บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 เชื้อแบคทีเรีย

Burkholderia pseudomallei สายพันธุ์ PSU4, PSU6, PSU9, PSU12, PSU68, PSU69, BKPN100, PAT41, PATNAR31, SK31 และ SK39 แยกได้จากสิ่งแวดล้อมภาคใต้ของประเทศไทย สายพันธุ์ BP2182-11 และ BP1856-12 แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

Acinetobacter spp., *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Muller Hinton agar (MHA)	บริษัท Difco
Muller Hinton broth (MHB)	บริษัท Difco
Nutrient agar (NA)	บริษัท Difco
Trypticase Soy broth (TSB)	บริษัท Difco
Tryptone	บริษัท Difco
Yeast extract	บริษัท Difco

2.1.3 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	Molecular weight	บริษัทผู้ผลิต
Acrylamide (C_3H_5NO)	71.1	Merck
Albumin	67,000	Merck
Ammonium chloride (NH_4Cl)	53.492	Merck

ชื่อสารเคมี	Molecular weight	บริษัทผู้ผลิต
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	80.04	BDH
Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.20	Sigma
Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Riedel de Haën
Anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4)	142.04	Carlo erba
Arabinose ($C_5H_{10}O_5$)	150.1	Sigma
N,N'-Methylene-bis-acrylamide ($C_7H_{10}N_2O_2$)	154.2	Sigma
Blue dextran	$2X10^6$	Sigma
Bovine serum albumin	67,000	Fluka
Bromophenol blue	669.99	Fluka
Chymotrypsinogen A	25,000	Merck
Coomassie brilliant blue G250 ($C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$)	854.03	Merck
Coomassie brilliant blue R250	-	Fluka
Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose)	-	Whatman
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	174.18	Merck
Ethanol (C_2H_5OH)	46.07	BDH
Glacial acetic acid (CH_3OOH)	60.05	Merck
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	180.2	Sigma
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	92.09	BDH
Glycine ($C_2H_5NO_2$)	75.07	Fluka
Hydrochloric acid (HCl)	36.46	Merck
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	245.48	BDH
Methanol(CH_3OH)	32.04	BDH
N, N',N',N, tetramethylenediamine (TEMED)	116.2	Promega
Ovalbumin	43,000	Merck
Phosphoric acid (H_3PO_4)	98.00	Sigma

ชื่อสารเคมี	Molecular Weight	บริษัทผู้ผลิต
Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)	294	Sigma
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	136.09	Merck
Ribonuclease A	13,700	Merck
Sodium chloride (NaCl)	58.443	Carlo Erba
Sodium hydroxide (NaOH)	40	Merck
Tris (hydroxymethyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)	121.114	Promega

2.2 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, Japan)
2. คอลัมน์แก้วขนาด1.1X84 และ2.4 X 20 เซนติเมตร
3. เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงสำหรับอิเล็กโทรฟอรีซิส (power supply) (Bio-Rad, U.S.A)
4. เครื่องเก็บแยกสารละลายแยกส่วน (fraction collector) (Bio-Rad, U.S.A)
5. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่งรุ่น FA-200 (AND, Japan)
6. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบตั้งโต๊ะรุ่น H-103N (Kokusan, Japan)
7. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้รุ่น Sorvall RC5C (Dupont, Korea)
8. เครื่องวัด pH (pH meter) รุ่น 713 (Metrohm, Switzerland)
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)รุ่น Lambda25 (Perkin Elmer, U.S.A)
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)รุ่น UV-1201V (Shimadzu, Japan)
11. ชุดเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Bio-Rad, U.S.A.)
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Heraeus, Germany)
13. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น INNOVA 4000 (New Brunswick Scientific, U.S.A)

14. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BH143AS (Gelman, Australia)

15. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-320 (Tomy, U.S.A)

16. หลอดปั่น รุ่น Centriprep YM-10 (Milipore, U.SA)

17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)

18. Automatic pipette (Eppendorf, Germany)

2.3 วิธีการ

2.3.1 การทดสอบความสามารถของ *Burkholderia pseudomallei* ในการใช้น้ำตาล arabinose (Wuthiekanun, *et al*., 1996)

เลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ใน TSB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปรับเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland เจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 ดูดเชื้อ 3 ไมโครลิตร หยดลงบน arabinose agar (ภาคผนวก ก.1) โดยมี glucose agar (ภาคผนวก ก.2) เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงอ่านผล ผลบวกเชื้อจะเจริญบน arabinose agar และ glucose agar ผลลบ เชื้อจะเจริญเฉพาะ glucose agar

2.1.2 การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆจากดิน (ดัดแปลงจาก Casida, 1968)

เก็บตัวอย่างดินจากภาคใต้ ภาคเหนือ และภาคกลาง โดยเก็บดินใส่ถุงพลาสติก ตัวอย่างละประมาณ 5 กรัม 79 ตัวอย่าง ชั่งดิน 1.0 กรัม ละลายใน 0.85% โซเดียม คลอไรด์ (NaCl) 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อทำลาย vegetative cell เป็นเวลา 3 นาที นำไปเจือจางด้วย 0.85% โซเดียม คลอไรด์ ให้ได้ความเจือจางเป็น 10^{-2} และ 10^{-3} ดูดสารละลายที่เจือจางเป็น 10^{-2} และ 10^{-3} อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก.6) แล้วใช้ spreader เกลี่ยให้ทั่วบนผิวอาหารจนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย Bacillus คือแห้งขรุขระ นำไปย้อมสีแกรมเพื่อยืนยันว่าเป็นแบคทีเรียรูปแท่งติดสีแกรมบวกและสร้างสปอร์ จากนั้นทำการเก็บโคโลนีไว้เพื่อศึกษาต่อไป

2.1.3 การคัดเลือก *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* โดยวิธี agar well diffusion assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Kirby-Bauer มาลัย วรจิตร และพนิดา ชัยเนตร, 2525)

เลี้ยง *Bacillus* spp. ในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกส่วนใส (supernatant) ด้วยความเร็ว 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที ทดสอบส่วนใสโดยถ่ายเชื้อลงใน NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้น เก็บส่วนใสดังกล่าวทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* โดยเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* PSU68 (ara^-)ในอาหารเหลว TSB (ภาคผนวก ก.10) อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland จะได้เชื้อแบคทีเรียประมาณ $1.5x10^8$ cfu/ml. ใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มเชื้อป้ายบนอาหารแข็ง Muller Hinton agar (MHA) (ภาคผนวก ก.5) จากนั้นเจาะหลุมให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร เติมส่วนใสของน้ำเลี้ยง Bacillus 80 ไมโครลิตร ลงไปในหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของขอบวงใส (inhibition zone) ด้วย vernier caliper จากนั้นคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุดไว้ศึกษาต่อไป

2.1.4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง

2.1.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus* sp.

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. บน NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ Bacillus ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นเก็บเชื้อเพื่อทำการทดสอบในขั้นต่อไป

2.1.4.2 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง

นำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ใส่ในอาหารเหลว LB และ TSB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 2.5 มิลลิลิตร (1%) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 5 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณการเติบโตของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 660 นาโนเมตร และนำอีกส่วนไปปั่นที่ 3,000 g นาน 20 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* ตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.1.4.3 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการสร้างสารยับยั้ง

นำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ใส่ในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3.4.2 และปรับ pH เป็น 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ โดยใส่ฟลาสก์ละ 2.5 มิลลิลิตร (1%) จำนวน 4 ฟลาสก์ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยวัดปริมาณการเติบโตของเชื้อและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ทดสอบตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.1.4.4 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารยับยั้ง

นำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ใส่ในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ตามที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.3.4.2 และ 2.3.4.3 โดยใส่ฟลาสก์ละ 2.5 มิลลิลิตร (1%) จำนวน 4 ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยวัดปริมาณการเติบโตของเชื้อและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ทดสอบตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.1.4.5 การศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้ง

นำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ใส่ในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ตามที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.3.4.2 และ 2.3.4.3 จำนวน 3 ฟลาสก์ โดยใส่ฟลาสก์ละ 2.5 มิลลิลิตร (1%), 5 มิลลิลิตร (2%) และ 10 มิลลิลิตร (4%) บ่มที่อุณหภูมิได้จากข้อ 2.3.4.4 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยวัดปริมาณการเติบโตของเชื้อและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ทดสอบตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.1.4.6 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้ง

นำกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ใส่ในอาหารปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH ตามที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2.3.4.2 และ 2.3.4.3 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 2.3.4.5 บ่มที่อุณหภูมิที่เชื้อเจริญดีที่สุดจากข้อ 2.3.4.4 เขย่าด้วยความเร็ว 150

รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง โดยวัดปริมาณการเติบโตของเชื้อและเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ทดสอบตามวิธีในข้อ 2.3.3

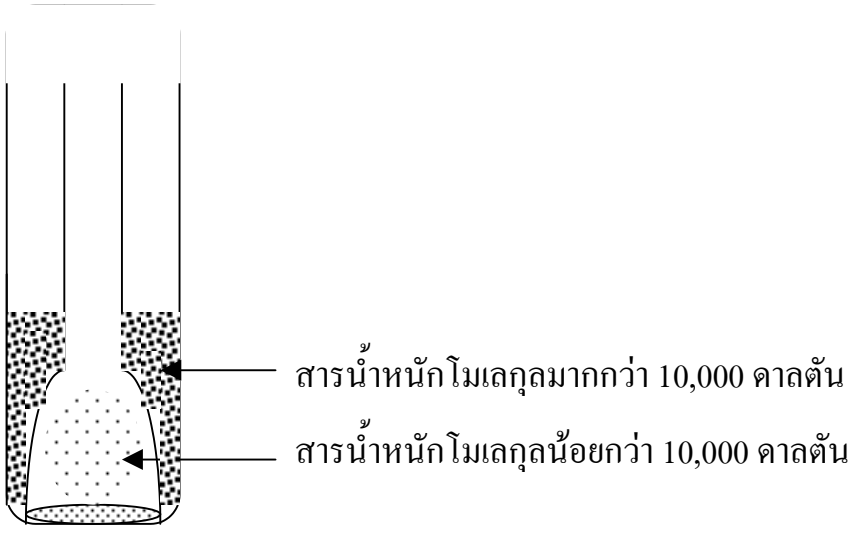
2.1.5 การเตรียมสารยับยั้ง

นำ *Bacillus* sp. มาเลี้ยงในอาหารในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3.4 จากนั้นนำมาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบต่อไป

2.1.6 การศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะ

2.1.6.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Centriprep

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3.5 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Centriprep YM-10 (บริษัท Milipore) ปั่น 1,912 g 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บสารละลายส่วนข้างนอก (น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน) และสารละลายส่วนข้างใน (น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดาลตัน) ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* ตามวิธีในข้อ 2.3.3



รูปที่ 2.1 หลอด centriprep YM-10

2.1.1.2 ผลของความร้อนที่มีต่อสารยับยั้ง

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3.5 มาทดสอบโดยแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม คือน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ให้ความร้อน ส่วนชุดที่ 2 เป็นชุดทดสอบจะนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที

และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *B. pseudomallei* ตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.1.1.3 ความสามารถของสารยับยั้งต่อแบคทีเรียชนิดอื่น

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3.5 มาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Acinetobacter spp, B. subtilis, E. faecalis*, *E. coli, K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa, Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus , S. pneumoniae* และ *B. pseudomallei* PSU69 (ara^+) ตามวิธีในข้อ 2.3.3 (ยกเว้นใช้ Muller Hinton Blood agar สำหรับเชื้อ *S. pneumoniae* และ *E. faecalis*)

2.1.1.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารยับยั้งต่อโครงสร้างของ *B. pseudomallei* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.3.5 มา 500 ไมโครลิตร เลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* PSU68 (ara^-) และ PSU69 (ara^+) ใน TSB ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland นำมาอย่างละ 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อ Bacillus บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 3000 g ให้เซลล์ตกตะกอนแล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

2.1.1.5 การหาค่า MIC และ MBC ของสารยับยั้งต่อ *B. pseudomallei* โดยวิธี broth dilution (มาลัย วรจิตร และพนิดา ชัยเนตร, 2525)

เลี้ยง *B. pseudomallei* ara^- หรือ ara^+ ในอาหารเหลว TSB 1-2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland จะได้เชื้อแบคทีเรียประมาณ $1.5x10^8$ cfu/ml. เจือจาง 1:100 ด้วย Muller Hinton broth (MHB) จะได้เชื้อแบคทีเรียประมาณ $5x10^5$ ตัวต่อมิลลิลิตร

เตรียมยา ceftazidime เป็นยาควบคุมให้ได้ความเข้มข้น 5,120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนใช้เจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จะได้ความเข้มข้นของยาเป็น 512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดูด MHB ใส่หลอดแก้ว 13x100 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรเริ่มจากหลอดที่ 2 จนถึงหลอดที่ 11 ส่วนหลอดที่ 12 ใส่ MHB 1 มิลลิลิตรเป็น negative control (แผนภูมิที่ 2.1) ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อ Bacillus จากข้อ 2.3.5 (สารยับยั้ง) ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดที่ 1 และ 2 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ทำ two fold dilution ตั้งแต่หลอดที่ 2 จนถึงหลอดที่ 10 ทำอีกชุดหนึ่งโดยใช้ยา ceftazidime เป็นตัวควบคุมเติมเชื้อ *B. pseudomallei* ลงในหลอดที่ 1-11 หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกันในหลอดที่มียา ceftazidime แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงจึงนำมาอ่านผล MIC จากนั้นนำหลอดที่ไม่ขุ่นทุกหลอดเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar (BA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียเป็นค่า MBC (มีแบคทีเรียขึ้นได้น้อยที่สุด 10 โคโลนี / 0.1 มิลลิลิตร)

แผนภูมิที่ 2.1 แสดงการหาค่า MIC และ MBC ของสารยับยั้งต่อ *B. pseudomallei*

หลอดทดลองที่	สารที่เติม			ความเข้มข้นสุดท้าย	
	MHB	สารยับยั้งหรือ ceftazidime	*B. pseudomallei* ara^- หรือ ara^+	สารยับยั้ง	ceftazidime
1		0.5	0.5	1:2	256
2	0.5	0.5	0.5	1:4	128
3	0.5	0.5	0.5	1:8	64
4	0.5	0.5	0.5	1:16	32
5	0.5	0.5	0.5	1:32	16
6	0.5	0.5	0.5	1:64	8
7	0.5	0.5	0.5	1:128	4
8	0.5	0.5	0.5	1:256	2
9	0.5	0.5	0.5	1:512	1
10	0.5	0.5	0.5	1:1024	0.5
11	0.5	-	0.5		
12	1	-	-		

2.1.7 การแยกสารสารยับยั้งในน้ำเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba

2.1.7.1 การตกตะกอนสารยับยั้งด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ *Bacillus* sp. มาเลี้ยงในอาหารในสภาวะที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.3.4 จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 13,000 g นาน 20 นาที เก็บส่วนใสปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40% ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แยกตะกอนที่ได้จากการปั่นด้วยความเร็ว 16,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนไปละลายด้วย Tris buffer (TB) (ภาคผนวก ข.5) แล้ว ไดอะไลซ์ (dialyse) ใน TB ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง นำสารที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. pseudomallei* ตามวิธีในข้อ 2.3.3 นำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอรด์และนำไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลจากนั้นนำสารที่เหลือไปแยกในขั้นตอนโครมาโตกราฟีต่อไป

2.1.7.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.7) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin)

2.1.7.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

(Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

เตรียมวุ้นโพลีอะคริลาไมด์ ตามวิธีประยุกต์ของ Davis (1964) โดยใช้วุ้นแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ซึ่งประกอบด้วยแผ่นวุ้น 2 ชั้น คือ วุ้นส่วนบน (stacking gel) ซึ่งมีความเข้มข้นของโพลิอะคริลาไมด์ 3% และวุ้นส่วนล่าง (separating gel) มีความเข้มข้นของโพลิอะคริลาไมด์ 4-10% โดยมีส่วนประกอบดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (3ml)	4% (2ml)	10% (2ml)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	5 ml	0.26 ml	0.66 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.38 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.0 ml	1.0 ml
10%Ammonium persulfate	30 μl	20 μl	20 μl
TEMED	3 μl	2 μl	2 μl
Distilled water	2.1 ml	0.72 ml	0.32 ml

จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน นำสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานมาทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 15 mA นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที จนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นวุ้น ปิดกระแสไฟ หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซิส ตัดแบ่งวุ้นออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปย้อมด้วยสีคูมาซีบลู เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยเปรียบเทียบตำแหน่งกับโปรตีนมาตรฐาน ส่วนที่สองนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่ากันตามขวาง 20 ชิ้น แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งโดยวางลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อ *B. pseudomallei* จากนั้นค่อยๆชะสารยับยั้งออกจากเนื้อวุ้นด้วย TB และส่วนที่สามนำวุ้นมาตัดเหมือนกับส่วนที่สอง หลังจากนั้นสะกัดสารจากวุ้นโดยนำวุ้นมาบดให้ละเอียดผสมกับ TB ปั่นแยกส่วนใสที่ความเร็ว 19,000 g และนำส่วนใสที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *B. pseudomallei* ตามวิธีในข้อ 2.3.3

2.1.1.4 การแยกสารยับยั้งโดยคอลัมน์ Sephadex G -50

ล้างและปรับคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาด 1x22 เซนติเมตร (ปริมาตร 17 มิลลิลิตร) ด้วยบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl, pH 8.8-10% กลีเซอรอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารยับยั้งที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการไดอะไลซ์แล้ว จากข้อ 2.3.7.1 มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราเร็วของการไหล 7 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.6 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรด์ฟอรด์ หลังจากนั้น

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ

2.1.1.5 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพหรือแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ประยุกต์ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยมีความเข้มข้นของวุ้นโพลิอะคริลาไมด์ 10-20% โดยมีส่วนประกอบดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel (μl)	Separating gel (μl)	
	3% (3ml.)	10% (2ml.)	20% (2ml.)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.30 ml	0.67 ml	1.33 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.75 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	0.50 ml	0.50 ml
0.2 M EDTA	30 μl	20 μl	20 μl
10%SDS	30 μl	20 μl	20 μl
10%Ammonium persulfate	30 μl	20 μl	20 μl
TEMED	30 μl	2 μl	2 μl
Distilled water	1.85 ml	0.77 ml	0.11 ml

ทำการเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 2.3.7.3 จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิสเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลและตัดวุ้นเพื่อตรวจสอบการยับยั้ง *B. pseudomallei* เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.3.7.3

2.1.8 การบ่งชี้ PSU82Ba ทางชีวเคมี

โดยเลี้ยงเชื้อ PSU82Ba ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงนำมาทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ BA, citrate, PR-glucose, PR-arabinose, PR-mannitol, OF-xylose, Gas of glucose, starch agar, skim milk agar, nitrate broth, indole, Tyrosine agar, casine agar, tributyrin agar, VP, gelatin, growth in 50, 60 องศาเซลเซียส และ growth in 7%NaCl บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน อ่านผลที่เกิดขึ้น