

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. แยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนจากส่วนใบ ลำต้น และรากของอ้อย

1. นำตัวอย่างอ้อยมาจากกลุ่มวิจัยทรัพยากรพันธุกรรมและธาตุอาหารพืช ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ปลูกในสภาพ sand culture จำนวน 9 ตัวอย่าง (ตาราง 1) ประกอบด้วยอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3 (AT3) จำนวน 1 ตัวอย่าง อ้อยป่า จำนวน 2 ตัวอย่าง (W1 และ W2) อ้อยเลี้ยงพันธุ์มะลิชาท จำนวน 6 ตัวอย่าง แบ่งตามปริมาณ คลอโรฟิลล์ในใบ ได้แก่ C2H และ C7H ซึ่งเป็นกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณสูง เท่ากับ 21.1 และ 26.2 SPAD units ตามลำดับ (วัดด้วย chlorophyll meter, Minolta รุ่น SPAD 502) C32M และ C34M ซึ่งเป็นกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบปริมาณปานกลางเท่ากับ 18.7 และ 18.1 SPAD units ตามลำดับ รวมทั้ง C13L และ C15L ซึ่งเป็นกลุ่มท่อนพันธุ์ที่มีคลอโรฟิลล์ในใบ ปริมาณต่ำเท่ากับ 15.3 และ 15.6 SPAD units ตามลำดับ

ตาราง 1 แหล่งที่มาของอ้อยที่ใช้ในการศึกษา

พันธุ์อ้อย	สถานที่เก็บตัวอย่าง
อู่ทอง 3	ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี
อ้อยป่า	ศูนย์เกษตรอ้อยภาคกลาง อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี
อ้อยเลี้ยงพันธุ์มะลิชาท	แปลงปลูกอ้อยของเกษตรกร อ. สารภี จ. เชียงใหม่

2. นำตัวอย่างมาล้างน้ำให้สะอาด นำเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 2% NaOCl เป็นเวลา 3 นาที และ 70% ethanol เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ (Whatman, UK) ตรวจสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยนำน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อที่ใช้ล้างในครั้งสุดท้ายมา spread บนอาหาร nutrient agar (NA)

3. นำตัวอย่างมาบดด้วยโกร่งที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในอาหาร nitrogen free broth (NFB) บ่มใน orbital incubator shaker (Gallenkamp, UK) ที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน

4. ดูอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างพืชมาทำการเจือจางจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-4} และนำแต่ละความเจือจางมา spread บนอาหาร nitrogen free agar (NFA) ที่ความเจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 ถึง 7 วัน

5. นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร NFA คำนวณปริมาณเชื้อแบคทีเรียในหน่วย colony forming unit/ gram fresh weight (CFU/ gram fresh weight)

6. แยกแบคทีเรียให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร NFA โดยแยกและคัดเลือกแบคทีเรียโดยอาศัยรูปร่าง ลักษณะ สี และการสร้างเมือกของโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน เก็บเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ใน 25% glycerol ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การจำแนกชนิดแบคทีเรียจริงในโตรเจน

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับจีโนมโดยอ้างอิงจาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994) โดยตรวจสอบลักษณะ ขนาด และการติดสีแกรมของเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CX31, UK) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ potato dextrose agar (PDA), nutrient agar (NA) และ glucose yeast extract calcium carbonate (GYC) รวมทั้งการทดสอบ catalase test, oxidase test, indole production test, methyl red – voges proskauer test (MR-VP test), motility test, starch hydrolysis และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน เป็นต้น (ภาคผนวก ข)

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ (ดัดแปลงตามวิธีของ Elbeltagy *et al.*, 2001)

1. นำแบคทีเรียใส่ในขวดรูปชมพู่ (Schott Duran, Germany) ขนาด 125 ml ที่มีอาหาร NFB ปริมาตร 50 ml บ่มใน orbital incubator shaker ที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน ปรับปริมาณเชื้อให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland standard no. 2 (ประมาณ 6×10^8 CFU/ml) (ภาคผนวก ง)

2. ดูดเซลล์แบคทีเรียจากอาหาร NFB ปริมาตร 3 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 ml (Pyrex, USA) ที่มีอาหาร NF semisolid ปริมาตร 7 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. ดูดอากาศออกจากหลอดทดลองและฉีดก๊าซ acetylene (C_2H_2) เข้าไปแทนที่อากาศในปริมาณที่เท่ากัน โดยให้บรรยากาศภายในหลอดทดลองมีความเข้มข้นของก๊าซ acetylene อยู่ 10% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน เก็บก๊าซตัวอย่างปริมาตร 3 ml ในหลอดสุญญากาศ (CRM

Gongdong, China) และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ในกรณีที่ไม่สามารถนำไปตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซ ethylene (C_2H_4) ได้ทันที

4. ตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซ ethylene (C_2H_4) ที่เกิดขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเครื่อง Gas chromatograph (GOW MAC รุ่น 750 Flame Ionization Detection, USA) ซึ่งมี detector เป็นแบบ Hydrogen Flame Ionization Detector (FID) column บรรจุสาร Porapak N อุณหภูมิของ column 55°C อุณหภูมิของ injector port 100°C และอุณหภูมิของ detector 100°C คัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้สูงไว้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่อไป

4. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase โดยวิธี acetylene reduction assay เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้ (ดัดแปลงตามวิธีของ Elbeltagy *et al.*, 2001)

1. นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่มีอาหาร NFB ปริมาตร 50 ml บ่มใน orbital incubator shaker ที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน ปรับปริมาณเชื้อให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland standard no. 2 (ประมาณ 6×10^8 CFU/ml)

2. ดูดเซลล์แบคทีเรียจากอาหาร NFB ปริมาตร 3 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 ml ที่มีอาหาร NF semisolid ปริมาตร 7 ml โดยมีความเข้มข้นของ yeast extract เป็น 0%, 0.005%, 0.01% และ 0.05% บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3. ดูดอากาศออกจากหลอดทดลองและฉีดก๊าซ acetylene (C_2H_2) เข้าไปแทนที่อากาศในปริมาณที่เท่ากัน โดยให้บรรยากาศภายในหลอดทดลองมีความเข้มข้นของก๊าซ acetylene อยู่ 10% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน เก็บก๊าซตัวอย่างปริมาตร 3 ml ในหลอดสูญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ในกรณีที่ไม่สามารถนำไปตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซ ethylene (C_2H_4) ได้ทันที

4. ตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซ ethylene (C_2H_4) ที่เกิดขึ้น ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเครื่อง Gas chromatograph (GOW MAC รุ่น 750 Flame Ionization Detection, USA) ซึ่งมี detector เป็นแบบ Hydrogen Flame Ionization Detector (FID) column บรรจุสาร Porapak N อุณหภูมิของ column 55°C อุณหภูมิของ injector port 100°C และอุณหภูมิของ detector 100°C คัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่ากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนได้สูงไว้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่อไป

5. เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในอาหาร NF semi-solid เพื่อและหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry (ภาคผนวก จ) คำนวณหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียในหน่วย $\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg protein/h}$ (ภาคผนวก ฉ)

5. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจน

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่มีอาหาร NFB ปริมาตร 50 ml บ่มใน orbital incubator shaker ที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน
2. คูดเซลล์แบคทีเรียจากอาหาร NFB ปริมาตร 5 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่มีอาหาร NFB ปริมาตร 100 ml (ปริมาณเชื้อแบคทีเรียตั้งต้น 5% v/v) บ่มใน orbital incubator shaker ที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C
3. วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Scientific รุ่น GENESYS 20, USA) ที่ความยาวคลื่น 660 nm ทุก 6 ชั่วโมง จนกระทั่งแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตคงที่

6. การตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา

1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) ของแบคทีเรีย (ดัดแปลงตามวิธีของ Prakamhang *et al.*, 2009)
 - (1) เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียใน nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 ml บ่มใน orbital incubator shaker ที่ความเร็ว 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
 - (2) แยกเซลล์แบคทีเรียใส่ใน microcentrifuge tube (Hycon E 1004, USA) โดยปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge (Hettich รุ่น Mikro 200 R) ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
 - (3) เติม extraction buffer (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 1.25% (w/v) SDS) ปริมาตร 720 μl แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo รุ่น TW 12, Germany) ที่อุณหภูมิ 65°C สลับกับการปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex (IKA รุ่น MS1 Minishaker, Germany) ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 20 นาที
 - (4) เติม 5M potassium acetate ปริมาตร 225 μl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที คูดส่วนใสใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่
 - (5) เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) ปริมาตร 500 μl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที

(6) ดูดส่วนใสใส่ ใน microcentrifuge tube อันใหม่ เติม cold isopropanol ปริมาตร 2/3 เท่า ของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที

(7) ทิ้งส่วนใส เติม 70% ethanol ปริมาตร 300 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ ทำซ้ำ 2 ครั้ง

(8) ปล่อยตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติม 1xTE buffer ปริมาตร 30 μ l เก็บดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

(1) เพิ่มปริมาณชิ้น 16S rRNA โดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ primer คู่ที่เหมาะสมกับชิ้น คือ 27f (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') และ 1525r (5' - AAG GAG GTG WTC CAR CC - 3') (Lane, 1991) โดยเตรียมเป็น Master mix ผสมกันใน microcentrifuge tube ที่แช่ใน น้ำแข็งซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Component	Final concentration	Volume/reaction
10x buffer (A/S) (Vivantis, USA)	1x	5.0 μ l
dNTP mix (Vivantis, USA)	10 mM	1.0 μ l
Primer: F (27f) (Bio Basic, USA)	1 nm	1.0 μ l
Primer: R (1525r) (Bio Basic, USA)	1 nm	1.0 μ l
Taq DNA Polymerase (Vivantis, USA)	5 unit/ml	0.4 μ l
MgCl ₂	50 mM	2.0 μ l
DNA	-	1.0 μ l
Deionized water	-	36.1 μ l
DMSO	5%	2.5 μ l
Total volume	-	50 μ l

(2) ดูดส่วนผสมดังกล่าวแบ่งใส่ลงใน PCR tube (Axygen, USA) จากนั้นเติม DNA ใน ขั้นตอนสุดท้าย

(3) นำ PCR tube เข้าเครื่อง PCR MJ mini gradient thermal cycle (Bio-rad รุ่น My cycler, USA) โดยตั้งโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

Initial denaturation	94°C	2 นาที	} 30 รอบ
denaturation	94°C	30 วินาที	
Annealing	55°C	30 วินาที	
Extension	72°C	30 วินาที	
Final extension	72°C	7 นาที	

4) เก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ -20 °C

3. การแสดงผลของ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis

(1) เตรียม agarose gel โดยการละลาย 0.8% agarose ด้วย 1X TAE buffer ผสมให้หลอมละลายเข้ากัน

(2) เท agarose gel ที่เตรียมลงใน gel chamber ที่วาง comb ไว้แล้วเพื่อให้เกิดเป็นหลุมสำหรับใส่ตัวอย่าง ปล่อยให้แข็งตัวประมาณ 30 - 45 นาที

(3) ดึง comb ออกอย่างระมัดระวัง แล้วนำมาวางลงใน gel chamber เท 1X TAE buffer ให้ท่วม agarose gel ประมาณ 1 mm

(4) ผสม loading dye (Vivantis, USA) ปริมาตร 3 µl กับ PCR product ปริมาตร 3 µl ให้เข้ากันแล้วใส่ลงในแต่ละหลุมของ agarose gel โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder (Vivantis, USA)

(5) Run agarose gel โดยใช้ชุด gel electrophoresis (Amersham Biosciences, USA) ซึ่งจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 45 นาทีหรือสังเกตการเคลื่อนที่ของสี methylene blue แล้วจึงหยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อถึงระยะที่เหมาะสม

(6) ย้อม agarose gel โดยแช่ในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้าง agarose gel โดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที นำไปตรวจสอบผลด้วยเครื่อง UV transilluminator (Syngene, USA)

4. การเตรียมดีเอ็นเอ (DNA) ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Nucleic acid and protein purification (NucleoSpin® Extract II) (Macherey-Nagel, Germany)

(1) ผสม loading dye กับ PCR product อัตราส่วน 1:1 แล้วใส่ลงในแต่ละหลุมของ agarose gel โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder และ run agarose gel โดยใช้ชุด gel electrophoresis ซึ่งจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ 100 V เป็นเวลา 45 นาที

(2) ตัด agarose gel ในตำแหน่งที่ปรากฏแถบของ DNA ขนาดที่ต้องการภายใต้เครื่อง UV transilluminator ใส่ลงใน microcentrifuge tube ที่ทราบน้ำหนัก

(3) เติม NT buffer 200 µl ต่อน้ำหนัก agarose gel 100 mg บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 – 10 นาที ผสม NT buffer และ agarose gel ให้เข้ากันทุกๆ 2 – 3 นาที กระทั่งละลายอย่างสมบูรณ์

(4) ดูดส่วนผสมข้างต้นใส่ใน NucleoSpin® Extract II column และนำไปวางบน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

(5) เติม NT3 buffer ปริมาตร 700 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อล้าง silica membrane ที่ของเหลวใน collection tube

(6) ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที รวมทั้งอาจนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 – 5 นาที เพื่อกำจัด NT3 buffer ที่อาจติดค้างอยู่บน silica membrane

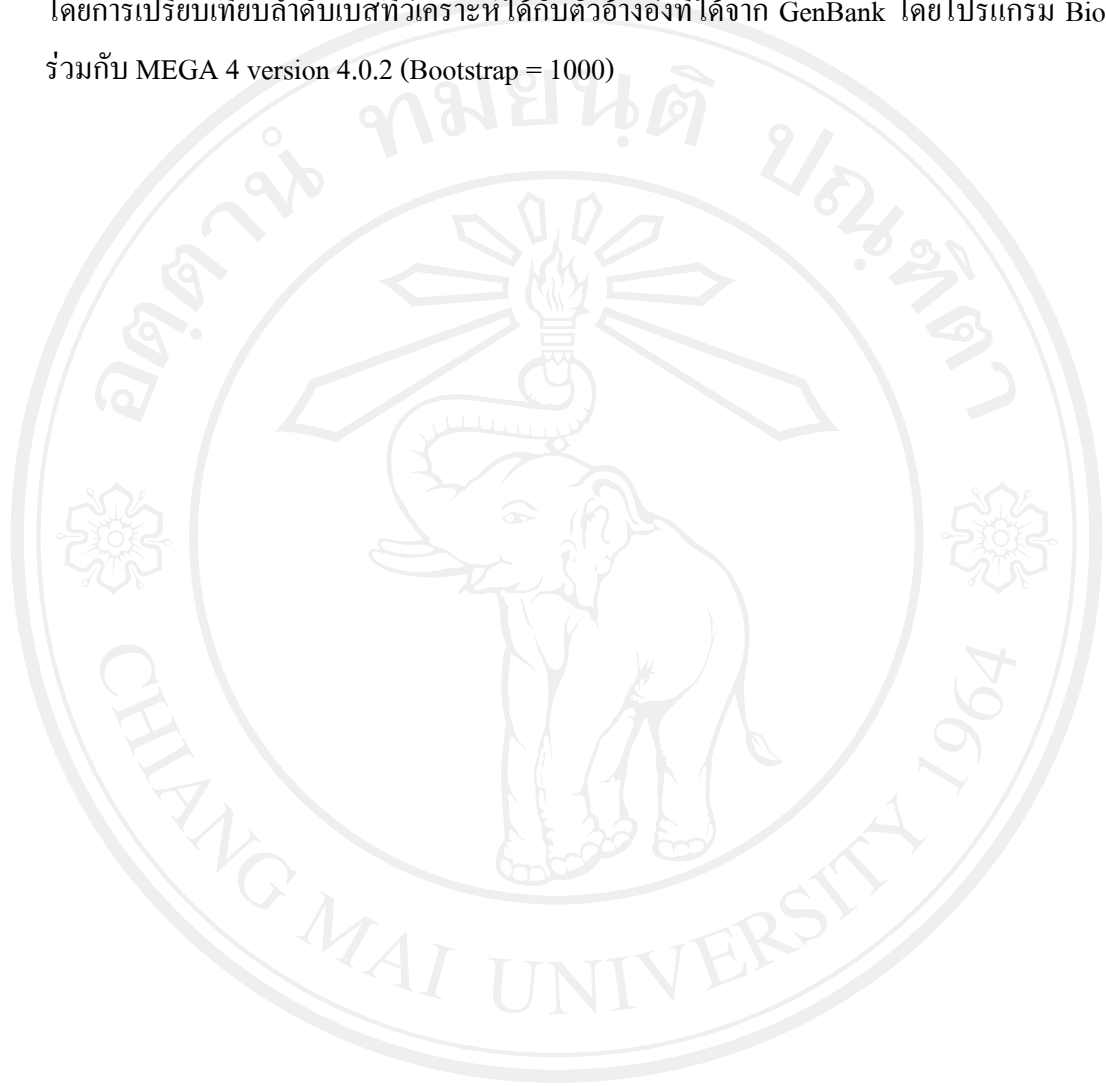
(7) วาง NucleoSpin® Extract II column ลงบน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม Elution buffer NE ปริมาตร 15-50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บ PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิ -20°C

5. การหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

(1) ส่งตัวอย่างผล PCR product ที่ได้เพื่อตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ที่บริษัท First BASE Ltd., ประเทศมาเลเซีย พร้อมด้วยไพรเมอร์ 27f (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') และ 1525r (5'- AAG GAG GTG WTC CAR CC - 3')

(2) นำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences (<http://147.47.212.35:8080/index.jsp>) โดยใช้โปรแกรม Identify และ SIM Table และฐานข้อมูลของ NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) เพื่อหาความคล้ายคลึงของลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่อยู่ในฐานข้อมูล

6. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ (phylogenetic relationship) โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้กับตัวอ้างอิงที่ได้จาก GenBank โดยโปรแกรม BioEdit ร่วมกับ MEGA 4 version 4.0.2 (Bootstrap = 1000)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved