บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. เชื้อ Z. mobilis IFO 13756

   Z. mobilis CM 141 จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย-เชียงใหม่

2. สารเคมี

   2.1 Lysozyme

   2.2 Dipotassium ethylene diaminetetraacetic acid (K_2EDTA)

   2.3 NaCl

   2.4 Tris-HCl buffer

   2.5 Tris-HCl buffer 20 % sucrose

   2.6 Phosphate buffer

   2.7 NaOH

3. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)

   3.1 YPG broth

   3.2 YPG agar

   3.3 YPG agar และ osmotic stabilizer

4. อุปกรณ์อื่น ๆ

   4.1 Mc Cartney bottle

   4.2 Centrifuge (MSE)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 Bacterial counting chamber

4.4 Anaerobic jar

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อตั้งต้น

นำเชื้อ Z. mobilis CM 141, IFO 13756 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°ซ) ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงใน YPG broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดแรก 0.1 มิลลิลิตร ลงใน YPG broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 เขย่าให้เชื้อกระจายแล้วเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อโดยวิธีเดียวกันอีก 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายถ่ายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน YPG broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 30 °ซ เวลา 10 ถึง 12 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในระยะ log phase

2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

2.1 ศึกษาหาชนิดของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

นำเชื้อ Z. mobilis CM 141 ที่เพาะเลี้ยงใน YPG broth อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 ถึง 12 ชั่วโมง เทใส่ในขวดแมคคาร์ตนีขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทน้ำใสทิ้งล้างด้วย 0.001 M Tris-HCl buffer pH 8.0 (TB) 2 ครั้ง นำเซลล์มาทำให้เป็น suspension ด้วย 0.01 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ที่มีซูโครส 20 % (TBS) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วรีบเติม lysozyme ลงไป 5 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากันทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 15 นาที จึงเติมสารละลาย 0.01 M K_2 EDTA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

pH 7.0 ลงไป 1 มิลลิลิตร ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ lysozyme เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 3 ชั่วโมง นำเชื้อมาตรวจดูรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดลองใช้ 0.06 M phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.2 M glycerol ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการใช้ TBS

2.2 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์

นำบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1 มาเตรียม suspension ของเชื้อ Z. mobilis CM 141 โดยแบ่งความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ออกเป็น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.01 และ 0.001 M แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 แล้วนำเชื้อมาตรวจดูรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.3 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ K_2 EDTA

นำบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากที่ 2.1 และ 2.2 มาเตรียม suspension โดยแบ่งความเข้มข้นของ K_2 EDTA ออกเป็น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.01 และ 0.001 M ทำการทดลองตามลำดับเช่นเดียวกับข้อที่ 2.1 แล้วนำเชื้อมาตรวจดูรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.4 ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaCl

นำบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมมาเตรียม suspension ของเชื้อ Z. mobilis CM 141 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เติม lysozyme 5 มิลลิกรัมทันที นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย NaCl โดยแบ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย NaCl ออกเป็น 3 ระดับคือ 0.2, 0.5 และ 1.0 % โดยเติม 0.5 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารละลาย NaCl 5, 10 และ 20 % ตามลำดับ นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เติม 1 มิลลิลิตร ของ K_2 EDTA ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 ลงไป นำเชื้อไปบ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเซลล์ไปตรวจดูรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเตรียม suspension ของเชื้อ Z. mobilis CM 141 เติม lysozyme 5 มิลลิกรัม เติม NaCl และ K_2 EDTA ที่เหมาะสมทดลองตามลำดับ เช่นเดียวกับข้อ 2.4 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ° และ 37 °ซ เพื่อเปรียบเทียบ

2.6 การหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโปโตพลาสต์

ใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นมาทำการทดลองเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์ของเชื้อ Z. mobilis CM 141 และ IFO 13756 โดยแบ่งความเข้มข้นสุดท้ายของ Lysozyme เป็น 5 ระดับ คือ 2.0, 1.0, 0.5, 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยนำบัฟเฟอร์สารละลาย NaCl สารละลาย K_2 EDTA และอุณหภูมิที่เหมาะสมมาใช้ทำการทดลองตามลำดับเช่นเดียวกับในข้อ 2.4 ตรวจดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเซลล์ด้วย bacterial counting chamber แต่ละซ้ำนับจำนวนเซลล์อย่างน้อย 200 เซลล์ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์

3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

3.1 นำ suspension ของโปรโตพลาสต์ไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ทำให้โปรโตพลาสต์เจือจางในน้ำกลั่นแล้วนำไปเกลี่ย (spread) บน YPG agar

3.3 ทำให้โปรโตพลาสต์เจือจางบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม นำไปเกลี่ย บน YPG agar ที่มีซูโครส 20 % บน YPG agar ที่มี 0.2 M glycerol และบน YPG agar ที่มี 0.5 M lactose ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ใน anaerobic jar แล้วตรวจนับโคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved