# บทที่ 2

## อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ต่ำ (refigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc ., USA.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น D-7200 ของบริษัท GS, W. Germany.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Z320 ของบริษัท HERMEL, USA.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota, Japan

เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง(pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer ) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Baush &Lomb, USA.

เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary vacuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela, Japan.

เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (ultrasonicator)

- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (microtube) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat System Utrasonics, USA.
- เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (kjeldaltherm) ของ Gerhardt, Germany.

ชุดเครื่องมือเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- จานพลาสติกที่มีหลุมขนาดเล็ก 96 หลุม (96-well microtiter plate) ของบริษัท Nunc, Denmark.

- หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกขนาด 15 มล. (plastic centrifuge tube) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.

- ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture flask) ของบริษัท Becton Dickinson and Company, USA.

- ปิเปต (pipet) และปิเปตเอด(pipet aid)

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope รุ่น C.K ของบริษัท Olympus, Japan.

ตู้ถ่ายเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO, USA.

SEP-PAK $C_{18}$ Cartridge รุ่น classic ของบริษัท Waters, USA.

ชุดเครื่องมือไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) รุ่น 2IK6GN-A ของบริษัท Oriental Motor CO., LTD, Japan.

- คอลัมน์ (column): Senshu Pak ODS-3251-D ขนาด 8.0x250 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.

- เครื่องตรวจสอบ (detector) fluoromonitor รุ่น RF-530 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- เครื่องบันทึก (recorder) chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

- กระบอกฉีดยาขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA.

ชุดเครื่องมืออิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

- แผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose polyacetate electrophoresis strips) รุ่น SEPRAPHORE III ขนาด 2.5x15.2 เซนติเมตร ของบริษัท Gelman Scences., USA.

- เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของบริษัท LKB, Sweden

- แชมเบอร์ (chamber)

- ชุดตรวจสอบ ประกอบด้วย เครื่องพ่น (spray), เครื่องเป่า (dryer), ตู้อบ ( hot air oven) 110 องศาเซลเซียส, เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (uv-lamp) รุ่น UVL-21 ของบริษัท UVP, USA.

<u>เคมีภัณฑ์</u>

กรดซัลฟูริก ($H_2SO_4$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial $CH_3COOH$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

กรดเฮปตาฟลูออโรบิวไทริก ($C_4HF_7O_2$) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท E. Merck, Germany.

ซูโครส (sucrose) ของบริษัท E. Merck, Germany.

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E. Merck, Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany.

ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$)ของบริษัท E. Merck, Germany.

ทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) ของบริษัท Gibco, USA.

เปปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Labolatories, USA.

โปติโอสเปปโตนหมายเลข 3. (proteose peptone no. 3) ของบริษัท Difco Labolatories, USA.

โพลีเปปโตน (polypeptone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.

ฟีตัลโบวีนซีรัม (fetal bovine serum) ของบริษัท Gibco, USA.

ฟรุกโตส (fructose) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

ไฟโตน (phytone) ของบริษัท Becton Dickinson and CO., USA.

เมทธานอล ($CH_3OH$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

ยูเรีย (urea) ของบริษัท Fluka-Garantic, Switzerland.

วอบาย (Ouabain) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

เวอราตริดีน (veratridine) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

สารมาตรฐาน

- เทโทรโดทอกซิน ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

- กอนิออทอกซิน 1, 2, 3 และ 4 (0.5 MU/ ul) ได้จาก Marine Biological Chemistry Laboratory, School of Fishery Science, Kitasato University, Japan.

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Labolatories, USA.

อะซิโตไนทริล ($CH_3CN$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

แอมโมเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) ของบริษัท E. Merck, Germany.

แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ของบริษัท E. Merck, Germany.

RPMI 1640 ของบริษัท Gibco, USA.

Trizma hydrochloride ( $C_4H_{11}NO_3$ . HCl ) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

จุลินทรีย์

*Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่แยกจากหอยทรายบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี (Juntongjin et al., 1993)

วิธีดำเนินการวิจัย

**การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

นำ *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ที่มีคุณสมบัติการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมมาทดสอบอีกครั้ง เพื่อตรวจดูความสามารถในการสร้างสารนี้ในระยะเวลาต่างๆ ของการเจริญ

1. การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว

เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งเลี้ยงอยู่บนอาหารแข็ง ORI (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) จำนวน 1 ลูป ปลูกลงในอาหารเหลว L-medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่มีปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำแบคทีเรียที่เลี้ยงเป็นหัวเชื้อมาวัดค่าความขุ่นหรือ ค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเจือจางหัวเชื้อให้ได้ความขุ่น 0.5 จากนั้นนำหัวเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 7.5 มล. ถ่าย ลงในอาหารเหลวปริมาตร 150 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปบ่มเขย่าโดยใช้ภาวะเดิม เป็นเวลา 0-216 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเพื่อนำไปหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม วัดการเจริญของเชื้อ และวัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก

วัดการเจริญของเชื้อ และวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของน้ำหมักโดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเนื่องจากสารสกัดขวางช่องโซเดียมบางส่วนจะถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างมากเกินไปจะทำให้สารเสียสภาพได้ ดังนั้นจึงทำการวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง แล้วนำส่วนที่เหลือปริมาตร 30 มิลลิลิตรไปสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียม

2. การสกัดสารกีดขวางช่องโซเดียม

สกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากเซลล์ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวในข้อ 1 มาแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge) ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนเซลล์ของแบคทีเรียมาล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) แยกส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วนำตะกอนเซลล์มาเติม 0.1 เปอร์เซนต์ กรดน้ำส้มในน้ำกลั่น (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 6-10 มล. จนได้ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 4 นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) นาน 6 นาที โดยควบคุมให้เซลล์แบคทีเรียอยู่ในอุณหภูมิต่ำตลอดเวลา จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำเพื่อแยกส่วนกากเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนน้ำใสนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) ส่วนผงที่ได้คือ สารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งนำไปชั่งน้ำหนักแห้งทั้งหมดและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

สกัดสารกีดขวางช่องโซเดียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้วด้วยวิธีสกัดด้วยเมทธานอลในภาวะกรด (acid methanol extraction) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้วปริมาตร 30 มล. มาปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 4 ด้วยกรดอะซีติค แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งเก็บผงของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ได้มาชั่งน้ำหนัก เติม 0.1 เปอร์เซนต์ กรดน้ำส้มในเมทธานอลปริมาตร 25 มล. เขย่า ด้วยมือนาน 5 นาที เพื่อสกัดสารพิษออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนเมทธานอล แล้วทำการสกัดเช่นเดิมอีกหนึ่งครั้ง เก็บรวบรวมชั้นเมทธานอลในขวดระเหยรูปกลม นำมาระเหยเอาเมทธานอลออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ โดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 0.1 เปอร์เซนต์ กรดน้ำส้มในเมทธานอล ลงไปอีกปริมาตร 30 มล. เขย่าและปั่นแยกตะกอน เพื่อเก็บชั้นเมทธานอลและระเหยเมทธานอลออกที่ ภาวะเดิมทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง นำผงแห้งของสารสกัดมาชั่งน้ำหนักแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย และจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

ชั่งน้ำหนักผงที่ได้อย่างละเอียดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก และละลายด้วยน้ำที่กลั่นสองครั้ง(double distilled water) ปราศจากเชื้อ โดยให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 มก.ต่อ 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีเก็บส่วนน้ำใส ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อมาตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture assay)

4. การตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture)

เลี้ยงเซลล์ประสาทหนู (mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2A ATCC CCL 131) ในขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง RPMI 1640

ที่เติมโบวีนซีรัม 10 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณเซลล์มากพอ และสภาพสมบูรณ์ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดจนแห้ง โดยใช้ปิเปตเอดและเติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.3 ) ปริมาตร 2 มล. ดูดทิ้งเพื่อล้างเซลล์ไม่ดีออก เติมสารละลายทริปซิน- อีดีทีเอ ปริมาตร 3 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ใช้มือเคาะข้างขวดหรือเป่าด้วยปิเปตเอดเบาๆ เพื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดอยู่บนผิวขวดหลุดออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มล. เขย่าเบาๆ ดูดเซลล์ที่แขวนลอยใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะความเร็ว 800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดที่มีตะกอนเซลล์ปริมาตร 5 มล. ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้งเพื่อกระจายเซลล์ ดูดส่วนหนึ่งไปตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเครื่องนับเซลล์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope ใช้กำลังขยาย 200 เท่า และเจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์RPMI 1640 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 1.0-1.5 x $10^5$ เซลล์ต่อมล.

วิธีการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียม

นำเอาเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ( ความหนาแน่น 1.0-1.5 x $10^5$ เซลล์ต่อมล.) ใส่ในจานหลุมพลาสติก (96-well microtiter plate) ลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจดูสภาพเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับก่อนนำไปใช้ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมๆ ละ 40 ไมโครลิตร และเติมสารละลายของสารสกัดหลุมละ 10 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงและกวนเบาๆเติมสารละลายวอบาย (ouabain) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3.1) หลุมละ 20 ไมโครลิตร ไมโครลิตรและสารละลายเวอราตริดีน (veratridine) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ( ภาคผนวก ข หมายเลข 3.2) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารเป็นเวลา 5 นาที ทำการทดลองสองซ้ำในแต่ละตัวอย่าง และทำการทดลองชุดควบคุมควบคู่ไปด้วยโดยใช้สารมาตรฐานเทโทรโดทอกซินเข้มข้น 28.6 ไมโครกรัมต่อมล.ที่ได้จาก Department of Domestic Science, Shikoku Women's University, Japan. โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 0, 0.011, 0.022, 0.044, 0.088, 0.176, 0.352 และ 0.715 ไมโครกรัมต่อมล. ตามลำดับ นำไปบ่มที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro 2A ที่ยังมีชีวิตและนับจำนวนเซลล์เพาะ

เลี้ยงทั้งหมดในแต่ละหลุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับกำลังขยาย 200 เท่า โดยสังเกตลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตจะมีรูปร่างรี หรือกลม ผิวเซลล์เรียบ และ มองเห็นขอบเซลล์ชัดเจน ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีชีวิตมีรูปร่างกลมบวม ผิวเซลล์ขรุขระ และมองเห็นขอบเซลล์ไม่ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะปรับระยะชัดของกล้อง (ภาคผนวก ค รูปที่ 27)

คำนวณหาร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิต แล้วนำไปเทียบหาปริมาณสารกีด-ขวางช่องโซเดียมที่สร้างจากแบคทีเรียโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของเทโทรโดทอกซินมาตร-ฐาน (ภาคผนวก ค ข้อ 1 )โดยใช้เทโทรโดทอกซินเป็นตัวแทนสารในกลุ่มที่เป็นสารกีดขวางช่องโซเดียม

**การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารสร้างกีดขวางช่วงโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1**

1. การหาชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1

เลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่ต่างๆ เช่นเดียวกับในอาหารเหลว L medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) แล้วแปรแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ลงไปแทนกลูโคส ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่นำมาศึกษา ได้แก่ กลีเซอรอล, ฟรุกโตส, สารละลายแป้ง, ซูโครส และ กลูโคส ความเข้มข้น 0- 0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยงตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 25 เป็นเวลา 72ชม. จึงนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า 27

2. การหาชนิด และปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

2.1 การแปรผันปริมาณโพลีเปปโตน โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์

เลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลว L-medium และมีแหล่งคาร์บอน

ที่เหมาะสมที่ได้ผลการทดลองจากข้อ 1 จากนั้นแปรปริมาณโพลีเปปโตนความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ เพาะเลี้ยงตามวิธีการในข้อ 1หน้า 25 เป็นเวลา 72 ชม. จึงนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า 27

2.2 การแปรผันชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวตามภาคผนวก ก หมายเลข 1 และมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้ผลการทดลองจากข้อ 1 จากนั้นแปรแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ลงไปแทน โพลีเปปโตน แต่ยังคงสารสกัดจากยีสต์ ไว้ตามเดิมเพื่อใช้เป็นแหล่งวิตามินซึ่งแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ( organic nitrogen) ที่นำมาศึกษาได้แก่ เปปโตน, โปติโอสเปปโตน หมายเลข 3, โพลีเปปโตน, ไฟโตนเปปโตน และยูเรีย ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) ที่นำมาศึกษาได้แก่แอมโมเนียม-ซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ($(NH_4)Cl$) ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยงตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 25 เป็นเวลา 72 ชม. แล้วนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม

3. การศึกษาชนิดและปริมาณของเกลือแร่ต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม

เลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมซึ่งได้ผลการทดลองจากข้อ1และ 2 จากนั้นแปรเกลือแร่ที่มีชนิดและปริมาณ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังต่อไปนี้

3.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0-2.0 เปอร์เซนต์

3.2 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์

3.3 ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซนต์

3.4 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซนต์

เพาะเลี้ยงตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 25 เป็นเวลา 72 ชม. แล้วนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า 27

4. การศึกษาภาวะที่เหมาะในการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1

4.1 การศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ ที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น โดยผันแปรความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 บ่มเขย่าตามวิธีการในข้อ 1 เป็นเวลา 72 ชม. จึงนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า

4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยง *Vibrio* sp.สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ และมีความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาข้างต้นในข้อ 3 และ 4 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 25, 28, 30, 37 องศาเซลเซียส บ่มเขย่าตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 25 เป็นเวลา 72 ชม. แล้วนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า 27

4.3 การศึกษาความเร็วรอบในการบ่มเชื้อโดยการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือแร่ มีความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 100 rpm, 200 rpm และไม่เขย่า บ่มเป็นเวลา 72 ชม. แล้วนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า 27

4.4 การศึกษารูปแบบการเจริญ และการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 3)

เพาะเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือแร่ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และความเร็วรอบในการบ่มเชื้อโดยการเขย่าที่ได้จากการศึกษาข้างต้น โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 9 วัน แล้วนำมาหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 4 หน้า 27

**การวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบสารกีดขวางช่องโซเดียม**

1. การวิเคราะห์โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส (Fallon และ Shimizu, 1977)

นำสารสกัดและสารมาตรฐานปริมาตร 2-4 ไมโครลิตร มาหยดในแนวระนาบลงบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate membrane) ทำการทดลอง 2 ชุด โดยใช้ทริสบัฟเฟอร์ (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride, $C_4H_{11}NO_3$ . HCl) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 10.2) เป็นสารละลายอิเลคโตรไลท์บัฟเฟอร์ (electrolyte buffer) และใช้ระบบกระแสคงที่ (constant current system) โดยให้กระแสไฟฟ้า 0.8 มิลลิแอมแปร์ (mA) ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต 2.5 เซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมาทำให้แห้งโดยเป่าด้วย hair dryer ตรวจดูการเรืองแสงของสารชนิดอื่น (false positive) จากนั้นนำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตแผ่นหนึ่งมาพ่นด้วยสารละลายโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 10.3) เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) ส่วนอีกแผ่นหนึ่งพ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 10.4) เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และตรวจดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แสงสีเหลืองอมเขียว) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี

นำสารตัวอย่างที่สกัดได้จาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 นำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์เซพแพค ซี 18 และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง แล้วนำมาวิเคราะห์ชนิดของอนุพันธ์ที่เป็นส่วนประกอบของสารกึดขวางช่องโซเดียมโดยวิธี เอช พี แอล ซี

การวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) ซึ่งระบบของเอช พี แอล ซี (Yasumoto และ Michishita, 1985) ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) : รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

คอลัมน์ (column) : Senshu Pak ODS-3251-D, stainless steel ขนาด 8.0 x250 มม.ของบริษัท Senshu Scientific, Japan.

ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) : รุ่น 2Ik6GN-A ของ บริษัท Oriental Motor CO., LTD, Japan.

เครื่องตรวจสอบ (detector) : fluoromonitor รุ่น RE-530 ของบริษัท Shimadzu ซึ่งตั้งค่า excitation และ emission wavelength 365 และ 510 นาโนเมตร ตามลำดับ

เครื่องบันทึก (recorder) : Chromatopac รุ่น C-R1A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

โมบายเฟส (mobile phase) : อะซีโตไนทริล เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ที่มีกรดเฮปตาฟลูออโรบิวไทริก เข้มข้น 0.005นอร์มัล และกรดอะซีติคเข้มข้น0.05 นอร์มัล ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 (ภาคผนวก

ข. หมายเลข 5.1.1) และมีอัตราการไหล(flow rate) 0.6 มล.ต่อนาที

ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4นอร์มัล (ภาคผนวก ข หมายเลข5.1.2)และมีอัตราการไหล 2.5 มล.ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1-15 ไมโครลิตร โดยใช้กระบอกฉีดขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น MS-R50 ของบริษัท Exmire, USA. สารที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์จะทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ในหลอดเทฟลอน(teflon tube) ที่ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ความยาว 10 เมตร โดยเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งก่อนเข้าสู่เครื่องตรวจสอบฟลูออเรสเซนซ์และเครื่องบันทึกผล

การวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ซึ่งระบบของเอช พี แอล ซี (Oshima และคณะ, 1989) ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) : รุ่น L-6200 ของบริษัท Hitachi, Japan.

คอลัมน์ (column) : Develosil ODS-5, stainless steel ขนาด 4.6 x 250 มม. ของบริษัท Nomura Chemical, Japan.

ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) : double head reaction pump รุ่น 655 A-13 ของบริษัท Hitachi, Japan.

เครื่องตรวจสอบ (detecor) : fluoromonitor ซึ่งตั้งค่า excitation และ emission wavelength 330 และ 390 นาโนเมตร ตามลำดับ

เครื่องบันทึก (recorder) : chromato-integrator รุ่น D-2000 ของบริษัท Hitachi, Japan.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โมบายเฟส (mobile phase)

| | |
|---|---|
| ก. สำหรับวิเคราะห์ STX, dSTX และneoSTX | : สารละลาย ก ผสมกับอะซีโตไนทริล ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร(ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.1) และมีอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที |
| ข. สำหรับวิเคราะห์ GTX 1, 2 3, 4 และ 5 | : 1-เฮปเทนซัลโฟเนต เข้มข้น 2 mM. ในแอมโมเนียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 7.2(ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.2) และมีอัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที |
| ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) | : กรดเปอร์ไอออดิก เข้มข้น 7 mM ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 mM ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 9.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.3) และมีอัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที |
| สารละลายปรับความเป็นกรด (acidifying reagent) | : กรดอะซีติคเข้มข้น0.5 M (ภาคผนวก ข หมายเลข 5.2.4) และมีอัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที |

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ และเมื่อสารผ่านออกมาจากคอลัมน์จะทำปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ในหลอดเทฟลอน ที่มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ยาว 10 เมตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปรับความเป็นกรดด้วย acidifying reagent ก่อนเข้าเครื่องวัดฟลูออเรสเซนซ์และเครื่องบันทึกผล

<u>หมายเหตุ</u> ในการฉีดวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซีแต่ละครั้งต้องฉีดสารมาตรฐานจนได้ค่า retention time คงที่ก่อนฉีดตัวอย่างสารที่วิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ และเมื่อฉีดสารตัวอย่างประมาณ 4-5 ตัวอย่างต้องฉีดสารมาตรฐานอีก 1 ครั้ง เพื่อเทียบว่า retention time เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่ รวมทั้งต้องฉีดสารมาตรฐานครั้งสุดท้ายเมื่อเลิกทำการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง

i17020001