รายการอ้างอิง

1. Kao, C. Y. 1972. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. Fed. Proc. 31: 1117-1131.
2. Bower, J. D., Hart, J. R., Mattews, A. P., and Howden, E. M. H. 1981. Non-protein neurotoxins. Cli. Toxicol. 18: 831-863.
3. Fuhrman, F. A. 1967. Tetrodotoxin. Sci. Am. 217: 60.
4. Yasumoto, T., Yasumura, D., Yotsu, M., Michishita, T., Endo, A., and Kotaki, Y. 1980. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. Agric. Biol. Chem. 50: 793-795.
5. Noguchi, T. et al. 1986. Occurence of tetrodotoxin and anhydro-tetrodotoxin in Vibrio sp. isolated from the intestines of a xanthid crab Altergatis floridis. J. Biochem. 99: 311- 314.
6. Shimidu, U., Noguchi, T., Hwang, F. D., Shida, Y., and Hashimoto, K. 1987. Marine bacteria which produced tetrodotoxin. App. Environ. Microbiol. 53: 1714-1715.
7. Yotsu, M. et al. 1987. Production of tetrodotoxin and its derivatives by Pseudomonas sp. isolated from the skin of a puffer fish. Toxicon. 25: 225-228.
8. Do, H., K., Kogure, K.,and Shimidu, U. 1990. Identification of deep-sea-sediment bacteria which produced tetrodotoxin. App. Environ. Microbiol. 56: 1162-1163.
9. Nagashima, Y., Nishio, S., Noguchi, T., Aragawa, O., Kanoh, S., and Hashimoto, K., 1988. Detection of tetrodotoxin by thin layer chromatography / fast atom bombardment mass spectrometry. Anal. Biochem. 175: 258-262.

10. Ghazarossian, V. E., Schant, E. J., Schoes, H. K., and Strong F.M. 1974. Identification of a poison in toxic scallops from a Gonyaulax tamarensis red tide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 1219.

11. Tamiyavanich, S., Kodama, M., and Fukuko, Y. 1985. The occurence of paralytic shellfish poisoning in Thailand. In D. M. Anderson, A. W. White, and D. G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellates, pp. 521-524. New York: Elsevier.

12. Proctor, N. H., Chan, S. L., and Trevor, A. J. 1975. Production of saxitoxin by cultures of Gonyaulax catanella. Toxicon. 13:1.

13. Shimidu, Y., Alam, M., Ohima, Y., and Fallen, W. E. 1975. Presence of four toxins in red tide infested clams and cultured Gonyaulax tamarensis cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 731.

14. Ogata, T., Kodama, M., and Ishimaru, T. 1987. Toxin production in the dinoflagellate Protogonyaulax tamarensis. Toxicon. 25: 923-928.

15. White, A. M. 1986. High toxin content in dinoflagellate Gonyaulax excavata in nature. Toxicon. 24: 605-610.

16. Nelinda, M., Dimanlig, V., and Taylor, F. J. R. 1985. Extracellular bacteria and toxin production in Protogonyaulax species. In D. M. Anderson, A. W. White, and D. G. Baden(eds.), Toxic Dinoflagellates, pp. 103-106, New York: Elsevier.

17. Kodama, M., and Ogata, T. 1988. Toxification of bivalves by paralytic shellfish toxins. Asia Pac. J. Pharmacol. 3: 99-109.

18. _____ 1989. Possible association of paralytic shellfish toxins- producing bacteria with bivalve toxicity.

In Natori, K. Hashimoto, and Y. Ueno (eds.) Mycotoxins and Phycotoxins 88. A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo, Japan, 16-19 August, 1988. pp.391-398.

19. Ogata, T.,Sato, S., and Kodama, M. 1989. Paralytic shellfish toxins in bivalves which are not associated with dinoflagellates. Toxicon. 27: 1241-1244.

20. Kodama, M., Ogata, T., and Sato, S. 1988. Bacterial production of saxitoxin. Agric. Biol. Chem. 52: 1075-1077.

21. Hille, B. 1975. The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. Biophys. J. 15: 615-619.

22. ธารา ตริตระการ, เทพกร สาธิตการมณี, บุญเจือ ธรรมินทร์, ประดิษฐ์ เจริญไทยกวี. 2523. ฤทธิ์ยาชาเฉพาะที่ของพิษปลาปักเป้า (Long acting local anesthetic properties of tetrodotoxin for epidural and spinal anesthesia in dogs.) วิสัญญีสาร. 7: 125-134.

23. Ritchie, J. M. 1975. Mechanism of action of local anesthetic agents and biotoxins. Br. J. Anesth. 47: 191-198.

24. Wakely, F. J., Fuhrman, G. J., Furman, F. A., Fisher, H. G., and Mosher, H. S. 1968. The occurence of tetrodotoxin (tarichatoxin) in amphibians and the distribution of the toxin in the organs of newts (Taricha). Toxicon. 3: 195.

25. Kim, Y. H., Brown, G. B., Mosher, H. S., and Fuhrman, F. A. 1975. Tetrodotoxin. Occurence in Alelopid frogs of Costa Rica. Science. 189: 151.

26. Sheumack, D. D., Howden, M. E. H., Spence, I., and Quinn, R. J. 1978. Maculotoxin: A neurotoxin from the venom glands of octopus Hepalochlaena maculosa identified as tetrodotoxin. Science. 199: 188.

27. Boyer, G. L., Sallivan, J. J., Anderson, R. J., Harison, P. J., Taylor, F. J. R. 1985. Toxin production in three isolated of Protogonyaulax sp. In D.M. Anderson, A.W. White, and D.G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellates, pp.281-286. New York:Elsevier.

28. Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Honda, T., and Miwatani, T. 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium Moraxella sp. isolated from Protogonyaulax tamarensis. Toxicon. 28: 707-714.

29. Susan, B. (eds.) 1989. The Merck Index,11th edtition. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. p.8339, 9172. Merck, U.S.A.

30. Yasumoto, T. 1985. Recent progress in the chemistry of dinoflagellate toxins. In D. M. Anderson, A. W. White, and D. G. Baden (eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 260. New York: Elsevier.

31. Kao, C. Y. 1966. Tetrodotoxin,saxitoxin and their significance in the study of excitable phenomena. Pharmac. Rev. 18: 997- 1049.

32. _____and Nishiyama, A. 1965. Actions of saxitoxin on peripheral neuromuscular systems. J. Physiol. 180: 50.

33. _____ and Walker, S. L. 1982. Active groups of saxitoxin and tetrodotoxin as deduced from actions of saxitoxin analogues on frog muscle and squid axon. J. Physiol. 323: 619-637.

34. A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis of the Official Analytical Chemists. 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, U.S.A. p.298.

35. Shimizu, Y., Fallon, W. E., Wekell, J. C., Gerber, D., Gerber, Jr., and Gauglitz, E. J. 1978. Analysis of toxic mussels (Mytilus sp.) from the Alaskan inside passage. J. Agric. Food Chem. 26: 878-879.

36. Miyazawa, K., Jeon, J. K., Maruyama, J., Noguchi, T., Ito, K., and Hashimoto, K. 1986. Occurence of tetrodotoxin in the flatworm Planocera multitentaculata. Toxicon. 24: 645-650.

37. Bates, H. A., Kostriken, R., and Rappoport, H. 1978. A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modification. J. Agric.Food Chem. 26: 252-254.

38. Fallon, W. E., and Shimizu, Y. 1977. Electrophoretic analysis of paralytic shellfish toxins. J. Envi. Sci. Hlth. A12: 455.

39. Yasumoto, T., and Michishita, . 1985. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem. 49: 3077-3080.

40. Nagashima, Y., Maruyama, J., Noguchi, T., and Hashimoto, K. 1987. Analysis of paralytic shellfish poison and tetrodotoxin by ion-pairing high performance liquid chromatography. Nippon Suisen Gakkaishi. 53: 815-823.

41. Oshima, Y., Sugino, K.,and Yasumoto, T. 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. (Mimeograph)

42. Kogure, K., Tamplin, M. L., Shimidu, U., and Colwell, R. R. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. Toxicon. 26: 191-197.

43. Nagamura, M., and Yasumoto, T. 1985. Tetrodotoxin derivatives in puffer fish. Toxicon. 23: 271-276.

44. นิลนาจ ชัยธนาวิสุทธิ์. 2527. การทดลองเลี้ยงหอยแมลงภู่ (Perna viridis) โดยการใช้เชือกห้อยแขวน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย

45. Holt, G. H., Krieg, N. R., (eds.) 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumn 1. pp. 516-548. Baltimore: Willium & Wilkins.

46. Brown, P. R., and Krsulovic, A. M. 1979. Practicalaspects of reverse- phase liquid chromatography applied to biochemical and biomedical research. Anal. Biochem. 99: 1-21.

47. สงคราม เหลืองทองคำ เกรียงศักดิ์ สายชนู และเกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2527. ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหอยแมลงภู่และหอยนางรมจากฟาร์มเลี้ยง: ผลการศึกษาระหว่างมกราคม- ตุลาคม 2525. วารสารโรคสัตว์น้ำ 7 : 71-83.

48. Austin, B. 1988. Marine Microbiology. London: University press. 222 pp.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ผสมน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121°ซ) เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อบางสูตรที่ระบุไว้โดยเฉพาะ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	17.53	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	2.46	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัม
โพลีเปปโตน (polypeptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
กลูโคส(glucose)	2.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ ต้มให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิ 45-50 °ซ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.5$\pm$0.1

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ORI medium,1.5X)

โปรติโอสเปปโตน (proteose peptone No.3)	1.5	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	1.5	กรัม
ไฟโตน (phytone)	1.0	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.4	กรัม
โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3)	0.1	กรัม
เฟอริคซิเตรต ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	0.08	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำทะเลสังเคราะห์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) 900 มล. และเติมน้ำกลั่น 100 มล. ต้มให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิ 45-50 °ซ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.8 เทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในจานเพาะเชื้อ จานละประมาณ 15-20 มล. ทิ้งให้แข็งตัว

3. อาหารสำหรับเก็บเชื้อ (ORI stock medium) มีส่วนผสมเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อหมายเลข 2 แต่เติมวุ้นผง เพียง 8 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มให้เดือด ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.8 บรรจุใส่หลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางเอียง (slant)

4. น้ำทะเลสังเคราะห์ (artificial sea water)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25.0	กรัม
ทริส ($C_4H_{11}NO_3$)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.0	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)	0.3	กรัม
กรดบอริค (HBO_3)	2.0	กรัม
โซเดียมโมลิบเดต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	0.5	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	0.4	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	50.0	ไมโครกรัม
คัปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.4	ไมโครกรัม
โคบอลท์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)	1.0	ไมโครกรัม
วิตามินบี 12 (B12)	20.0	ไมโครกรัม
ไบโอติน (biotin)	10.0	ไมโครกรัม

ละลาย tris ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.8 ละลายส่วนผสมแต่ละอย่างแยกกัน แล้วจึงนำมาผสมกันภายหลังตามลำดับ และผสมรวมกับสารละลาย tris ที่ปรับความเป็นกรดด่างแล้ว เติมน้ำจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำมาใช้ เติมวิตะมินบี 12 และไบโอตินที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองแล้ว

5. Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar(TCBS agar)

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5.0	กรัม
โปรติโอส เปปโตน (proteose peptone)	10.0	กรัม
ซูโครส (sucrose)	20.0	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรต ($(C_3H_4(OH)(COONa)_3.2H_2O$)	10.0	กรัม
ออกกอล (ox-gall)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอร์คซิเตรต ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (bromthymol blue)	0.04	กรัม
ไธมอลบลู (thymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 89.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ต้มจนเดือดโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิ 45-50°ซ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 8.6 เทอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวลงในจานแก้วเพาะเชื้อ ทิ้งให้อาหารแข็งตัวก่อนนำไปใช้

6. Triple sugar iron agar (TSI agar)

บีฟเอกซ์แตรก (beef extract)	3.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	15.0	กรัม
เดกซ์โตรส (dextrose)	1.0	กรัม
แลคโตส (lactose)	10.0	กรัม
ซูโครส (sucrose)	10.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	0.3	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.025	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	12.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 65.0 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.4 บรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววางเอียงทิ้งให้อาหารแข็งตัว

7. Motility test medium

บีฟเอกซ์แตรก (beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตน (peptone)	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	3.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 20.0 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำ ต้มให้ละลาย ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.2 บรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

8. Lysine iron agar

เปปโตน (peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	1.0	กรัม
แอล-ไลซีน (L- lysine hydrochloride)	10.0	กรัม
เฟอริคแอมโมเนียมซิเตรต (ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	0.04	กรัม
บรอมครีซอลเพอเพิล (bromcresol purple)	0.02	กรัม
วุ้นผง (agar)	15.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 34.5 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ต้มจนละลาย ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.7 บรรจุใส่หลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววางเอียง ทิ้งให้อาหารแข็งตัว

9. Methyl red-Voges Proskauer medium(MR-VP medium)

บัฟเฟอร์เปปโตน (buffer peptone)	7.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	5.0	กรัม

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่งมา 17.0 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.9 บรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

10. Peptone broth

เปปโตน (peptone)	10.0	กรัม

ละลายในน้ำ 1ลิตร แบ่งเป็น 7 ส่วนเท่าๆกัน เติมโซเดียมคลอไรด์แต่ละส่วนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2,4,6,8,10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ อีก 1 ส่วนไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ บรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

11. Tryptone broth

ทริปโตน (tryptone)	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	20.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1 ลิตร บรรจุใส่หลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

12. Oxidation Fermentation test medium (OF test medium)

ทริปโตน (tryptone)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.3	กรัม
กลูโคส (glucose)	10.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (bromthymol blue)	0.08	กรัม
วุ้นผง (agar)		

ใช้อาหารสำเร็จรูป OF basal medium ของ Difco โดยชั่งมา 9.4 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำต้มให้ละลาย ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิ 45-50°ซ เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อ 10 มล. ต่ออาหาร 100 มล. บรรจุใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ

13. อาหารสำหรับเซลล์เพาะเลี้ยง (RPMI medium 1640)

แอล-อาร์จีนีน (L-arginine)	200.0	มก.
แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine)	50.0	มก.
แอล-แอสพาร์ติก แอซิด (L-aspartic acid)	20.0	มก.
แอล-ซิสตีน (L-cystine)	50.0	มก.

แอล-กลูตามิก แอซิด (L-glutamic acid)	20.0	มก.
แอล-กลูตามีน (L-glutamine)	300.0	มก.
ไกลซีน (glycine)	10.0	มก.
แอล-ฮิสติดีน (L-histidine)	15.0	มก.
ไฮดรอกซี-แอล-โพรลีน (hydroxy-L-proline)	20.0	มก.
แอล-ไอโซลูซีน (L-isoleucine)	50.0	มก.
แอล-ลูซีน (L-leucine)	50.0	มก.
แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์ (L-lysine HCl)	40.0	มก.
แอล-เมทไธโอนีน (L-methionine)	15.0	มก.
แอล-ฟีนิลลาลานีน (L-phenylalanine)	15.0	มก.
แอล-โพรลีน (L-proline)	20.0	มก.
แอล-ซีรีน (L-serine)	30.0	มก.
แอล-ทรีโอนีน (L-threonine)	20.0	มก.
แอล-ทริปโตฟาน (L-tryptophane)	5.0	มก.
แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)	20.0	มก.
แอล-วาลีน (L-valine)	20.0	มก.
พารา-อะมิโนเบนโซอิค แอซิด (p-aminobenzoic acid)	1.0	มก.
ไบโอติน (biotin)	0.2	มก.
แคลเซียมแพนโทธีเนต (calcium pantothenate)	0.25	มก.
โคลีนคลอไรด์ (choline chloride)	3.0	มก.
โฟลิก แอซิด (folic acid)	1.0	มก.
อินโนซิทอล (inositol)	35.0	มก.
นิโคตินาไมด์ (nicotinamide)	1.0	มก.
ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine HCl)	1.0	มก.
ไรโบฟลาวิน (riboflavin)	0.2	มก.
ไธอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ (thiamine HCl)	1.0	มก.
วิตามินบี 12 (vitamin B_{12})	0.005	มก.
เด็กโตรส (dextrose)	2000.0	มก.

กลูตาไธโอน (glutathione)	1.0	มก.
แคลเซียมไนเตรต ($CaNO_3$)	100.0	มก.
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	400.0	มก.
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	100.0	มก.
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	6460.0	มก.
โมโนโซเดียมฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	1512.0	มก.
ฟีนอลเรด (phenol red)	5.0	มก.

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Gibco 1 ซอง (10.4 กรัม) ละลายในน้ำกลั่นสองครั้ง 1 ลิตร กรองด้วยเยื่อกรองขนาดความกว้างของช่อง 0.45 ไมครอน และ 0.20 ไมครอน ตามลำดับ เติมฟีตัลโบวายซีรัม(fetal bovine serum) ของ Gibco 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 °ซ ก่อนใช้นำออกมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ ประมาณ 15-20 นาที

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายกรดอะซีติก เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (0.1% Acetic acid)

ใช้ลูกยางดูดกรดอะซีติกเข้มข้น (glacial acetic acid) มา 0.1 มล.ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 100 มล.ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (0.3 M NaCl)

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 17.53 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 900 มล.ในขวดวัดปริมาตรเติมน้ำให้ครบ 1000 มล. นำสารละลายที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายแอมโมเนียออกซาเลท คริสตอลไวโอเลต (ammonium oxalate crystal violet solotion)

<u>สารละลาย ก</u>

คริสตอลไวโอเลต (crystal violet)	3.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์	20.0	มล.

<u>สารละลาย ข</u>

แอมโมเนียมออกซาเลต ($(COONH_4)_2H_2O$)	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มล.

ผสมสารละลาย ก. และสารละลาย ข.เข้าด้วยกัน กรองก่อนนำไปใช้

4. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีน (I_2)	1.0	กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มล.

บดไอโอดีนและโปตัสเซียมไอโอไดด์ด้วยกันในโกร่งจนเป็นผงละเอียด ใช้น้ำกลั่นประมาณ 200 มล. ล้างเอาส่วนผสมทั้งหมดใส่ในกระบอกตวง เติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มล. เก็บสารละลายนี้ในขวดสีชาและเก็บในที่มืด

5. สารละลายอะซีโตนแอลกอฮอล์ (acetone alcohol solution)

เอทธิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์	400.0	มล.
อะซีโตน (CH_3COCH_3)	300.0	มล.

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดปิดฝาให้แน่น

6. สารละลายซาฟรานีน (safranin solution)

ซาฟรานีน (safranin)	0.25	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์	10.0	มล.
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายซาฟรานีนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปผสมให้เข้ากัน กรองก่อนนำไปใช้

7. สารละลายโคแวค (Kovacs solution)

พาราไดเมลธิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (para-dimethylaminobenzaldehyde)	5.0	กรัม
เอมิลหรือบิวทิลแอลกอฮอล์ ($C_7H_{14}O_2$ or $C_4H_8O_2$)	75.0	มล.
กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น (conc.HCl)	25.0	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ในขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°ซ

8. สารละลายเมธิดเรด (methyl red solution)

เมธิลเรด (methyl red)	1.0	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์	300.0	มล.
น้ำกลั่น	200.0	มล.

ละลายเมธิลเรดในเอธิลแอลกอฮอล์จนหมด แล้วจึงเติมน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ในที่เย็นอุณหภูมิ 4°ซ

9. สารละลายทดสอบ Voger-Proskauer (VP test solution)

สารละลาย ก

แอลฟาแนฟธอล (alpha-naphthol)	5.0	มล.
เอธิลแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซ็นต์	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาในที่เย็นอุณหภูมิ 4°ซ

สารละลาย ข

โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH)	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาในที่เย็นอุณหภูมิ 4°ซ

10. สารละลายทดสอบเอ็นไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Cytochrom oxidase test solution)

เตตร้าเมทธิล พาราฟีนิลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ 1.0 กรัม (tetramethyl para-phenylenedianine dihydrochoride)

น้ำกลั่น 100.0 มล.

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีน้ำตาล เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

11. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี tissue culture assay

11.1 สารละลายวอบาย (ouabain solution) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ชั่งวอบาย (ouabain) 72.88 มก.(น้ำหนักโมเลกุล 728.8)ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ ในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มล.ต้มในน้ำเดือดจนละลายหมด บรรจุใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge tube)หลอดละ 1 มล. และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ

11.2 สารละลายเวอราตริดีน (veratridine solution) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชั่งเวอราตริดีน (veratridine) 6.738 มก. (น้ำหนักโมเลกุล 673.8) ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. หยดแอบโซลูทเอทธานอล ปริมาตร 3.3 มล. ลงไปละลายอย่างช้าๆ เขย่าตลอดเวลา จากนั้นจึงค่อยๆเติมน้ำกลั่นสองครั้งที่ปราศจากเชื้อลงไป เขย่าตลอดเวลาเช่นเดียวกันจนครบปริมาตร 10 มล. บรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก หลอดละ1 มล.เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิเยือกแข็ง(-20°ซ)

11.3 สารละลายมาตรฐาน tetrodotoxin เข้มข้น 1,500 นาโนโมลาร์

ชั่ง tetrodotoxin (TTX) 0.4789 มก.(น้ำหนักโมเลกุล 320) ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อในขวดวัดปริมาตร จนครบปริมาตร 10 มล. จะได้สารละลายมาตรฐาน tetrodotoxin เข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ หรือ 150,000 นาโนโมลาร์ ทำการเจือจางลง 100 เท่า โดยนำสารละลายนี้มา 0.1 มล. เติมน้ำกลั่นสองครั้งปราศจากเชื้อ 9.9 มล.ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐาน tetrodotoxin เข้มข้น 1,500 นาโนโมลาร์ บรรจุในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กหลอดละ 1 มล. เก็บไว้ในอุณหภูมิเยือกแข็ง (-20° ซ)

11.4 สารละลายสำหรับทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงหลุดจากขวดเลี้ยงเซลล์

ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.25	กรัม
โปตัสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.75	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	4.55	กรัม
น้ำกลั่นสองครั้ง	500.0	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ข. สารละลายทริปซิน - อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA solution)

ทริปซิน (trypsin)	5.0	กรัม
โซเดียมอีดีทีเอ (EDTA.4 Na)	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5	กรัม
น้ำกลั่นสองครั้ง	1,000.0	มล.

ใช้สารละลายสำเร็จรูปของ Gibco 25 มล. ผสมกับสารละลาย ก 225 มล. ในขวดแก้วเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ

12. สารละลายสำหรับโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (thin layer chromatography , TLC)

12.1 ระบบตัวทำละลาย (solvent system)

ไพริดีน (C_5H_5N)	15.0 มล.
เอทธิลอะซีเตต ($CH_3COOC_2H_5$)	5.0 มล.
แกลเซียลอะซีติก แอซิด (conc.CH_3COOH)	3.0 มล.
น้ำกลั่น	4.0 มล.

ผสมส่วนประกอบทั้งหมด ใส่ในถังแก้วให้มีระดับสูงประมาณ 1 ซม.ปิดฝาให้สนิทเพื่อให้ภายในถังอิ่มตัวด้วยไอของสารละลาย เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

12.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide solution) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ดูดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 3.33 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มล. เก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

12.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide solution) เข้มข้น 3 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 12.0 กรัม (น้ำหนักโมเลกุล 40) ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรจนครบปริมาตร 100 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

13. สารละลายสำหรับอิเลคโตรโฟริซีส (electrophoresis,EP)

13.1 สารละลายทริสบัฟเฟอร์ (tris buffer) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7

ชั่งทริส ($C_4H_{11}NO_3$) 9.68 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มล. ปรับ ความเป็นกรดด่างเป็น 8.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น(conc. HCL)

สารละลายนี้ใช้เป็นอิเลคโตรไลท์บัฟเฟอร์ (electrolyte buffer solution) เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

13.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(hydrogen peroxide solution) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมเช่นเดียวกับ 12.2

13.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide solution) เข้มข้น 3 โมลาร์

มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมเช่นเดียวกับ 12.3

14. สารละลายสำหรับไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

14.1 สารละลายสำหรับสารกลุ่ม tetrodotoxins

14.1.1 สารละลายโมบายล์เฟส (mobile phase solution)

อะซีโตไนไตรล์ (CH_3CN)	30.0 มล.
แกลเซียลอะซีติกแอซิด (conc.CH_3COOH)	3.0 มล.
เฮปตาฟลูออโรบิวทิริคแอซิด ($C_4HF_7O_2$)	1.0 มล.

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 2 ครั้ง 900 มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.0 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น(conc. NH_4OH) เติมน้ำให้ครบปริมาตร 1,000 มล. กรองผ่านเยื่อกรองขนาดช่อง 0.45 ไมครอน และกำจัดฟองอากาศ(degas)ก่อนใช้

14.1.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydrocide) เข้มข้น 4 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 32.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 2 ครั้ง เติมน้ำจนได้ปริมาตรรวมครบ 200 มล. กรองและกำจัดฟองอากาศก่อนใช้เช่นเดียวกัน

สารละลายนี้ใช้เป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing reagent)

14.2 สารละลายสำหรับวิเคราะห์สารในกลุ่ม saxitoxins

สารละลายตั้งต้น (stock solution)

ก. สารละลายโซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต (sodium 1-heptanesulfonate solution) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งโซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต ($(Na(CH_2)_6CHSO_2OH$) 2.02 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

ข. สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต (disodium phophate solution) เข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์

ชั่งโซเดียมฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 44.77 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

ค. สารละลายกรดฟอสฟอริค (phosphoric acid) เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์

ชั่งกรดฟอสฟอริค (HPO_4) เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ 28.8 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นสองครั้งจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

ง. สารละลายกรดเปอร์ไอออดิก (periodic acid solution) เข้มข้น 350 มิลลิโมลาร์

ชั่งกรดเปอร์ไอออดิก (H_5IO_6) 7.89 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตรจนได้ปริมาตรครบ 100 มล.

<u>สารละลายที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรดด่าง</u>

จ. สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide solution) เข้มข้น 1 นอร์มัล

ดูดแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เข้มข้นมา 16.67 มล. ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นสองครั้งจนได้ปริมาตรครบ 200 มล.

ฉ. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide solution) เข้มข้น 1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้งในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นได้ปริมาตรครบ 100 มล.

14.3 สารละลายโมบายล์เฟส (mobile phase solution) สำหรับวิเคราะห์ gonyautoxin 1,2,3 และ 4 (GTX 1-4)

ผสมสารละลาย ก.และสารละลาย ค. อย่างละ 10 มล.ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่นสองครั้ง 450 มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.2 ด้วยสารละลาย จ. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มล.

14.4 สารละลายโมบายล์เฟส (mobile phase solution) สำหรับวิเคราะห์ saxitoxin (STX) และ neosaxitoxin (neoSTX)

ผสมสารละลาย ก. 10 มล. และสารละลาย ค. 30 มล.ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มล. เติมกลั่นสองครั้ง 450 มล.ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7.1 ด้วยสารละลาย จ. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มล. เติมอะซีโตไนไตรล์ (CH_3CN) 30 มล.ผสมให้เข้ากัน

14.5 สารละลายตัวออกซิไดซ์ (oxidizing reagent)

ผสมสารละลาย ง. 10 มล. สารละลาย ข. 100 มล. เติมน้ำกลั่นสองครั้ง 300 มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 9.0 ด้วยสารละลาย ง. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มล. เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

14.6 สารละลายกรดอะซีติค (acetic acid solution) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ดูดแกลเชียลอะซีติคแอซิด (conc.CH_3COOH) 0.57 มล.ใส่ในขวดวัดปริมาตร เติมน้ำกลั่นสองครั้งจนได้ปริมาตรครบ 200 มล.

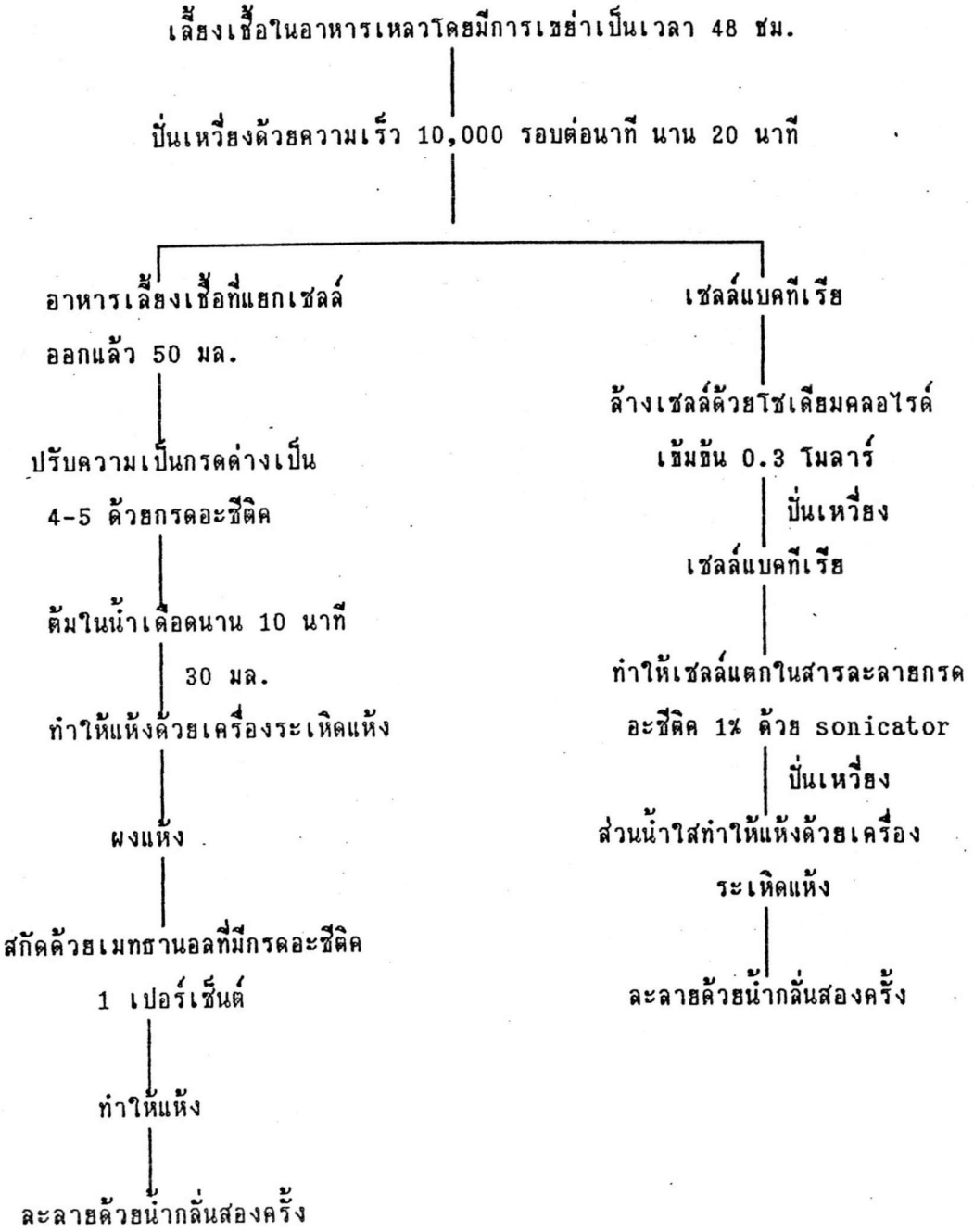
<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายในการทำ HPLC ทั้งหมดเป็นสารเคมีระดับ HPLC grade หรือ analytical reagent grade และสารละลายที่เตรียมได้ ก่อนนำมาใช้ต้องนำมากรองผ่านเยื่อกรองขนาดช่อง (pore size) 0.45 ไมครอน(um) และกำจัดฟองอากาศออก (degas) ทุกครั้ง

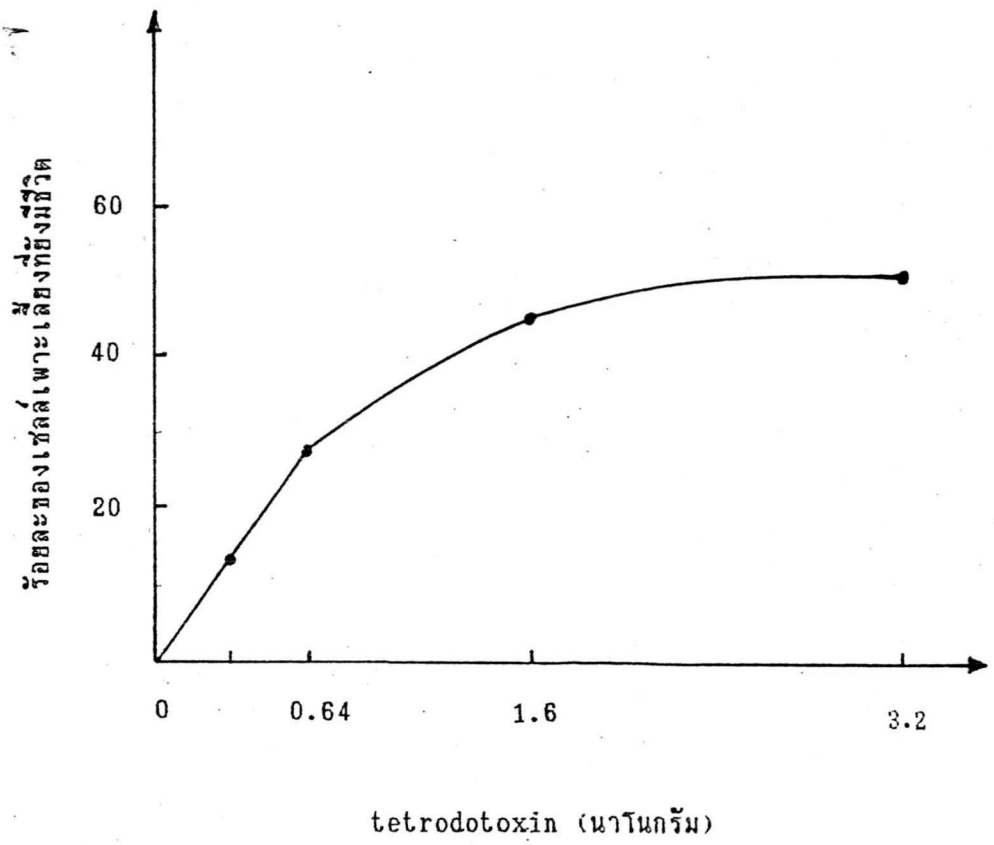
ภาคผนวก ค

1. วิธีการทำ dilution spread plating

ชั่งเนื้อหอยแมลงภู่ที่ปั่นละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน 25 กรัม เติมน้ำทะเลสังเคราะห์ปราศจากเชื้อ 225 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยมือเป็นเวลา 5 นาที และทำการเจือจางลงอีกครั้งละ 10 เท่า โดยใช้น้ำทะเลสังเคราะห์ปราศจากเชื้อเป็นตัวทำให้เจือจางเช่นเดียวกัน จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อจากนั้นจึงใช้วิธี spread plate technique โดยดูดแต่ละความเข้มข้นมา 0.1 มล. ใส่บนผิวของอาหารแข็ง ORI medium ที่อยู่บนจานเพาะเชื้อ และใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยเชื้อที่อยู่บนผิวของอาหารให้สม่ำเสมอ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้นของเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชม.

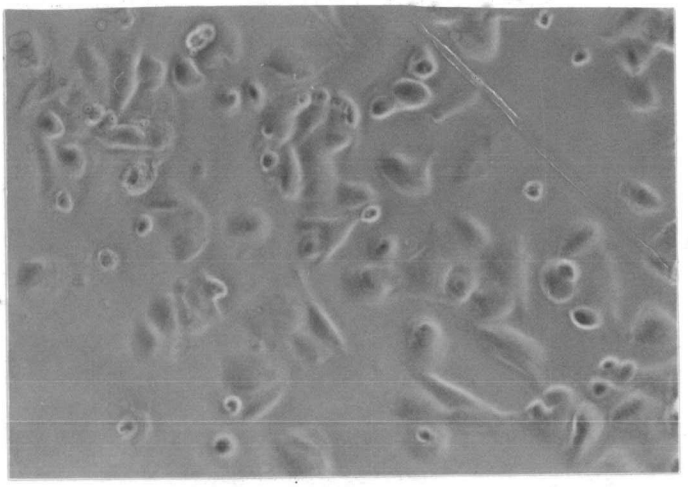
2. แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว สำหรับนำไปตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธี tissue culture assay



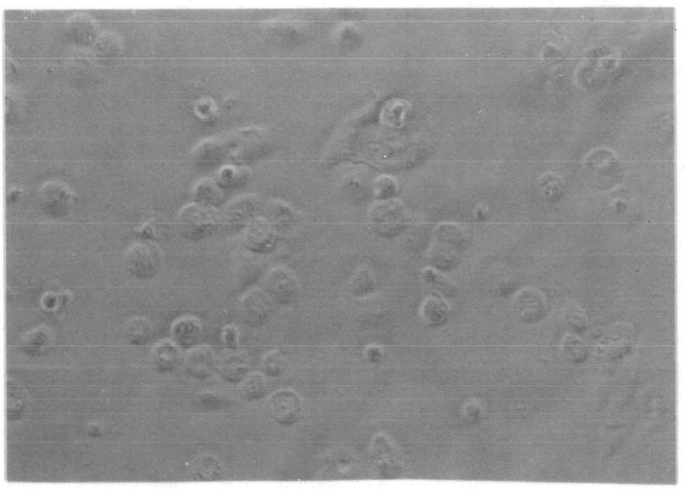


รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิต กับปริมาณ tetrodotoxin (นาโนกรัม) จากวิธี tissue culture assay

ก



ข



รูปที่ 18 แสดงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro 2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธี tissue culture assay เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast รุ่น ULWCD 0.30 ของบริษัท Olympus, Japan กำลังขยาย 500 เท่า

ก เซลล์ที่มีชีวิต

ข เซลล์ตาย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวศิริโฉม เหลืองอ่อน เกิดเมื่อวันที่ 12 พฤษภาคม 2504 ที่จังหวัดชลบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2526 ที่อยู่ปัจจุบัน 59/2 หมู่ 3 ต.เสม็ด อ.เมือง จ.ชลบุรี 20000 ปัจจุบันรับราชการอยู่ที่ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 2 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์