)

3.14.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scaning Electron Microsope:SEM)

ใช้เทคนิค slide culture (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) เลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Malt Extract Agar (GYM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) และ Sodium Caseinate Yeast Extract Agar (SCYA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 14) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร และจำนวนวันที่มีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วิธีเตรียมตัวอย่างดังภาคผนวก ค หมายเลข 4 สังเกตลักษณะการแตกออกของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ ลักษณะของสายสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะพื้นผิวของสปอร์

3.14.2 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP (International Streptomyces Project) (ภาคผนวก ก หมายเลข 15-20)

อาหาร ISP ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

ISP1 คือ Trypton-Yeast Extract Agar (TYEA)

ISP2 คือ Yeast-Malt Extract Agar (YMEA)

ISP3 คือ Oat Meal Agar (OAA)

ISP4 คือ Inorganic Salts Starch Agar (ISSA)

ISP5 คือ Glycerol Asparagines Agar (GAA)

ISP6 คือ Peptone Yeast Extract Iron Agar (PYEA)

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP 1-6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกการเจริญ สีและลักษณะของเส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำและการสร้างสปอร์

3.14.3 ทดสอบการสร้างรงควัตถุเมลานิน

เลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนอาหาร ISP6 (Peptone Yeast Extract Iron Agar) และ Tyrosine Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 21) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.14.4 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท

แทง (stab) แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 22) ในหลอดอาหารขนาด 16x150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท โดยหยดสารละลายเอ (ละลาย sulfanilic acid 0.8 กรัม ใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร) และสารละลายบี (ละลาย alphanaphthylamine 0.5 กรัม ใน 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลองซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงอันเนื่องมาจากไนไตรทถูกสลายต่อไปเป็นแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน ต้องทดสอบขั้นที่สองโดยเติมผงสังกะสีลงไป หากเกิดสีแดงแสดงว่ายังมีไนเตรทอยู่ (Shirling และ Gottlieb, 1966)

3.14.5 ทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ขีด (streak) และแทง แอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 บนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียง ISP6 (Peptone Yeast Extract Iron Agar) และ อาหารสำเร็จรูป TSI บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-24 ชั่วโมง สังเกตอาหารจะมีสีน้ำเงินดำ (bluish-black color) ควรสังเกตสีของอาหารก่อนที่เชื้อจะสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ลงไปในอาหาร (Tresner และ Danga, 1958) และถ้ามีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะเกิดการแตกที่วุ้นในอาหาร TSI

3.14.6 การศึกษาสมบัติการย่อยสลายสาร (degradation activity)

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) ที่แปรผัน 0.5% อะดีนีน (adenine), 0.5% ไทโรซีน (tyrosine), 0.4% ไซแลน (xylan), 0.4% แซนทีน (xanthine), 0.1% เคซีน (casein), 0.4% เจลาติน (gelatin) และ 0.1% แป้ง (starch) ตรวจสอบการย่อยสลายโดยสังเกต

การเปลี่ยนแปลงความใสบริเวณรอบหรือใต้โคโลนีในอาหารวุ้น ยกเว้นการย่อยสลายเจลาตินและแป้ง ตรวจสอบโดยสังเกตจากวงใสหลังจากเททับด้วยสารละลาย acidified $HgCl_2$ และ Iodine ตามลำดับ

3.14.7 การตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) บ่มที่อุณหภูมิ 37 , 45 และ 55 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจากวันที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 2 สัปดาห์

3.14.8 การตรวจสอบการเจริญที่ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Bennett Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 23) ที่มีพีเอช เท่ากับ 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 8.5, และ 9 ตามลำดับ และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญหลังจาก 14 วัน

3.14.9 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 24) ที่แปรผันแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ 0.1%*L*-arginine, 0.1%*L*-histidine, 0.1%*L*-methionine, 0.1%potassium nitrate, 0.1%*L*-theonine, 0.1%*L*-valine, 0.1%*L*-glutamine และ 0.1%*B*-alanine บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยเทียบการเจริญกับชุดควบคุมลบคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน และชุดควบคุมบวกคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Medium Agar ที่ประกอบด้วย 0.1% *L*-Asparagine หรือ 0.1% *L*-proline

3.14.10 การตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ขีดแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 25) ที่แปรผันสารประกอบคาร์บอน ได้แก่ 1.0% *L*-arabinose, 1.0% dextran, 1.0% *D*-fructose, 1.0% *D*-galactose, 1.0% meso-inositol, 1.0% *D*-lactose, 1.0% *D*-mannitol, 1.0% *D*-manose, 1.0% *L*-rhamnose, 1.0% sucrose, 1.0% threhalose, 1.0% xylose, 1.0% sodium acetate และ 1.0% sodium

citrate ตามลำดับ ทำการตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนโดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon Utilization Agar ที่ประกอบด้วย 1.0% glucose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.15 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

3.15.1 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999) โดยเลี้ยงแอกติโนมัยซีทีสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 (Yeast-Malt Extract Agar) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเส้นใยประมาณ 30 กรัม ไปบดด้วยโกร่งจนละเอียดเติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายส่วนผสมลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรและปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายผสมของ chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลายผสมของ chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำเข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม 70 % เอธานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase (ความเข้มข้น 10 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เติมสารละลาย 20% PEG (Polyethylene glycol) (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยง

ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของดีเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอด้วยการเติม 70%เอธานอลปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.15.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ใช้ไพรเมอร์ (primer) อ้างอิงข้อมูลจาก Rintala และคณะ (2001) และ Lanoot และคณะ (2005) ในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1541 base pairs ไพร์เมอร์ดังกล่าวคือ

Forward primer PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ตำแหน่งที่จับ 8-27

Reward primer StrepF (5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3') ตำแหน่งที่จับ 1194-1212

ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โครโมโซมมอลดีเอ็นเอของแอกติโนมัยซีสสายพันธุ์ Nan 2.4 และ Nan 6.2 ซึ่งสกัดตามวิธีในข้อ 3.14.1 เป็นแม่แบบ (template) ในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ประกอบด้วยสารผสม dNTP, forward primer, reward primer, เอ็นไซม์ Tag DNA polymerase, PCR บัฟเฟอร์, แมกนีเซียมคลอไรด์, และเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ครบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่าง ๆ ในสารละลาย PCR 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการ

รีเอเจนต์	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR บัฟเฟอร์	1x
2mM dNTP mixture	0.2 mM
25 mM $MgCl_2$	1.5 mM
PrimerI (forward)	0.5 µM
PrimerII (reverse)	0.5 µM
Tag DNA polymerase	0.5 U
แม่แบบ (DNA template)	1ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation	95 °C	5 นาที	
Denaturation	95 °C	1 นาที	35 รอบ
Annealing	53 °C	1 นาที	
Extension	72 °C	1 นาที	
Final Extension	72 °C	15 นาที	
Hold	4 °C		

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมผลิตผลพีซีอาร์ (PCR product) กับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5:2 หยดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำอิเลคโทรโฟรีซีสในเจลแชมเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV–Transilluminator) และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

3.15.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA

นำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ primer PA (forward primer) กับ StrepF (Reward primer) ส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ณ บริษัทวอร์ดเมดริกซ์ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank DNA database จากเว็บไซต์ นำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของตัวอย่างและข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank DNA database โดยนำข้อมูลลำดับเบสมาจัดเรียงความเหมือนของลำดับเบสโดยใช้ โปรแกรม Clustal X (http://innprotweiznann.ac.il/solfware/ClustalX.html) และทำการตรวจสอบการจัดเรียงความเหมือนของลำดับเบสอีกครั้งด้วยโปรแกรม MacClade 4 (Maddison และ Madison, 2001) โดยมีลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNAของ *Nocardia asteroids* (z36934) เป็น outgroup Phylogenetic tree จะถูกสร้างขึ้นใน Neighbour-Joining mode ของโปรแกรม PAUP*4.08b (PPC) (Swofford, 1999)