ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหาร TSA

1.1 Casein Enzymic Hydrolysate	15	กรัม
1.2 Papaic Digest of Soyabean Meal	5	กรัม
1.3 Sodium Chloride	5	กรัม
1.4 Agar	15	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. การเตรียมอาหาร TSB

2.1 Casein Enzymic Hydrolysate	17	กรัม
2.2 Papaic Digest of Soyabean Meal	3	กรัม
2.3 Sodium Chloride	5	กรัม
2.4 Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม
2.5 Dextrose	2.5	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การเตรียมอาหาร TCBS

3.1 Proteose Peptone	10	กรัม
3.2 Yeast Extracts	5	กรัม
3.3 Sodium Citract	10	กรัม
3.4 Oxgall	8	กรัม
3.5 Sucrose	20	กรัม
3.6 Sodium Chloride	10	กรัม
3.7 Ferric Citrate	1	กรัม
3.8 Bromothymol Blue	0.04	กรัม
3.9 Thymol Blue	0.04	กรัม
3.10 Agar	15	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และต้มให้ละลายโดยไม่ต้องเข้าเครื่อง Autoclave

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การเตรียมอาหาร Decarbolylase Medium, Ornithine Modified

4.1 L-Ornithine	10	กรัม
4.2 Meat Peptone	5	กรัม
4.3 Yeast Extracts	3	กรัม
4.4 Bromeresol Purple Solution	5	มิลลิลิตร

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.5 นำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. การเตรียมอาหาร MR – VP

5.1 Buffered Peptone	7	กรัม
5.2 Dipotassium Phosphate	5	กรัม
5.3 Bacto Dextrose	5	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. การเตรียมอาหาร OF

6.1 Pancreatic Digest of Casein	2	กรัม
6.2 Sodium Chloride	5	กรัม
6.3 Dipotassium Phosphate	0.3	กรัม
6.4 Bromo Thymol Blue	0.08	กรัม
6.5 Agar	2	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้สารละลาย แล้วนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. การเตรียมอาหาร Motility

7.1 Tryptone	10	กรัม
7.2 Sodium Chloride	5	กรัม
7.3 Agar	5	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้สารละลาย แล้วนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. การเตรียมอาหาร MacConkey Agar

8.1 Peptone	17	กรัม
8.2 Proteose Peptone	3	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

8.3 Lactose	10	กรัม
8.4 Bile Salts	1.5	กรัม
8.5 Sodium Chloride	5	กรัม
8.6 Agar	13.5	กรัม
8.7 Neutral Red	0.03	กรัม
8.8 Crytal Violet	0.001	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้สารละลาย แล้วนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9. การเตรียม Triple Suger Iron Agar (TSI)

9.1 Polypeptone	20	กรัม
9.2 NaCl	5	กรัม
9.3 Lactose	10	กรัม
9.4 Sucrose	10	กรัม
9.5 Glucose	1	กรัม
9.6 Ferrous Ammonium Sufate	0.2	กรัม
9.7 Sodium Thiosulfate	0.2	กรัม
9.8 Phenol Red	0.025	กรัม
9.9 Agar	13	กรัม
9.10 น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 แล้วนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

10. การเตรียม Indole Test Broth

10.1 Tryptone	10	กรัม
10.2 NaCl	5	กรัม
10.3 Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม
10.4 น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.3 แล้วนำเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมบัฟเฟอร์

1. การเตรียม 0.01 M PBS สำหรับ 1 ลิตร

1.1 NaCl	8	กรัม
1.2 KCl	0.2	กรัม
1.3 Na_2HPo_4	1.15	กรัม
1.4 KH_2PO_4	0.2	กรัม

ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับ pH 7.4

2. การเตรียม Blocking Solution

2.1 Skin Milk	5	กรัม
2.2 0.01 M PBS	100	มิลลิลิตร

ผสม Skin Milk ให้เข้ากับ 0.01 M PBS แล้วใช้ทันที

3. การเตรียม TBS

3.1 Tris Base	2.42	กรัม
3.2 NaCl	29.24	กรัม
3.3 น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.5

4. การเตรียม TTBS

4.1 TBS	999	มิลลิลิตร
4.2 Tween 20	1	มิลลิลิตร

5. การเตรียม Semi - Dry Transfer Buffer

5.1 Tris	5.82	กรัม
5.2 Glysine	2.93	กรัม
5.3 SDS	0.0375	กรัม
5.4 Methanol	200	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

6. การเตรียม Citrate Buffer 0.1 M, pH 4.5

6.1 Sodium Citrate	29.4	กรัม
6.2 1% Merthiolate	10	มิลลิลิตร
6.3 น้ำกลั่น	990	มิลลิลิตร

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 4.5 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียม Polyacrylamide Gel

1. การเตรียม 4% Stacking Acrylamide Gel สำหรับ 2 มิลลิลิตร

1.1 น้ำกลั่น	1.40	มิลลิลิตร
1.2 30% Acrylamide Mix	0.33	มิลลิลิตร
1.3 0.5 M Tris (pH 6.8)	0.25	มิลลิลิตร
1.4 10% SDS	0.02	มิลลิลิตร
1.5 10% APS	0.02	มิลลิลิตร
1.6 TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันและใช้ทันที

2. การเตรียม 12% Stacking Acrylamide Gel สำหรับ 10 มิลลิลิตร

2.1 น้ำกลั่น	3.3	มิลลิลิตร
2.2 30% Acrylamide Mix	4.0	มิลลิลิตร
2.3 0.5 M Tris (pH6.8)	2.5	มิลลิลิตร
2.4 10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
2.5 10% APS	0.1	มิลลิลิตร
2.6 TEMED	0.008	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันและใช้ทันที

3. การเตรียม 1.5 M Tris (Running Gel Buffer)

3.1 Tris-HCl	3.692	กรัม
3.2 Tris-Base	15.39	กรัม
3.3 SDS	0.400	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 8.8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม 0.5M Tris (Stacking Gel Buffer)

4.1 Tris-HCl	0.315	กรัม
4.2 Tris-Base	7.470	กรัม
4.3 SDS	0.400	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 6.8 เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การเตรียม 30 % Acrylaminde Mix

5.1 Acrylamide	29.2	กรัม
5.2 BIS	0.8	กรัม

นำสารละลายที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บไว้ในที่มืดที่ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียม 5X Electrode Buffer สำหรับ 500 มิลลิลิตร

6.1 Tris-HCl	7.5	กรัม
6.2 Glycine	36	กรัม
6.3 SDS	2.5	กรัม

นำสารที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แต่การทดลองต้องใช้ 1X Electrode Buffer ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดั้งนั้นต้องเติม 5X Buffer 200 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

การเตรียมสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250

1. แม่สีเข้มข้น

1.1 ผงสี Coomassie Brilliant Blue R-250	25	กรัม
1.2 Methanol	600	มิลลิลิตร
1.3 Acetic Acid	120	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันโดยเขย่านานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง แต่ระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 1 คืน แม่สีนี้สามารถเก็บได้นานหลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

2. สีย้อม (Staining Solution)

2.1 Methanol	1,000	มิลลิลิตร
2.2 แม่สี	60	มิลลิลิตร
2.3 Acetic Acid	200	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันหากเกิดการตกตะกอนให้ทำการกรองสีด้วยกระดาษกรอง แม่สีสามารถเก็บได้นานหลายเดือนที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลาย Citrate Develop

3.1 Sodium citrate	0.5	กรัม
3.2 Formadehyde เข้มข้น 37% (v/ v)	0.5	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นี้ควรผสมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้งาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียม Destaining Solution (500มิลลิลิตร)

Methanol	150	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร
Acetic Acid	50	มิลลิลิตร

การเตรียมสีย้อมเม็ดเลือดขาว Natt-Herrick's Stain

Sodium Chloride	3.88	กรัม
Sodium Sulfate	2.5	กรัม
Sodium Phosphate	1.74	กรัม
Potassium Phosphate	0.25	กรัม
Formalin 37%	7.5	มิลลิลิตร
Methyl Violet	0.1	กรัม

นำส่วนประกอบต่าง ๆ ละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

การเตรียมเชื้อที่ 10^7 และ 10^9 เซลล์/ มิลลิลิตร

1. นำ 1 โคโลนีของเชื้อที่ต้องการเลี้ยงในอาหาร TSA แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่า

2. ครบ 24 ชั่วโมง ปั่นล้างเชื้อที่เลี้ยง 3 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์

3. นำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดย

3.1 ใช้ปิเปตดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำเกลือ 99 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้น 1 : 100

3.2 ใช้ปิเปตดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1 : 10 ใส่ในน้ำเกลือ 99 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 : 1000 (10^3)

3.3 ใช้ปิเปตดูดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 1: 100 ใส่ในน้ำเกลือ 99 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 : 10000 (10^4) ทำจนถึง 10^9

4. แบ่งเชื้อที่เจือจางเป็น 2 ส่วนโดยส่วนที่ 1 นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยทำการเลี้ยงแบบกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับโคโลนีโดยการนับจำนวนจะอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี และส่วนที่ 2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดสอบ API 20 E

น้ำเชื้อที่ต้องการจำแนกใส่ลงในหลอดน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วเขย่าให้เชื้อผสมกับน้ำเกลือ จากนั้นทิ้งไว้สักพัก แล้วจึงน้ำเชื้อที่ผสมน้ำเกลือถ่ายลงในช่องต่าง ๆ บนชุดทดสอบ API 20 E ให้ครบทุดช่อง และนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาอ่านผล พร้อมเติมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ ตามตารางการทดสอบแล้วนำไปอ่านค่าตามโปรแกรมคอมพิวเตอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University