บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 บริษัท Bausch & Lomb

เครื่องวัดความขุ่น Klett Summerson Photoelectric Colorimeter บริษัท Arthur H. Thomas Company

เครื่องปั่นแอพเพนดอฟ (Eppendof centrifuge) Tomy MC-15A

เครื่องปั่นความเร็วต่ำของ International Equipment

เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath) ของ Forma Scientific company

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubater) บริษัท Heraeus

เครื่องนับโคโลนี (Colony counter) Model 3326 (American Optical Corporatian, New York, U.S.A.)

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas chromatography) Model 3700 (Varian, California, U.S.A.)

เครื่องวัด pH Model PHM 83 (Radiometer Ltd., Denmark)

เครื่องป้อนพลังงาน (Power supply)

อุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซิล

UV. transilluminator บริษัท UVP model TS-20

กล้องถ่ายรูป Pentax super A Soft case 32650 พร้อมฟิล์มยาวดำ Kodax Tri-x Pan

ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipett) ของ Pipetman

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 ก๊าซที่ใช้

อะเซทิลีน ของบริษัทลิทธิโย่คเอนจิเนียริ่ง จำกัด

เอทีลีนมาตรฐานของ Supelco

อาร์กอน ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซ จำกัด

อากาศอัด ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารบก

ไฮโดรเจน ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารบก

ไนโตรเจน ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซ จำกัด

2.1.3 เคมีภัณฑ์

ก. สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดวิเคราะห์

ข. เอนไซม์

Restriction endonuclease บริษัท Amersham

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 Azotobacter spp. เป็นสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกจากรากของต้นอ้อย โดยคุณเศรษฐา คิริพันท์ และได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.นันทกร บุญเกิด กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.2.2 Escherichia coli 5K ซึ่งมีพลาสมิด pCK3 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จาก C.Kennedy ARC Unit of Nitrogen Fixation, University of Sussex, England

2.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

2.3.1 LB-medium (Luria-Bertani) (Luria และคณะ, 1960) เป็นอาหารอุดม (rich medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10 กรัม

013009

Yeast extract	5 กรัม
Sodium chloride	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย Sodium hydroxide 1 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.2 อาหารสูตร Burk (Burk's medium) (Page และ Sadoff, 1976) เป็นอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน (Nitrogen-free medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Magnesium sulfate	0.2 กรัม
Calcium chloride	0.0085 กรัม
Ferrous sulfate	0.005 กรัม
Sodium molybdate	0.00024 กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	0.8 กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.2 กรัม
Glucose	10.0 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.1 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto—agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3.3 อาหารสูตรปรับต่ำ (Minimum medium, M.M.) (Terzaghi, 1980) เป็นอาหารสูตรปรับต่ำที่มีสารต้นตอไนโตรเจนคือ Ammonium acetate เข้มข้น 15 mM

เตรียมโดยการเติม Ammonium acetate 1.1 กรัม ใน Burk's medium 1 ลิตร

2.3.4 อาหารอุดมสูตร RM(Robson และคณะ, 1984) เป็นอาหารที่ลดการสร้างเมือกใน Azotobacter เตรียมโดยการเติม

Nutrient broth	2 กรัม
Yeast extract	0.1 กรัม

ใน Burk's medium 1 ลิตร

2.3.5 Transformation medium (TF medium) (Glick และคณะ, 1985) เป็นอาหารที่ใช้ในการเตรียม Competent cells ของ Azotobacter ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Magnesium sulfate	1.9718	กรัม
Calcium sulfate	0.0136	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	0.55	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.25	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Ammonium acetate	1.1	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.1 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

2.4 สารละลายที่ใช้ในการเจริญพืช

2.4.1 สารละลายที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน (N-free solution) (Jensen, 1942)

สารละลาย I	Postassium dihydrogen phosphate	34	กรัมต่อลิตร
สารละลาย II	Magnesium sulfate	123	กรัมต่อลิตร
สารละลาย III	Potassium sulfate	65	กรัมต่อลิตร
สารละลาย IV	Ferric chloride	1.4	กรัมต่อลิตร
	Ethylene diaminetetraacetic acid	1.7	กรัมต่อลิตร
สารละลาย V	Potassium chloride	0.75	กรัมต่อลิตร
	Boric acid	0.124	กรัมต่อลิตร
	Manganese sulfate	0.067	กรัมต่อลิตร
	Zinc sulfate	0.046	กรัมต่อลิตร
	Cupric sulfate	0.01	กรัมต่อลิตร
	Molybdenum trioxide	0.002	กรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลาย I - V อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม Calcium sulfate 0.1 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 6.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.2 สารละลายที่มีสารต้นตอไนโตรเจน

เติม Ammonium sulfate ลงในสารละลายที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 และ 1.2 มิลลิโมลาร์

2.5 การเตรียมสารละลาย

2.5.1 สารละลาย Lowry (Lowry และคณะ, 1951) ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนประกอบด้วย

Sodium carbonate 2 เปอร์เซ็นต์ใน Sodium hydroxide เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร

Copper sulfate 1 เปอร์เซ็นต์ และ Sodium potassiumtartate 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร

2.5.2 บัฟเฟอร์ของ Burk (Page และ Sadoff, 1976) ใช้สำหรับการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต คือ Burk's medium ซึ่งไม่มี glucose

2.5.3 บัฟเฟอร์ TE (Maniatis และคณะ, 1982) ใช้สำหรับละลายดีเอนเอ

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 8.0

2.5.4 บัฟเฟอร์ RNase (Rodrignez Tait, 1983)

Sodium acetate	0.1	โมลาร์
Na_2EDTA	0.4	มิลลิโมลาร์
RNase	10	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 4.3

2.5.5 Tracking dye (Maniatis และคณะ, 1982) ใช้สำหรับผสมกับดีเอนเอ ก่อนทำอีเลคโตรโฟรีซีส ประกอบด้วย

Bromphenol blue	0.1	เปอร์เซ็นต์
Ficoll	40	เปอร์เซ็นต์
Na_2EDTA	5	มิลลิโมลาร์

2.5.6 บัฟเฟอร์ Tris-borate (Maniatis และคณะ, 1982) เป็น running buffer ของการทำอิเลคโตรโฟรีซิส ประกอบด้วย

Tris-HCl	89	มิลลิโมลาร์
Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA	2.5	มิลลิโมลาร์

ปรับ pH ให้เป็น 8.3

2.5.7 สารละลายไอโอดีน ใช้ในการทดสอบแป้ง ประกอบด้วย

Iodine	0.005	โมลาร์
Potassium iodide	3	กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2.6 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ก. เพลท มีอายุการเก็บไม่เกินหนึ่งเดือนใช้เป็นจานแม่ (master plate) ในขณะทำวิจัยหลักการก็คือ สุ่มตรวจให้ได้โคโลนีแยกเดี่ยวบนอาหารที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกให้โคโลนีที่ต้องการเท่านั้นที่อยู่รอดได้ ตัวอย่างเช่น E. coli ที่มี pCK3 จะเก็บใน LB-agar ที่เสริมด้วยเตรทตราซัยคลิน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานามัยซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรณีของ Azotobacter ที่มี pCK3 จะเก็บไว้ใน glucose-Burk agar ที่เสริมด้วยเตรทตราซัยคลิน 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานามัยซิน 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และในกรณีของ Azotobacter ที่มี pCK3* จะเพิ่มปริมาณของคานามัยซินขึ้นเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อีกด้วย

ข. Slant มีอายุการเก็บเป็นเดือน โดยบรรจุอาหารครึ่งหนึ่งในขวดจิ๋ว (vial) ขนาดความจุ 4 มิลลิลิตร เกลี่ยเซลล์ที่บริสุทธิ์ลงบนผิวหน้าของ vial บ่มจนขึ้นเต็มหน้า เทับด้วยอาหารสูตรเดิมแต่มีวุ้นเพียง 0.06% ปิดเกลียวให้แน่นโดยการจุ่มลงในพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ E. coli อาหารที่ใช้คือ LB-agar และถ้าเป็น Azotobacter อาหารที่ใช้คือ อาหารสูตร Burk

ค. กลีเซอรอล ใช้สำหรับเก็บแบคทีเรียทุกชนิด โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวแล้วเก็บโดยผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ในขวดจิ๋ว (vial) ซึ่งจุ่มด้วยพาราฟินเหลว เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.7 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย

2.7.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)

เขี่ยโคโลนีจากจานแม่ (Master plate) ลงในอาหารเหลวปริมาณ 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง (สำหรับให้อาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน จะต้องบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ก่อนนำไปเขย่า)

2.7.2 การเลี้ยงและวัดการเจริญของแบคทีเรีย

ใส่เชื้อตั้งต้นลงในอาหารที่ต้องการด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหาร เท่ากับ 5 : 100 โดยอาหาร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ชนิดมีแขนข้าง ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที (สำหรับในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนจะต้องบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ก่อนนำไปเขย่า) เมื่อแบคทีเรียเจริญถึงเวลาที่ต้องการวัดการเจริญโดย

ก. วัดความขุ่นของคัลเจอร์ด้วยเครื่อง Klett-Summerson Photo-electric Colorimeter มีหน่วยเป็น Klett unit

ข. นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยการกระจายแบคทีเรียที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ของ Burk บนอาหารแข็งสูตรปรับต่ำ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน จึงนับจำนวนโคโลนี

ในแต่ละการทดลองได้ทำ duplicate

2.8 การวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสในแบคทีเรียอิสระ

2.8.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยโคโลนีจากจานแม่ลงในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนปริมาณ 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง

2.8.2 การชักนำเอนไซม์ไนโตรจิเนส

ใส่เชื้อตั้งต้นลงในอาหารที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจนด้วยอัตราส่วนเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 5 : 100 โดยอาหาร 50 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ชนิดมีแขนข้าง ซึ่งมีความจุ 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง แล้วนำไปเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เมื่อแบคทีเรียเจริญถึงเวลาที่ต้องการนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสด้วยวิธีอะเซทิลีนรีดักชั่น

2.8.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชั่น

นำคัลเจอร์ที่ได้ชักนำเอนไซม์มา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง เปลี่ยนบรรยากาศให้มีก๊าซอะเซทิลีน 10 เปอร์เซนต์ โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศในขวดทดลองออก 3.0 มิลลิลิตร แล้วใส่ก๊าซอะเซทิลีนในจำนวนเท่ากันลงไปแทนที่ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จึงนำไปวัดก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้นจากการรีดิวส์อะเซทิลีน โดยเอนไซม์ไนโตรจิเนส ใช้ขนาดของตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟที่มี detector ชนิด Flame ionization คอลัมน์ Parapak N ขนาด 2.0 m x $\frac{1}{8}$" ใช้ไนโตรเจน (OFN) เป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 องศาเซลเซียส และในแต่ละการทดลองได้ทำ duplicate

ปริมาณก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้นคำนวณได้จากความสูงของ peak เอทิลีนตัวอย่างเปรียบเทียบกับความสูงของ peak เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry แอคติวิตีจำเพาะของอะเซทิลีนรีดักชั่น แสดงค่าเป็นไมโครโมลของเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของแบคทีเรียต่อชั่วโมง

2.9 การสกัดและเก็บรักษาพลาสมิดดีเอนเอ

2.9.1 การสกัดพลาสมิดดีเอนเอ (Rapid alkaline extraction)

(Birnboim และ Doly, 1979)

เครื่องใช้และรีเอเจนต์ทุกชนิดต้องสะอาดและฆ่าเชื้อจนปราศจาก DNase

เจริญแบคทีเรียที่มีพาล์มิด pCK3 ในอาหารเหลวที่ 30 องศาเซลเซียส จนเข้าสู่ช่วงการเจริญ Late log phase(ประมาณ 300 KU.)

ปั่นเซลล์ 25 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนมาเติมสารละลายไลโซไซม์ (lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, glucose 50 มิลลิโมลาร์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์, pH 8) จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที เติมสารละลายด่าง (Sodium hydroxide 0.2 นอร์มอล, SDS 1 เปอร์เซนต์) จำนวน 2 มิลลิลิตร กลับหลอดขึ้นลงเบา ๆ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เพื่อทำให้ผนังเซลล์เป็นรูรั่วและดีเอนเอออกมาเกิดการ denature ในสารละลายด่าง

เติมสารละลายของ Sodium acetate 3 โมลาร์ pH 4.8 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร เพื่อ neutralized พลาสมิดจะเกิด renature ได้ง่ายเนื่องจากมีขนาดเล็ก เมื่อแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 60 นาที โปรตีน โครโมโซม และ RNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะตกตะกอน นำมาปั่น 20,000 รอบต่อนาที 20 นาที นำส่วนน้ำใส 0.5 มิลลิลิตรใส่ใน microfuge tube เติมเอทธานอล 1 มิลลิลิตร กลับหลอดขึ้นลง แล้วทิ้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ทำให้ตะกอนแห้งในเดซิเคเตอร์สูญญากาศ

ละลายตะกอนในสารละลาย Sodium acetate 0.1 โมลาร์ และ Tris-HCl 0.05 โมลาร์ pH 8.0 จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วเติมเอทธานอลจำนวน 200 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งไป ทำให้ตะกอนแห้งในเดซิเคเตอร์สูญญากาศ

ละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ TE จำนวน 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.9.2 <u>การเก็บรักษาพลาสมิดดีเอนเอ</u>

สารละลายและภาชนะที่ใช้เก็บดีเอนเอต้องปราศจาก DNase การเก็บรักษาดีเอนเอที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 วิธี คือ

ก. <u>การเก็บรักษาระยะสั้น</u> ละลายดีเอนเอในบัฟเฟอร์ TE เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. <u>การเก็บรักษาระยะยาว</u> เก็บตะกอนแห้งของดีเอนเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ นำดีเอนเอมาละลายในบัฟเฟอร์ TE

2.10 <u>การย่อยดีเอนเอด้วยเอนไซม์ Restriction endonuclease</u>

EcoRI และ SalI ที่ใช้ในการทดลองเป็นของบริษัท Amersham โดยที่ลักษณะในการย่อยดีเอนเออย่างสมบูรณ์ เป็นดังนี้

reaction mixture 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอนเอ 1 ไมโครกรัม, Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH 8.0, Sodium chloride 100 มิลลิโมลาร์, Magnesium chloride 10 มิลลิโมลาร์ และ dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ และ EcoRI หรือ SalI 3 หน่วย บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม tracking dye จำนวน $\frac{1}{3}$ เท่าของปริมาตรรวม

2.11 <u>การตรวจสอบดีเอนเอด้วยวิธีอีเลคโตรโฟรีซีส</u>

2.11.1 <u>ตรวจสอบดีเอนเอที่ได้จากการสกัด</u> (Maniatis และคณะ, 1982)

การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอนเอ ทำโดยใช้ submarine horizontal gel electrophoresis ของอะกาโรสเจล 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ Tris-borate และใส่ดีเอนเอประมาณ 100 - 200 นาโนกรัมต่อ 1 ช่องของเจล ถ้าเจลมีขนาด 110 x 60 x 3 มิลลิเมตร ทำอีเลคโตรโฟรีซีส 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที และถ้าเจลมีขนาด 100 x 80 x 8 มิลลิเมตร ทำอีเลคโตรโฟรีซีส 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ Tris-borate โดยให้เคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวก และใช้ tracking dye เป็นเครื่องหมาย

2.11.2 ตรวจสอบดีเอนเอโดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกยกะอีเลคโตรโฟรซีส์ (ดัดแปลงจาก Eckhardt, 1978)

เยี่ยโคโลนีของเชื้อใส่ในสารละลายของ Sucrose 10 เปอร์เซ็นต์, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์, pH 8.0, Lysozyme 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase 8 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมบนแผ่นอะกาโรส์เจล 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ Tris-borate หยอดสารละลายของ Sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ และ SDS 8 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 ไมโครลิตร ลงในหลุมด้านบนของเซลล์ ทำอีเลคโตรโฟรซีส์ 15 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายของ SDS เคลื่อนลงมาทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตก แล้วให้พลาสมิด และโครโมโซมออกจากเซลล์ได้เปลี่ยนความต่างศักย์เป็น 80 โวลต์ นาน 5 ชั่วโมง มี tracking dye เป็นเครื่องหมาย

เมื่อทำอีเลคโตรโฟรซีส์ในข้อ 11.1 หรือ 11.2 แล้ว นำเจลมาย้อมโดยแช่ใน ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วแช่ล้างในน้ำกลั่น 1 ชั่วโมง นำเจลมาส่องดูแถบดีเอนเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตจาก UV transilluminator แล้วเปรียบเทียบขนาดและปริมาณกับแถบของดีเอนเอมาตรฐาน

2.12 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry และคณะ, 1951)

ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ของ Burk 2 ครั้ง แล้วกระจายในบัฟเฟอร์ของ Burk ปริมาตรเท่าเดิม

ผสมเซลล์ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร กับ Sodium hydroxide 1 นอร์มอล จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ได้เป็น Hydrolysate ทำให้เย็นลง

ผสม Hydrolysate 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลาย Lowry จำนวน 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciocalten (เจือจาง 1 : 2) จำนวน 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส วัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

2.13 วิธีการ Transformation

เขี่ยโคโลนีของ Azotobacter จากจานแมลงใน Transformation medium (TF medium) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 15 ชั่วโมง จะเป็นเชื้อตั้งต้น

ใส่เชื้อตั้งต้น 1 มิลลิลิตร ใน TF medium 9 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที 5 ชั่วโมง เติมพลาสมิด pCK3 165 นาโนกรัมลงในคัลเจอร์ เขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ต่อไปอีก 10 ชั่วโมง

กระจายแบคทีเรียที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ของ Burk 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารสูตรปรับต่ำ ที่เสริมเตรทตราซัยคลินเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคานามัยซินเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน นับจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญได้ ต่อจำนวนดีเอนเอ 1 ไมโครกรัม เพื่อคำนวณเป็นประสิทธิภาพของการ transformation

2.14 การแยกมิวแทนท์ที่ทำการถอดรหัสไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดันจากการกลายพันธุ์ด้วย NTG

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตรปรับต่ำ จนกระทั่งถึงระยะการแบ่งตัวทวีคูณ ล้างด้วยบัฟเฟอร์ของ Burk 1 ครั้ง กระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เติมด้วยปริมาตรเท่าเดิม

เติม NTG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) ให้ความเข้มข้นเป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 30 นาที ล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ของ Burk 3 ครั้ง กระจายเซลล์ในอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตรเท่าเดิม

นำเซลล์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง เจือจางเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ของ Burk แล้วกระจายเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารอุดมสูตร RM เสริมด้วยคานามัยซินเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน พิมพ์โคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารอุดมสูตร RM เสริมด้วยคานามัยซินเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2 วัน

เลือกโคโลนีที่เจริญได้ในอาหารที่เสริมคานามัยซิน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่เสริมด้วยคานามัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบสมบัติเพื่อค้นหาโคโลนีที่เป็น derepressed nitrogenase ต่อไป

2.15 การทดสอบผลกระทบของ Azotobacter ต่ออ้อย

ในการทดสอบนี้เลือกใช้วิธีวางแผนการการทดลองแบบ 3 x 3 factorial ใน Randomized complete block Treatment ที่ทำการศึกษาคือ สายพันธุ์ของ Azotobacter และสารอาหารที่ใช้ในการปลูกอ้อย โดยแต่ละ Treatment ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

Treatment ที่ใช้ในการปลูกอ้อยครั้งแรกมีดังนี้

สารอาหารที่ปราศจากอัมโมเนียมซัลเฟต และ Azotobacter (N_0A_0)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 0.4 mM และปราศจาก Azotobacter ($N_{0.4}A_0$)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 1.2 mM และปราศจาก Azotobacter ($N_{1.2}A_0$)

สารอาหารที่ปราศจากอัมโมเนียมซัลเฟตและมี Azotobacter WT(N_0A_{WT})

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 0.4 mM และ Azotobacter WT($N_{0.4}A_{WT}$)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 1.2 mM และ Azotobacter WT($N_{1.2}A_{WT}$)

สารอาหารที่ปราศจากอัมโมเนียมซัลเฟตและมี TF23(pCK3)($N_0A_{TF23(pCK3)}$)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 0.4 mM และ TF23(pCK3)($N_{0.4}A_{TF23(pCK3)}$)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 1.2 mM และ TF23(pCK3)($N_{1.2}A_{TF23(pCK3)}$)

และ Treatment ที่ใช้ในการปลูกอ้อยครั้งที่สองมีดังนี้

สารอาหารที่ปราศจากอัมโมเนียมซัลเฟตและ Azotobacter (N_0A_0)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 1.2 mM และปราศจาก Azotobacter ($N_{1.2}A_0$)

สารอาหารที่ปราศจากอัมโมเนียมซัลเฟตและมี Azotobacter WT(N_0A_{WT})

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 1.2 mM และมี Azotobacter WT($N_{1.2}A_{WT}$)

สารอาหารที่ปราศจากอัมโมเนียมซัลเฟตและมี TF2($pCK3^*$) ($N_0{}^A{}_{TF2(pCK3^*)}$)

สารอาหารที่มีอัมโมเนียมซัลเฟต 1.2 mM และมี TF2($pCK3^*$)($N_{1.2}{}^A{}_{TF2(pCK3^*)}$)

2.15.1 การเตรียมทราย

เลือกเศษดิน อินทรียวัตถุ และกรวดออก ล้างทรายด้วยน้ำ ผึ่งไว้

2.15.2 การเตรียมข้อพันธุ์อ้อย ดัดแปลงจาก Wongkaew และ Intarawat (1982)

อ้อยที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือพันธุ์ F 140 ซึ่งได้มาจากสถานีไร่อ้อย อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

พันธุ์อ้อยที่ใช้มีอายุประมาณ 7 เดือน ตัดข้อพันธุ์อ้อยเป็นท่อน ๆ ให้มีความยาวประมาณ $1\frac{1}{2}$ นิ้ว คัดเลือกข้อพันธุ์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกัน และมีตาที่สมบูรณ์ แช่คลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซนต์ 15 นาที ย้ายมาแช่คลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซนต์ 10 นาที เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนข้อพันธุ์ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง นำข้อพันธุ์ไปเรียงในกะบะทรายซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กลบด้วยทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว รดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว คลุมกะบะทรายด้วยพลาสติคใส่เพื่อรักษาความชื้น ข้อพันธุ์นานประมาณ 10 วัน จะได้หน่ออ้อยที่มีขนาดสูงประมาณ $1\frac{1}{2}$ นิ้ว จึงนำไปปลูกใน Leonard jar ต่อไป

2.15.3 การเตรียม Leonard jar (Leonard, 1944)

Leonard jar ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนล่างเป็นขวดปากกว้างบรรจุสารละลายที่ใช้ในการเจริญของพืช ส่วนบนเป็นขวดปลายเปิดทั้งสองด้าน ด้านล่างมีลักษณะเรียวยาวลุกไว้ด้วยสำลีและเชือก ปลายด้านบนเปิดไว้เพื่อบรรจุทราย นำไปฆ่าเชื้อ

2.15.4 การปลูกใน Leonard jar ดัดแปลงจาก Gibson (1980)

เลือกหน่ออ้อยที่มีขนาดใกล้เคียงกันวางบน Leonard jar ใส่

Azotobacter WT หรือทรานสฟอร์แมนท์ประมาณ 10^9 เซลล์ ลงบนบริเวณรากของอ้อย กลบด้วยทรายที่ฆ่าเชื้อแล้ว แล้วใช้กรวดลียาวขนาดประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร ซึ่งล้างและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กลบอีกชั้นหนึ่งเพื่อไม่ให้ Blue green algae เจริญขึ้นที่ผิวหน้าของทรายชั้นบน (ใน Control ไม่ต้องใส่ Azotobacter)

2.15.5 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนสของ Azotobacter ที่อยู่ร่วมกับรากอ้อย ดัดแปลงจาก Bergersen (1980)

นำรากของอ้อยซึ่งปลูกใน Leonard jar 6 อาทิตย์ ใส่ในขวดทดลองทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง (sleeved-stopper) เปลี่ยนบรรยากาศให้มีก๊าซอะเซทิลีน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศในขวดทดลองออก 25 มิลลิลิตร แล้วใส่ก๊าซอะเซทิลีนในจำนวนเท่ากันลงไปแทนที่ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จึงนำไปวัดก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้นด้วยการฉีดตัวอย่างก๊าซ 200 ไมโครลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

ปริมาณก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้นคำนวณได้จากความสูงของ peak เอทิลีนตัวอย่าง เปรียบเทียบกับความสูงของ peak เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน และชั่งน้ำหนักแห้งของรากอ้อย แอคติวิตีจำเพาะของเอะเซทิลีน รีดัคชั่น แสดงค่าเป็นนาโนโมลของเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อกรัมของรากอ้อยต่อชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย