บทที่ 2

วิธีการทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ก๊าซที่ใช้

ไนโตรเจน ของ บริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซจำกัด

อะเซทีลีน ของ บริษัทสิทธิโชคเอนจิเนียริ่งจำกัด

เอทีลีน ของ บริษัทสิทธิโชคเอนจิเนียริ่งจำกัด

อากาศอัด ของ บริษัทสิทธิโชคเอนจิเนียริ่งจำกัด

อาร์กอน ของ บริษัทไทยอินดัสเตรียลก๊าซจำกัด

ไฮโดรเจน จาก เครื่องให้กำเนิดไฮโดรเจน(Hydrogen generator) ของ General Electric

1.2 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 ของ Bosch & Lomb

เครื่องปั่นแรงสูงของ Beckman Model J21C และ Sorvall Model RC-5

เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี ของ Perkin Elmer Model F17

เครื่องเขย่าซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking waterbath) ของ Forma Scientific Company

1.3 เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็น Analar Grade

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นของบริษัท Difco

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 Klebsiella pneumoniae M5a1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มียีนการตรึงไนโตรเจน (nif^+) อยู่ด้วย

2.1.2 Escherichaia coli K12 JC5466 (RP41) ซึ่ง RP41 นี้มียีนของ nif^+, his^-, T^r, A^r และ K^r อยู่ด้วย

2.2 ไวรัส ได้แก่ Phage P1

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 L-Brothหรือ LB-agar (Luria,S.E.,Adams,J.N.,and Ting,R.C.1960) เป็นอาหารเชื้ออุดม (rich medium) ประกอบด้วย

Tryptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ถ้าเป็น LB-glucose medium เติมกลูโคสให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 เปอร์เซนต์ ถ้าเป็นอาหารแข็ง เติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

3.2 R-medium (Goldberg,R.B.;Bender,R.A.;and Streicher, S.L.1974) เป็นอาหารที่ใช้ในการหาปริมาณของ Phage P1 ประกอบด้วย

Tryptone	15.50	กรัม
Yeast Extract	8.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.50	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ก่อนใช้เติมกลูโคส และ แคลเซียมคลอไรด์ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 เปอร์เซนต์ และ 2×10^{-3} โมลาร์ ตามลำดับ ในกรณีที่ใช้เป็น R-bottom medium เติม Bacto-agar 12 กรัมต่อลิตร และกรณีที่ใช้เป็น R-top medium เติม Bacto-agar 6 กรัมต่อลิตร

3.3 Minimal Medium (Miller,J.H.1972) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ สำหรับใช้ในการทดลองทั่วไป ประกอบด้วย

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ก่อนใช้เติมแมกเนเซียมซัลเฟต และ กลูโคส ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01 และ 0.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ถ้าใช้เป็นอาหาร... แข็ง เติม Bacto - agar 15 กรัมต่อลิตร

3.4 Minimal Medium สำหรับการตรึงไนโตรเจน (ปรับปรุงจาก Streicher,S.;Gurney,E.;and Valentine,R.C.1971) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ สำหรับใช้ในการทดสอบการตรึงไนโตรเจน ประกอบด้วย

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	6.25	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.75	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.00	กรัม

เฟอรัสซัลเฟต	0.01	กรัม
โซเดียมโมลิบเดท	0.01	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ก่อนใช้เติมกลูโคส และแมกเนเซียมซัลเฟต ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 และ 0.02 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในกรณีที่ต้องการดูผลของยาปฏิชีวนะ เติม คานามัยซิน แอมพิซิลลิน และ เตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 20 , 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.5 Plate Count Agar ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในกรณีที่ต้องการทราบปริมาณของเซล เป็นอาหารสูตรสำเร็จของบริษัท Difco ละลาย Plate Count Agar 23.5 กรัม ในน้ำกลั่น1 ลิตร

3.6 Diluting Fluid (Miller,J.H.1972) สำหรับใช้ในการเจือจาง Phage P1 ประกอบด้วย

Tryptone	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	8.5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.7 MC medium (Miller,J.H.1972) สำหรับใช้เป็น Phage P1 absorbing medium ในการทำทรานสดัคชั่น ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	0.005	โมลาร์
แมกเนเซียมซัลเฟต	0.100	โมลาร์

3.8 6-Cyanopurine plate (ปรับปรุงจาก McNeil,D.,and Brill, W.J.1978) สำหรับใช้ในการศึกษาการให้สีของ nif มิวแตนท์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 6-Cyanopurine อยู่ด้วย ประกอบด้วยสูตรอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3,4 ยกเว้นไม่ใส่เฟอรัสซัลเฟต และเติม Bacto-agarลงไปด้วย 15 กรัมต่อลิตร ก่อนใช้ เติมกลูโคส , L-Serine และ 6-Cyanopurine ลงไป

002576

ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 เปอร์เซนต์, 50 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 สารละลาย Somogyi's Alkali Copper (Somogyi,M.1945)

สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรท 12 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนท 16 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 4 กรัม และ โซเดียมซัลเฟต 180 กรัม

4.2 สารละลาย Arsenomolybdate (Somogyi,M.1945)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 12.5 กรัม ในน้ำกลั่น 225 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติม กรดซัลฟูริคเข้มข้น 10.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายไดโซเดียมออร์โธอาร์ซิเนท ความเข้มข้น 9 เปอร์เซนต์ จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้นี้ในขวดแก้วสีน้ำตาล บ่มไว้ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ก่อนใช้

4.3 สารละลายต่างสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี่ (Lowry,O.H. 1951)

ผสม 5 เปอร์เซนต์ โซเดียมคาร์บอเนท 50 มิลลิลิตร กับ 0.5 เปอร์เซนต์ คอปเปอร์ซัลเฟต และ 1 เปอร์เซนต์ โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรท 2 มิลลิลิตร

5. การหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีลอรี่ (Lowry,O.H.1951)

ล้างเชื้อด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ แล้วกระจายเซลให้มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 100 - 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เซลที่เตรียมไว้นี้ 0.5มิลลิลิตร ผสมกับ 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้ม

ในน้ำเดือด5 นาที ทำให้เย็น เติมสารละลายด่างของลอรี่ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (เจือจาง 1 : 2) 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้อีก 30 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอน

6. การหาปริมาณ Reducing Sugar โดยวิธีของSomogyi และ Nelson (Nelson,N.1944 , Somogyi,M.1945)

ผสมสารละลายน้ำตาลตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (ประมาณว่ามี Reducing Sugar อยู่ 20 - 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) กับสารละลาย Somogyi's Alkali Copper 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที เติมสารละลายArseno-molybdate 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ที่ความยาวแสง 560 มิลลิไมครอน

7. การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

7.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ถูกเก็บรักษาไว้บน Slant LB-agar ในขวดที่ปิด และซุบทับด้วยพาราฟิน เมื่อต้องการใช้ในการทดลอง จะเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อใหม่ โดยเขี่ยเชื้อมาจากขวดที่เก็บไว้นี้ เฉพาะพวกรีคอมบิแนนท์ จะเติมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน คานามัยซิน และ เตตราซัยคลิน ลงในอาหารปริมาณ 20 , 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7.2 ไวรัส

Phage P1 จะเก็บไว้ใน L-Broth ซึ่งปลอดจากแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 0 - 4 °ซ

8. การเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายใต้ภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน

เตรียมเชื้อตั้งต้น โดยเลี้ยงใน L-Broth 5 มิลลิลิตร ที่ 37 °ซ ในหลอดแก้วขนาดบรรจุ 15 มิลลิลิตร ตลอดคืน ใช้เชื้อตั้งต้นที่เตรียมได้ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามต้องการ 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน วัดความขุ่นของเชื้อในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ความยาวแสง 420 มิลลิไมครอน

9. การให้สีของแบคทีเรียบน 6-Cyanopurine เพลท

ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบมาบน 6-Cyanopurine เพลท โดยเริ่มจากการใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีที่ต้องการจากเพลทตั้งต้น และแตะลงบน 6-Cyanopurine เพลท เป็นจุดเล็ก ๆ เรียงตามลำดับไป โคโลนีละ 1 จุด ประมาณ 50 โคโลนีต่อ หนึ่งจานเพาะเชื้อ (รูปที่ 2) นำไปบ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน 3 - 4 วัน แล้วสังเกตสีของโคโลนีที่เกิดขึ้น

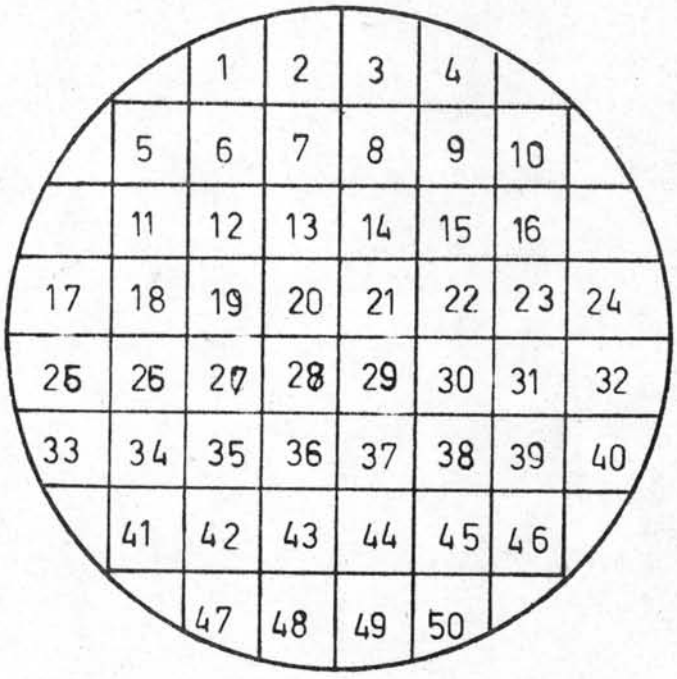
10. การวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทีลีนรีดักชั่น (ปรับปรุงจาก Hardy,R.W.F., et al.1968)

10.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมของ Minimal Medium และ L-Broth เป็น 100 : 1) จำนวน 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ ตลอดคืน สำหรับเชื้อพวกรีคอมบิแนนท์ จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวดังกล่าวข้างต้น และเติมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน คานามัยซิน และ เตตราซัยคลิน ลงไปด้วยในปริมาณ 20 , 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

10.2 การวัดแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีน

ใช้เชื้อตั้งต้นที่เตรียมจาก 10.1 มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimal Medium สำหรับการตรึงไนโตรเจน จำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่ง



รูปที่ 2 ลักษณะจานเพาะเชื้อที่แบ่งพื้นที่เป็น 50 ส่วน แต่ละหมายเลข หมายถึง จุดที่เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบหนึ่งโคโลนีมาแตะไว้

บรรจุอยู่ในขวดกรวยแก้วขนาด 25 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง และนำไปเปลี่ยนเป็นบรรยากาศไนโตรเจน โดยใช้เครื่องปั๊มดูดให้เป็นสุญญากาศ แล้วแทนที่ให้เป็นความดันบรรยากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำซ้ำเช่นนี้ 4 - 5 ครั้ง บ่มเชื้อที่ 30 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือ ตามที่ต้องการในแต่ละการทดลอง เมื่อครบเวลา นำขวดกรวยแก้วนี้มาดูดเอาก๊าซไนโตรเจนออก แล้วเปลี่ยนบรรยากาศอาร์กอนเข้าไปแทนที่โดยวิธีเดียวกับที่อธิบายข้างต้น เติมอะเซทีลีนลงไปให้มีความดัน 0.1 บรรยากาศ โดยใช้เข็มดูดเอาอาร์กอนออกมาจากขวดกรวยแก้ว 2.5 มิลลิลิตร แล้วฉีดก๊าซอะเซทีลีนปริมาณเท่ากันเข้าไปแทนที่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1 ชั่วโมง หาปริมาณของก๊าซเอทีลีนที่เกิดขึ้น จากการรีดิวส์อะเซทีลีนโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยใช้ Hamilton Syringe (Gas tight) ดูดเอาก๊าซในขวดกรวยแก้วออกมา 50 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟีของ Perkin Elmer Model F17 ซึ่งมี Detector เป็นชนิด Hydrogen flame ionization คอลัมน์ Porapak N ขนาด 0.6 X 45 เซนติเมตร และใช้ไนโตรเจนเป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 50 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 55 $^{\circ}$ ซ หาปริมาณของก๊าซเอทีลีนโดยการวัดความสูงของ peak ที่ได้ เทียบกับก๊าซเอทีลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน วัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวแสง 420 มิลลิไมครอน และหาปริมาณโปรตีนของเชื้อทั้งหมดโดยวิธีของลอรี่ แอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวส์อะเซทีลีน คือ จำนวนไมโครโมลของเอทีลีนที่เกิดขึ้น ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนของเชื้อ ต่อ ชั่วโมง

11. การเตรียม his D ออกโซโทรพ จาก Klebsiella pneumoniae M5a1

เลี้ยง Klebsiella pneumoniae M5a1 ใน L-Broth บ่มไว้ที่ 37°ซ จนถึง late log phase เก็บเซลโดยการปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซล 2 - 3 ครั้ง ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายแบคทีเรียในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ แล้วเติม N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NTG) ลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 150 ไมโครกรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำแบคทีเรียที่ถูกกลายพันธุ์นี้ ไปล้างเซล 2 - 3 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ ตะกอนของแบคทีเรียครั้งสุดท้าย นำมา

ใส่ L-Broth แล้วบ่มต่อไปที่ 37 °ซ 30 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว ตกตะกอน แบคทีเรียโดยการปั่นและละลายให้กระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ นำแบคทีเรียนี้มาเจือจางให้มีปริมาณเซลต่าง ๆ กัน แล้วดูด 0.1 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้นมาหยดใส่จานเพาะเชื้อ ที่มีอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเติมฮีสติดีน 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเกลี่ยให้กระจายทั่วบนผิวอาหารนี้ บ่มที่ 37 °ซ 24 - 48 ชั่วโมง หรือ จนโคโลนีโตขึ้นเห็นได้ชัด นำมา replica บนอาหารสูตรปรับต่ำที่ปราศจากฮีสติดีน และ บ่มที่ 37 °ซ 12 - 24 ชั่วโมง เลือก his ออกโซโทรพ โดยดูจากโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีฮีสติดีน แต่ไม่เจริญบนอาหารที่ปราศจากฮีสติดีน นำแบคทีเรียที่เลือกไว้นี้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงทดสอบหา his D ออกโซโทรพ ต่อ โดยการเปรียบเทียบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ที่มีฮีสติดีน และ ฮีสติดินอล โคโลนีที่เจริญได้เมื่อมีฮีสติดินอล คือ his D ออกโซโทรพ

12. การหาปริมาณ Phage P1 (ปรับปรุงจาก Goldberg,R.B.;Bender,R.A.; and Streicher,S.L.1974)

เลี้ยง Klebsiella pneumoniae M5a1 ใน L-Broth ที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 2 X 10^{-3} โมลาร์อยู่ด้วย บ่มที่ 37 °ซ จนได้จำนวนเชื้อประมาณ 2 X 10^{8} เซลต่อมิลลิลิตร ดูดเชื้อที่เตรียมไว้นี้ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน R-top mediumซึ่งละลาย และอุ่นไว้ที่ 42 °ซ นำ Phage P1 ซึ่งต้องการหาปริมาณ มาเจือจางด้วย Diluting fluid ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และดูดมาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วที่มี R-top mediumและเชื้ออยู่แล้ว ผสมให้เข้ากันดีอย่างเบา ๆ แล้วเทหมดลงบนจานเพาะเชื้อที่มี R-bottom mediumอยู่แล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จน R-top mediumแข็งตัว แล้วจึงนำไปบ่มที่ 42 °ซ 18 - 24 ชั่วโมง นับจำนวน plaque ของ Phage P1 ที่เกิดขึ้น ไตเตอร์ คือ จำนวน plaque ต่อ Phage P1 1 มิลลิลิตร

13. การเพิ่มปริมาณ Phage P1 โดย Agar layer method (Swanstrom,M., and Adams,M.H.1951)

เตรียมเลี้ยง Phage P1 ให้เกิด plaque บน R-medium โดยวิธีที่กล่าวแล้วในข้อ 12 (ให้มีปริมาณ Phage P1 ประมาณ 1 - 5 X 10^5 ต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ) หลังจากบ่มไว้ที่ 42 °ซ 18 - 24 ชั่วโมง ดูด L-Broth ใส่ลงไปในแต่ละจานเพาะเชื้อจานละ 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วที่ปลอดเชื้อ ขูดเอาชั้นที่เป็น R-top agar ออกมา เทรวมทั้งหมดนี้ลงในหลอดแก้วปั่น เขย่าอย่างแรง 2 - 3 นาที เพื่อให้ก้อนวุ้นแตก และให้ Phage P1 หลุดออกจากก้อนวุ้นด้วย นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงสูง Sorvall RC-5 ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำตอนบนออกมาใส่ในหลอดแก้วที่ปลอดเชื้อ ใส่คลอโรฟอร์มลงไป 4 - 5 หยด แล้วเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้สักครู่ จนคลอโรฟอร์มตกแยกชั้นลงมาที่ก้นหลอด ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสตอนบนมาปั่นอีกครั้งหนึ่ง ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนแบคทีเรีย และ เศษชิ้นส่วนของแบคทีเรียที่เหลือออกให้หมด เก็บน้ำส่วนใสตอนบนมาหาปริมาณ Phage P1 และเก็บรักษา Phage P1ที่ได้นี้ไว้ที่ 0 - 4 °ซ โดยเติมคลอโรฟอร์ม 3 - 4 หยดลงไปด้วย โดยวิธีการนี้ จะสามารถเพิ่มปริมาณ Phage P1 ได้จนถึง 1 - 5 X 10^{11} plaque ต่อมิลลิลิตร

14. การตกตะกอน Phage P1 โดยใช้ Polyethylene Glycol (PEG)

เตรียม Phage P1 ใน L-Broth ให้มีปริมาณ 10^{10} - 10^{11} plaque ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 13 ดูด Phage P1 นี้ ใส่ในหลอดแก้วปั่น เติม PEG และ โซเดียมคลอไรด์ ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 7 เปอร์เซนต์ และ 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ เขย่าจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำหลอดแก้วปั่นนี้ไปบ่มไว้ที่ 0 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงสูง Sorvall RC-5 ที่ความเร็ว 15,000 g นาน 20 นาที เก็บตะกอน Phage P1 ที่ตกอยู่ก้นหลอดไว้ และกระจายตัวในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 เก็บที่ 4 °ซ

15. การกลายพันธุ์ Phage P1 โดยใช้ Hydroxylamine (ปรับปรุงจาก Hong, J., and Ames,B.N.1971)

นำ Phage P1 ที่มีปริมาณ 2 - 4 X 10^{12} plaque ต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการตกตะกอน 100 มิลลิลิตร ของการเลี้ยง Phage P1 จากข้อ 13 นำ Phage P1 นี้ มากลายพันธุ์ โดยใช้ Phage P1 1 ส่วน ผสมกับ โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 (มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์อยู่ด้วย) 5 ส่วน และ Hydroxylamine hydrochloride 1 โมลาร์ pH 6.0 (มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์อยู่ด้วย) 4 ส่วน บ่มทั้งหมดไว้ที่ 37 °ซ 6 ชั่วโมง นำมาตกตะกอน โดยใช้ PEG และ โซเดียมคลอไรด์ ล้างสารละลายต่าง ๆ ออกด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 สองสามครั้ง สุดท้ายเก็บ Phage P1 ที่ถูกกลายพันธุ์ ในบัฟเฟอร์ที่ 4 °ซ

16. การเหนี่ยวนำยีนผ่านไวรัส (Transduction) (Miller,J.H.1972)

เลี้ยงเชื้อที่จะใช้เป็นแบคทีเรียตัวรับใน L-Broth ที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ อยู่ด้วย บ่มที่ 37 °ซ จนเซลอยู่ใน Stationary phase เก็บแบคทีเรียทั้งหมด โดยการปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 2 - 3 ครั้ง สุดท้ายกระจายเซลใน MC medium นำแบคทีเรียที่เตรียมไว้นี้ไปเขย่าที่ 37 °ซ นาน 15 นาที ใส่ Phage P1 ลงในแบคทีเรียตัวรับ ให้มีอัตราส่วนที่พอเหมาะ แล้วเขย่าต่อไปอีกนาน 20 นาที ยับยั้งการบุกรุกของ Phage P1 โดยการเติมโซเดียมซิเตรท 1 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากันลงไปที่อุณหภูมิ 0°ซ นำทรานสดักแตนท์ที่ได้ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วดูดมาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามต้องการอยู่แล้ว เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวโดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม บ่มที่อุณหภูมิตามต้องการ แล้วสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น

17. การผสมพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีคอนจูเกชั่น (Miller,J.H.1972)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียตัวให้และแบคทีเรียตัวรับ ใน L-Broth ที่มีกลูโคส เปอร์เซนต์ อยู่ด้วย บ่มที่ 37 $^{\circ}$ ซ ตลอดคืน นำแบคทีเรียตัวให้และตัวรับนี้ มาทำให้เจือจางด้วย L-Broth ให้เป็นอัตราส่วน 1 : 40 และ 1 : 20 ตามลำดับ เลี้ยงต่อไปที่ 37 $^{\circ}$ ซ จนมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 2 - 3 X 10^{8} เซลต่อมิลลิลิตร หรือ จนเซลอยู่ใน late log phase ผสมแบคทีเรียตัวให้และตัวรับอย่างละ 1 มิลลิลิตร ไว้ในหลอดแก้วเกลียวขนาดบรรจุ 20 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าที่เขย่าด้วยความเร็ว 30 รอบ ต่อนาที ที่ 37 $^{\circ}$ ซ - 1 ชั่วโมง นำมาเจือจางให้มีปริมาณคอนจูแกนท์ต่าง ๆ กัน แล้วดูดมาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการ เกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ และสภาวะที่ต้องการ แล้วสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น

18. การสร้าง และ คัดเลือก nif มิวแตนท์ (ดัดแปลงจาก Hong,J.,and Ames, B.N.1971)

อาศัยหลักการกลายพันธุ์ Phage P1 ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนอยู่ด้วย โดยใช้ Hydroxylamine แล้วเหนี่ยวนำยีนที่ถูกกลายพันธุ์แล้วนี้ เข้าสู่แบคทีเรียตัวรับ ซึ่งเป็น his D ออกโซโทรฟ (จากการทดลองของ Streicher,S.;Gurney, E.;and Valentine,R.C. (1971) ยีนการตรึงไนโตรเจนอยู่ใกล้กับยีนการสังเคราะห์ยีสติดีน) โดยวิธีการนี้ ยีนการตรึงไนโตรเจนที่ถูกกลายพันธุ์ จะสามารถแทรก หรือเข้าไปแลกเปลี่ยน (crossing over) กับโครโมโซมของแบคทีเรียตัวรับได้

วิธีการทดลอง เริ่มจากที่ทำการเลี้ยง Klebsiella pneumoniae M5a1 his D ให้เจริญเติบโตใน L-Broth ที่มีกลูโคส และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซนต์ และ 2 X 10^{-3} โมลาร์ ตามลำดับ บ่มที่ 37 $^{\circ}$ ซ จนเซลอยู่ใน Stationary phase เก็บและล้างเซล 2 - 3 ครั้ง ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ สุดท้ายกระจายเซลใน MC medium ให้มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 2 - 5 X 10^{9} เซลต่อ

มิลลิลิตร นำแบคทีเรียที่เตรียมไว้นี้ ใส่ในขวดกรวยแก้ว ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร แล้วเขย่าที่ 37 °ซ 15 นาที นำ Phage P1 ที่ถูกกลายพันธุ์แล้ว ใส่ผสมลงไป โดยประมาณอัตราส่วนของ Phage P1 ต่อแบคทีเรีย (m.o.i.) เป็น 1 - 10 เขย่าต่อไปที่ 37 °ซ 20 นาที ยับยั้งการบุกรุกของ Phage P1 โดยการเติม โซเดียมซิเตรท 1 โมลาร์ ปริมาตรเท่ากันลงไปที่ 0 °ซ นำทรานสดัคแตนท์ที่ได้ มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วดูด 0.1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้นมาหยด บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรปรับต่ำสำหรับการตรึงไนโตรเจนอยู่ เกลี่ยเชื้อให้ กระจายทั่วผิว โดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน 3 - 4 วัน คัดเลือก nif มิวแตนท์ โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนีที่ขึ้นแยกกันบนอาหาร เลี้ยงเชื้อนี้ ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อ สะกิดโคโลนีที่ต้องการใช้ศึกษาต่อไป มาแตะเป็นจุด เล็ก ๆ บนผิวอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซนต์อยู่ เก็บมิวแตนท์ โดยวิธีการนี้ ให้บรรจุ 50 โคโลนีต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ (รูปที่ 2) บ่มที่ 37 °ซ 24 - 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ขึ้นทั้งหมด มาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนอีก ครั้งหนึ่ง โดยการทำ replica ลงบนอาหารสูตรปรับต่ำสำหรับการตรึงไนโตรเจน บ่มที่ 30°ซ 3 - 4 วัน มิวแตนท์ที่ยังคงคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนเช่นเดิม จะนำ มาแยกให้บริสุทธิ์บน LB-agar แล้วเก็บรักษาไว้ในหลอดแก้วเกลียวที่ปิดสนิท เพื่อใช้ใน การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป