วัสดุและวิธีการทดลอง
(Materials and Methods)

1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษานี้จะใช้ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TFF221 เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อตรวจหาแบคเทอริโอเฟจในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังใช้ในการเพิ่มจำนวนและศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคเทอริโอเฟจที่ตรวจพบด้วย การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่นใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียทดสอบจำนวน 17 ชนิดดังต่อไปนี้ *Lactococcus lactis* ATCC11454, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11007, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Lactobacillus brevis* ATCC14869, *Lactobacillus brevis* UBUB001, *Lactobacillus casei* ATCC334, *Lactobacillus curvatus* ATCC25601, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC12315, *Lactobacillus pentosus* ATCC8041, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, *Leuconostoc cremoris* ATCC19254, *Leuconostoc fallax* ATCC700006, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR473, *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745, *Pediococcus pentosaceus* TISTR374, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 และ *Enterococcus faecalis* TISTR927

แลคติกแอสิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้เลี้ยงโดยใช้อาหารเหลว (MRS broth) หรืออาหารแข็ง (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง แบคทีเรียทุกชนิดถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหาร MRS broth ซึ่งมี glycerol อยู่ 15% (v/v)

2. การเตรียมตัวอย่างอาหารหมัก

อาหารหมักที่นำมาใช้ในการแยกแบคเทอริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ อาหารที่มีลักษณะแห้งหรือกึ่งแห้ง (เช่น แหนม หม่ำ ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น) และอาหารที่มีลักษณะเป็นน้ำหรือมีส่วนที่เป็นของเหลว (เช่น ผักดองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น) ในกรณีที่อาหารมีลักษณะแห้งหรือกึ่งแห้ง นำอาหารมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ผสมกับ PBS buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้สำหรับทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage enrichment) ในกรณีที่อาหารมีลักษณะเป็นน้ำหรือมีส่วนที่เป็นของเหลว นำเอาส่วนที่เป็นน้ำหรือของเหลวมาใช้ได้โดยตรง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้สำหรับทำการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างอาหาร

การเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอเฟจในตัวอย่างอาหารใช้วิธี enrichment method ทำโดยนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองเรียกว่า ตัวอย่างที่กรองแล้ว (filtrated sample) นำตัวอย่างที่กรองแล้วนี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาผสมกับอาหาร MRS broth ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า (double strength MRS broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ที่บ่มข้ามคืน (overnight culture) ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า สารละลายแบคเทอริโอเฟจสำหรับตรวจสอบ (bacteriophage suspension for testing) ซึ่งจะนำไปตรวจสอบว่ามีแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 อยู่หรือไม่โดยวิธี spot test

4. การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ

การตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage detection) โดยวิธี spot test (Chang et. al., 2005) มีวิธีการดังนี้ นำ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth และเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.4% และก่อนใช้ให้นำไปหลอมเพื่อให้วุ้นละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส) แล้วเติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากันแล้วเททับให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MRS agar รอให้อาหาร MRS soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว (ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที) จากนั้นหยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจสำหรับตรวจสอบ (bacteriophage suspension for testing) ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตรโดยหยดลงตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจสำหรับตรวจสอบหรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าวแสดงว่าในสารละลายแบคเทอริโอเฟจสำหรับตรวจสอบนั้นมีแบคเทอริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221

5. การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดหรือลอกตรงบริเวณที่เกิด clear zone (เอาเฉพาะเนื้อวุ้นที่อยู่ชั้นบนซึ่งก็คือชั้นของ soft agar) ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมี *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มนัน 1 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter) ที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า สารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6. การหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ

การหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (bacteriphage titer) จะรายงานเป็นค่า plaque-forming unit/ml (pfu/ml) โดยวิธี double-layer agar method (Adams, 1959) ซึ่งมีวิธีการคือ นำตัวอย่างที่ต้องการหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในอาหาร MRS broth จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 20-200 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจโดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml) = จำนวน plaque×10×ระดับความเจือจาง

7. การศึกษาความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ความสามารถของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (host range) ทดสอบโดยวิธี spot test ดังนี้ นำแลคติกแอสิดแบคทีเรียทดสอบซึ่งเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มน้น 1 M ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร MRS agar รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว หยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร MRS soft agar ดังกล่าวโดยหยดลงบริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายแบคเทอริโอเฟจหรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าแบคเทอริโอเฟจสามารถทำลายแบคทีเรียทดสอบชนิดนั้น

8. การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์

การศึกษาผลของสารละลาย $CaCl_2$ ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์ ทำโดยนำ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด มาเติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 M โดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ในแต่ละหลอดเท่ากับ 0, 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 mM จากนั้นเติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ให้มีปริมาณแบคเทอริโอเฟจความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลอดเท่ากับ 10^4 pfu/ml นำหลอดทดลองทั้ง 7 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง (ครั้งละ 5 มิลลิลิตร) จากทุกหลอด ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml)

9. การศึกษาการยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวของโฮสต์เซลล์

การศึกษาการยึดเกาะ (adsorption) ของแบคเทอริโอเฟจบนผิวเซลล์ของ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ทำตามวิธีของ Lu และคณะ (2003) โดยนำ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ให้มีค่า MOI (multiplicity of infection) เท่ากับ 0.01 เติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง (ครั้งละ 5 มิลลิลิตร) ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จะเป็นความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ไม่ได้เกาะที่ผิวเซลล์ของ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 เรียกว่า residual titer

การทดลองนี้ต้องทำการทดลองชุดควบคุม (control) ควบคู่ไปด้วย โดยในการทดลองชุดควบคุมจะทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวมา แต่ใช้ MRS broth แทน *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจที่ได้จากการทดลองชุดควบคุมเรียกว่า control titer

การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของแบคเทอริโอเฟจบนผิวของโฮสต์เซลล์ (% adsorption of the bacteriophage) ใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$[(\text{control titer} - \text{residual titer}) / \text{control titer}] \times 100$$

10. การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคเทอริโอเฟจ

นำ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ mid-exponential phase (OD 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5) มาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ใน MRS-Ca broth (MRS broth ซึ่งเติม $CaCl_2$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 mmol/L) ซึ่งลดปริมาตรลงให้เหลือเพียง 1 ใน 5 ของปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น เติมแบคเทอริโอเฟจ ϕTFF221 ให้มีค่า MOI เท่ากับ 0.5 ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อให้แบคเทอริโอเฟจยึดเกาะ (adsorb) กับผิวเซลล์แบคทีเรีย ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ใน MRS-Ca broth ทำการเจือจางตะกอนเซลล์แบบ ten-fold serial dilution บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เริ่มจับเวลาและเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ มานับจำนวนแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี double-layer agar plaque assay และสร้างกราฟการเจริญของแบคเทอริโอเฟจ (one-step growth curve)

11. การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอเฟจทำโดยนำน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้น้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้ จากนั้นนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงไปในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้แล้ว โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของแบคเทอริโอเฟจในแต่ละหลอดเท่ากับ 10^8 pfu/ml หลังจากที่เติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจแล้วให้เริ่มจับเวลาทันที และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที ตัวอย่างที่เก็บมานั้นจะถูกทำให้เย็นลงทันทีหลังการเก็บโดยจุ่มลงในน้ำแข็ง นำแต่ละตัวอย่างไปหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml) โดยวิธี double-layer agar plaque assay

12. การศึกษาการทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของแบคเทอริโอเฟจทำโดยนำ MRS broth ซึ่งปรับให้มีค่า pH แตกต่างกัน คือ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร มาเติมแบคเทอริโอเฟจลงไปหลอดละ 100 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของแบคเทอริโอเฟจแต่ละหลอดเท่ากับ 10^8 pfu/ml ตั้งหลอดเหล่านั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำทุกหลอดมาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 พร้อมทั้งปรับปริมาตรของสารละลายทุกหลอดให้เท่ากัน จากนั้นนำแต่ละหลอดไปหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml) โดยวิธี double-layer agar plaque assay

13. การศึกษาการทนต่อสารละลายเกลือ (NaCl) ของแบคเทอริโอเฟจ

การศึกษาการทนต่อสารละลายเกลือของแบคเทอริโอเฟจทำโดย นำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้น 1, 2, 5 และ 10% (w/v) ปริมาตรหลอดละ 30 มิลลิลิตร มาเติม

แบคเทอริโอเฟจลงไปหลอดละ 100 ไมโครลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของแบคเทอริโอเฟจแต่ละหลอดเท่ากับ 10^8 pfu/ml บ่มหลอดเหล่านั้นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ครั้งละ 5 มิลลิลิตรจากแต่ละหลอด นำไปหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอเฟจ (pfu/ml) โดยวิธี double-layer agar plaque assay

14. การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์

การทำแบคเทอริโอเฟจให้บริสุทธิ์ (bacteriophage purification) ทำตามวิธีของ Watanabe และคณะ (1970) ดังนี้ เลี้ยง *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตรซึ่งเติมสารละลาย $CaCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเชื้อมีค่า O.D. 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 จากนั้นเติมสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (10^5 pfu/ml) แล้วนำไปบ่มต่อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 28,500 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เก็บตะกอนมาละลายใน phage buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

15. การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษารูปร่าง (morphology) ของแบคเทอริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนทำตามวิธีของ Caso และคณะ (1995) โดยนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) 1 หยด (ประมาณ 10 ไมโครลิตร) หยดลงบน grid ที่ฉาบด้วยคาร์บอน (carbon-coated grid) ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วย้อมแบบ negative ด้วย 2% (w/v) uranyl acetate (pH 4.0) ทิ้งไว้ 10 วินาที จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจอาศัยเกณฑ์ (criteria) ที่กำหนดโดย International Committee of Taxonomy of Viruses

16. การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE

การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบ (structural proteins) ของแบคเทอริโอเฟจด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Chakrabarti et. al., 2000) ทำโดยนำสารละลายแบคเทอริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ปริมาตร 250 ไมโครลิตรผสมกับ acetone ที่แช่เย็นจัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายใน PBS buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และผสมกับ 2× sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue] ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหยอดลงในช่อง (well) บนแผ่น polyacrylamide gel โดยหยอดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (standard protein marker) ลงในช่องข้าง ๆ ด้วย จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าคงที่ (ประมาณ 100 mA) ผ่านแผ่น polyacrylamide gel เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมง นำแผ่น polyacrylamide gel ไปย้อมด้วย coomassie brilliant blue ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วย destaining solution [45% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid] จะเห็นแถบ (band) โปรตีนเป็นสีน้ำเงิน มวลโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอเฟจ สามารถคาดคะเนได้จากการเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

17. การสกัดและศึกษาสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ

นำสารละลายแบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage suspension) มาสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonucleases ชนิดต่าง ๆ ตามสภาวะที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์กำหนด (Promega) หลังจากสารพันธุกรรมถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมไปศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis

วิธี agarose gel electrophoresis ที่ใช้ในการศึกษาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ มีวิธีการดังนี้ เตรียม agarose gel (ความเข้มข้นของ agarose เท่ากับ 1 %) นำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมที่ได้หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ผสมกับ DNA loading sample แล้วใส่ลงในช่อง (well) บนแผ่น agarose gel เติม DNA มาตรฐานที่ทราบขนาด (DNA marker: λ DNA /*Hind* III) ลงในช่องข้าง ๆ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจ บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris-acetate-EDTA buffer กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยผ่าน agarose gel มีค่าความต่างศักย์คงที่เท่ากับ 100 V และใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย GelStar (Lonza Bioscience) และดูด้วย Dark Reader transilluminator (Clare Chemical Research)

18. การทำทรานสฟอร์เมชัน

การทำทรานสฟอร์เมชัน (transformation) ทำโดยนำพลาสมิด pN014-GFP [ซึ่งเป็น *E. coli/Lactococcus* shuttle vector และมียีน gfp (green fluorescent protein) และยีน erythromycin resistance (Phumkhachorn et al., 2007)] ใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 โดยวิธี electroporation โดยใช้เครื่อง CelljecT PRO (Hybaid) และทำ

ตามวิธีของ Holo และ Nes (1989) การคัดเลือกเซลล์แบคทีเรียที่รับพลาสมิด (transformant) ทำโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร MRS agar ที่เติม erythromycin ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน การตรวจสอบว่าแบคทีเรียรับพลาสมิดไว้ภายในเซลล์ ทำโดยการสกัดพลาสมิดตามวิธีของ Anderson และ Mckay (1983) และตรวจสอบขนาดของพลาสมิดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แบคทีเรียที่รับพลาสมิดให้ชื่อว่า *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP^{+} ซึ่งสามารถเรืองแสงได้เมื่อนำโคโลนีที่เจริญอยู่บน MRS agar plate ไปวางไว้บนเครื่อง Hoefer MacroVue Uvis-20 transilluminator (Amersham Biosciences) แบคทีเรียดังกล่าวจะถูกนำไปทดสอบความไว (sentitive) ต่อแบคเทอริโอเฟจว่ายังคงอยู่หรือไม่ หากไวต่อแบคเทอริโอเฟจจะเก็บรักษาไว้และใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในกระบวนการหมักในการทดลองต่อไป

19. การศึกษาผลของแบคเทอริโอเฟจในการทำลายหัวเชื้อ (starter culture) ในกระบวนการหมัก

การศึกษาผลของแบคเทอริโอเฟจในการทำลาย *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221 ในกระบวนการหมัก ในที่นี้จะใช้กุ้งจ่อมเป็นแม่แบบ (model) ของการศึกษาและใช้ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP^{+} เป็นหัวเชื้อ (starter culture) โดยมีวิธีการดังนี้ ทำการหมักกุ้งจ่อมซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญคือ กุ้งฝอยแห้ง เกลือ กระเทียม และข้าวคั่ว นำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน แบ่งส่วนผสมทั้งหมดออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 คือชุดทดลอง ซึ่งเติมหัวเชื้อ คือ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP^{+} ลงไป 10^{4} เซลล์/ส่วนผสม 1 กรัม และเติมแบคเทอริโอเฟจ 10^{3} pfu/ส่วนผสม 1 กรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ชุดที่ 2 คือชุดควบคุม (control) ซึ่งเติมเฉพาะหัวเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* TFF221-GFP^{+} ลงไป 10^{4} เซลล์/ส่วนผสม 1 กรัม แต่ไม่เติมแบคเทอริโอเฟจ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำส่วนผสมแต่ละชุดบรรจุลงในภาชนะ ปิดให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน เก็บตัวอย่างจากชุดการทดลองทั้งสองตลอดช่วงเวลาการหมัก เริ่มตั้งแต่เวลา 0 (เวลาเริ่มต้นหมัก) และทุก ๆ วันเป็นเวลา 5 วัน นำตัวอย่างทุกตัวอย่างที่เก็บมานั้นไปนับจำนวนแบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจ การนับจำนวนแบคทีเรียทำโดยวิธี spread plate บนอาหาร MSR agar ที่เติมยา erythromycin นำโคโลนีที่เจริญบนอาหารดังกล่าวไปดูด้วย Hoefer MacroVue Uvis-20 transilluminator (Amersham Biosciences) นับจำนวนโคโลนีที่เรืองแสงและรายงานเป็น cfu/g สำหรับการนับจำนวนแบคเทริโอเฟจทำโดยวิธี double-layer agar method และรายงานเป็น pfu/g