พระมหาภูมิสาย สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

1.2.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ(refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

1.2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ(bench-top centrifuge)รุ่นD-7200 ของบริษัท GS, W.Germany

1.2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) รุ่น KM-15200 ของบริษัท Kubota , Japan

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Baush & Lomb, U.S.A.

1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 70 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

1.5 เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Eyela,Japan

1.6 เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) รุ่น W-385 ของบริษัท Heat System Ultrasonics, U.S.A.

1.7 เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary vaccuum evaporator) รุ่น N ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

1.8 เครื่องปั่น (homogenizer) รุ่น AM-T ของบริษัท Nihon Seiki Kaisha, Japan

1.9 ชุดเครื่องมือทำ tissue culture assay

1.9.1 จานพลาสติกที่มีหลุมขนาดเล็ก 96 หลุม (96-well microtiter plate) ของบริษัท Nunc, Denmark

1.9.2 หลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติก (plastic centrifuge tube) ของบริษัท Becton ,U.S.A.

1.9.3 ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture flask) ของบริษัท Becton, U.S.A.

1.9.4 ปิเปต (pipet) และปิเปตเอด (pipet aid)

1.9.5 กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) รุ่น CK ของบริษัท Olympus, Japan

1.10 ชุดเครื่องมือทำโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง(thin layer chromatography, TLC)

1.10.1 แผ่น TLC ขนาด 20 x 20 ซม. เคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel) G60 F254 หนา 0.2 มม.บนแผ่นอลูมิเนียม ของบริษัท Merck, Germany

1.10.2 ถังแก้วพร้อมฝาปิด (developing tank)

1.10.3 ชุดตรวจสอบ ประกอบด้วย

- เครื่องพ่น (spray)
- เครื่องเป่า (dryer)
- ตู้อบ (hot air oven) ตั้งอุณหภูมิได้ถึง 110° ซ
- เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-lamp) รุ่น UVL-21 ของบริษัท UVP,U.S.A.

1.11 ชุดเครื่องมือทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis, EP)

1.11.1 แผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate foil) รุ่น CA 250/0 ขนาด 50 x 200 มม. ของบริษัท Schleicher & Schull, W.Germany

1.11.2 เครื่องกำเนิดไฟฟ้า รุ่น 2301 microdrive 1 ของบริษัท LKB, Sweden

1.11.3 แชมเบอร์ (chamber)

1.11.4 ชุดตรวจสอบ

-เช่นเดียวกับ 1.10.3

1.12 ชุดเครื่องมือทำไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี(high performance liquid chromatography, HPLC)

1.12.1 ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan

1.12.2 ปั๊มแรงดันสูงชนิดสองหัว (double-head high pressure pump) รุ่น SP-D-2502 ของบริษัท Nihon Simitsu Kagaku, Japan

1.12.3 คอลัมน์ (column) ได้แก่

- Senshu Pak ODS-3251-D ขนาด 8.0x250 มม.ของบริษัท Senshu Scientific, Japan
- Develosil ODS-5 ขนาด 4.6x250 มม. ของบริษัท Nomura Chemical, Japan

1.12.4 เครื่องตรวจสอบ (detector) ได้แก่ spectrofluorometer รุ่น RF-530 ของบริษัท Shimadzu, Japan

1.12.5 เครื่องบันทึก (recorder) รุ่น R-111 ของบริษัท Shimadzu, Japan

1.13 Sep-Pak C18 cartridge รุ่น classic ของบริษัท Water,U.S.A.

1.14 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124 ของบริษัท ISSCO

2. สารเคมี

2.1 ouabain ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.2 veratridine ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.3 heptafluorobutyric acid ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

2.4 sodium 1-heptanesulfonate ของบริษัท Aldrich Chemical, U.S.A.

2.5 periodic acid ของบริษัท Merck, Germany

2.6 acetonitrile ของบริษัท Merck, Germany

2.7 methanol ของบริษัท Merck,U.S.A.

2.8 glacial acetic acid ของบริษัท Merck,U.S.A.

2.9 RPMI 1640 ของบริษัท Gibco ,U.S.A.

2.10 fetal bovine serum ของบริษัท Gibco,U.S.A.

2.11 trypsin-EDTA ของบริษัท Gibco,U.S.A.

2.12 Bio-gel P-2 ขนาด 200-400 เมช ของบริษัท Bio Rad, U.S.A.

2.13 สารมาตรฐาน

-tetrodotoxin ของ บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

-tetrodotoxin (5 MU/ml) ได้จาก Department of Domestic Science, Shikoku Women's University, Japan

-gonyautoxin 1,2,3 และ 4 (8.14,1.20,1.00,1.53 MU/ml ตามลำดับ) ได้จาก Marine Biological Chemistry Laboratory, School of Fishery Science, Kitasato University, Japan

-saxitoxin และ neosaxitoxin (6.9,9.4 MU/ml ตามลำดับ) ได้จาก Marine Biological Chemistry Laboratory, School of Fishery Science, Kitasato University, Japan

สารเคมีอื่นๆ เป็นสารเคมีในระดับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) จากบริษัทต่างๆ

3. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจากหอยแมลงภู่

1.1 การเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ ตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่นำมาวิจัยเก็บจากแหล่งเพาะเลี้ยงในทะเลซึ่งอยู่เขตตำบลบางทราย อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี แหล่งเพาะเลี้ยงดังกล่าวอยู่ห่างจากชายฝั่งประมาณ 2 กิโลเมตร โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากจุดต่างๆ ของเสาไม้ไผ่ที่หอยใช้ยึดเกาะ เสาละ 3 จุดๆละ ประมาณ 5 ตัว รวมได้ประมาณ 150 ตัว นำหอยแมลงภู่ทั้งหมดที่เก็บได้มาใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด และรีบนำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวิจัยต่อไป

1.2 การแยกแบคทีเรียจากส่วนเนื้อของหอยแมลงภู่

1.2.1 สุ่มเลือกตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่เก็บมา 20 ตัว ล้างบริเวณเปลือกด้านนอกด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ที่ปราศจากเชื้อ(steriled artificial sea water) (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ประมาณ 4-5 ครั้ง นำมาวางในจานแก้วเพาะเชื้อขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 14.0 ซม.) ที่สะอาด

1.2.2 แยกส่วนเนื้อของหอยออกมา ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ โดยใช้คีมคีบและกรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเนื้อหอยที่ได้ด้วยน้ำทะเลสังเคราะห์ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เก็บรวบรวมในขวดแก้วที่ปราศจากเชื้อโดยให้มีน้ำที่ล้างปนอยู่กับส่วนเนื้อหอยน้อยที่สุด

1.2.3 นำเนื้อหอยที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่น (homogenizer) โดยใช้ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน

1.2.4 ทำการแยกแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในเนื้อหอย โดยวิธี dilution spread plate method (ภาคผนวก ค.หมายเลข 1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 24 ชม.

การนับจำนวนแบคทีเรีย จะนับเฉพาะจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีแบคทีเรียระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดและสังเกตความแตกต่างของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

1.2.5 นำจานแก้วเพาะเชื้อที่นับจำนวนโคโลนีได้ระหว่าง 30-300 โคโลนีที่มีการกระจายของโคโลนีสม่ำเสมอ และมีความแตกต่างของโคโลนีมากกว่าจานอื่นๆมา

คัดแยกแบคทีเรียโดยใช้เข็มเขี่ย (needle) และลูป (loop) ที่ปราศจากเชื้อแตะโคโลนี แล้วนำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมเพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ ให้หมายเลขกำกับแต่ละโคโลนีที่แตะมา นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชม.

1.2.6 เก็บรักษาเชื้อที่คัดแยกได้ โดยใช้เข็มเขี่ยแตะโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์จากจานแก้วเพาะเชื้อที่ได้จากข้อ 1.2.5 แทง (stab) ลง และขีด (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง ORI ที่ใช้เป็นอาหารเก็บเชื้อ (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) นำไปบ่มที่สภาวะเดิมจนมีแบคทีเรียเจริญ เททับผิวหน้าอาหารด้วยพาราฟฟิน ออยล์ (paraffin oil) ที่ปราศจากเชื้อจนท่วมผิว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (stock culture) ต่อไป

1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้

1.3.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย(inoculum) ใช้ลูปเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากเชื้อที่เก็บไว้ประมาณครึ่งลูป ปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวก ก หมายเลข1) ปริมาตร 50 มล. ที่อยู่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker)ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชม.

1.3.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (cultivation) ถ่ายหัวเชื้อที่ได้ในข้อ 1.3.1 ปริมาตร 10 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิม ปริมาตร 200 มล. ที่อยู่ในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 500 มล. นำไปเขย่าโดยใช้สภาวะเดิม เป็นเวลา 48 ชม.

1.3.3 การวัดการเจริญของแบคทีเรีย ดูดเชื้อที่ได้ 10 มล. ใส่ในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ นำส่วนหนึ่งไปวัดความขุ่น ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (OD_{550}) อีกส่วนหนึ่งนำไปหาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี dilution spread plate method ดังภาคผนวก ค หมายเลข 1

1.3.4 การแยกสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียโดยนำเชื้อเหลวส่วนที่เหลืออีกประมาณ 200 มล. มาแยกส่วนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บเฉพาะส่วนเซลล์แบคทีเรีย ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) เข้มข้น 0.3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วน

น้ำใสออกทิ้ง ทำเช่นเดียวกันซ้ำอีกหนึ่งครั้ง จากนั้นจึงนำเซลล์แบคทีเรียมาเติมสารละลายกรดอะซิติค (acetic acid) เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ประมาณ 10-20 มล. จนได้ความเป็นกรดด่าง 3-4 นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) นาน 10 นาที โดยควบคุมให้เซลล์แบคทีเรียอยู่ในอุณหภูมิต่ำตลอดเวลา นำไปแยกส่วนตะกอนออกโดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนน้ำใส (supernatant) นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) ส่วนผงที่ได้คือสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย (cell extract)

1.3.5 การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย โดยชั่งน้ำหนักผงที่ได้อย่างละเอียด ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง (double distilled water) ปราศจากเชื้อ ปริมาตรน้อยที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 นาที เก็บเฉพาะส่วนน้ำใส สำหรับนำไปตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธี tissue culture assay ของ Kogure และคณะ(42)ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ก. <u>การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง</u>

1. เลี้ยงเซลล์ประสาทหนู (mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2A ATCC CCL 131) ในขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง (plastic cell culture flask) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงคือ RPMI 1640 (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จนมีปริมาณเซลล์มากพอและสภาพสมบูรณ์

2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากขวดจนแห้ง และเติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ (trypsin-EDTA) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.4) 2 มล. ดูดออกทิ้งเพื่อล้างเซลล์ที่ไม่ดีออกไป

3. เติมสารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ อีก 3 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ใช้มือเคาะที่ข้างขวด หรือเป่าด้วยปิเปตเอด (pipet aid) เพื่อให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดอยู่บนผิวขวดหลุดออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์อีก 2 มล.เขย่าเบาๆ ดูดเซลล์ที่แขวนลอย(cell suspension) ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อ นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ ความเร็ว 800 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง

4. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดปั่นเหวี่ยง 2 มล. ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อกระจายเซลล์ ดูดส่วนหนึ่งไปตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเครื่อง haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscope) โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า

5. เจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง ให้ได้ความเข้มข้น $1.0-1.5x10^5$ เซลล์ต่อมล.

ข. <u>วิธีการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียม</u>

1. ดูดเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมได้(ความเข้มข้น $1.0-1.5x10^5$ เซลล์ต่อมล.) ใส่ในหลุมของจานพลาสติก (96- well microtiter plate) หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 12 ชม.

2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกหลุมละ 40 ไมโครลิตร

3. เติมสารละลายที่ต้องการตรวจลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยดูดขึ้นลงและกวนเบาๆ

4. เติมสารละลายวอบาย (ouabain)เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.1) หลุมละ 20 ไมโครลิตร และสารละลายเวอราตริดีน (veratridine) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.2) หลุมละ10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีเดียวกัน

ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง และทำการทดลองชุดควบคุมควบคู่ไปด้วย โดยใช้สารมาตรฐาน tetrodotoxin ของบริษัท Sigma เข้มข้น 1,000, 500,200 และ 100 นาโนโมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 11.3)

5. นำจานไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 6 ชม.

6. นำออกมาตรวจนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro 2A ที่ยังมีชีวิต และจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดในแต่ละหลุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ กำลังขยาย 200 เท่า โดยสังเกตลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิต ซึ่งจะมีรูปร่างรี ผิวเซลล์เรียบ และมองเห็นขอบเซลล์ชัดเจน ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีชีวิตจะมีรูปร่างกลม ผิวเซลล์ขรุขระ และเห็นขอบเซลล์ไม่ชัดแม้ว่าจะปรับระยะชัดของกล้อง

7. คำนวนร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro 2A ที่ยังมีชีวิต (percentage of survival cells) และนำไปหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม โดยคิดเป็นสาร tetrodotoxin ได้จากกราฟมาตรฐาน

เปรียบเทียบปริมาณสารกึดขวางช่องโซเดียม ที่พบในสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียแต่ละหมายเลขที่แยกได้ คัดเลือกแบคทีเรียที่มีปริมาณของสารสูงสุดสำหรับใช้ในการวิจัยต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยยึดแนวจัดจำแนกตามหนังสือ Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology (45)

2.1 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) และ TCBS agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) มาศึกษารูปร่าง ขนาด สี และความโปร่งแสงหรือทึบแสงของโคโลนี

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

<u>การติดสีแกรม</u> ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI medium เป็นเวลา 24 ชม. ไปย้อมแกรม

<u>การเคลื่อนที่</u> นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ปลูกเชื้อแบบปักตรง (stab) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) ถ้าแบคทีเรียเจริญออกนอกรอยที่ปลูกแสดงว่าเคลื่อนที่ได้

2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

<u>การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ</u> เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2,4,6,8,10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ที่ 28 °ซ เป็นเวลา24 ชม. สังเกตการเจริญโดยวัดความขุ่น (OD_{550}) เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า

<u>การใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสรวมทั้งการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์</u> ปลูกแบคทีเรียแบบปักตรง และขีดลงในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง triple sugar iron agar (ภาคผนวก ก หมายเลข6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. ดูผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเอียง (slant) และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งตรง (butt) การเกิดฟองอากาศ รวมทั้งการเปลี่ยนเป็นสีดำของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ชุบสารละลายเตตตร้าเมทธิล 1,4 ฟีนิลีนไดแอมโมเนียมไดไฮโดรคลอไรด์ (tetramethyl-1,4-phenylenediammonium dihydrochloride) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) พอหมาด นำมาวางบนจานแก้วเพาะเชื้อที่สะอาด ใช้เข็มเขี่ยที่ทำด้วยลวดแพลตตินัม (platinum loop) แตะโคโลนีแบคทีเรียอายุ 24 ชม. มาขีดลงบนกระดาษกรองดังกล่าว สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามรอยขีด แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส

การสร้างอินโดล ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 11)เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจหาสารอินโดลที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายโคแวค(Kovacs reagent) (ภาคผนวก ข หมายเลข 7)โดยหยดสารละลายโคแวค 2-3 หยดลงในหลอดทดลองที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถสร้างอินโดลได้ บันทึกผลเป็นบวก

การทดสอบเมธิลเรด (Methyl-Red test) ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก หมายเลข 9)เป็นเวลา 48 ชม. เติมสารละลายเมธิลเรด (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ลงไป 2-3 หยด ถ้าเกิดสีแดงในอาหารบันทึกผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองบันทึกผลเป็นลบ

การทดสอบเมธิลคาร์บินอล (Voges-Proskauer test) ปลูกแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MR-VP (ภาคผนวก ก หมายเลข 9) เป็นเวลา 48 ชม.เติมน้ำยาทดสอบสารละลาย ก และสารละลาย ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) ลงไปอย่างละ 2-3 หยด ถ้าอาหารมีสีชมพูเกิดขึ้นภายใน 10 นาที บันทึกผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดสีชมพูให้ตั้งทิ้งไว้เพื่อดูผลภายใน24 ชม. ถ้าไม่มีสีชมพูเกิดขึ้น บันทึกผลเป็นลบ

วิธีการใช้น้ำตาลกลูโคส(Oxidation Fermentation test) ปลูกแบคทีเรียแบบปักตรง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง OF medium ที่เติมน้ำตาลกลูโคสจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) โดยต้มอาหารในน้ำเดือดเพื่อไล่อากาศออกก่อน ปิดทับผิวหน้าอาหารหลอดหนึ่งด้วยพาราฟฟิน ออยล์ สูงประมาณ 2 ซม. ส่วนอีกหลอดหนึ่งปล่อยไว้เฉยๆ นำทั้ง 2 หลอดไปบ่มที่ 28° ซ เป็นเวลา 24 ชม. อ่านผลโดยดูการขุ่นและการเปลี่ยนสีของอาหารทั้ง 2 หลอด ดังนี้

ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองแสดงว่า แบคทีเรียใช้น้ำตาลกลูโคสได้กรด โดยถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้ง 2 หลอด หรือหลอดที่ปิดทับด้วยพาราฟฟินเพียงอย่างเดียว แสดงว่าใช้น้ำตาลกลูโคสแบบ fermentation

ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่มีพาราฟฟินปิดทับแสดงว่า ใช้น้ำตาลแบบ oxidation

การทดสอบการเรืองแสงในที่มืด (luminescence) ปลูกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ORI เป็นเวลา 24 ชม. นำไปตรวจดูในที่มืดด้วยตาเปล่าเป็นเวลา 5-10 นาที แบคทีเรียที่เรืองแสงในที่มืดจะมองเห็นคล้ายแสงนีออนที่โคโลนีของแบคทีเรีย

3. การทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียบริสุทธิ์บางส่วน โดยโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์

คอลัมน์ที่ใช้ได้แก่ เซพแพค ซี18 (Sep-Pak C18 cartridge) และคอลัมน์ที่บรรจุไบโอเจล พี 2 (Bio-Gel P-2)

3.1 วิธีเตรียมคอลัมน์

3.1.1 คอลัมน์ เซพแพค ซี 18 เป็นคอลัมน์สำเร็จรูปของบริษัท Water, U.S.A. มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. และสูง 1.2 ซม. นำคอลัมน์ดังกล่าวมาล้างด้วยเมทธานอลประมาณ 20 มล. และน้ำกลั่นประมาณ 20 มล. ตามลำดับ

3.1.2 คอลัมน์ไบโอเจล พี 2 เตรียมขึ้นเอง โดยบรรจุไบโอเจล พี 2 ขนาด 200-400 เมช (mesh) ของบริษัท Bio-Rad Laboratiries,U.S.A.ที่นำมาผ่านการแอคติเวต (activation)โดยการแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 ชม.แล้ว ในกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ปริมาตร 10 มล. โดยบรรจุให้เจลสูง 6.0 ซม.ชะคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นจนคอลัมน์มีลักษณะคงตัว

3.2 วิธีเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยให้มีปริมาตรรวมประมาณ 1 ลิตร ดังวิธีในข้อ 1.4.1 และ 1.4.2

3.2.2 แยกสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียและเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ดังวิธีที่กล่าวแล้วในข้อ 1.4.4 และ 1.4.5

3.3 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ เซพแพค ซี 18 (Sep-Pak C18 cartridge)

3.3.1 ดูดสารละลายในข้อ 3.2.2 มา 2 มล. นำไปผ่านคอลัมน์เซพแพค ซี 18 ที่เตรียมไว้ โดยให้มีอัตราการไหล (flow rate) 1.0 มล.ต่อนาที จากนั้นจึงชะคอลัมน์ด้วยกรดอะซีติค เข้มข้น 0.3 โมลาร์ จำนวน 30 มล. เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา

3.3.2 ทำให้สารละลายที่ได้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง

3.3.3 ละลายผงที่ได้ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตรน้อยที่สุด

3.4 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์ ไบโอเจล พี 2 (Bio-gel P-2)

3.4.1 ผ่านสารละลายจากข้อ 3.3.3 ลงในคอลัมน์ ไบโอเจล พี 2 ที่เตรียมไว้ โดยให้มีอัตราการไหล 0.2 มล.ต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น 20 มล.จากนั้นจึงชะคอลัมน์ด้วยกรดอะซีติคเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ส่วนนี้

3.4.2 นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง

3.4.3 ละลายผงที่ได้ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตรน้อยที่สุด

3.5 ตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียม ในสารละลายที่เตรียมได้ ในข้อ 3.2.2 3.3.3 และ 3.4.3 โดยวิธี tissue culture assay ตามขั้นตอนที่กล่าวแล้ว

เปรียบเทียบปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารละลายจากแต่ละขั้นของการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคิดเป็นสาร tetrodotoxin ในสารสกัดจากเซลล์แห้ง 1 มก.

4. การวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมจากแบคทีเรียด้วยวิธีทางเคมีบางประการ

โดยใช้สารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ดังขั้นตอนที่กล่าวในข้อ 3.3 และ 3.4 แล้ว นำมาวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธีทางเคมี ได้แก่

-วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง (thin layer chromatography, TLC)

-วิธีอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis, EP)

-วิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC)

ทำการทดลองเทียบกับสารมาตรฐานกลุ่ม tetrodotoxin (TTXs) ได้แก่สารผสมของอนุพันธ์ TTX และ anhydro-TTX และ สารมาตรฐานกลุ่ม saxitoxin (STXs) ซึ่งได้แก่ สารผสมของอนุพันธ์ gonyautoxin 1,2,3 และ 4 (GTX 1-4) , saxitoxin (STX) และ neosaxitoxin (neoSTX)

4.1 วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง

หยด (spot) สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์และสารมาตรฐาน ลงบนแผ่น TLC สำเร็จรูปของบริษัท Merck ซึ่งเคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel) ขนาด 60G หนา 0.2 มม. ทำการทดลอง 2 ชุดโดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) คือ ไพริดีน (pyridine) : เอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate) : กรดอะซีติค (acetic acid) : น้ำ ในอัตราส่วน 15:5:3:4 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.1) นำแผ่น TLC ชุดที่ 1 มาพ่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.3) ส่วนชุดที่ 2 นำมาพ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.2) นำแผ่น TLC ทั้งสองชุดไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110°ซ นาน 10 นาทีเพื่อให้เกิด สารฟลูออโรฟลอร์ (fluorophore) และนำมาตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

คำนวณหาค่า retention factor (R_f) ของสาร ได้จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

4.2 วิธีอิเลคโตรโฟริซิส

หยดสารที่ต้องการวิเคราะห์และสารมาตรฐานเช่นเดียวกับในข้อ 4.1 ลงบนแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate membrane) ของบริษัท Schleicher & Scholl, Germany ทำการทดลอง 2 ชุด โดยใช้สารละลายอิเลคโตรไลท์บัฟเฟอร์ (electrolyte buffer) คือ ทริสบัฟเฟอร์ (tris buffer) เข้มข้น 0.08 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.7 (ภาคผนวก ข หมายเลข 13.1) ใช้ระบบกระแสคงที่(constant current system) โดยให้กระแสไฟ 0.8 มิลลิแอมแปร์(mA)ต่อความกว้างของแผ่นเซลลูโลสอะซีเตต 1 ซม. เป็นเวลานาน 1 ชม. นำแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตแผ่นหนึ่งมาพ่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.3) ส่วนอีกแผ่นหนึ่ง พ่นด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12.2) นำไปให้ความร้อนและตรวจดูการเรืองแสงโดยวิธีเดียวกับการทำ TLC

เปรียบเทียบระยะทางและทิศทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่กับสารมาตรฐาน

4.3 วิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

ระบบที่ใช้วิเคราะห์มี 2 ระบบ ได้แก่ ระบบสำหรับวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs และระบบสำหรับวิเคราะห์ สารกลุ่ม STXs

4.3.1 ระบบของ HPLC ที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid-chromatography)	; รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan
คอลัมน์(column)	; Senshu Pak ODS-3251-D, stainless steel ขนาด 8.0 x 250 มม. ของบริษัท Senshu Scientific, Japan
ปั๊มแรงดันสูงชนิดสองหัว (double-head high pressure pump)	; รุ่น SP-D-2502 U ของบริษัท Nihon Simitsu Kagaku, Japan
เครื่องตรวจสอบ (detector)	; spectrofluorometer รุ่น RF-530 ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องบันทึกผล (recorder)	; รุ่น R-111 ของบริษัท Shimadzu, Japan
โมบายล์เฟส (mobile phase)	; อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเฮปตาฟลูออโรบิวทิริกแอซิด(hepta-fluorobutyric acid) เข้มข้น 0.005 นอร์มัล และกรดอะซีติค เข้มข้น 0.05 นอร์มัล ความเป็นกรดด่าง 5.0 (ภาคผนวก ข หมายเลข 14.1.1) อัตราการไหล (flow rate) 0.4 มล.ต่อนาที
ตัวออกซิไดซ์ (oxidizing reagent)	; สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 4 นอร์มัล (ภาคผนวก ข หมายเลข 14.12) อัตราการไหล 0.3 มล.ต่อนาที

ฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร โดยใช้เข็มฉีดขนาดเล็ก (microsyringe) รุ่น SNR-702 ของบริษัท Hamilton, U.S.A. สารที่ผ่านออกจากคอลัมน์จะเกิดปฏิกิริยากับตัวออกซิไดซ์ ในหลอดเทฟลอน (teflon tube) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ความยาว 10 เมตรที่อุณหภูมิ 100°ซ และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งก่อนเข้าสู่เครื่องตรวจสอบ ซึ่งตั้งความยาวคลื่น excitation และ emission ไว้ที่ 381 และ 505 นาโนเมตร ตามลำดับ และบันทึกผลด้วยเครื่องบันทึกผล

4.3.2 ระบบของ HPLC ที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม STXs ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี	; เช่นเดียวกับข้อ 4.3.1
คอลัมน์	; Develosil ODS-5, stainless steel ขนาด 4.6 x 250 มม. ของบริษัท Nomura Chemical, Japan
ปั๊มแรงดันสูงชนิดสองหัว	; เช่นเดียวกับข้อ 4.3.1
เครื่องตรวจสอบ	; เช่นเดียวกับข้อ 4.3.1 โดยตั้งความยาวคลื่น excitation และ emission ที่ 330 และ 390 นาโนเมตร ตามลำดับ
เครื่องบันทึกผล	; เช่นเดียวกับข้อ 4.3.1

i17267286

โมบายล์เฟส

ก.สำหรับวิเคราะห์ GTX 1,2,3 และ4 ; โซเดียม 1-เฮปเทนซัลโฟเนต(sodium 1-heptane sulfonate)เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ในแอมโมเนียมฟอสเฟต (ammonium phosphate) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 14.3) อัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที

ข.สำหรับวิเคราะห์ STX, neoSTX ; สารละลาย ก ผสมกับอะซีโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 14.4) อัตราการไหล 0.8 มล.ต่อนาที

ตัวออกซิไดส์ (oxidizing reagent) ; กรดเปอร์ไอออดิก (periodic acid) เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 9.0 (ภาคผนวก ก หมายเลข 14.5) อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

สารละลายปรับความเป็นกรด (acidifying reagent) ; กรดอะซีติค เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 14.6) อัตราการไหล 0.4 มล.ต่อนาที

เครื่องตรวจสอบ ; เช่นเดียวกับข้อ 4.3.1

เครื่องบันทึกผล ; เช่นเดียวกับข้อ 4.3.1

ฉีดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 10-20 ไมโครลิตร โดยใช้ microsyringe รุ่น SNR-702 ของบริษัท Hamilton, U.S.A. เมื่อสารผ่านออกจากคอลัมน์จะเกิดปฏิกิริยากับ oxidizing reagent ในหลอดเทฟลอน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 มม. ความยาว 10 เมตร ที่อุณหภูมิ 65°ซ และปรับความเป็นกรดด่างด้วย acidifying-reagent ก่อนที่จะเข้าสู่เครื่องตรวจสอบการฟลูออเรสเซนซ์และบันทึกผลด้วยเครื่องบันทึกผล

<u>หมายเหตุ</u> ฉีดสารมาตรฐาน จนได้ค่า retention time คงที่ก่อน จึงฉีดสารที่ต้องการวิเคราะห์ เปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองระบบ

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีทั้ง 3 วิธี จะทำให้ทราบชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาศึกษาดังกล่าว

5. การศึกษารูปแบบของการเจริญ และการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวในสภาวะที่มีการเขย่า (shaking condition) และสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (standing condition)

5.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 300 มล. ดังวิธีในข้อ 1.4.1

5.2 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว ดังวิธีในข้อ 1.4.2

แบ่งขวดเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ชุดๆละเท่าๆกัน ชุดหนึ่งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ โดยมีการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ส่วนอีกชุดหนึ่งนำไปบ่มในสภาวะเดียวกัน โดยไม่มี การเขย่า ทำการทดลองเป็นเวลา 11 วัน (264 ชม.) โดยแต่ละช่วงเวลาของการบ่มจะดึงขวดเลี้ยงเชื้อทั้งสองชุดออกมา ครั้งแรกจะดึงออกมาเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 12ชม. หลังจากนั้น จะดึงออกมาเมื่อครบรอบการบ่มทุก 24 ชม. จนครบเวลา 264 ชม.

5.3 นำขวดเลี้ยงเชื้อที่ดึงออกมาแต่ละช่วงเวลามาทำการทดลองดังนี้

5.3.1 การวัดการเจริญของเชื้อ ดังวิธีในข้อ 1.4.3

5.3.2 การแยกสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ดังวิธีในข้อ 1.4.4

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว นำมา 30 มล. ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ประมาณ 3-4 ด้วยกรดอะซีติค นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง เก็บผงที่ได้

5.3.3 การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรีย ดังวิธีในข้อ 1.4.5

5.3.4 การเตรียมสารละลายที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว

5.3.4.1 ชั่งน้ำหนักผงของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่ได้ในข้อ 5.3.2 อย่างละเอียด (ระหว่าง 0.2-0.3 กรัม) ใส่ในขวดรูปกรวย เติมแอบโซลูท เมทธานอลที่มีกรดอะซิติค 1 เปอร์เซ็นต์ 30 มล. เขย่าด้วยมือนาน 5 นาที

5.3.4.2 ปั่นแยกชั้นเมทธานอลออก เก็บในขวดระเหยรูปกลม ทำการสกัดเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง เก็บรวบรวมชั้นเมทธานอล

5.3.4.3 ระเหยเมทธานอลออก ด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (rotary evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ 60°ซ

5.3.4.4 เติมเมทธานอลลงไปในขวดระเหยอีก 30 มล. เขย่าและปั่นแยกตะกอนออก เก็บชั้นเมทธานอล และระเหยออก ดังวิธีในข้อ 5.3.4.3

5.3.4.5 ทำซ้ำข้อ 5.3.4.3 และ 5.3.4.4 อีก 1 ครั้ง

5.3.4.6 ละลายผงแห้งที่ได้ ด้วยน้ำกลั่นสองครั้งปริมาตรน้อยที่สุด ถ้ามีตะกอนให้ปั่นแยกออก เก็บส่วนน้ำใส

5.4 ตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารละลายที่เตรียมได้ ในข้อ 5.3.3 และ 5.3.4.6 โดยวิธี tissue culture assay ดังขั้นตอนที่กล่าวแล้วในข้อ 1.4.5 ก และ ข

เปรียบเทียบปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละช่วงเวลาของการบ่ม โดยคิดเป็นสาร tetrodotoxin ใน 1 มิลลิลิตร เลือกสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียบางช่วงเวลา นำมาวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มที่เหมาะสม เปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้