หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การรอดชีวิตของ Phage P1 ในบัฟเฟอร์ที่ 4 °ซ

เนื่องจากการแยกมิวแตนท์ โดยวิธี localized mutagenesis ขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายอย่าง ปัจจัยหนึ่งที่จำเป็น ก็คือ จำนวนที่แน่นอนและมากเกินพอของ Phage P1 ดังนั้น จึงต้องทดสอบเพื่อความแน่ใจว่า ปริมาณ Phage P1 ซึ่งเตรียมไว้มีมากพอตลอดทุกขั้นตอนของการทดลอง จากการศึกษาการรอดชีวิตของ Phage P1 กับเวลาที่เก็บรักษาในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์. pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 1 พบว่า การเก็บรักษา Phage P1 โดยวิธีการนี้จะทำให้การรอดชีวิตของ Phage P1 มีเปอร์เซนต์ค่อนข้างสูง กล่าวคือ เมื่อเก็บไว้นาน 24 ชั่วโมง ปริมาณของ Phage P1 จะลดลงเพียง 14 เปอร์เซนต์ และจะลดลงอย่างช้า ๆ เมื่อช่วงเวลานานขึ้น แม้จะเก็บต่อไปอีกจนถึง 168 ชั่วโมง หรือ 1 สัปดาห์ ยังคงพบการรอดชีวิตสูงถึง 76 เปอร์เซนต์ ซึ่งช่วงระยะเวลาดังกล่าวนานพอสำหรับการจัดเตรียมขั้นตอนที่จำเป็นอื่น ๆ ในการแยกมิวแตนท์

2. ประสิทธิภาพในการเนี่ยวนำยีนของ Phage P1

ปรกติแล้ว Phage P1 จะอาศัย Escherichia coli เป็นเซลเจ้าเรือน (Lennox,E.S.1955) แต่สำหรับการทดลองนี้ ได้เปลี่ยนมาใช้ Klebsiella pneumoniae เป็นเซลเจ้าเรือนแทน จึงควรศึกษาประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1 ต่อ Klebsiella pneumoniae ก่อน ทั้งนี้ เพื่อจะนำค่าที่ได้มาใช้ประกอบการประมาณให้ได้จำนวนทรานสดัคแตนท์ตามต้องการ

ตารางที่ 1 การรอดชีวิตของ Phage P1 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

เวลา (ชั่วโมง)	ไตเตอร์ของ Phage P1 (จำนวนหน่วยต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซนต์ของ Phage P1 ที่รอดชีวิต
0	1.2×10^{11}	100
24	1.0×10^{11}	86
48	9.9×10^{10}	84
72	9.7×10^{10}	82
168	9.0×10^{10}	76

ตกตะกอน Phage P1 โดยใช้ PEG และ โซเดียมคลอไรด์ ตามที่ได้กล่าวไว้แล้วในวิธีการทดลอง กระจายตะกอนที่ได้ใน 50 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7,0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หาไตเตอร์ที่เวลา 0 , 24 , 48 , 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ

โดยการตรึงจำนวนของเซลตัวรับ (his D) ให้คงที่ และแปรปริมาณ Phage P1 ที่บุกรุก ให้เป็นอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีน จากตารางที่ 2 พบว่า ที่อัตราส่วนของจำนวนไวรัสต่อเซลตัวรับ (m.o.i.) มีค่ามากกว่า 1 จะได้เปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีนประมาณกัน คือ ระหว่าง 1 - 2 X 10^{-4} แต่ถ้าค่าอัตราส่วนนี้ลดลงน้อยกว่า 1 แล้ว เปอร์เซนต์ของการเหนี่ยวนำยีนก็มีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อย ๆ ด้วย

3. การเหนี่ยวนำยีนโดย Phage P1 ที่ผ่านการกลายพันธุ์

ในการแยกมิวแตนท์โดยวิธีนี้ จำเป็นต้องทราบปริมาณที่แปรปรวนของ Phage P1 ทุกขั้นตอนการทดลอง เพราะต้องนำมาใช้ในการคำนวณระหว่างการทดลอง เพื่อให้ได้ปริมาณทรานสดัคแตนท์ที่เหมาะสมในเพลทคัดเลือก จากการทดลองศึกษาความแปรปรวนของ Phage P1 ไว้ล่วงหน้า แสดงในตารางที่ 3 พบว่า ถ้าเริ่มต้นด้วยจำนวนไวรัส 4.4 X 10^{12} หลังตกตะกอนด้วย Polyethylene Glycol 4000 (PEG) แล้ว จะเหลือ Phage P1 อยู่ถึง 64 เปอร์เซนต์ เมื่อนำ Phage P1 จำนวนดังกล่าวไปกลายพันธุ์ด้วยไฮดรอกซีลามีน เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง พบว่า Phage P1 จะตายไปประมาณ 98 เปอร์เซนต์ นั่นคือ เหลือ Phage P1 อยู่เพียง 2 เปอร์เซนต์ นับจากเริ่มต้นขบวนการ Phage P1 ที่เหลือนี้ ต้องนำไปตกตะกอนด้วย PEG อีกครั้งหนึ่งก่อนนำไปทำทรานสดัคชั่น หลังจากขั้นตอนนี้แล้ว พบว่า เหลือ Phage P1 อยู่เป็นจำนวน 0.6 เปอร์เซนต์ ของ Phage P1 เริ่มต้น หรือ นับเป็นปริมาณได้ 2.5 X 10^{10} ซึ่งจะเป็นจำนวนที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

สำหรับขั้นตอนของการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1 เข้าสู่แบคทีเรียตัวรับ คือ his D นั้น มีจำนวน his D อยู่ 2.1 X 10^{10} เซล เมื่อรวมกับ Phage P1 ที่เหลือมาจากขบวนการกลายพันธุ์ 2.5 X 10^{10} คิดเป็น m.o.i. ได้เท่ากับ 0.8 จะได้จำนวนทรานสดัคแตนท์ที่เป็น his D^+ ประมาณ 6 - 9 X 10^3 เซล หรือ คิดเป็นเปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีนได้ 3 - 5 X 10^{-5} ในจำนวนนี้สามารถแยกเป็นมิวแตนท์ที่โอเปอรอน

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำยีนของ Phage P1

จำนวนตัวรับ (his D)	จำนวนตัวให้ (Phage P1)	m.o.i.	จำนวนทรานสดัคแตนท์ (nif$^+$)	เปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีน
2.1×10^9	-	-	-	-
-	3.8×10^{11}	-	-	-
2.1×10^9	3.8×10^{11}	180	3440	1.6×10^{-4}
2.1×10^9	3.8×10^{10}	18	3230	1.5×10^{-4}
2.1×10^9	3.8×10^9	1.8	2600	1.2×10^{-4}
2.1×10^9	3.8×10^8	0.18	297	7.8×10^{-5}
2.1×10^9	3.8×10^7	0.018	26	6.8×10^{-5}

ทำการเหนี่ยวนำยีนจาก Phage P1 เข้าสู่แบคทีเรียตัวรับ (his D)ตามที่ได้กล่าวไว้ในวิธีการทดลอง

1. m.o.i.(multiplicity of infection) หมายถึง อัตราส่วนระหว่างตัวให้ (Phage P1) ต่อตัวรับ (his D)

2. เปอร์เซนต์การเหนี่ยวนำยีน หมายถึง จำนวนทรานสดัคแตนท์ (nif$^+$)ที่ได้ต่อจำนวนน้อยที่สุดของตัวให้หรือตัวรับ คูณด้วย 100

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงจำนวน Phage P1 ในขบวนการกลายพันธุ์

ขั้นตอนในการกลายพันธุ์	ไตเตอร์เริ่มต้น (จำนวนหน่วยต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	ไตเตอร์ทั้งหมด	เปอร์เซนต์ [1] Phage P1 ที่เหลือ
ก่อนตกตะกอนด้วย PEG	4.4×10^{10}	100	4.4×10^{12}	100
ภายหลังตกตะกอนด้วย PEG (ก่อนการกลายพันธุ์)	1.4×10^{12}	2	2.8×10^{12}	64
ภายหลังการกลายพันธุ์	8.3×10^{9}	10	8.3×10^{10}	2
ภายหลังตกตะกอนด้วย PEG (หลังการกลายพันธุ์)	2.5×10^{10}	1	2.5×10^{10}	0.6

การตกตะกอน การหาปริมาณ และ การกลายพันธุ์ของ Phage P1 ทำโดยวิธีการซึ่งได้กล่าวไว้แล้ว ในวิธีการทดลอง

1. เปอร์เซนต์ Phage P1 ที่เหลือ หมายถึง จำนวน Phage P1 ที่เหลือในแต่ละขั้นตอน ต่อจำนวน Phage P1 ทั้งหมด คูณด้วย 100

ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ได้ประมาณ 90 ตัว บางตัว reverse กลับไปเป็น wild type ในช่วงการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้น จึงเหลือจำนวนมิวแตนท์สุดท้าย ที่นำมาใช้ในการศึกษาต่อ 76 ตัว แสดงว่า เปอร์เซนต์ที่จะพบมิวแตนท์ของไนโตรจีเนสโอเปอรอน โดยวิธีนี้มีสูง 1 เปอร์เซนต์

4. ลักษณะทั่ว ๆ ไป ของมิวแตนท์ที่แยกได้

ตามวิธีการที่สร้างขึ้น จะได้ทรานสดัคแตนท์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันบนเพลทคัดเลือก ในขั้นแรก การคัดเลือกมิวแตนท์ทำโดยสังเกตลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ

สำหรับมิวแตนท์ที่มีโคโลนีขนาดเล็ก ใส ไม่มีสี และแบนราบ เลือกเก็บไว้ 64 โคโลนี เนื่องจากต่อมาพบว่า มิวแตนท์พวกนี้ ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน จึงให้ ชื่อมิวแตนท์กลุ่มนี้ว่า " nif มิวแตนท์ " และให้หมายเลขเรียงตามลำดับ ตั้งแต่ nif 1,2,3..... จนถึง nif 64 ในจำนวนนี้ คัดไว้ทดลองคุณสมบัติขั้นต่อไปเพียง 50 โคโลนี

มิวแตนท์ที่มีโคโลนีขนาดเล็ก สีน้ำตาลขุ่น และนูน เลือกไว้ 26 โคโลนี มิวแตนท์กลุ่มนี้ สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน เพียงแต่ให้ลักษณะโคโลนีเล็กกว่า wild type จึงให้ชื่อว่า "partial nif มิวแตนท์ " และให้หมายเลขเรียงตามลำดับตั้งแต่ P 1,2,3..... จนถึง P 26

5. คุณสมบัติของ nif มิวแตนท์

เนื่องจากไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีนขนาดใหญ่ 2ส่วน (Zumft,W.S.,and Mortenson,L.E.1975) ดังนั้น การกลายพันธุ์ที่โอเปอรอนของเอนไซม์นี้แล้ว ได้มิวแตนท์จำนวนมาก จึงเป็นไปได้ที่มิวแตนท์เหล่านี้ จะถูกกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน บนโอเปอรอน อันอาจจะมีผลให้คุณสมบัติบางประการทางฟีโนไทป์แตกต่างกัน จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติบางอย่างของ nif มิวแตนท์ที่ได้ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ซึ่งอาจจะช่วยชี้แนะการศึกษาต่อไปในระดับโมเลกุลได้

5.1 การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของ nif มิวแตนท์ทั้งหมด บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มี และ ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน แสดงในตารางที่ 4 พบว่า nif มิวแตนท์ทั้งหมด ให้ลักษณะการเจริญแบบเดียวกัน กล่าวคือ ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และสามารถเจริญได้เล็กน้อย ให้โคโลนีขนาดเล็ก ใส ไม่มีสี และแบนราบ บนอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับผลการทดสอบการให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท พบว่า จะให้สีแตกต่างกัน แสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 4 โดยยึดหลักความแตกต่างของสีบน 6-Cyanopurine เพลท สามารถแยก nif มิวแตนท์ ออกได้เป็นสามกลุ่ม คือ พบกลุ่มที่ให้สีม่วงอ่อน 28 ตัว กลุ่มที่ให้สีม่วงเข้ม 11 ตัว และกลุ่มที่ให้สีขาว 11 ตัว

5.2 การเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำ nif มิวแตนท์ที่ให้สีต่างกันบน 6-Cyanopurine เพลท ไปศึกษาความแตกต่างของการเจริญเติบโต และ แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 พบว่า nif มิวแตนท์ทั้ง 3 ตัว ซึ่งสุ่มมาจาก nif มิวแตนท์ ที่ให้สีต่างกัน จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความขุ่นของเชื้อใกล้เคียงกัน คือ ระหว่าง 0.1 - 0.2 หน่วย $O.D._{420}$ ขณะที่ Klebsiella pneumoniae M5a1 ให้ความขุ่น 0.3 - 0.4 หน่วย $O.D._{420}$ และที่ความขุ่นดังกล่าว ไม่พบแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนแต่อย่างใด ในขณะที่ค่าที่ได้จาก wild type สูงถึง 4.0 - 6.0 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

5.3 การหาเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นกับ his D

จากการทดลองโดยใช้ Phage P1 ทรานสดัคชั่น (Streicher,S.; Gurney,E.;and Valentine,R.C.1971) และ คอนจูเกชั่น (Dixon,R.D.,and Postgate,J.R.1971) พบว่า ยีนการตรึงไนโตรเจนอยู่ใกล้ยีนการสังเคราะห์ฮีสติดีน

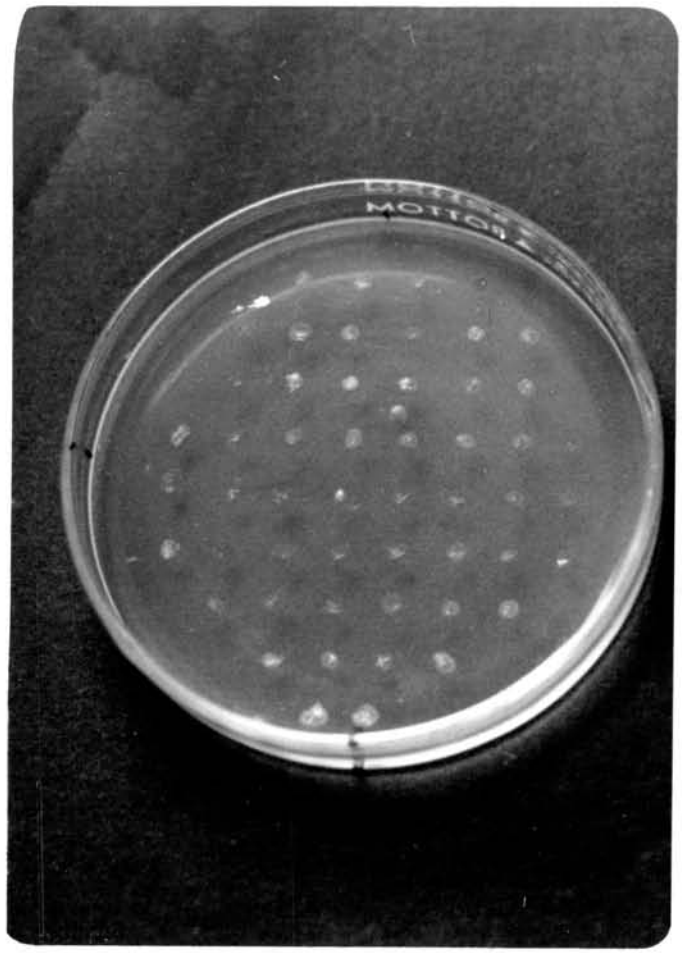
ตารางที่ 4 คุณสมบัติเบื้องต้นของ nif มิวแตนท์ที่แยกได้

ฟีโนไทป์	หมายเลขซื่อเชื้อ	จำนวนทั้งหมด	ลักษณะโคโลนี[1] บนเพลทที่มี 15 µg/ml. $(NH_4)_2SO_4$	ลักษณะโคโลนี[2] อาหารแข็งที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน	การให้สีบน[3] 6-CP เพลท
his^+,nif^-	nif 1,2,3,8,9,10, 11,12,18,21, 23,25,29,37, 39,40,45,46, 48,50,52,53, 54,57,22,26, 27,28.	28	ขนาดเล็ก ไม่มีสี ใสแบนราบ	ไม่สามารถเจริญได้	ม่วงอ่อน
his^+,nif^-	nif 5,7,13,24, 30,32,33,35, 41,44,51.	11	ขนาดเล็ก ไม่มีสี ใสแบนราบ	ไม่สามารถเจริญได้	ม่วงเข้ม
his^+,nif^-	nif 19,20,36,43, 49,58,59,60, 61,62,63.	11	ขนาดเล็ก ไม่มีสี ใสแบนราบ	ไม่สามารถเจริญได้	ขาว

1. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรปรับต่ำ ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน 3 - 4 วัน

2. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรปรับต่ำที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน บ่มที่30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน 3 - 4 วัน

3. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรปรับต่ำ ที่มี 6-Cyanopurineอยู่ด้วย บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน 3 - 4 วัน



รูปที่ 3 แสดงสีซึ่งแตกต่างกัน บน 6-Cyanopurine เพลท ของ nif มิวแตนท์

ตารางที่ 5 การเจริญเติบโต และ การตรึงไนโตรเจนของ nif มิวแตนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

หมายเลขชื่อของเชื้อ	การให้สีบน 6-CP เพลท	ความขุ่นของเชื้อ[1]	แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน[2]
nif 41, nif 51	ม่วงเข้ม	0.10 - 0.15	0
nif 57, nif 26	ม่วงอ่อน	0.13 - 0.17	0
nif 43, nif 36, nif 20, nif 61	ขาว	0.10 - 0.15	0
Klebsiella pneumoniae M5a1	ม่วง	0.30 - 0.40	4.0 - 6.0

จาก nif มิวแตนท์ 50 ตัว ที่ทดสอบไว้จากตารางที่ 4 เลือกหมายเลขโดยวิธีการสุ่มมาดังนี้ สีม่วงเข้ม 2 ตัว สีม่วงอ่อน 2 ตัว และ สีขาว 4 ตัว นำมาศึกษาการเจริญเติบโต และ ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยวิธีอะเซทีลีนรีดัคชั่น

1. วัดความขุ่นของเชื้อโดยใช้เครื่องวัดการดูดแสงที่ 420 มิลลิไมครอน

2. หาแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่เสริมด้วยกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามที่ได้กล่าวไว้แล้วในวิธีการทดลอง หน่วยเป็นไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

i 17108822

ดังนั้น การหาเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นของ nif มิวแตนท์ กับ his D อาจช่วยให้เห็นถึงความแตกต่างของตำแหน่งผิดปรกติบนโอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของ nif มิวแตนท์แต่ละตัวได้

การทดลองนี้ สุ่ม nif มิวแตนท์ที่ให้สีต่างกันบน 6-Cyanopurine เพลท มา 8 ตัว หาเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่น โดยใช้ his D เป็นยีนตรึงตัว ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่า nif มิวแตนท์ มีการกระจายตัวของตำแหน่งยีนที่ผิดปรกติบนโอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสต่าง ๆ กัน โดยให้เปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่น ตั้งแต่ 45 - 85 เปอร์เซนต์ และยังมีความสัมพันธ์กับสีที่ให้บน 6-Cyanopurine เพลทอีกด้วย กล่าวคือ nif มิวแตนท์ที่ให้สีม่วงอ่อน จะให้เปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นต่ำสุดตั้งแต่ 45 - 50 เปอร์เซนต์ ขณะที่กลุ่มซึ่งให้สีม่วงเข้ม เป็น 65 - 70 เปอร์เซนต์ สำหรับมิวแตนท์ที่ให้สีขาว จะให้เปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นสูงสุด ตั้งแต่ 75 - 85 เปอร์เซนต์

5.4 การคอนจูเกทระหว่าง nif มิวแตนท์ กับ Escherichia coli K12 JC5466 (RP41)

ได้นำ nif มิวแตนท์ที่แยกได้นี้ ทดลองคอนจูเกทกับ Escherichia coli K12 JC5466 (RP41) ซึ่งมีพลาสมิดต้านยา และ ยีนการตรึงไนโตรเจนเชื่อมติดอยู่ด้วย โดยการเลือก nif มิวแตนท์ 7 ตัว ที่สุ่มมาจากการให้สีต่างกันบน 6-Cyanopurine เพลท เป็นตัวทดลอง พบว่า การคอนจูเกทข้ามชนิดของแบคทีเรีย เกิดขึ้นได้ด้วยความถี่ $1 - 5 \times 10^{-4}$ ต่อแบคทีเรียตัวรับหนึ่งตัว ให้ชื่อรีคอมบิแนนท์ที่ได้ ตามหมายเลขมิวแตนท์ คือเป็น R20 , R41 , R26 , R36 , R51 , R57 และ R61 เมื่อแยกจนได้รีคอมบิแนนท์บริสุทธิ์แล้ว นำมาทดสอบลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า รีคอมบิแนนท์ทั้งหมดเจริญได้ดีบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะปนอยู่ด้วย ในขณะที่ nif มิวแตนท์ และ Klebsiella pneumoniae M8a1 เจริญไม่ได้ แสดงว่า ยีนต้านยาได้เคลื่อนเข้ามาอยู่ใน nif มิวแตนท์ได้ นอกจากนี้

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นของ nif มิวแตนท์ กับ his D

สายพันธุ์ตัวให้	สายพันธุ์ตัวรับ	จำนวน [1] ทรานสดัคแตนท์ (his$^+$)	จำนวน [2] ทรานสดัค-แตนท์ (nif$^-$ his$^+$)	เปอร์เซนต์[3] โคทราน-สดัคชั่น	การให้สีบน 6-CP เพลท
nif 57	his D	123	58	47	ม่วงอ่อน
nif 1	his D	124	64	52	ม่วงอ่อน
nif 41	his D	184	120	65	ม่วงเข้ม
nif 51	his D	240	166	69	ม่วงเข้ม
nif 43	his D	178	138	76	ขาว
nif 36	his D	176	142	81	ขาว
nif 20	his D	192	157	82	ขาว
nif 49	his D	147	124	84	ขาว

1. หมายถึง ทรานสดัคแตนท์ที่เลือกมาจากการทำทรานสดัคชั่น โดยใช้ Phage P1 ที่เจริญเติบโต เมื่อมี nif มิวแตนท์เป็นเซลเจ้าเรือน แล้วเหนี่ยวนำเข้าเซลตัวรับ (his D) เลือกทรานสดัคแตนท์จากจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ และเสริมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซนต์

2. หมายถึง ทรานสดัคแตนท์จากข้อ 1 ซึ่งเจริญเติบโตไม่ได้ในจานเพาะเชื้อที่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ที่ 30°ซ

3. คำนวณจาก $\frac{\text{จำนวน nif}^- \text{ his}^+}{\text{จำนวนทรานสดัคแตนท์ทั้งหมด (his}^+\text{)}} \times 100$

รีคอมบิแนนท์ทั้งหมด ยังสามารถเจริญได้บนอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน เหมือนกับ Klebsiella pneumoniae M5a1 ขณะที่ nif มิวแตนท์เจริญไม่ได้ ซึ่งชี้แนะว่านอกจากจะได้รับยีนต้านยาแล้ว ยังอาจได้รับยีน nif^+ เข้ามาด้วย

5.5 การเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ และ wild typeในภาวะตรึงไนโตรเจน

โดยทั่วไป ยีนไนโตรจีเนสจะถูกถอดแบบเป็นเอนไซม์ได้ จะต้องมีสารต้นตอไนโตรเจน เช่น อนุมูลแอมโมเนียม หรือ กลูตามีนไม่เกิน 60 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Parejko,R.A.,and Wilson,P.W.1970) และเอนไซม์ไนโตรจีเนสจะตื่นตัว เมื่อความดันบรรยากาศของออกซิเจนต่ำมาก หรือ เป็นศูนย์ (Klucas,R.1972 , Drozd,J.,and Postgate,J.R,1970)

ในที่นี้ เมื่อทดลองนำ Klebsiella pneumoniae M5a1 มาเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน (รูปที่ 4) พบว่า การเจริญเติบโตของเชื้อจะขึ้นสูงสุด ต้องการเวลาบ่มนานเกิน 16 ชั่วโมง ที่ 30 $^{\circ}$ ซ ส่วนแอคติวิตี้ของการตรึงไนโตรเจน ซึ่งติดตามโดยดูการรีดิวส์อะเซทีลีนเป็นเอทีลีน จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วมาก ค่าสูงสุดของแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนจะอยู่ในระยะการแบ่งตัวแบบทวีคูณ ซึ่งตรงกับช่วงเวลาประมาณ 10 - 13 ชั่วโมง จากนั้นแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีนจะลดลงอย่างรวดเร็ว จากการทำการทดลองหลาย ๆ ครั้ง พบว่า ช่วงเวลาบ่ม 12 ชั่วโมง จะเป็นช่วงเวลาที่ให้ค่าการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดเสมอ รูปแบบนี้พบเช่นเดียวกันในรีคอมบิแนนท์ (รูปที่ 5) ต่างกันที่ช่วงเวลาบ่มที่ให้ค่าการตรึงไนโตรเจนสูงสุดนานกว่า คือ 15 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 คุณสมบัติโดยทั่วไปของรีคอมบิแนนท์ที่ได้จากการคอนจูเกท Escherichia coli K12 JC5466 (RP41)กับ nif มิวแตนท์

หมายเลขชื่อเชื้อ	การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
	แอมโมเนียม[1] ซัลเฟต 0.1 เปอร์เซนต์	แอมโมเนียม[2] ซัลเฟต 0.1 เปอร์เซนต์ + ยาปฏิชีวนะ	ปราศจากต้น[3] ตอไนโตร -เจน	ปราศจากต้น[4] ตอไนโตร - เจน +ยาปฏิชีวนะ
R41 , R51 , R57 R61 , R26 , R36 R20	+	+	+	+
nif 41,51,57,61, 26,36,20	+	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	+	-

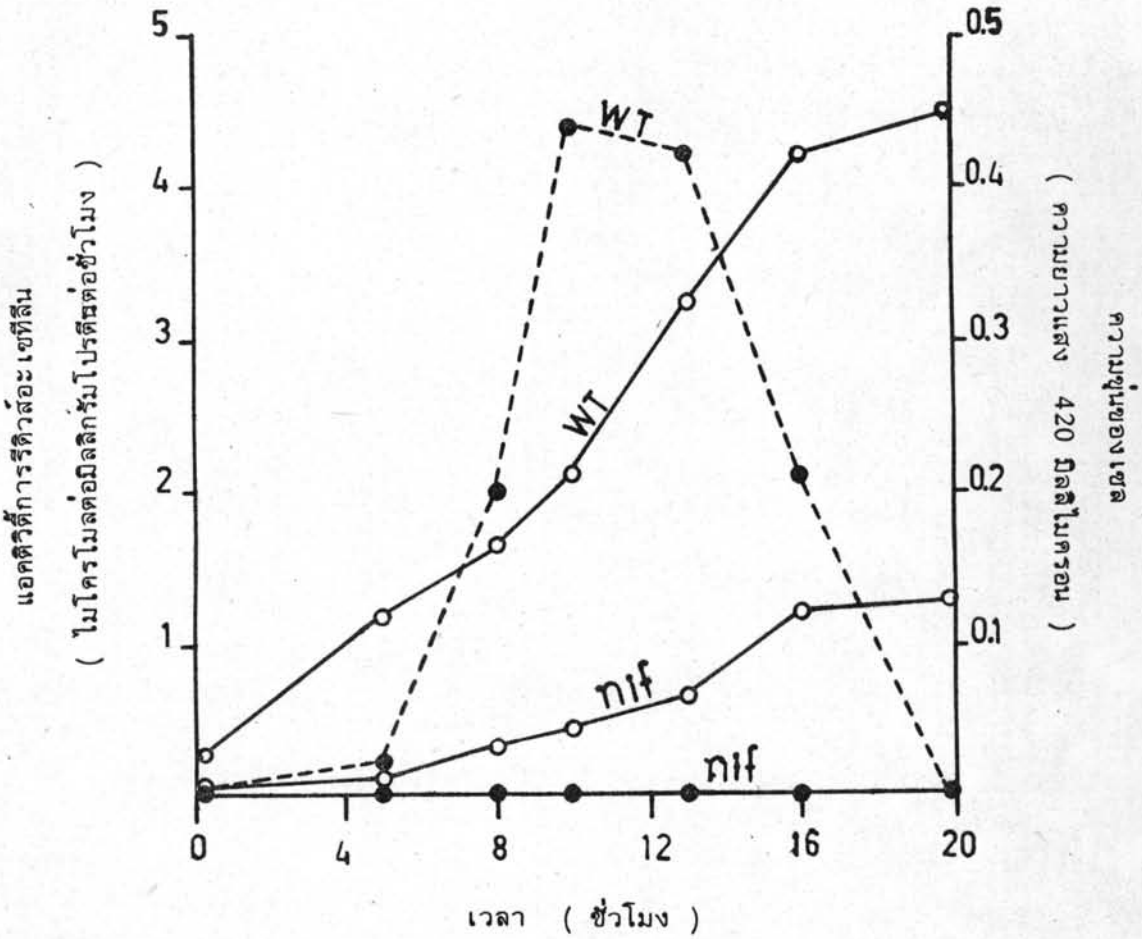
+ = เจริญได้ - = ไม่สามารถเจริญได้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซนต์ บ่มที่ 30 °ซ 2 วัน

2. เหมือนข้อ 1 และเติมยาปฏิชีวนะ คานามัยซิน แอมพิซิลลิน และ เตตราซัยคลิน ปริมาณ 20 , 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน 3 - 4 วัน

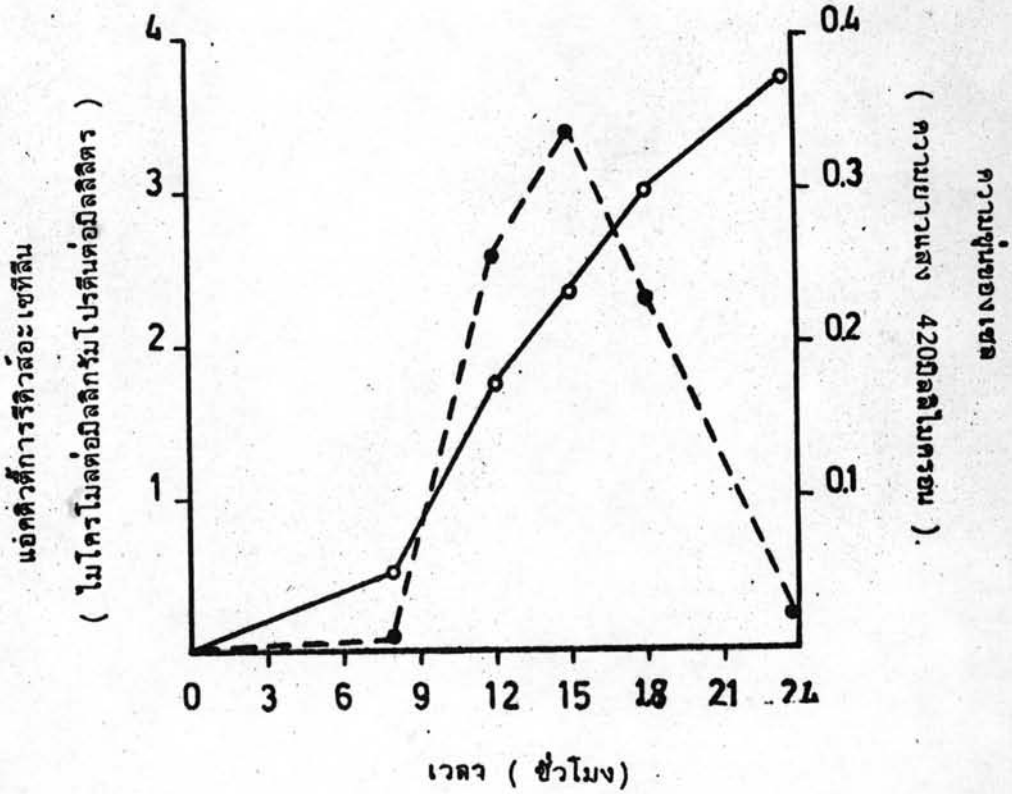
4. เหมือนข้อ 3 และ เติมยาปฏิชีวนะดังข้อ 2 ลงไปด้วย



รูปที่ 4 ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ Klebsiella pneumoniae M5a1 และ nif มิวแตนท์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วยกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน (WT = Wild Type)

o——o——o หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

●- - -●- - -● หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของเชื้อ



รูปที่ 5 ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ รีคอมบิแนนท์ (R61) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วย กลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศ อาร์กอน

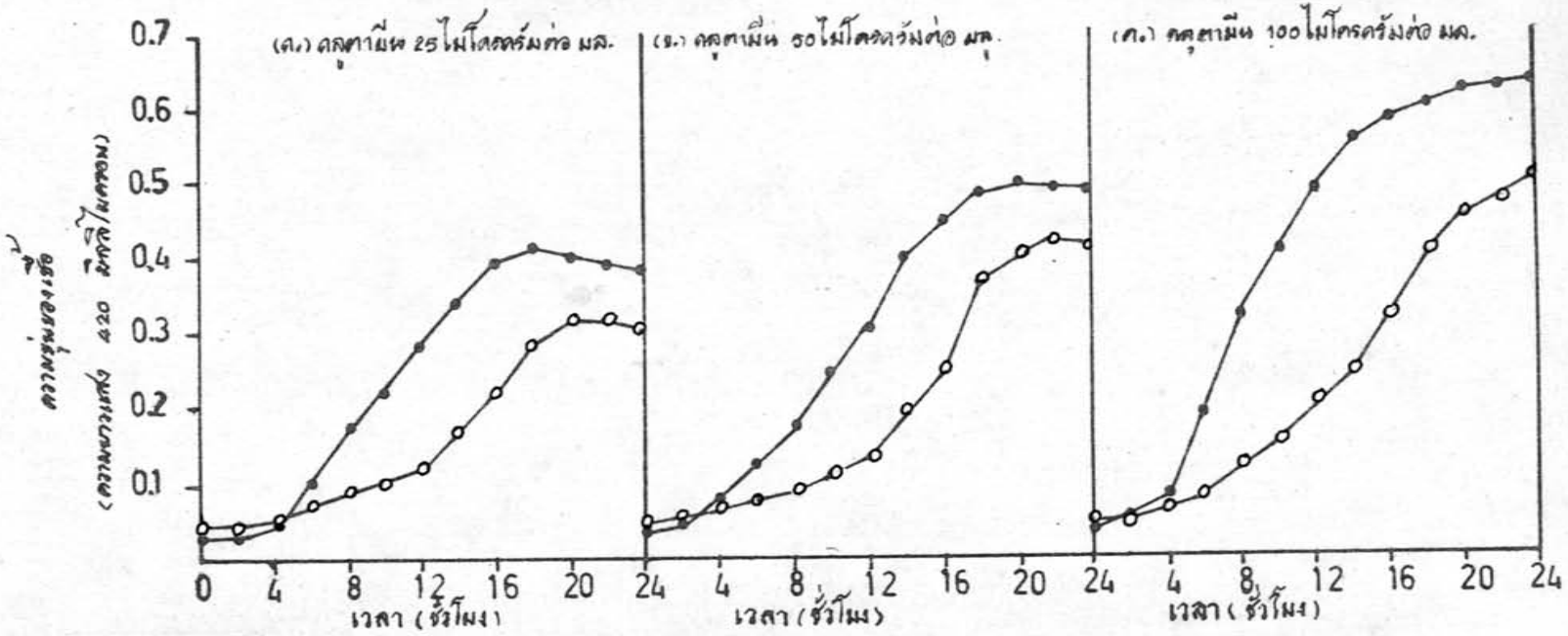
o——o——o หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

●- - -●- - -● หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของเชื้อ

เมื่อทดลองนำรีคอมบิแนนท์ที่ได้มาเจริญตัวเทียบกับ wild type ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน พบว่า การเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ทุกตัว (R20 , R26 , R36 , R41 , R51 , R57 , R61) จะเจริญได้ช้ากว่า wild typeที่สภาวะเดียวกัน รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตดังกล่าว จะเห็นได้ว่า การเจริญตัวของ wild typeจะเร็วกว่าของรีคอมบิแนนท์ ไม่ว่าปริมาณของต้นตอไนโตรเจนเป็นเท่าใด การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจน จาก 25 เป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของกลูตามีน ในสภาพที่เอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกถอดระหัสได้นี้ จะทำให้จุดกึ่งกลางของการแบ่งตัวของ wild type ยิ่งสั้นขึ้น พิสัยของมันจะอยู่ในระหว่าง 8 - 12 ชั่วโมง ในขณะที่ของรีคอมบิแนนท์ จะอยู่ระหว่าง 14 - 15 ชั่วโมง

5.6 การตรึงไนโตรเจนของรีคอมบิแนนท์ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

เพื่อหาช่องทางศึกษาปริมาณการถอดระหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของรีคอมบิแนนท์เทียบกับของ wild type จึงได้ทดลองหาแอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวส์อะเซทีลีนภายใต้บรรยากาศอาร์กอน พบว่า ในสภาพที่มีสารต้นตอไนโตรเจนต่างกัน ค่าแอคติวิตี้สูงสุดของการรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์จะต่างกัน แสดงในตารางที่ 8 กล่าวคือ รีคอมบิแนนท์ที่มาจาก nif มิวแตนท์กลุ่มที่ให้สีขาวบน 6-Cyanopurine เพลท (R20 , R61 และ R36) จะมีแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงกว่า คือ 3.4 - 5.4 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ทั้งสามระดับความเข้มข้นของกลูตามีน ขณะที่รีคอมบิแนนท์กลุ่มที่มาจาก nif มิวแตนท์ ที่ให้สีม่วงอ่อน และ ม่วงเข้ม มีแอคติวิตี้ต่ำกว่า คือ ตั้งแต่ 1.3 - 2.9 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าสูงสุดของแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ wild type เท่ากับ 5.0 - 6.0 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ส่วนความขุ่นสูงสุดของเชื้อภายใต้สภาวะจำกัดสารต้นตอไนโตรเจน ไม่มีความแตกต่างที่เป็นนัยสำคัญของรีคอมบิแนนท์ และ wild type



รูปที่ 6 ลักษณะการเจริญเติบโตของ รีคอมบิแนนท์ เทียบกับ Klebsiella pneumoniae M5a1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วย (ก) กลูตามีน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(ข) กลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(ค) กลูตามีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บ่มที่ 30°ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

●——●——● หมายถึง การเจริญเติบโตของ Klebsiella pneumoniae M5a1

○——○——○ หมายถึง การเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตและความสามารถสูงสุดในการรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีปริมาณกลูตามีนต่าง ๆ กัน ภายใต้บรรยากาศอาร์กอน

หมายเลขซื้อเชื้อ	กลูตามีน 25 ไมโคร[1] กรัมต่อมิลลิลิตร		กลูตามีน 50 ไมโคร[2] กรัมต่อมิลลิลิตร		กลูตามีน 100 ไมโคร[3] กรัมต่อมิลลิลิตร	
	แอคติวิตี้จำเพาะ	ความขุ่นของเชื้อ	แอคติวิตี้จำเพาะ	ความขุ่นของเชื้อ	แอคติวิตี้จำเพาะ	ความขุ่นของเชื้อ
R41	2.4	0.12	2.9	0.14	22.6	0.17
R51	2.9	0.11	2.9	0.13	2.3	0.24
R26	1.3	0.13	1.9	0.17	2.0	0.22
R57	2.9	0.12	2.9	0.17	2.4	0.24
R20	3.8	0.12	4.1	0.14	3.4	0.23
R61	3.7	0.09	4.0	0.15	3.4	0.24
R36	4.2	0.12	5.4	0.14	4.8	0.21
M5a1	5.2	0.15	6.2	0.23	5.6	0.24

1. แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน(ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูตามีน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดโดยวิธีที่กล่าวมาแล้วในการทดลอง สำหรับรีคอมบิแนนท์ บ่มเชื้อภายใต้บรรยากาศอาร์กอนนาน 15ชั่วโมง และ สำหรับ Klebsiella pneumoniae M5a1 บ่มนาน 12 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวแสง 420 มิลลิไมครอน

2. เหมือนข้อ 1 แต่ใช้กลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. เหมือนข้อ 1 แต่ใช้กลูตามีน 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำค่าแอคติวิตี้สูงสุดของการรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์ กับการให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท และ เปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นของ nif มิวแตนท์เดิม มาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ระหว่างกัน ในตารางที่ 9 จะพบว่า nif มิวแตนท์ กลุ่มที่ให้สีขาวบน 6-Cyanopurine เพลท จะมีเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นสูง และค่าแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน หลังจากคอนจูเกทเอายีนการตรึงไนโตรเจนเข้าไปแล้วก็สูงกว่า nif มิวแตนท์อีกกลุ่มหนึ่งด้วย ซึ่งสังเกตได้จาก ค่าเฉลี่ยของแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของรีคอมบิแนนท์ที่มาจาก nif มิวแตนท์ที่ให้สีขาวบน 6-Cyanopurine เพลท จะสูงกว่า nif มิวแตนท์ที่ให้สีม่วงอ่อนและม่วงเข้มบน 6-Cyanopurine เพลท ประมาณ 46 เปอร์เซนต์ ข้อน่าสังเกตคือ nif มิวแตนท์ที่ให้สีขาวกับ 6-Cyanopurine เพลทนั้น อยู่ใกล้กับยีน his D มากที่สุด เพราะค่าเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นมีค่าสูงสุด และยีนที่อยู่ใกล้กับยีน his D มากที่สุด คือยีนควบคุมการถอดระหัสของโอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Dixon,R.C.,et al.1977, Roberts,C.P.,et al.1978)

6. การทดสอบคุณสมบัติของ partial nifมิวแตนท์

มิวแตนท์อีกกลุ่มหนึ่งที่แยกได้ มีลักษณะเบื้องต้นทั่ว ๆ ไป คล้ายกับ wild type เพียงแต่ค่าแอคติวิตี้ของการตรึงไนโตรเจนต่ำกว่า จึงให้ชื่อว่า partial nif มิวแตนท์ ได้สุ่มเอามิวแตนท์ในกลุ่มนี้มา 3 ตัว เพื่อทำการทดสอบลักษณะของฟีโนไทป์ที่แท้จริงของมัน ได้แก่ สายพันธุ์ที่มีชื่อว่า P2 , P4 และ P7

6.1 คุณสมบัติเบื้องต้น

มิวแตนท์ที่สุ่มมาทั้งสามตัวนี้ ให้ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน คล้ายกับ wild type ดังแสดงในตารางที่ 10 กล่าวคือ โคโลนีมีสีน้ำตาลขุ่น และ นูน เหมือน wild type ต่างกันเฉพาะขนาดเล็กกว่าเมื่อบ่มในระยะเวลาเท่ากัน ไม่พบความแตกต่าง ของการเกิดสีบน 6-Cyanopurine เพลทเลย สำหรับแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนนั้น พบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างมิวแตนท์แต่ละตัว และ wild type อย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ P2 จะพบแอคติวิตี้ของการรีดิวส์ -

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการให้สีบน 6-Cyanopurine เพลท และเปอร์เซนต์โคทรานสดัคชั่นของ nif มิวแตนท์เดิม กับแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุดของรีคอมบิแนนท์ และ wild type

หมายเลขชื่อเชื้อ	การให้สีบน 6-CPเพลทของ nifมิวแตนท์เดิม	เปอร์เซนต์โคทราน-สดัคชั่นของ nif มิวแตนท์เดิม	ช่วงแอคติวิตี้จำเพาะ[1] สูงสุด
R41	ม่วงเข้ม	65	2.4 - 2.6
R51	ม่วงเข้ม	69	2.3 - 2.9
R57	ม่วงอ่อน	58	1.3 - 2.0
R26	ม่วงอ่อน	ไม่ได้ทำ	2.4 - 2.9
R36	ขาว	81	3.4 - 4.1
R20	ขาว	82	3.4 - 4.0
R61	ขาว	ไม่ได้ทำ	4.2 - 5.4
M5a1	ม่วง	-	5.2 - 6.2

1. ช่วงแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุด (ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ของรีคอมบิแนนท์ ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูตามีนตั้งแต่ 25 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 10 คุณสมบัติเบื้องต้นของ partial nif มิวแตนท์ P2 , P4 และ P7

หมายเลขชื่อเชื้อ	ลักษณะโคโลนีบนอาหารที่ปราศจากต้นตอไนโตรเจน	แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุดในกลูตามีน 50 µl/ml.	แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนในอาหารที่ปราศจากไนโตรเจน	การให้สีบน 6-CP เพลท
P2	ขนาดเล็ก สีน้ำตาลนูน	4.1	4.5	ม่วง
P4	ขนาดเล็ก สีน้ำตาลนูน	1.4	2.0	ม่วง
P7	ขนาดเล็ก สีน้ำตาลนูน	1.6	3.2	ม่วง
M5a1	ขนาดใหญ่ สีน้ำตาลนูน	5.6	6.7	ม่วง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ ที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน บ่มที่ 30°ซ 3 - 4 วัน ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

2. แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุด (ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ในอาหารสูตรปรับต่ำสำหรับการตรึงไนโตรเจน และเสริมด้วยกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสำหรับ Klebsiella pneumoniae M5a1 และ 16 ชั่วโมงสำหรับ partial nif มิวแตนท์

3. เหมือนข้อ 2 แต่ไม่มีสารต้นตอไนโตรเจน บ่มเป็นเวลา 30 ชั่วโมง สำหรับ Klebsiella pneumoniae M5a1 และ 40 ชั่วโมงสำหรับ partial nifมิวแตนท์

4. ทดสอบแบบเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในวิธีการทดลอง

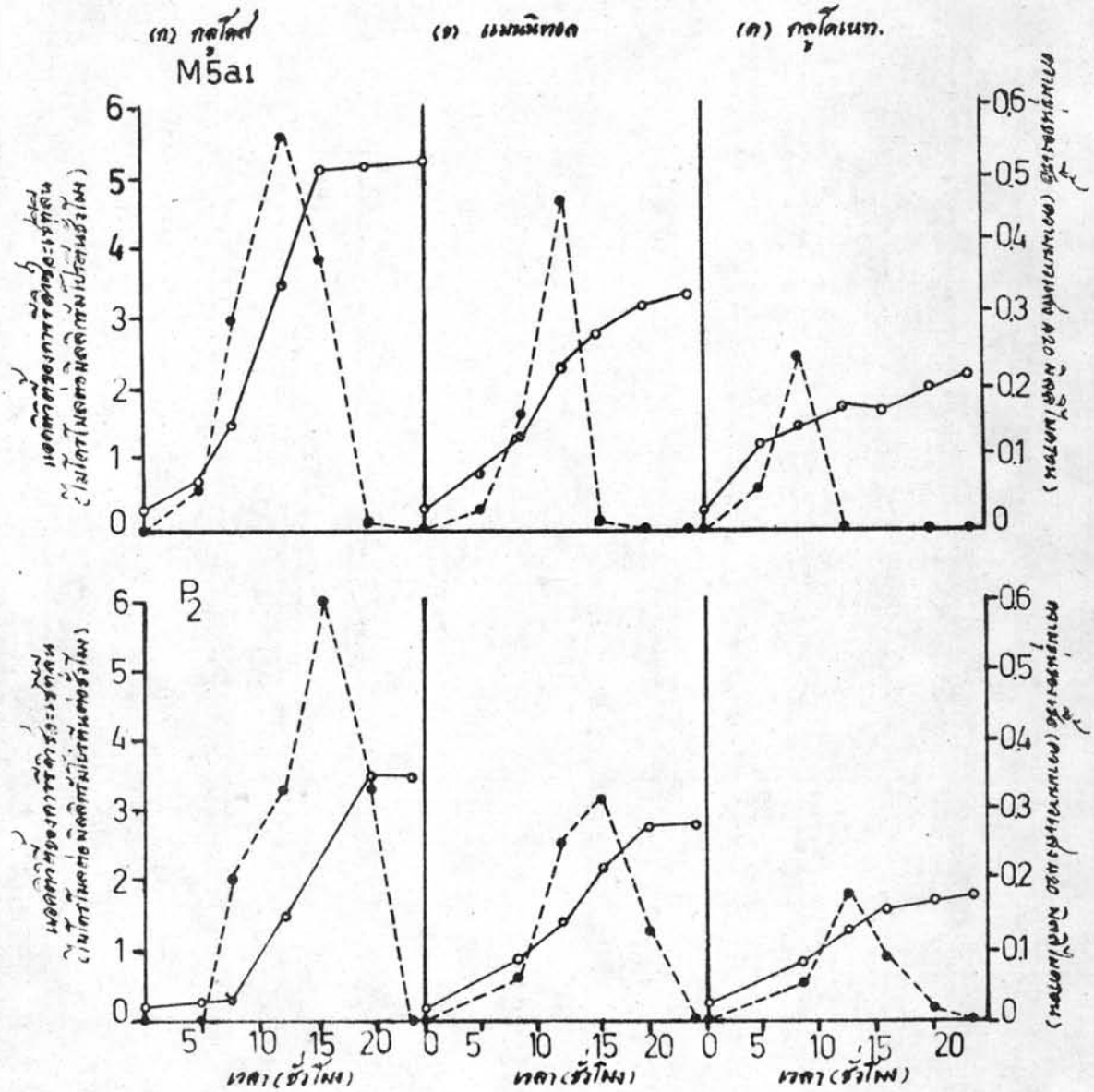
อะเซทีลีนค่อนข้างสูง (4.1 - 4.5 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ขณะที่ P4 และ P7 ให้ระดับแอคติวิตี้นี้ค่อนข้างต่ำ (1.4 - 3.2 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ทั้งนี้ไม่ว่าสภาวะการตรึงไนโตรเจนนั้น จะมี หรือ ไม่มีกรดอะมิโนเสริมอยู่ก็ตาม

6.2 การตรึงไนโตรเจนเมื่อมีสารต้นตอคาร์บอนต่างชนิดกัน

ปรกติแล้ว ขบวนการตรึงไนโตรเจน ต้องการพลังงานในรูปของ ATP สูงมาก ดังนั้น การที่ partial nif มิวแตนท์ มีการเจริญเติบโตน้อยกว่า wild type อาจเนื่องมาจากการหย่อนประสิทธิภาพในการใช้สารต้นตอคาร์บอนให้เป็นประโยชน์ ได้ทำการศึกษารูปแบบของการเจริญเติบโตของ partial nif มิวแตนท์ (P2 , P4 , P7) และวัดแอคติวิตี้จำเพาะของการรีดิวส์อะเซทีลีนตลอดช่วงระยะการเจริญพันธุ์ของเชื้อ โดยใช้กลูโคส แมนนิทอล และ กลูโคเนท ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากัน ต่างกันที่โครงสร้างของการรีดิวส์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 และ 8

จากรูปที่ 7 เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบของการตรึงไนโตรเจนของ wild type ภายใต้สารต้นตอคาร์บอนทั้งสามชนิด จะพบว่า ค่าแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.6 , 4.8 และ 2.4 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ที่ช่วงเวลา 12 , 12 และ 8 ชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคส แมนนิทอล และ กลูโคเนท เป็นสารต้นตอคาร์บอนตามลำดับ ค่าความขุ่นสูงสุด (maximum growth)ที่ได้ มีค่า 0.51, 0.32 และ 0.21 หน่วย $O.D._{420}$ จากผลการทดลองนี้ อาจสรุปได้ว่ากลูโคสใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนของ wild type ได้ดีที่สุด

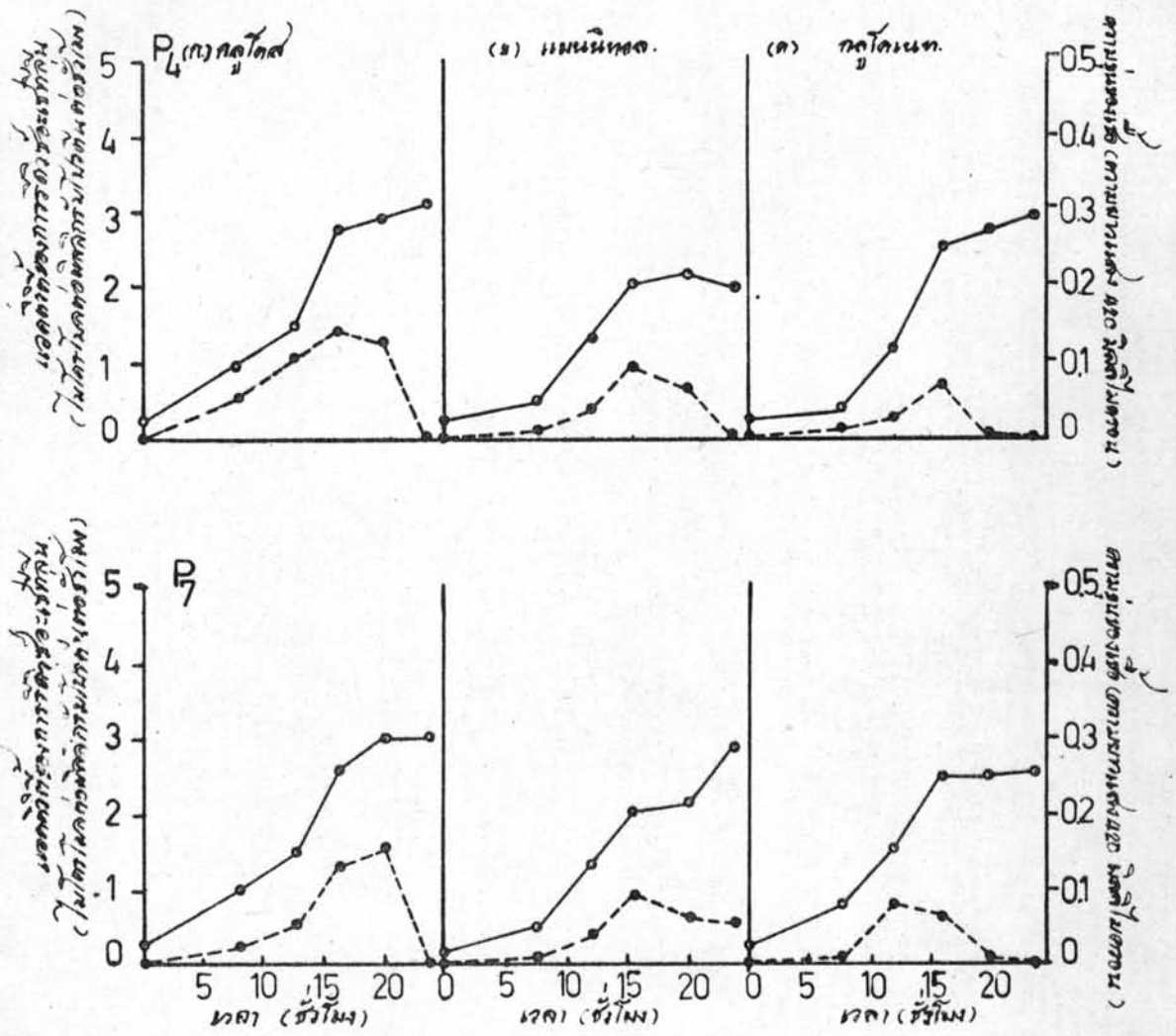
เมื่อพิจารณาในทำนองเดียวกันกับ wild typeจะพบว่า รูปแบบของการเจริญเติบโตของ P2 , P4 และ P7 ภายใต้ภาวะการตรึงไนโตรเจน มีความแตกต่างจาก wild type และ แม้แต่ในระหว่างหมู่มิวแตนท์กันเอง ก็ยังแตกต่างกัน



รูปที่ 7 ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ Klebsiella pneumoniae M5a1 และ P2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วยกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ (ก) กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ (ข) แมนนิทอล 10 มิลลิโมลาร์ (ค) กลูโคเนท 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 30 °ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

o——o——o หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

•- - - -•- - - -• หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของเชื้อ



รูปที่ 8 ลักษณะการเจริญเติบโต และแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ P4 และ P7 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วยกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ (ก) กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์

(ข) แมนนิทอล 10 มิลลิโมลาร์

(ค) กลูโคเนท 10 มิลลิโมลาร์

o——o——o หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

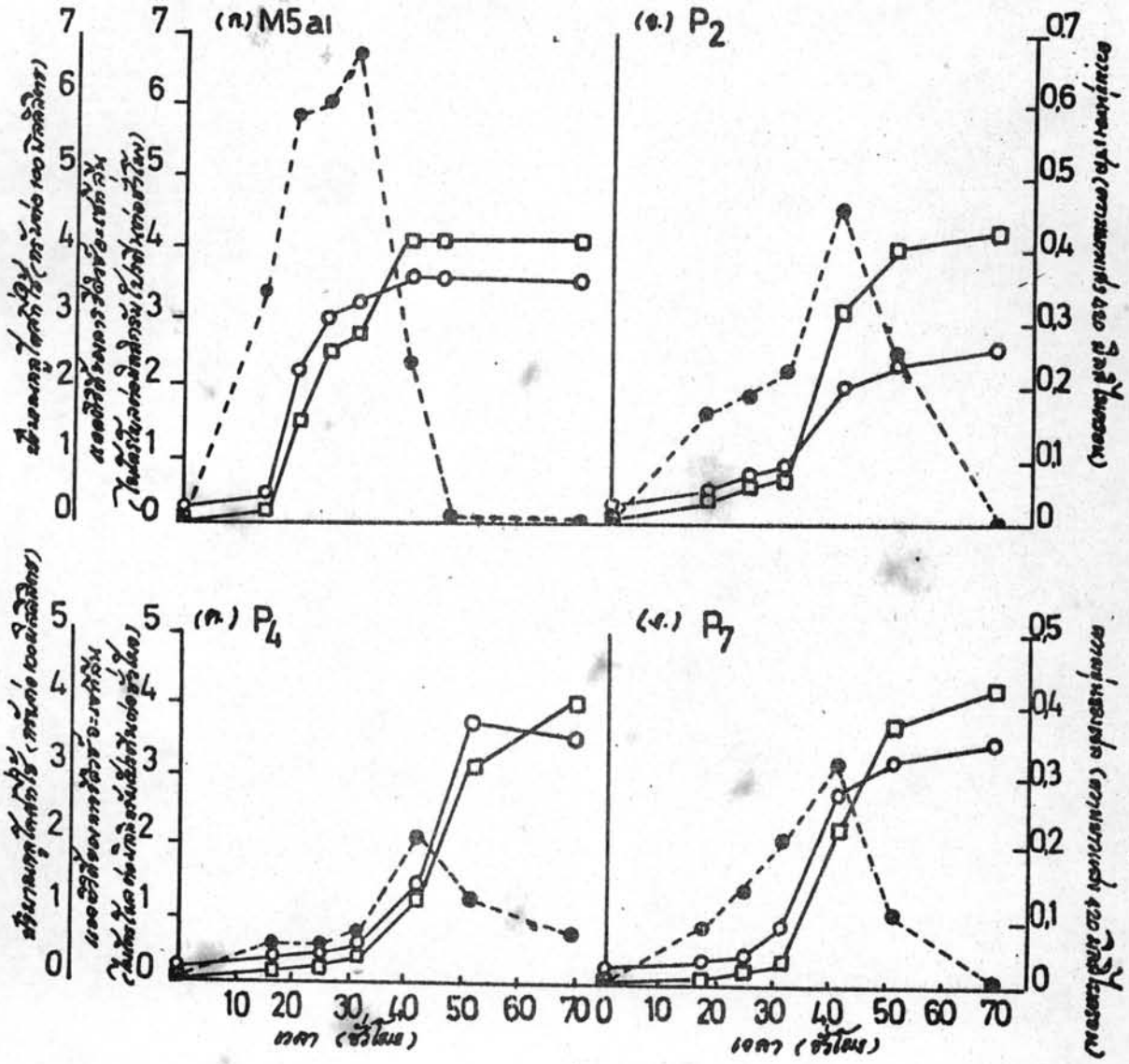
•- - -•- - -• หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของเชื้อ

สำหรับ P2 พบความเบี่ยงเบนของแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน กับ การเจริญเติบโต เมื่อใช้สารประกอบทั้งสามชนิดเป็นต้นตอคาร์บอน จะคล้ายกันกับของ wild type กล่าวคือ ค่าการรีดิวส์อะเซทีลีนสูงสุด คือ 6.0 , 3.2 และ 1.9 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และค่าเจริญตัวสูงสุด คือ 0.35 , 0.28 และ 0.18 หน่วย $O.D._{420}$ เมื่อใช้กลูโคส แมนนิทอล และ กลูโคเนท เป็นต้นตอคาร์บอนตามลำดับ เทียบความแปรปรวนนี้กับของ wild type จะเห็นได้ว่า สิ่งที่แตกต่างกัน คือ จำนวนความขุ่นสูงสุดของ P2 จะน้อยกว่าของ wild type ถึง 50 เปอร์เซนต์ ในขณะที่แอคติวิตี้ การรีดิวส์อะเซทีลีนมีเท่า ๆ กัน

เมื่อพิจารณาความแปรปรวนของรูปแบบการเจริญเติบโต และ แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของ P4 และ P7 (รูปที่ 8) โดยการเปรียบเทียบกับ wild type (รูปที่ 7) แล้วจะพบว่า แม้ค่าสูงสุดของแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนจะมีค่าต่ำ แต่มิวแตนท์ทั้งสองตัวนี้ กลับสามารถใช้สารประกอบคาร์บอนทั้งสาม เป็นต้นตอคาร์บอนได้ดีเกือบเท่า ๆ กัน ทั้งนี้ โดยพิจารณาจากค่าเจริญตัวสูงสุด (maximum growth) คือ ทั้ง P4 และ P7 ให้ค่าการเจริญตัวสูงสุด 0.2 - 0.3 หน่วย $O.D._{420}$ ทั้งนี้ไม่ว่าจะเป็นสภาวะที่มีกลูโคส แมนนิทอล หรือ กลูโคเนทเป็นสารต้นตอคาร์บอนก็ตาม และ แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของทั้ง P4 และ P7 จะต่ำลงคล้าย ๆ กันด้วย คือ ค่าจะแปรปรวนอยู่ระหว่าง 0.8 - 1.5 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง

6.3 ประสิทธิภาพในการใช้กลูโคสของ partial nif มิวแตนท์ เทียบกับ wild type

การทดลองที่ผ่านมาในข้อ 6.2 ชี้บ่งว่า อาจ มีความแตกต่างในระหว่างการใช้กลูโคส กับ การตรึงไนโตรเจน และ การเจริญเติบโตของ partial nif มิวแตนท์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูตามีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอยู่นั้น เพื่อที่จะแน่ใจได้ว่า ความแตกต่างที่เกิดขึ้น ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้กลูตามีนในการเจริญของ



รูปที่ 9 ลักษณะการเจริญเติบโต แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน และ การใช้กลูโคสของ (ก) Klebsiella pneumoniae M5a1 (ข) P2 (ค) P4 (ง) P7 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ซึ่งเสริมด้วยกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ และปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน บ่มที่ 30°ซ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

—○—○— หมายถึง การเจริญเติบโตของเชื้อ

—□—□— หมายถึง การใช้กลูโคสของเชื้อ

·●----●----● หมายถึง แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนของเชื้อ

เซล และสารต้นตอคาร์บอนทั้งหมดที่ถูกใช้ไป จะนำไปใช้ในการเจริญตัวของเซลโดยอาศัยขบวนการตรึงไนโตรเจนอย่างเดียว จึงได้ทำการทดลองหารูปแบบของการเจริญเติบโต แอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีน และการใช้กลูโคสของเซล ในอาหารที่ปราศจากสารต้นตอไนโตรเจน และบ่มไว้ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 9 พบว่า partial nif มิวแตนท์ทั้งสาม จะใช้กลูโคสด้วยอัตราที่ช้ากว่าwild type ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการเจริญเติบโต กล่าวคือ partial nif มิวแตนท์ จะมีระยะ lag phase ยาวกว่า wild type ที่น่าสังเกต คือ การใช้กลูโคสของ wild type , P4 และ P7 จะสอดคล้องกันกับการเจริญเติบโตของเซล ซึ่งต่างจาก P2 ที่สามารถเจริญได้น้อยกว่า เมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคสที่ใช้ไป

เมื่อพิจารณาถึงแอคติวิตี้ของการรีดิวส์อะเซทีลีน พบว่า P4 มีแอคติวิตี้ที่จุดกึ่งกลางการแบ่งตัว ต่ำที่สุด คือ 2.1 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ถัดต่อมา คือ P7 ซึ่งมีค่า 3.2 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง แต่ทั้งสองสายพันธุ์ ก็เจริญเติบโตได้อย่างดี คือ ให้ความขุ่นสูงสุด ได้ถึง 0.40 หน่วย $O.D._{420}$ ซึ่งเท่าเทียมกับ wild typeขณะที่ P2 แม้จะมีแอคติวิตี้การรีดิวส์อะเซทีลีนค่อนข้างสูง คือ 4.6 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง แต่ความขุ่นสูงสุด กลับมีค่าต่ำ คือ เพียง 0.26 หน่วย $O.D._{420}$ เท่านั้น

เพื่อแน่ใจว่า การใช้กลูโคส และ ความขุ่นของ partial nif มิวแตนท์ และ wild type มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย จึงได้ทำการทดสอบโดยการวิเคราะห์วาเรียนซ์แบบแจงหลายทาง (จรัล จันทลักขณา 2519) ได้ผลแสดงในตารางที่ 11 พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ในทุกทิศทางของการทดลอง กล่าวคือ รูปแบบของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อแต่ละตัวมีความต่างกัน โดยให้ค่า F-value สูงถึง 14.86 นอกจากนั้น ยังพบความแตกต่างของการใช้กลูโคสของเชื้อแต่ละตัวในแต่ละช่วงเวลาที่บ่มเชื้อด้วย

ตารางที่ 11 การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อระหว่าง partial nif มิวแตนท์ (P2 , P4 , P7) และ Klebsiella pneumoniae M5a1 โดยวิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์แบบแจงหลายทาง

ความแตกต่างของการใช้กลูโคส ต่อความขุ่นของเชื้อ	degree of freedom	F-value	F-table	การแปรผล
ทดสอบระหว่างข้อมูลทั้งหมด	23	6.11	2.29	มีนัยสำคัญ
ทดสอบระหว่างเชื้อแต่ละตัว	3	14.86	3.29	มีนัยสำคัญ
ทดสอบระหว่างการใช้กลูโคสแต่ละช่วงเวลา	5	16.21	2.90	มีนัยสำคัญ
ความคลาดเคลื่อน	15	-	-	-

การทดสอบนี้ ให้ค่าการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อ ($O.D._{420}$) ที่เวลาต่าง ๆ กัน เป็นจำนวน replicate ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6 และจำนวนเชื้อที่ทดสอบเป็นจำนวน treatment ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4 ค่า F-value ที่ได้จากการทดลองมีมากกว่าค่าการกระจายของ F ที่เปิดจากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ และ degree of freedom ของความคลาดเคลื่อน = 15 แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)

เพื่อที่จะบอกได้ว่า ความแตกต่างซึ่งทดสอบพบในตารางที่ 11 นั้น เชื้อคู่ใดบ้างที่ต่างกัน และคู่ใดที่ไม่ต่างกัน จึงได้ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range test ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 เห็นได้ว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เฉพาะการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อ ระหว่าง P2 กับเชื้อตัวอื่น ๆ ได้แก่ wild type , P4 , และ P7 ซึ่งชี้บ่งว่า มีความผิดปรกติอย่างหนึ่งอย่างใด เกิดขึ้นกับการใช้กลูโคสในขบวนการตรึงไนโตรเจนของ P2 สำหรับ P4 และ P7 ไม่พบความแตกต่าง เมื่อเทียบกับ wild type

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อ ระหว่าง partial nif มิวแตนท์ และ Klebsiella pneumoniae M5a1 โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test

ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการใช้กลูโคสต่อความขุ่นของเชื้อ	1 ค่าความแตกต่างจากการคำนวณ	2 Significant Studentized Range จากตาราง $S_{\bar{x}}$	3 แปรผล
ระหว่าง M5a1 และ P2	4443	1903	มีนัยสำคัญ
ระหว่าง M5a1 และ P4	531	1903	ไม่มีนัยสำคัญ
ระหว่าง M5a1 และ P7	660	1998	ไม่มีนัยสำคัญ
ระหว่าง P2 และ P4	4974	1998	มีนัยสำคัญ
ระหว่าง P2 และ P7	5103	2055	มีนัยสำคัญ
ระหว่าง P4 และ P7	129	1903	ไม่มีนัยสำคัญ

ค่า Significant Studentized Range (SSR) จากตาราง ใช้ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ถ้าค่าความแตกต่างที่คำนวณได้ มีค่ามากกว่า SSR จากตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และถ้าน้อยกว่า แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดูวิธีการคำนวณในภาคผนวก)