รหัส

โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อเรื่อง ความสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อผลการเจริญในข้าวโพดพันธุ์ไทย

คณะ วิทยาศาสตร์

วันที่ 31 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2533

ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม (*nif* A/pCK 3) ต่อผลการเจริญในข้าวโพดพันธุ์ไทย

โดย

นายสราวุธ เรืองวีรยุทธ

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์

ภาควิชาชีวเคมี

ปีการศึกษา 2532

I18462683

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ , กองขยายพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , MIRCEN สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย , คุณสลิล ภูวิภาดาวรรธน์ และอาจารย์สนิท กิตติภรณ์ แห่งสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และ ดร.ชำนาญ ฉัตรแก้ว แห่งกองวิจัยข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้อำนวยความสะดวกในงานวิจัยด้านเชื้อแบคทีเรีย , เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดและการปรึกษาด้านเพาะเมล็ดพันธุ์ ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้ให้คำแนะนำปรึกษาโครงงานวิจัยโดยตลอด และโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทดลองสำหรับงานวิจัยนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	3
อุปกรณ์และสารเคมี	5
เชื้อแบคทีเรียที่ใช้	7
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและรีเอเจนต์	8
วิธีทดลอง	10
ผลการทดลอง	13
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	22

ชื่อเรื่อง	:	ความสัมพันธ์ผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม (nif A/pCK 3) ต่อผลการเจริญในข้าวโพดพันธุ์ไทย
ชื่อนิสิต	:	นายสราวุธ เรืองวีรยุทธ
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
อยู่ในหมวดวิชา	:	Senior project (course 272-499)
ภาควิชา	:	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	:	2532

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม คือ nif A/pCK 3 ได้ถูกเคลื่อนย้ายเข้าสู่ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 และนำมาใช้เพื่อกระตุ้นให้การถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจีเนสเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาโดยอาศัยโปรตีนที่สร้างจากยีน nif A เมื่อทำการกลายพันธุ์แบคทีเรียที่ได้รับ nif A/pCK 3 ด้วยสารเคมี Nitrosoguanidine ได้เป็น mutant ที่มี pCK 3* ซึ่งมีลักษณะพิเศษช่วยในการตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ในสภาวะที่มี Ammonium acetate 15 mM และมีความแตกต่างจากสภาวะโดยทั่วไปที่การถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสมักจะถูกกดดันไว้ด้วยอนุมูลแอมโมเนียม ดังนั้นเมื่อนำแบคทีเรีย Azotobacter vinelandii ATCC 9046 , Transformant ที่มี pCK 3 และ pCK 3* ไปคลุกกับเมล็ดข้าวโพด 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สุวรรณ 1 , 3 และพันธุ์ข้าวโพดหวาน แล้วติดตามการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดโดยวัดความสูงจากโคนถึงยอด และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยวัดเป็น Acetylene reduction activity ภายในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 °c ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม pCK 3* มีความสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตด้านความสูงและการตรึงไนโตรเจนในอากาศของข้าวโพดพันธุ์หวานได้มากที่สุด รองลงมา คือ พันธุ์สุวรรณ 3 ส่วนข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 ไม่มีผลการกระตุ้นจาก pCK 3* และ pCK 3 เลยทั้งในด้านความสูงและความสามารถในการตรึงไนโตรเจน นอกจากนี้ผลของ Ammonium acetate กดดันการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจี-

เนสเกิดขึ้น เมื่อใช้เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 (WT) หรือ Transformant ที่มี pCK 3 อยู่ร่วมกับต้นข้าวโพดพันธุ์หวาน แต่ผลของ Ammonium acetate ไม่กดดันการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเมื่อใช้ Transformant ที่มี pCK 3* อยู่ร่วมกับต้นข้าวโพดพันธุ์หวานซึ่งสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้สูงกว่าประมาณ 35 เท่า ในสภาวะที่มี Ammonium acetate และประมาณ 1.2 เท่า ในสภาวะที่ไม่มี Ammonium acetate แสดงให้เห็นว่า pCK 3* มีความสามารถพิเศษช่วยในการตรึงไนโตรเจนในอากาศได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดให้กับต้นข้าวโพดพันธุ์หวานเท่านั้นในสภาวะที่มี Ammonium acetate 15 mM

บทนำ

ข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยอันหนึ่งที่ส่งออกไปแข่งขันในตลาดโลก และทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมากมายมหาศาล นอกจากนี้ข้าวโพดยังเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกร และถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ และการผลิตแป้งข้าวโพดภายในประเทศด้วย (1,2) จากประโยชน์การใช้ข้าวโพดที่ได้กล่าวมาข้างต้นทำให้มีการส่งเสริมการปลูกข้าวโพดเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้นโดยวิธีการใช้เชื้อ Azotobacter คลุกกับเมล็ดข้าวโพดเพื่อเพิ่มผลผลิตโดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อ Azotobacter ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้โดยอิสระและเปลี่ยนเป็นปุ๋ยแอมโมเนียมให้แก่ต้นข้าวโพด (3,4) อัตราการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในเชื้อ Azotobacter ค่อนข้างสูงประมาณ 1,050 μgN/ml (5) จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ดังกล่าวด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มการตรึงไนโตรเจนให้มากขึ้นอีกและเพิ่มผลผลิตสูงขึ้น ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกข้าวโพดลงได้

ข้าวโพด (Maize) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Zea mays อยู่ในตระกูล Poaceae (Gramineae) พันธุ์ข้าวโพดที่ปลูกในประเทศ คือ พันธุ์ข้าวโพดหวาน (super sweat) , พันธุ์สุวรรณ 1 และ 3 เป็นต้น ข้าวโพดที่เกษตรกรนิยมปลูกมาก คือ พันธุ์ข้าวโพดหวาน และ พันธุ์สุวรรณ 1 เนื่องจากให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพันธุ์สุวรรณ 3 ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย ศ.ดร.ชำนาญ ฉัตรแก้ว โดยใช้พันธุ์ดีเด่นเขตร้อนผสมกันขึ้นในปี 2512 แล้วเลือกโดยต้านราน้ำค้างจนได้พันธุ์สุวรรณ 1 จากนั้นในปี 2518 ได้ใช้พันธุ์ของ CIMMYT คัดเรื่อยมาจนผสมกับพันธุ์สุวรรณ 1 เกิดเป็นพันธุ์สุวรรณ 3 สำเร็จในปี 2530

การสร้างผลิตภัณฑ์ทางเทคนิคพันธุวิศวกรรม คือ nif A/pCK 3 เริ่มต้นจากการค้นพบว่าการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจีเนสถูกกระตุ้นได้ด้วยโปรตีนที่สร้างจากยีน nif A ดังนั้นการนำยีน nif A เข้าสู่เซลล์ในรูปของพลาสมิดจะให้โปรตีนจากยีน nif A ได้ตลอดเวลา และน่าจะช่วยให้การถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจีเนสเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาด้วย ซึ่งการทดลองที่ยืนยันนี้ได้จากการนำยีน nif A ของ Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าสู่เซลล์

ของ Klebsiella pneumoniae เอง ต่อมาได้มีการนำยีน nif A ของ Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนอื่น ๆ เช่น Rhizobium meliloti (6) และ Azotobacter (7) พบว่าโปรตีนของยีน nif A สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนการสร้างไนโตรจีเนสในอาหารที่มีสารต้นตอไนโตรเจนได้ วิธีการทำการเคลื่อนย้ายพลาสมิด pCK 3 ซึ่งมียีน nif A มาจาก Klebsiella pneumoniae M5a1 เข้าสู่เซลล์ของ Azotobacter สายพันธุ์ที่เป็น Nif^+ ซึ่งแยกมาจากรากอ้อยของดินในประเทศไทย ทำให้ Azotobacter เกิดการถอดรหัสไนโตรจีเนสมากขึ้นโดยอาศัยการกระตุ้นจากโปรตีนของยีน nif A นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ภาควิชาชีวเคมี ภายใต้การนำของ รศ.ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์ ได้พัฒนาพลาสมิด pCK 3 ต่อไปอีกโดยการกลายพันธุ์ transformant ของ Azotobacter vinelandii ที่มีพลาสมิด pCK 3 ด้วยสารเคมี Nitrosoguanidine (NTG) mutant ที่ถูกกลายพันธุ์บนพลาสมิด pCK 3 จะสามารถต้านยา Kanamycin ได้ 1 µg/ลิตร แต่จะไม่สามารถต้านยา Kanamycin 10 µg/ลิตร ได้ ทั้งนี้เพราะ promoter ของพลาสมิด pCK 3 ไม่เอื้ออำนวยที่จะทำให้แบคทีเรียต้านยา Kanamycin ที่ความเข้มข้นสูงได้ พลาสมิด pCK 3 ที่ถูกกลายพันธุ์ด้วย NTG เรียกว่า pCK 3^* mutant ที่มี pCK 3^* จะมีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ในสภาวะที่มี Ammonium acetate 15 mM (6) ซึ่งแตกต่างจากสภาวะโดยทั่วไปที่การถอดรหัสของยีนไนโตรจีเนสมักจะถูกกดดันไว้ด้วยอนุมูลแอมโมเนียม นับว่าการสร้างผลิตผลทางเทคนิคพันธุวิศวกรรม คือ pCK 3 และ pCK 3^* จะมีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ในงานเกษตรกรรมได้มากขึ้นโดยการเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนให้แก่ Azotobacter vinelandii โดยที่ transformant ที่มี pCK 3^* จะช่วยให้ตรึงไนโตรเจนสูงกว่า transformant ที่มี pCK 3 ถึง 13 เท่า (8)

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ คือ การนำผลิตภัณฑ์ทางเทคนิคพันธุวิศวกรรมส่งทอดให้กับ Azotobacter vinelandii และนำเชื้อไปคลุกกับเมล็ดข้าวโพดเพื่อติดตามผลการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดและความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ Azotobacter vinelandii ที่มี pCK 3 และ pCK 3^* ตามลำดับ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. กล่องพลาสติก
2. สำลี
3. หลอดทดลองขนาดใหญ่
4. ที่วางหลอดทดลอง
5. จานเพาะเลี้ยง
6. จุกยางปิดปากหลอด
7. เข็มฉีดยา
8. ขวดเพาะเลี้ยง
9. Chlorox
10. วุ้น
11. ก๊าซ Acetylene
12. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ
13. Gas Chromatography ที่มี detector แบบ FID และ Porapak N column
14. ก๊าซ Ethylene มาตรฐาน
15. ก๊าซไนโตรเจน
16. ก๊าซไฮโดรเจน
17. ถังอากาศ
18. $MgSO_4.7H_2O$
19. $CaSO_4$
20. K_2HPO_4
21. KH_2PO_4
22. Glucose
23. Ammonium acetate

24. NaCl
25. $FeSO_4$
26. ดินร่วน
27. Na_2CO_3
28. Mannitol
29. Bacto-agar
30. Kanamycin
31. Tetracycline
32. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ
33. ก๊าซอาร์กอน

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้

Azotobacter vinelandii ATCC 9046 จาก MIRCEN

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและรีเอเจนต์

1. 190 Media (ATCC 1983) ประกอบด้วย

K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	"
NaCl	0.2	"
$FeSO_4$	0.005	"
Soil extract	100	ml
น้ำกลั่น	900	"
Mannitol	20	กรัม
ปรับ pH ให้เป็น	8.7	

นำไป autoclave เป็นเวลา 20 นาที

ในกรณีที่ต้องการเตรียม 190-agar plate ให้เติม Bacto-agar จำนวน 15 กรัม แล้วจึงนำไป autoclave หลังจากนั้นค่อยเทใส่ petri-dish plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งวุ้นแข็งตัว นำไปอบที่ 37°c , overnight เลือกเฉพาะ plate ที่ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียมาใช้

2. Transformation media (TF media) (Glick และคณะ , 1985) เป็นอาหารที่ใช้ในการเตรียม Competent cells ของ Azotobacter ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

$MgSO_4.7H_2O$	1.9718	กรัม
$CaSO_4$	0.0136	"
K_2HPO_4	0.55	"
KH_2PO_4	0.25	"
Glucose	10.0	"
Ammonium acetate	1.1	"
ปรับ pH ให้เป็น	7.1	"

ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

3. TE buffer (10 mM Tris-HCl , pH 8.0 และ 1 mM Na_2-EDTA)

4. 190-agar plate ที่มี 5,000 ng Tetracycline และ 50 ng Kanamycin

5. Burk's medium ประกอบด้วย

Na_2HPO_4	0.189	กรัม
KH_2PO_4	0.011	"
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	"
$FeSO_4.7H_2O$	0.006	"
MoO_3	0.0005	"
$CaSO_4.2H_2O$	0.02	"
$SrCl_2.6H_2O$	0.01	"
NaCl	0.01	"
$NaHCO_3$	0.05	"
Adenine	0.01	"

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร นำไป autoclave เป็นเวลา 20 นาที

วิธีทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046

lyophilized culture ของ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ถูกถ่ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 190 media จำนวน 50 ml เขย่าที่ 28°c , overnight เชื้อ 1 loop ของ overnight culture streak ลงบน 190-agar plate ที่มี tetracycline 5,000 ng และ Kanamycin 50 ng นำไป incubate ที่ 28°c , overnight เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่ไม่ขึ้นบน 190-agar plate ที่มี tetracycline และ Kanamycin จะถูกคัดเลือกเป็น recipient สำหรับการทำ Transformation ของ pCK 3 และ pCK 3* ต่อไป

2. การ Transformation pCK 3 และ pCK 3* เข้าสู่ Azotobacter vinelandii ATCC 9046

ใช้ recipient ในข้อ 1 จำนวน 1 colony มาใส่ใน TF media 10 ml เขย่าที่ 28°c , 15 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่โดยใช้ 1 ml culture ต่อ 9 ml TF media เลี้ยงที่ 28°c เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา ทำการส่งทอดพลาสมิดต่อโดยการเติม pCK 3 หรือ pCK 3* ที่ละลายใน TE buffer จำนวน 50 µl คิดเป็น 165 ng ของพลาสมิด ลงใน 10 ml ของ culture แล้ว incubate 28°c , เป็นเวลา 10 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเก็บตะกอน และละลายตะกอนใน 190-media ปิเปตสารละลายเซลล์นี้มาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยปริมาณ 100 µl/plate incubate ที่ 28°c ไม่น้อยกว่า 40 ชั่วโมง ทำ replica plate เพื่อหา colony ที่ต้านยา tetracycline และ Kanamycin จากนั้นคัดเก็บ colony นี้ไว้เป็นสายพันธุ์ต่อไป

3. การเพาะเมล็ดพันธุ์เพื่อเพาะปลูกในหลอดเพาะเลี้ยงที่ไม่มีวุ้น

ใช้กล่องพลาสติกขนาดใหญ่บรรจุกระดาษทิชชูที่อุ้มน้ำกลั่นไว้เชื้อ นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สุวรรณ 1 (S1) , พันธุ์สุวรรณ 3 (S3) และ พันธุ์ข้าวโพดหวาน (SS) มาวางไว้ในกล่องนี้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ต้นกล้า จากนั้นนำต้นกล้าอายุประมาณ 48 ชั่วโมงไปแช่ในสารละลายดังต่อไปนี้

ก. น้ำกลั่นไร้เชื้อ เป็นกลุ่มควบคุม (A)

ข. เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 (WT)

ค. เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่ได้รับ pCK 3 (TF3)

ง. เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่ได้รับ pCK 3* (TF3*)

โดยที่สารละลายในข้อ ข , ค และ ง มีความขุ่นของสารละลายใกล้เคียงกัน เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำต้นกล้าที่แช่ในสารละลายทั้ง 4 ชนิดไปเพาะปลูกในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีน้ำกลั่นไร้เชื้อ โดยจัดทำ triplicate สำหรับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดแต่ละพันธุ์ ติดตามวัดการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดจากส่วนโคนถึงยอดมีหน่วยเป็น cm. บันทึกผลการทดลองภายหลังเวลา 5 วัน

4. การสร้างระบบทดลองสำหรับวิเคราะห์ Acetylene reduction

เตรียมสารละลายวุ้น 15 g/l ในน้ำกลั่น เทใส่ในหลอดเพาะเลี้ยงจำนวน 5 ml/หลอด ปิดหลอดด้วยจุกยาง นำไป autoclave และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจำนวน 3 เมล็ด มาวางลงบนวุ้นแข็งภายใน Laminar flow (ทำ Triplicate สำหรับแต่ละพันธุ์) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28 °c จนกว่าจะได้ต้นกล้า

5. การปลูกถ่ายเชื้อลงบนต้นข้าวโพด

นำเชื้อที่แยกเป็น colony เดี่ยวมาปลูกถ่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 190 media ไม่ต่ำกว่า 20 ชั่วโมง แล้วจึงปิเปตเชื้อจำนวน 1 ml แบ่งใส่หลอดทดลองขนาดใหญ่ที่ได้ถ่ายต้นกล้าอายุไม่ต่ำกว่า 2 วัน โดยทำการปิเปตให้ลงบนบริเวณรากของต้น หรืออาจใช้วิธีรดบนรากด้วยอัตราส่วน 1 ml/หลอด แล้วอุดจุกสนิทไม่ให้มีการถ่ายเทอากาศ เพื่อเตรียมวัด Acetylene reduction activity สร้างหลอดควบคุมด้วยการเลี้ยงข้าวโพดที่รดด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีเชื้อปนอยู่ด้วย ดังนั้นหลอดเพาะเลี้ยงมีการเติมสารละลายดังนี้คือ

ก. น้ำกลั่นไร้เชื้อ 1 ml เป็นกลุ่มควบคุม

ข. เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 (WT) จำนวน 1 ml

ค. เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่ได้รับ pCK 3 (TF3) จำนวน 1 ml

ง. เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่ได้รับ pCK 3* (TF3*) จำนวน 1 ml

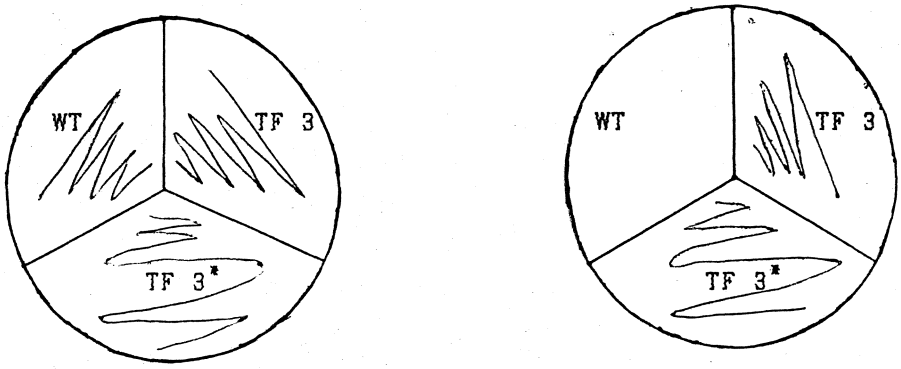
6. การวัด Acetylene reduction ของหลอดเพาะเลี้ยงข้าวโพด

หลังจากที่เมล็ดข้าวโพดเติบโตในหลอดเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันแล้ว จึงดูดอากาศออกจากหลอดด้วยเข็มฉีดยาจำนวน 10 ml แล้วฉีดก๊าซ Acetylene ลงไปแทนที่ 10 ml/หลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28°c เป็นเวลา 3 วัน แล้วดูดก๊าซภายในหลอดด้วยเข็มฉีดยาขนาด 1 ml เพื่อไปฉีดในเครื่อง Gas Chromatography ที่มี FID เป็น Detector , column เป็นแบบ Porapak N ในเวลาทำการฉีดก๊าซเพื่อวิเคราะห์จะมีอุณหภูมิของ column 90°c , Injector port 110°c และ Detector 150°c โดยใช้อัตราการไหลของก๊าซ N_2 , H_2 และอากาศเป็น 30 , 40 และ 300 ml/min ตามลำดับ ทำการฉีดก๊าซ Ethylene เป็นมาตรฐานในการคำนวณหา pmole ของก๊าซ Ethylene ควบคู่ไปกับการฉีดก๊าซจากหลอดเพาะเลี้ยงข้าวโพด

ผลการทดลอง

1. การเจริญของสายพันธุ์ Azotobacter vinelandii บน Tetracycline และ Kanamycin 190-agar plate

Azotobacter vinelandii ATCC 9046 เป็นสายพันธุ์ Wild type (WT) ที่ไม่ดื้อต่อยา tetracycline และ Kanamycin ได้ถูกคัดเลือกมาใช้ในการ Transformation pCK 3 และ pCK 3* ได้เป็น TF 3 และ TF 3* ตามลำดับ ผลการทดสอบการเจริญของ WT , TF 3 และ TF 3* บน 190-agar plate และ190-agar plate ที่มี tetracycline (Tc) 5,000 ng และ Kanamycin (Km) 50 ng ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1



190-Agar plate 190-agar plate+5,000 ng Tc+50 ng Km

รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเชื้อ 3 ชนิด คือ WT , TF 3 และ TF 3* บน 190-agar plate และ 190-agar plate+Tc+Km

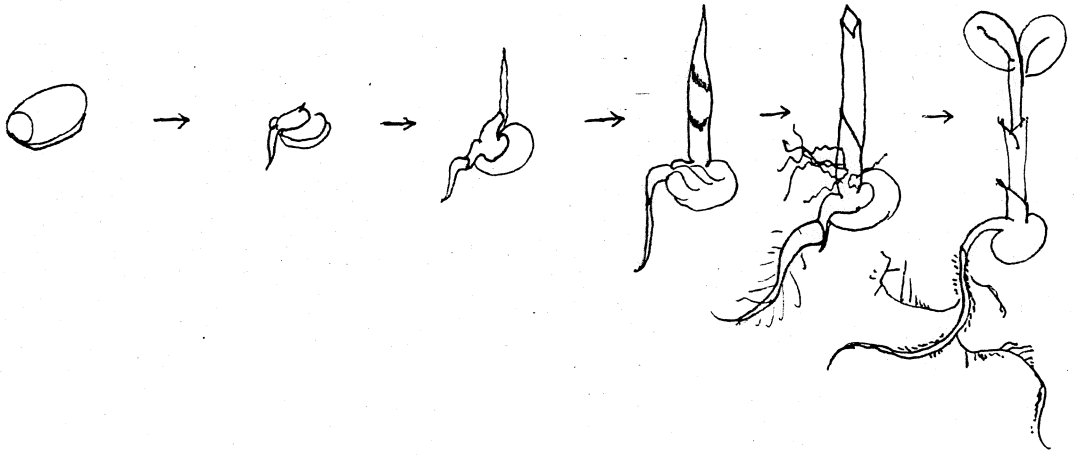
2. การเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่งอกจากเมล็ดในหลอดเพาะเลี้ยงที่ไม่มีวุ้นภายใต้สภาวะต่างๆ

ตารางที่ 1 แสดงความสูงโดยเฉลี่ยของต้นข้าวโพดที่ปลูกในหลอดเพาะเลี้ยงที่ไม่มีวุ้น ในระยะเวลา 140 ชั่วโมง ค่าความสูงได้มาจากการทำ Triplicate แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

	น้ำกลั่น	WT	TF 3	TF 3*
S1	5.80	4.42	3.90	2.70
S2	4.60	5.80	7.50 △	6.15 △
S3	3.55	4.10	8.46	9.62

หมายเหตุ △ ค่าทั้งสองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

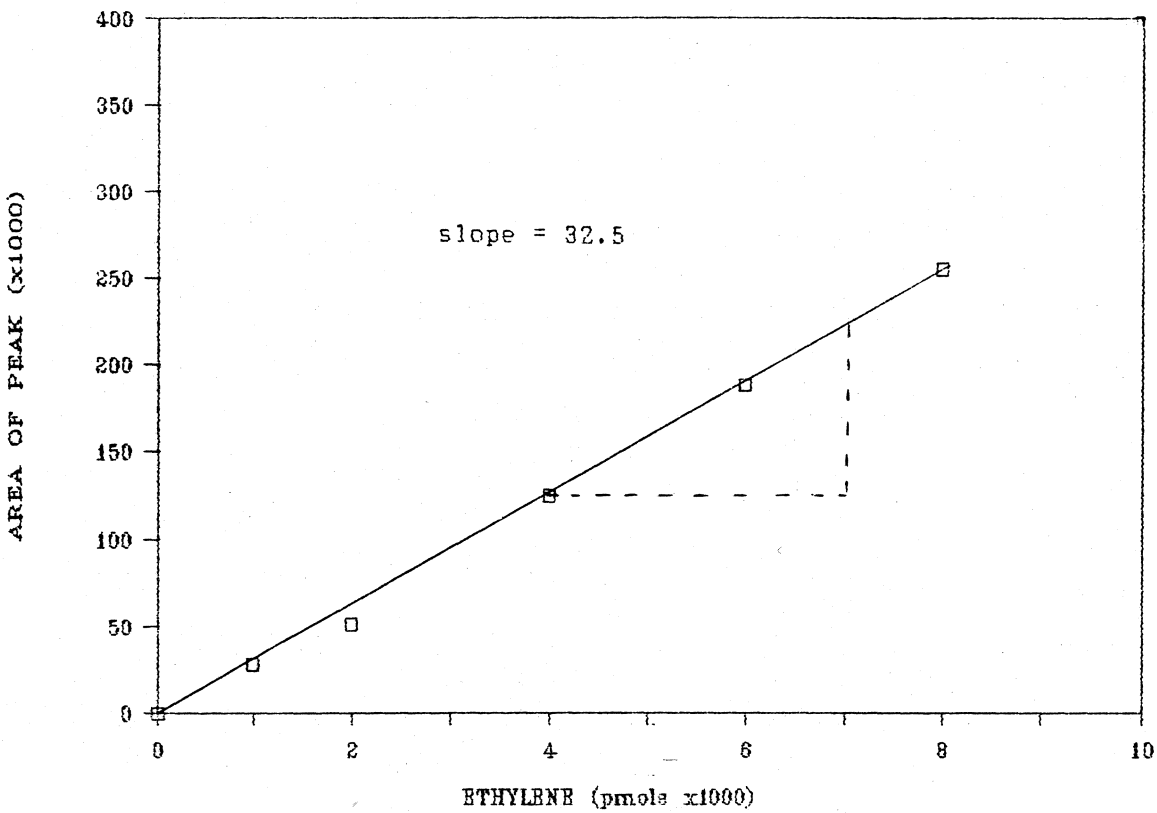
3. ลักษณะการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวโพดภายในหลอดเพาะเลี้ยงที่ไม่มีวุ้น



รูปที่ 2 แผนภาพการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวโพดภายในหลอดเพาะเลี้ยง

4. การวัด Acetylene reduction activity ของต้นข้าวโพดในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีวุ้น

ปริมาณก๊าซที่ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography จำนวน 0.5 ml ต่อครั้ง จาก area ของ peak ที่วัดได้นำมาคำนวณหา pmole ของก๊าซ Ethylene ต่อปริมาตร 1 ml (pmole/ml) จาก slope ของ standard curve ของก๊าซ Ethylene ที่มีค่าเท่ากับ 840 (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ peak กับ pmole $x10^3$ ของก๊าซ Ethylene

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณก๊าซ Ethylene โดยเฉลี่ยที่วัดได้จากต้นข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 (S1) ที่เพาะเลี้ยงที่มีวุ้นภายใต้สภาวะต่าง ๆ

สภาวะที่ใช้	ปริมาณก๊าซ Ethylene โดยเฉลี่ย (pmole/0.5 ml)
WT	130
ข้าวโพด+WT	184
TF 3	131
ข้าวโพด+TF 3	152
TF 3*	135
ข้าวโพด+TF 3*	263
น้ำกลั่น	228

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณก๊าซ Ethylene โดยเฉลี่ยที่วัดได้จากต้นข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ (S3) ในสูตรอาหารของ Burk (B) และสูตรอาหาร TF ที่มีวุ้นอยู่ด้วย

สภาวะที่ใช้	ปริมาณก๊าซ Ethylene โดยเฉลี่ย (pmole/0.5 ml)
น้ำกลั่น + ข้าวโพด	216
B (WT) + ข้าวโพด	246
B (3) + ข้าวโพด	282
B (3*) + ข้าวโพด	658?
TF (WT) + ข้าวโพด	215
TF (3) + ข้าวโพด	281
TF (3*) + ข้าวโพด	359

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณก๊าซ Ethylene โดยเฉลี่ยที่วัดได้จากต้นข้าวโพดพันธุ์หวาน (SS) ในสูตรอาหารของ Burk (B) และสูตรอาหาร TF ที่มีวุ้นอยู่ด้วย

สภาวะที่ใช้	ปริมาณก๊าซ Ethylene โดยเฉลี่ย (pmole/0.5 ml)
น้ำกลั่น + ข้าวโพด	507
TF (WT)	1,913
TF (WT) + ข้าวโพด	308
TF (3)	293
TF (3) + ข้าวโพด	335
TF (3*)	148
TF (3*) + ข้าวโพด	11,603
B (WT) + ข้าวโพด	1,115?
B (3) + ข้าวโพด	3,602?
B (3*) + ข้าวโพด	4,372?

หมายเหตุ ? = ค่าแต่ละค่ามีความเบี่ยงเบนสูงมากในการทำ Triplicate

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ได้รับการ Transform pCK 3 และ pCK 3* โดยอาศัยการคัดเลือกบน 190-agar plate ที่มี Tetracycline 5,000 ng และ Kanamycin 50 ng เมื่อนำ Transformant ที่ได้ คือ TF 3 และ TF 3* ไปใช้ในการช่วยการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์สุวรรณ 1 , พันธุ์ข้าวโพดหวาน และ พันธุ์สุวรรณ 3 พบว่า pCK 3 และ pCK 3* ใน TF 3 และ TF 3* นั้นไม่มีผลช่วยการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 แต่มีผลช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์หวาน และพันธุ์สุวรรณ 3 ให้เพิ่มขึ้นจากต้นข้าวโพดควบคุมที่มี WT ปนอยู่ การนำผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม คือ pCK 3 และ pCK 3* สามารถนำมาช่วยให้การเจริญเติบโตของข้าวโพดพันธุ์หวาน และพันธุ์สุวรรณ 3 ได้มากขึ้นจริงโดยยืนยันจากการทำ Acetylene reduction ก็พบว่าให้ผลสัมพันธ์โดยตรงกับข้อมูลความสูงโดยเฉลี่ย และ Acetylene reduction activity ของข้าวโพดพันธุ์หวานที่มี TF 3* ให้ค่าสูงที่สุดในการทำการทดลองทั้งหมด รองลงมาได้แก่ ข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 ที่มี TF 3* ส่วนข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดว่าผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม คือ pCK 3* ให้ผลในการเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดจริงหรือไม่ ทั้งนี้เพราะข้อมูลความสูงโดยเฉลี่ยให้ผลที่ไม่สัมพันธ์โดยตรงกับข้อมูลของ Acetylene reduction activity โดยที่พบ Acetylene reduction activity สูงแต่ความสูงโดยเฉลี่ยลดลง แต่กรณีของ pCK 3 ให้ผลสอดคล้องกันทั้งแง่ความสูงโดยเฉลี่ยและ Acetylene reduction activity ว่าไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการเจริญของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 อย่างแน่นอน

สูตรอาหารที่ใช้ในการ Transformation pCK 3 และ pCK 3* เข้าสู่เชื้อ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 มีอยู่ 2 สูตร คือ สูตรอาหาร TF และ สูตรอาหารของ Burk จากผลการทดลองวัด Acetylene reduction activity ในต้นข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 3 และพันธุ์หวานที่คลุกกับเชื้อที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่างกัน พบว่า สูตรอาหาร TF เป็นสูตรอาหารที่มีอนุมูล Ammonium อยู่ด้วยในการ Transformation ของพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย แล้วเมื่อ

ใส่ให้ต้นข้าวโพด และพิจารณาจากค่า Acetylene reduction activity จะให้ค่าที่สูงกว่าสูตรอาหารของ Burk ที่ไม่มีอนุมูล Ammonium สูตรอาหารทั้งสองให้ผลสอดคล้องกันว่าแบคทีเรียที่มี pCK 3* จะมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเปลี่ยนเป็นปุ๋ยแอมโมเนียมได้มากกว่าแบคทีเรียที่มี pCK 3 และแบคทีเรียดั้งเดิม (WT) ตามลำดับ สูตรอาหารของ Burk ให้ค่า Acetylene reduction activity ที่มีความเบี่ยงเบนในแต่ละค่าสูงมากกว่าในสูตรอาหาร TF นอกจากนี้ผลของ Ammonium acetate 15 mM ในสูตรอาหาร TF มีส่วนช่วยให้การตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่มี pCK 3* และอยู่ร่วมกับต้นข้าวโพดพันธุ์หวานจะให้ประสิทธิภาพสูงที่สุด ส่วน Azotobacter vinelandii ATCC 9046 ที่มี pCK 3 และอยู่ร่วมกับต้นข้าวโพดพันธุ์หวานและพันธุ์สุวรรณ 3 นั้นมีประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนได้น้อยกว่าทั้งในสูตรอาหารของ Burk และสูตรอาหาร TF นอกจากนี้ Ammonium acetate 15 mM ในสูตรอาหาร TF มีผลกดดันการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของเชื้อที่มี pCK 3 และเชื้อ WT ปรากฏให้เห็นในต้นข้าวโพดพันธุ์หวานเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

1. สรุปนโยบายและแนวทางพัฒนาข้าวโพด ปี 32/33-36/37 โดยคณะกรรมการนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1-23
2. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 30/31 ศูนย์สถิติการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
3. Rubenchick , L.I.(1963) Azotobacter and its use in Agriculture. Oldbourne Press , London.
4. Blinkov , G.N.(1957) The Effect of Azotobacter on Higher Plants. Author's Summary of Thesis , Moskva.
5. สมศักดิ์ วังใน (2524) จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 244 หน้า
6. Sundareson , V. , et.al.(1983) Klebsiella pneumoniae nif A Product Activates the Rhizobium meliloti Nitrogenase Promoter. Nature 301 , 728
7. Kennedy , C. and Robson , R.L. (1983) Activation of nif Gene Expression in Azotobacter by the nif A Gene Product of Klebsiella pneumoniae . Nature 301 , 626-628
8. เสาวคนธ์ ภคอัครเลิศกุล (2523) การสร้างมิวแตนท์ของ Azotobacter spp. ที่ไนโตรจิเนสไม่ถูกกดดัน วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 98 หน้า

รายละเอียดโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ปีงบประมาณ ๒๕๓๒

คณะ วิทยาศาสตร์ **ภาควิชา** ชีวเคมี

ชื่อโครงการ ความสัมพันธ์ ผลิตภัณฑ์เทคนิคพันธุวิศวกรรม (nif A/pCK 3) ต่อผลการเจริญในข้าวโพดพันธุ์ไทย

ชื่อนิสิตที่ร่วมโครงการ นายสราวุธ เรืองวิรยุทธ

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาในโครงการ ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

แนวทางการดำเนินโครงการ

จากแนวคิดดังกล่าวทำให้เราเห็นว่าการดำเนินโครงการนี้ ต้องยอมรับหลักการชีวเคมีเป็นพื้นฐานในชั้นต้นก่อน ซึ่งได้มาจากการประมวลความรู้ที่สั่งสมกันมาแต่อดีตของมหชีวโมเลกุลนี้

การนำผลผลิตจากเทคนิคปรับแต่งสารพันธุกรรม (recombinant DNA Technology) ซึ่งเป็นแบบจำลองการประยุกต์หลักการให้เกิดผลงาน มาถ่ายโอนเข้าสู่ (Azotobacter vinelandii) เพื่อเตรียมเป็นหน่วยศึกษาในขั้นต่อไป (หมายถึง การทำ tranformation)

จากหลักทางชีวภาพและความรู้ของมหชีวโมเลกุล เราได้ผนวกวิทยาการทั้งสองขึ้นเป็นแบบจำลองของโครงการ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และการเคลื่อนตัวของความรู้จากหลักการชีวเคมีสู่การประยุกต์ด้วยหลักการชีวภาพ (ดูขั้นตอนการดำเนินงานในแนวความคิดหลักของโครงการ 4 หลัก)

ความมุ่งหวังในอนาคตเมื่อดำเนินโครงการในขั้นต้นเสร็จสิ้น

พัฒนาวิธีการคัดสายพันธุ์ด้วยเทคนิคปรับแต่งมหชีวโมเลกุลดีเอ็นเอ ดังนี้

ligate nif A ที่มีอยู่ด้วย lacZ gene เพื่อสามารถคัดจากเทคนิคทางจุลชีววิทยา (clear zone on x-gal agar plate) โดยคัดสายพันธุ์ wild type ที่ไม่แสดงสมบัติการคัดมาใช้เป็น recipient cell line และอาจตรวจสอบ tranformation efficiency เพื่อพัฒนาการคัดไปแล้วอีกด้วย

มูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ความสำคัญของ nif A

nif A (Ow-Ausbel;1983,Buchanan.Wollaston,et. al;1980) จะให้โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัสของยีนโครงสร้างไนโตรจิเนส

ความสำคัญของ pCK 3 *

จากการสร้าง pCK 3 * ซึ่งเป็นอนุพันธ์ pCK 1 ที่มี nif A จาก Klebsella pneumoniae M 5 a1 และเคลื่อนเข้า Azotobacter vinelandii ได้ด้วยประสิทธิภาพการถ่ายโอน 9.1 * 10^{-5} ทำให้ได้สายพันธุ์ถอดรหัสการตรึงไนโตรเจนได้ ในสภาพที่มีอนุมูลแอมโมเนียสูงถึง 15 mM

ความเป็นมาของโครงการ

ผลจากทีมงานในห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมภายใต้การนำของรองศาสตราจารย์ ไพเราะ ทิพยทัศน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่าสามารถถ่ายโอนยีนจากโอเปอรอนควบคุม การสร้างไนโตรจิเนสเข้า Azotobacter vinelandii เพื่อสร้างสายพันธุ์ที่ไม่ถูกกดดัน (derepressed mutant) ได้ผลสำเร็จ จึงมีการรักษา และอาจตรวจสอบสภาพสายพันธุ์ในคลังเก็บเพื่องานพันธุวิศวกรรมของภาควิชา

ทั้งนี้ในการดำเนินงาน จะทำการประยุกต์เพื่อทดสอบผลต่อการเจริญของข้าวโพดสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นเองในประเทศไทย

สุวรรณ 1 เป็นตัวแทนข้าวโพดเศรษฐกิจเพื่อการค้าทั้งในและระหว่างประเทศ

super sweet เป็นตัวแทนข้าวโพดเศรษฐกิจเพื่อการตลาดภายในประเทศ

สุวรรณ 3 เป็นพันธุ์ที่พึงประสงผลสำเร็จในการพัฒนาในประเทศล่าสุด

สมมติฐานของโครงการ

1. การนำ nif A เข้าเซลในรูปพลาสมิดซึ่งจะให้โปรตีนจาก nif A ได้ตลอดเวลา น่าจะช่วยให้การถอดรหัสของยีนโครงสร้างไนโตรจิเนสเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาด้วย ดังมีข้อสนับสนุนจากการนำยีน nif A ของ K. pneumoniae M 5a1 เข้า K. pneumoniae แล้วพบการกระตุ้นถอดรหัสของยีนได้(Buchanan,et.al.1981) และ Kenedy.Robsonเคลื่อน pCK 1 เข้า Azotobacter Nifโดย pRK 2013 ได้สมบัติการถอดรหัสยีนในภาวะที่มีอนุมูลแอมโมเนียคล้ายกับผลงานจากภาควิชาที่ไร้pCK 3

2. การอยู่ร่วมกันของพืชและสายพันธุ์จุลชีพที่มียีนดังกล่าว ด้วยกลไกที่ซับซ้อนซึ่งยังไม่อาจกระจ่างได้ในเวลาที่น่าจะช่วยเพิ่มโอกาสในการเจริญของพืช

ดังนั้นถ้าเราให้ derepressed nif mutantอยู่ร่วมกับชัญญพืชได้ ซึ่งจะทำให้มีการตรึงไนโตรเจนเพื่อเสริมไนโตรเจนให้พืชก็จะเป็น ประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตของชัญญพืช

คุณค่าของการดำเนินโครงการ

การดำเนินโครงการนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ดำเนินโครงการในแง่ของการพัฒนาและสร้างเสริมความคิดให้เกิดเป็นระบบโดยต้องประมวลความรู้ที่ได้เรียนมา เพื่อวิเคราะห์และหาผลสรุป และเสริมประสบการณ์ในแง่พัฒนาความสามารถในการนำเสนอความคิดที่เป็นระบบทางวิทยาศาสตร์ ให้ผู้ฟังเห็นคุณค่าในความเป็นวิทยาศาสตร์ของทั้งเรื่องที่ดำเนินการ

อนึ่ง ยังสร้างภาพพจน์และมโนคติซึ่งจะผสานการได้มาของความรู้จากการปฏิบัติและความรู้จากวิทยาการที่สั่งสมกันมา ให้เห็นจริงจนเกิดมโนภาพที่ต่อเนื่องเป็นตัวของตัวเองได้

ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1 เตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษา

ต้นอ่อนข้าวโพด

เพาะจากเมล็ดพันธุ์ที่ควบคุมพันธุ์เพื่อการแจกจ่ายสู่เกษตรกร

สุวรรณ 1 และ super sweet จากหน่วยพันธุ์พืชไร่

กรมวิชาการเกษตร

สุวรรณ 3 จาก ดร.ชำนาญ ผู้ผลิตสายพันธุ์

มีเพียง 26 เมล็ดเท่านั้น

ตัวแปรที่ควบคุม

ในภาวะกระถางดิน กำหนดอายุพืชที่จะดำเนินการทดลอง

ในภาวะการปลูกไร้เชื้อ ควบคุมอาหาร N-source

เพิ่มจากกระถางดินเพื่อประโยชน์ในการติดตามผล

สายพันธุ์จุลชีพที่มีพันธุกรรมศึกษา

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์เดิมให้มีอยู่ในหน่วยศึกษา (Wild type strain)

คัดสายพันธุ์เดิมที่ไม่มีสมบัติในการต้านยาที่ใช้คัดสายพันธุ์ทดสอบ

(Recipient cell line)

นำผลผลิตจากเทคนิคปรับแต่งสารพันธุกรรมที่สนใจ

(recombinant plasmid pCK 3 และ pCK 3*)

มาถ่ายโอนเข้าสู่ *Azotobacter vinelandii*

เพื่อเป็นหน่วยศึกษาต่อไป (TRANSFORMATION TECHNICS)

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ใหม่นี้ให้มีอยู่ในหน่วยศึกษา

(Transformant strain)

2 ศึกษาความสัมพันธ์การเจริญของข้าวโพดพันธุ์ไทยกับผลิตภัณฑ์เทคนิคปรับแต่ง
มหชีวโมเลกุล (Recombination DNA Technology)

คลุกจุลชีพสายพันธุ์ใหม่ที่มีอยู่ให้เจริญพร้อมกับสายพันธุ์ข้าวโพด
ภายใต้เงื่อนไขการทดลองเพื่อเก็บข้อมูลนำมาวิเคราะห์
ติดตามการเจริญต้นอ่อนข้าวโพด
และบันทึกผลเป็นภาพถ่ายไว้ด้วย

เงื่อนไขที่กำหนด แยกศึกษาเป็นแต่ละคู่ที่เจริญพร้อมกัน

ตัวแปรที่ติดตาม ความสามารถในการเจริญ
(Unloading site protein ; leaf/root)

3 การทดลองที่อาจดำเนินงานเพิ่มเติม เสริมความมุ่งหวังในการนำเสนอโครงการ

เพื่อประกันความเชื่อถือในข้อมูล

ตามแนวความคิดที่ 1 ช่วยในเรื่องสายพันธุ์และความสำเร็จ
การถ่ายโอนสารพันธุกรรม

ตามแนวความคิดที่ 2 ช่วยในเรื่องการพิสูจน์มหชีวโมเลกุล
Nitrogenase
K_m
ARA (Nitrogenase activity)

ศึกษาการหาตัวแทนการเจริญ
สุ่มจากการวิเคราะห์ทางสถิติ
Protein จากตำแหน่งที่ใช้ในการเจริญ(Unloading site)

เพื่อเสริมน้ำหนักข้อมูล
Glutamime synthethase (GS activity)

4 การวิเคราะห์และประเมินคุณค่า ผลผลิตจากเทคนิคปรับแต่ง(pCK 3/3*)
ต่อการเจริญข้าวโพดพันธุ์ไทย

การเตรียมตัวอย่าง GS assay

ปั่นแยกเซลล์จากสารละลายด้วย 10000 rpm ,15'

ล้างด้วย TME และแยกเซลล์ออกจึงแช่แข็งข้ามคืน

กระจายเซลล์อีกครั้งในปริมาตรที่แน่นอน

(250 ml culture: 10 ml TME)

sonicate ที่ 50 Hz,output mode scale 3

ใช้ส่วนใสหลังปั่นแยกด้วยกำลัง 16000 rpm,20'(JA 20)

Transferase hydroxamate GS assay (Shaprie-Stadtman; 1970)

Incubation mixture reagent (IMR)

Imidazole-HCl Buffer	pH 7.0	,0.5 M ,2 ml
Glutamine		0.15 M ,4 ml
$MnSO_4$		0.1 M ,.6ml
ADP	pH 7.0	,0.01 M ,.8ml
Sodium arsenate	pH 7.0	,1.0 M ,.4ml

ผสมในปริมาตร 10.0 ml

Hydroxylamine solution (H-solution)

1 X	1M	$NH_2OH.HCl$
1 x	1M	NaOH

Ferric chloride reagent

8x	10%	w/v	$FeCl_3.6H_2O$
2x	24%	w/v	TCA
1x	6M		HCl
13x			H_2O

γ-glutamyl hydroxamate เป็นสารมาตรฐาน

ARA (Acetylene reduction activity)

เปลี่ยนบรรยากาศให้มี C_2H_2 10% ด้วยเข็มฉีดยาสุญญากาศ

บ่ม 1 ชั่วโมงหรือมากกว่า ใช้ 200 →1 บรรยากาศเหนือสภาวะทดลอง

ฉีดเข้า GC (Gas Chromatography)

FID detector/ TCD detector

column Parapak N 2.0 m* 1/8 "

He carrier gas (O_2 Free)

ความเร็ว 30 mm/min

column temp. 90 • c

Lowry's reagent for Protein Assay

แสดงรายการทดสอบสมบูรณ์แบบต่อหนึ่งตัวอย่าง

แต่ละเงื่อนไขต้องการทดสอบโดยสมบูรณ์ ไม่ต่ำกว่า 12 ตัวอย่าง

การทดสอบแต่ละกรณีหากต้องการความมั่นใจต้องมีทำซ้ำ

สายพันธุ์จุลชีพมี WT ในหน่วยศึกษาและ WT จากสถาบันคุมสายพันธุ์

TF pCK 3 ,TF pCK 3*

สายพันธุ์ข้าวโพดหากเจริญได้ครบ

S-1, S-3 ,SS

ความมุ่งหวังของโครงการ

เนื่องจากตั้งไว้ที่การเข้าถึงหลักการชีวเคมีของมหชีวโมเลกุล Nitrogenase และความสัมพันธ์การต่อเนื่องของความรู้สู่หลักการชีวภาพ จึงกำหนดรูปแบบขึ้นเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญในต้นข้าวโพดกับผลิตภัณฑ์ recombinant DNA (pCK 3) ภายใต้เงื่อนไขดังได้กล่าวไว้ในแนวความคิดรวบยอดการนำเสนอโครงการ

คุณค่าจากการดำเนินโครงการ

1 ประโยชน์ต่อนิสิตผู้ดำเนินการ

สามารถฝึกทักษะการคิดวิเคราะห์วิเคราะห์และประมวลผลการศึกษาจากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ให้เกิดระบบที่เป็นโครงสร้างของสหสาขาวิชาเพื่อสร้างความพร้อมและก่อให้มีพื้นฐานที่มีคุณค่าต่อการเป็นบัณฑิตวิทยาศาสตร์ไม่ว่าผลการทดลองแสดงความสัมพันธ์หรือไม่ก็ตาม

2 ผลจากการดำเนินงาน

อาจประยุกต์คุณค่าจำเพาะเรื่องในการเกษตรหรืออาจใช้เสริมคุณค่าของผลิตภัณฑ์ (pCK 3) ในการประยุกต์สู่เกษตรกรรม

แนวความคิดหลักของโครงการที่สำคัญมี 4 หัวข้อย่อย

1. การประกันความเชื่อถืองานโดยอาศัยความรู้พันธุกรรมระดับโมเลกุลของไนโตรจิเนส

2. การตรวจสอบลักษณะจำเพาะเชิงจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไนโตรจิเนส

3. การศึกษาโดยอาศัยความรู้กระบวนการตรึงไนโตรเจน

4. การศึกษาภาวะร่วมชีวิตของ *Azotobacter vinelandii* กับสายพันธุ์ข้าวโพดที่พัฒนาขึ้นเองในประเทศไทย

แนวความคิดหลักการประกันความเชื่อถืองานโดยอาศัยความรู้พันธุกรรมระดับโมเลกุลของไนโตรจิเนส

การทดสอบลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์

สภาพต้านยาปฏิชีวนะ

Kanamycin resistant 1 ug/ml

ปัจจัยอุเหภูมิต่อประสิทธิภาพ

29 , 39

การทดสอบลักษณะเฉพาะยีน

Restriction site ต่อ Sal I , ECoR I

แนวความคิดหลักการศึกษาโดยอาศัยความรู้กระบวนการตรึงไนโตรเจน

ศึกษาการนำอนุมูลแอมโมเนียจากการตรึงไนโตรเจนเข้าโมเลกุลของเซล เปรียบเทียบตัวแปรที่ติดตาม ในภาวะทดสอบแสดงการอยู่ร่วมกันเพื่อวิเคราะห์และสรุปผล แนวความคิดพื้นฐานที่ต้องยอมรับ คือพืชกับจุลชีพดำรงชีพร่วมกันอยู่

ตัวแปรที่ติดตาม

GS activity

ARA

แนวความคิดหลักการศึกษาภาวะร่วมชีวิต *Azotobacter vinelandii* กับข้าวโพดพันธุ์ไทย

ตามที่ได้ตั้งสมมติฐานของงานไว้ เราจึงกำหนดจะทดสอบผลการเจริญของข้าวโพดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้เจริญในภาวะร่วมชีวิตต่อสายพันธุ์จุลชีพที่มียีนดังกล่าวว่า เพียงพอต่อการสรุปว่า mutant ช่วยเสริมการเจริญของพืชได้หรือไม่

รูปงาน : ติดตามการเจริญของต้นอ่อนข้าวโพด

เค้าโครงรูปงาน

เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ในอายุต่าง ๆ กันให้มีเป็นตัวอย่างทดสอบ

นำสายพันธุ์จุลชีพที่มียีนดังกล่าวคลุกได้ในเวลาที่ทดสอบ

เปรียบเทียบตัวแปรที่ติดตามการเจริญ เพื่อวิเคราะห์และสรุปผลตัวแปรที่ติดตามการเจริญ

เงื่อนไข

ให้ภาพสะท้อนกลับมาที่กระบวนการตรึงไนโตรเจน

งบประมาณ

1. หมวดค่าใช้สอย

- เข้าเล่ม 10 เล่ม ๆ ละ 15 บาท	150	บาท
- จ้างล้างฟิลม์ slide เป็นภาพถ่าย	150	บาท
- จ้างล้างฟิลม์ 2 ม้วน ๆ ละ 20 บาท	40	บาท
- ถ่ายเอกสารจัดทำรายงาน	150	บาท
- จ้างพิมพ์รายงาน	500	บาท
- ดูแลต้นไม้	210	บาท
	1400	บาท

2. หมวดค่าวัสดุ

วัสดุที่ใช้ในการปลูกต้นไม้ เช่น ดิน กระถาง	1300	บาท
วัสดุสารเคมี		
glutaryl hydroxamate 500 mg	700	บาท
L-glutamine 5 g/1 ขวด	300	บาท
ADP 1 g/1 ขวด	1000	บาท
Imidazole hydrochloride 100 g/1 ขวด	400	บาท
Hydroxylamine 100 g/1 ขวด	300	บาท
DNA/Hind III	2000	บาท
He carrier gas & Acetylene gas	700	บาท

วัสดุสำนักงาน

กระดาษพิมพ์ 1 รีม	85	บาท
ค่าอัดภาพ 30 รูป	90	บาท
ค่าฟิลม์ 2 ม้วน	144	บาท
ค่าฟิลม์ slide 1 ม้วน	140	บาท
ค่าล้างฟิลม์ slide 1 ม้วน	70	บาท
ค่าถ่ายเอกสารค้นคว้า	300	บาท
	7529	บาท

รวมเป็นงบประมาณทั้งสิ้น 8929 บาท