บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย

1.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษากลไกการทนเค็ม ได้แก่ Rhizobium sp. TAL 141 และ Rhizobium meliloti TAL 380 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

1.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ศึกษาในเทคนิคโพรโทพลาสต์ฟิวชัน ได้แก่ Rhizobium sp. TAL 141 ure his และ Rhizobium fredii USDA 192 Trp Phe ซึ่งได้จากการเตรียมยีนเครื่องหมายโดยวิธีการกลายพันธุ์ด้วย NTG จาก Rhizobium sp. TAL 141 และ Rhizobium fredii USDA 192 ตามลำดับ

2. เมล็ดพันธุ์พืช

เมล็ดพันธุ์พืชตระกูลถั่วที่ใช้ทดสอบการติดปมมีสองสายพันธุ์ คือ ถั่วเหลือง สจ.4 และซีราโทร (seratro) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3. เคมีภัณฑ์

3.1 สารเคมี เป็นชนิดการวิเคราะห์ (analytical grades)

3.2 เอนไซม์ ไลโซไซม์ เกรด 1 จากบริษัท Sigma และเรสทริกชันเอนไซม์จากบริษัท Amersham

4. ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 สูตรอาหารอุดมยีสต์แมนนิทอล (YM) (Vincent, 1970) เป็นสูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ สำหรับเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (starter inoculum) และสำหรับติดตามการเจริญของเชื้อ ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย

D-mannitol	10.0	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม

ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 6.8

4.2 YM+0.3 M NaCl ใช้สำหรับศึกษาความสามารถในการทนเค็มของไรโซเบียมโดยเสริมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 โมลาร์ ลงในอาหารสูตร YM

4.3 สูตรอาหารชี้เฉพาะ (Selective media) สำหรับไรโซเบียม (Vincent, 1970) ได้แก่

4.3.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มี congo red เป็นสูตรอาหารสำหรับทดสอบว่ามีเชื้อแปลกปลอมปนอยู่กับไรโซเบียมหรือไม่ โดยเติมสี congo red ลงในอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0025 กรัมเปอร์เซ็นต์ลงในอาหารสูตร YM หรืออาหารสูตรอื่นๆ ตามต้องการ

4.3.2 กลูโคสเปปโตน (GP) ในสารอาหารหนึ่งลิตรประกอบด้วย

Glucose	5	กรัม
Bacto peptone	10	กรัม
Bromocresol purple	0.1	กรัม

4.4 สูตรอาหารปรับต่ำ

4.4.1 MMG (Vincent, 1970) เป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการติดตามการเจริญของเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อสายพันธุ์ลูกผสม ในสารอาหารหนึ่งลิตรประกอบด้วย ข้อ ก.-ช.

ก.	KH_2PO_4	0.3	กรัม
	K_2HPO_4	0.3	กรัม
	D-mannitol	10.0	กรัม
	Sodium glutamate	1.0	กรัม

ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 6.8

ข.	$MgSO_4.7H_2O$	10.0	กรัม
ค.	$CaCl_2$	5.0	กรัม

Micronutrient-stock solution ใน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย ข้อ ง.-ช.

ง.	Boric acid	1.0	กรัม
	$ZnSO_4$	0.1	กรัม
	$CuSO_4$	0.05	กรัม
	$MnCl_2$	0.05	กรัม
จ.	Na_2MoO_4	0.01	กรัม
ฉ.	$FeCl_3$	0.1	กรัม
ช.	Biotin	0.02	กรัม

สารอาหารแต่ละชนิดเตรียมแยกกัน และภายหลังการฆ่าเชื้อ จึงเติมสารอาหาร ข.-ช. อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ลงในสารอาหาร ก. 1 ลิตร

4.4.2 MGG เตรียมเช่นเดียวกับ MMG แต่เปลี่ยนแหล่งต้นคาร์บอนจากแมนนิทอลเป็นกลูโคส

4.4.3 MMG+0.3 M NaCl หรือ MGG+0.3 M NaCl คือสูตรอาหาร MMG หรือ MGG ที่เสริมด้วยโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 โมลาร์

4.4.4 สูตรอาหารกึ่งปรับต่ำ MMGY และ MGGY เป็นสูตรอาหารดัดแปลงโดยการเติมยีสต์สกัด (yeast extract) 0.25 กรัมต่อลิตร ลงในสูตรอาหารปรับต่ำ 4.4.1 และ 4.4.2 ตามลำดับ

4.5 <u>สูตรอาหาร Tryptone yeast extract (TY)</u> (Beringer, 1974) ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.1	กรัม

<u>หมายเหตุ</u>

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้น อาจอยู่ในรูปของเหลวหรือจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าต้องการอาหารในรูปอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (จานอาหารเลี้ยงเชื้อ) เติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

4.6 <u>สูตรอาหารสำหรับการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ และสูตรอาหาร</u>

4.6 สูตรอาหารสำหรับการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ และสูตรอาหารคัดเลือกฟิวแซนต์ (fusants)

4.6.1 Complete medium (CMS-8) เป็นสูตรอาหารครบที่ให้โพรโทพลาสต์เจริญได้ ประกอบด้วยสูตรอาหารปรับต่ำ MMG ที่เสริมกรดอะมิโนทุกชนิดที่มิวแทนต์แต่ละสายพันธุ์ต้องการ (ตามชนิดของ auxotrophs) และมีน้ำตาลซูโครส 0.234 โมลาร์ (8 กรัมเปอร์เซ็นต์) ช่วยรักษาสภาพโพรโทพลาสต์

4.6.2 Base minimum medium (BMS-8) เป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกฟิวแซนต์ ประกอบด้วยสูตรอาหารปรับต่ำ MMG และมีน้ำตาลซูโครส 0.234 โมลาร์

5. สารอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนสำหรับเจริญพืช (Jensen, 1942) ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย

ก.	KH_2PO_4	34	กรัม
ข.	$MgSO_4.7H_2O$	123	กรัม
ค.	K_2SO_4	65	กรัม
ง.	$FeCl_3.6H_2O$	1.4	กรัม
	EDTA	1.7	กรัม
จ.	KCl	0.75	กรัม
	H_3BO_3	124	มิลลิกรัม
	$MnSO_4.H_2O$	67	มิลลิกรัม
	$ZnSO_4.7H_2O$	46	มิลลิกรัม
	$CuSO_4.5H_2O$	10	มิลลิกรัม
	$Na_2MoO_2.2H_2O$	2	มิลลิกรัม

เติมสารละลาย (ก.-จ.) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ลิตร และเติมผงแคลเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม เมื่อสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำไปปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

หมายเหตุ

สูตรอาหารที่ใช้ในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์

เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นสารละลาย $FeCl_3$ และ Biotin ทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรอง Millipore filter membrane ขนาด 0.4 ไมครอน

6. สารละลายที่ใช้

6.1 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) NTG 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมเปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 °ซ 1 ชั่วโมง

6.2 สารละลายเตรียมโพรโทพลาสต์

ก. บัฟเฟอร์ Tris 125 มิลลิโมลาร์ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์ (14 กรัมเปอร์เซ็นต์)

ข. Lytic buffer A ประกอบด้วย ไลโซไซม์ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์

ค. Lytic buffer B ประกอบด้วย EDTA หรือ GEDTA 125 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์

6.3 สารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ (SMMC) maleate buffer 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี $MgCl_2$ และ $CaCl_2$ อย่างละ 10 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 ในสารละลายซูโครส 0.4 โมลาร์

6.4 สารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ โพลีเอทิลีนกลัยคอล (PEG 6000) 60 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสารละลายซูโครส 0.234 โมลาร์

6.5 สารละลายที่ใช้ทดสอบทางอิมมูโนวิทยา (Agglution test) โซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมเปอร์เซ็นต์ (NSS)

6.6 สารละลายที่ใช้ในการแยกและตัดดีเอ็นเอ (ศิริพร สิทธิประณีต, 2531)

6.6.1 สารละลายบัฟเฟอร์ SET

Sucrose	20	กรัมเปอร์เซ็นต์	
Tris-HCl	50	มิลลิโมลาร์	pH 7.6
EDTA	50	มิลลิโมลาร์	

6.6.2 สารละลายบัฟเฟอร์ RNase

Sodium acetate	0.1	โมลาร์	pH 7.4
EDTA	0.3	มิลลิโมลาร์	

RNase	10	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.6.3 สารละลายบัฟเฟอร์ TEN

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์ pH 7.6
EDTA	1	มิลลิโมลาร์
NaCl	10	มิลลิโมลาร์

6.6.4 สารละลายบัฟเฟอร์กำลังอิออนต่ำ (low ionic strength) ความเข้มข้น 10 เท่า

Tris-HCl	100	มิลลิโมลาร์
$MgCl_2$	100	มิลลิโมลาร์
DTT	10	มิลลิโมลาร์

6.6.5 สารละลายบัฟเฟอร์กำลังอิออนปานกลาง (medium ionic strength) ความเข้มข้น 10 เท่า

Tris-HCl	100	มิลลิโมลาร์
$MgCl_2$	100	มิลลิโมลาร์
DTT	10	มิลลิโมลาร์
NaCl	500	มิลลิโมลาร์

6.6.6 สารละลายบัฟเฟอร์กำลังอิออนสูง (high ionic strength) ความเข้มข้น 10 เท่า

Tris-HCl	100	มิลลิโมลาร์
$MgCl_2$	100	มิลลิโมลาร์
DTT	10	มิลลิโมลาร์
NaCl	1000	มิลลิโมลาร์

6.6.7 อะกาโรสเจล ประกอบด้วย อะกาโรส 0.7 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate

6.6.8 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate เป็น running buffer ของอีเล็กโทรโฟริซีส ประกอบด้วย

Tris-HCl	89	มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
Na_2EDTA	2.5	มิลลิโมลาร์

6.6.9 สีติดตาม (tracking dye) ใช้สำหรับผสมกับดีเอ็นเอ ก่อนทำอีเล็กโทรโฟริซีส ประกอบด้วย

Bromophenol blue	0.025	กรัมเปอร์เซ็นต์
Ficoll 400	40	กรัมเปอร์เซ็นต์
SDS	0.5	กรัมเปอร์เซ็นต์

6.6.10 สารละลายสำหรับย้อมดีเอ็นเอ (DNA staining solution) เพื่อบอกตำแหน่งของดีเอ็นเอจากการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

Ethidium bromide	2.5	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. <u>เครื่องมือที่ใช้</u>

เครื่องชั่งวิเคราะห์ model H10 Tw ของ Metler Instrument, Switzerland

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบไอน้ำความดันสูง model HA-3D ของ Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

เครื่องวัด pH model PHM 83 ของ Radiometer Ltd., Denmark

เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ (shaking water bath) ของ Heto Lab Equipment, Denmark

เครื่องวัดความขุ่น Klett Summerson Photoelectric Colorimeter ของ Arthur H. Thomas Company

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 2000 ของ Bausch & Lomb

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ของ Heraeus

เครื่องนับโคโลนี (Colony counter) model 3326 ของ American Optical Corporation, New York, USA

เครื่องปั่นความเร็วต่ำของ International Equipment

เครื่องปั่นแอพเพนดอฟ (Eppendof centrifuge) Tomy MC-15A

เครื่องปั่นความเร็วสูง model J-21C ของ Beckman Instrument Company, U.S.A.

เครื่องกาซโครมาโตกราฟ (Gas chromatograph) model 3700 ของ Varian, California, U.S.A. และ model GC-R1A ของ Shimadzu, Japan

เครื่องกำเนิดกาซไฮโดรเจน (Hydrogen generator) model 15 EHG ของ General Eletric Company, Willington, U.S.A.

เครื่องบันทึก (Recorder) model 613 ของ Instrumentation Specialities Company, Lincoln, Nebraska, U.S.A.

อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟริซีส ได้แก่

-เจลแชมเบอร์ (Gel chamber)

-เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Power supply)

-เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator) model TS-20 ของ Biorad

-ไมโครปิเปตต์ ของ Pipetman

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

-ที่ตักเจลออกจากแชมเบอร์ พร้อมกล่องพลาสติกสำหรับย้อมเจล

8. <u>กาซที่ใช้</u>

อะเซทิลีน ของบริษัทสิทธิโชคเอนจิเนียริ่ง จำกัด

เอทิลีนมาตรฐานของ Supelco

อาร์กอน ของบริษัทไทยอินดัสเตรียลกาซ จำกัด

อากาศอัด ของกรมวิทยาศาสตร์ทหารบก

ไฮโดรเจน จาก Hydrogen generator

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. <u>การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย</u>

1.1 <u>การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)</u> เขี่ยโคโลนีเชื้อที่เจริญบนจานแม่ (master plate) สูตรอาหาร YM ลงในอาหารเหลว YM 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปหมุน 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา

1-2 วัน เชื้อที่ได้ในรูปของเหลว (culture broth) ใช้เป็นเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

1.2 การเพาะเลี้ยงและวัดการเจริญของเชื้อ ถ่ายเชื้อตั้งต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในสูตรอาหารเหลวที่ต้องการ 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดชมพู่ที่มีแขนข้าง (side armed-flasks) ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที (ยกเว้นบางกรณีตั้งไว้โดยไม่เขย่า) ติดตามการเจริญในช่วงเวลาต่างๆ กันด้วย

1.2.1 การวัดความขุ่นของคัลเจอร์ด้วยเครื่อง Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter มีหน่วยเป็น Klett Units (KU)

1.2.2 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) (Somasegaran and Hoben, 1985) โดยการกระจายแบคทีเรียที่เจือจางด้วย NSS ที่ความหนาแน่นเซลล์เหมาะสม ลงบนสูตรอาหารที่ต้องการศึกษา บ่มที่ 30 °ซ จนเริ่มเห็นโคโลนีที่สามารถนับได้ จึงนับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับโคโลนี

2. การเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย

2.1 การเก็บรักษาระยะสั้น สำหรับสายพันธุ์เดิม (WT) จะเก็บในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YM แต่ในกรณีที่เป็นสายพันธุ์มิวแทนต์จะเก็บในจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YM ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนตามชนิดของออกโซโทรปนั้นๆ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 1 เดือน และจะถ่ายเชื้อใหม่ (subculture) ทุกเดือน

2.2 การเก็บรักษาระยะยาว

2.2.1 เก็บที่ -20 °ซ : ผสมคัลเจอร์ (ที่เจริญในอาหารเหลวชนิดเดียวกับการเก็บรักษาระยะสั้น) กับกลีเซอรอลในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง (กลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) เก็บไว้ที่ -20 °ซ ได้ประมาณ 6 เดือน

2.2.2 เก็บในรูปแช่แข็งแห้ง (lyophilized หรือ freeze dried) : โดยการนำคัลเจอร์ไปแช่แข็งที่ -70 °ซ และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ซึ่งได้รับการบริการโดยหน่วย Bangkok MIRCEN สถาบันพัฒนาการวิทยาศาสตร์และการวิจัยแห่งประเทศไทย

3. การแยกยีนเครื่องหมายในไรโซเบียม

การแยกยีนเครื่องหมายจากสายพันธุ์ตั้งต้น Rhizobium sp. TAL 141 และ R. fredii USDA 192 ใช้ NTG ในการกลายพันธุ์ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการแยกมิวแทนต์ทั่วไป

ใน *E. coli* (Adelberg et al., 1965) ความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้ครั้งแรกและครั้งที่สองคือ 500 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขั้นตอนในการเตรียมยีนเครื่องหมายมีดังนี้ คือ

3.1 การแยกสายพันธุ์ TAL 141 *ure* สายพันธุ์มิวแทนต์ *ure* คือสายพันธุ์ซึ่งมีสมบัติที่ไม่สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน การแยกยีนเครื่องหมายชนิดนี้ทำได้โดย

เจริญเซลล์ไรโซเบียมในสูตรอาหารอุดม YM 10 มิลลิลิตร จนถึงระยะ late log ปั่นและล้างตกตะกอนเซลล์ด้วย NSS 1 ครั้ง ที่ความเร็ว 1000xg เป็นเวลา 10 นาที กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย NTG 1 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นและล้างตกตะกอนเซลล์ด้วย NSS 3 ครั้ง ในหลอดแอพเพนดรอฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 4000xg นาน 1 นาที แล้วกระจายตะกอนเซลล์ในสูตรอาหารอุดม YM 10 มิลลิลิตร เจริญเซลล์ที่กลายพันธุ์แล้ว โดยการเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนเซลล์แล้วกระจายในสูตรอาหารปรับต่ำ MMU และเจริญเซลล์เป็นเวลา 13 ชั่วโมง จึง enrichment ด้วยการเติม Pen G 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในคัลเจอร์ดังกล่าว เขย่าต่ออีก 45 นาที ปั่นและล้างตกตะกอนเซลล์ด้วย NSS 3 ครั้ง แล้วกระจายตะกอนเซลล์ในอาหารสูตรปรับต่ำ MMG เจริญเซลล์เป็นเวลา 7 ชั่วโมง จึงสุ่มตัวอย่างคัลเจอร์และเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม กระจายเซลล์ที่เจือจางนั้นบนอาหารสูตรปรับต่ำ MMG ประมาณ 30-50 เพลท ด้วยเทคนิค spread plate อบที่ 30 °ซ เป็นเวลา 2 วัน จึงพิมพ์ (replica) โคโลนีที่เจริญบนสูตรอาหาร MMG มายังจานอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ MMU ด้วยเทคนิค replica plating (Carton et al.,1981) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MMU ที่พิมพ์เชื้อแล้ว ไปอบที่ 30 °ซ นาน 1 วัน สังเกตโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนสูตรอาหาร MMG แต่ไม่ สามารถเจริญได้บนสูตรอาหาร MMU ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสายพันธุ์มิวแทนต์ *ure* แยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้งบนสูตรอาหารอุดม YM และทดสอบสมบัติของยีนเครื่องหมาย *ure* ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เก็บสายพันธุ์ที่ยังคงสมบัติเป็นมิวแทนต์ไว้ศึกษาต่อไป

3.2 การแยกสายพันธุ์ TAL 141 *ure his* ซึ่งเป็นสายพันธุ์มิวแทนต์ที่ได้จากการแยกยีนเครื่องหมายครั้งที่สองด้วย NTG มีสมบัติเป็นมิวแทนต์ที่ต้องการกรดอะมิโนในการเจริญเติบโต (auxotroph) ขั้นตอนในการแยกก็ทำนองเดียวกับการแยกสายพันธุ์ TAL 141 *ure* แต่แตกต่างกันที่ขั้นตอนภายหลังการกลายพันธุ์ โดยจะเจริญเซลล์ที่กลายพันธุ์ในสูตรอาหารอุดม YM

ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนฮีสติดีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จึงสุ่มตัวอย่างเซลล์และกระจายเซลล์ที่เจือจางเหมาะสมแล้วบนอาหารสูตร MMG ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนฮีสติดีน อบที่ 30°ซ นาน 2 วัน จึงพิมพ์โคโลนีที่เจริญบนอาหารสูตรดังกล่าวมายังอาหาร MMG และอบที่ 30°ซ นาน 1 วัน สังเกตโคโลนีที่เจริญได้บนอาหาร MMG ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนฮีสติดีน แต่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร MMG โดยลำพัง ซึ่งเป็นมิวแทนต์ his นำโคโลนีที่เจริญในอาหารชนิดแรกได้แต่ไม่เจริญในอาหาร MMG มาทำให้บริสุทธิ์ และทดสอบความเป็น auxotroph อีกครั้งหนึ่ง

3.3 การแยกสายพันธุ์ USDA 192 Trp Phe ซึ่งเป็นสายพันธุ์มิวแทนต์ที่ต้องการกรดอะมิโนทริปโตเฟนและฟีนิลอะลานีนในการเจริญเติบโต ซึ่งแยกสายพันธุ์ดังกล่าวด้วย NTG เพียงครั้งเดียว ขั้นตอนในการแยกสายพันธุ์นี้จะทำในทำนองเดียวกับการแยกสายพันธุ์ TAL141 ure his แต่ใช้กรดอะมิโนทั้งสองชนิดข้างต้นแทนกรดอะมิโนฮีสติดีน

4. การเตรียมโพรโทพลาสต์ (Protoplast formation)

ประยุกต์จากวิธีของ Coetzee et al.(1979) ซึ่งมีหลักการคือ เจริญเซลล์ในอาหารสูตรที่เสริมด้วยกรดอะมิโนไกลซีน แล้วสร้างโพรโทพลาสต์โดยอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง Tris-HCl, lysozyme และ divalent metal chelating agent (EDTA หรือ GEDTA) รายละเอียดเพิ่มเติมอยู่ในผลการทดลอง

5. การหลอมโพรโทพลาสต์ (Protoplast fusion)

ใช้ PEG6000 60 กรัมเปอร์เซ็นต์ หลอมโพรโทพลาสต์ของไรโซเบียมจำนวน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ PEG เท่ากับ 15 กรัมเปอร์เซ็นต์) อุ่นที่ 42°ซ เป็นเวลา 5 นาที

6. การหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ (Protoplast regeneration)

เจือจางโพรโทพลาสต์ในสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ SMMC และในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4°ซ ในอัตราการเจือจางที่เหมาะสมต่อชนิดของสารละลายที่ใช้เจือจาง กระจายเซลล์โพรโทพลาสต์ที่เจือจางในอัตราต่างๆ ลงบนสูตรอาหารสำหรับการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ และกระจายโพรโทพลาสต์ที่หลอมแล้วซึ่งเจือจางในสารละลายรักษาสภาพโพรโทพลาสต์ ลงบนอาหารสูตรคัดเลือกฟิวแซนต์และอาหารสูตรสำหรับการหวลคืนผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ เลือกเก็บโคโลนี

ที่เจริญได้ดีบนสูตรอาหารคัดเลือกฟิวแซนต์ นำไปทำให้บริสุทธิ์บนสูตรอาหารอุดม YM และทดสอบสมบัติของฟิวแซนต์ที่ได้

7. <u>การทดสอบสมบัติของฟิวแซนต์</u>

7.1 <u>ทดสอบการเปลี่ยนแปลงของยีนเครื่องหมาย</u>

โดยการกริด (grid) เชื้อที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2-5 วัน เปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ฟิวแซนต์กับสายพันธุ์พ่อแม่ เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญบนสูตรอาหารต่างๆ

7.1.1 การเจริญบนสูตรอาหารปรับต่ำ MMG

7.1.2 การเจริญบนสูตรอาหารอุดม YM ที่มียาปฏิชีวนะ

7.1.3 การเจริญบนสูตรอาหารอุดม YM ที่อุณหภูมิ 42 °ซ

7.1.4 การเจริญบนสูตรอาหารอุดม YM ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์

7.1.5 การเจริญบนสูตรอาหารอุดม YM ที่มีไกลซีน 0.1 กรัมเปอร์เซ็นต์

7.1.6 การเจริญบนสูตรอาหารจำเพาะกลูโคสเปปโตนซึ่งมีตัวบอกค่าการเปลี่ยนสภาวะกรด-ด่าง (สูตรอาหารที่ 4.3.2)

7.2 <u>การหารูปแบบของโครโมโซมที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์</u> (ดัดแปลงจาก ศิริพร สิทธิประณีต, 2531) อุปกรณ์และรีเอเจนต์ทุกชนิดต้องสะอาดและฆ่าเชื้อให้ปราศจาก DNase ในการทดลองได้แยก chromosomal DNA จากสายพันธุ์พ่อแม่ TAL 141 <u>ure his</u>, USDA 192 Trp Phe และสายพันธุ์ฟิวแซนต์ F11, F14, F15, F20 และ F36 นำมาตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Eco RI, Bam HI และ Xho I

7.2.1 การแยกดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเซลล์ไรโซเบียม ถ่ายเชื้อตั้งต้นลงในสูตรอาหารเหลว YM ที่มีแมนนิทอลเพียง 0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์และเสริมด้วยซัคซิเนท 0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร เจริญเซลล์จนได้ช่วงต้นๆ ของระยะ stationary (ประมาณ 180 KU) จึงเก็บเซลล์โดยการปั่นตกตะกอนและล้างเซลล์ด้วยSET buffer (30 มิลลิลิตร) 1 ครั้ง ที่ความเร็ว 4000xg ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 10-15 นาที เก็บเซลล์ไว้ที่ -70 °ซ 10 นาที

นำเซลล์มาแช่น้ำอุ่น (ประมาณ 65 °ซ) ทันที แช่เซลล์ในน้ำแข็ง และละลายใน SET buffer 2 มิลลิลิตร จึงเติมสารละลาย lysozyme (5 mg/ml ใน TEN buffer) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย RNase (10 mg/ml ใน RNase buffer) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร

ตั้งที่ 37 °ซ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า 3-6 ชั่วโมง จึงเติมสารละลาย Pronase (2 mg/ml ใน TEN buffer) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ตั้งที่ 37 °ซ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า 10-16 ชั่วโมง

เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ 3 มิลลิลิตร และ chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ 30 นาที แล้วปั่นที่ 1000xg เป็นเวลา 20 นาที เก็บชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นบนสุด โดยการดูดด้วยปาสเจอร์ปิเปตต์ปากกว้าง สกัดส่วนที่เก็บมานั้นด้วย chloroform/isomyl alcohol (24:1) 2 ครั้ง ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน แยกสารละลายส่วนบนมาปรับด้วย 5 M NaCl ให้มีความเข้มข้นของ NaCl เป็น 0.1 M และเติม absolute alcohol 2 เท่าของปริมาตรเดิมลงไป ผสมให้เข้ากันดี ตั้งไว้ที่ -20 °ซ ข้ามคืน ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 4000xg ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 10-15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอไปละลายใน TEN buffer 2 มิลลิลิตร

การเก็บรักษา chromosomal DNA

ก. การเก็บระยะสั้น : ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TEN เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

ข. การเก็บรักษาระยะยาว : เก็บตะกอนดีเอ็นเอใน Absolute alcohol ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อต้องการใช้ นำดีเอ็นเอมาละลายในบัฟเฟอร์ TEN

7.2.2 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ ย่อย chromosomal DNA ด้วย Eco RI, Bam HI และ Xho I

Reaction mixture 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA 5 ไมโครกรัม Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.8 Sodium chloride 0, 50 หรือ 100 มิลลิโมลาร์ (ขึ้นอยู่กับชนิดของเรสทริกชันเอนไซม์ว่าต้องการบัฟเฟอร์ที่มีความแรงอิออนอย่างไร) Magnesium chloride 10 มิลลิโมลาร์ dithiothreitol 1 มิลลิโมลาร์ และเรสทริกชันเอนไซม์ 15 หน่วย บ่มที่ 37 °ซ 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม tracking dye จำนวน 1/5-1/3 เท่าของปริมาตรรวม

7.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีส การวิเคราะห์ปริมาณและขนาดดีเอ็นเอ ทำโดยใช้เจลแซมเบอร์ที่เทอะกาโรสเจล 0.7 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมในบัฟเฟอร์ Tris-borate และใส่ดีเอ็นเอประมาณ 100-200 นาโนกรัมต่อ 1 ช่องเจล สำหรับเจลที่มีขนาด 110x60x3 มิลลิลิตร ทำอิเล็กโทรโฟริซีส 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

และใส่ดีเอ็นเอประมาณ 400 นาโนกรัมต่อ 1 ช่องเจล สำหรับเจลที่มีขนาด 100x80x8 มิลลิลิตร ทำอิเล็กโทรโฟริซีส 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ Tris-borate โดยให้กระแสไฟฟ้าเคลื่อนจากขั้วลบไปขั้วบวก และใช้ tracking dye เป็นเครื่องหมายติดตามการเคลื่อนที่

7.3 <u>การทดสอบทางอิมมูโนวิทยาโดยวิธีแอกกลูทิเนชัน</u> วิธีแอกกลูทิเนชันเป็นวิธีพื้นฐานในการตรวจสอบปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนทิเจนกับแอนทิบอดี โดยการสังเกตการเกิดการจับกลุ่ม (clumping) เนื่องจากแอนทิเจนบนผิวเซลล์จับกับแอนทิบอดีในซีรัม ซึ่งจะแตกต่างจากการเกิดเม็ดตะกอนของเซลล์ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนทิเจนกับแอนทิบอดี ในการทดสอบดังกล่าวมีขั้นตอนดังนี้

7.3.1 การกระตุ้นการสร้างแอนทิบอดีในกระต่าย

ก. การเตรียมแอนทิเจน เจริญเซลล์ไรโซเบียมในอาหารเหลว YM และล้างด้วย NSS 2 ครั้ง นำตะกอนเซลล์ไปกระจายใน NSS ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายแฟลกเจลลาและโปรตีนแอนทิเจนอื่นๆ หลังจากตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิแล้วเติมสารละลายหยุดการเจริญของเชื้อรา เช่น เมอไธโอเลต ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ เก็บเซลล์ที่อินแอกทิเวตแล้วดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

ข. การเตรียมแอนทิบอดี วิธีอิมมูไนซ์กระต่าย ดัดแปลงจากวิธีของ Schmidt et al. (1968) ซึ่งเป็นวิธีฉีดแบบเร่ง ใช้อินแอคทิเวตแอนทิเจน (ซึ่งไม่มีเมอไธโอเลต) ที่มีความเข้มข้นสูงประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าทางเส้นเลือดข้างหู (marginal ear vein) ขั้นตอนการฉีดแอนทิเจนมีดังนี้คือ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันที่	ปริมาตรที่ฉีดให้กระต่าย (มล.)
1	0.5
2	1.0
3	1.5
4-6	หยุดพักการฉีด (rest)
7	1.5
8	2.0
9	2.0
10-15	หยุดพักการฉีด

วันที่ 16 เก็บเลือดจากกระต่ายโดยใช้วิธีกรีดใบหูประมาณ 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วเก็บในตู้เย็นข้ามคืน ปั่นแยกซีรัม นำมาตรวจวัดระดับไตเตอร์

ค. การตรวจวัดระดับไตเตอร์ (Somasegaran and Hoben, 1985) เจือจางซีรัมในอัตราส่วน 1:2 เป็นลำดับ (serial two fold dilution) โดยปิเปตสารละลาย NSS ลงในหลอดทดลองที่ 1 2.0 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลาย NSS ลงในหลอดทดลองที่ 2 ถึงหลอดที่ 10 หลอดละ 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตซีรัม 2.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องหมุนผสมสารละลาย (vortex mixer) หลอดที่ 1 จะมีซีรัมเจือจางเท่ากับ 1:2 จากนั้นใช้ปิเปตอันใหม่ถ่ายซีรัมเจือจางจากหลอดที่ 1 2.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ทำเช่นเดียวกันตั้งแต่หลอดที่ 2 จนถึงหลอดที่ 10 จะได้ซีรัมเจือจางจากหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 12 คือ 1/2 1/4 1/8 1/16 ... 1/4096 หยดซีรัมที่เจือจางแต่ละหลอดลงในหลุมแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลทหลุมละ 2 หยด (50 ไมโครลิตร/หลุม) ตามลำดับ จากนั้นจิ้งหยดอินแอคทิเวทแอนทิเจนที่เตรียมไว้แล้วลงในแต่ละหลุมๆ ละ 2 หยด เขย่าให้เข้ากันเบาๆ เติมสี crystal violet ที่ใช้ย้อมแบคทีเรียหลุมละ 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่รองพื้นด้วยกระดาษชำระชุ่มน้ำ ปิดฝาให้แน่น ตั้งไว้ที่ 37 °ซ 3 ชั่วโมง แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จึงอ่านผลการทดลอง

7.3.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ฟิวแซนต์กับสายพันธุ์พ่อแม่ทางอิมมูโนวิทยา ได้ทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนทิเจนบนผิวเซลล์ของฟิวแซนต์ F11, F14, F15, F20 และ F36 กับแอนทิบอดีของสายพันธุ์พ่อแม่ TAL 141 ure his และ USDA 192 Trp Phe เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 3 กลุ่มคือ

ก. กลุ่มควบคุมผลบวก (positive control) ทดสอบการเกิดแอกกลูทิเนชันระหว่างแอนทิเจนของสายพันธุ์พ่อแม่แต่ละสายพันธุ์กับแอนทิซีรัมของสายพันธุ์นั้นๆ

ข. กลุ่มควบคุมผลความคล้ายกันของแอนทิเจนระหว่างสายพันธุ์ (cross reactional control) ทดสอบการเกิดแอกกลูทิเนชันระหว่างแอนทิเจนของสายพันธุ์พ่อแม่แต่ละสายพันธุ์ข้ามกับแอนทิซีรัมของอีกสายพันธุ์หนึ่ง (สลับแอนทิซีรัมในกลุ่มควบคุม ก.)

การอ่านผลการเกิดแอกกลูทิเนชัน

ผลบวก คือ การเกิดการแผ่ของตะกอนเซลล์เป็นแผ่นบางๆ ติดกับก้นหลุมในสารละลายใส (granular clumps in a clear supernatant)

ผลลบ คือ การเกิดการรวมกลุ่มเป็นก้อนของเซลล์คล้ายเม็ดกระดุมที่ก้นหลุม และเมื่อเขย่าเบาๆ สารละลายจะขุ่นทันที (wisp of smoke)

7.4 <u>การทดสอบความสามารถในการติดปมและการตรึงไนโตรเจนกับพืชตระกูลถั่ว</u>

พืชตัวอย่างที่เลือกมาทดลองในที่นี้คือ ถั่วเหลือง สจ.4 และ ซีราโทร (seratro) ซึ่งปลูกในขวดแบบ Leonard jar assemblies (ดัดแปลงจาก Vincent, 1970)

7.4.1 การเตรียมทราย นำทรายละเอียดที่ปราศจากเศษดิน หรืออินทรียวัตถุมาล้างให้สะอาด ผึ่งแดดให้แห้ง

7.4.2 การเตรียม Leonard jar การเตรียม Leonard jar อาจใช้ขวดเบียร์ขนาด 700 มิลลิลิตร เป็นวัสดุก็ได้ ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนล่างเป็นส่วนก้นขวดที่ถูกตัดออก ใช้สำหรับบรรจุสารอาหารเหลวสำหรับพืช ส่วนบนเป็นขวดปลายเปิดทั้งสองด้าน โดยด้านล่างคือคอขวดเรียวยาว ส่วนบนนี้ใช้บรรจุทรายจนเต็ม ตรงแกนกลางเป็นเชือกด้ายต่อจากส่วนบนผ่านคอขวดลงมาถึงส่วนล่าง เพื่อดูดสารอาหารให้กับพืช

ก่อนปลูกพืช จะอบฆ่าเชื้อ Leonard jar และสารอาหารเหลวของพืชแยกกัน โดยอบฆ่าเชื้อ Leonard jar ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ อย่างน้อย 3 ชั่วโมง สำหรับสารอาหารพืชจะใช้วิธีการอบฆ่าเชื้อแบบสูตรอาหารของแบคทีเรีย

7.4.3 การเพาะเมล็ดพืช เลือกเมล็ดถั่วที่มีลักษณะสมบูรณ์ นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดย

ก. เมล็ดถั่วเหลือง แช่ในไฮโปคลอไรท์ 20 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วหลายๆ ครั้ง (ประมาณ 6 ครั้ง) ก่อนนำเมล็ดไปเพาะ

ข. เมล็ดซีราโทร แช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วแช่ในกรดซัลฟุริกเข้มข้นเป็นเวลา 5 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ก่อนนำเมล็ดไปเพาะ หลังจากที่เมล็ดพืชผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำเมล็ดที่มีลักษณะเปลือกย่นไปเพาะบนสำลีชุ่มน้ำในจาน petri-dish ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 วัน เลือกเมล็ดที่มีรากงอกประมาณ 7.5 มิลลิลิตร ไปปลูกใน Leonard jar

7.4.4 การปลูกและบำรุงรักษาพืชตัวอย่าง นำเมล็ดที่มีรากงอกใกล้เคียงกัน ไปฝังในทรายซึ่งบรรจุอยู่ใน Leonard jar ที่เติมสารอาหารเหลวซึ่งปราศจากแหล่งต้นตอไนโตรเจนสำหรับพืช (สารอาหารเหลวจะผ่านด้ายขึ้นมาส่วนบนทำให้ทรายชุ่มชื้น) และใช้ปิเปตดูดคัลเจอร์ของเชื้อไรโซเบียมประมาณ 10^9 เซลล์ต่อขวด โดยหยอดเชื้อลงบริเวณที่มีเมล็ดฝังอยู่ ยกเว้นกลุ่มควบคุม (ไม่ต้องใส่เชื้อไรโซเบียม) โรยทรายแห้งและหินก้อนเล็กๆ ที่ฆ่าเชื้อแล้วกลบผิวหน้า เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายที่เติมลงไประเหยเร็วเกินไป และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อรา นำตัวอย่างทั้งหมดไปไว้ในห้องกระจกซึ่งแสงแดดผ่านได้ แต่ควบคุมการผ่านเข้าออกของกระแสลมและการปนเปื้อนจากเชื้อนอกระบบที่ศึกษา คอยเติมสารอาหารเหลวของพืชดังกล่าวข้างต้น ประมาณสัปดาห์ละ 2 ครั้ง และสังเกตการเจริญเติบโต

7.4.5 การเก็บพืชตัวอย่าง เก็บพืชตัวอย่างที่มีอายุ 4 สัปดาห์ โดยการตัดตรงบริเวณรอยต่อระหว่างลำต้นกับรากข้อแรก เก็บส่วนรากซึ่งอาจมีปมติดอยู่โดยการสลัดทรายออกให้เหลือติดรากน้อยที่สุด เพื่อนำไปหาแอคทิวิตีการรีดิวซ์อะเซทีลีน ส่วนลำต้นนำไปชั่งน้ำหนักและวัดส่วนสูง

7.4.6 การหาแอคทิวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีน (ARA) (Somasegaran and Hoben, 1985)

นำตัวอย่างพืชส่วนรากที่เอาทรายออกแล้ว ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางให้แน่น ดูดอากาศภายในออก 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรขวด แล้วบรรจุอะเซทีลีนเข้าไปแทนที่ด้วยปริมาตรเท่ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง วัดปริมาณอะเซทีลีนที่เกิดขึ้นโดยการฉีดตัวอย่างกาซ 100 ไมโครลิตร เข้าเครื่องกาซโครมาโตกราฟ ซึ่ง

ใช้ดีเทคเตอร์ชนิด hydrogen flame ionization คอลัมน์ Porapak N สำหรับเครื่องของ Varian Model 3700 ใช้อัตราเร็วของกาซพา (N_2) 30 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ขนาด 0.28x200 เซนติเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 °ซ อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ 110 °ซ อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ 150 °ซ ถ้าใช้เครื่องของ Shimadzu GC-R1A ใช้อัตราเร็วของกาซพา 45 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ขนาด 0.32x210 เซนติเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 °ซ อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ 180 °ซ อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ 180 °ซ

ปริมาณกาซที่เกิดขึ้นคำนวณได้จากความสูง หรือพื้นที่ใต้กราฟของเอทีลีนตัวอย่างเปรียบเทียบกับความสูง หรือพื้นที่ใต้กราฟของเอทีลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก นับจำนวนปม และชั่งน้ำหนักปม แอคทิวิตีจำเพาะการรีดิวซ์อะเซทีลีน คือ จำนวนไมโครโมลของอะเซทีลีนที่เกิดขึ้นต่อ 1 กรัมน้ำหนักปมแห้งต่อชั่วโมง

7.4.7 การแยกเชื้อจากปมรากพืช (Vincent, 1970) แยกปมจากรากพืชตระกูลถั่ว นำมาล้างให้สะอาด แช่ในไฮโปรคลอไรต์ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ผิวนอก แล้วล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อประมาณ 6 ครั้ง ใช้คีมปลายแหลมบดปมในจานปลอดเชื้อ แล้วใช้ห่วง (loop) แตะเขี่ยเชื้อบน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่มี congo red นำไปบ่มที่ 30 °ซ สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้นว่าเป็นโคโลนีของไรโซเบียมชนิดเดิมหรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย