บทที่ 2

วิธีทดลอง

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ก๊าซที่ใช้

ไนโตรเจน	ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซจำกัด
อาร์กอน	ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซจำกัด
ไฮโดรเจน	ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
ฮีเลียม	ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซจำกัด
ไฮโดรเจนมาตรฐาน	ของบริษัท Scott Environmental Technology

คาร์บอนไดออกไซด์มาตรฐาน ของบริษัท Scientific Gas Products

1.2 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสงของ Bosch & Lomb รุ่น Spectronic 20
เครื่องปั่นซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ของ Beckman รุ่น J 21
เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ของ Heto Lab Equipment
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟของ Varian รุ่น 3700
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำของ Hirayama รุ่น HA - 3 D
เครื่องดูดสูญญากาศของ Hitachi

1.3 เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดวิเคราะห์

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นของบริษัทดิฟโก (Difco)

008642

2. จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เชื้อที่ใช้ในการทดลอง คือ Klebsiella pneumoniae M5a1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มียีนการตรึงไนโตรเจน (nif $^+$) อยู่ด้วย

2.2 ไวรัสที่ใช้ในการทดลอง คือ bacteriophage P_1

3. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 L broth, L agar (Luria และคณะ, 1960) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม ในปริมาตรของอาหาร 1 ลิตรจะประกอบด้วย

ทริพโตน (Tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมลาร์ เติมกลูโคสให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 เปอร์เซนต์ ถ้าเป็น L agar เติมวุ้นอาหาร (Bacto agar) 15 กรัมต่อลิตร

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ (Minimal medium) (ปรับปรุงจาก Streicher และคณะ, 1971) ประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	6.25	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.00	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.10	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต	0.01	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต	0.01	กรัม
โซเดียมซีลีไนท์	0.002	กรัม
กลูโคสหรือแมนนิทอลหรือซอร์บิทอล	5.00	กรัม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับ pH เป็น 7.6 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้นอาหาร (Bacio agar) 15 กรัมต่อลิตร

3.3 R-medium (Goldberg และคณะ, 1974) เป็นอาหารที่ใช้หาปริมาณและเพิ่มปริมาณ bacteriophage P_1 ในปริมาตรของอาหารหนึ่งลิตรจะประกอบด้วย

ทริพโตน (Tryptone)	15.50	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	6.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.50	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มอล เติมกลูโคสให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ในกรณีที่ใช้เป็น R-bottom medium เติมวุ้นอาหาร (Bacto - agar) 12 กรัม ในกรณีที่ใช้เป็น R-top medium เติมวุ้นอาหาร (Bacto-agar) 6 กรัม

3.4 Diluting Fluid (Miller , 1972) สำหรับเจือจาง bacteriophage P_1 สารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

ทริพโตน (Tryptone)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	8.5	กรัม

3.5 MC medium (Miller, 1972) สำหรับใช้ในการเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส สารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	5 มิลลิโมล
แมกนีเซียมซัลเฟต	100 มิลลิโมล

4. การเก็บรักษาจุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

4.1 เชื้อที่ใช้ศึกษา

เก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลองไว้บนวุ้นเอียงของ L agar บรรจุอยู่ในขวดเกลียวที่เคลือบด้วยพาราฟินที่อุณหภูมิ 4° ซ

4.2 ไวรัส

เก็บรักษา bacteriophage P_1 ใน L broth ที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4° ซ

5. การเตรียมสารละลาย

5.1 สารละลายสำหรับหาปริมาณน้ำตาล (Snell และ Snell,1961)

ละลายโปตัสเซียมเฟอร์ไรด์ซัยยาไนด์ 0.18 เปอร์เซนต์ ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 3 เปอร์เซนต์ เมื่อจะใช้หาปริมาณน้ำตาล นำสารละลายดังกล่าว 65 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนไตรต์ (Snell และ Snell,1961)

สารละลายซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide)

ละลายซัลฟานิลาไมด์ 1 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง 25 เปอร์เซนต์ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย เอ็น – (1–เนฟธิล) เอทธิลีนไดอะมีนไฮโดรคลอไรด์ (N-(1-napthyl) ethylenediamine hydrochloride)

ละลาย เอ็น– (1–เนฟธิล) เอทธิลีนไดอะมีนไฮโดรคลอไรด์ 0.02 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

5.3 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน (Lowry, 1951)

สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (Alkali copper)

เติม 1 มิลลิลิตรของสารผสมระหว่าง 0.5 เปอร์เซนต์ คอปเปอร์ซัลเฟตกับ 1 เปอร์เซนต์ โซเดียมโปตัสเซียมคาร์เตรต ลงใน 50 มิลลิลิตรของ 2 เปอร์เซนต์ โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลายฟีนอล – ซิโอคัลทู (Phenol - Ciocalteu)

ละลายโซเดียมทังสเตต 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5

กรัม ในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร เติม 85 เปอร์เซนต์ กรดฟอสฟอริก 25 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 10 ชั่วโมง เติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร น้ำโบรมีน 2–3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอเป็นเวลาประมาณ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4° ซ ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

6. การแยกฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแตนท์

6.1 การกลายพันธุ์และการเลือกมิวแตนท์

เลี้ยง Klebsiella pneumoniae M5a1 ใน L broth ที่อุณหภูมิ 37° ซ จนเซลล์อยู่ใน stationary phase เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 5 000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2–3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเซลล์ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ที่มี N-methyl-N'-nitro - N - nitrosoguanidine (NTG) ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างเซลล์ที่ถูกกลายพันธุ์นี้ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 2–3 ครั้ง นำไปเลี้ยงใน L broth โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37° ซ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง นำมาเจือจางให้มีปริมาณเซลล์ต่าง ๆ กันด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ นำ 0.1 มิลลิลิตรของเซลล์ที่เจือจางนี้มาหยดใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเคสอะมิโนแอซิด (Casamino acid) 1 กรัมเปอร์เซนต์ และเบนซิลไวโอโลเจน (Benzyl viologen) 12 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ บ่มภายใต้บรรยากาศของอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเห็นโคโลนีชัดเจน (ประมาณ 48 ชั่วโมง) เลือกเซลล์ที่มีโคโลนีสีขาวโดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อนี้ 1 โคโลนีมาจุด (grid) บนอาหาร สูตรปรับต่ำ จำนวน 50 โคโลนีต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ จนเห็นโคโลนีชัดเจน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) ใช้เป็น Master plate ในการจำแนกฟีโนไทพ์เบื้องต้นต่อไป

6.2 การจำแนกฟีโนไทพ์เบื้องต้น

การเปรียบเทียบสีของโคโลนีในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีและไม่มีฟอร์เมต

พิมพ์ (replica) เชื้อจาก Master plate ลงในอาหารที่มีซูโครส 0.5 เปอร์เซนต์เป็นสารต้นคาร์บอนที่เสริมด้วยเคสอะมิโนแอซิด และเบนซิลไวโอโลเจน และอาหารชนิดเดียวกัน แต่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ บ่มภายใต้บรรยากาศของอาร์กอนที่อุณหภูมิห้อง สังเกตสีของโคโลนีที่เกิดขึ้น

การทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

พิมพ์เชื้อจาก Master plate ลงในอาหารสูตรปรับต่ำที่ปราศจากสารต้นคอไนโตรเจน บ่มภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง สังเกตโคโลนีที่สามารถขึ้นได้

การทดสอบการเกิดก๊าซของมิวแตนท์

เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น นำเชื้อตั้งต้น 0,1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดจุกเกลียว เติมอาหารสูตรปรับต่ำ pH 7.6 7.0 และ 6.6 และอาหารชนิดเดียวกันที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองนั้น เทพาราฟินเหลว (liquid paraffin) ทับก่อนปิดจุกเกลียว บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

7. การตรึงตำแหน่งยีนที่ผิดปกติโดยการเหนี่ยวนำผ่านไวรัส (Transduction)

7.1 การแยก mtl

เลี้ยง Klebsiella pneumoniae M5a1 ใน L broth ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 5 000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2–3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเซลล์ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ที่มี N-methyl - N'-nitro - N-nitroso guanidine (NTG) ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างเซลล์ถูกกลายพันธุ์นี้ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 2-3 ครั้ง นำเซลล์ไปเลี้ยงใน L Broth โดยเขย่าที่ 37° ซ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2-3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเซลล์ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ 37° ซ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เติมเพนนิ-ซิลิน จี (Pennicillin G) และดี - ไซโคลซีรีน (D - Cycloserine) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เขย่าต่อไปอีก 5 ชั่วโมง ล้างเซลล์ 2-3 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์-เซนต์ นำเซลล์นี้ไปเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ โดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เกลี่ยเซลล์ปริมาณพอเหมาะในอาหารสูตรปรับต่ำซึ่งมีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ จนเห็นโคโลนีชัดเจน (ประมาณ 24 ชั่วโมง) พิมพ์ (replica) เซลล์ลงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน เลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน โดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อเหล่านั้นมาจุด (grid) ลงบน L-agar จำนวน 50 โคโลนีต่อ 1 จาน เพาะเชื้อ เลือกแมนนิทอลออกโซโทรพ (mtl) โดยพิมพ์ (replica) ตัวที่เลือกไว้ลงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีซอร์บิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน โคโลนีที่ไม่สามารถใช้แมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์-บอน แต่สามารถใช้ซอร์บิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน คือ mtl ที่ต้องการ

7.2 การหาปริมาณ bacteriophage P_1 (Curtiss, 1981)

เลี้ยง Klebsiella pneumoniae M5a1 ใน L broth ที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ใช้เชื้อนี้ 1.9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิ-เมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ จนอุณหภูมิคงที่ นำ bacteriophage P_1 ที่ต้องการหาปริ-มาณมาเจือจางด้วย diluting fluid ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เติม bacterio-phage P_1 นี้ 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีแบคทีเรียอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ นาน 20 นาที แยกส่วน P_1 - เซลล์ 0.2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มี R-top medium 2.5 มิลลิลิตรซึ่งละลายและอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 48° ซ เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

และเทลงในจานเพาะเชื้อที่มี R-bottom medium อยู่แล้ว เขย่าจานเพาะเชื้อให้ R-top medium กระจายทั่วผิวของ R-bottom medium ตั้งทิ้งไว้จน R-top แข็งตัว แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ ประมาณ 6 ชั่วโมง จะสามารถนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นได้ ไตเตอร์คือ จำนวน plaque ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับจำนวน plaque ที่นับได้ x dilution factor x 10^2

7.3 <u>การเพิ่มปริมาณ bacteriophage P_1</u> (Curtiss, 1981)

เพิ่ม bacteriophage P_1 ตามวิธีดังกล่าวแล้วในข้อ 7.2 โดยใช้มิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธ์ เป็นเซลล์เจ้าเรือน (host) ใช้ m.o.i. (ปริมาณ bacteriophage P_1 ต่อปริมาณแบคทีเรีย) ประมาณ 0.01 หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ จนกระทั่งเห็น R-top medium ใส (ประมาณ 4 ชั่วโมง) ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับจานเพาะเชื้อที่ไม่ได้ใส่ bacteriophage P_1 ขูดชั้น R-top ใส่ในหลอดแก้วปั่นที่มี L broth ซึ่งประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต 10 มิลลิโมลาร์ และใช้ L broth ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตนี้ล้าง R-top จากจานเพาะเชื้อให้หมด โดยใช้ L broth ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตประมาณ 3–5 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อ ตีให้วุ้นแตก เติมคลอโรฟอร์ม 0.1 มิลลิลิตรต่อ lysate 4 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดและเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่า Vortex เพื่อให้วุ้นแตก ตั้งหลอดแก้วนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมทั้งนำมาเขย่าทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง ตกตะกอนวุ้นโดยการปั่นที่ความเร็ว 5 000 – 6 000 g ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 15 นาที ตกตะกอนเซลล์และเศษชิ้นส่วนของเซลล์ด้วยคลอโรฟอร์ม 0.1 มิลลิลิตรต่อ lysate 4 มิลลิลิตร โดยการปั่นที่ความเร็ว 12 000 g ที่อุณหภูมิ 4° ซ เก็บส่วนใสไว้ในหลอดแก้ว ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4° ซ เติมคลอโรฟอร์ม 3–4 หยดลงไปด้วย โดยวิธีนี้จะสามารถเพิ่มปริมาณ P_1 ได้ถึง 5×10^9 plaque ต่อมิลลิลิตร

7.4 <u>การเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส</u> (Transduction) (Miller, 1972)

เลี้ยง <u>mtl</u> ซึ่งจะใช้เป็นเชื้อตัวรับใน L broth ที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ แล้วกระจายเซลล์ใน MC medium บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ

ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เติม bacteriophage P_1 ให้มี m.o.i. ประมาณ 1 เขย่าต่อไปอีก 20 นาที ยับยั้งการบุกรุกของ bacteriophage P_1 โดยการเติมโซเดียมซิเตรต 1 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากันลงไปที่อุณหภูมิ 0° ซ นำทรานสดักแตนท์ที่ได้มาเจือจางให้มีปริมาณเซลล์ต่าง ๆ กันด้วยโซเดียมซิเตรต 1 โมลาร์ นำ 0.1 มิลลิลิตรของเซลล์แต่ละความเข้มข้นมาหยดใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นคอคาร์บอน เกลี่ยเซลล์ให้กระจายทั่วผิวอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ จนกระทั่งเห็นโคโลนี ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยทรานสดักแตนท์ที่ได้มาจุด (grid) ลงบนอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแมนนิทอลเป็นสารต้นคอคาร์บอน 50 โคโลนีต่อ 1 จานเพาะเชื้อ นำทรานสดักแตนท์นี้มาทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต เปรียบเทียบความขุ่นสูงสุดของทรานสดักแตนท์กับไวลไทพ์

8. การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์จากการเจริญเติบโต

8.1 การตรวจสอบก๊าซที่เกิดขึ้น

เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่อุณหภูมิ 37° ซ ประมาณ 15 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น ใช้เชื้อตั้งต้น 0.1 มิลลิลิตรใส่ในอาหารสูตรปรับต่ำ 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปกรวยขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง นำไปเปลี่ยนให้เป็นบรรยากาศของอาร์กอน โดยใช้เครื่องปั๊มดูดอากาศออกจนเป็นสูญญากาศแล้วแทนที่อากาศที่ถูกดูดออกด้วยอาร์กอนจนมีความดัน 1 บรรยากาศ (760 มิลลิเมตรของปรอท) บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ ตรวจสอบชนิดและปริมาณของก๊าซที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ โดยใช้ Hamilton syringe ชนิด gas tight ขนาด 500 ไมโครลิตร ดูดก๊าซในขวดรูปกรวย 100 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ โดยใช้ดีเทคเตอร์ (Detector) ชนิด Thermal conductor คอลัมน์ Silica gel ยาว 4 เมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 60° ซ อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (Injector) 70° ซ อุณหภูมิของฟิลาเมนท์ (Filament) 140° ซ อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ 100° ซ ใช้ฮีเลียมเป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบชนิดและคำนวณปริมาณของก๊าซที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับ retention time และความสูงของ peak ของก๊าซมาตรฐาน วัดความขุ่นของเชื้อโดยวัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

8.2 การหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

(Snell และ Snell, 1961)

เติมสารละลายโปตัสเซียมเฟอร์ไรด์ยาไนด์เจือจาง 2 มิลลิลิตร ลงในชั้นสารละลายที่ได้จากการปั่นเพื่อกำจัดเซลล์ออกจากอินนอคคิวลัมแล้ว 1 มิลลิลิตร (มีปริมาณน้ำตาลอยู่ในพิสัย 15 – 200 ไมโครกรัม) ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร วัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มของการดูดแสงกับเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีปริมาณ 15 – 200 ไมโครกรัม

8.3 การหาปริมาณไนไตรต์ (Snell และ Snell,1961)

เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ 1 มิลลิลิตร ลงในชั้นสารละลายที่ได้จากการปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์ออกจากอินนอคคิวลัมแล้ว 1 มิลลิลิตร (มีปริมาณไนไตรต์อยู่ในพิสัย 0.05 – 2.0 ไมโครกรัม) เติมสารละลายเอ็น–(1–เนพธิล)–เอทธิลีนไดอะมีนไฮโดรคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร วัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไนไตรต์โดยเปรียบเทียบค่าความเข้มของการดูดแสงกับเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไนไตรต์มาตรฐานที่มีปริมาณไนไตรต์ 0.05 – 2.0 ไมโครกรัม

9. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

9.1 การเตรียมเซลล์

เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H

เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเคสอะมิโนแอซิด 1 กรัมเปอร์เซนต์ และโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ โดยเลี้ยงในขวดรูปกรวยขนาดความจุ 2 ลิตร ที่บรรจุอาหารเต็มขวด บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่นด้วยความเร็ว 2 000 g อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ล้างเซลล์ด้วย 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เก็บรักษาเซลล์นี้ไว้ที่อุณหภูมิ –70° ซ

ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน

เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N

เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเคสอะมิโนแอซิด 1 กรัมเปอร์เซนต์ และโปตัสเซียมไนเตรต 0.1 โมลาร์ เลี้ยงและเก็บเซลล์ด้วยวิธีเดียวกับการเตรียมเซลล์สำหรับตรวจสอบแอคติวิตีของฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H

9.2 การเตรียมเยื่อเซลล์ (Schnaitman, 1981)

กระจายเซลล์ที่ล้างแล้วให้เป็น 30 เปอร์เซนต์ใน 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ที่มี EDTA 5 มิลลิโมลาร์ ซูโครส 0.25 โมลาร์ ไลโซไซม์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แกว่งในอ่างไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 3 นาที เซลล์จะแข็งเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ นำมาแกว่งต่อในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 1.5 นาที เซลล์จะเริ่มละลาย ทำเซลล์ให้แข็งและเหลวด้วยจังหวะดังกล่าวสลับกัน 6 ครั้ง เจือจางเซลล์ลง 20 เท่าภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ ดีออกซิไรโบนิวคลีเอส (Deoxyribonuclease) 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคส 37 มิลลิโมลาร์ กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase)0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไดไธโอทรีทอล (Dithiotreitol) 6.67 มิลลิโมลาร์ นำไปเขย่ากลับไปมาที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 30 นาที กำจัดกากเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 5 000 g ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนเยื่อเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 27 000 g ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้มากระจายใน 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 เพื่อใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ฟอร์มต่อไป

9.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H (ปรับปรุงจาก Lester และ De Moss, 1971)

สารละลายที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอ็นไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 0.25 มิลลิโมลาร์ EDTA 0.5 มิลลิโมลาร์เบนซิลไวโอโลเจน บรรจุในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ปิดจุกยางและดูดอากาศออกด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศ แทนที่ด้วยอาร์กอน เติมสารละลาย

โซเดียมไดไฮโอไนด์ – โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.125 มิลลิโมลาร์ – 0.36 มิลลิโมลาร์ เติมเอ็นไซม์และโซเดียมฟอร์เมตให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.18 มิลลิโมลาร์ ติดตามแอคติวิตีโดยการบันทึกความเข้มของการดูดแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณเบนซิลไวโอโลเจนที่ถูกรีดิวส์ต่อนาทีจากค่า extinction coefficient ของเบนซิลไวโอโลเจน ซึ่งเท่ากับ 7.4 มิลลิโมลาร์$^{-1}$ เซนติเมตร$^{-1}$

9.4 <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N</u>

(Lester และ DeMoss,1971)

สารละลายที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 0.078 มิลลิโมลาร์ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล (DCPI) และ 0.24 มิลลิโมลาร์ฟีนาซิน-เมโธซัลเฟต (PMS) บรรจุอยู่ในหลอดแก้วขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ปิดจุกยางและดูดอากาศออกด้วยเครื่องปั๊มสูญญากาศ แทนที่ด้วยอาร์กอน เติมเอนไซม์ลงในหลอดทดลอง บันทึกความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที เติมโซเดียมฟอร์เมตให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 18 มิลลิโมลาร์ ติดตามแอคติวิตีโดยการบันทึกความเข้มของการดูดแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ถูกรีดิวส์ต่อนาทีจากค่า extinction coefficient ของไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ซึ่งเท่ากับ 21 000 โมลาร์$^{-1}$ เซนติเมตร$^{-1}$

9.5 <u>การหาปริมาณโปรตีนของเยื่อเซลล์</u> (Lowry , 1951)

ใช้สารละลายของเยื่อเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ในพิสัย 10 – 100 ไมโครกรัม เติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายฟีนอล – ซิโอคัลทูเจือจาง 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มของการดูดแสงกับเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ที่มีปริมาณโปรตีน 10–100 ไมโครกรัม