

ลักษณะของเทมเพลตฟาจของสเตรปโตมัยซิทีสที่แยกจากดิน



นายธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1308-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERISTICS OF TEMPERATE PHAGES OF
STREPTOMYCETES ISOLATED FROM SOIL



Mr. Theerapat Wechprasit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1308-6

ธีระพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ : ลักษณะของเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตมัยซีทีสที่แยกจากดิน.

(CHARACTERISTICS OF TEMPERATE PHAGES OF STREPTOMYCETES ISOLATED FROM SOIL) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์, 88 หน้า. ISBN 974-03-1308-6

จากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆในประเทศไทยจำนวน 17 ตัวอย่าง นำมาแยกแอกติโนฟาจด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญโดยมี *Streptomyces griseus* KA1198, *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 และ *S. luteogriseus* ISP 5483 เป็นโฮสต์ สามารถแยกแอกติโนฟาจได้ 15 ชนิด เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อของสเตรปโตมัยซีทีสโดยแอกติโนฟาจจากลักษณะพลัค ด้วยวิธีการทำอาหารรุ่นสองชั้น พบว่าแอกติโนฟาจส่วนใหญ่เป็นไวรัสเลนทอฟาจเนื่องจากให้พลัคที่มีลักษณะใส มี แอกติโนฟาจ 2 ชนิด คือ Tg2 และ TN2 ที่ให้พลัคลักษณะขุ่น พร้อมกันนี้ได้นำแอกติโนฟาจ Ac7 ซึ่งแยกได้ก่อนล่วงหน้า และ ให้พลัคที่มีลักษณะขุ่นมาตรวจสอบด้วย จากการตรวจสอบไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิด พบว่าไลโซเจนไม่เกิดการติดเชื้อซ้ำจากแอกติโนฟาจชนิดเดิมและแอกติโนฟาจอื่นบางชนิด ไลโซเจนดังกล่าวสามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้เองตามธรรมชาติ จากผลดังกล่าวแสดงว่า แอกติโนฟาจ Tg2, TN2 และ Ac7 เป็นเทมเพอเรตฟาจ ไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2 และ TN2 สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้เพิ่มขึ้น เมื่อถูกชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และ ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Ac7 สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้เพิ่มขึ้น เมื่อถูกชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจเพิ่มขึ้นได้ เมื่อถูกชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จากการศึกษารูปร่างของเทมเพอเรตแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเทมเพอเรตฟาจทั้ง 3 ชนิดมีรูปร่างคล้ายกัน คือ มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ส่วนหางยาวไม่สามารถหดได้และไม่มีแผ่นฐาน ด้วยลักษณะดังกล่าวจึงจัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม B ตามวิธีการจัดจำแนกแบคทีริโอฟาจตามลักษณะรูปร่างของ Bradley จากการศึกษาโฮสต์-เรนจ์พบว่าเทมเพอเรตฟาจ Tg2, TN2 และ Ac7 มีโฮสต์-เรนจ์กว้าง สามารถทำให้สเตรปโตมัยซีทีสที่นำมาทดสอบทั้งหมด 38 สายพันธุ์เกิดการติดเชื้อได้ 13, 11 และ 15 สายพันธุ์ตามลำดับ

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4172309023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: TEMPERATE PHAGE / STREPTOMYCETES / CHARACTERISTICS / PLAQUE / LYSOGEN

THEERAPAT WECHAPRASIT : CHARACTERISTICS OF TEMPERATE PHAGES OF

STERTOMYCETES ISOLATED FROM SOIL. THESIS ADIVISOR : ASSOVC.PROF. SURINA

CHAVANICH, Ph.D., 88 pp. ISBN 974-03-1308-6

Seventeen soil samples collected from various parts of Thailand were used for isolation and characterization of actinophages. Fifteen actinophages were obtained from *Streptomyces griseus* KA 1198, *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* NOV-1 and *S. luteogriseus* ISP 5483, by using enrichment method. Plaque formation was detected by using double agar layer technique. Most of isolated actinophages were considered as virulent phages since they produced clear plaques on lawn of these streptomycete hosts. However, two isolates: Tg2 and TN2, giving turbid plaques as well as actinophage Ac7 which were previously isolated. Lysogens from these actinophages had superinfection immunity against the same phage and some other phages. In addition, phage particles were spontaneously released from lysogens. These results indicated that actinophage Tg2, TN2 and Ac7 were temperate phages. The UV and mitomycin C at concentration of 1, 5 and 10 µg/ml were able to induce lysogens of Tg2 and TN2 to release phage particles increasingly, whereas lysogens of Ac7 were induced only by mitomycin C at concentration of 1 µg/ml. Examination of actinophages by transmission electron microscope showed that all of them had similar morphology, hexagonal heads and long non-contractile tails without baseplates. Based on morphological classification, they belong to the Bradley group B. Temperate phage Tg2, TN2 and Ac7 had board host-range, so each of them were able to infect 13, 11 and 15 from 38 *Streptomyces* tested strains, respectively.

Department.....Microbiology.....

Field of study.. Industrial Microbiology

Academic year 2001

Student 's signature.....

Advisor 's signature.....

Co- advisor 's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือ และความกรุณาอย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัยด้วยดีตลอด และยังได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์ ที่กรุณารับเป็น ประธานกรรมการสอบ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย และอาจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ในการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษานี้

ขอขอบคุณ Prof. Dr. Seiya Ogata และ Assoc. Prof. Dr. Katsumi Doi สำหรับคำปรึกษา สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์ต่างๆ และ สารเคมี

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการถ่ายภาพบางส่วน ของวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับสเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์ต่างๆ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณอรอนงค์ พริ้งสุลกะ ที่เป็นที่ปรึกษาและช่วยให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้และขอขอบคุณ คุณเจนจิรา เดชรักษา คุณวีระวัฒน์ ปิยะเกรียงไกร คุณอุรุจฉวี อุณหเลขกะ และคุณปวีณา รัตนเสนา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดหลักสูตรการศึกษานี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังสำคัญที่สุดที่ช่วยเหลือด้านทุนทรัพย์และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฅ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. วารสารปริทรรศน์.....	3
3. อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	26
4. ผลการวิจัย.....	37
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	69
รายการอ้างอิง.....	77
ภาคผนวก.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจที่มีแบคทีเรียกลุ่มต่างๆเป็นโฮสต์.....	4
4.1 แอคติโนฟาจที่แยกจากแหล่งดินต่างๆโดยใช้สเตรปโตมัยซิที่สังเคราะห์เป็นโฮสต์.....	38
4.2 ลักษณะของพลาซมิดของแอคติโนฟาจ 16 ชนิด.....	42
4.3 ไลโสเจนที่เกิดจากแอคติโนฟาจ Tg2	43
4.4 ไลโสเจนที่เกิดจากแอคติโนฟาจ Ac7	43
4.5 ไลโสเจนที่เกิดจากแอคติโนฟาจ TN2.....	44
4.6 การแสดงภูมิคุ้มกันของไลโสเจนที่เกิดจากแอคติโนฟาจ Tg2 ต่อแอคติโนฟาจชนิดต่างๆ...	45
4.7 การแสดงภูมิคุ้มกันของไลโสเจนที่เกิดจากแอคติโนฟาจ TN2 ต่อแอคติโนฟาจชนิดต่างๆ.	46
4.8 การแสดงภูมิคุ้มกันของไลโสเจนที่เกิดจากแอคติโนฟาจ Ac7 ต่อแอคติโนฟาจชนิดต่างๆ..	47
4.9 การปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากไลโสเจนโดยธรรมชาติที่ภาวะต่างๆ.....	51
4.10 ขนาดของแอคติโนฟาจ	52
4.11 การติดเชื้อของสเตรปโตมัยซิที่สังเคราะห์จากแอคติโนฟาจ Tg2 TN2 และ Ac7.....	55
4.12 จำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซิที่สังเคราะห์เมื่อถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ....	57
4.13 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโสเจน Lg9.9 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ	60
4.14 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโสเจน Liu5.4 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ	61
4.15 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโสเจน LN5.12 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ.....	62
4.16 จำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซิที่สังเคราะห์เมื่อบ่มในไมโตมัยซิน ซี ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลาต่างๆ.....	64
4.17 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโสเจน Lg9.9 ของ <i>S. griseus</i> KA1198 เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	66
4.18 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโสเจน Liu5.4 ของ <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 เมื่อถูกชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	67
4.19 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโสเจน LN5.12 ของ <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1 เมื่อถูกชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	68
5.1 ขนาดรูปร่างของแอคติโนฟาจ Tg2, Ac7, TN2 และตัวอย่างแอคติโนฟาจชนิดอื่นที่จัดอยู่ใน Bradley กลุ่ม B.....	72

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	โครงสร้างและส่วนประกอบของอนุภาคฟาจที-ไฟว์ (T4).....	5
2.2	ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไลติคไซเคิลของที-อีเวนฟาจใน <i>E. coli</i>	6
2.3	ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไลโซเจนิคไซเคิลของฟาจแลมดาใน <i>E. coli</i>	7
2.4	การทำงานของยีนและโปรตีนชนิดต่างๆที่ควบคุมกลไกการเกิดไลโซเจนิคไซเคิล.....	10
2.5	การสอดแทรกดีเอ็นเอของแลมดาฟาจเข้าสู่โครโมโซมของ <i>E. coli</i>	11
2.6	การตรวจสอบแบคทีริโอฟาจด้วยวิธีการทำอาหารรุ่นสองชั้น.....	16
2.7	การจัดจำแนกแบคทีริโอฟาจตามวิธีการของ Bradley (A-F) และ ตามวิธีการของ Ackermann (A1-G).....	21
2.8	การจัดจำแนกและเรียกชื่อฟาจในระดับแฟมิลี.....	21
4.1	พลาคลักษณะใสของแอกติโนฟาจ TN1 บนลอนของ <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1 บนนิวเตรียนท์อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....	39
4.2	พลาคลักษณะใสของแอกติโนฟาจ Tlu3 บนลอน <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 บน นิวเตรียนท์อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง	39
4.3	พลาคลักษณะขุ่นของแอกติโนฟาจ Tg2 บนลอน <i>S. griseus</i> KA 1198 บนนิวเตรียนท์ อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....	40
4.4	พลาคลักษณะขุ่นของแอกติโนฟาจ TN2 บนลอน <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1 บนนิวเตรียนท์อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....	40
4.5	พลาคลักษณะขุ่นของแอกติโนฟาจ Ac7 บนลอน <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 บน นิวเตรียนท์อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....	41
4.6	แสดงลักษณะการเกิดและไม่เกิดพลาคลของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2 เมื่อทำให้ติดเชื้อซ้ำด้วยแอกติโนฟาจเดิมและแอกติโนฟาจอื่น บนนิวเตรียนท์อการ์ ใน microtitre plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	45

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 แสดงลักษณะการเกิดและไม่เกิดพลาซมของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ TN2 เมื่อทำให้ติดเชื้อซ้ำด้วยแอกติโนฟาจเดิมและแอกติโนฟาจอื่น บนนิวเตรียนท์อการ์ ใน microtitre plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง.....	46
4.8 แสดงลักษณะการเกิดและไม่เกิดพลาซมของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Ac7 เมื่อทำให้ติดเชื้อซ้ำด้วยแอกติโนฟาจเดิมและแอกติโนฟาจอื่น บนนิวเตรียนท์อการ์ ใน microtitre plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.....	47
4.9 (ก) วงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีไลโซเจน Lg9.9 เมื่อเททับโคโลนีไลโซเจนด้วย <i>S. griseus</i> KA1198 (ข) ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใสเมื่อเททับโคโลนีของ <i>S. griseus</i> KA1198 ด้วย <i>S. griseus</i> KA1198 ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลต 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที...	48
4.10 (ก) วงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีไลโซเจน Liu5.4 เมื่อเททับโคโลนีไลโซเจนด้วย <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 (ข) ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใสเมื่อเททับโคโลนีของ <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 ด้วย <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลต 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที.....	49
4.11 (ก) วงใสที่เกิดขึ้นบริเวณโคโลนีไลโซเจน LN5.12 เมื่อเททับโคโลนีไลโซเจนด้วย <i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> NOV-1 (ข) ชุดควบคุมไม่เกิดวงใส เมื่อเททับโคโลนีของ <i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> NOV-1 ด้วย <i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> NOV-1 ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเลต 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที.....	49
4.12 รูปร่างของแอกติโนฟาจ Tg2 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 109,500 เท่า.....	52
4.13 รูปร่างของแอกติโนฟาจ Ac7 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	53
4.14 รูปร่างของแอกติโนฟาจ TN2 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า.....	53
4.15 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ของสเตรปโตมัยซิทีสเมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ.....	58
4.16 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจน Lg9.9 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ.....	60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.17 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโดเจน Lu5.4 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ เวลาต่างๆ.....	61
4.18 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโดเจน LN5.12 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ เวลาต่างๆ.....	62
4.19 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ของสเตรปโตมัยซิทีส เมื่อบ่มในไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ.....	64
4.20 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโดเจน Lg9.9 เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความ เข้มข้นต่างๆ.....	66
4.21 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโดเจน Lu5.4 เมื่อชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความ เข้มข้นต่างๆ.....	67
4.22 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโดเจน LN 5.12 เมื่อชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความ เข้มข้นต่างๆ.....	68

บทที่ 1

บทนำ

เทมเพอเรตฟาจ (temperate phage) คือ แบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) ที่มี การเพิ่มจำนวนในเซลล์แบคทีเรียเป็นแบบไลโซเจนิคไซเคิล (lysogenic cycle) โดยดีเอ็นเอของเทมเพอเรตฟาจที่เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจะเข้าไปสอดแทรก (integrate) อยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่เกิดการแตกสลาย เนื่องจากเทมเพอเรตฟาจมีบทบาทสำคัญในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเพื่อใช้เป็นพาหะ (cloning vector) ในการโคลนยีนของแบคทีเรียชนิดต่างๆ

สเตรปโตไมซีทีส (streptomycetes) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเมทาบอลไลต์ที่มีประโยชน์ เช่น สารปฏิชีวนะ และ เอนไซม์ชนิดต่างๆ ฉะนั้นจึงมีผู้วิจัยและพัฒนาเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตไมซีทีสเพื่อนำมาใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ตัวอย่างเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตไมซีทีสที่ถูกนำมาพัฒนาใช้เป็นพาหะมาก เช่น เทมเพอเรตฟาจ ϕ C31 และ เทมเพอเรตฟาจ R4 โดยเทมเพอเรตฟาจทั้ง 2 ชนิดนี้มีสมบัติเอื้อต่อการนำมาใช้เป็นพาหะ หรือนำมาศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรม หรือ อณูชีววิทยา (molecular biology) ของสเตรปโตไมซีทีสได้ดี เนื่องจากได้มีการศึกษาแผนที่ยีนของเทมเพอเรตฟาจทั้ง 2 ชนิดเป็นอย่างดี อีกทั้งสามารถทำให้เกิดสายพันธุ์กลายของฟาจและไลโซเจน (lysogen) ได้มาก และมีโฮสต์-เรนจ์ (host-range) กว้างสามารถทำให้สเตรปโตไมซีทีสหลายสายพันธุ์เกิดการติดเชื้อได้ (Chater and Cater, 1979; Lomovskaya *et al.*, 1980; Hartley *et al.*, 1994; Morino and Takahashi, 1997)

จากความสำคัญของเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตไมซีทีสดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตไมซีทีส กอปรกับยังขาดรายงานการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตไมซีทีสในประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาลักษณะของเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตไมซีทีสที่แยกได้จากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย โดยใช้วิธีส่งเสริมการเจริญ (enrichment method) ตรวจสอบลักษณะพลัค (plaque) ด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method) ตรวจสอบสมบัติของเทมเพอเรตฟาจที่ทำให้เกิดไลโซเจน โดยตรวจสอบภูมิต้านทานของไลโซเจนที่มีต่อการติดเชื้อจากฟาจชนิดเดิม (superinfection immunity) และการปลดปล่อยฟาจจากไลโซเจนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือถูกชักนำด้วยตัวชักนำชนิดต่างๆ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังศึกษารูปร่างของอนุภาคฟาจจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) เพื่อจัดจำแนกชนิดของฟาจโดยอาศัยรูปร่างตามวิธีของ Bradley (1967) และศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของฟาจโดยการตรวจสอบการก่อให้เกิดการติดเชื้อของเทมเพอเรตฟาจกับแอกติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ต่างๆ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะและจำแนกชนิดของเทมเพอเรตฟาจที่แยกได้จากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆ โดยมีสเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิงเป็นโฮสต์ ศึกษาความสัมพันธ์ของเทมเพอเรตฟาจที่แยกได้กับสเตรปโตมัยซิสอื่นๆ และทดลองชักนำไลโซเจนให้ปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากเซลล์

ขั้นตอนการวิจัย

1. แยกเทมเพอเรตฟาจจากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆ ด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญโดยใช้สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิงเป็นโฮสต์
2. ศึกษาลักษณะของเทมเพอเรตฟาจและจำแนกชนิดโดยอาศัยรูปร่างของฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเทมเพอเรตฟาจที่แยกได้กับสเตรปโตมัยซิสอื่นๆ
4. ทดลองชักนำไลโซเจนให้ปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากเซลล์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และ ไมโตมัยซิน ซี (mitomycin C)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่ได้จากการศึกษา สมบัติ ลักษณะ และการจัดจำแนกชนิดของเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตมัยซิส สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับเทมเพอเรตฟาจและ สเตรปโตมัยซิส เพื่อพัฒนาเทมเพอเรตฟาจสำหรับใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนของ สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์ต่างๆ อันจะนำไปสู่การใช้ประโยชน์ทางด้านพันธุวิศวกรรมของสเตรปโตมัยซิสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์

2.1 ประวัติการค้นพบ (Adams, 1959; Duckworth, 1976)

ค.ศ. 1915 Frederick W. Twort พบว่าบางครั้งโคโลนีแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มีลักษณะไม่สมบูรณ์หรือหายไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเหตุการณ์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปสู่โคโลนีที่อยู่บริเวณใกล้เคียงได้ แต่ในขณะนั้น Twort ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสิ่งที่ทำให้โคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะไม่สมบูรณ์หรือหายไปว่าเป็นแบคทีเรียโอฟาจ ในช่วงเวลาเดียวกัน Fe'lix d' Herelle ค้นพบเหตุการณ์ในลักษณะเดียวกับ Twort จากการทดลองที่เกิดจากผู้ป่วยโรคบิดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Shigella dysenteriae* ซึ่งแยกจากอุจจาระของผู้ป่วย เมื่อ D' Herelle นำของเหลวที่ได้จากการกรองอุจจาระไปผสมกับอาหารที่มีเชื้อดังกล่าวอยู่ แล้วนำเชื้อไปบ่มตามปกติกลับไม่พบการเจริญของเชื้อ ดังนั้น D' Herelle จึงสรุปว่าสารที่สามารถกรองผ่านแผ่นกรองแบคทีเรียเป็นไวรัสของแบคทีเรีย และให้คำจำกัดความของสิ่งที่ค้นพบว่า แบคทีเรียโอฟาจ หมายถึง ผู้กินแบคทีเรีย

D' Herelle และ Twort ได้ร่วมมือกันทำงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียโอฟาจ เนื่องจากมีความคิดที่ว่าอาจนำแบคทีเรียโอฟาจมาใช้กำจัดแบคทีเรียก่อโรคต่างๆได้ การวิจัยดังกล่าวได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์อย่างมากในช่วงปี ค.ศ. 1920-1940 จนกระทั่งการใช้สารเคมีในการรักษาโรคซึ่งใช้ได้สะดวกและรวดเร็วกว่าเริ่มเข้ามามีบทบาทขึ้น ทำให้การศึกษาแบคทีเรียโอฟาจเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคเหลืออยู่เพียงไม่กี่ชนิด ในช่วงปี ค.ศ. 1970 เริ่มมีการศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาของแบคทีเรียโอฟาจ และหลังจากปี ค.ศ. 1975 จึงเน้นการนำแบคทีเรียโอฟาจมาใช้ในการศึกษาด้านพันธุวิศวกรรม เช่น เคมเพอเรต ฟาจแลมดา เคมเพอเรตฟาจ M13 เป็นต้น (Furuse, 1987)

ส่วนการศึกษาแบคทีเรียโอฟาจที่แยกได้จากแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทีส (actinomycetes) หรือ แอกติโนฟาจ (actinophage) เริ่มมีการศึกษาครั้งแรกโดย Wieringa และ Wiebols ในปี ค.ศ. 1936 (Dowding, 1973) แต่ไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนถึงเรื่องที่ทำการศึกษาวิจัยในช่วงนั้น ซึ่งอาจเป็นเพียงการแยกแอกติโนฟาจได้เท่านั้น

2.2 แบคทีเรียโอฟาจ

แบคทีเรียโอฟาจหรือฟาจ เป็นไวรัสซึ่งเป็นออบลิเกทพาราไซต์ (obligate parasite) ของแบคทีเรียที่เรียกว่าตามปกติอนุภาคฟาจสามารถดำรงชีวิตได้อย่างอิสระในสิ่งแวดล้อมได้เหมือนไวรัสชนิดต่างๆ เช่น ในน้ำจืด น้ำทะเล น้ำเสีย ในอุตสาหกรรมอาหาร และในดิน เป็นต้น อนุภาคฟาจมีชีวิตอยู่ได้นานในสิ่งแวดล้อมดังกล่าวแต่จะไม่มีเพิ่มจำนวน การเพิ่มจำนวนของอนุภาคฟาจจะเกิดขึ้นเฉพาะภายในเซลล์แบคทีเรียเท่านั้น ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจที่มีแบคทีเรียชนิดต่างๆเป็นโฮสต์ แสดงในตารางที่ 2.1

แอกติโนฟาจเป็นแบคทีเรียโอฟาจที่มีโฮสต์เป็นแบคทีเรียที่เรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทีส แอกติโนฟาจที่สามารถแยกได้และนำมาศึกษากันมาก คือ แอกติโนฟาจที่แยกได้จากสเตรปโตมัยซีทีส เช่น ฟาจ ϕ C31, R4 และ SH10 เป็นต้น ส่วนแอกติโนฟาจจากแอกติโนมัยซีทีสกลุ่มอื่นมีการแยกและนำมาศึกษาอยู่บ้างแต่ไม่มากเท่าฟาจจากสเตรปโตมัยซีทีส เช่น ฟาจ FR113, FR114, FR371 ที่แยกได้จาก *Faenia rectivirgula* (Schneider *et al.*, 1987) ϕ 115A แยกได้จาก *Thermoactinomyces* sp. และ ϕ 150A แยกได้จาก *Micropolyspora* sp. (Kurup and Heinzen, 1978) นอกจากนี้ Ackermann และคณะ (1985) ได้รวมฟาจของแบคทีเรียที่เรียกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับแอกติโนมัยซีทีสเป็นโฮสต์ว่าเป็นแอกติโนฟาจด้วย เช่น ฟาจของ *Corynebacterium* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างแบคทีเรียโอฟาจที่มีแบคทีเรียกลุ่มต่างๆเป็นโฮสต์

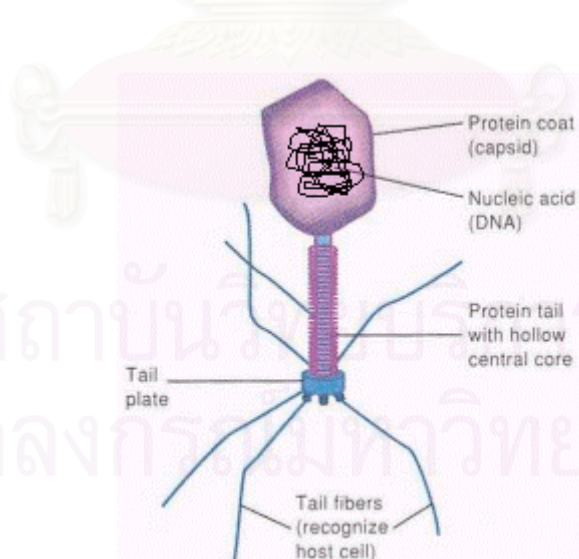
โฮสต์	แบคทีเรียโอฟาจ	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ		
<i>Escherichia coli</i>	λ	Hershey, 1971
<i>Bacillus thuringiensis</i>	SU-11	Kanda <i>et al.</i> , 1999
<i>Lactobacillus</i> sp.	ϕ FSW	Shimizu-Kadota <i>et al.</i> , 1983
แอกติโนมัยซีทีส และกลุ่มที่ใกล้ชิด	แอกติโนฟาจ	
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	ϕ C31	Lomovskaya <i>et al.</i> , 1972
<i>Micropolyspora</i>	ϕ 150A	Kurup and Heinzen, 1978
<i>Bifidobacterium</i>	Bir	Ackermann <i>et al.</i> , 1985
ไซยาโนแบคทีเรีย	ไซยาโนฟาจ	
<i>Nostoc muscurum</i>	N-1	Adolph and Haselkom, 1971
<i>Anacystis nidulans</i>	AC-1	Shama <i>et al.</i> , 1977

2.3 โครงสร้างพื้นฐานของแบคทีริโอเฟจ

อนุภาคของแบคทีริโอเฟจประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 2 ส่วนคือ

กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ในอนุภาคเฟจ 1 อนุภาคจะประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิด ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) ดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) อาร์เอ็นเอสายคู่ (double stranded RNA) เพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น แต่อนุภาคเฟจส่วนใหญ่จะมีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

แคปซิด (capsid) เป็นโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein) ทำหน้าที่ป้องกันกรดนิวคลีอิกจากการย่อยสลายของเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) แคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยเรียกว่าแคปโซเมอร์ (capsomer) หลายหน่วยมาเรียงต่อกัน เกิดเป็นรูปร่างหลายแบบ ทั้งรูปทรงแบบไอโคซาฮีดรัล (icosahedral shape) เป็นรูปทรงที่มีมุมยอด 12 มุม ในแต่ละมุมประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 5 หน่วยมารวมกันเรียกว่า เพนตอน (penton) และมีหน้าของสามเหลี่ยมด้านเท่า 20 หน้า ซึ่งเกิดจากแคปโซเมอร์ 6 หน่วยมาเรียงตัวกันรอบส่วนของเพนตอน เฟจบางชนิดที่มีโครงสร้างซับซ้อนจะมีการเรียงตัวของแคปโซเมอร์ต่อจากส่วนไอโคซาฮีดรัลหรือส่วนหัว (head) ในลักษณะขดเป็นเกลียวเหมือนท่อที่ตรงกลางกลวงหรือส่วนหาง (tail) และอาจมีโครงสร้างอื่นเป็นส่วนประกอบ เช่น ซีทห่อหุ้ม (sheath) แผ่นฐาน (base plate) ไยหาง (tail fiber) เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 2.1) รูปทรงแบบสายยาว (filamentous shape) เกิดจากการเรียงตัวของแคปโซเมอร์ในลักษณะที่ขดเป็นเกลียว โดยมีกรดนิวคลีอิกเป็นแกนกลาง



รูปที่ 2.1 โครงสร้างและส่วนประกอบของอนุภาคเฟจที-โฟว์ (T4) (Nester *et al.*, 1995)

2.4 การเพิ่มจำนวนของอนุภาคเฟจ

แม้ว่าฟาจสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้แต่จำเป็นต้องอาศัยแบคทีเรียในการเพิ่มจำนวน เนื่องจากต้องอาศัยระบบการสร้างโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียและการที่ฟาจจะเพิ่มจำนวนได้ต้องอาศัยเซลล์แบคทีเรียที่มีเมทาบอลิซึมเท่านั้น (Maloy *et al.*, 1994) เมื่อเซลล์แบคทีเรียอยู่ในภาวะที่มีเมทาบอลิซึมสูงสุดจะทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจเกิดขึ้นได้เร็วและผลิตอนุภาคฟาจได้จำนวนมาก เช่น ฟาจที่เพิ่มจำนวนใน *E. coli* ใช้เซลล์ที่เจริญในช่วง mid log phase หรือในไฮสท์ที่เป็นกลุ่มแอดดิโนมายซีทีสที่ต้องใช้สปอร์ในการเพิ่มจำนวนฟาจจะใช้ สปอร์ในช่วงที่กำลังเริ่มงอก (Lomovskaya *et al.*, 1972)

2.4.1 ไวรูเลนท์ฟาจ (virulent phage)

เป็นฟาจที่มีการเพิ่มจำนวนแบบไลติคไซเคิล (lytic cycle) ซึ่งเมื่อถึงขั้นสุดท้ายของวงชีวิตเซลล์แบคทีเรียจะเกิดการแตกสลาย (lysis) (Duckworth, 1987) ไวรูเลนท์ฟาจที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น กลุ่ม ที-อีเวนฟาจ (T-evenphage) มี *E. coli* เป็นโฮสต์ ฟาจในกลุ่มนี้สามารถใช้เป็นแบบจำลองในการศึกษาหลักการเพิ่มจำนวนแบบไลติคไซเคิลได้ (Vallee and Cornett, 1972; Wood and Revel, 1976; Mathews *et al.*, 1983) การเพิ่มจำนวนแบบไลติคไซเคิลมีขั้นตอนต่างๆดังนี้คือ (ดังแสดงในรูปที่ 2.2)

การเกาะติด (attachment)

เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนอนุภาคฟาจซึ่งถ้าฟาจไม่สามารถเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรียได้ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ฟาจจะเกาะติดกับเซลล์แบคทีเรียบริเวณตำแหน่งที่จำเพาะกับการเกาะติด (receptor site) บนผิวของผนังเซลล์แบคทีเรีย ฟาจแต่ละชนิดจะมีตำแหน่งที่จำเพาะกับการเกาะติดแตกต่างกันออกไป แต่ส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียชนิดนั้นๆ เช่น ฟาจ BF-23 มีตำแหน่งจำเพาะเป็นโปรตีนบนผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่ขนส่งวิตามิน B12 เข้าสู่เซลล์ (Di Masi *et al.*, 1973) ฟาจ kh พบว่ามีตำแหน่งจำเพาะกับการเกาะติดเป็นน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของ *Lactococcus lactis* (Valyasevi *et al.*, 1990) นอกจากนี้อาจมีส่วนประกอบอื่นที่เป็นตำแหน่งจำเพาะกับการเกาะติดของฟาจได้ เช่น พิลไล (pilli) กรดไทโคอิก (teichoic acid) หรือ แคปซูล (capsule) ของแบคทีเรียเป็นต้น (Furukawa *et al.*, 1983)

การส่งผ่านกรดนิวคลีอิกของฟาจเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (penetration)

รูปร่างของแบคทีริโอฟาจมีส่วนทำให้การส่งผ่านกรดนิวคลีอิกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้แตกต่างกัน ฟาจที-โฟว์ มีส่วนหางที่สามารถหดได้ เมื่อเกิดการเกาะติดส่วนหางจะหดและแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึม กรดนิวคลีอิกจะถูกส่งผ่านเข้าสู่ไซโตพลาสซึมได้โดยตรงส่วนที่เป็นแคปซิดถูกทิ้งไว้ภายนอก (Simon and Anderson, 1967) ฟาจที่มีหางสั้นจะส่งผ่านกรดนิวคลีอิกไปยังเพอริพลาสซึม (periplasm) ฟาจที่ไม่มีหางเมื่อเกิดการเกาะติดกับโฮสต์แล้วแคปซิดจะแตกออกส่งผ่านกรดนิวคลีอิกไปที่ผนังเซลล์ จากนั้นจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งเป็นตัวนำกรดนิวคลีอิกเข้าไปภายในเซลล์ (Duckworth, 1987)

การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของฟาจ

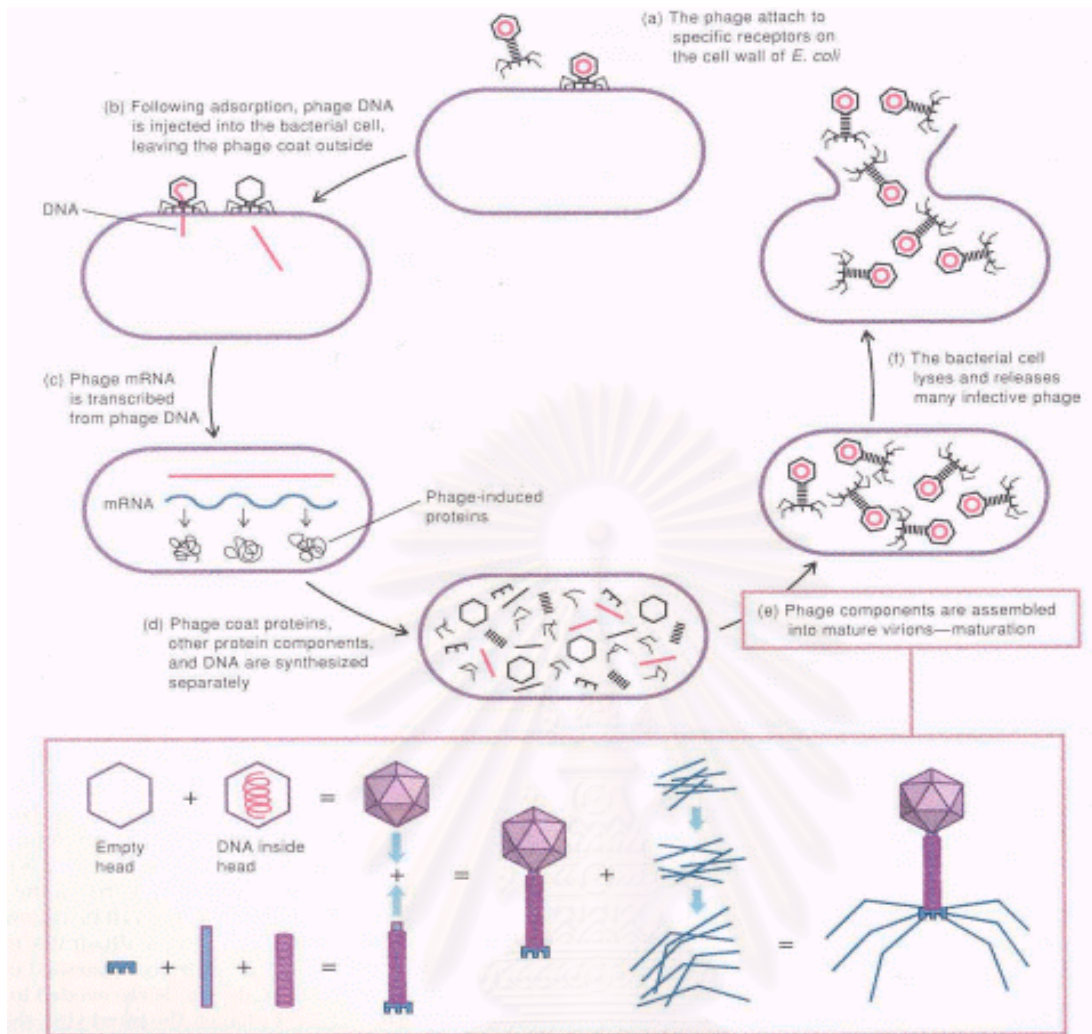
ฟาจที่มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอจะอาศัยอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ของโฮสต์ในการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่เรียกว่าเอ็มอาร์เอ็นเอช่วงต้น (early mRNA) จากนั้นจะเกิดการแปลรหัสได้เป็นโปรตีน เช่น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของฟาจที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอของฟาจ อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสที่สร้างขึ้นจะช่วยให้เกิดการถอดรหัสจากดีเอ็นเอของฟาจได้เอ็มอาร์เอ็นเอช่วงหลัง (late mRNA) ซึ่งเมื่อเกิดการแปลรหัสจะได้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของอนุภาคฟาจ เช่น แคปซิด เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการประกอบโครงสร้างฟาจและการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากเซลล์ เป็นต้น (Maloy *et al.*, 1994)

การประกอบเป็นอนุภาคฟาจ (assembly)

ขั้นตอนที่สำคัญของการประกอบเป็นอนุภาคของฟาจ คือขั้นตอนการใส่กรดนิวคลีอิกเข้าภายในแคปซิด ในฟาจที-โฟว์ส่วนของแคปซิดจะถูกย่อย (cleavage) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทำให้สามารถนำกรดนิวคลีอิกเข้าภายในแคปซิดได้ (Black and Showe, 1983) ส่วนประกอบอื่นๆจะรวมกันเป็นส่วนหางจากนั้นทั้งส่วนที่เป็นส่วนหัวและส่วนหางจะเกิดการเชื่อมต่อกันได้เป็นอนุภาคฟาจที่สมบูรณ์

การปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากเซลล์แบคทีเรีย (release)

เมื่อฟาจประกอบกันเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์จะเกิดการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ทำลายเซลล์แบคทีเรีย คือเอนไซม์โฮลิน (holin) ที่ใช้ในการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ และไลโซไซม์ (lysozyme) ที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงเกิดการแตกสลายและปลดปล่อยอนุภาคฟาจ ออกมาภายนอกได้ (Yong, 1992)



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไลติกไซเคิลของที-อีเวนฟาจใน *E. coli* (Nester *et al.*, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.2 เวมเพอเรตฟาจ (temperate phage)

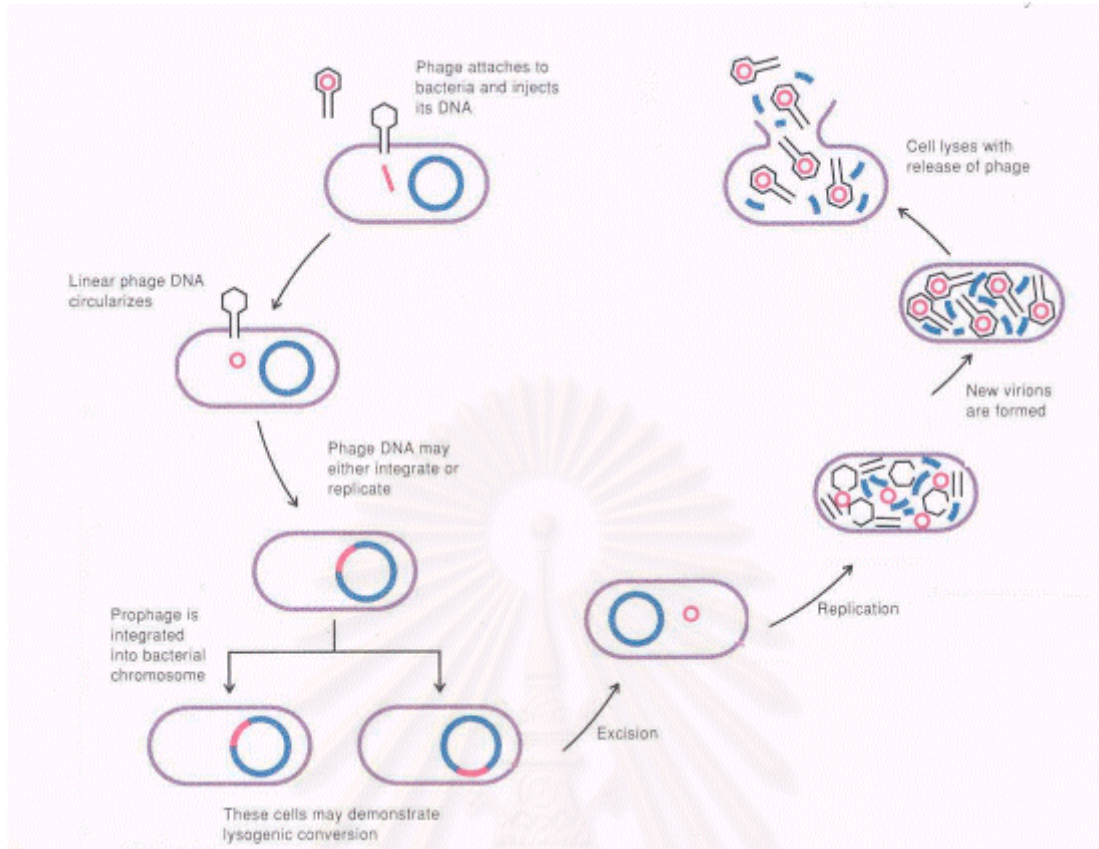
เป็นฟาจที่มีการเพิ่มจำนวนแบบไลโซเจนิคไซเคิล (lysogenic cycle) ซึ่งการเพิ่มจำนวนของฟาจในลักษณะนี้จะไม่ทำให้โฮสต์เซลล์เกิดการแตกสลาย แต่ในบางภาวะเวมเพอเรตฟาจจะมีกลไกการเพิ่มจำนวนเป็นแบบไลติกไซเคิลได้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นเองหรือถูกชักนำโดยสารเคมีหรือแสงอัลตราไวโอเล็ต ตัวอย่างเวมเพอเรตฟาจที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษากลไกการเกิดไลโซเจนิคไซเคิล คือ ฟาจแลมดาที่มี *E. coli* เป็นโฮสต์ (Johnson *et al.*, 1981) นอกจากนี้ยังมีฟาจ ϕ C31 ที่ถูกใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ของสเตรปโตมัยซีทีสด้วย (Lomovskaya *et al.*, 1980) ไลโซเจนิคไซเคิลประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้คือ (ดังแสดงในรูปที่ 2.3)

การเกาะติดและฉีดกรดนิวคลีอิกเข้าภายในเซลล์

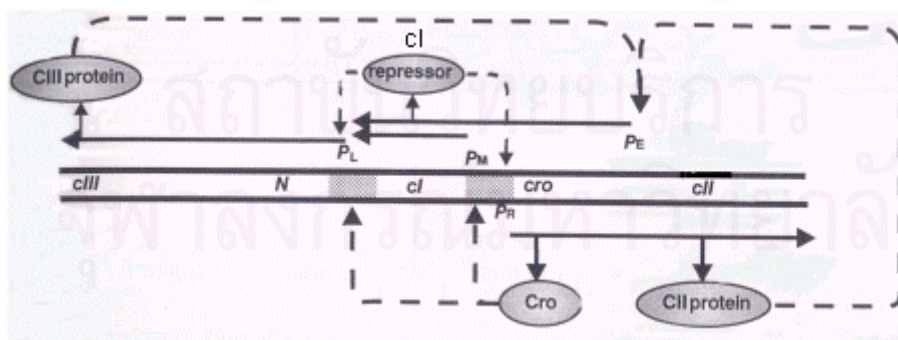
ขั้นตอนนี้เหมือนกับการเพิ่มจำนวนแบบไลติกไซเคิล ในฟาจแลมดาตำแหน่งที่จำเพาะกับการเกาะติดจะเป็นบริเวณที่ใช้สำหรับขนส่งน้ำตาลมอลโตสที่อยู่บนผนังเซลล์ (Hershey, 1971) และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีรูปร่างเหมือนฟาจแลมดาจะใช้บริเวณที่ใช้ในการขนส่งโปรตีนหรือน้ำตาลชนิดต่างๆ เข้าสู่เซลล์เป็นตำแหน่งที่จำเพาะกับการเกาะติดเช่นกัน (Lamont *et al.*, 1993) เมื่อฟาจเกาะติดกับเซลล์แล้วดีเอ็นเอจะถูกฉีดเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย

การทำงานของโปรตีนยับยั้ง (repressor protein)

ในฟาจแลมดา (Voyles, 1993) และ ฟาจ 186 (Lamont *et al.*, 1993) เมื่อดีเอ็นเอของฟาจเข้าภายในเซลล์ของ *E. coli* แล้ว โปรตีนที่เกิดจากยีน *N* ที่อยู่บนดีเอ็นเอของฟาจจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีน CII และโปรตีน CIII จากยีน *cII* และ *cIII* ตามลำดับ ซึ่งโปรตีน CII เป็นตัวควบคุมการเริ่มต้นกลไกของไลโซเจนิคไซเคิล ส่วนโปรตีน CIII จะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้โปรตีน CII ถูกย่อยสลายโดยโปรติเอส (protease) จากโฮสต์เร็วเกินไป โปรตีน CII กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสผ่านยีน *cI* ได้โปรตีน CI ออกมาจำนวนมากพอ ซึ่งโปรตีนนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน CI เอง และยังทำหน้าที่เป็นโปรตีนยับยั้งการถอดรหัสของยีน *cro* ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเกิดไลติกไซเคิล เมื่อยีน *cro* ไม่สามารถเกิดการถอดรหัสได้การเพิ่มจำนวนแบบไลติกไซเคิลจึงไม่เกิดขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนแบบไลโซเจนิคไซเคิลของฟาจแลมดาใน *E. coli* (Nester et al., 1995)

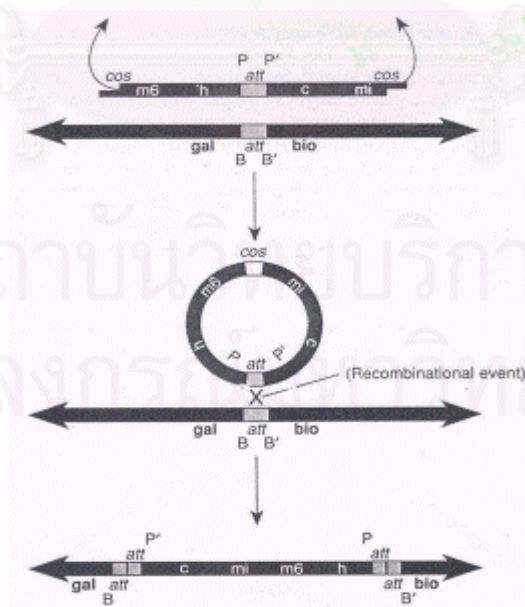


รูปที่ 2.4 การทำงานของยีนและโปรตีนชนิดต่างๆที่ควบคุมกลไกการเกิดไลโซเจนิคไซเคิล (Dale, 1998)

ดีเอ็นเอของฟาจสอดแทรก(integrate)เข้าสู่โครโมโซมของโฮสต์(Voyles, 1993)

ในกรณีของฟาจแลมดาดีเอ็นเอจะสอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมของ *E. coli* ได้ต่อเมื่อดีเอ็นเออยู่ในลักษณะที่เป็นวงแหวน โดยส่วนปลายดีเอ็นเอของฟาจแลมดาที่เป็นปลายเหนียว (cohesive end) จะมาเชื่อมกันได้ดีเอ็นเอเป็นวงแหวน ดีเอ็นเอของฟาจแลมดาและโครโมโซมของ *E. coli* จะมีบริเวณจำเพาะสำหรับเกิดการสอดแทรกของดีเอ็นเอซึ่งอยู่ระหว่างยีน *gal* และยีน *bio* เอนไซม์อินทิเกรส (integrase) จากฟาจจะทำให้เกิดรีคอมบิเนชัน (recombination) ขึ้นระหว่างดีเอ็นเอของฟาจและของโฮสต์ เมื่อกระบวนการสอดแทรกของดีเอ็นเอเสร็จสิ้นลำดับยีนของฟาจแลมดาจะเปลี่ยนแปลงไป (ดังแสดงในรูปที่ 2.5) เรียกดีเอ็นเอของฟาจที่สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรียว่า โปรฟาจ (prophage) และเรียกแบคทีเรียที่มี โปรฟาจอยู่ว่า ไลโซเจนิคเซลล์ (lysogenic cell) หรือ ไลโซเจน แบคทีเรียที่เป็นไลโซเจนสามารถมีชีวิตต่อไปได้และเมื่อมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นโปรฟาจที่สอดแทรกอยู่จะเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการแบ่งเซลล์เป็นเหมือนส่วนหนึ่งของโครโมโซมของโฮสต์

การศึกษากลไกการเกิดไลโซเจนิคไซเคิลของแอกติโนฟาจมีรายงานการศึกษาอยู่น้อย Sinclair และ Bibb (1988) พบว่าการเกิดไลโซเจนิคไซเคิลของฟาจ ϕ C31 เกิดจากยีน *c* บนดีเอ็นเอของฟาจ ซึ่งยีนดังกล่าวควบคุมทั้งกระบวนการเริ่มต้นการเกิดไลโซเจนิคไซเคิลและควบคุมภาวะที่เกิดขึ้นให้ดำเนินต่อไป ส่วนการสอดแทรกดีเอ็นเอของฟาจจะเกิดขึ้นระหว่างยีน *pheA* และ *uraA* บนโครโมโซมของ *Streptomyces coelicolor* A3(2)



รูปที่ 2.5 การสอดแทรกดีเอ็นเอของแลมดาฟาจเข้าสู่โครโมโซมของ *E. coli* (Voyles, 1993)

2.5 สมบัติและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แบคทีเรียที่เป็นไลโซเจน (properties and lysogenic conversion)

2.5.1 ภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อซ้ำจากฟาจชนิดเดิม (superinfection immunity)

สมบัติที่สำคัญของไลโซเจน คือ ความสามารถในการต้านการถูกทำลายโดยแบคทีริโอฟาจชนิดเดิมที่ทำให้เกิดไลโซเจน การสร้างโปรตีน CI ในไลโซเจนของฟาจแลมดาจะเกิดขึ้นตลอดเวลาเพื่อรักษาภาวะไลโซเจนิกไซเคิลไว้ เมื่อมีดีเอ็นเอของฟาจชนิดเดิมเข้ามาภายใน ไลโซเจน โปรตีน CI จำนวนมากที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจะเข้าไปจับกับโอเปอเรเตอร์ (operator) บนดีเอ็นเอของฟาจที่เข้ามาใหม่ทันที ก่อนที่อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสจะเข้าไปจับกับโปรโมเตอร์ของฟาจที่เข้ามาใหม่ได้ทัน ดังนั้นกระบวนการถอดรหัสและแปลรหัสของไลโคไซเคิลจึงไม่เกิดขึ้น (Maloy *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Vostrov และคณะ (1996) ศึกษาสมบัติดังกล่าวในไลโซเจนของ *E. coli* ที่เกิดจากฟาจ $\phi 80$ และฟาจ N15 พบว่าการเกิดภูมิคุ้มกันของไลโซเจนมีกลไกแตกต่างจากฟาจแลมดา โดยมียีนที่เกี่ยวข้องคือ ยีน *cor* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน Cor โปรตีนที่สร้างขึ้นนี้สามารถแทรกตัวเข้าไปอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งอาจเป็นตำแหน่งจำเพาะกับการเกาะติดของฟาจทั้ง 2 ชนิด ทำให้ไลโซเจนที่เกิดขึ้นมีภูมิคุ้มกัน

2.5.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะอื่นที่เกิดขึ้นในไลโซเจน

ดีเอ็นเอของฟาจที่สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมอาจเข้าไปอยู่ระหว่างยีนที่ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถผลิตเอนไซม์นั้นๆออกมาได้ หรือในทางกลับกันการผลิตเอนไซม์หรือโปรตีนของแบคทีเรียบางชนิดจำเป็นต้องอาศัยโปรฟาจ เช่น shiga toxin ใน *E. coli* O157 : H7 (Muniesa and Jofre, 1998) cholera toxin ใน *Vibrio cholerae* (Waldor and Mekalanos, 1996) ในบางกรณีโปรฟาจอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เช่นการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตของโอแอนติเจน (O antigen) ในไลโซเจนของ *Salmonella* (Voyles, 1993) แต่ในแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทีสจะไม่ค่อยพบรายงานการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่างๆเหล่านี้ในไลโซเจน

2.5.3 การชักนำไลโซเจนให้เกิดภาวะไลติคไซเคิล

เมื่อไลโซเจนสัมผัสกับตัวชักนำบางชนิดเช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) หรือ ไมโตมายซิน ซี (Bradley, 1967) ดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะเกิดความเสียหายขึ้น โดยเกิดเป็นลักษณะของไธมีนไดเมอร์ (thymine dimers) บนสายของดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถเกิดการเพิ่มจำนวนหรือเกิดการถอดรหัสของยีนบริเวณดังกล่าวได้ แต่แบคทีเรียจะมีระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลายได้หลายวิธี ในระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ใช้แสง (light repair) แสงจะทำหน้าที่กระตุ้นเอนไซม์บางชนิดให้ไปทำลายพันธะโควาเลนต์ของไธมีนไดเมอร์ทำให้สายดีเอ็นเอกลับมามีลักษณะเดิม ระบบซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบไม่ต้องการแสง (dark repair) เอนไซม์บางชนิดจะถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่ตัด (excise) สายดีเอ็นเอบริเวณที่เกิดไธมีนไดเมอร์และจะมีเอนไซม์อีกชนิดทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอส่วนที่ขาดหายไปเรียกระบบการซ่อมแซมแบบนี้อีกชื่อหนึ่งว่า excision repair ระบบการซ่อมแซมดีเอ็นเออีกระบบที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานคือระบบซ่อมแซมแบบเอสไอเอส (SOS repair) ซึ่งปกติการถอดรหัสของยีนที่ควบคุมระบบนี้ถูกยับยั้งอยู่ด้วยโปรตีน LexA เมื่อดีเอ็นเอเกิดความเสียหายจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนที่เรียกว่า RecA เอนไซม์นี้จะไปย่อยสลายโปรตีน LexA ทำให้ระบบการซ่อมแซมแบบเอสไอเอสสามารถทำงานได้ นอกจากนั้นเอนไซม์ RecA ที่ถูกสร้างขึ้นมากจำนวนมาย่อยสลายโปรตีน CI ที่โปรฟาจสร้างขึ้นมาเช่นกัน เมื่อขาดโปรตีน CI อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสจึงสามารถจับกับโปรโมเตอร์ของฟาจได้ เกิดการถอดรหัสของยีน *cro* กลไกของไลติคไซเคิลจึงเริ่มขึ้น (Voyles, 1993; Nester *et al.*, 1995)

2.6 การแยกแบคทีเรียโอฟาจ

แบคทีเรียโอฟาจสามารถแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆเช่น จากดิน น้ำจืด น้ำทะเล จากอุตสาหกรรมอาหาร หรือจากแบคทีเรียที่มีโอฟาจอยู่ในเซลล์ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี

2.6.1 วิธีการนับจำนวนโดยตรง (direct count)

เป็นวิธีการแยกและประมาณจำนวนฟาจจากแหล่งต่างๆโดยตรง ซึ่งต้องทราบน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่างที่นำมาแยก การแยกฟาจจากตัวอย่างดินทำโดยนำตัวอย่างดินมาทำการเจือจางและกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนออกโดยการกรองหรือใช้สารเคมี ซึ่ง Lanning และ Williams (1982) ทำการทดลองกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับดินโดยใช้คลอโรฟอร์ม (chloroform) เปรียบเทียบกับแผ่นกรอง พบว่าการใช้คลอโรฟอร์มกำจัดแบคทีเรียสามารถแยก แอคติโนฟาจจากดินได้มากกว่าการกำจัดแบคทีเรียโดยใช้แผ่นกรอง แต่ทั้งนี้ฟาจที่ทำการแยกต้องสามารถทนต่อคลอโรฟอร์มได้ นอกจากนี้ Casida และ Liu (1974) พบว่าสามารถแยกฟาจของ *Arthrobacter globiformis* ได้น้อยมากเมื่อแยกจากดินที่ขาดสารอาหาร จึงทดลองเติมสารอาหารลงไปนดินก่อนการแยกทำให้ฟาจที่แยกได้มีจำนวนเพิ่มขึ้น ส่วนการแยกฟาจจากตัวอย่างน้ำซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียและฟาจอยู่น้อยจะใช้วิธีการกรองแยกแบคทีเรียและอนุภาค

ต่างๆที่มีขนาดใหญ่ออกก่อน จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงให้อนุภาคฟาจติดอยู่กับแผ่นกรองที่สามารถดักจับอนุภาคฟาจที่มีขนาดเล็กไว้ได้ ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้ได้จำนวนอนุภาคฟาจเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ (Paul *et al.*, 1997)

วิธีการนับจำนวนโดยตรงสามารถบอกจำนวนอนุภาคฟาจที่จำเพาะต่อโฮสต์ที่ต้องการแยกได้ในระดับหนึ่ง แต่ไม่สามารถบอกจำนวนฟาจที่แน่นอนได้ซึ่งมาจากหลายสาเหตุ เช่น เมตาบอลิซึมของโฮสต์ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ หรือ การที่อนุภาคฟาจถูกดูดซับอยู่กับอนุภาคดิน เป็นต้น

2.6.2 วิธีการส่งเสริมการเจริญ

เป็นวิธีการแยกฟาจที่ง่ายและได้ผลดี นิยมใช้แยกฟาจจากตัวอย่างที่เป็นดินโดยการบ่มตัวอย่างดินกับแบคทีเรียที่ต้องการแยกฟาจในอาหารเหลวเวลาที่ใช้ในการบ่มขึ้นอยู่กับการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโฮสต์ วิธีการส่งเสริมการเจริญจะทำให้จำนวนอนุภาคฟาจที่อยู่ในดินเพิ่มมากขึ้นทำให้สามารถแยกฟาจออกมาได้ง่าย โดยกำจัดอนุภาคดินและแบคทีเรียบางส่วนออกโดยการปั่นเหวี่ยงและกำจัดแบคทีเรียที่เหลืออยู่ด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองหรือใช้คอลโรฟอร์ม

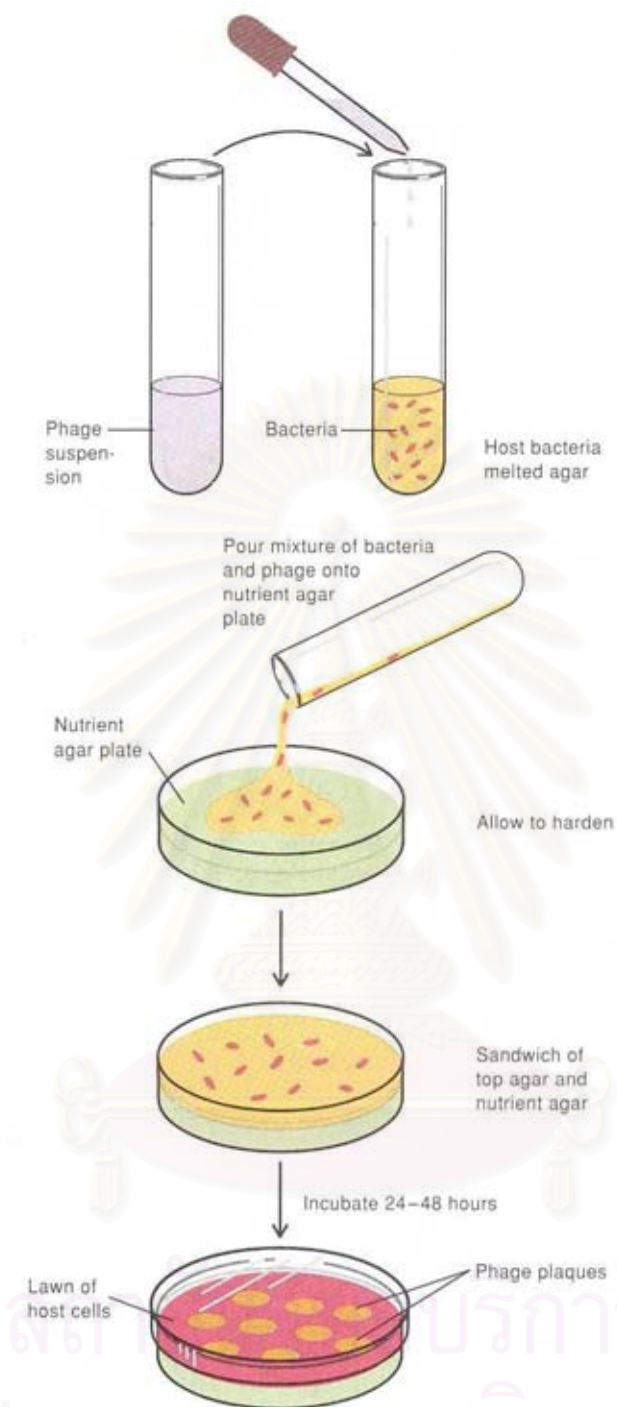
การแยกแอคติโนฟาจจากตัวอย่างดินนิยมใช้วิธีส่งเสริมการเจริญ Dowding และ Hopwood (1973) แยกแอคติโนฟาจโดยผสมตัวอย่างดินกับสปอร์ของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ สามารถแยกแอคติโนฟาจ VP7 และ VP14 ได้ ส่วน Ogata และคณะ (1985) ทำการทดลองแตกต่างออกไปด้วยการแยกแอคติโนฟาจโดยใช้สปอร์ของ *Streptomyces azureus* ความเข้มข้นสูง (10^{12} สปอร์ต่อลิตร) เกลงในแหล่งดินธรรมชาติ จากนั้นนำตัวอย่างดินมาตรวจสอบจำนวนฟาจทุกสัปดาห์สามารถแยกแอคติโนฟาจจากแหล่งดินนั้นได้และพบว่าในช่วงสัปดาห์แรกๆ จำนวนฟาจที่แยกได้มีน้อยและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีจำนวนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 หลังจากนั้นปริมาณฟาจจะลดลงในเวลาต่อมา วิธีการส่งเสริมการเจริญนี้สามารถแยกฟาจได้ง่ายและสะดวกแต่ไม่สามารถระบุจำนวนอนุภาคฟาจอิสระที่มีอยู่ได้

2.6.3 การแยกอนุภาคฟาจที่เป็นโปรฟาจในเซลล์แบคทีเรีย

วิธีการนี้เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้แยกเทมเพอเรตฟาจซึ่งอยู่ในภาวะที่เป็นโปรฟาจภายในเซลล์แบคทีเรีย ส่วนใหญ่ใช้วิธีการชักนำเซลล์แบคทีเรียด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เช่น ฟาจ SU-11 ได้จาก *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Kanda *et al.*, 1999) ฟาจ LC1 และ LL5 ได้จาก *Lactococcus lactis* (Lillehaug, 1997) ในขณะที่ Lomovskaya และคณะ (1972) แยกฟาจ ϕ C31 โดยไม่ได้ชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แต่เกิดจากการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาเองโดยธรรมชาติ (spontaneous release) เมื่อผสม *Streptomyces coelicolor* A3(2) กับ *Sterptomyces coelicolor* 66 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เนื่องจาก ϕ C31 มีสมบัติเป็นโปรฟาจใน *S. coelicolor* A3(2) แต่สามารถทำให้เกิดไลติคไซเคิลใน *S. coelicolor* 66 ได้ นอกจากนี้เทมเพอเรตฟาจที่อยู่ในเซลล์แบคทีเรียบางชนิดสามารถเกิดการปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ได้เองตามธรรมชาติเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยไม่ต้องมีการชักนำหรือผสมกับโฮสต์ที่จำเพาะต่อเทมเพอเรตฟาจนั้นลงไป เช่น เทมเพอเรตฟาจ B α ที่ได้จากการเลี้ยง *Streptomyces lavendulae* S283 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Nakano *et al.*, 1981)

2.7 การตรวจสอบแบคทีเรียฟาจ (Adams, 1959)

แบคทีเรียฟาจสามารถถูกตรวจสอบได้ โดยดูจากการเกิดพลาควาโฮสต์ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซึ่งเรียกว่า การทำอาหารรุ่นสองชั้น วิธีนี้ทำโดยผสมเซลล์แบคทีเรียหรือสปอร์ของแอคติโนมัยซีทีสที่ใช้เป็นโฮสต์กับซอฟท์อาการ์และตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบฟาจ จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แบคทีเรียจะเจริญมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆที่เรียกว่า ลอน (lawn) ครอบคลุมอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แบคทีเรียฟาจจะเข้าไปทำลายแบคทีเรียจนเกิดการแตกสลายและปลดปล่อยฟาจรุ่นใหม่ออกมา อนุภาคฟาจที่ออกมาจะแพร่ไปตามอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่แบคทีเรียเซลล์อื่นที่อยู่ใกล้เคียงทำให้ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียเป็นบริเวณหนึ่ง เกิดเป็นบริเวณหรือวงใสขึ้นบนลอนของแบคทีเรีย เรียกว่า พลาควา (ดังแสดงในรูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 การตรวจ

วิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (Nester *et al.*, 1995)

สอบแบคทีเรียโอฟาจด้วย

2.8 ลักษณะพลัคที่เกิดจากแบคทีเรียโอฟาจ

พลัคที่เกิดจากแบคทีเรียโอฟาจจะมีอยู่ 2 ลักษณะคือพลัคใส (clear plaque) และ พลัคขุ่น (turbid plaque) ขนาดและรูปร่างของพลัคขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของฟาจและแบคทีเรียรวมทั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย ถ้าแบคทีเรียในบริเวณที่มีฟาจอยู่หยุดเจริญเร็วซึ่งอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อหมด สารพิษที่แบคทีเรียสร้างออกมารบกวนการเจริญของแบคทีเรียเอง หรือไม่มีพื้นที่ให้แบคทีเรียเจริญต่อพลัคที่ได้ก็จะมีขนาดเล็ก ขนาดของฟาจมีผลต่อขนาดพลัคเช่นกัน ซึ่งฟาจที่มีอนุภาคเล็กสามารถแพร่ไปตามอาหารเลี้ยงเชื้อสู่เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ใกล้เคียงได้เร็วกว่าฟาจที่มีอนุภาคใหญ่ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นเช่น ระยะพักตัว (latent period) และอัตราการเกาะติดของฟาจ (adsorption rate) (Adams, 1959)

2.8.1 พลัคใส

เกิดจากการที่แบคทีเรียโอฟาจสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตกสลายได้ทั้งหมดจึงไม่มีแบคทีเรียเจริญอยู่เลย ซึ่งไวรัลเลนทฟาจสามารถทำให้เกิดพลัคในลักษณะใสได้ ในบางครั้งเมื่อพบพลัคที่มีลักษณะใสต่อไประยะหนึ่งอาจมีโคโลนีของแบคทีเรียเกิดขึ้นจำนวนหนึ่ง ซึ่งแบคทีเรียที่อยู่รอดได้นี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เกิดการกลายพันธุ์ทำให้ตำแหน่งที่จำเพาะต่อการเกาะติดของฟาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลให้เซลล์เหล่านั้นรอดจากการถูกทำลายโดยแบคทีเรียโอฟาจ (Donadio *et al.*, 1986)

2.8.2 พลัคขุ่น

เป็นลักษณะพลัคที่เกิดจากเทมเพอเรตฟาจ ซึ่งในช่วงแรกที่ฟาจเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์นั้น การเจริญของแบคทีเรียเป็นไปอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีสารอาหารเพียงพอและฟาจที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อย การเพิ่มจำนวนของฟาจในช่วงแรกจึงเป็นแบบโลจิสติกส์เป็นส่วนใหญ่ แต่เมื่อฟาจมีจำนวนมากขึ้นฟาจส่วนหนึ่งจะเกิดการเพิ่มจำนวนแบบโลจิสติกส์เชิงลบทำให้แบคทีเรียเซลล์นั้นไม่แตกสลาย เซลล์ที่เป็นโลจิสติกส์สามารถใส่สารอาหารที่เหลืออยู่ภายในพลัคซึ่งแบคทีเรียบริเวณนั้นถูกทำลายหมดก่อนที่จะมีการใช้สารอาหาร ดังนั้นเมื่อพบอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวต่อไปอีกระยะหนึ่ง แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในพลัคจะเพิ่มจำนวนขึ้นจนสามารถเห็นเป็น พลัคที่มีลักษณะขุ่นได้ด้วยตาเปล่า (Maloy *et al.*, 1994)

2.9 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอฟาจ

ในการนำโอฟาจไปใช้ศึกษาวิจัยในด้านต่างๆจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของโอฟาจสูงและมีปริมาณมากเพียงพอคือประมาณ 10^7 - 10^{10} PFU (Plaque Forming Unit) ต่อมิลลิลิตร (Hranueli *et al.*, 1979; Klaus *et al.*, 1981) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงโอฟาจให้ได้จำนวนมากซึ่งการเพาะเลี้ยงโอฟาจที่นิยมทำมี 2 วิธีคือ

2.9.1 การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เป็นการเลี้ยงแบคทีเรียและโอฟาจในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อให้การเจริญของเชื้อมีประสิทธิภาพดี ซึ่งโอฟาจจะเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แบคทีเรียจนเซลล์แตกสลาย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะใสเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขุ่นที่มีเฉพาะแบคทีเรียจำนวนเท่ากันเจริญอยู่เพียงอย่างเดียว การเพาะเลี้ยงโอฟาจในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนั้นนิยมใช้กับโอฟาจที่มีโฮสต์เป็นแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลวได้ดี เช่น โอฟาจของ *E.coli* หรือ *Lactococcus* sp. (Lillehaug, 1997 ; Yin,1997) เป็นต้น

2.9.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

การเพาะเลี้ยงโอฟาจวิธีนี้เป็นวิธีการเดียวกับการตรวจสอบโอฟาจบนอาหารวุ้นสองชั้น วิธีการนี้ให้จำนวนโอฟาจได้มากหรือน้อยขึ้นกับจำนวนจานเพาะเชื้อที่ใช้ ซึ่งวิธีการนี้เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงโอฟาจที่มีโฮสต์เจริญในอาหารเหลวได้ไม่ดี Dowding และ Hopwood (1973) พบว่าแอกติโนโอฟาจ VP5 ซึ่งมีโฮสต์คือ *S. coelicolor* A3 (2) มีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวได้น้อยมากเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งยังมีแอกติโนโอฟาจที่มีโฮสต์เป็นแอกติโนมัยซีทีสอีกหลายชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงโอฟาจให้ได้ปริมาณมากในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเท่านั้น (Kurup and Heinzen, 1978; Klaus *et al.*, 1981; Anne *et al.*, 1984) การเก็บรวบรวมโอฟาจจากอาหารแข็งจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหรือบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆชะโอฟาจออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10 การศึกษารูปร่างแบคทีเรียโอฟาจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษารูปร่างของฟาจต้องอาศัยเทคนิคการย้อมตัวอย่างด้วยวิธีเนกาทีฟสแตนนิง (negative staining) ด้วยวิธีนี้จะทำให้เห็นรูปร่างของฟาจได้ง่ายขึ้นเนื่องจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบจะมีสีอ่อนกว่าพื้นผิว (background) ซึ่งทึบแสง ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างตัวอย่างและพื้นผิว (Bradley, 1967) วิธีเนกาทีฟสแตนนิงนิยมย้อมตัวอย่างด้วยยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) (Chater and Cater, 1979; Stuttard and Dwyer, 1981; Kanda *et al.*, 1999) หรือโปแทสเซียมฟอสโฟทังสเตต (potassium phosphotungstate) (Dowding, 1973; Hranueli *et al.*, 1979)

2.11 การจัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาจ

Bradley (1967) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียโอฟาจโดยอาศัยรูปร่างและชนิดของกรดนิวคลีอิก แบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (ดังแสดงในรูปที่ 2.7)

กลุ่ม A มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) ส่วนหางมีซีทห่อหุ้มที่หดตัวได้ (contractile sheath) บริเวณปลายของส่วนหางมักมีโครงสร้างอื่นประกอบ เช่น แผ่นฐาน หรือ โยหาง เป็นต้น มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม B มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ส่วนหางมีความยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนหัว หางไม่มีซีทที่หดตัวได้ห่อหุ้ม อาจมีหรือไม่มีโครงสร้างอื่นที่ปลายส่วนหาง มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม C มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ความยาวส่วนหางสั้นกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนหัว ส่วนหางไม่สามารถหดตัวได้ กรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่

กลุ่ม D แคปซิดเป็นรูปหกเหลี่ยม ประกอบด้วยแคปไซเมอร์ขนาดใหญ่มีปุ่มเกาะ (knob) อยู่บนส่วนยอดของแคปซิด กรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

กลุ่ม E แคปซิดเป็นรูปหกเหลี่ยม ประกอบด้วยแคปไซเมอร์ขนาดเล็ก กรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว

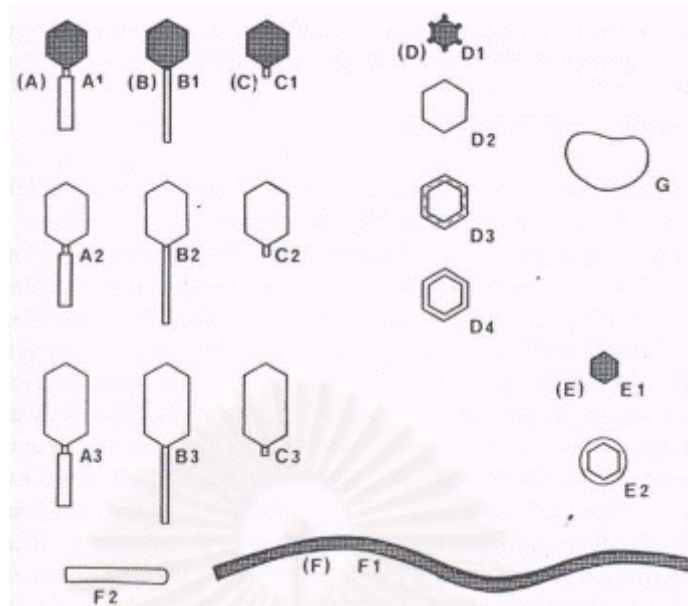
กลุ่ม F รูปร่างแบคทีเรียโอฟาจเป็นสายยาว มีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

ต่อมา Reanney และ Ackermann (1982) จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไวรัสเพิ่มขึ้นจาก 6 กลุ่มหลักของ Bradley เป็น 18 กลุ่ม คือ A1-A3, B1-B3, C1-C3, D1-D4, E1-E2 และ F1-F2 โดยอาศัยขนาดของแคปซิดเป็นหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกด้วย และเพิ่มกลุ่ม G ซึ่งเป็นแบคทีเรียไวรัสที่มีรูปร่างไม่แน่นอนมีกรดนิวคลีอิกเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (ดังแสดงในรูปที่ 2.7)

นอกจากนี้คณะกรรมการสากลว่าด้วยการจัดจำแนกไวรัส (International Committee for Taxonomy of Virus: ICTV) จัดจำแนกแบคทีเรียไวรัสในระดับแฟมิลี (family) โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของชนิดกรดนิวคลีอิก จำนวนสายของกรดนิวคลีอิก และการมีหรือไม่มีเอนVELOPE (envelope) ห่อหุ้มอนุภาค ซึ่ง ICTV จัดจำแนกแบคทีเรียไวรัสออกเป็นแฟมิลีต่างๆดังแสดงในรูปที่ 2.8 (Matthews, 1982)

ฟาจในกลุ่ม ที-อีเวนเมื่อจำแนกด้วยวิธีของ Bradley จัดอยู่ในกลุ่ม A ในขณะที่ฟาจแลมดาจัดอยู่ในกลุ่ม B ฟาจที่จัดอยู่ในกลุ่ม D เช่น ϕ X-174 ส่วนฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาวซึ่งอยู่ในกลุ่ม F เช่น ฟาจ M13 และฟาจ fd เป็นต้น (Goyal, 1987)

Ackermann และคณะ (1985) ศึกษารูปร่างของแอกติโนฟาจที่มีแอกติโนมัซซีที่สกลุ่มต่างๆเป็นไฮสท์ สามารถจำแนกแอกติโนฟาจที่สำรวจ 305 ชนิด ออกได้เป็น 3 กลุ่มตามการจัดจำแนกของ Bradley คือ กลุ่ม A, B และ C หรือ จำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม ตามการจัดจำแนกโดยวิธีการของ Reanney และ Ackermann คือ A1-A2, B1-B2 และ C1-C2 และพบว่าฟาจของสเตรปโตมัซซีที่สแทบทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม B หรือกลุ่ม B1-B2 แอกติโนฟาจของสเตรปโตมัซซีที่สในกลุ่ม A และ C พบได้น้อยมาก ส่วนใหญ่เป็นแอกติโนฟาจของ *Thermomonospora* และ *Mycobacterium* และถ้าจัดจำแนกในระดับแฟมิลีตามวิธีของ ICTV แอกติโนฟาจ 305 ชนิดที่ทำการสำรวจจะถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* 4 ชนิด แฟมิลี *Podoviridae* 18 ชนิด และอีก 283 ชนิดจัดอยู่ในแฟมิลี *Siphoviridae*



รูปที่ 2.7 การจัดจำแนกแบคทีริโอฟาจตามวิธีการของ Bradley (A-F) และตามวิธีการของ Ackermann (A1-G) (Coetzee, 1987)

Nonenveloped				Enveloped	
dsDNA				Surface view	Section
				Surface view	Section
ssDNA				dsRNA	
ssRNA					
				100 nm	

รูปที่ 2.8 การจัดจำแนกและเรียกชื่อฟาจในระดับแฟมิลี (Matthews, 1982)

2.12 โฮสต์-เรนจ์ (host-range)

การศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของฟาจ หมายถึง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแคคเทอริโอฟาจกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่โฮสต์ที่ใช้แยกฟาจนั้น ถ้าฟาจสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการติดเชื้อได้มากชนิด เรียกว่า ฟาจมีโฮสต์-เรนจ์กว้าง แต่ถ้าฟาจสามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการติดเชื้อได้น้อยชนิด เรียกว่า ฟาจมีโฮสต์-เรนจ์แคบ การที่ฟาจจะมีโฮสต์-เรนจ์กว้างหรือแคบขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความจำเพาะต่อตำแหน่งที่จำเพาะกับการเกาะติดบนเซลล์แบคทีเรีย ถ้าตำแหน่งนั้นพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดโฮสต์-เรนจ์ของฟาจจะกว้าง ในทางกลับกันถ้าตำแหน่งนั้นพบเฉพาะในแบคทีเรียบางชนิดฟาจนั้นจะมีโฮสต์-เรนจ์แคบ อีกปัจจัยที่มีผลต่อโฮสต์-เรนจ์ของฟาจ คือ สิ่งขัดขวางหรือระบบป้องกันสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกเซลล์ของโฮสต์ เรียกว่า ระบบการจดจำและการดัดแปรที่ควบคุมโดยโฮสต์ (Host controlled restriction and modification system) ซึ่งระบบนี้พบได้ในแบคทีเรียทั่วไปโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนโดนิวคลีเอส (endonuclease) และ เมทิลเลส (methylase) เมื่อมีดีเอ็นเอของฟาจเข้าสู่เซลล์ เอนโดนิวคลีเอสจะทำการย่อยสลายดีเอ็นเอแปลกปลอมที่เข้ามา แต่ถ้าดีเอ็นเอของฟาจที่เข้ามา มีความจำเพาะต่อเมทิลเลสของแบคทีเรียจะเกิดการเติมหมู่เมทิลบนดีเอ็นเอของฟาจ ทำให้ดีเอ็นเอของฟาจไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนโดนิวคลีเอส (Kruger and Bickle, 1983; Sanders, 1987) ดังนั้นถ้าดีเอ็นเอของฟาจสามารถต้านทานระบบการจดจำและการดัดแปรที่ควบคุมโดยโฮสต์ของแบคทีเรียได้มากชนิดเท่ากับฟาจนั้นมีโฮสต์-เรนจ์กว้าง

Dowding และ Hopwood (1973) ศึกษาโฮสต์-เรนจ์ของแอคติโนฟาจของ *Streptomyces coelicolor* A3(2) พบว่าแอคติโนฟาจ VP11 ซึ่งเป็นไวรัสเลนต์ฟาจมีโฮสต์-เรนจ์กว้างในขณะที่แอคติโนฟาจ VP5 ซึ่งเป็นเทมเพอเรตฟาจมีโฮสต์-เรนจ์ที่แคบ

Chater และ Carter (1979) รายงานว่าแอคติโนฟาจ R4 มีโฮสต์-เรนจ์ที่กว้างสามารถทำให้สเตรปโตมัยซิส 18 สายพันธุ์จากทั้งหมด 36 สายพันธุ์ที่ทดสอบเกิดการติดเชื้อ แต่จากการทดสอบกับแอคติโนมัยซิสที่สกุลอื่น คือ *Nocardia mediterranei* และ *Corynebacterium glutamicum* พบว่าแอคติโนฟาจ R4 ไม่สามารถทำให้ทั้ง 2 สายพันธุ์เกิดการติดเชื้อได้

Klaus และคณะ (1981) พบว่าแอคติโนฟาจ SH10 มีโฮสต์-เรนจ์กว้างเช่นกัน สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสที่ทดสอบ 36 สายพันธุ์เกิดการติดเชื้อได้ถึง 28 สายพันธุ์ และจากการทดสอบกับแอคติโนมัยซิสที่สกุลอื่นคือ *Oerskovia* sp., *Nocardia* sp., *Rhodococcus* sp., *Promicromonospora* sp., *Micropolyspora* sp., *Actinomadura* sp. และ *Micromonospora* sp. พบว่าฟาจดังกล่าวไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้

Stuttard และ Dwyer (1981) พบว่าแอกติโนฟาจ SV2 ที่ทำการศึกษามีโฮสต์-เรนจ์แคบมาก สามารถทำให้ *Streptomyces venezuelae* ซึ่งเป็นโฮสต์เกิดการติดเชื้อได้เท่านั้น นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มเดียวกับแอกติโนมัยซีทีส คือ *Bacillus cereus* และ *Acinetobacter calcoaceticus* พบว่า SV2 ไม่สามารถทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเกิดการติดเชื้อได้

Suenaga และคณะ (1994) ศึกษาแอกติโนฟาจ SA1 ที่ทำให้ *Streptomyces azureus* ATCC14921 ซึ่งสามารถผลิตโธโอสเตรปตอน (thiostrepton) เกิดการติดเชื้อได้ แต่เนื่องจาก SA1 มีโฮสต์-เรนจ์แคบสามารถทำให้ *S. azureus* เกิดการติดเชื้อได้เท่านั้น จึงทำการแยกแอกติโนฟาจตัวใหม่ที่มีโฮสต์-เรนจ์ที่กว้างจากโฮสต์ชนิดเดิม สามารถแยกแอกติโนฟาจตัวใหม่ คือ SA28 ที่ทำให้สเตรปโตมัยซีสเกิดการติดเชื้อได้ 12 สายพันธุ์จากเชื้อทดสอบ 50 สายพันธุ์ แต่ แอกติโนฟาจ SA28 ให้ผลึกที่มีลักษณะชุนกับ *S. azureus* เพียงโฮสต์เดียวเท่านั้น

2.13 การนำฟาจไปประยุกต์ในงานด้านต่างๆ

2.13.1 ใช้ฟาจในการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดเช่น *Salmonella typhi* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) หรือ *Staphylococcus aureus* ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ แบคทีเรียดังกล่าวมีหลายสายพันธุ์ซึ่งจะมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นจึงใช้ความจำเพาะของฟาจแต่ละชนิดที่มีต่อโฮสต์ หรือเรียกว่า phage typing ในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเหล่านี้ ซึ่งวิธีการนี้ทำให้การวินิจฉัยเชื้อทำได้รวดเร็วและถูกต้องกว่าการแยกและตรวจสอบเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ (DuBow, 1994; Black, 1999)

2.13.2 ใช้ฟาจลดจำนวนสเตรปโตมัยซีทีสที่มีอยู่มากในดินเพื่อแยกแอคติโนมัยซีทีสชนิดอื่นที่มีอยู่น้อยจากดิน

Kurtboke และคณะ (1992) ทำการแยกแอคติโนมัยซีทีสกลุ่มที่ไม่ใช้สเตรปโตมัยซีทีสโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะคัดแยก แต่สามารถแยกได้น้อยเนื่องจากมีสเตรปโตมัยซีทีสปนเปื้อนมาด้วยเสมอ ดังนั้นจึงใช้แอคติโนฟาจหลายชนิด (polyvalent phage) ที่จำเพาะต่อ สเตรปโตมัยซีทีสผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้แยกแอคติโนมัยซีทีสกลุ่มต่างๆ พบว่าสามารถแยกแอคติโนมัยซีทีสกลุ่มที่ไม่ใช้สเตรปโตมัยซีทีสได้จำนวนมากขึ้น และในปีต่อมา Kurtboke และคณะ ใช้แบคทีเรียฟาจที่จำเพาะต่อแบคทีเรียชอปร้อน (thermophilic bacteria) ในการลดจำนวนแบคทีเรียเหล่านี้ลงเพื่อแยกแอคติโนมัยซีทีสชอปร้อน (thermophilic actinomycetes) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ *Thermomonospora* sp. *Saccharopolyspora rectivirgula* และ สเตรปโตมัยซีทีสชอปร้อนต่างๆได้มากขึ้น (Kurtboke et al., 1993) นอกจากนี้ Long และ Amphlett (1996) ใช้แอคติโนฟาจที่มีความสามารถทำลายเซลล์ได้สูง (super lytic actinophage) ในการลดจำนวนสเตรปโตมัยซีทีสเพื่อแยกแอคติโนมัยซีทีสชนิดอื่นๆ พบว่าหลังจากการใช้วิธีดังกล่าวสามารถลดจำนวนสเตรปโตมัยซีทีสได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มตัวอย่างดินกับฟาจกลุ่มดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และจำนวนแอคติโนมัยซีทีสชนิดอื่นเพิ่มขึ้นเป็น 3-10 เท่า โดยเฉพาะกลุ่ม *Micromonospora Actinoplanes* และ *Streptosporangium* ซึ่งแอคติโนมัยซีทีสเหล่านี้สามารถแยกจากตัวอย่างดินได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับการแยกโดยไม่ใช้แอคติโนฟาจ

2.13.3 ใช้แบคทีเรียฟาจในการศึกษาด้านพันธุวิศวกรรมของแบคทีเรีย

แบคทีเรียฟาจถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมเนื่องจากคุณสมบัติของแบคทีเรียฟาจที่สามารถส่งกรดนิวคลีอิกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ แบคทีเรียฟาจที่ศึกษาและนำมาใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนกันมาก เช่น เทมเพอเรตฟาจ แลมดา เทมเพอเรตฟาจ M13 (Chauthaiwale et al., 1992; Sambrook and Russell, 2001) เป็นต้น

เริ่มมีผู้ศึกษาแอคติโนฟาจเพื่อนำมาพัฒนาเป็นพาหะในการโคลนยีนของสเตรปโตมัยซีทีสในราวปี ค.ศ. 1970 แอคติโนฟาจ ϕ C31 เป็นเทมเพอเรตฟาจที่มีผู้ศึกษาและพัฒนาใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนของสเตรปโตมัยซีทีส (Lomovskaya et al., 1980; Harris et al., 1983) ใช้เป็นส่วนประกอบของพลาสมิด (plasmid vector) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของพลาสมิดให้สูงขึ้นเพื่อนำมาใช้กับสเตรปโตมัยซีทีส (Kuhstoss et al., 1991) ถึงแม้เทมเพอเรตฟาจ ϕ C31 ถูกศึกษาและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านพันธุวิศวกรรมอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน (Hartley et al., 1994; Howe and Smith, 1996; Lomovskaya et al., 1997) แต่ยังมีสเตรปโตมัยซีทีสอีกหลายชนิดที่ไม่เกิดการติดเชื่อมกับฟาจ ϕ C31 ได้ ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาและพัฒนาแอคติโนฟาจชนิดอื่นๆอีกหลายชนิดเพื่อนำมาใช้เป็นพาหะในการโคลนยีน เช่น ฟาจ R4 (Mitsui and Takahashi, 1992; Morino and Takahashi, 1997) ฟาจ SAT1 (Suenaga et al., 1994) และ ฟาจ VWB (Anne et al., 1990) เป็นต้น

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

-ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D-0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.

-ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-24 บริษัท International Scientific Supply Co. Ltd.,

Thailand

-เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น Gyrotory G 10 บริษัท New Brunswick Co. Ltd., U.S.A.

-เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น H-103N บริษัท Kokusan Ensinki Co. Ltd., Japan

-เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) model Hertz บริษัท Kubota Corporation, Japan

-อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Aquatherm G-560E บริษัท Scientific Industries, U.S.A.

-เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore

-เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

-กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) รุ่น MZ6 บริษัท Leica, Germany

-กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan

-กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) รุ่น Jeol model JEM-200 CX, Japan

-เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น Model HS10-2 บริษัท Torrey Pines Scientific, U.S.A.

-หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต รุ่น GTE กำลังไฟ 10 วัตต์ บริษัท Sylvania, Japan

-Swinnex Filter Unit บริษัท Millipore Corporation, U.S.A.

-แผ่นกรองชนิด เซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate filter) pore size 0.45 μm บริษัท Sartorius, Germany

-Microtitre plate ขนาด 80 หลุม บริษัท Tominaga, Japan

3.2 สารเคมี

-แมนนิทอล (D-mannitol) บริษัท Difco Laboratories,U.S.A.

-โพลีเอทิลีนไกลคอล 8000 (polyethyleneglycol 8000) บริษัท Fluka Chemika, Switzerland

-ไมโตมายซิน ซี (mitomycin C) บริษัท Fluka Chemika, Switzerland

-ยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) บริษัท Fluka Chemika, Switzerland

-กลีเซอรอล (glycerol) 87 เปอร์เซนต์ บริษัท Merck, Germany

-โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) บริษัท Merck, Germany

-แอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate) บริษัท Merck, Germany

-เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (tetra-sodiumpyrophosphate) บริษัท Fluka Chemika, Switzerland

3.3 จุลินทรีย์

1. *Streptomyces coralus* JCM 4313

2. *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* JCM 4772

3. *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1

4. *S. tauricus* JCM 4837

5. *S. melanosporofaciens* JCM 4495

6. *S. pavullus* F4b-31

7. *S. perciperlis* V6C-6

8. *S. griseus* KA1198

9. *S. luteogriseus* ISP 5483

10. *S. alboniger* ATCC 12461

11. *S. albovinaceus* ATCC 15823

12. *S. aminophilus* ATCC 14961

13. *S. albus* KCC S-0166

14. *S. ambofaciens* KCC S-0204

15. *S. aureus* KCC S-0009

16. *S. azureus* PK 100C

17. *S. coelicolor* M145
18. *S. coelicolor* KCC S-0357
19. *S. coeruleofuscus* KCC S-0358
20. *S. cyaneus* KCC S-0220
21. *S. echinatus* KCC S-0144
22. *S. endus* KCC S-0213
23. *S. humifer* KCC S-0770
24. *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* KCC S-0055
25. *S. lavendulae* subsp. *grosserius* KCC S-0056
26. *S. lividans* TK 24
27. *S. luteofluorescens* KCC S-0203
28. *S. niveus* KCC S-0251
29. *S. puniceus* KCC S-0406
30. *S. sparsogenes* KCC S-0517
31. *S. viridochromogenes* KCC S-0435
32. *S. badius* JCM 4350
33. *S. bikiniensis* JCM 4011
34. *S. thermovulgaris* JCM 4520
35. *S. lincolensis* JCM 4287
36. *S. nodosus* JCM 4297
37. *Streptomyces* sp. PO
38. *Kitasatospora griseola* JCM 3339

ที่มา : สายพันธุ์ 1 - 9 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ
สายพันธุ์ 10 - 12 ี่้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
สายพันธุ์ 13 - 38 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Seiya Ogata

3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เตรียมและเก็บรักษาสเตรปโตมัยซีทีสในรูปแบบสปอร์แขวนลอยโดยเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารวุ้น เอียงแมนนิทอลมั่งป็นอการ์ (mannitol mungbean agar ; ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-30 วัน หรือจนกระทั่งสเตรปโตมัยซีทีสสร้างสปอร์ เติมน้ำกลั่นผสมทวินเอตตี (Tween-80) 10 มิลลิลิตร ชูตให้สปอร์หลุดออกทำให้สปอร์หลุดออกจากมัยซีเทียมและไม่เกาะกันเป็นกลุ่มโดยใช้เครื่องผสมสาร กรองผ่านชุดกรองสำลีปลอดเชื้อ นำไปปั่น ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ใส่สารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดิน ที่มีลักษณะร่วน และมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.0-8.0 ประมาณ 500 กรัม ลึกจากผิวดินประมาณ 7-10 เซนติเมตร บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะและสีของดินแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การแยกแอคติโนฟาจโดยวิธีส่งเสริมการเจริญ (Dowding, 1973)

นำตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในนิวเตรียนท์บรอก (Nutrient Broth; ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีสสายพันธุ์อ้างอิงจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *S. griseus* KA1198, *S. luteogriseus* ISP 5483 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 ความเข้มข้นประมาณ 10^7 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง แยกดินออกโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.45 ไมครอน

3.7 การตรวจสอบการติดเชื้อของสเตรปโตค็อกคัสที่สจากแอดติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหาร วันสองชั้น (Adams, 1959)

นำส่วนน้ำใสจากข้อ 3.6 เจือจางแบบลำดับส่วน 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ด้วยนิวเตรียนท์บรอกท ผสมส่วนน้ำใสที่เจือจางในแต่ละระดับปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตค็อกคัสสายพันธุ์อ้างอิงชนิดเดียวกับที่ใช้แยกแอดติโนฟาจจากดินปริมาตร 100 ไมโครลิตร (10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ในซอฟท์อการ์ (Soft Agar; ภาคผนวก ก หมายเลข 4) เทลงบนนิวเตรียนท์อการ์ (Nutrient Agar; ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อจากการเกิดพลัค ตรวจสอบลักษณะของพลัค ขนาด ความชุ่ม-ใส รูปร่างและขอบของพลัค

ถ้าเป็นการตรวจสอบการติดเชื้อของแอดติโนฟาจที่มีต่อสเตรปโตค็อกคัสที่อื่น ๆ จะใช้สปอร์แขวนลอยของสเตรปโตค็อกคัสที่ต้องการตรวจสอบผสมกับแอดติโนฟาจที่แยกได้

3.8 การทำแอดติโนฟาจให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้วิธีการแยกพลัคเดี่ยว (single plaque isolation)

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยพลัคที่อยู่เดี่ยวๆ ลงในหลอดทดลองที่บรรจุนิวเตรียนท์บรอกท ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มีสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตค็อกคัสชนิดเดียวกับที่ใช้แยกแอดติโนฟาจ ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ตรวจสอบลักษณะ พลัคตามวิธีในข้อ 3.7 ทำซ้ำ 2-3 ครั้งจนได้พลัคที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมากที่สุด (Greene and Goldberg, 1985)

3.9 การเพิ่มปริมาณและเก็บรวบรวมแอกติโนฟาจ

เพิ่มปริมาณแอกติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีในข้อ 3.7 ในจานเพาะเชื้อ 20 จาน หลังจากเกิดพลาัคเต็มนิวเตรียนท์บรอกปริมาณ 5 มิลลิตรลงในจานเพาะเชื้อ เขย่าจานเพาะเชื้อทุก 15 นาทีเป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำของเหลวออกจากจานเพาะเชื้อกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Dowding, 1973) นับจำนวนแอกติโนฟาจจากค่าความสามารถในการเกิดพลาัค (PFU: Plaque Forming Unit ต่อ มิลลิตร) โดยคำนวณจากสูตร (Luria *et al.*, 1987)

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาัค} = \frac{\text{จำนวนพลาัค}}{\text{ปริมาตรฟาจที่ใช้} \times \text{ค่าอัตราการเจือจาง}}$$

ปรับความเข้มข้นของแอกติโนฟาจเพื่อใช้ในการทดลองต่างๆเป็น 10^7 - 10^{10} PFU ต่อ มิลลิตร (Hranueli *et al.*, 1979; Klaus *et al.*, 1981)

3.10 การเก็บไลโซเจนที่เจริญอยู่ในพลาัค (Greene and Goldberg, 1985)

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยเซลล์ที่เจริญอยู่ในพลาัคชั้นของสเตรปโตมัยซิทีส จำนวน 15 พลาัค นำไปเลี้ยงลงบนนิวเตรียนท์อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อที่เจริญมาขีด (streak) ลงบนแมนนิทอลม้งปีนอการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวจำนวน 15-20 โคโลนี มาขีดบนแมนนิทอลม้งปีนอการ์ ถ่ายเชื้อซ้ำ 3 ครั้ง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ไม่เกิดการปนเปื้อน และ สร้างสปอร์ได้เร็ว จำนวน 2-3 โคโลนีต่อพลาัค มาเลี้ยงบนแมนนิทอลม้งปีนอการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-14 วัน ทำเป็นสปอร์แขวนลอยเช่นเดียวกับข้อ 3.4

3.11 การตรวจสอบภูมิคุ้มกันของไลโซเจนต่อการติดเชื้อซ้ำจากแอกติโนฟาจ

ผสมสปอร์แขวนลอยของไลโซเจนที่ได้จากข้อ 3.10 ความเข้มข้น 10^7 ลงในซอฟท์อการ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์อการ์ใน Microtitre plate หยด (spot) แอกติโนฟาจชนิดต่างๆที่สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์เดียวกับไลโซเจนเกิดการติดเชื้อ ที่ความเข้มข้น 10^7 PFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารรุ่นสองชั้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดพลาัค (Diaz *et al.*, 1989) ตรวจสอบผลที่ได้ซ้ำตามวิธีในข้อ 3.7 โดยชุดควบคุมคือ สปอร์ของสเตรปโตมัยซิสและไลโซเจน ที่ผสมกับซอฟท์อการ์ แล้วเทลงบนนิวเตรียนท์อการ์

3.12 การตรวจสอบการปลดปล่อยแอกติโนฟาจออกจากเซลล์ไลโซเจนโดยธรรมชาติ

(Diaz *et al.*, 1989)

ผสมสปอร์ไลโซเจนจากข้อ 3.10 ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในสารละลายเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 50 มิลลิโมลาร์ (Tetra-sodium pyrophosphate; ภาคผนวก ข หมายเลข 2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ล้างด้วยสารละลายเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง และ น้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร อีก 3 ครั้ง ผ่านแผ่นกรองที่มีสปอร์ของไลโซเจนอยู่ สปอร์ไลโซเจนที่ได้นำมาเจือจางในนิวเตรียนท์บรอกทจนเหลือความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10- 100 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปกระจาย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์อการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ผสมสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตมัยซิสชนิดเดียวกับที่ให้ไลโซเจนในซอฟท์อการ์ เทกับลงบนนิวเตรียนท์อการ์ที่มีโคโลนีของไลโซเจนเจริญอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสบริเวณโคโลนีของไลโซเจน เทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้สปอร์ของสเตรปโตมัยซิสชนิดเดียวกับไลโซเจน ในขั้นตอนที่นำสปอร์ไปเจือจางแล้วกระจายลงบนนิวเตรียนท์อการ์

การสังเกตวงใสทำโดยนำไปย้อมสีด้วยคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที ใช้แสงไฟส่องจากด้านล่างจนเพาะเชื้อเพื่อสังเกตการเกิดวงใส

3.13 การตรวจสอบการปลดปล่อยแอกติโนฟาจออกจากเซลล์ไลโซเจนโดยธรรมชาติใน ภาวะต่างๆ

เลี้ยงสปอร์แขวนลอยของไลโซเจนที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรปริมาตร 100 ไมโครลิตรในสารละลายนอร์มอลซาลีน 10 มิลลิลิตร และในนิวเตรียนท์บรอกปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในแสงไฟที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และที่มืด เป็นเวลา 6 และ 18 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลานำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ตรวจสอบจำนวนแอกติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารรุ่นสองชั้นตามวิธีในข้อ 3.7

3.14 การศึกษารูปร่างแอกติโนฟาจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำแอกติโนฟาจแขวนลอยจากข้อ 3.9 มาตกตะกอนด้วยไซเดียมคลอไรด์ปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 โมลาร์ และ พอลิเอธิลีนไกลคอล 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนมาละลายในแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 (ammonium acetate buffer ; ภาคผนวก ข) หยดสารละลายแอกติโนฟาจในแอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ลงบนกริด (grid) ย้อมตัวอย่างด้วยวิธีเนกาทีฟสแตนนิง โดยใช้ยูรานิลอะซิเตต 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปศึกษารูปร่างแอกติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Dowding, 1973 ; Kuhn *et al.*, 1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.15 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอกติโนฟาจที่แยกได้กับสเตรปโตมัยซีทีสอื่น ๆ

ผสมสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตมัยซีทีสที่ต้องการทดสอบการติดเชื้อ ในซอฟท์อการ์ เทลบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์อการ์ จากนั้นทดสอบการติดเชื้อของสเตรปโตมัยซีทีส โดยหยดแอกติโนฟาจที่แยกได้ที่ความเข้มข้น 10^7 PFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์อการ์ที่เทสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีสที่ต้องการทดสอบการติดเชื้อไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อของสเตรปโตมัยซีทีส โดยสังเกตการเกิดพลาสมาบริเวณที่หยดแอกติโนฟาจ (Kuhn *et al.*, 1987)

ตรวจสอบลักษณะพลาสมาที่เกิดจากแอกติโนฟาจที่ทำให้สเตรปโตมัยซีทีสที่นำมาทดสอบเกิดการติดเชื้อ โดยการทำอาหารวุ้นสองชั้นเช่นเดียวกับข้อ 3.7

3.16 การชักนำโปรฟาจในไลโซเจน

3.16.1 การตรวจหาอัตราการรอดชีวิตของสปอร์เมื่อฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

เลี้ยงสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีสที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอก บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนที่เป็นเซลล์นำมาละลายในนอร์มอลซาลีน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงบนจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อที่มีเข็มวางอยู่ วางจานเพาะเชื้อลงบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กและกวนให้เข็มหมุน ฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรระยะห่าง 40 เซนติเมตร ที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ตามลำดับ เมื่อครบตามเวลาเจือจางสปอร์แขวนลอยด้วยสารละลายนอร์มอลซาลีน จนเหลือความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 10-100 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์อการ์ บ่มเชื้อในที่มืดและที่มีแสงไฟที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิต

3.16.2 การชักนำโปรฟาจในไลโซเจนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ogata, *et al.*, 1985)

เลี้ยงสปอร์ของไลโซเจนจากข้อ 3.10 ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเช่นเดียวกับข้อ 3.16.1 เมื่อครบตามเวลาถ่ายสปอร์แขวนลอยของไลโซเจนปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอก ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีในที่มืด และ ที่มีแสงไฟที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาเจือจาง ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ในนิวเตรียนท์บรอก ตรวจสอบจำนวนแอกติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้นตามวิธีข้อ 3.7

3.16.3 การตรวจหาอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่บ่มกับไมโตมายซิน ซี

เลี้ยงสปอร์ของสเตรปโตมัซซีทีสที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายสปอร์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอก ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผสมไมโตมายซิน ซี (ปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาบั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีและล้างสปอร์ด้วยสารละลายยอนอร์มอลซาลิน จากนั้นเจือจางจนเหลือความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 10-100 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และนำไปกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์ฮอกการ์ บ่มที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.16.4 การชักนำโปรฟาจในไลโซเจนด้วยไมโตมายซิน ซี (Ogata *et al.*, 1985)

เลี้ยงสปอร์ของไลโซเจนความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรจากข้อ 3.10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกท ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายสปอร์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกท ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่ผสมไมโตมายซิน ซี (ปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15, 30, 60, 120 และ 180 นาที เมื่อครบตามเวลา ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีและล้างสปอร์ด้วยสารละลายยอนอร์มอลซาลีน ใส่น้ำส่วนเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกท ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ความเข้มข้นแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ในนิวเตรียนท์บรอกท ตรวจสอบจำนวนแอกติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารรุ่นสองชั้นตามวิธีข้อ 3.7

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การแยกแอสคิตินอฟาจากตัวอย่างดิน

จากตัวอย่างดินจำนวน 17 ตัวอย่าง นำมาใช้แยกแอสคิตินอฟาด้วยวิธีส่งเสริมการเจริญ โดยใช้สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิง 3 สายพันธุ์ คือ *S. griseus* KA 1198 *S. luteogriseus* ISP 5483 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 เป็นโฮสต์ เมื่อตรวจสอบส่วนน้ำใสด้วยวิธีการทำอาหารรุ้นสองชั้น พบว่า *S. griseus* KA 1198 *S. luteogriseus* ISP 5483 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 เกิดการติดเชื้อจากแอสคิตินอฟาชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.2 ลักษณะปลั๊กของแอสคิตินอฟาที่แยกจากตัวอย่างดิน

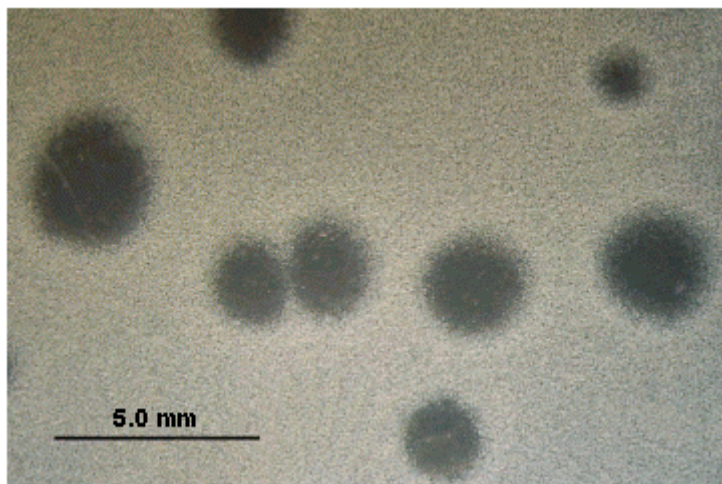
จากการนำปลั๊กของแอสคิตินอฟา 15 ชนิดที่ได้จากข้อ 4.1 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการแยกแอสคิตินอฟาจากปลั๊กเดียวตามวิธีในข้อ 3.8 ทำซ้ำ 3 ครั้งจนได้ปลั๊กที่มีลักษณะเหมือนกัน พบว่าแอสคิตินอฟา 13 ชนิดคือ Tg1 Tg3 Tg4 Tg5 Tlu1 Tlu3 Tlu4 Tlu5 TN1 TN3 TN5 TN6 TN7 ให้ปลั๊กลักษณะค่อนข้างกลม ใส แต่มีขนาดแตกต่างกันดังตัวอย่างปลั๊กของแอสคิตินอฟา TN1 และ Tlu3 ในรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ ส่วนแอสคิตินอฟาอีก 2 ชนิด คือ Tg2 และ TN2 ให้ปลั๊กลักษณะค่อนข้างกลม และมีลักษณะขุ่น ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4

นอกจากนี้ในการวิจัยยังได้นำแอสคิตินอฟา Ac7 ซึ่งแยกได้โดยเจนจิรา เดชรักษา (2543) ผู้ซึ่งได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอสคิตินอฟา Ac7 กับ *S. luteogriseus* ISP 5483 แล้ว ให้ปลั๊กลักษณะขุ่น ดังแสดงในรูปที่ 4.5 มาศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมในงานวิจัยนี้ด้วย ปลั๊กของแอสคิตินอฟาทั้ง 16 ชนิดมีลักษณะและขนาดแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.2

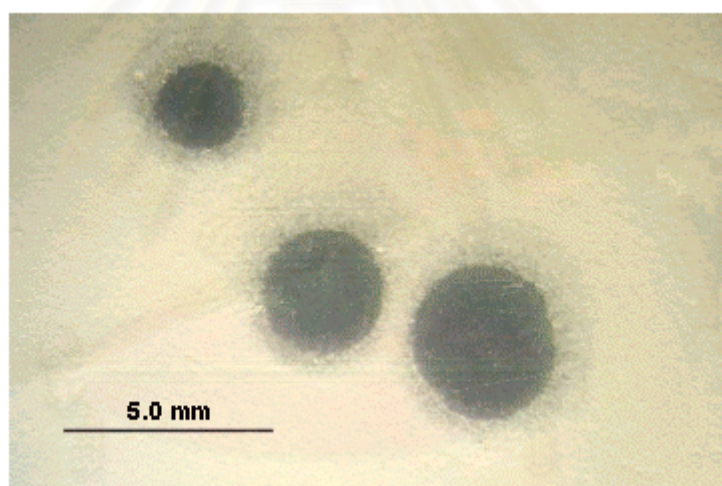
ตารางที่ 4.1 แอคติโนฟาจที่แยกจากแหล่งดินต่างๆโดยใช้สเตรปโตมัยซิสอ้างอิงเป็นโฮสต์

ตัวอย่างดิน	แอกติโนฟาจที่แยกได้จากโฮสต์		
	<i>S. griseus</i> KA 1198	<i>S. luteogriseus</i> ISP 5483	<i>S. hygrosopicus</i> subsp. <i>hygrosopicus</i> NOV-1
1. อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	—	—	TN1
2. ดอยปู่ย จ. แม่ฮ่องสอน	—	—	—
3. สนวนยางพารา อ. เมือง จ. กระบี่	—	Tlu1	—
4. ดินปลูกไม้ประดับ กทม.	—	—	TN2
5. อ. ศรีเทพ จ. เพชรบูรณ์	Tg1	—	—
6. อ. เมือง จ. ชัยนาท	Tg2	—	—
7. อ. โพนทอง จ. ร้อยเอ็ด	—	—	—
8. อ. เขาสมนกวาง จ. ขอนแก่น	—	—	—
9. เขาใหญ่ จ. นครราชสีมา	Tg4	Tlu4	TN6
10. อ. โคกเจริญ จ. ลพบุรี	—	—	—
11. ดอยขุนตาล จ. ลำพูน	Tg5	Tlu5	—
12. อ. ปากพลี จ. นครนายก	—	—	—
13. อ. พรหมบุรี จ. สิงห์บุรี	—	—	—
14. อ. คู่ม่วง จ. ตาก	—	—	TN3
15. อ. หนองบัว จ. นครสวรรค์	Tg3	Tlu3	TN7
16. อ. แก่งกระจาน จ. เพชรบุรี	—	—	—
17. บ้านเขาทราย จ. พิจิตร	—	—	TN5

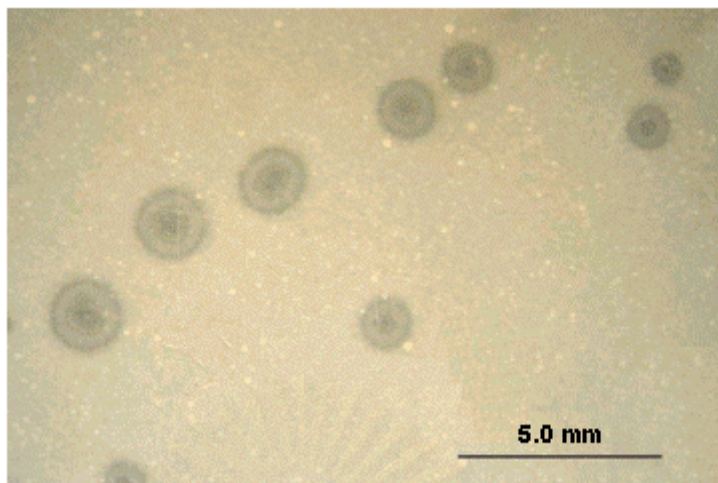
— : ไม่สามารถแยกแอกติโนฟาจได้



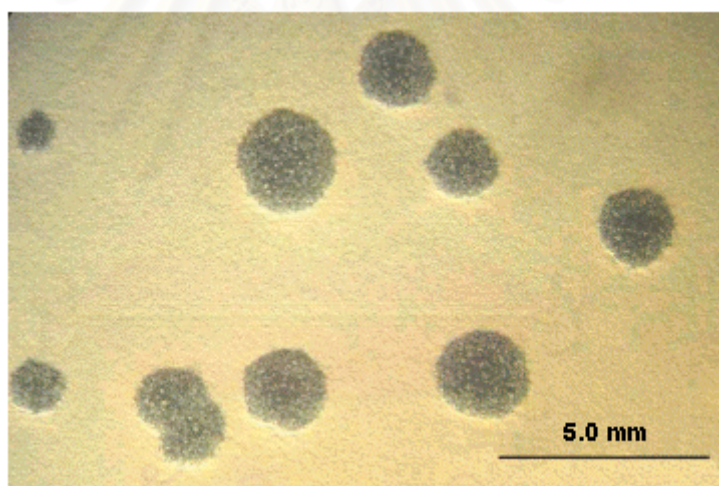
รูปที่ 4.1 พลาัคลักษณะใสของแอคติโนฟาจ TN1 บนลอนของ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* NOV-1 บนนิวเตรียนท์อการ์ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



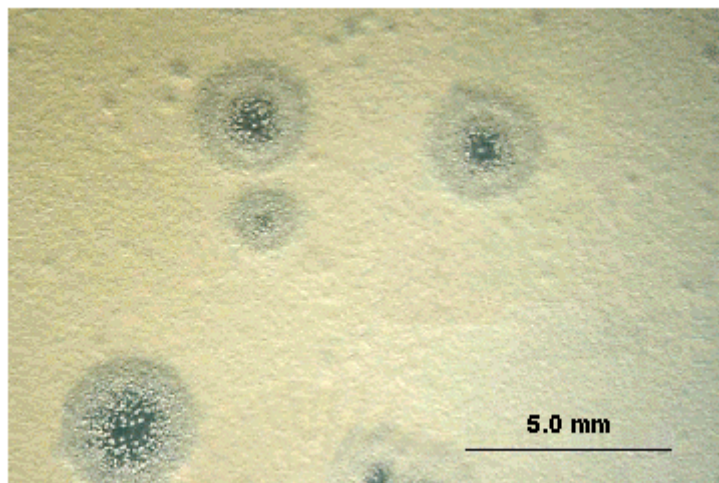
รูปที่ 4.2 พลาัคลักษณะใสของแอคติโนฟาจ Tlu3 บนลอน *S. luteogriseus* ISP 5483 บนนิวเตรียนท์อการ์ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.3 พลาสติกลักษณะขุ่นของแอคติโนฟาจ Tg2 บนลอน *S. griseus* KA 1198 บนนิวเตรียนท์
 อการ์ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.4 พลาสติกลักษณะขุ่นของแอคติโนฟาจ TN2 บนลอน *S. hygroscopicus* subsp.
hygroscopicus NOV-1 บนนิวเตรียนท์อการ์ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 พลาคลักษณะของแอคติโนฟาจ Ac7 บนลอน *S. luteogriseus* ISP 5483 บน
นิวเตรียนท์อการ์ ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของพลา๊คของแอคติโนฟาจ 16 ชนิด

แอคติโนฟาจ	ลักษณะของพลา๊ค		
	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง(มม.)	รูปร่างพลา๊ค	ความขุ่น-ใสของพลา๊ค
Tg1	1.2-1.7	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ	ใส
Tg2	1.2-1.8	ค่อนข้างกลมขอบเรียบ มีลักษณะวงแหวนรอบพลา๊ค	ขุ่น มีโคโลนีในพลา๊คเห็นด้วยตาเปล่า
Tg3	1.1-1.4	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ	ใส
Tg4	1.2-1.5	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ	ใส
Tg5	1.0-1.5	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ	ใส
Ac7	2.2-3.5	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ มีลักษณะวงแหวนรอบพลา๊ค	ขุ่น มีโคโลนีในพลา๊คเห็นด้วยตาเปล่า
Tlu1	1.5-3.0	กลมขอบเรียบ	ใส
Tlu3	1.6-3.2	กลมขอบเรียบ	ใส
Tlu4	1.5-2.9	กลมขอบเรียบ	ใส
Tlu5	1.8-3.2	กลมขอบเรียบ	ใส
TN1	1.85-3.1	กลมขอบไม่เรียบ	ใส
TN2	1.7-2.6	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ	ขุ่น มีโคโลนีในพลา๊คเห็นด้วยตาเปล่าเมื่อมองผ่านแสง
TN3	2.0-2.7	ค่อนข้างกลมขอบเรียบ	ใส
TN5	1.75-3.0	กลมขอบไม่เรียบ	ใส
TN6	2.1-3.1	กลมขอบไม่เรียบ	ใส
TN7	1.8-2.9	ค่อนข้างกลมขอบไม่เรียบ	

4.3 การแยกไลโซเจนจากพลาคลักษณะขุ่น

จากแอสคิตโนฟาจทั้งหมด 16 ชนิด พบว่ามีแอสคิตโนฟาจ 3 ชนิดที่ให้พลาคลักษณะขุ่น คือ แอสคิตโนฟาจ Tg2 TN2 และ Ac7 ทำการแยกไลโซเจนตามวิธีข้อ 3.10 เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละเชื้อประมาณ 15-20 โคโลนีมาเลี้ยงจนได้สปอร์และทำเป็นสปอร์แขวนลอยแล้วนำมาตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อจากแอสคิตโนฟาจชนิดเดิม โดยใช้ความเข้มข้นของแอสคิตโนฟาจ 10^7 PFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้มีทั้งเป็นไลโซเจน คือ มีภูมิคุ้มกันต่อแอสคิตโนฟาจชนิดเดิม และโคโลนีเดี่ยวที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน ดังตารางที่ 4.3-4.5

ตารางที่ 4.3 ไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิตโนฟาจ Tg2

ภูมิคุ้มกันต่อ แอสคิตโนฟาจ Tg2	โคโลนีของ <i>S. griseus</i> KA1198 จากพลาคลักษณะขุ่น เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแอสคิตโนฟาจ Tg2
ไม่มีภูมิคุ้มกัน เพราะเกิดพลาคล	g1.9, g1.11, g2.7, g2.8, g4.4, g4.8, g5.5, g7.1, g7.8, g8.9, g8.13
มีภูมิคุ้มกัน เพราะไม่เกิดพลาคล	Lg3.13, Lg3.14, Lg6.1, Lg6.4, Lg9.5, Lg9.5.1, Lg9.5.2, Lg9.9, Lg10.9

g : โคโลนีของ *S. griseus* KA1198 ที่ไม่เป็นไลโซเจน

Lg : โคโลนีที่เป็นไลโซเจนของ *S. griseus* KA1198

ตารางที่ 4.4 ไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิตโนฟาจ Ac7

ภูมิคุ้มกันต่อ แอสคิตโนฟาจ Ac7	โคโลนีของ <i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 จากพลาคลักษณะขุ่น เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแอสคิตโนฟาจ Ac7
ไม่มีภูมิคุ้มกัน เพราะเกิดพลาคล	lu1.11, lu1.13, lu4.9, lu4.10, lu6.2, lu6.3
มีภูมิคุ้มกัน เพราะไม่เกิดพลาคล	Llu3.14, Llu3.15, Llu5.3, Llu5.4, Llu5.11, Llu7.7, Llu7.9

lu : โคโลนีของ *S. luteogriseus* ISP 5483 ที่ไม่เป็นไลโซเจน

Llu : โคโลนีที่เป็นไลโซเจนของ *S. luteogriseus* ISP 5483

ตารางที่ 4.5 ไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิโนฟาจ TN2

ภูมิคุ้มกันต่อ แอสคิโนฟาจ TN2	โคโลนีของ <i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1 จากพลาไคขุน เมื่อเกิดการติดเชื้อจากแอสคิโนฟาจ TN2
ไม่มีภูมิคุ้มกัน เพราะเกิดพลาไค	N3.8, N3.11, N4.6, N4.8, N5.7, N10.0, N10.1
มีภูมิคุ้มกัน เพราะไม่เกิดพลาไค	LN1.5, LN1.6, LN2.5, LN2.6, LN5.12, LN7.5, LN7.7, LN12.7, LN12.9, LN13.4

N : โคโลนีของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 ที่ไม่เป็นไลโซเจน

LN : โคโลนีที่เป็นไลโซเจนของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1

4.4 การตรวจสอบภูมิคุ้มกันของไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิโนฟาจ

เมื่อนำไลโซเจนที่ได้จากข้อ 4.3 ที่เกิดจากแอสคิโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมาตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อจากแอสคิโนฟาจชนิดเดิมและแอสคิโนฟาจชนิดอื่นตามตารางที่ 4.1 รวมทั้งแอสคิโนฟาจซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการ 403 ภายใต้การดูแลของ รศ. ดร. สุรีนา ชวนิชย์ คือ แอสคิโนฟาจ 15N สามารถทำให้แอสคิโนฟาจทั้ง 3 ชนิดเกิดการติดเชื้อ แอสคิโนฟาจ 1/3D สามารถทำให้ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 และ *S. luteogriseus* ISP 5483 เกิดการติดเชื้อ และแอสคิโนฟาจ 7A ที่สามารถทำให้ *S. griseus* KA 1198 เกิดการติดเชื้อได้ โดยใช้ความเข้มข้นแอสคิโนฟาจเป็น 10^7 PFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าโคโลนีที่เจริญอยู่ในพลาไคของแอสคิโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมีสมบัติเป็นไลโซเจน คือสามารถต้านการติดเชื้อจากแอสคิโนฟาจชนิดเดิมได้ โดยไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิโนฟาจ Tg2 ไม่เกิดพลาไคเมื่อทำให้ติดเชื้อด้วยแอสคิโนฟาจ Tg2 และมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมีกับแอสคิโนฟาจอื่นอีก 2 ชนิดคือ TN1 และ TN6 แต่ยังเกิดพลาไคเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยแอสคิโนฟาจ Tg3 Tg4 TN5 15N และ 7A ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ ตารางที่ 4.6 ไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิโนฟาจ TN2 ไม่เกิดพลาไคเมื่อทำให้ติดเชื้อด้วยแอสคิโนฟาจ TN2 และ Ac7 แต่เกิดพลาไคเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยแอสคิโนฟาจอื่นอีก 6 ชนิดคือ Tlu4 Tg3 Tg5 TN1 15N และ 1/3D ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.7 และไลโซเจนที่เกิดจากแอสคิโนฟาจ Ac7 ไม่เกิดพลาไคเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยแอสคิโนฟาจ Ac7 TN2 และ TN3 แต่เกิดพลาไคเมื่อทำให้เกิดการติดเชื้อด้วยแอสคิโนฟาจอื่นอีก 5 ชนิดคือ TN6 Tlu4 15N 1/3D และ Tg5 ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ ตารางที่ 4.8

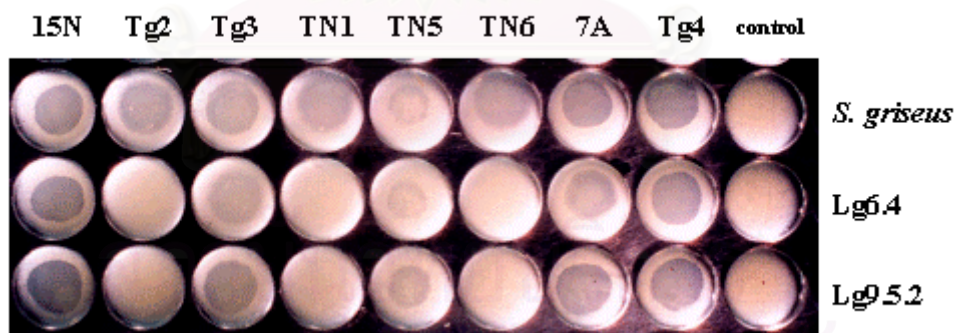
ตารางที่ 4.6 การแสดงภูมิคุ้มกันของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2 ต่อแอกติโนฟาจชนิดต่างๆ

สายพันธุ์แม่ และไลโซเจน	ภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจ							
	15N	Tg2*	Tg3	TN1	TN5	TN6	7A	Tg4
<i>S. griseus</i> KA 1198	-	-	-	-	-	-	-	-
Lg3.13	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg3.14	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg6.1	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg6.4	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg9.5	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg9.5.1	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg9.5.2	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg9.9	-	+	-	+	-	+	-	-
Lg10.9	-	+	-	+	-	+	-	-

- : ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจที่ทำให้ *S. griseus* KA1198 ติดเชื้อ เพราะเกิดแผล

+ : มีภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจที่ทำให้ *S. griseus* KA1198 ติดเชื้อ เพราะไม่เกิดแผล

* : ชนิดแอกติโนฟาจที่ทำให้เกิดไลโซเจนของ *S. griseus* KA1198

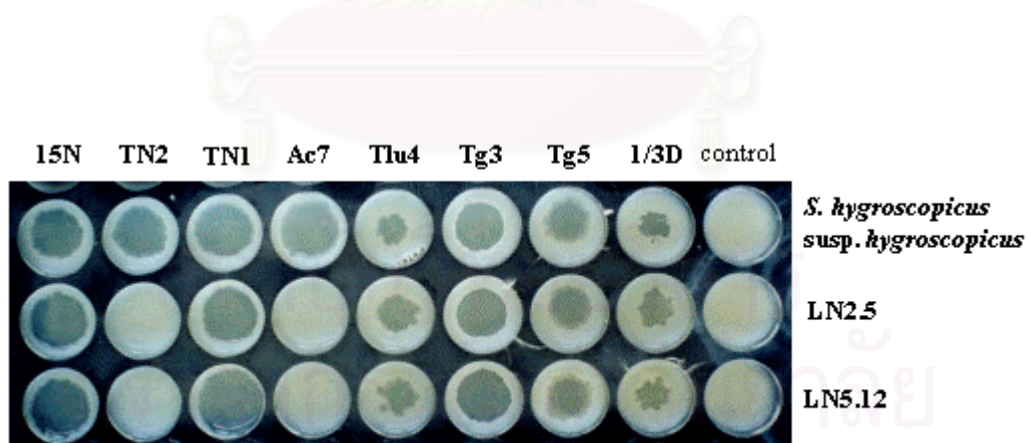


รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะการเกิดและไม่เกิดแผลของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2 เมื่อทำให้ติดเชื้อซ้ำด้วยแอกติโนฟาจเดิมและแอกติโนฟาจอื่น บนนิวตริยบร็อกการีน microtitre plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.7 การแสดงภูมิคุ้มกันของไลโซเจนที่เกิดจากแอสทีโนฟาจ TN2 ต่อแอสทีโนฟาจชนิดต่างๆ

สายพันธุ์แม่ และไลโซเจน	ภูมิคุ้มกันต่อแอสทีโนฟาจ							
	15N	TN2*	TN1	Ac7	Tlu4	Tg3	Tg5	1/3D
<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>Hygroscopicus</i> NOV-1	-	-	-	-	-	-	-	-
LN1.5	-	+	-	+	-	-	-	-
LN1.6	-	+	-	+	-	-	-	-
LN2.5	-	+	-	+	-	-	-	-
LN2.9	-	+	-	+	-	-	-	-
LN5.12	-	+	-	+	-	-	-	-
LN7.5	-	+	-	+	-	-	-	-
LN7.7	-	+	-	+	-	-	-	-
LN9.3	-	+	-	+	-	-	-	-
LN9.4	-	+	-	+	-	-	-	-
LN12.7	-	+	-	+	-	-	-	-
LN12.9	-	+	-	+	-	-	-	-
LN13.4	-	+	-	+	-	-	-	-

- : ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อแอสทีโนฟาจที่ทำให้ *S. hygroscopicus* subsp.*hygroscopicus* NOV-1 ติดเชื้อ เกิดพลาัค
- + : มีภูมิคุ้มกันต่อแอสทีโนฟาจที่ทำให้ *S. hygroscopicus* subsp.*hygroscopicus* NOV-1 ติดเชื้อ ไม่เกิดพลาัค
- * : ชนิดแอสทีโนฟาจที่ทำให้เกิดไลโซเจนของ *S. hygroscopicus* subsp.*hygroscopicus* NOV-1



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะการเกิดและไม่เกิดพลาัคของไลโซเจนที่เกิดจากแอสทีโนฟาจ TN2 เมื่อทำให้ติดเชื้อซ้ำด้วยแอสทีโนฟาจเดิมและแอสทีโนฟาจอื่น บนนิวเตรียนท์ออการ์โน microtitre plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

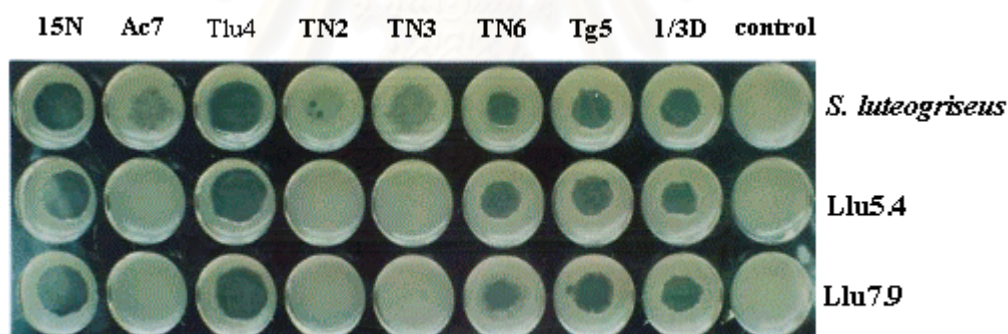
ตารางที่ 4.8 การแสดงภูมิคุ้มกันของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Ac7 ต่อแอกติโนฟาจชนิดต่างๆ

สายพันธุ์แม่ และไลโซเจน	ภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจ							
	15N	Ac7*	Tlu4	TN2	TN3	TN6	Tg5	1/3D
<i>S. luteogriseus</i> ISP 5483	-	-	-	-	-	-	-	-
Llu3.14	-	+	-	+	+	-	-	-
Llu3.15	-	+	-	+	+	-	-	-
Llu5.3	-	+	-	+	+	-	-	-
Llu5.4	-	+	-	+	+	-	-	-
Llu5.11	-	+	-	+	+	-	-	-
Llu7.7	-	+	-	+	+	-	-	-
Llu7.9	-	+	-	+	+	-	-	-

- : ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจที่ทำให้ *S. luteogriseus* ISP5483 ติดเชื้อ เพราะเกิดพลาัค

+ : มีภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจที่ทำให้ *S. luteogriseus* ISP5483 ติดเชื้อ เพราะ ไม่เกิดพลาัค

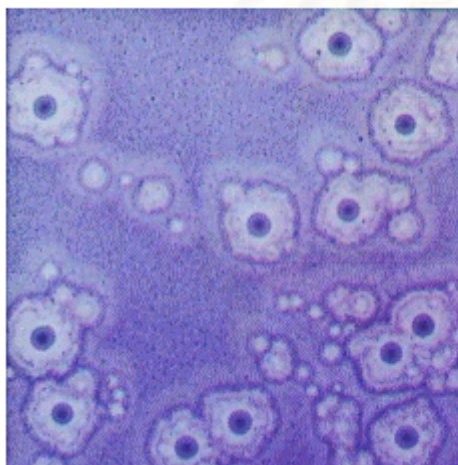
* : ชนิดแอกติโนฟาจที่ทำให้เกิดไลโซเจนของ *S. luteogriseus* ISP 5483



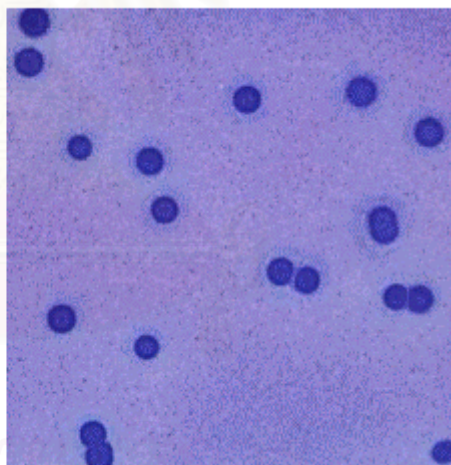
รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะการเกิดและไม่เกิดพลาัคของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Ac7 เมื่อทำให้ติดเชื้อซ้ำด้วยแอกติโนฟาจเดิม และแอกติโนฟาจอื่น บนนิวตริยีนท์อการ์ใน microtitre plate ป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

4.5 การตรวจสอบการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากไลโซเจนโดยธรรมชาติ

เมื่อนำไลโซเจนแต่ละชนิดที่เกิดจากแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมาเลี้ยงให้ได้โคโลนีเดี่ยวและเททับด้วยไฮสท์ที่เป็นสเตรปโตมัยซีทีสชนิดเดิมแล้ว พบว่าไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2 เมื่อเททับด้วย *S. griseus* KA1198 จะเกิดวงใสรอบโคโลนีของไลโซเจนและมีเชื้อเจริญอยู่ในวงใสเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ก) แต่ไม่เกิดวงใสในงานเพาะเชื้อที่เป็นชุดควบคุมดังแสดงในรูปที่ 4.9 (ข) เช่นเดียวกับไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Ac7 เมื่อเททับด้วย *S. luteogriseus* ISP 5483 จะเกิดวงใสและมีเชื้อเจริญอยู่ในวงใสรอบโคโลนีของไลโซเจนแต่ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนีเดี่ยวของ *S. luteogriseus* ISP 5483 ในงานเพาะเชื้อที่เป็นชุดควบคุมดังแสดงในรูปที่ 4.10 (ก) และ 4.10 (ข) ส่วนไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ TN2 เมื่อเททับด้วย *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 จะเกิดวงใสขนาดเล็กบริเวณโคโลนีที่เป็นไลโซเจนและไม่มีเชื้อเจริญอยู่ในวงใสเมื่อเทียบกับไลโซเจนของ *S. griseus* KA1198 และ *S. luteogriseus* ISP 5483 ดังแสดงรูปที่ 4.11 (ก) และไม่เกิดวงใสในงานเพาะเชื้อที่เป็นชุดควบคุมเช่นกันดังแสดงในรูปที่ 4.11 (ข)

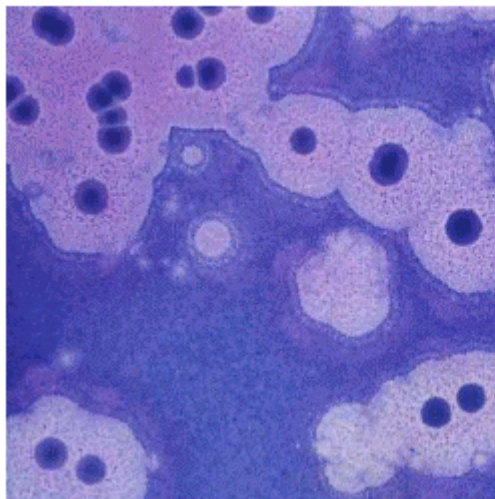


(ก)

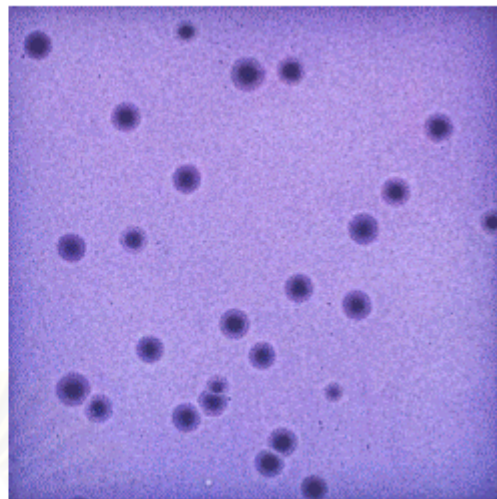


(ข)

รูปที่ 4.9 (ก) วงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีไลโซเจน Lg9.9 เมื่อเททับโคโลนีไลโซเจนด้วย *S. griseus* KA1198 (ข) ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใสเมื่อเททับโคโลนีของ *S. griseus* KA1198 ด้วย *S. griseus* KA1198 ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ต 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

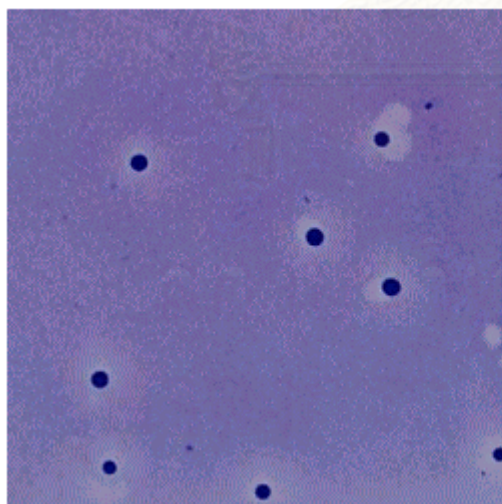


(ก)

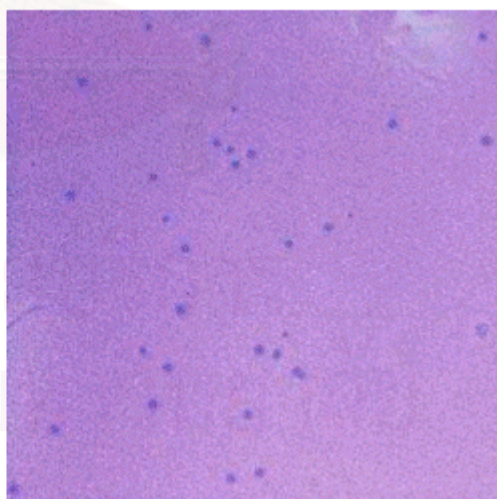


(ข)

รูปที่ 4.10 (ก) วงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีไลโซเจน Llu5.4 เมื่อเททับโคโลนีไลโซเจนด้วย *S. luteogriseus* ISP 5483 (ข) ชุดควบคุม ไม่เกิดวงใสเมื่อเททับโคโลนีของ *S. luteogriseus* ISP 5483 ด้วย *S. luteogriseus* ISP 5483 ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ต 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.11 (ก) วงใสที่เกิดขึ้นบริเวณโคโลนีไลโซเจน LN5.12 เมื่อเททับโคโลนีไลโซเจนด้วย *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 (ข) ชุดควบคุมไม่เกิดวงใสเมื่อเททับ โคโลนีของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 ด้วย *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 ย้อมด้วยคริสตัลไวโอเล็ต 3 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

4.6 การปลดปล่อยอนุภาคฟาจจากไลโซเจนโดยธรรมชาติในภาวะต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงสปอร์ของไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นประมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในภาวะต่างๆคือ เลี้ยงในนอร์มอลซาลีนเปรียบเทียบกับเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกเป็นเวลา 6 และ 18 ชั่วโมง และในภาวะที่มีแสงไฟความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เปรียบเทียบกับภาวะที่มืด ผลการทดลองที่ได้พบว่าไลโซเจนจากแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้ 10^2 - 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตรที่เวลา 6 ชั่วโมงและ 10^5 - 10^6 PFU ต่อมิลลิลิตรที่เวลา 18 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอก ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงสปอร์ในนอร์มอลซาลีนที่มีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้น้อยกว่า 10^2 PFU ต่อมิลลิลิตรที่เวลา 6 ชั่วโมงและ 10^2 - 10^3 PFU ต่อมิลลิลิตรที่เวลา 18 ชั่วโมง แต่การเลี้ยงสปอร์ในภาวะที่มีแสงไฟเปรียบเทียบกับภาวะที่มืด พบว่าการปลดปล่อยอนุภาคฟาจจากไลโซเจนไม่แตกต่างกัน คือ เมื่อเลี้ยงในนอร์มอลซาลีนที่เวลา 6 และ 18 ชั่วโมงมีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาน้อยกว่า 10^2 PFU ต่อมิลลิลิตร และ 10^2 - 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เช่นเดียวกับการเลี้ยงสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกในภาวะที่มีแสงไฟและที่มืดให้ผลไม่แตกต่างกัน คือที่เวลา 6 ชั่วโมงมีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้ 10^2 - 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตรและที่เวลา 18 ชั่วโมงปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้ 10^3 - 10^6 PFU ต่อมิลลิลิตรดังแสดงในตารางที่ 4.9

และเมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อยอนุภาคฟาจโดยธรรมชาติของไลโซเจนทั้ง 3 ชนิด พบว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2 มีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้มากที่สุดคือประมาณ 10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร ไลโซเจนจากแอกติโนฟาจ Ac7 ปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้ประมาณ 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตร และไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ TN2 มีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้ต่ำสุด คือ ประมาณ 10^3 PFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนการเลี้ยงในนอร์มอลซาลีนมีการปลดปล่อยอนุภาคแอกติโนฟาจของไลโซเจนทั้ง 3 ชนิดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก คือ ประมาณ 10^2 - 10^3 PFU ต่อมิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

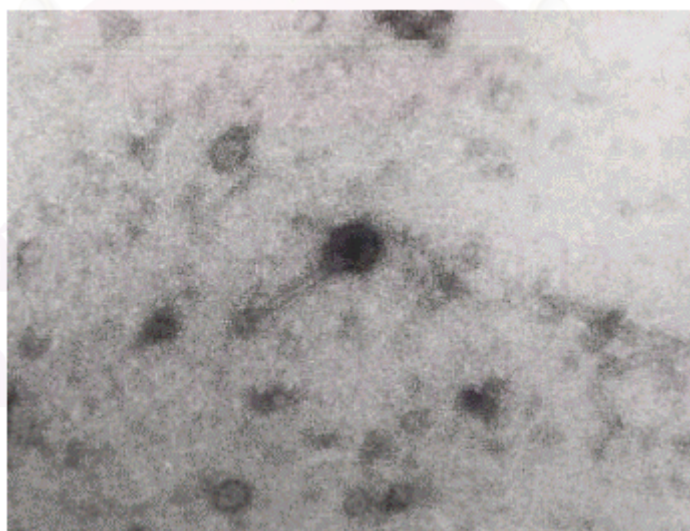
ตารางที่ 4.9 การปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากไลโซเจนโดยธรรมชาติที่ภาวะต่างๆ

ไลโซเจน	ปริมาณอนุภาคฟาจ (PFU ต่อมิลลิลิตร) ที่ปลดปล่อยเมื่ออยู่ในภาวะ							
	สารละลายนอร์มอลซาลีน				นิวเตรียนท์บรอกท			
	ที่มีมืด		ที่มีแสง		ที่มีมืด		ที่มีแสง	
	6 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง
Lg9.9	$<10^2$	10^3	$<10^2$	10^3	10^5	10^6	10^5	10^6
Llu5.4	$<10^2$	10^3	$<10^2$	10^3	10^3	10^5	10^3	10^5
LN5.12	$<10^2$	10^2	$<10^2$	10^2	10^2	10^3	10^2	10^3

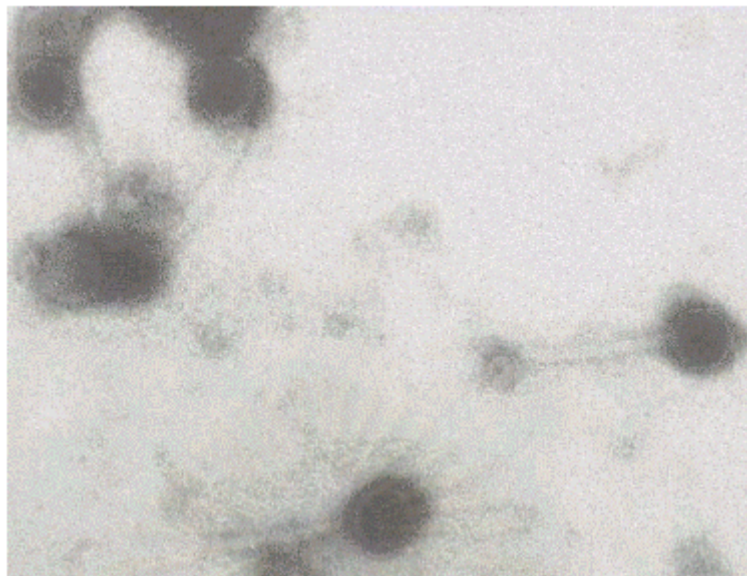
4.7 การศึกษารูปร่างแอกติโนฟาจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เมื่อข้อมนุภาคแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิด คือ Tg2 TN2 และ Ac7 ด้วยยูรานิลอะซิเตต 2 เปอร์เซ็นต์และตรวจสอบรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมีรูปร่างคล้ายกันคือ มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีส่วนหางยาวไม่สามารถหดได้และไม่มีแผ่นฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.12-4.14 แต่แอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันที่ขนาดของส่วนหัวและส่วนหางดังแสดงในตารางที่ 4.10 เมื่อจำแนกแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดโดยการจำแนกแบคทีเรียโอฟาจตามวิธีของ Bradley (1967) พบว่าแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดอยู่ในกลุ่ม B ตารางที่ 4.10 ขนาดของแอกติโนฟาจ

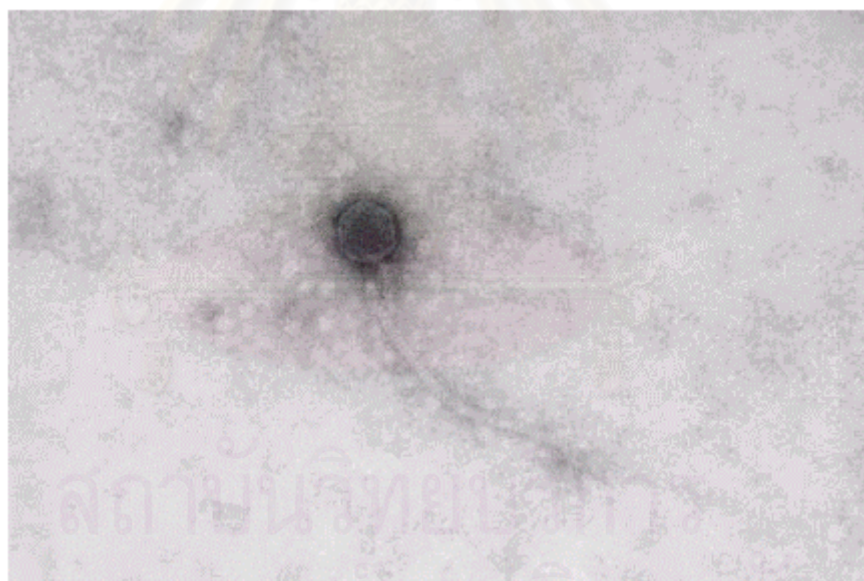
แอกติโนฟาจ	ขนาดของฟาจกว้าง x ยาว (นาโนเมตร)	
	ส่วนหัว	ส่วนหาง
Tg2	50.0 x 63.6	9.1 x 163.6
Ac7*	53.3 x 60.0	13.3 x 133.3
TN2	40.2 x 53.6	6.7 x 268.0



รูปที่ 4.12 รูปร่างของแอกติโนฟาจ Tg2 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 109,500 เท่า (— = 100 นาโนเมตร)



รูปที่ 4.13 รูปร่างของแอดดีโนฟาจ Ac7* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)



รูปที่ 4.14 รูปร่างของแอดดีโนฟาจ TN2 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน กำลังขยาย 150,000 เท่า (————— = 100 นาโนเมตร)

* : ข้อมูลของแอดดีโนฟาจ Ac7 จาก เจนจีรา (2543)

4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างแอสโคติโนฟาจที่แยกได้กับสเตรปโตมัยซิทีสอื่น

จากการทดสอบการติดเชื้อของสเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิงจำนวน 37 สายพันธุ์ และ *Kitasatospora griseola* JCM 3339 กับแอสโคติโนฟาจ Tg2, TN2 และ Ac7 พบว่าแอสโคติโนฟาจ Tg2, TN2 และ Ac7 สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสเกิดการติดเชื้อได้ 13 11 และ 15 สายพันธุ์ตามลำดับรวมสายพันธุ์ที่ใช้แยกแอสโคติโนฟาจด้วย แต่ไม่มีแอสโคติโนฟาจชนิดใดที่สามารถทำให้ *Kitasatospora griseola* JCM 3339 เกิดการติดเชื้อได้ พลาสติกที่เกิดจากแอสโคติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมีทั้งลักษณะใสและขุ่นดังแสดงในตารางที่ 4.11

แอสโคติโนฟาจ AC7 สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิงอื่นเกิดการติดเชื้อได้มากที่สุดคือ 14 สายพันธุ์ โดยให้พลาสติกที่มีลักษณะใสกับสเตรปโตมัยซิทีส 7 สายพันธุ์ คือ *S. aminophilus* ATCC 14961, *S. pervullus* F4b-31, *S. cyaneus* KCC S-0220, *S. humifer* KCC S-0770, *S. echinatus* KCC S-0144, *S. coralus* JCM 4313 และ *S. nodosus* JCM 4297 และให้พลาสติกที่มีลักษณะขุ่นกับสเตรปโตมัยซิทีสอีก 7 สายพันธุ์ คือ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* NOV-1, *S. endus* KCC S-0213, *S. coelicolor* KCC S-0357, *S. ambofaciens* KCC S-0204, *S. niveus* KCC S-0251, *S. luteofluorescens* KCC S-0203 และ *S. lincolnensis* JCM 4287

แอสโคติโนฟาจ Tg2 สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิงอื่นเกิดการติดเชื้อได้ 12 สายพันธุ์ โดยให้พลาสติกที่มีลักษณะใสกับสเตรปโตมัยซิทีส 7 สายพันธุ์ คือ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* NOV-1, *S. albovinaceus* ATCC 15823, *S. humifer* KCC S-0770, *S. echinatus* KCC S-0144, *S. luteofluorescens* KCC S-0203, *S. badius* JCM 4350 และ *S. nodosus* JCM 4297 และให้พลาสติกที่มีลักษณะขุ่นกับสเตรปโตมัยซิทีส 5 สายพันธุ์ คือ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* JCM 4772, *S. ambofaciens* KCC S-0204, *S. niveus* KCC S-0251, *S. lincolnensis* JCM 4287 และ *Streptomyces* sp. PO

ส่วนแอสโคติโนฟาจ TN2 สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสสายพันธุ์อ้างอิงอื่นเกิดการติดเชื้อได้ 10 สายพันธุ์ โดยให้พลาสติกที่มีลักษณะใสกับสเตรปโตมัยซิทีสเพียง 2 สายพันธุ์ คือ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* JCM 4772 และ *S. nodosus* JCM 4297 แต่ให้พลาสติกที่มีลักษณะขุ่นกับ สเตรปโตมัยซิทีสได้ถึง 8 สายพันธุ์ คือ *S. luteogriseus* ISP 5483, *S. albovinaceus* ATCC 15823, *S. coelicolor* KCC S-0357, *S. ambofaciens* KCC S-0204, *S. niveus* KCC S-0251, *S. luteofluorescens* KCC S-0203 และ *S. lincolnensis* JCM 4287

ตารางที่ 4.11 การติดเชื้อของสเตรปโตมัยซีที่ส้างอิงจากแอกติโนฟาจ Tg2 TN2 และ Ac7

สายพันธุ์สเตรปโตมัยซี	แอกติโนฟาจ		
	Tg2 ^a	TN2 ^b	Ac7 ^c
<i>Streptomyces</i> sp. PO	T	—	—
<i>S. alboniger</i> ATCC 12461	—	—	—
<i>S. albovinaceus</i> ATCC 15823	C	T	—
<i>S. albus</i> KCC S-0166	—	—	—
<i>S. ambofaciens</i> KCC S-0204	T	T	T
<i>S. aminophilus</i> ATCC 14961	—	T	C
<i>S. aureus</i> KCC S-0009	—	—	—
<i>S. azureus</i> PK 100C	—	—	—
<i>S. badius</i> JCM 4350	C	—	—
<i>S. bikiniensis</i> JCM 4011	—	—	—
<i>S. coelicolor</i> KCC S-0357	—	T	T
<i>S. coelicolor</i> M 145	—	—	—
<i>S. coeruleofuscus</i> KCC S-0358	—	—	—
<i>S. coralus</i> JCM 4313	—	—	C
<i>S. cyaneus</i> KCC S-0220	—	—	C
<i>S. echinatus</i> KCC S-0144	C	—	C
<i>S. endus</i> KCC S-0213	—	—	T
<i>S. griseus</i> KA 1198 ^a	T	—	—
<i>S. humifer</i> KCC S-0770	C	—	C
<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> JCM 4772	T	C	—
<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1 ^b	C	T	T
<i>S. lavendulae</i> subsp. <i>grosserius</i> KCC S-0056	—	—	—
<i>S. lavendulae</i> subsp. <i>lavendulae</i> KCC S-0055	—	—	—
<i>S. lincolnensis</i> JCM 4287	T	T	T
<i>S. lividans</i> TK 24	—	—	—
<i>S. luteofluorescens</i> KCC S-0203	C	T	T
<i>S. luteogriseus</i> ISP 5483 ^c	—	T	T
<i>S. melanosporofaciens</i> JCM 4495	—	—	—
<i>S. niveus</i> KCC S-0251	T	T	T
<i>S. nodosus</i> JCM 4297	C	C	C
<i>S. perciperlis</i> V6C-6	—	—	—
<i>S. pervullus</i> F4b-31	—	—	C
<i>S. puniceus</i> KCC S-0406	—	—	—
<i>S. sparsogenes</i> KCC S-0517	—	—	—
<i>S. tauricus</i> JCM 4837	—	—	—
<i>S. thermovulgaris</i> JCM 4520	—	—	—
<i>S. viridochromogenes</i> KCC S-0435	—	—	—
<i>Kitasatoapora griseola</i> JCM 3339	—	—	—

a, b, c คือชนิดของฟาจที่แยกมาจากชนิดของสเตรปโตมัยซีที่เป็นโฮสต์

— : ไม่พบการติดเชื้อ

T : พื้คมีลักษณะขุ่น

C : พื้คมีลักษณะใส

4.9 การชักนำไลโซเจนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

4.9.1 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์สเตรปโตมัยซิสที่เมื่อถูกชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เมื่อนำสปอร์ของ *S. griseus* KA1198, *S. luteogriseus* ISP 5483 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 ประมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที จากนั้นนำสปอร์ไปบ่มในที่มืดและที่มีแสงไฟเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดลดลงเมื่อระยะเวลาของการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเพิ่มขึ้นทั้งในการบ่มสปอร์ในที่มืดและที่มีแสง แต่จำนวนสปอร์ที่บ่มในที่มืดมีจำนวนลดลงน้อยกว่าการบ่มสปอร์ในที่มืดดังแสดงในตารางที่ 4.12

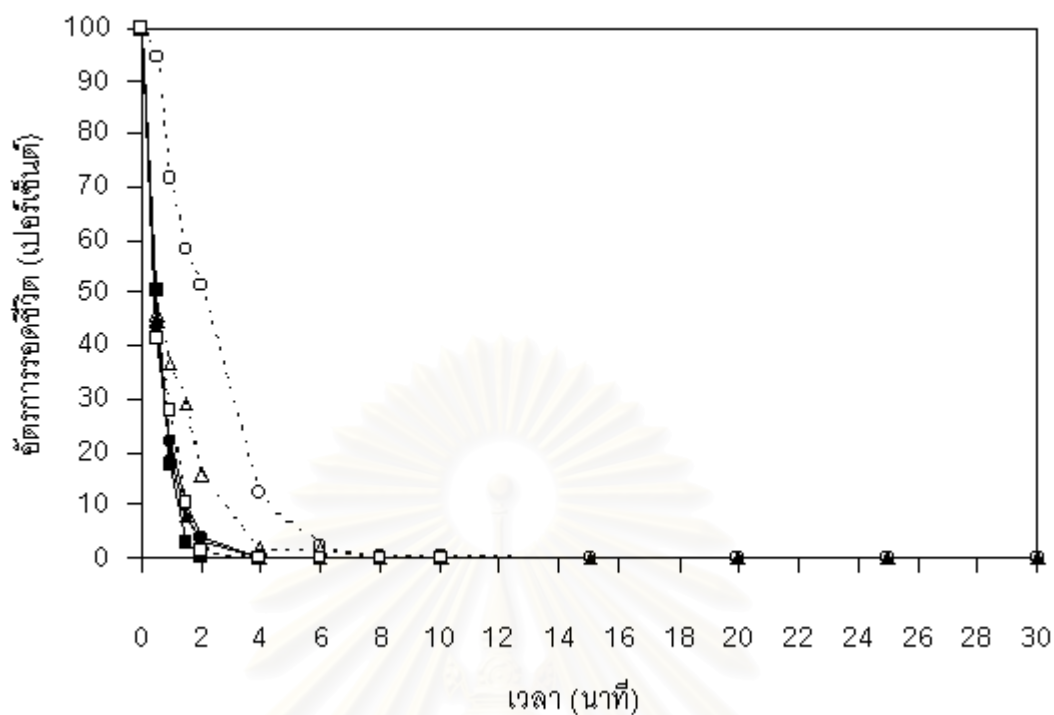
เมื่อให้จำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดที่ไม่ได้ฉายรังสีมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถหาอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่เวลาต่างๆได้ โดยอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ของ *S. griseus* KA1198 และ *S. luteogriseus* ISP 5483 ลดลงต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์เมื่อถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตนานเกินกว่า 2 นาทีเมื่อบ่มในที่มืดและนานกว่า 6 นาทีเมื่อบ่มในที่มืดและมีแสง สำหรับสปอร์ของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่บ่มในที่มืดและที่มีแสงลดลงแตกต่างกันไม่มาก โดยสปอร์ที่บ่มในที่มืดมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์เมื่อถูกฉายแสงนานเกินกว่า 1.5 นาทีและนานเกินกว่า 2 นาทีเมื่อบ่มในที่มืดและมีแสง ดังแสดงในรูปที่ 4.15

เนื่องจากสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเมื่อฉายแสงเป็นระยะเวลา นานกว่า 10 นาที จึงทำการชักนำไลโซเจนโดยใช้ระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 0-10 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 จำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีสเมื่อถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลาฉายแสง อัลตราไวโอเล็ต (นาที)	จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร					
	<i>S. griseus</i> KA1198		<i>S. luteogriseus</i> ISP 5483		<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1	
	บ่มที่มืด	บ่มมีแสง	บ่มที่มืด	บ่มมีแสง	บ่มที่มืด	บ่มมีแสง
0	1.5×10^6	1.6×10^6	3.67×10^6	4.1×10^6	1.09×10^7	1.10×10^7
0.5	6.3×10^5	1.51×10^6	1.64×10^6	1.89×10^6	5.52×10^6	4.5×10^6
1	3.3×10^5	1.15×10^6	7.1×10^5	1.5×10^6	1.91×10^6	3.03×10^6
1.5	1.49×10^5	9.3×10^5	2.95×10^5	1.2×10^6	3.05×10^5	1.17×10^6
2	5.8×10^4	8.24×10^5	9.72×10^4	6.34×10^5	9.8×10^3	1.55×10^5
4	1.25×10^2	1.98×10^5	1.25×10^3	7.4×10^4	90	8.43×10^2
6	24	3.52×10^4	1.22×10^2	7.0×10^4	8	73
8	15	9.2×10^3	54	8.4×10^3	4	48
10	14	4.18×10^3	27	1.5×10^3	2	19
15	0	95	0	89	0	0
20	0	43	0	36	0	0
25	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0



รูปที่ 4.15 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีสเมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

- *S. griseus* KA1198 บ่มที่มีแสง
- *S. griseus* KA1198 บ่มที่มีมืด
- *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 บ่มที่มีแสง
- *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 บ่มที่มีมืด
- △— *S. luteogriseus* ISP 5483 บ่มที่มีแสง
- ▲— *S. luteogriseus* ISP 5483 บ่มที่มีมืด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.9.2 การปลดปล่อยอนุภาคแอกติโนฟาจออกจากไลโซเจนเมื่อถูกชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

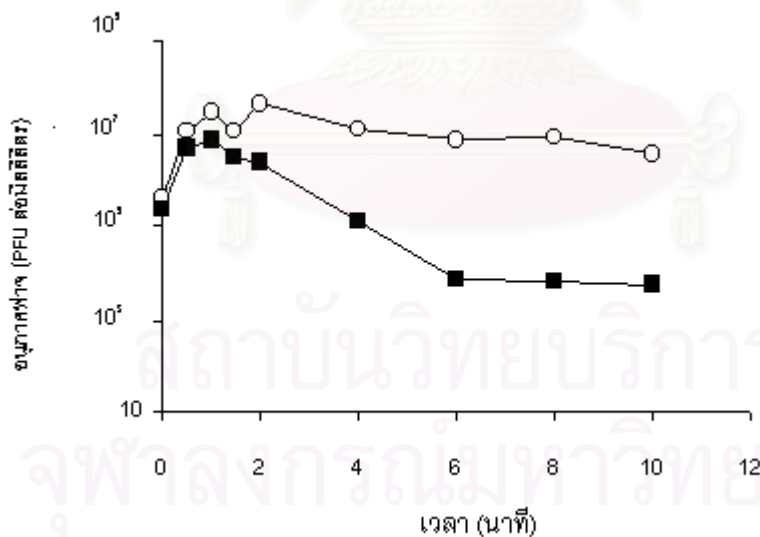
เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆบนสปอร์ของไลโซเจนของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดแล้วนำไปบ่มในที่มืดและที่มีแสง พบว่าไลโซเจนของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดมีการปลดปล่อยอนุภาคแอกติโนฟาจออกมาได้แตกต่างกัน โดยไลโซเจน Lg9.9 ของ *S. griseus* KA1198 เมื่อบ่มในที่มืดมีการปลดปล่อยอนุภาคแอกติโนฟาจได้ 2.31×10^5 PFU ต่อมิลลิลิตร โดยไม่ได้มีการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต การปลดปล่อยอนุภาคฟาจเพิ่มขึ้นเป็น 10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 30 วินาทีจนถึง 2 นาที หลังจากนั้นการปลดปล่อยอนุภาคฟาจลดลงเรื่อยๆจนเหลือ 10^3 PFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อฉายแสงเป็นเวลา 6 ถึง 10 นาที Lg9.9 ที่บ่มในที่มืดมีการปลดปล่อยอนุภาคแอกติโนฟาจโดยไม่ได้ถูกชักนำได้ 3.52×10^5 PFU ต่อมิลลิลิตร การปลดปล่อยอนุภาคฟาจเพิ่มขึ้นเป็น 10^7 PFU ต่อมิลลิลิตรเมื่อถูกฉายแสงเป็นเวลา 30 วินาทีจนถึง 4 นาที และการปลดปล่อยอนุภาคฟาจลดลงเหลือประมาณ 10^6 PFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 6 ถึง 10 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.13 และ รูปที่ 4.16

ในขณะที่ไลโซเจน Liu 5.4 ของ *S. luteogriseus* ISP 5483 เมื่อถูกฉายแสงการปลดปล่อยอนุภาคฟาจจะน้อยกว่า Liu 5.4 ที่ไม่ได้ถูกชักนำ และน้อยลงตามระยะเวลาในการฉายแสงที่นานขึ้นเมื่อบ่มไลโซเจนดังกล่าวในที่มืด ส่วนสปอร์ที่บ่มในที่มืดไฟจำนวนอนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกมาจาก Liu5.4 ที่ถูกฉายแสงเป็นเวลา 0.5 และ 1 นาทีมีมากกว่าการปลดปล่อยจาก Liu5.4 ที่ไม่ได้ถูกชักนำเล็กน้อย และอนุภาคฟาจจะลดลงเมื่อ Liu5.4 ถูกชักนำนานเกินกว่า 1 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.14 และ รูปที่ 4.17

ส่วนไลโซเจน LN5.12 ของ *S. hygroscopicus* supsp. *hygroscopicus* NOV-1 เมื่อถูกฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 0.5–1.5 นาที จะปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้มากกว่า LN5.12 ที่ไม่ได้ถูกชักนำ แต่ถ้าชักนำ LN5.12 นานเกินกว่า 2 นาทีอนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกมามีน้อยมากเมื่อบ่มสปอร์ดังกล่าวในที่มืด ส่วนสปอร์ของ LN5.12 ที่บ่มในที่มืดไฟการปลดปล่อยอนุภาคฟาจจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ชักนำ LN5.12 แต่เมื่อฉายแสงนานเกินกว่า 8 นาทีอนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกมาจะลดลงจนใกล้เคียงกับอนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจาก LN5.12 ที่ไม่ได้ชักนำ ดังแสดงในตารางที่ 4.15 และ รูปที่ 4.18

ตารางที่ 4.13 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน Lg9.9 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลา ที่ฉายแสง (นาที)	อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน Lg9.9 (PFU ต่อ มิลลิลิตร)	
	บ่มไลโซเจนในที่มืด	บ่มไลโซเจนในที่ที่มีแสง
0	2.31×10^5	3.92×10^5
0.5	4.7×10^6	1.08×10^7
1.0	7.0×10^6	2.8×10^7
1.5	3.0×10^6	1.1×10^7
2	2.4×10^6	4.2×10^7
4	1.3×10^5	1.18×10^7
6	7.0×10^3	7.5×10^6
8	6.1×10^3	8.7×10^6
10	5.4×10^3	3.6×10^6

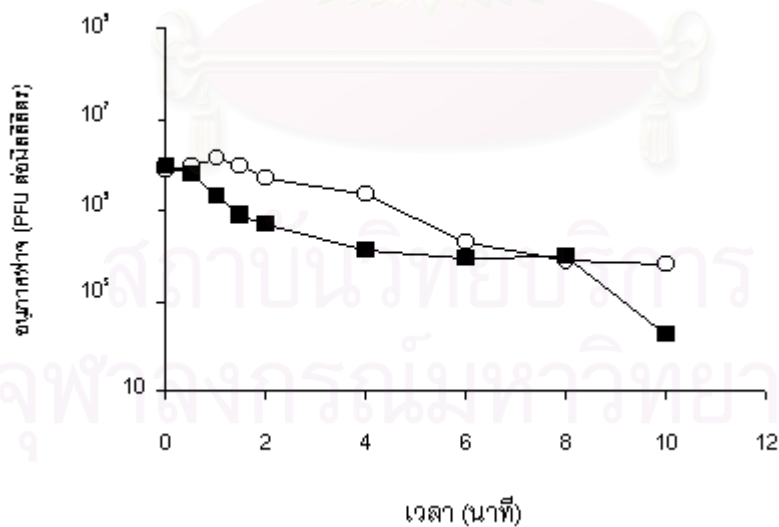


รูปที่ 4.16 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจน Lg9.9 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

- บ่มเชื้อในที่ที่มีแสง
- บ่มเชื้อในที่ที่มืด

ตารางที่ 4.14 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน Liu5.4 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลา ที่ฉายแสง (นาทีก)	อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน Liu5.4 (PFU ต่อมิลลิลิตร)	
	บ่มไลโซเจนในที่มืด	บ่มไลโซเจนในที่แสง
0	9.0×10^5	7.9×10^5
0.5	6.0×10^5	9.0×10^5
1.0	1.9×10^5	1.4×10^6
1.5	8.0×10^4	9.2×10^5
2	5.3×10^4	4.9×10^5
4	1.2×10^4	2.3×10^5
6	8.7×10^3	1.8×10^4
8	9.1×10^3	7.1×10^3
10	1.7×10^2	6.0×10^3

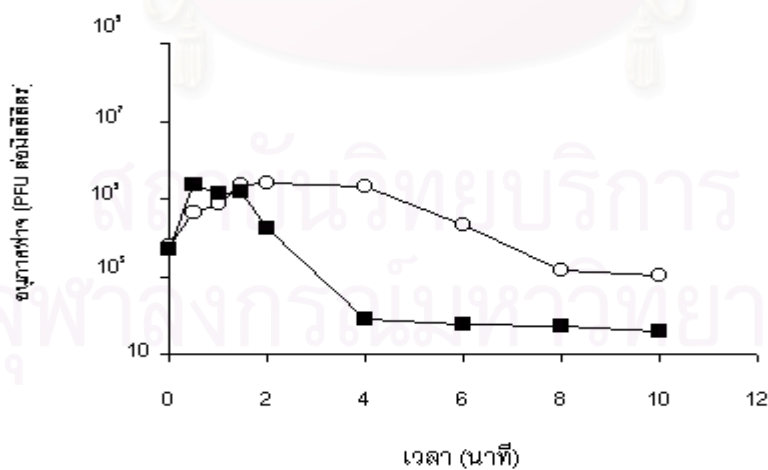


รูปที่ 4.17 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจน Liu5.4 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

- บ่มเชื้อในที่แสง
- บ่มเชื้อในที่มืด

ตารางที่ 4.15 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน LN5.12 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

ระยะเวลา ที่ฉายแสง (นาที)	อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน LN5.12 (PFU ต่อมิลลิลิตร)	
	บ่มไลโซเจนในที่มืด	บ่มไลโซเจนในที่ที่มีแสง
0	4.7×10^3	6.8×10^3
0.5	2.36×10^5	4.3×10^4
1.0	1.3×10^5	7.5×10^4
1.5	1.5×10^5	2.3×10^5
2	1.6×10^4	2.5×10^5
4	80	2.03×10^5
6	50	2.2×10^4
8	30	1.5×10^3
10	24	1.1×10^3



รูปที่ 4.18 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจน LN5.12 เมื่อชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่เวลาต่างๆ

- บ่มเชื้อในที่ที่มีแสง
- บ่มเชื้อในที่ที่มืด

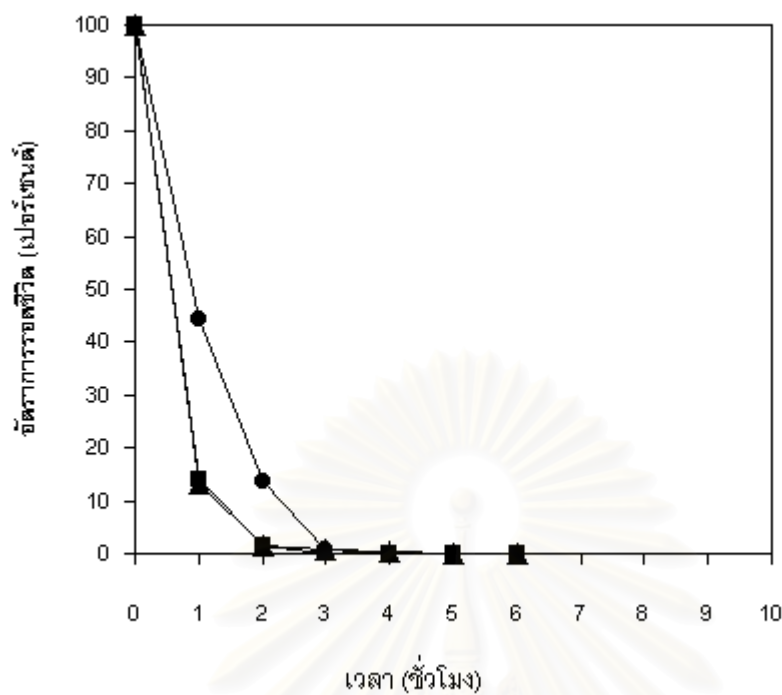
4.10 การชักนำไลโซเจนด้วยไมโตมัยซิน ซี

4.10.1 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ของสเตรปโตมัยซิสที่สเมื่อบ่มในไมโตมัยซิน ซี

เมื่อบ่มสปอร์ของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดจำนวน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอก ที่ผสมไมโตมัยซิน ซี ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดลดลงเมื่อเวลาในการบ่ม สปอร์กับไมโตมัยซิน ซี เพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4.16 และเมื่อให้จำนวนสปอร์ที่ไม่ได้บ่มกับไมโตมัยซิน ซี มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถหาอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่เวลาต่างๆได้ดังแสดงในรูปที่ 4.19 โดยสปอร์ของ *S. griseus* KA1198 *S. luteogriseus* ISP 5483 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลานานกว่า 3 ชั่วโมง ดังนั้นจึงทำการชักนำไลโซเจนโดยใช้เวลาการบ่ม 0-3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของไมโตมัยซิน ซี เป็น 0, 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.16 จำนวนสปอร์ของสเตรปโตมัยซิสที่สเมื่อบ่มในไมโตมัยซิน ซี ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

เวลาที่บ่มสปอร์ ใน ไมโตมัยซิน ซี (ชั่วโมง)	จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร		
	<i>S. griseus</i> KA1198	<i>S. luteogriseus</i> ISP 5483	<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1
0	5.2×10^6	4.2×10^6	3.0×10^6
1	2.3×10^6	6.6×10^5	4.2×10^5
2	7.0×10^5	2.3×10^5	5.1×10^4
3	3.2×10^4	5.0×10^4	2.8×10^3
4	4.3×10^2	3.7×10^2	7.1×10^2
5	1.8×10^2	1.6×10^2	2.5×10^2
6	69	82	107



รูปที่ 4.19 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีส เมื่อบ่มในไมโตมัยซิน ที่ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

--●-- *S. griseus* KA1198

--▲-- *S. luteogriseus* ISP 5483

--■-- *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.10.2 การปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากไลโซเจนเมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี

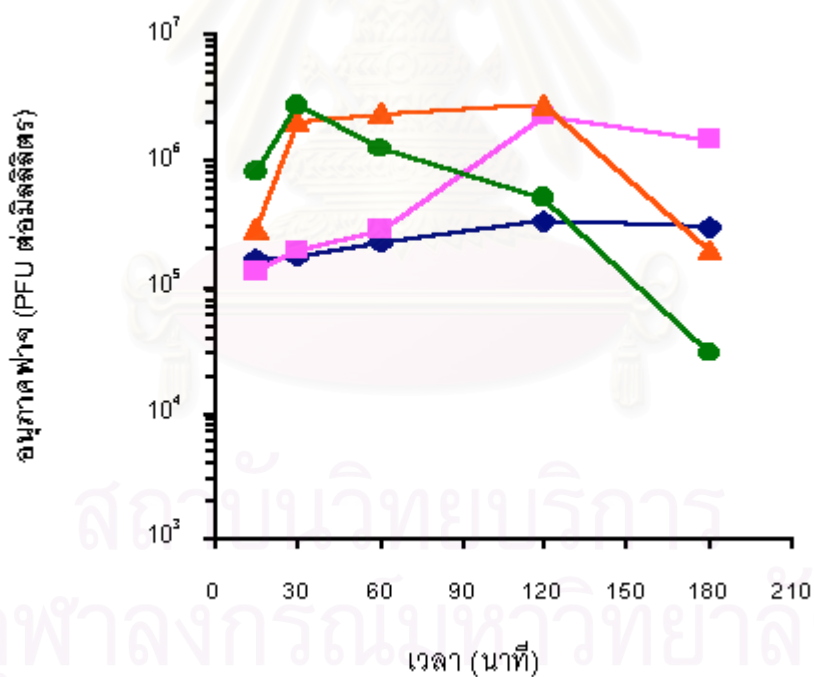
ไลโซเจน Lg9.9 ของ *S. griseus* KA1198 สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจโดยไม่ต้องถูกชักนำได้ประมาณ 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกชักนำด้วยความเข้มข้นของไมโตมัซิน ซี เป็น 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า Lg9.9 สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อบ่ม Lg9.9 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของไมโตมัซิน ซี เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีการปลดปล่อยฟาจต่ำกว่าการปลดปล่อยฟาจจาก Lg9.9 ที่ไม่ได้ชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.20

เช่นเดียวกับไลโซเจน Liu5.4 ของ *S. luteogriseus* ISP 5483 ที่สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจโดยไม่ต้องถูกชักนำได้ประมาณ 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นของไมโตมัซิน ซี 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Liu5.4 จะปลดปล่อยฟาจได้ต่ำกว่า Liu5.4 ที่ไม่ได้ถูกชักนำ ดังแสดงในตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.21

ส่วนไลโซเจน LN 5.12 ของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 มีการปลดปล่อยอนุภาคฟาจโดยไม่มีถูกการชักนำได้ต่ำ คือ ประมาณ 10^3 PFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การปลดปล่อยอนุภาคฟาจจาก LN 5.12 เพิ่มขึ้นเป็น 10^4 PFU ต่อมิลลิลิตร และเพิ่มมากขึ้นเป็น 10^5 PFU ต่อมิลลิลิตรเมื่อบ่มด้วยไมโตมัซิน ซี ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 30-180 นาที และบ่มที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 15-60 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และ รูปที่ 4.22

ตารางที่ 4.17 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจิน Lg9.9 ของ *S. griseus* KA1198 เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ระยะเวลาที่ชักนำ (นาที)	อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจิน Lg9.9 เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ (PFU ต่อมิลลิลิตร)			
	0 ($\mu\text{g/ml}$)	1 ($\mu\text{g/ml}$)	5 ($\mu\text{g/ml}$)	10 ($\mu\text{g/ml}$)
15	1.65×10^5	1.37×10^5	2.77×10^5	8.3×10^5
30	1.73×10^5	1.92×10^5	2.0×10^6	2.78×10^6
60	2.23×10^5	2.79×10^5	2.4×10^6	1.23×10^6
120	3.37×10^5	2.21×10^6	2.8×10^6	5.1×10^5
180	3.02×10^5	1.45×10^6	1.96×10^5	2.94×10^4

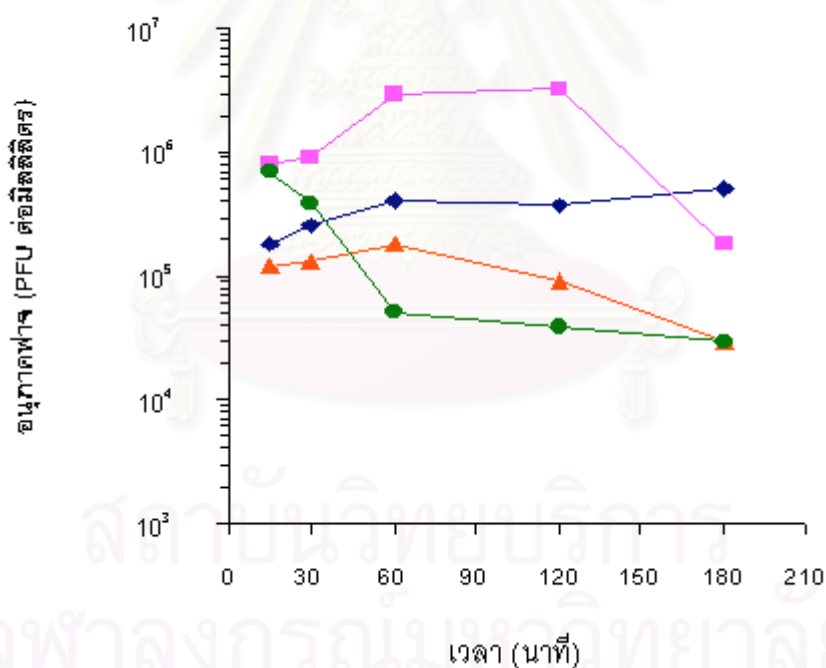


รูปที่ 4.20 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจิน Lg9.9 เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- ◆-- ไมโตมัยซิน ซี 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ไมโตมัยซิน ซี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ▲-- ไมโตมัยซิน ซี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ไมโตมัยซิน ซี 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.18 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจิน Llu5.4 ของ *S. luteogriseus* ISP 5483 เมื่อถูกชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ระยะเวลา ที่ชักนำ (นาที)	อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจิน Llu5.4 เมื่อถูกชักนำ ด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ (PFU ต่อมิลลิลิตร)			
	0 ($\mu\text{g/ml}$)	1 ($\mu\text{g/ml}$)	5 ($\mu\text{g/ml}$)	10 ($\mu\text{g/ml}$)
15	1.8×10^5	8.0×10^5	1.2×10^5	7.0×10^5
30	2.6×10^5	9.0×10^5	1.3×10^5	3.8×10^5
60	4.1×10^5	2.9×10^6	1.8×10^5	5.0×10^4
120	3.7×10^5	3.2×10^6	9.0×10^4	3.8×10^4
180	5.1×10^5	1.8×10^5	3.0×10^4	3.0×10^4

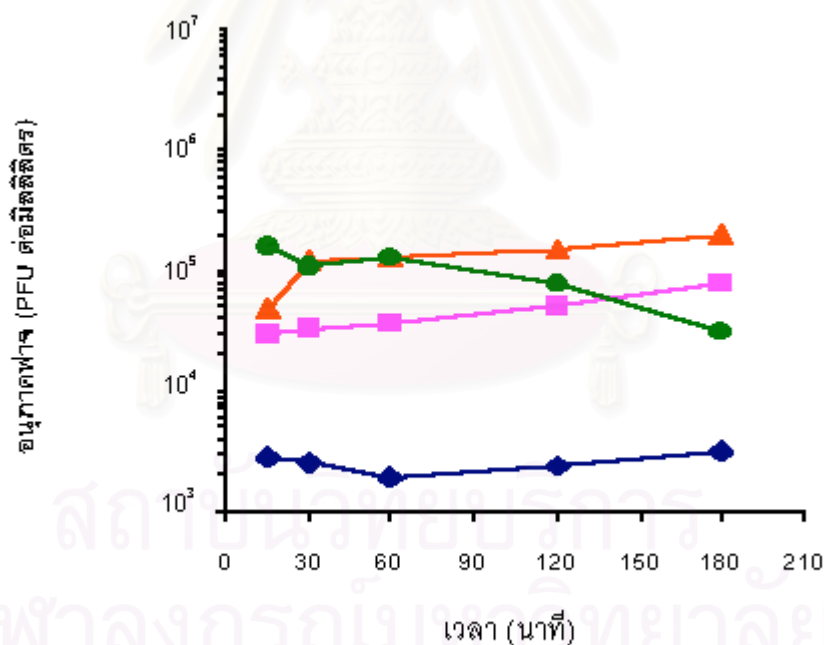


รูปที่ 4.21 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจิน Llu5.4 เมื่อชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- ◆-- ไมโตมัยซิน ซี 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ไมโตมัยซิน ซี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ▲-- ไมโตมัยซิน ซี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ไมโตมัยซิน ซี 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.19 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน LN5.12 ของ *S. hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* NOV-1 เมื่อถูกชักนำด้วย ไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ระยะเวลา ที่ชักนำ (นาที)	อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจน LN5.12 เมื่อถูกชักนำ ด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ (PFU ต่อมิลลิลิตร)			
	0 ($\mu\text{g/ml}$)	1 ($\mu\text{g/ml}$)	5 ($\mu\text{g/ml}$)	10 ($\mu\text{g/ml}$)
15	2.8×10^3	2.9×10^4	4.8×10^4	1.6×10^5
30	2.5×10^3	3.2×10^4	1.2×10^5	1.1×10^5
60	1.9×10^3	3.6×10^4	1.3×10^5	1.3×10^5
120	2.4×10^3	5.0×10^4	1.5×10^5	8.0×10^4
180	3.2×10^3	8.0×10^4	2.0×10^5	3.1×10^4



รูปที่ 4.22 อนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจน LN 5.12 เมื่อชักนำด้วยไมโตมัยซิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- ◆-- ไมโตมัยซิน ซี 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ไมโตมัยซิน ซี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ▲-- ไมโตมัยซิน ซี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ไมโตมัยซิน ซี 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเลือกเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยเลือกเก็บตัวอย่างดินที่ค่อนข้างมีความอุดมสมบูรณ์สูง คือ มีลักษณะร่วนซุย สีค่อนข้างเข้มจนออกดำ และมีค่าความเป็นกรดต่ำ อยู่ในช่วง 6.0-8.0 ซึ่งเกณฑ์ในการเลือกตัวอย่างนี้ได้ใช้ข้อมูลจาก เจนจิรา (2543) ซึ่งจากตัวอย่างดินทั้งหมด 17 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่างที่สามารถแยกแอคติโนฟาจได้ โดยแยกได้ทั้งหมด 15 ชนิด โดยมีสเตรปโตมัซีสสายพันธุ์อ้างอิง คือ *Streptomyces griseus* KA1198, *S. luteogriseus* ISP 5483 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 เป็นโฮสต์ในการแยกแอคติโนฟาจในงานวิจัยนี้ใช้วิธีส่งเสริมการเจริญซึ่งมีรายงานการวิจัยของแอคติโนฟาจหลายชนิดที่ใช้วิธีการนี้ในการแยก เช่น ฟาจ SH10 (Klaus *et al.*, 1981) SAt1 (Ogata *et al.*, 1985) TG1 (Foor *et al.*, 1985) เป็นต้น เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก และสามารถเพิ่มจำนวนแอคติโนฟาจในตัวอย่างดินให้มากขึ้นทำให้สามารถตรวจสอบแอคติโนฟาจได้ และจากรายงานการวิจัยของ Dowding และคณะ (1973) ที่ทำการทดลองเปรียบเทียบการแยกแอคติโนฟาจจากตัวอย่างดินโดยตรงกับวิธีส่งเสริมการเจริญ พบว่าการแยกจากตัวอย่างดินโดยตรงสามารถแยกแอคติโนฟาจจากดินได้เพียง 3 ตัวอย่างเท่านั้น ในขณะที่วิธีส่งเสริมการเจริญสามารถแยกฟาจจากดินได้ 25 ตัวอย่างจากตัวอย่างดินทั้งหมด 28 ตัวอย่าง นอกจากนี้ Dowding ยังรายงานในการวิจัยอีกว่าสาเหตุที่มีผู้ใช้วิธีส่งเสริมการเจริญแล้วสามารถแยกแอคติโนฟาจได้น้อยกว่าวิธีการแยกโดยตรง เนื่องจากใช้เวลาในการบ่มตัวอย่างดินกับสปอร์ของสเตรปโตมัซีสในอาหารเลี้ยงเชื้อนานเกินกว่า 16-18 ชั่วโมง ทำให้ฟาจที่ออกมาจากเซลล์กลับไปเกาะติดกับมัซีสเดิมของแอคติโนมัซีสที่เจริญอยู่ในอาหาร ดังนั้นจำนวนแอคติโนฟาจที่แยกได้จึงลดลง

เมื่อทำแอคติโนฟาจให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยแยกแอคติโนฟาจจากพลาไคเดี่ยวซ้ำ 3 ครั้ง และตรวจสอบลักษณะพลาไคของแอคติโนฟาจทั้งหมดที่แยกได้ พบว่าแอคติโนฟาจ 13 ชนิด คือ Tg1, Tg3, Tg4, Tg5 ที่มีโฮสต์คือ *S. griseus* KA 1198 Tlu1, Tlu3, Tlu4, Tlu5 ที่มีโฮสต์คือ *S. luteogriseus* ISP 5483 และ TN1, TN3, TN5, TN6, TN7 ที่มีโฮสต์คือ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 ให้พลาไคใสซึ่งเป็นลักษณะของไวรัสเลนส์ฟาจ พลาไคของแอคติโนฟาจทั้ง 13 ชนิดมีความแตกต่างกันทั้งรูปร่างและขนาด แต่โดยส่วนใหญ่มีลักษณะค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ และมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 1-3 มิลลิเมตร แอคติโนฟาจ 2 ชนิด คือ Tg2 และ TN2 ให้ พลาไคขุ่นเหมือนกันแต่มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกัน คือ พลาไคที่เกิดจากแอคติโนฟาจ Tg2 บนลอนของ *S. griseus* KA 1198 มีลักษณะคล้ายวงแหวนซึ่งเหมือนลักษณะพลาไคของฟาจ VP5 ที่แยกได้จาก *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Dowding and Hopwood, 1973) ส่วน

พลาไคที่เกิดจากฟาจ TN2 บนลอนของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 จะมีโคโลนีของเชื้อกระจายอยู่ทั่วไปในพลาไค ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนพลาไคที่เกิดจากแอกติโนฟาจ SA1 บนลอนของ *Streptomyces azureus* (Ogata et al., 1985)

นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบลักษณะพลาไคของแอกติโนฟาจ Ac7 ซึ่งแยกโดย เจนจิรา เดชรักษา (2543) พบว่าพลาไคที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Ac7 บนลอนของ *S. luteo-griseus* ISP 5483 เป็นพลาไคขุ่นที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนเช่นเดียวกับพลาไคของฟาจ Tg2 พลาไคของแอกติโนฟาจ ทั้ง 3 ชนิดมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 1.5-3 มิลลิเมตร ซึ่งจากรูปที่ 4.1-4.5 และตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าพลาไคที่เกิดจากแอกติโนฟาจแม้จะผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกพลาไคเดี่ยวถึง 3 ครั้งแล้วแต่พลาไคที่ได้ยังคงมีขนาดไม่เท่ากันทุกพลาไคซึ่งไม่ได้หมายความว่าแอกติโนฟาจดังกล่าวไม่บริสุทธิ์ แต่ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นในแอกติโนฟาจส่วนใหญ่ เช่น ฟาจ ϕ SPK1 ให้พลาไคที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตรบนลอนของ *Streptomyces galilaeus* (Kuhn et al., 1987) ฟาจ B α ให้พลาไคที่มีขนาด 0.5-1 มิลลิเมตรกับโฮสต์คือ *Streptomyces lavendulae* ในขณะที่ฟาจ S985 และ S57 ให้พลาไคที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร (Nakano et al., 1981) ซึ่ง Dowding (1973) ได้อธิบายถึงสาเหตุที่พลาไคที่เกิดจากแอกติโนฟาจชนิดเดียวกันแต่มีขนาดไม่เท่ากันว่าเกิดเนื่องจากการศึกษาแอกติโนฟาจต้องใช้สปอร์ของแอกติโนมัยซีทีสซึ่งเป็นไปได้ยากที่จะควบคุมอายุหรือการงอกของสปอร์ให้เกิดขึ้นพร้อมกัน และถ้าในสปอร์แขวนลอยมีมัยซีเลียมปนเปื้อนอยู่ด้วย ฟาจจำนวนมากจะเข้าไปเกาะติดกับมัยซีเลียมโดยไม่เกิดการเพิ่มจำนวนของฟาจทำให้การแพร่กระจายของฟาจสู่เซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงมีน้อยลง ด้วยเหตุนี้ทำให้พลาไคที่เกิดจากแอกติโนฟาจชนิดเดียวกันมีขนาดไม่เท่ากัน

เมื่อนำเชื้อที่เจริญอยู่ในพลาไคขุ่นที่เกิดจากแอกติโนฟาจ Tg2, Ac7 และ TN2 มาแยกให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวและนำมาตรวจสอบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อจากแอกติโนฟาจชนิดเดิม พบว่าโคโลนีที่ได้จากพลาไคของสเตรปโตมัยซีทีสแต่ละสายพันธุ์นั้นจะมีบางโคโลนีที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อจากฟาจชนิดเดิม ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการขั้นตอนการแยกเชื้อจากพลาไคซึ่งมีขนาดเล็กมากอาจมีสปอร์หรือมัยซีเลียมที่ไม่เกิดการติดเชื้อจากฟาจปนเปื้อนมาในขั้นตอนนี้ได้ แต่โคโลนีไลโซเจนที่มีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อจากแอกติโนฟาจชนิดเดิมก็สามารถแยกจากพลาไคที่เกิดจากแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดได้เช่นกัน ผู้วิจัยคาดคะเนว่าการที่ไลโซเจนสามารถต้านฟาจชนิดเดิมได้อาจเนื่องมาจาก โปรตีนยับยั้งที่มีอยู่ในเซลล์สามารถยับยั้งการทำงานของยีนที่ควบคุมการเกิดไลโซเจนิคไซเคิลบนดีเอ็นเอของฟาจที่เข้ามาใหม่ (Maloy et al., 1993) หรือ อาจเกิดจากการที่ไลโซเจนมีสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณตำแหน่งที่จำเพาะกับการเกาะติดของฟาจ ทำให้ฟาจไม่สามารถเกาะติดกับโฮสต์ได้เช่นเดียวกับไลโซเจนที่เกิดจากฟาจ ϕ 80 และฟาจ N15 (Vostrov et al., 1996) จากคุณสมบัติของแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิด ที่ให้พลาไค

ลักษณะชุ่นและสามารถทำให้ไฮสท์เกิดไลโซเจนที่มีภูมิคุ้มกันจากแอกติโนฟาจชนิดเดิมได้ แสดงว่าแอกติโนฟาจ Tg2, Ac7 และ TN2 เป็นเทมเพอเรตฟาจ

จากลักษณะพลาซมิดชุ่น และการตรวจสอบภูมิคุ้มกันของไลโซเจนต่อฟาจชนิดเดิมเป็นข้อมูลพอที่จะบอกได้ว่าแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดเป็นเทมเพอเรตฟาจ (Ogata *et al.*, 1985; Suenaga *et al.*, 1994) แต่ผู้วิจัยใคร่จะศึกษาต่อถึงการมีภูมิคุ้มกันต่อแอกติโนฟาจชนิดอื่น รวมทั้งศึกษาการปลดปล่อยฟาจออกจากไลโซเจนโดยธรรมชาติและโดยการชักนำ เพื่อให้ได้ข้อมูลสนับสนุนว่าแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดเป็นเทมเพอเรตฟาจมากขึ้น จากการตรวจสอบภูมิคุ้มกันของไลโซเจนต่อการติดเชื้อจากแอกติโนฟาจชนิดอื่นๆ พบว่าไลโซเจนของ *S. griseus* KA1198 สามารถต้านการติดเชื้อจากแอกติโนฟาจ TN1 และ TN6 ซึ่งมี *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 เป็นไฮสท์ที่ได้แต่กลับไม่สามารถต้านทานการติดเชื้อจากฟาจ Tg3 และ Tg4 ที่มี *S. griseus* KA1198 เป็นไฮสท์ที่ได้ เช่นเดียวกับผลที่เกิดจากการทดสอบไลโซเจนของ *S. luteogriseus* ISP 5483 สามารถต้านฟาจ TN2 และ TN3 ได้ แต่ไม่สามารถต้านฟาจ Tlu4 ที่มี *S. luteogriseus* ISP 5483 เป็นไฮสท์ที่ได้ และไลโซเจนของ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 สามารถต้านฟาจ Ac7 ได้แต่กลับไม่สามารถต้านการติดเชื้อจากฟาจ TN1 ซึ่งมีไฮสท์เป็นชนิดเดียวกับไลโซเจนได้เช่นกัน ซึ่งผู้วิจัยคาดคะเนว่าการที่ไลโซเจนสามารถต้านแอกติโนฟาจชนิดอื่นได้อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอของฟาจชนิดนั้นๆอาจมีบริเวณที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ยับยั้งกลไกการเกิดไลโซติไซเคิลของฟาจที่สร้างขึ้นจากไลโซเจนได้ ในทางกลับกันดีเอ็นเอของฟาจชนิดอื่นที่มีไฮสท์เป็นชนิดเดียวกับไลโซเจนอาจไม่มีบริเวณที่จำเพาะต่อโปรตีนยับยั้งดังกล่าวไลโซเจนจึงไม่สามารถต้านฟาจเหล่านี้ได้ (Maloy *et al.*, 1993) การทดสอบภูมิคุ้มกันของไลโซเจนต่อแอกติโนฟาจชนิดอื่นๆยังไม่พบรายงานจากผู้วิจัยอื่น ส่วนใหญ่เป็นรายงานการตรวจสอบภูมิคุ้มกันจากแอกติโนฟาจชนิดเดียวกับที่ทำให้เกิดไลโซเจนเท่านั้นจึงยังขาดข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบหรืออธิบายผลที่ได้จากการทดลองนี้

การตรวจสอบการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากไลโซเจนโดยธรรมชาติเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเทมเพอเรตฟาจ (Dowding and Hopwood, 1973; Stuttard, 1982; Kuhn *et al.*, 1987; Herron and Wellington, 1990) ซึ่งจากผลการทดลองในรูปที่ 4.9-4.11 แสดงให้เห็นว่าไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดสามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้เองโดยธรรมชาติ ดังนั้นจึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนว่าแอกติโนฟาจ Tg2, Ac7 และ TN2 เป็นเทมเพอเรตฟาจ และเมื่อเปรียบเทียบการปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกจากไลโซเจนโดยธรรมชาติเมื่อเลี้ยงในภาวะต่างๆ (ดังแสดงในตารางที่ 4.9) พบว่าไลโซเจนทั้ง 3 ชนิดสามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้ดีในภาวะที่มีสารอาหารสมบูรณ์ คือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกท ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nakano และคณะ (1981) ที่สามารถแยกแอกติโนฟาจ B α

ได้เมื่อเลี้ยงไลโซเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อนิวเตรียนท์บรอกท ส่วนในภาวะที่มีสารอาหารไม่สมบูรณ์คือในสารละลายนอร์มอลซาลีนอนุภาคฟาจมักอยู่ในภาวะที่เป็นไลโซเจนมากกว่าอยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งจากงานวิจัยของ Herron และ Wellington (1990) ที่ศึกษาไลโซเจนของสเตรปโตมัยซีทีสในดินพบว่าสามารถตรวจสอบอนุภาคฟาจอิสระที่ปลดปล่อยออกจากไลโซเจนได้มากเมื่อสปอร์ไลโซเจนของสเตรปโตมัยซีทีสเจริญจนกลายเป็นมัยซีเลียม และจากการที่ไลโซเจนสามารถปลดปล่อยฟาจโดยธรรมชาติได้ดีในภาวะที่มีสารอาหารสมบูรณ์นี้ทำให้เกิดการกระจายยีนระหว่างสเตรปโตมัยซีทีสที่อยู่ในดินได้ ส่วนการเลี้ยงไลโซเจนในภาวะที่ให้โดนแสงเปรียบเทียบกับภาวะที่มีดพบว่าการปลดปล่อยฟาจโดยธรรมชาติเกิดขึ้นได้ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าแสงไม่ได้เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้ไลโซเจนปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาโดยธรรมชาติ แต่ปัจจัยที่มีผลคือความสมบูรณ์ของสารอาหาร

จากผลการศึกษารูปร่างของแอกติโนฟาจ Tg2, Ac7 และ TN2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดมีรูปร่างเหมือนกัน คือ มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม ส่วนหางยาวไม่สามารถหดได้และไม่มีส่วนที่เป็นแผ่นฐาน แต่มีขนาดแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4.10 เมื่อจำแนกแอกติโนฟาจตามรูปร่างของฟาจด้วยวิธีการของ Bradley (1967) แอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม B ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแอกติโนฟาจชนิดต่างๆที่จัดอยู่ในกลุ่ม B ตามที่มีรายงานการวิจัยมาจะพบว่า ฟาจเหล่านั้นมีรูปร่างที่คล้ายคลึงและมีขนาดใกล้เคียงกับแอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5.1 นอกจากนี้ผลการวิจัยที่ได้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ackermann และคณะ (1985) ที่รายงานว่าแอกติโนฟาจที่มีผู้ศึกษามากทุกชนิดจะมีส่วนหางเป็นส่วนประกอบแต่ไม่พบแอกติโนฟาจที่มีลักษณะเป็นสายยาว ซึ่งเมื่อจัดจำแนกแอกติโนฟาจเหล่านี้ตามวิธีของ Reaney และ Ackermann (1982) จะจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆได้เพียง 6 กลุ่มจากทั้งหมด 18 กลุ่ม คือ A1-A2, B1-B2 และ C1-C2 และถ้าจัดจำแนกแอกติโนฟาจ Tg2, Ac7 และ TN2 ด้วยวิธีของ Reaney และ Ackermann ตามลักษณะรูปร่าง แอกติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่ม B1 ซึ่งรูปร่างแอกติโนฟาจของสเตรปโตมัยซีทีสแทบทุกชนิดจัดอยู่ในกลุ่มนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 ขนาดรูปร่างของแอดติโนฟาจ Tg2, Ac7, TN2 และตัวอย่างแอดติโนฟาจชนิดอื่นที่จัดอยู่ใน Bradley กลุ่ม B

แอดติโนฟาจ	โฮสต์	ขนาดของฟาจ กว้าง x ยาว (nm)		Bradley กลุ่ม	เอกสารอ้างอิง
		ส่วนหัว	ส่วนหาง		
Tg2	<i>S. griseus</i> KA 1198	50 x 63.6	9.1 x 163.6	B	วิทยานิพนธ์ฉบับนี้
TN2	<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> NOV-1	40.2 x 53.6	6.7 x 268	B	
Ac7	<i>S. luteogriseus</i> ISP 5483	53.3 x 60	13.3 x 133.3	B	
R4	<i>S. albus</i> G J1074	64 x 64	12.5 x 190	B	Chater and Cater, 1979
TG1	<i>S. cattleya</i>	43 x 47.6	100	B	Foor et al., 1985
SPK1	<i>S. galilaeus</i>	94 x 95	10 x 210	B	Kuhn et al., 1987
RP3	<i>S. nimosus</i>	68.5 x 68.5	12 x 216	B	Rausch et al., 1993

จากผลการศึกษาโฮสต์-เรนจ์พบว่าแอดติโนฟาจทั้ง Tg2, Ac7 และ TN2 สามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสอ้างอิงอื่นจำนวน 36 สายพันธุ์นอกเหนือจากสายพันธุ์ที่เป็นโฮสต์ เกิดการติดเชื้อได้ 12, 14 และ 10 สายพันธุ์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาโฮสต์-เรนจ์ในแอดติโนฟาจชนิดอื่นๆ เช่น แอดติโนฟาจ R4 ซึ่งเป็นแอดติโนฟาจที่มีโฮสต์-เรนจ์กว้างสามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสติดเชื้อได้ 18 สายพันธุ์จากเชื้อทดสอบ 36 สายพันธุ์ (Chater and Cater, 1979) หรือแอดติโนฟาจ SAt 28 มีโฮสต์-เรนจ์กว้างเช่นกันสามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสติดเชื้อได้ 12 สายพันธุ์จากจำนวนเชื้อทดสอบทั้งหมด 50 สายพันธุ์ (Suenaga et al., 1994) ในขณะที่แอดติโนฟาจชนิดที่มีโฮสต์-เรนจ์แคบจะสามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสติดเชื้อได้เพียง 1 หรือ 2 สายพันธุ์เท่านั้น (Stuttard and Dwyer, 1981; Ogata et al., 1985) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าแอดติโนฟาจ Tg2, Ac7 และ TN2 เป็นแอดติโนฟาจที่มีโฮสต์-เรนจ์กว้าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 4.11 สเตรปโตมัยซิสบางสายพันธุ์ เช่น *S. ambofaciens* KCC S-0204, *S. niveus* KCC S-0251, *S. lincolnensis* JCM 4287 พบว่ามีการติดเชื้อจากแอสคิโนฟาจทั้ง 3 ชนิด ได้ ในขณะที่ *S. tauricus* JCM 4837, *S. alboniger* ATCC 12461 *S. bikiniensis* JCM 4011 และ *Kitasatospora griseola* JCM 3339 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับสเตรปโตมัยซิสที่สมากแตกต่างกันที่กรดไดอะมิโนปิเมลิก (diaminopimelic acid) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Takahashi and Omura, 1987) ไม่พบการติดเชื้อจากแอสคิโนฟาจทั้ง 3 ชนิด จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สเตรปโตมัยซิสบางชนิดอาจมีความจำเพาะกับแอสคิโนฟาจได้หลายชนิด ในขณะที่บางชนิดอาจมีความจำเพาะกับฟาจได้น้อยชนิดหรือไม่มีความจำเพาะกับฟาจเลย ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับความจำเพาะของฟาจต่อบริเวณที่เกาะติดบนเซลล์ หรือเกิดจาก host controlled restriction and modification system ของโฮสต์เอง

เมื่อชักนำไลโซเจนของสเตรปโตมัยซิสทั้ง 3 ชนิดด้วย แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะห่าง 40 เซนติเมตร เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0-10 นาที พบว่าเมื่อฉายแสงระยะเวลาไม่เกิน 2 นาที ไลโซเจนของ *S. griseus* KA 1198 และ *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้สูงสุดประมาณ 100 เท่าของการปลดปล่อยฟาจออกมาเองโดยธรรมชาติ แต่เมื่อฉายแสงระยะเวลานานขึ้นอนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยออกมามีจำนวนลดลงเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการฉายแสง และอนุภาคฟาจที่ปลดปล่อยจากไลโซเจนที่ป่มในที่มืดหลังจากถูกชักนำมีมากกว่าไลโซเจนที่ป่มในที่มืด (ดังแสดงในตารางที่ 4.13-4.15) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองที่ Stuttard (1982) ได้ชักนำไลโซเจนของ *Streptomyces venezuelae* ที่เกิดจากฟาจ SV2 ให้ปลดปล่อยฟาจออกมาได้เพิ่มขึ้นประมาณ 4-5 เท่า เช่นเดียวกับไลโซเจนของ *S. azureus* ซึ่งเกิดจากแอสคิโนฟาจ SAt 1 เมื่อถูกฉายแสงสามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้เพิ่มขึ้น 1000 เท่า (Ogata et al., 1985) ในขณะที่การชักนำไลโซเจนของ *Streptomyces cattleya* และไลโซเจนของ *S. venezuelae* โดยฉายแสงเป็นเวลา 0-2 นาทีไลโซเจนทั้ง 2 ชนิดปลดปล่อยฟาจออกมาได้มากขึ้นเล็กน้อยเมื่อฉายแสงเป็นเวลา 1-5 วินาทีแต่เมื่อฉายแสงนานกว่า 5 วินาทีฟาจที่ปลดปล่อยออกมามีจำนวนน้อยกว่าฟาจที่ปลดปล่อยออกมาเองโดยธรรมชาติ (Anne et al., 1984) ซึ่งรายงานดังกล่าวคล้ายกับผลของการชักนำไลโซเจนของ *S. luteogriseus* ISP 5483 ที่สามารถปลดปล่อยฟาจออกมาได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงระยะเวลาที่ฉายแสง 0.5-1 นาทีแรกหลังจากนั้นการปลดปล่อยฟาจจะลดลงต่ำกว่าการปลดปล่อยเองโดยธรรมชาติ

ไลโซเจนของ *S. griseus* KA 1198 เมื่อถูกชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ที่ความเข้มข้นของไมโตมัซิน ซี 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจเพิ่มขึ้นได้ประมาณ 10 เท่าของการปลดปล่อยโดยธรรมชาติส่วนไลโซเจนของ *S. luteogriseus* ISP 5483 จะปลดปล่อยฟาจเพิ่มขึ้นได้ประมาณ 10 เท่าเมื่อใช้ความเข้มข้นไมโตมัซิน ซี เป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาในการบ่ม 1-2 ชั่วโมง ในขณะที่ไลโซเจนของ *S. hygroscopicus* subsp *hygroscopicus* NOV-1 สามารถปลดปล่อยฟาจเพิ่มขึ้นได้มากถึง 100 เท่า ที่ความเข้มข้นของไมโตมัซิน ซี เป็น 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้แสดงว่าไลโซเจนของสเตรปโตมัซิที่สทั้ง 3 ชนิดสามารถถูกชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Ogata และคณะ (1985) ที่ไลโซเจนของ *S. azureus* ถูกชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ได้สามารถปลดปล่อยฟาจเพิ่มขึ้นประมาณ 100 เท่า มีรายงานว่าไมโตมัซิน ซี มีผลต่อการชักนำให้ไลโซเจนปลดปล่อยฟาจออกมาน้อย เช่น ไลโซเจนของ *S. galilaeus* ที่เกิดจากฟาจ SPK1 (Kuhn *et al.*, 1987) หรือไลโซเจนที่เกิดจากแอกติโนฟาจ ϕ C31 พบว่าทั้งการฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตและการชักนำด้วยไมโตมัซิน ซี ไม่สามารถทำให้การปลดปล่อยฟาจเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการปลดปล่อยออกมาเองธรรมชาติ (Sinclair and Bibb, 1988)

การวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของไมโตมัซิน ซี และระยะเวลาในการบ่มไลโซเจนตามรายงานที่มีผู้ได้ทำการศึกษาวิจัยมา เช่น Ogata และคณะ (1985) ใช้ไมโตมัซิน ซี ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรระยะเวลาในการบ่ม 1 ชั่วโมง Kuhn และคณะ (1987) ใช้ความเข้มข้นของไมโตมัซิน ซี น้อยกว่า คือ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ใช้ระยะเวลาในการบ่มนานถึง 24 ชั่วโมง และ Matsuura และคณะ (1995) ใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรระยะเวลาบ่ม 3 ชั่วโมง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ ไมโตมัซิน ซี ตั้งแต่ 0-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ ระยะเวลาในการบ่มเป็น 0-3 ชั่วโมง ในการชักนำไลโซเจนด้วยตัวชักนำทั้ง 2 ชนิดจะได้ผลดีเมื่อสปอร์ของไลโซเจนอยู่ในช่วงที่กำลังงอกทำได้โดยการเลี้ยงสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก่อนการชักนำเป็นเวลา 3-8 ชั่วโมง (Ogata *et al.*, 1985; Matsuura *et al.*, 1995) ซึ่ง Stuttard (1982) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการชักนำไลโซเจนของ *S. venezuelae* ในรูปของสปอร์ที่ยังไม่งอกและสปอร์ที่ทำให้เกิดการงอกก่อนชักนำประมาณ 4 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่าสปอร์ที่งอกสามารถถูกชักนำให้ปลดปล่อยฟาจออกจากไลโซเจนได้มากกว่าไลโซเจนในรูปของสปอร์ที่ยังไม่งอกถึง 6 เท่า ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงเลี้ยงสปอร์ในนิวเตรียนท์บรอกก่อนการชักนำเพื่อให้ประสิทธิภาพในการปลดปล่อยฟาจออกจากไลโซเจนดีขึ้น

งานวิจัยนี้บรรลุตตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ กล่าวคือ จากการทดลองกับแอคติโนฟาจทั้ง 3 ชนิด คือ Tg2 และ TN2 ที่ผู้วิจัยแยกได้ และ Ac7 (เจนจิรา, 2543) พบว่าให้ผลึกที่มีลักษณะขุ่นบนลอนของ *S. griseus* KA1198, *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NOV-1 และ *S. luteogriseus* ISP 5483 ตามลำดับ ฟาจทั้ง 3 ชนิดสามารถทำให้โฮสต์เกิดไลโซเจนที่มีภูมิคุ้มกันต่อแอคติโนฟาจชนิดเดิมและแอคติโนฟาจอื่นบางชนิดได้ ไลโซเจนดังกล่าวยังสามารถปลดปล่อยอนุภาคฟาจออกมาได้เองโดยธรรมชาติและถูกชักนำให้ปลดปล่อยอนุภาคฟาจเพิ่มขึ้นได้ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตและไมโตมัยซิน ซี ซึ่งลักษณะที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นลักษณะของเทมเพอเรตฟาจเมื่อจัดจำแนกแอคติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดตามรูปร่างลักษณะของฟาจด้วยวิธีการของ Bradley ฟาจที่แยกได้ทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม B นอกจากนี้เทมเพอเรตแอคติโนฟาจทั้ง 3 ชนิดที่แยกได้ยังมีโฮสต์-เรนจ์กว้างอีกด้วย

งานวิจัยนี้เป็นรายงานการศึกษาคั้งแรกของประเทศ ในเรื่องลักษณะและสมบัติของเทมเพอเรตฟาจของสเตรปโตมัยซิทีส ข้อมูลต่างๆที่ได้สามารถนำเทมเพอเรตฟาจดังกล่าว โดยเฉพาะเทมเพอเรตฟาจ TN2 ซึ่งมีโฮสต์-เรนจ์กว้าง และสามารถทำให้สเตรปโตมัยซิสหลายชนิดเกิดการติดเชื้อแล้วให้ผลึกที่มีลักษณะขุ่น ไปพัฒนาใช้เป็นพาหะในการโคลนยีนของสเตรปโตมัยซิสชนิดต่างๆได้ ดังที่มีผู้ได้ทำการศึกษากับพาหะตัวอื่นมาก่อน (Anne *et al.*, 1984; Diaz *et al.*, 1989)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เจนจิรา เดชรัรักษา. 2543. ลักษณะเฉพาะของแอกติโนฟาจที่แยกจากสเตรปโตมัยซีทีสในดิน.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลง
กรณ์มหาวิทยาลัย. 92 หน้า

ภาษาอังกฤษ

- Ackermann, H. W., Berthiaume, L., and Jones, L. A. 1985. New actinophage species. Intervirology. 23: 121-130.
- Adams, M. H. 1959. Bacteriophages. New York: Interscience.
- Adolph, K. W., and Haselkorn, R. H. 1971. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga, *Nostoc muscorum*. Virology. 46: 200-208.
- Anne, J., Mellaert, L. V., and Eyssen, H. 1990. Determination of the packaging capacity of bacteriophage VWB. J. Bacteriol. 172: 1129-1132.
- Anne, J., Wohlleben, W., Burkardt, H. J., Springer, R., and Puhler, A. 1984. Morphological and molecular characterization of several actinophages isolated from soil which lyse *Streptomyces cattleya* or *S. venezuelae*. J. Gen. Microbiol. 130: 2639-2649.
- Black, J. C. 1999. Microbiology Principles and Explorations. 4th ed. New Jersey: Prentice- Hall.
- Black, L. W., and Showe, M. K. 1983. Morphogenesis of the T4 head. In Mathews, C. K., Kutter, E. M., Mosig, G., and Berget, P. B. (eds.) Bacteriophage T4. p. 267-297. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Bradley, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31: 230-314.
- Casida, L. E., and Liu, K. C. 1974. *Arthrobacter globiformis* and its bacteriophage in soil. Appl. Microbiol. 28: 951-959.
- Chater, K. F., and Carter, A. T. 1979. A new, wide host-range, temperate bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its interaction with some restriction-modification system. J. Gen. Microbiol. 115: 431-442.

- Chauthaiwale, V. M., Therwath, A., and Deshpande, V. V. 1992. Bacteriophage lambda as a cloning vector. Microbiol. Rev. 56: 577-591.
- Coetzee, J. N. 1987. Bacteriophage taxonomy. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage Ecology. p. 45-85. New York: John Wiley and Sons.
- Dale, J. W. 1998. Molecular Genetics of Bacteria. 3rd ed. p. 99-128 Chichester: Wiley.
- Di Masi, D. R., White, J. C., Schnaitman, C. A., and Bradbeer, C. 1973. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: common receptor site for vitamin B12 and the ecolicins on the outer membrane of the cell envelope. J. Bacteriol. 115: 506-513.
- Diaz, L. A., Hardisson, C., and Rodicio, M. R. 1989. Isolation and characterization of actinophages infecting *Streptomyces* species and their interaction with host restriction-modification systems. J. Gen. Microbiol. 135: 1847-1856.
- Donadio, S., Paladino, R., Costanzi, I., Sparapani, P., Schreil, W., and Iaccarino, M. 1986. Characterization of bacteriophages infecting *Streptomyces erythreus* and properties of phage-resistant mutants. J. Bacteriol. 166: 1055-1060.
- Dowding, J. E. 1973. Characterization of a bacteriophage virulent for *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Gen. Microbiol. 76: 163-176.
- Dowding, J. E., and Hopwood, D. A. 1973. Temperate bacteriophages for *Streptomyces coelicolor* A3(2) isolated from soil. J. Gen. Microbiol. 73: 349-359.
- DuBow, M. S. 1994. Bacterial identification use of bacteriophages. In: Webster, R. G., and Granoff, A. (eds.) Encyclopedia of Virology. Vol.2 London: Academic Press.
- Duckworth, D. H. 1976. "Who discovered bacteriophage?" Bacteriol. Rev. 40: 793-802.
- Duckworth, D. H. 1987. History and basic properties of bacterial viruses. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage Ecology. p. 1-45. New York : John Wiley and Sons.
- Foor, F., Roberts, G. P., Morin, N., Snyder, L., Hwang, M., Gibbons, P. H., Paradiso, M. J., Stotish, R. L., Ruby, C. L., Wolanski, B., and Streicher, S. L. 1985. Isolation and characterization of the *Streptomyces cattleya* temperate phage TG1. Gene. 39: 11-16.
- Furukawa, H., Kuroiwa, T., and Mizushima, S. 1983. DNA injection during bacteriophage T4 infection of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 154: 938-945.

- Furuse, K. 1987. Distribution of coliphage in the environment : General consideration. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage Ecology. p. 87-124. New York: John Wiley and Sons.
- Goyal, S. M. 1987. Methods in phage ecology. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage Ecology. p. 267-297. New York : John Wiley and Sons.
- Greene, J., and Goldberg, R. B. 1985. Isolation and preliminary characterization of lytic and lysogenic phages with wide host-range within the streptomycetes. J. Gen. Microbiol. 131: 2459-2465.
- Harris, J. E., Chater, K. F., Bruton, C. J., and Piret, J. M. 1983. The restriction mapping of *c* gene deletions in *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 and their use in cloning vector development. Gene. 22: 167-174.
- Hartley, M. N., Murphy, G. O., Bruton, C. J., and Chater, K. F. 1994. Sequence of the essential early region of ϕ C31, a temperate phage of *Streptomyces* spp. with unusual features in its lytic development. Gene. 147: 29-40.
- Herron, P. R., and Wellington, E. M. H. 1990. New method for extraction of streptomycetes spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1406-1412.
- Hershey, A. D. (ed) 1971. The bacteriophage Lambda. New York : Cold Spring Harbor.
- Howe, C. H., and Smith, M. C. M. 1996. Gene expression in *cos* region of the *Streptomyces* temperate actinophage ϕ C31. Microbiology. 142: 1357-1367.
- Hranueli, D., Pigac, J., and Vesligaj, M. 1979. Characterization and persistence of actinophage RP2 isolated from *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. J. Gen. Microbiol. 114: 295-303.
- Johnson, A.D., Poteete, A. R., Lauer, G., Sauer, R. T., Ackers, G. K., and Ptashne, M. 1981. λ repressor and *cro*-components of an efficient molecular switch. Nature. 294: 217-223.
- Kanda, K., Ohderaotoshi, T., Shimojyo, A., Kato, F., and Murata, A. 1999. An extrachromosomal prophage naturally associated with *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. Lett. Appl. Microbiol. 28: 305-308.
- Klaus, S., Krugel, H., Suss, F., Neigenfind, M., Zimmermann, I., and Taubeneck, U. 1981. Properties of temperate actinophage SH10. J. Gen. Microbiol. 123: 269-279.

- Kruger, D. H., and Bickle, T. A. 1983. Bacteriophage survival: multiple mechanism for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. Microbiol. Rev. 47: 345-360.
- Kuhn, S. P., Lampel, J. S., and Strohl, W. R. 1987. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage from *Streptomyces galilaeus*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2708-2713.
- Kuhstoss, S., Richardson, M. A., and Rao, R. N. 1991. Plasmid cloning vectors that integrate site-specifically in *Streptomyces* spp. Gene. 97: 143-146.
- Kurtboke, D. I., Chen, C. F., and Williams, S. T. 1992. Use of polyvalent phage for reduction of streptomycetes on soil dilution plates. J. Appl. Bacteriol. 72: 103-111.
- Kurtboke, D. I., Murphy, N. E., and Sivasithamparam, K. 1993. Use of bacteriophage for selective isolation of thermophilic actinomycetes from composted eucalyptus bark. Can. J. Microbiol. 39: 46-51.
- Kurup, V. P., and Heinzen, R. J. 1978. Isolation and characterization of actinophages of *Thermoactinomyces* and *Micropolyspora*. Can. J. Microbiol. 24: 794-797.
- Lamont, I., Richardson, H., Cater, D. R., and Egan, J. B. 1993. Genes for the establishment and maintenance of lysogeny by the temperate coliphage 186. J. Bacteriol. 175: 5286-5288.
- Lanning, S., and Williams, S. T. 1982. Methods for the direct isolation and enumeration of actinophages in soil. J. Gen. Microbiol. 128: 2063-2071.
- Lillehaug, D. 1997. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. J. Appl. Microbiol. 83: 85-90.
- Lomovskaya, N. D., Chater, K. F., and Mkrtumian, N. M. 1980. Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. Microbiol. Rev. 44: 206-229.
- Lomovskaya, N. D., Fonstein, L., Ruan, X., Stassi, D., Katz, L., and Hutchinson, C. R. 1997. Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. Microbiology. 143 : 875-883.
- Lomovskaya, N. D., Mkrtumian, N. M., Gostimskaya, N. L., and Danilenko, V. N. 1972. Characterization of temperate actinophages ϕ C31 isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Virol. 9: 258-262.

- Long, P. F., and Amphlett, G. E. 1996. A superlytic actinophage system as a pre-treatment in the isolation of non-streptomycetes actinomycetes from soil. Lett. Appl. Microbiol. 22: 62-65.
- Luria, S. E., Darnell, J. E., Baltimore, D., and Campbell, A. 1978. General Virology. 3rd ed. New York: John Willey and Sons.
- Maloy, S. R., Cronan, J. E., Jr., and Freigelder, D. 1994. Microbial Genetics. 2nd ed. p. 80-375. Boston: Jones and Bartlett.
- Mathews, C. K., Kutter, E. M., Mosig, G., and Berget, P. B. 1983. Bacteriophage T4. Woshington DC: American Society for Microbiology.
- Matthews, R. E. F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. Intervirology. 17: 1-200.
- Matsuura, M., Noguchi, T., Aida, T., Asayama, M., Takahashi, H., and Shirai, M. 1995. A gene essential for the site-specific excision of actinophage R4 prophage genome from the chromosome of a lysogen. J. Gen. Appl. Microbiol. 41: 53-61.
- Mitsui, H., and Takahashi, H. 1992. Cohesive single-stranded ends of *Streptomyces* temperate bacteriophage R4. Mol. Gen. Genet. 231: 360-362.
- Morino, T., and Takahashi, H. 1997. Transduction of a plasmid with an inserted R4 phage DNA fragment in *Streptomyces lividans*. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 1047-1048.
- Muniesa, M., and Jofre, J. 1998. Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the shiga toxin 2 gene. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2443-2448.
- Nakano, M. M., Ishihara, H., and Ogawara, H. 1981. Characterization of temperate bacteriophage BQ isolated from *Streptomyces lavendulae*. J. Gen. Microbiol. 122: 289-293.
- Nester, E. W., Roberts, C. E., and Nester, M. T. 1995. Microbiology : A Human Perspective. p. 293-312. Iowa: Wm. C. Brown.
- Ogata, S., Suenaga, H., and Hayashida S. 1985. A temperate phage of *Streptomyces azureus*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 201-204.
- Paul, J. H., Joan, B. R., Sunny, C. J., Pam, L., Xingting, X., and Christina, K. 1997. Coliphage and indigenous phage in Mamala bay, Oahu, Hawaii. Appl. Environ.

- Microbiol. 63: 133-138.
- Rausch, H., Vesligaj, M., Pocta, D., Biukovic, G., Pigac, J., Cullum, J., Schmiger, H., and Hranueli, D. 1993. The temperate phages RP2 and RP3 of *Streptomyces rimosus*. J. Gen. Microbiol. 139: 2517-2524.
- Reaney, D. C., and Ackermann, H. W. 1982. Comparative biology and evolution of bacteriophages. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage ecology. p. 53-55. New York: John Wiley and Sons.
- Sanders, M. E. 1987. Bacteriophages of industrial importance. In: Goyal, S. M., Gerba, C. P., and Bitton, G. (eds.) Phage Ecology. p. 211-244. New York: John Wiley and Sons.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 3rd ed. Vol 1. p. 2.1-3.49 New York: Cold Spring Harbor.
- Schneider, J., Garcia, I. A., and Kutzner, H. J. 1987. Characterization of family of temperate actinophages of *Faenia rectivirgula*. J. Gen. Microbiol. 133: 2263-2268.
- Sharma, C. R., Venkataraman, G. S., and Prakash, N. 1977. Cyanophage AC-1 infecting the blue-green alga *Anacystis nidulans*. Curr. Sci. 46: 496-497.
- Shimizu-Kadota, M., Sakurai, T., and Tsuchida, N. 1983. Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. Appl. Environ. Microbiol. 45: 669-674.
- Simon, L. D., and Anderson, T. F. 1967. The infection of *Escherichia coli* by T2 and T4 bacteriophage as seen in the electron microscope. I. Attachment and penetration. Virology. 32: 279-297.
- Sinclair, R. B., and Bibb, M. J. 1988. The repressor gene (*c*) of the *Streptomyces* temperate phage ϕ C31: Nucleotide sequence, analysis and functional cloning. Mol. Gen. Genet. 213: 269-277.
- Stuttard, C. 1982. Temperate phages of *Streptomyces venezuelae*: lysogeny and host specificity shown by phages SV1 and SV2. J. Gen. Microbiol. 128: 115-121.
- Stuttard, C., and Dwyer, M. 1981. A new temperate phage of *Streptomyces venezuelae*: morphology, DNA molecular weight, and host range of SV2. Can. J. Microbiol. 27: 496-499.

- Suenaga, H., Rodprapakorn, M., Hitomi, K., and Ogata, S. 1994. Isolation and characterization of temperate phage SAT28 and its deletion mutants infecting *Streptomyces azureus* ATCC 14921. Actinomycetol. 8: 69-72.
- Takahashi, Y., and Omura, S. 1971. *Kitasatosporia*, a genus of order actinomycetales. Kitasato. Arch. Exp. Med. 60: 1-14.
- Vallee, M., and Cornett, J. B. 1972. A new gene of bacteriophage T4 determining immunity against superinfecting ghosts and phage in T4-infected *Escherichia coli*. Virology. 48: 777-784.
- Valyasevi, R., Sandine, W. E., and Geller, B. L. 1990. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1882-1889.
- Vostrov, A. A., Vostrukhina, O. A., Svarchevsky, A. N., and Rybchin, V. N. 1996. Proteins responsible for lysogenic conversion caused by coliphages N15 and ϕ 80 are highly homologous. J. Bacteriol. 178: 1484-1486.
- Voyles, B. A. 1993. The Biology of Viruses. p. 261-274. St. Louis: Mosby.
- Waldor, M. K., and Mekalanos, J. J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 272: 1910-1914.
- Wood, W. E., and Revel, H. R. 1976. The genome of bacteriophage T4. Bacteriol. Rev. 40: 847-868.
- Yin, X., Zeph, L. R., and Statzky, G. 1997. A simple method for enumerating bacteriophages in soil. Can. J. Microbiol. 43: 461-466.
- Young, R. Y. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol. Rev. 56: 430-481.

ภาคผนวก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แมนนิทอล มังปิ้ง อการ์ (Mannitol Mungbean Agar)

ถั่วเขียวบด	20.0	กรัม
น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol)	20.0	กรัม
วุ้นผง	18.0	กรัม
น้ำประปา	500.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0

ต้มถั่วเขียวบดกับน้ำประปาจนเดือด กรองเอาถั่วเขียวออก นำน้ำต้มถั่วเขียวที่ได้มาเติมน้ำตาลแมนนิทอล วุ้นผง และน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดต่าง แล้วนำไปต้มอีกครั้งจนเดือด

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)

2. นิวเตรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3. นิวเตรียนท์ บรอก (Nutrient Broth)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

4. ซอฟท์อการ์ (Soft Agar)

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน (Bacto peptone)	5.0	กรัม
วุ้นผง	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

แบ่งใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 0.1 โมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตดบัฟเฟอร์

แอมโมเนียม อะซิเตด ($C_2H_7NO_2$)	0.77	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.0 ด้วย 1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์

2. การเตรียม 50 มิลลิโมลาร์เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต

เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต		กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ เกิดวันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2519 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2540 และ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541

ผลงานทางวิชาการ

ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ เจนจิรา เดชรักษา และ สุรีนา ชวนิชย์. 2544. ลักษณะบางประการของแอคติโนฟาจที่แยกจากดินในประเทศไทย. การเสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยาย ที่การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 9. 20-21 มีนาคม, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ เจนจิรา เดชรักษา และ สุรีนา ชวนิชย์. 2545. ลักษณะบางประการของแอคติโนฟาจที่แยกจากดินในประเทศไทย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ (Section T) 1: 27-33.

Wechprasit, T., Chavanich, S. 2000. Morphological characterization of temperate actinophages from *Streptomyces* species. Poster presented at the 12th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology. 1-3 November, Felix hotel, Kanchanaburi, Thailand.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย