ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วัสดุอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วัสดุอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดันไอ (ALP, KT-30L)

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Sigma, 1K 15)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (Jeol -JSM-5410)

ชุด DNA electrophoresis (Gelmate 2000)

ชุด Protein electrophoresis (Hoefer SE 245)

Speed vac (Savant SC 210A)

เครื่องวัด pH (Metrohm, 713)

เครื่องชั่ง (Precisa 300A)

Dark reader transilluminator

ตู้บ่ม (Memmert)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (0.2% glucose) 1,000 ml

peptone from casein	10	g
meat extract	8	g
yeast extract	4	g
D–glucose	2	g
di- potassium hydrogen phosphate	1	g
tween 80	1	ml
di- ammonium hydrogen citrate	2	g
sodium acetate	5	g
magnesium sulfate	2	g
manganese sulfate	0.04	g

ชั่งส่วนผสมละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml นำไป autoclave เป็นเวลา 15 นาที

2.2 MRS agar (0.2% glucose)

เตรียมเช่นเดียวกับ MRS broth (0.2% glucose) และผสม agar 15 g

2.3 BHI broth

ชั่ง BHI 37.5 g ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml นำไป autoclave เป็นเวลา 15 นาที

2.4 BHI agar

เตรียมเช่นเดียวกับ BHI broth และผสม agar 15 g

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารสำหรับสกัด plasmid DNA

1. การเตรียมสาร

1.1 สารละลายที่ 1 (6.7% sucrose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA)

sucrose	6.7	g
Tris base	0.606	g
EDTA	0.0372	g

ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH เป็น 8 และนำไป autoclave

1.2 สารละลายที่ 2 (25 mM Tris)

ชั่ง Tris base 0.303 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH เป็น 8 และนำไป autoclave

1.3 สารละลายที่ 3 (0.25 M EDTA, 50 mM Tris)

Tris base	4.65	g
EDTA	0.303	g

ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่น 50 ml ปรับ pH เป็น 8 และนำไป autoclave

1.4 สารละลายที่ 4 (20 mM EDTA, 50 mM Tris)

Tris base	0.606	g
EDTA	0.745	g

ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH เป็น 8 และนำไป autoclave

1.5 สารละลายที่ 5 (2M Tris-HCl)

ชั่ง Tris HCl 12.6 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 40 ml ปรับ pH เป็น 7 และนำไป autoclave

1.6 สารละลายที่ 6 (5M NaCl)

ชั่ง NaCl 11.68 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 40 ml ปรับ และนำไป autoclave

1.7 สารละลายที่ 7 (1 mM EDTA, 10 mM Tris)

Tris base	0.12	g
EDTA	0.037	g

ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH เป็น7.5 และนำไป autoclave

หมายเหตุ : ปรับ pH ของสารละลายด้วย NaOH หรือ Acetic acid

1.8 สารละลายที่ 8 Tris-acetate buffer (50X TAE)

glacial acetic acid	5.7	g
Tris base	24.2	g
EDTA	3.7	g

ชั่งส่วนผสมละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH เป็น 8 และนำไป autoclave

1.9 สารละลายที่ 9 Tris-acetate buffer (1X TAE)

นำสารละลาย 50x TAE ปริมาตร 20 ml มาเติมด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml

1.10 สารละลายที่ SDS

ชั่ง SDS 2 g ละลายในสารละลายที่ 4 ปริมาตร 10 ml

1.11 สารละลายที่ lysozyme

ชั่ง lysozyme 0.02 g ละลายในสารละลายที่ 2 ปริมาตร 1 ml

1.12 สารละลาย RNase

ชั่ง RNase 0.01 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ml

1.13 สารละลาย 3N NaOH

ชั่ง NaOH 0.12 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 ml นำไป autoclave

1.14 gel electrophoresis

1.14.1 loading dye

bromophenol blue	0.25	%
sucrose in water	40	% (w/v)

ชั่งส่วนผสมต่างๆ และเก็บไว้ในที่มืด

1.14.2 1% agarose gel

ชั่ง agarose 1 กรัม ละลายในสารละลาย 1X TAE 100 ml นำไปอุ่นให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารสำหรับ Tricine-SDS-PAGE

(Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

1. การเตรียมสาร

1.1 การเตรียม separating gel และ stacking gel

	separating gel (10%)		stacking gel (5%)	
น้ำกลั่น	1.406	ml	1.556	ml
30 % acrylamide	1.96	ml	0.324	ml
Tris-Cl/SDS (pH8.45)	2.0	ml	0.62	ml
glycerol	0.634	ml	-	
10% ammonium persulfate	10	µl	10	µl
TEMED	2	µl	2	µl

- 30 % acrylamide เตรียมโดย ชั่ง acrylamide 29 g และ bis acrylamide 1 g ผสมและละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ml เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- Tris-Cl/SDS เตรียมโดยชั่ง Tris base 36.4 g เติมน้ำกลั่น 50 ml ปรับ pH เป็น 8.45 เติม SDS 3 g และเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 ml
- 10% ammonium persulfate เตรียมโดยชั่ง ammonium persulfate 1 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียม 2X Tricine sample buffer

1 M Tris-Cl pH 6.8	1	ml
glycerol	2.4	ml
SDS	0.8	g
DTT	0.31	g
coomassie blue G-250	2	mg
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

1.3 การเตรียม cathod buffer (1X)

Tris-base	12.11	g
trycine	17.92	g
SDS	1	g
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

1.4 การเตรียม anode buffer (1X)

Tris-base	24.22	g
น้ำกลั่น	500	ml
ปรับ pH เป็น 8.9 และเติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	ml

1.5 การเตรียม coomassie R 250 staining solution

Brilliant R 250	1	g
methanol	450	ml
glacial acetic acid	100	ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

1.6 การเตรียม destaining solution

methanol	450	ml
glacial acetic acid	100	ml
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่า bacteriocin activity ในหน่วย arbitrary unit (AU/ml)

arbitrary unit (AU) คือ หน่วยของค่าระดับความเจือจางต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

ยกตัวอย่าง

ระดับความเจือจางต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้คือ 1: 8 โดยใช้ culture supernatant ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ดังนั้นค่า bacteriocin activity จะเท่ากับ

culture supernatant 25 ไมโครลิตร วัดค่า bacteriocin activity ได้เท่ากับ 8 AU

ถ้าใช้ culture supernatant 1,000 ไมโครลิตร จะวัดค่า bacteriocin activity ได้เท่ากับ

$$(1{,}000 \times 8)/25 = 320 \text{ AU/ml}$$

ดังนั้นค่า bacteriocin activity ได้เท่ากับ 320 AU/ml