

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษานี้จะใช้ *Lactococcus lactis* RP359 เป็นโฮสต์เซลล์ (host cell) เพื่อตรวจหาแบคทีริโอเฟจในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังใช้ในการเพิ่มจำนวนและศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของแบคทีริโอเฟจที่ตรวจพบด้วย การศึกษาความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแลคติกแอซิดแบคทีเรียชนิดอื่นใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4

แลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเหลว (MRS broth) หรืออาหารแข็ง (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง การเก็บรักษาแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ทำโดยนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร MRS broth เติมน้ำ glycerol ลงไปให้ได้สัดส่วนของ glycerol เท่ากับ 15% (v/v) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้นี้มาใช้ จะนำไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth ก่อน แล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างอาหารหมัก

อาหารหมักที่นำมาใช้ในการแยกแบคทีริโอเฟจแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ (1) อาหารที่มีลักษณะแห้งหรือมีน้ำเป็นส่วนประกอบน้อย (เช่น แหนม หม่า ไส้กรอกเปรี้ยว เค็มบักนัด เป็นต้น) และ (2) อาหารที่มีลักษณะเป็นน้ำหรือมีส่วนประกอบที่เป็นของเหลวมาก (เช่น ผักดองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น) ในกรณีที่มีอาหารที่มีลักษณะแห้งหรือมีน้ำเป็นส่วนประกอบน้อย นำอาหารมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ผสมกับ PBS buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้สำหรับการเพิ่มปริมาณแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage enrichment) ในกรณีที่อาหารมีลักษณะเป็นน้ำหรือมีส่วนประกอบที่เป็นของเหลวมาก นำเอาส่วนที่เป็นน้ำหรือของเหลวมาใช้โดยตรง โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้สำหรับการเพิ่มปริมาณแบคทีริโอเฟจในตัวอย่างอาหารในขั้นตอนต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณแบคทีริโอเฟจในตัวอย่างอาหาร

การเพิ่มปริมาณแบคทีริโอเฟจในตัวอย่างอาหาร ใช้วิธี bacteriophage enrichment ซึ่งทำได้โดย นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ที่มีขนาดของรูพรุน (pore size) เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองจะเรียกว่า “ตัวอย่างที่กรองแล้ว” (filtrated sample) นำตัวอย่างที่กรองแล้วนี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหาร MRS broth ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า (double strength MRS broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำ *L. lactis* RP359 ที่บ่มข้ามคืน (overnight culture) ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า “สารละลายสำหรับตรวจสอบแบคทีริโอเฟจ” ซึ่งจะนำไปทดสอบว่ามีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 อยู่หรือไม่โดยวิธี spot test

4. การตรวจหาแบคทีริโอเฟจ

การตรวจหาแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage detection) ใช้วิธี spot test ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ นำ *L. lactis* RP359 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth และเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิตร (ความเข้มข้นของ agar เท่ากับ 0.4% และก่อนใช้ให้นำไปหลอมเพื่อให้วุ้นละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ผสมแบบที่เรียบและ soft agar ให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วเททับให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MRS agar รอให้ MRS soft agar ที่เททับลงไปนั้นแข็งตัว (ใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที) จากนั้นหยดสารละลายสำหรับตรวจสอบแบคทีริโอเฟจ ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหยดลงตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายสำหรับตรวจสอบแบคทีริโอเฟจหรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าวแสดงว่าในสารละลายดังกล่าวมีแบคทีริโอเฟจที่สามารถทำลาย *L. lactis* RP359 อยู่

5. การแยกแบคทีริโอเฟจ

ใช้ห่วงเย็บเชื้อ (loop) ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วชุดหรือลอกตรงบริเวณที่เกิด clear zone (เอาเฉพาะเนื้อวุ้นที่อยู่ชั้นบนซึ่งก็คือชั้นของ soft agar) ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมี *L. lactis* RP359 เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer เพื่อให้เนื้อวุ้นแตกกระจายในอาหาร MRS broth ดังกล่าว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า “สารละลายแบคทีริโอเฟจ” (bacteriophage suspension) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำสารละลายแบคทีริโอเฟจที่ได้มาทำ plaque assay โดยใช้วิธี double-layer agar method เพื่อให้ได้ plaque เดี่ยว ดังนี้ นำสารละลายแบคทีริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในอาหาร MRS broth จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิตร เติม *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก plaque ที่อยู่เดี่ยว ๆ มาหนึ่งอัน โดยใช้ loop เชียเนื้อวุ้นตรงตำแหน่งที่เกิด plaque มาจุ่มลงในอาหาร MRS broth ที่มี *L. lactis* RP359 เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 10 มิลลิตร ผสมให้เนื้อวุ้นแตกกระจายในอาหารโดยใช้ vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร ของเหลวที่ผ่านการกรองนี้เรียกว่า “สารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์” (purified bacteriophage suspension) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

6. การหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ

ในการหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจหรือนับปริมาณของแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage titer) จะรายงานเป็นค่า plaque-forming unit/ml (pfu/ml) โดยใช้วิธี double-layer agar method ซึ่งมีวิธีการคือ นำตัวอย่างที่ต้องการหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจมาทำการเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ในอาหาร MRS broth จากนั้นนำตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวน plaque ที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (เลือกนับจากจานเพาะเลี้ยงที่มี plaque อยู่ในช่วง 30-300 อัน) นำจำนวน plaque ที่นับได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจโดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (pfu/ml) = จำนวน plaque $\times 10 \times$ ระดับความเจือจาง

7. การศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น

ความสามารถของแบคทีริโอเฟจในการทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น (bacteriophage host range) ทดสอบโดยวิธี spot test ดังนี้ นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 4) ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร MRS agar รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว หยดสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 pfu/ml ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร MRS soft agar ดังกล่าว โดยหยดลงบริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง นำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตว่ามีส่วนใสของการยับยั้ง (clear zone) เกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่มีการหยดสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์หรือไม่ ถ้ามีส่วนใสของการยับยั้งเกิดขึ้นที่ตำแหน่งดังกล่าว แสดงว่าแบคทีริโอเฟจดังกล่าวสามารถทำลายแบคทีเรียทดสอบชนิดนั้นได้

8. การศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโอฟิล

การศึกษาผลของสารละลาย CaCl_2 ต่อความสามารถของแบคทีเรียโอเฟจในการทำลาย *L. lactis* RP359 สามารถทำได้โดยการนำ *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด มาเติมสารละลาย CaCl_2 ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ (M) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ในแต่ละหลอดเท่ากับ 0, 1, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิโมลาร์ (mM) จากนั้นเติมสารละลายแบคทีเรียโอเฟจบริสุทธิ์โดยให้มีปริมาณแบคทีเรียโอเฟจความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลอดเท่ากับ 10^4 pfu/ml นำหลอดทดลองทั้ง 7 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคทีเรียโอเฟจ (pfu/ml)

9. การศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรียโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์

การศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรียโอเพกบนผิวเซลล์ของโฮสต์ ซึ่งในที่นี้คือ *L. lactis* RP359 ทำโดยนำ *L. lactis* RP359 ที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายแบคทีเรีย

โอเฟจบริสุทธิ ให้มีค่า MOI (multiplicity of infection) เท่ากับ 0.01 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่าง (ครั้งละ 10 มิลลิลิตร) ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปตรวจหาความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ ซึ่งความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจที่ได้จะเป็นความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจที่ไม่ได้เกาะที่ผิวเซลล์ของ *L. lactis* RP359 เรียกว่า residual titer

การทดลองนี้จะต้องทำการทดลองชุดควบคุม (control) ควบคู่ไปด้วย โดยในการทดลองชุดควบคุมจะทำทุกขั้นตอนเช่นเดียวกับที่กล่าวมา แต่ใช้ MRS broth แทน *L. lactis* RP359 ความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจที่ได้จากการทดลองชุดควบคุมเรียกว่า control titer

การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของแบคทีริโอเฟจบนผิวเซลล์ของโฮสต์ (% adsorption of the bacteriophage) สามารถทำได้โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

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

10. การศึกษาการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจ

การศึกษาการทนความร้อนของแบคทีริโอเฟจทำโดยนำน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้ จากนั้นนำสารละลายแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงไปในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิตามที่ตั้งไว้แล้ว โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของแบคทีริโอเฟจในแต่ละหลอดนั้นเท่ากับ 10^8 pfu/ml หลังจากที่ได้เติมสารละลายแบคทีริโอเฟจแล้วให้เริ่มจับเวลาทันที และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที ตัวอย่างที่เก็บมานั้นจะถูกทำให้เย็นลงทันทีหลังการเก็บ โดยจุ่มลงในน้ำแข็ง นำแต่ละตัวอย่างไปหาค่าความเข้มข้นของแบคทีริโอเฟจ (pfu/ml)

11. การทำแบคทีริโอเฟจให้บริสุทธิ์ (Bacteriophage purification)

การทำแบคทีริโอเฟจให้บริสุทธิ์ มีวิธีการดังนี้ เลี้ยง *L. lactis* RP359 ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase เติมสารละลายแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage suspension) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย CaCl_2 ที่มีความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดของรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 23,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอน (pellet) ใน bacteriophage buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในสารละลาย CsCl ที่มีความหนาแน่นแตกต่างกัน (CsCl gradient ที่มีความหนาแน่น 1.35, 1.53 และ 1.65 กรัม/มิลลิลิตร) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 35,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ใช้ syringe ดูดสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ออกมาจากสารละลาย CsCl แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี dialysis ใน bacteriophage buffer

12. การศึกษารูปร่างของแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษารูปร่าง (morphology) ของแบคทีริโอเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (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 จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) การจำแนกชนิดของแบคทีริโอเฟจอาศัยเกณฑ์ (criteria) ที่กำหนดโดย International Committee of Taxonomy of Viruses

13. การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจโดยวิธี SDS-PAGE

การศึกษาโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้โดยนำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์ (purified bacteriophage suspension) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 2× sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปหยอดลงในช่อง (well) บนแผ่น polyacrylamide gel โดยหยอดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (standard protein marker) ลงในช่องข้าง ๆ ด้วย จากนั้นปล่อยกระแสไฟฟ้าคงที่ (ประมาณ 50 มิลลิแอมแปร์, 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 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแบคทีริโอเฟจ สามารถคาดคะเนได้จากการเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

14. การสกัดและศึกษาสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ

นำสารละลายแบคทีริโอเฟจบริสุทธิ์มาสกัดสารพันธุกรรม โดยใช้ชุดสกัดสารพันธุกรรม PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ RNase และ restriction endonucleases ชนิดต่าง ๆ ตามสถานะที่บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์กำหนด (Promega) หลังจากสารพันธุกรรมถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนสารพันธุกรรมไปศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis

วิธี agarose gel electrophoresis ที่ใช้ในการศึกษาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ 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 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของแบคทีริโอเฟจ บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ Tris-acetate-EDTA buffer กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยผ่าน agarose gel มีค่าความต่างศักย์คงที่เท่ากับ 100 โวลต์ (V) และใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย GelStar (Lonza Bioscience) และดูด้วย Dark Reader transilluminator (Clare Chemical Research)