บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

Autoclave: Model HA-30, Hirayama Manufacturing Corperation, Japan.

Autopipette: Pipetman, Gilson, France.

Centrifuge: Microcentrifuge High Speed: Model 1110 Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Germany.

Centrifuge: Refrigerated centrifuge: Model J-21C, Beckman Instrument Inc., U.S.A.

Electrophoresis Unit: Model Mini-gel mate, BioRad, U.S.A.

Gel documentation: Syngene, U.S.A.

Incubator: Model OB-28L Fisher Scientific Inc., U.S.A.

Nuclear magnetic resonance apparatus: Varian UNITY-500 spectrometer, U.S.A.

Magnetic stirrer and heater: Model IKAMA® GRH, Janke & Kunkel Gmbh & Co.KG, Japan.

Orbital shaker: Gallenkamp, Germany.

pH meter: PHM 83 Autocal pH meter, Radiometer, Denmark.

Power supply: Model EC 135-90, E-C Apparatus Corperation.

Transformation apparatus: Gene pulser™: BioRad, U.S.A.

Sequencer: Model CEQ™ 8000 Genetic Analysis system, Beckman Coulter, U.S.A.

Spectrophotometer: Jenway 6400, England.

U.V. transilluminator: 2011 MA Crovue, San Gabrial, U.S.A.

Vortex: Model K 550-GE, Scientific Industries, U.S.A.

Water bath: Charles Hearson Co. Ltd., England.

3.2 สารเคมี

Agarose, SEAKEM LE Agarose, FMC Bioproducts, U.S.A.

Ammonium hydroxide, Merck, Germany.

Ammonium sulfate, Sigma, U.S.A.

Ampicillin, Biobasic Inc, Thailand.

Bacto-Agar, DIFCO, U.S.A.

Bovine Serum Albumin (BSA), Sigma, U.S.A.

Bromophenol blue, Merck, Germany.

5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal), Sigma, U.S.A.

Chloroform, Sigma, U.S.A.

Coomassie® brilliant blue R, Acros organics, Belgium.

Deoxyribonucleic acid, Promega, Co. Ltd., U.S

Di-potassium hydrogen phosphate anhydrous, Carlo Erba Reagenti, Italy.

Di-Sodium hydrogen phosphate, Fluka, Switzerland.

Dislysis tubing, Sigma, U.S.A.

Ethidium bromide, Sigma, U.S.A.

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), Fluka, Switzerland.

Ethyl alcohol absolute, Carlo Erba Reagenti, Italy.

Ficoll type 400, Sigma, U.S.A.

Fructose, Sigma, U.S.A.

Glucose, Sigma, U.S.A.

Glycerol, Scharlau, Spain.

Heavy water, Isotec Inc. Japan.

Hydrochloric acid, Lab Scan, Ireland.

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), Serva, Heidelberg, Germany.

Isoamyl alcohol, Merck, Germany.

Levan, patronizing by Professor Dr. Noshi Minamiura, Japan

Levanbiose, patronizing by Professor Dr. Noshi Minamiura, Japan

Magnesium sulfate 7-hydrate, BDH, England.

Methanol, Scharlau, Spain.

N, N'-dimethylformamid, Merck, Germany.

NNN'N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane, Carlo Erba Reagenti, Italy.

Phenol, BDH, England.

85% Phosphoric acid, Lab Scan, Ireland.

Potassium phosphate monobasic, Carlo Erba Reagenti, Itly.

Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany.

Qiaquick Miniprep Kit, Qiagen, Germany.

Sodium chloride, Univar, Australia.

Sodium dihydrogen orthophosphate, Carlo Erba, Italy.

Sodium dodecyl sulfate, Sigma, U.S.A.

Sodium hydroxide, Carlo Erba, Italy.

Sucrose, Sigma, U.S.A.

Tris-base, USB, U.S.A.

Tri-Sodium citrate dihydrate, Carlo Erba, Italy.

Tryptone, Scharlau, Spain.

Xylene cyanol FF, Sigma, U.S.A.

Yeast extract, Scharlau, Spain.

3.3 เอนไซม์สำหรับอณูพันธุวิศวกรรม

*Not*I, New England Biolabs Inc., U.S.A.

*Eco*RI, GIBCOBRL, U.S.A.

Lysozyme, Sigma, U.S.A.

Pfu polymerase, Promega, Co. Ltd., U.S.A.

Proteinase K, GIBCOBRL, U.S.A.

RNase A, Sigma, U.S.A.

T_4 DNA ligase,Promega, Co. Ltd., U.S.A.

Taq polymerase, Promega, Co. Ltd., U.S.A.

3.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli TOP10 ซึ่งมี genotype เป็น (F^- mcrA, Δ*(mrr-hsdRMS-mcrBC)* ϕ*80lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 deoR recA1 araD139* Δ*(ara-leu)7697galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

3.5 ดีเอ็นเอพาหะ

pGEM T-easy, Promega, Co. Ltd., U.S.A.

3.6 วิธีทดลอง

3.6.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Luria-Bertani broth (LB medium)

LB broth ประกอบด้วย tryptone 1% โดยน้ำหนัก yeast extract 0.5% โดยน้ำหนัก และNaCl 0.5% โดยน้ำหนัก ในกรณีที่ต้องการอาหารแข็งเพิ่ม Bacto agar 1.5% โดยน้ำหนัก สำหรับอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกโคลนเติม ampicillin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 μg/ml

Levan producing medium (LPM)

LPM เป็นอาหารสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลีแวน ประกอบด้วย sucrose 10% โดยน้ำหนัก yeast extract 0.5% โดยน้ำหนัก $(NH_4)_2SO_4$ 0.16% โดยน้ำหนัก K_2HPO_4 0.25% โดยน้ำหนัก และ $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.1% โดยน้ำหนัก ในกรณีที่ต้องการอาหารแข็งเพิ่ม Bacto agar 1.5% โดยน้ำหนัก ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.5-6.5

3.6.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลีแวน

แหล่งที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการคัดเลือกในงานวิจัยนี้คัดเลือกจากขนมไทยที่มีคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ข้าวต้มมัด บะจ่าง ข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง ข้าวเหนียวหน้ากุ้ง และข้าวเหนียวสังขยา อย่างละ 5 ตัวอย่าง จากตลาดยิ่งเจริญ เขตสายไหม กรุงเทพมหานคร โดยเลือกซื้อตัวอย่างขนมจากผู้ขายที่ทำขนมชนิดนั้น ๆ ขึ้นเอง เพื่อเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่พยายามคัดเลือก เก็บตัวอย่างในวันเสาร์ที่ 25 กุมภาพันธ์ 2549 เวลา 7.00 - 9.00 น. วางตัวอย่างขนมชนิดต่าง ๆ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างขนมชนิดละ 5 กรัมมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร คนจนเข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งให้ตะกอนนอนก้น แล้วนำส่วนใสด้านบนมาเจือจาง ดังแสดงในภาคผนวก ก จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ได้จางการเจือจางมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่ง

คาร์บอนหลัก ตั้งทิ้งข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง เลือก จุลินทรีย์ที่ปล่อยสารเมือกออกมานอกเซลล์ได้มาเขี่ยซ้ำ จนได้ จุลินทรีย์บริสุทธิ์ โดยตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารเมือกตามชนิดของขนมไทยโดยตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่ผลิตสารเมือกตามชนิดของขนมไทย (ภาคผนวก ข)

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตลีแวนโดยใช้แหล่งคาร์บอนจำเพาะ

เตรียมอาหารสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตลีแวนได้ (LPM) กระจายตัวอย่างขนมไทยชนิดต่าง ๆ ที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียที่สามารถผลิตลีแวนได้ ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ โดยใช้เทคนิค pour plate technique (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างกระจายอยู่ไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง แล้วเลือกเก็บโคโลนีที่ผลิตสารเมือกมาเขี่ยซ้ำ จนกว่าจะได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของโคโลนี เมื่อมองใต้กล้องจุลทรรศน์

เมื่อได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้ว นำมาเขี่ยลงในอาหาร LPM อีกครั้งหนึ่งเพื่อผลิตสารเมือก แล้วนำไปตรวจหาประเภทของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบโดย Saliwanoff's test ซึ่งมีวิธีการโดยสรุปคือ นำสารเมือกตัวอย่างที่ผ่านการไฮโดรไลซิสด้วย 5 M H_2SO_4 ที่ 100^{O}C และปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย $Ba(OH)_2$ แล้ว มาผสมกับ Saliwanoff'reagent (resorcinol 0.05 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (ปริมาตรกรด:น้ำเป็น 1:2) โดยผสมสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กับ Saliwanoff' reagent 3 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที สารตัวอย่างที่สามารถเปลี่ยน Saliwanoff' reagent เป็นสารละลายสีแดงเลือดนกได้ จัดเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำตาลคีโทสเป็นองค์ประกอบ

3.6.3 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตลีแวนได้

ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยหลักการทางจุลชีววิทยา

นำแบคทีเรียที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาระบุชนิด โดยอาศัยสัณฐานวิทยา เช่น การย้อมติดสีของผนังเซลล์ การสร้างสปอร์ รูปร่าง และตำแหน่งของสปอร์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ รวมถึงรูปร่างของโคโลนีในอาหารชนิดต่าง ๆ

ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยพิจารณาการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาระบุชนิด โดยพิจารณาจากการปฏิกิริยาทางชีวเคมี เช่น การสร้างแอลกอฮอล์จากการย่อยสลายน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตบางชนิดเช่น กลูโคส ฟรุกโทส ไซโลส แมนิทอล และอินนูลิน การผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น catalase oxidase และgelatinase ตลอดจนการสร้าง Acetone ในอาหารเลี้ยงเชื้อ VP โดยอาศัยหลักการของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

ระบุชนิดของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบ 16S rRNA

นำแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาหาลำดับเบสของ 16S rRNA ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

การเตรียมดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ถ่ายแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจากจานเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว LB แล้วนำไปเขย่าข้ามคืนที่ 37^{O}C จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยง 3,000 rpm นาน 5 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย SET (25 mM sucrous 50 mMEDTA และ 50 mM Tris-HCl) 450 ไมโครลิตร เติม lysozyme (20 mg/mL) 5 ไมโครลิตร RNase I (50 mg/mL) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 37^{O}C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K (20mg/mL) 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 50^{O}C ข้ามคืน เมื่อครบเวลานำสารละลายหนืดที่ได้มาเติม 5 M Potassium acetate pH 7.2 50 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เติมสารละลาย Saturated phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จนฟีนอล กระจายทั่วหลอด จากนั้นนำไปปั่นแยกสารละลาย Saturated phenol:chloroform:isoamyl alcohol และสารละลายใสออกจากกันที่ 10,000 rpm นาน 10

นาที จากนั้นดูดเก็บสารละลายใสด้านบนลงในหลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol 1.0 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาจนตะกอนดีเอ็นเอจับกันเป็นก้อน แล้วค่อยๆ เขี่ยตะกอนลงในหลอดใหม่ แล้วล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย สารละลาย TE (50 mM Tris-HCl และ 10 mM EDTA)

การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดย ยูวี สเปกโตโฟโตรมิเตอร์

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำให้เจือจางลงด้วย TE buffer แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของเบสพิวรีนและเบสพิริมิดีนที่ 260 นาโนเมตร โดยใช้ TE buffer เป็น blank

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ 16S rRNA สำหรับโคลน

นำดีเอ็นเอทั้งหมด (Total DNA) ที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ปฏิกิริยา มาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ 16S rRNA โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์ (dNTP) ให้แก่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ pA ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดง 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’ ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งนั้นใช้ pH’ ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดง 5’-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3’ โดยการเร่งปฏิกิริยาของ *vent* DNA polymerase โดยใช้เครื่อง Polymerase chain reaction จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ออกจากสารปนเปื้อนอื่นๆ ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยย้อมดีเอ็นเอด้วย Ethidium bromide แล้วตัดเจลที่เรืองแสงภายใต้ยูวีที่มาจากเครื่อง Gel documentation ออกมา โดยในการตัดเจลนั้นจะเลือกตัดเฉพาะดีเอ็นเอที่มีขนาด 1.6 kb ซึ่งเป็นขนาดของยีน 16S rRNA เท่านั้น

การโคลนยีน 16S rRNA

เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอของ 16S rRNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย Quick spin gel extraction kit แล้วเข้ากับดีเอ็นเอพาหะที่มีปลาย overhang-T ในปริมาณที่เหมาะสม โดยการเร่งปฏิกิริยาของ DNA Ligase แล้วนำไปบ่มที่ 4^{o} C ข้ามคืน

การคัดเลือกโคลน 16S rRNA

ส่งดีเอ็นเอพาหะที่เตรียมได้ในขั้นที่แล้วเข้าใน *E. coli* top-10 โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยอาศัยการทำงานของเครื่อง eletroporation จากนั้นเลี้ยง *E. coli* top-10 ในอาหารเหลว ที่ 37^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ *E. coli* top-10 ซ่อมแซมผนังเซลล์ จากนั้นนำมากระจายบนอาหารแข็ง LB-ampicilin ที่มี 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (x-gal) อยู่ 80 μg/mL และ isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 40 μg/mL อยู่ บ่มเชื่อข้ามคืนที่ 37^{o}C แล้วคัดเลือก *E. coli* Top-10 ที่มีโคลนของ 16S rRNA อยู่ โดย blue-white screening นำโคโลนีที่เลือกได้มาสกัดแยกดีเอ็นเอพาหะที่คาดว่าจะมีชิ้นยีน 16S rRNA อยู่ โดยวิธี alkaline lysis (Maniatis และคณะ, 2001) ซึ่งทำโดยผ่านลงบน Qiaquick Miniprep Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอพาหะที่สกัดได้มาตัดที่ลำดับเบสจำเพาะด้วย *Eco*RI แล้วตรวจสอบขนาดของ 16S rRNA gene ที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอพาหะ โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/*Hin*DIII

การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA

ในการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับยีนชนิดเดียวกันจากสิ่งมีชีวิตอื่น ในฐานข้อมูลโดย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul และคณะ, 1990)

3.6.4 การผลิตลีแวน

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง ข้ามคืน จากนั้นย้ายแบคทีเรีย 1 mL ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL ที่มีอาหาร LPM อยู่ 100 mL เขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ในขั้นนี้จะสังเกตได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความหนืดเพิ่มขึ้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง แยกเก็บสารละลายใส เติมเอทานอล 200 mL ลงในสารละลายใส เพื่อตกตะกอนพอลิเมอร์ ตั้งที่ 4 ^{o} C 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 50 mL จากนั้นตกตะกอนพอลิเมอร์ซ้ำด้วยเอทานอล เก็บตะกอนพอลิเมอร์ ละลายน้ำ

ปราศจากไอออน 25 mL แล้วนำไปกำจัดเกลือโดยการแลกเปลี่ยนกับน้ำกลั่น (Dialysis) กำจัดน้ำออกจากพอลิเมอร์โดย freeze-dried

3.6.5 ตรวจสอบพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียด้วย TLC และ ^{13}C-NMR

ตรวจสอบพอลิเมอร์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียด้วย TLC

หยดสารมาตรฐาน ได้แก่ ลีแวน โอลิโกลีแวน ฟรุกโทส กลูโคส ซูโครส และตัวอย่างพอลิเมอร์ที่ผ่านการไฮโดรไลซิสแล้วลงบน siliga gel 60 F_{254} plate เป่าให้แห้ง แล้วนำ siliga gel 60 F_{254} plate วางลงในถัง TLC ที่มีตัวทำละลายอิ่มตัว (butanol:acetic acid:water) ทั่วทั้งถัง ปล่อยให้สารเคลื่อนไปจนเกือบสุดปลาย siliga gel 60 F_{254} plate แล้วยก siliga gel 60 F_{254} plate ออกจากถัง TLC วางทิ้งให้แห้งในตู้ควัน จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย *N*-(1-napthtyl)-ethylenediamine ใน 5% sulfuric acid ซึ่งละลายอยู่ในเมทานอล นำไปอบที่ 120^{o} C นาน 10 นาที แล้วเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ (R_f) ของตัวอย่างน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพอลิเมอร์กับสารมาตรฐาน

ตรวจสอบลีแวนที่ผลิตโดยแบคทีเรียด้วย ^{13}C-NMR

ละลายพอลิฟรุกโทสที่เตรียมได้ใน 99.9 atom %D_2O ผ่านสารละลายลีแวนตัวอย่างไปใน ^{13}C-NMR (Varian UNITY-500 spectrometer) 125 MHz ตามลำดับ โดยใช้ probe temperature เป็น 80 ° C และ Relaxation delay เป็น 2 วินาที จากนั้นเปรียบเทียบตำแหน่งของ chemical signal ที่เกิดขึ้นกับ ลีแวน ลีแวนไบโอส และฟรุกโทสมาตรฐาน