บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 อุจจาระมนุษย์จากนักศึกษาเพศหญิงและชายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง

1.2 ตัวอย่างมูลไก่จากหมู่บ้านต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 8 ตัวอย่าง

1.3 ตัวอย่างมูลโคจากฟาร์มโคในบริเวณใกล้เคียงกับมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 3 ตัวอย่าง

1.4 ตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มสุกรมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง

2. แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ (indicator strains)

2.1 *Lactobacillus casei* JCM 1134

2.2 *Lactobacillus fermentum* JCM 1173

2.3 *Lactobacillus delbrueckii* JCM 1012

2.4 *Lactobacillus gallinarum* JCM 2011

2.5 *Lactobacillus crispatus* JCM 5810

2.6 *Lactobacillus pentosus* JCM 1558

2.7 *Lactobacillus agilis* JCM 1187

2.8 *Lactobacillus thermotolerans* JCM 11425

2.9 *Lactobacillus mucosae* DMST 13345

2.10 *Enterococcus avium* JCM 8722

2.11 *Enterococcus durans* JCM 8725

2.12 *Enterococcus gallinarum* JCM 8728

2.13 *Enterococcus faecium* MJU 92

2.14 *Pediococcus pentosaceus* MJU 78

2.15 *Pediococcus acidilactici* MJU

2.16 *Bacillus subtilis* TISTR 008

2.17 *Bacillus cereus* MJU

2.18 *Micrococcus luteus* MJU

2.19 *Staphylococcus aureus* TISTR 517

2.20 *Listeria monocytogenes* DMST 1327

2.21 *Listeria monocytogenes* DMST 2871

2.22 *Listeria monocytogenes* DMST 1783

2.23 *Listeria monocytogenes* DMST 4553

2.24 *Listeria murrayi* DMST 4564

2.25 *Streptococcus agalactiae* DMST 11366

2.26 *Streptococcus dysgalactiae*DMTS10953

2.27 *Helicobacter pylori* DMST 20165

2.28 *Escherichia coli* MJU

2.29 *Escherichia coli* DMST 12743

2. 30 *Enterobacter aerogenes* MJU

2.31 *Serratia marcescens* MJU

2.32 *Salmonella typhimurium* TISTR 292

2.33 *Salmonella choleraesuis* DMST 8014

2.34 *Salmonella enteritidis* DMST 15676

2.35 *Vibrio cholerae* DMST 2873

2.36 *Vibrio parahaemolyticus* DMST5665

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.1 อาหารเหลวสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Criterion, USA)

3.2 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว สูตร De Man, Rogosa and Sharpe (0.7 % agar) (Criterion, USA)

3.3 อาหารแข็งสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (1.5 % agar) (Criterion, USA)

3.4 อาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlau, Spain)

3.5 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร Brain Heart Infusion (0.7 % agar) (Scharlau, Spain)

3.6 อาหารแข็งสูตร Brain Heart Infusion (1.5 % agar) (Scharlau, Spain)

4. สารเคมี (ภาคผนวก ข)

4.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับพีเอช

4.1.1 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล (Merck, Germany)

4.1.2 สารละลาย HCl ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล (Merck, Germany)

4.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

4.2.1 เอนไซม์ proteinase K (Sigma, USA)

4.2.2 เอนไซม์ protease (Sigma, USA)

4.2.3 เอนไซม์ catalase (Sigma, USA)

4.2.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % ที่ทำการเจือจางกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:16

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธีการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rDNA

4.3.1 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Isoplant DNA extraction kit No.314-02731) (Nippon Gene, Japan)

4.3.2 เอนไซม์ RNase (Nippon Gene, Japan)

4.3.3 Absolute ethanol และ 70 % ethanol (Merck, Germany)

4.3.4 27F (forward primer) 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3' (Operon, Germany)

4.3.5 520R (reverse primer) 5' -ACCGCGGCKGCTGGC- 3' (Operon, Germany)

4.3.6 Master mix (Eppendorf, USA)

4.3.7 ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (TaKaRa SUPREC™ -PCR) (Takara, Japan)

4.3.8 O' GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas LIFE SCIENCES,USA)

4.3.9 loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES,USA)

4.3.10 ผงวุ้นอะกาโรส (agarose)

4.3.11 TE buffer (พีเอช 8.0)

4.3.12 1X TAE buffer

4.3.12 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

4.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

4.4.1 สารละลาย A : Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) (Fisher chemical, UK)
NaHO ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (Merck, Germany)

4.4.2 สารละลาย B : $CuSO_45H_2O$ ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) (Carlo erba, France)
Na-K-tartrate ความเข้มข้น 1.0 % (w/v) (Carlo erba, France)

4.4.3 สารละลาย C : สารละลาย A ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

4.4.4 สารละลาย D : Folin ciocateus phenol reagent (Merck, Germany)

4.4.5 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin; BSA) (Fluka, Switzerland)

4.4.6 แอมโมเนียมซัลเฟต (Merck, Germany)

4.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีน

4.5.1 SDS (Sodium dodecyl sulphate) ความเข้มข้น 10 % (w/v) (Fisher chemicals, UK)

4.5.2 Coomassie R-250 ความเข้มข้น 5 % (w/v) (Bio-rad,USA)

4.5.3 Tris base (Univar, Australia) (Univar, Australia)

4.5.4 Tricine (Bio-rad, USA) (Bio-rad, USA)

4.5.5 ß-mercaptoethanol (Bio-rad, USA)

4.5.6 Ammonium persulfate ความเข้มข้น 10 % (w/v) (Bio-rad, USA)

4.5.7 Glycerol ความเข้มข้น 87 % (w/v) และ Glycerol ความเข้มข้น 10 % (w/v) (Univar,

4.5.8 Glycerol ความเข้มข้น 10 % (w/v)

4.5.9 เจลสำเร็จรูป Ready Gel^R Precast Gels (BIO-RAD)

4.5.10 เมทานอล ความเข้มข้น 40 % (v/v) (Merck, Germany)

4.5.11 กรดอะซิติก ความเข้มข้น 10 % (v/v) (Merck, Germany)

4.5.12 Polypeptide SDS-PAGE standard (molecular weight marker) (Bio-rad, USA)

5. เครื่องมือ

5.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Metrohm

5.2 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ยี่ห้อ Microflow รุ่น Advanced Bio Safety Cabinet Class II

5.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (microcentrifuge) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Harrier

5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ HETTICH รุ่น EBA 12R

5.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ Binder

5.6 ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air over) ยี่ห้อ Binder

5.7 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscopy) ยี่ห้อ Olympus

5.8 เครื่อง Microwave ยี่ห้อ Sharp

5.9 เครื่อง PCR Sprint Thermal Cycler ยี่ห้อ Thermo hybrid รุ่น Spint

5.10 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance) ยี่ห้อ OHAUS

5.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (microbalance) ยี่ห้อ Metler Toledo

5.12 เครื่องแยกตัวอย่าง DNA (gel-eletrophopresis) ยี่ห้อ Bio-rad

5.13 เครื่องแยกตัวอย่างโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE apparatus) ยี่ห้อ Bio-rad

5.14 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Genesys 20

5.15 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin-Elmer รุ่น OGENE

5.16 เครื่อง Transluminator ยี่ห้อ Bio-rad

5.17 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ยี่ห้อ Pressure sterilizer Model No. 1941X

5.18 ตู้เย็นเก็บสารเคมี (refrigerator) ยี่ห้อ Mitsubishi

5.19 ตู้แช่แข็ง (deep freezer) – 80 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sanyo

6. อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ

6.1 บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

6.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125, 250 และ500 มิลลิลิตร

6.3 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร

6.4 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร

6.5 กระบอกตวง (measuring cylinder) ขนาด 100 และ 1, 000 มิลลิลิตร

6.6 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1, 000 มิลลิลิตร

6.7 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

6.8 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

6.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

6.10 ตัวกรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

6.11 Centri-sep columns (Applied Biosystems, USA)

6.12 Anaerobic jar

6.13 สำลี

6.14 ถุงพลาสติก

6.15 ช้อนตักสาร

6.16 ขวดเก็บสารเคมี

6.17 ไมโครปิเปตทิฟ

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์

1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง 4 แหล่ง คือ ตัวอย่างอุจจาระมนุษย์จากนักศึกษาเพศหญิงและชายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างมูลไก่จากอำเภอสันทรายในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างมูลโคจากฟาร์มโคในบริเวณใกล้เคียงกับมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มสุกรมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างใส่ในหลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อขนาด 16 X 150 มิลลิเมตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการแยกแบคทีเรียต่อไป

1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินขั้นต้น

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการแยกแบคทีเรียกรดแลตติก ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธี the direct plating (Noonpakdee *et al.*, 2003) ขั้นตอนแรกทำการเพิ่มจำนวน (enrichment) แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตร MRS ก่อน โดยการนำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเจริญมาเจือจางตามลำดับ (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสม 2 ระดับ มาเกลี่ยเชื้อ (spread) บนอาหารแข็งสูตร MRS ที่มีกลูโคส เข้มข้น 0.2 % (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร MRS จากนั้นเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7 % agar) ที่มีเชื้อทดสอบแต่ละชนิดผสมอยู่ มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.1% (v/v) โดยการทดลองนี้ใช้เชื้อทดสอบทั้งสิ้น 4 ชนิด คือ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นสังเกตดูลักษณะวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติก แล้วนำโคโลนีที่เกิดวงใสไปทำให้บริสุทธิ์

1.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์และการเก็บรักษาเชื้อ

เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่เกิดวงใสมาขีด (streak) ลงบนอาหารแข็งสูตร MRS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยง แยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในกลีซอลรอล 20 % (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Niamsup *et al.*, 2003)

2. การทดสอบฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ดัดแปลงจากวิธีการของ Schillinger and Lucke (1989)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดวงใสที่แยกได้จากข้อ 1.3 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนใส (supernatant) ที่ได้ มาทำการปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 5 นอร์มอล เพื่อลดอิทธิพลที่เกิดจากกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น และทำการเติมเอนไซม์คะตะเลสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อลดอิทธิพลที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในตัวอย่าง จากนั้นนำมากรองด้วยชุดกรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ที่มีขนาดรูประมาณ 0.2 ไมโครเมตร และเก็บของเหลวใสที่ได้จากการกรองไว้ในหลอด microcentrifuge ที่ปราศจากเชื้อ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบขั้นต่อไป

2.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ (Indicator bacterial strian)

แบคทีเรียทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบและสภาวะในการเพาะเลี้ยง

เชื้อทดสอบ	แกรม	อาหาร	สภาวะการเพาะเลี้ยง
Lactobacillus casei JCM 1134	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus fermentum JCM 1173	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus delbrueckii JCM 1012	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus gallinarum JCM 2011	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus crispatus JCM 5810	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus pentosus JCM 1558	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus agilis JCM 1187	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus thermotolerans JCM 11425	+	MRS	37 °C, anaerobic
Lactobacillus mucosae DMST 13345	+	MRS	37 °C, anaerobic
Enterococcus avium JCM 8722	+	MRS	37 °C, anaerobic
Enterococcus durans JCM 8725	+	MRS	37 °C, anaerobic
Enterococcus gallinarum JCM 8728	+	MRS	37 °C, anaerobic
Enterococcus faecium MJU 92	+	MRS	37 °C, anaerobic
Pediococcus pentosaceus MJU 78	+	MRS	37 °C, anaerobic
Pediococcus acidilactici MJU No.1	+	MRS	37 °C, anaerobic
Bacillus subtilis TISTR 008	+	BHI	37 °C, anaerobic
Bacillus cereus MJU	+	BHI	37 °C, anaerobic
Micrococcus luteus MJU	+	BHI	37 °C, anaerobic
Staphylococcus aureus TISTR 517	+	BHI	37 °C, anaerobic
Listeria monocytogenes DMST 1327	+	BHI	37 °C, anaerobic

ตาราง 1 สายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบและสภาวะในการเพาะเลี้ยง (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	แกรม	อาหาร	สภาวะการเพาะเลี้ยง
Listeria monocytogenes DMST 2871	+	BHI	37 °C, anaerobic
Listeria monocytogenes DMST 1783	+	BHI	37 °C, anaerobic
Listeria monocytogenes DMST 1783	+	BHI	37 °C, anaerobic
Listeria monocytogenes DMST 4553	+	BHI	37 °C, anaerobic
Listeria murrayi DMST 4564	+	BHI	37 °C, anaerobic
Streptococcus agalactiae DMST 11366	+	BHI	37 °C, aerobic
Streptococcus dysgalactiae DMTS 10953	+	BHI	37 °C, aerobic
Helicobacter pylori DMST 20165	+	BHI	37 °C, anaerobic
Escherichia coli MJU	-	BHI	37 °C, aerobic
Escherichia coli DMST 12743	-	BHI	37 °C, aerobic
Enterobacter aerogenes MJU	-	BHI	37 °C, aerobic
Serratia marcescens MJU	-	BHI	37 °C, aerobic
Salmonella typhimurium TISTR 292	-	BHI	37 °C, aerobic
Salmonella choleraesuis DMST 8014	-	BHI	37 °C, aerobic
Salmonella enteritidis DMST 15676	-	BHI	37 °C, aerobic
Vibrio cholerae DMST 2873	-	BHI	37 °C, aerobic
Vibrio parahaemolyticus DMST 5665	-	BHI	37 °C, aerobic

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกด้วยวิธี direct plating มาทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบจำนวน 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยวิธี well diffusion assay (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schillinger and Lucke, 1989) ดังนี้คือ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร MRS หรืออาจเป็นอาหารแข็งสูตร BHI (ขึ้นกับชนิดของเชื้อทดสอบที่ใช้) มาเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7% agar) หรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร BHI (0.7% agar) และมีเชื้อทดสอบแต่สายพันธุ์ที่ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.1 % (v/v)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

จากนั้นทำการเจาะหลุมบนอาหารด้วย cork borer ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร และหยอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7% agar) ลงไปเล็กน้อยเพื่อรองก้นหลุม จากนั้นนำของเหลวใสที่เตรียมไว้ข้างต้นตามข้อ 2.1 หยอดลงไปในหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3.0 % ที่ทำการเจือจางกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:16 เป็น positive control และอาหารเหลวสูตร MRS เป็น negative control จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน สังเกตดูวงใสที่เกิดขึ้น วัดค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อทดสอบตามขนาดวงใส (Noonpakdee *et al.*, 2003) เมื่อนำแบคทีเรียมาทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 36 ชนิด จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบมากที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท มาทำการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบดีที่สุด เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ลักษณะความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ดัดแปลงจากวิธีการของ Oh *et al.* (2000) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่งโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน เตรียมตัวอย่างของแบคเทอริโอซินตามขั้นตอนข้อ 2.1 จากนั้นนำแบคเทอริโอซินมาทดสอบคุณสมบัติการทนต่อความร้อน โดยนำไปแช่ไว้ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 65, 95 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40, 20 และ 20 นาที ตามลำดับ นำแบคเทอริโอซินมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ครั้งละ 2 เท่า ตามลำดับ (two fold dilution) (1:1, 1:2, 1:4 , 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64) จากนั้นนำไปทดสอบหาค่ากิจกรรมยับยั้งของแบคเทอริโอซินด้วยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

3.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ดัดแปลงจากวิธีการของ Oh *et al.* (2000) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาการปรับค่าพีเอชด้วยสารละลาย NaOH และสารละลาย HCl ความเข้มข้น 5 นอร์มอล ให้มีค่าเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปรับค่าพีเอชของแบคเทอริโอซินให้เป็น 6.5 และเติมเอนไซม์คะตะเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่านชุดกรองชนิดไนลอน ที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร แล้วทำการเจือ

จางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อครั้งละ 2 เท่า ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบค่ากิจกรรมยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่เหลืออยู่ด้วยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

3.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ดัดแปลงจากวิธีการของ Noonpakdee *et al.* (2003) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่งโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน เตรียมตัวอย่างของแบคเทอริโอซินตามขั้นตอนข้อ 2.1 จากนั้นนำแบคเทอริโอซินมาเติมเอนไซม์ proteinase K และ protease ลงไป ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ครั้งละ 2 เท่า ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบหาค่ากิจกรรมยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่เหลืออยู่ ด้วยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา

4.1.1 ศึกษา รูปร่าง การติดสีแกรม และการจัดเรียงตัวของเซลล์

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ไอโซเลท CF52 อายุ 18-24 ชั่วโมง มาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ นำสไลด์ผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์แน่นขึ้น จากนั้นทำการย้อมแบบแกรม (Gram's staining) โดยหยด crystal violet ให้ท่วมรอยเชื้อที่เกลี่ยไว้ นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำประปาเบา ๆ หยดสารละลายไอโอดีนลงไป ทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นล้างสี crystal violet ด้วย acetone alcohol เป็นเวลา 5-10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง ย้อมทับด้วยสี safranin เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสีทิ้งพร้อมกับล้างสีออกด้วยน้ำเบา ๆ ซับสไลด์ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะ รูปร่าง การติดสีแกรม การจัดเรียงตัวของเซลล์

4.1.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ไปขีดลงบนอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียที่เจริญเป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยว มาเกลี่ยลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นผสมด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3.0 % (w/v) ให้ท่วมรอยเชื้อที่

เกลี่ยไว้ สังเกตปฏิกิริยาการเกิดฟองหลังจากหยดสารละลาย ผลการทดสอบให้ผลบวกจะเกิดฟองก๊าซขึ้น ส่วนผลลบไม่เกิดฟองก๊าซ

4.1.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซ

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS broth ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) มาลนไฟจนร้อนแดง จากนั้นนำไปจุ่มลงไปในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ สังเกตปฏิกิริยาการเกิดฟองก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบให้ผลบวกจะเกิดฟองก๊าซจำนวนมากในอาหารเชื้อ ส่วนผลลบไม่เกิดฟองก๊าซในอาหารเชื้อ

4.1.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกรดและด่าง โดยนำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น

การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF 52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย NaCl ที่มีความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.5 และ 18.0 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH (Biomerieux)

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเซลล์ไปละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หยดสารละลายเซลล์ที่ได้ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยนับจำนวนหยดที่เติมลงไป จนได้ความขุ่นของสารละลายเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 2 เท่าของ McFarland แล้วใช้สารละลายเซลล์ปริมาตรเป็น 2 เท่าของจำนวนที่หยดที่เติมลงไปมาผสมกับอาหาร API 50 CHL นำอาหารที่มีสารละลายเซลล์ผสมอยู่หยดลงในหลอดเล็ก ๆ บนแผ่น strip จากนั้นหยดน้ำมัน (mineral oil) ทับผิวหน้า เพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

นำแผ่น strip นี้ไปวางในกล่องบ่ม (incubation box) ที่มีการเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลหลังจากการบ่ม เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดนั้นได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในหลอดเล็ก ๆ จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 จากสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีดำ เนื่องจากพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลการทดลองเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลในเว็บไซต์ API web™ (http: //apiweb.biomerieux.com)

4.3 การหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่งโมง ในสภาวะไร้อากาศ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Isoplant DNA extraction kit) โดยเติม solution I ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยเขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นเติม solution II ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 5-6 นาที แล้วนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม solution III ปริมาณ 150 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสส่วนบนออกมาปริมาตร 300 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เท absolute ethanol ทิ้งให้หมด แล้วเติม ethanol เข้มข้น 70 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เท ethanol ทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ให้ ethanol ระเหยออกให้หมด แล้วเติม TE buffer (pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อทำลาย RNA ที่อาจปนเปื้อนมา นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งจะได้ genomic DNA แล้วทำการวัดความเข้มข้นของ genomic DNA โดยใช้เครื่องวิซิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อใช้คำนวณความเข้มข้น genomic DNA ตามสูตรดังนี้

ความเข้มข้น DNA (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor

4.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reation (PCR)

นำ genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 จากข้อ 4.3.1 มาทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer ซึ่งมี primer 2 ชนิด คือ 27F (forward primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 520R (reverse primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3' (Operon, Germany) ซึ่งตรงกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง V_1-V_3 (ประมาณ 500 คู่เบส) ทำการเตรียมปฏิกริยาสำหรับการทำ PCR ให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย mastermix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Mg 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์, Taq DNA polymerase 1.25 U), primer 27F ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์), primer 520R ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์), genomic DNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อโมโครลิตร) เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ PCR Sprint Thermal Cycler (ยี่ห้อ Thermohybrid รุ่น Sprint) โดยตั้งโปรแกรมในการทำงานดังนี้

	Initial denaturetion	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
25 รอบ	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Annealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Extenstion	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Terminating	72 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้

4.3.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reation (PCR) แล้ว จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด TaKaRa SUPREC™ – PCR, Japan มีขั้นตอนดังนี้ ปิเปต PCR product ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (พีเอช 8.0) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวที่อยู่ในหลอด microcentrifuge ทิ้ง เติม TE buffer (พีเอช 8.0) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง และทำการขูด DNA ที่ค้างอยู่บนเยื่อกรอง (filter) ในคอลัมน์ให้หลุดออกมา คว่ำคอลัมน์ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งจะได้ PCR product บริสุทธิ์ที่มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร

4.3.4 ตรวจสอบขนาด DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (Agarose)

นำ PCR product บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบขนาด DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5 % (w/v) จากนั้นวางเจลที่มีหลุมที่ปลายด้านหนึ่งลงในเครื่อง run gel เทสารละลาย 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล เตรียม DNA ตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำ DNA ตัวอย่างที่ผสม loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำหยอดลงในหลุมบนเจล โดยใช้ O' GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas LIFE SCIENCES,USA) เป็น DNA marker ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) จากนั้นปิดฝาเครื่อง ตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 20 นาที นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Transluminator

4.3.5 การหาลำดับเบส DNA

เมื่อทราบขนาดของ DNA และการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนของยีน 16S rRNA โดยไม่มีสิ่งปนเปื้อนแล้ว จึงนำ PCR product บริสุทธิ์ส่วนที่เหลือไปทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ชั้น 5 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST เว็บไซต์ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งจะทำให้ทราบชนิดของจุลินทรีย์

5. การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

5.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

เตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 7 ชนิด คือ glucose, lactose, dextrin, fructose, maltose, sucrose และ sorbitol ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคเทอริโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

5.2 ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

นำแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินจากข้อ 5.1 มาหาระดับความเข้มข้นของชนิดแหล่งคาร์บอนที่ความเหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีส่วนประกอบของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 % (w/v) บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยง *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคเทอริโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

5.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน
(ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 8 ชนิด คือ beef extract, peptone, skim milk, urea, NH_4Cl, tryptone, ammonnium sulfate และ yeast extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยง *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 % (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคเทอริโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยใช้วิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน จำนวน 4 ชนิด เพื่อหาส่วนผสมของแหล่งไนโตรเจนในขั้นตอนต่อไป

5.4 การทดสอบหาส่วนผสมของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน
(ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ peptone, tryptone, beef extract และ yeast extract โดยเติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดแสดงดังตาราง 2 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

จากนั้นไปเลี้ยงเพาะเลี้ยง *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคเทอริโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

หลอดที่	แหล่งไนโตรเจน
1	Not added
2	0.5 % PP
3	1.0 % PP
4	0.5 % PP + 0.5 % TP
5	0.5 % PP + 1.0 % TP
6	0.5 % PP + 0.5 % YE
7	0.5 % PP + 1.0 % YE
8	0.5 % PP + 0.5 % BE
9	0.5 % PP + 1.0 % BE
10	0.5 % PP + 1.0 % TP + 0.5 % YE
11	0.5 % PP + 0.5 % BE + 0.5 % YE
12	0.5 % PP + 0.5 % TP + 0.5 % BE
13	0.5 % PP + 0.5 % TP + 0.5 % YE
14	0.5 % PP + 0.5 % TP + 0.5 % YE + 0.5 % BE

หมายเหตุ : PP (peptone), TP (tryptone), BE (beef extract) และ YE (yeast extract)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

5.5 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะของฟอสเฟสต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1.0, 2.0 , 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟส บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นโดยใช้วิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

5.5 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 7.0, 10.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งแมกนีเซียม บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

6.1 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Todorov and dicks, 2005)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v) ซึ่งเป็นอาหารสูตรดัดแปลงที่มีเหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่พีเอชต่าง ๆ คือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากนั้นไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

6.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v) โดยทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 15 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้น โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

6.3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Noonpakdee *et al.*, 2003)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS สูตรดัดแปลงที่มีความเหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวนทั้งสิ้น 36 หลอด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง จำนวนครั้งละ 3 ซ้ำ จนครบชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

7. การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์บางส่วน

7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวใสมาทำการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 แยกของเหลวใสส่วนหนึ่งออกมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry *et al.* (1951) นำของเหลวใสที่เหลือไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อย ๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยลงในของเหลวใส จำนวน 472 กรัมต่อลิตร (70 % saturation) กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากของเหลวใส นำตะกอนโปรตีนที่ได้ซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม มาละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายโปรตีนออกมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน นำสารละลายโปรตีนที่เหลือไปทำการแยกเกลือออกจากสารละลายในขั้นตอนต่อ ไป

7.2 ทำการแยกเกลือออกจากสารละลายแบคเทอริโอซินโดยผ่านกระบวนการ gel filtration

นำสารละลายโปรตีนไปทำการแยกเกลือออก โดยผ่านกระบวนการ gel filtration ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ ทำการเติมน้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากอิออน (deionized water) ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ Centri – sep จำนวน 20 คอลัมน์ ซึ่งภายในคอลัมน์มีเจลบรรจุอยู่ ทำการผสมส่วนของเจลกับน้ำให้เข้ากัน เจลจะฟองตัวเต็มคอลัมน์ ทำการไล่ฟองอากาศภายในเจลออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อไล่น้ำออกจากเจล จะได้เจลที่มีผิวหน้าตัดเฉียง จากนั้นทำการหยดสารละลายแบคเทอริโอซินลงไปบนผิวหน้าเจลในแต่ละคอลัมน์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร นำคอลัมน์ไปวางบนหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ได้สารละลายแบคเทอริโอซิน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน นำส่วนสารละลายแบคเทอริโอซินที่เหลือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

7.3 การแยกสารแบคเทอริโอซินโดยวิธี tricine sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE)

นำตัวอย่างสารแบคเทอริโอซินมาทำการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโปรตีน โดยวิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAGE ซึ่งใช้เจลสำเร็จรูป Ready Gel® Precast Gels (BIO-RAD) ก่อนใช้ทำการตัดเทปกาวสีดำตามยาวแล้วดึงออก จากนั้นดึงซี่หวีออกจากแผ่นเจลอย่างระมัดระวัง ล้างหลุมเจลด้วยน้ำปราศจากอิออน จากนั้นประกอบแผ่นเจลกับชุด SDS-PAGE (BIO-RAD) แล้วเทสารละลาย running buffer ลงไป แล้วนำตัวอย่างแบตเทอริโอซินผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที ก่อนที่นำไปหยดในช่องบนเจล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐาน (Polypeptide SDS-PAGE standard) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดในช่องบนเจล จากนั้นทำการแยกตัวอย่างด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน คือ เจลส่วนแรกทำการตรึงตัวอย่างด้วย สารละลาย destaining เป็นเวลา 30 นาที ต่อมาย้อม Coomassie blue stain และล้างออกด้วย destaining เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตแถบโปรตีน จากนั้นนำไปเก็บรักษาในกลีเซอรอล เข้มข้น 10.0 % (v/v) และเจลส่วนที่สองทำการตรึงตัวอย่างด้วยสารละลาย destaining เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากอิออนครั้งละ 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นย้ายเจลส่วนที่สองไว้ในจานเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทำการเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7 % agar) ที่มีเชื้อทดสอบผสมอยู่ 0.1 % (v/v) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณที่เกิดวงใส จากนั้นนำเจลส่วนแรกและส่วนที่สองเทียบหามวลโมเลกุลแบคเทอริโอซิน โดยทำการเทียบตำแหน่งจุดศูนย์กลางการเกิดวงใสของเจลส่วนที่สอง ตรงกับตำแหน่งของแถบโปรตีนใดในส่วนของเจลส่วนแรก ทำให้ทราบมวลโมเลกุลโปรตีนของแบคเทอริโอซินชนิดนี้