3. วิธีการวิจัย

3.1. ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในการวิจัย

ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในการวิจัย เป็นแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วจำนวน 7 สายพันธุ์ และประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์รวมเป็น 65 สายพันธุ์ที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง 15 ตำบลใน 3 อำเภอ (อ.ชาติตระการ อ.บางระกำ และ อ.พรหมพิราม) จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งแยกโดย Emampaiwong (2006) สาเหตุที่เลือกแบคทีเรียเหล่านี้เพราะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาโดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ RPO1 หรือ CRL-7 เป็นไพร์เมอร์ ซึ่งเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างกัน แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้ต่างสายพันธุ์ (Emampaiwong, 2006)

เก็บแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียงที่ 4°C ซึ่งบรรจุ YMA (Yeast extract mannitol agar) ที่เติมสี Congo red ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25 $\mu g.ml^{-1}$ โดยปลูกเชื้อ (inoculate) ในอาหาร YMA ที่เตรียมใหม่ (subculture) ทุกๆ 6 เดือน นอกจากนี้เก็บรักษาเซลล์เหล่านี้ในระยะยาว (6 เดือนขึ้นไป) ใน 10% กลีซีรอลที่ -80°C อาหาร YMA มีสูตรอาหารดังที่ระบุโดย Somasegaran & Hoben (1994) ดังนี้ (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) : mannitol 10.0 ; K_2HPO_4 0.5 ; $MgSO_4$ 0.2 ; Nacl 0.1 ; yeast extract 0.5 ; วุ้น 15 ; พีเอช 6.8 น้ำกรอง 1 ลิตร

3.2. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนระหว่าง *nodD1* และ *nodA*

3.2.1 ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าได้แก่ *nodY* ดังนั้นในการเพิ่มจำนวน *nodY* จึงใช้ไพร์เมอร์ *nodY*F และ *nodY*R ที่ออกแบบโดย Emampaiwong (2006) ซึ่งมีสมบัติตามที่ปรากฏในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สมบัติของไพร์เมอร์ *nodY*F และ *nodY*R (Emampaiwong, 2006)

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (จำนวนคู่เบส)	GC (%)	Tm (°C) *
*nodY*F	5'TGTACGCGGGTAAACC3'	340	56.3	55.1
*nodY*R	5'AGCGCAACGAGAAGAT3'		50.0	52.6

*ใช้สูตรคำนวณ melting point temperature (Tm) ตามที่รายงานโดย Pastorino และคณะ (2003) ดังนี้

$$Tm = 63.3 + (0.41 \times GC\%) - \frac{500}{\text{จำนวนคู่เบสของไพร์เมอร์}}$$

3.2.2 การแยกโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

แยกโครโมโซมัลดีเอ็นเอ โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย 1 ลูป ในอาหารเหลว YMB 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนถึงระยะมิดล็อก ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ จากนั้นเติม 100 ไมโครลิตร 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไลโซไซม์ ใน 10 mM EDTA เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์ไป freeze/thaw ที่ -20 องศาเซลเซียส / 80 องศาเซลเซียส 4 ครั้ง และเติม DNAzol® (Invitrogen) 250ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 90% เอทานอล ล้างดีเอ็นเอโดย 70% เอทานอล จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ปลอดเชื้อลงไปเพื่อละลายดีเอ็นเอ คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยใช้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร ตามวิธีมาตรฐาน (Sambrook et al., 1989)

3.2.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนระหว่าง *nodD1* และ *nodA* โดยวิธีพีซีอาร์

3.2.3.1 ส่วนผสมและโปรแกรมสำหรับเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์ เมื่อใช้ *nodD1*Rf และ *nodA*Fc หรือ *nodY*F และ *nodY*R เป็นไพร์เมอร์มีดังนี้

ส่วนผสมพีซีอาร์ : 10x พีซีอาร์บัฟเฟอร์ 2 µl, 10x 2.5mM dNTPs 2 µl, *nodD1*Rc 2.5 µl (25 pmol) *nodA*Fc 2.5 µl (25 pmol) *Taq* polymerase (5 units/ µl) 0.2 µl, สารละลายดีเอ็นเอ 200 ng, เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 20 µl โปรแกรมเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยวิธีพีซีอาร์มีดังนี้ 95^{0}C 15 วินาที, 55^{0}C 30 วินาที, 72^{0}C 90 วินาที (จำนวน 30 รอบ) ตามด้วย 72^{0}C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1.25% agarose gel electrophoresis โดยวิธีมาตรฐาน (Sambook et al., 1989) โดยใช้ 1kb λDNA ladder (Invitrogen) เป็นขนาดโมเลกุลมาตรฐาน และถ่ายภาพเจลภายใต้แสงยูวีของ UV-transilluminator (Bio-Rad) ด้วยฟิล์มโพลารอยด์ (FUJI FILM FP-3000B)

3.2.3.2 การทำ RFLP ของชิ้นส่วนระหว่าง *nodD1* และ *nodA*

ส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของสถาบันจีโนมสำนักงานส่งเสริมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และหา restriction sites โดยใช้โปรแกรม Bioedit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html) หลังจากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Nucleospin® ExtractII (Macherey-Nagel) ทำ restriction digestion ตามวิธีที่แนะนำโดยผู้ผลิต และทำ agarose gel electrophoresis ตามวิธีมาตรฐาน (Sambrook et al., 1989)

3.3 การหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง

กระตุ้นไรโซเบียมถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์ที่เก็บรักษาในอาหารวุ้นเอียงโดยขีดเชื้อบนอาหารแข็ง YMA ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 30^{0}C เป็นเวลา 2 วัน สำหรับไรโซเบียมประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และ 4 วันสำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ปลูกเชื้อ 1 ลูป (loop) ลงในอาหาร

เหลว YMB (Yeast extract mannitol broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน Erhenmeyer flasks ที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30°C ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน สำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และ 4 วันสำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า หลังจากนั้นเติมสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 5 มล. ลงในโหลเลี้ยวนาร์ดที่บรรจุถั่วเหลืองงอกราก พันธุ์เชียงใหม่ 60 จำนวน 3 เมล็ดต่อโหล วิธีเตรียมโหลเลี้ยวนาร์ดดังปรากฏใน Somasegaran and Hoben (1994) ดังนี้ นำขวดเบียร์ขนาด 1 ลิตร มาตัดปลายขวดออกให้เหลือปริมาตรขวด 700 มิลลิลิตร นำไปคว่ำลงในขวดเนสกาแฟขนาดจุ 1 ลิตร ปากขวดเบียร์จะอยู่ห่างจากก้นขวดเนสกาแฟประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใช้สำลีอุดปากขวดเบียร์โดยมี cotton rope wick ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ยาว 50 มิลลิเมตร หลังจากนั้นเททรายหยาบสำหรับเลี้ยงต้นไม้ซึ่งเป็นทรายที่ซื้อมาใหม่ลงในขวดเบียร์ และเติมสารอาหารเลี้ยงถั่วเหลืองที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน (nitrogen-free medium) พีเอช 6.8 ลงในขวดเนสกาแฟปริมาตร 600 มิลลิลิตรต่อขวด นำขวดเลี้ยวนาร์ดที่ประกอบเสร็จแล้วไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอสูงที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เตรียม negative control โดยเลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนและไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เตรียม positive control โดยเลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่มี 0.05% โปตัสเซียมไนเตรตใน nitrogen-free medium เตรียมตัวอย่าง (treatment samples) โดยเติมเซลล์แขวนลอย แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนระยะมิดล็อคปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งเมล็ด เลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน พีเอช 6.8 ซึ่งมีสูตรอาหารตามที่ระบุโดย Somasegaran and Hoben (1994)

หลังจากเลี้ยงต้นถั่วเหลืองได้ 14 วัน ถอนต้นถั่วเหลืองทิ้งไว้ให้เหลือ 2 ต้นต่อขวด รดด้วยสารอาหารเลี้ยงถั่วเหลืองทุกวันจนกระทั่งถั่วเหลืองทุกพันธุ์ออกดอก (28 วัน) ถ่ายภาพรากที่ติดปมและชั่งน้ำหนักแห้งลำต้น