บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุพันธุ์พืช

ผลลำไยพันธุ์ดอจากสวนเกษตรกร อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ที่เก็บเกี่ยวในระยะแก่ทางการค้าชั้นมาตรฐาน A บรรจุใส่กล่องกระดาษกล่องละ 10 กิโลกรัม แล้วขนส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งใช้เวลาตั้งแต่เริ่มเก็บเกี่ยวจนถึงเริ่มทดลองประมาณ 7 ชั่วโมง นำผลลำไยพันธุ์ดอมาคัดเลือกผลที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน ไม่มีตำหนิ ไม่มีรอยแมลงกัด และไม่เน่าเสีย นำผลลำไยทั้งหมดมาตัดก้านออกเหลือประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักและแบ่งกลุ่มตามแผนการทดลอง

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิสูงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและรูปแบบของแถบโปรตีนที่เปลือกของผลลำไย

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2X6 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์มี 3 ซ้ำแต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 0.5 กิโลกรัม ปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความร้อน 2 ระดับคือ 40 $\pm$1 และ 50 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ได้รับความร้อน คือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

วิธีการ นำผลลำไยมาแช่น้ำที่มีอุณหภูมิ 40 $\pm$1 และ 50 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที โดยแช่ผลลำไยน้ำหนัก 2 กิโลกรัม ในน้ำ 6 ลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (total soluble protein) จากเปลือกลำไยโดยวิธี dye binding (Caprette, 1997) และรูปแบบของโปรตีน (protein patterns) โดยวิธี polyacrylamide slap gel electrophoresis (Copeland, 1993) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 การสกัดโปรตีนจากเปลือกผลลำไย

3.2.1.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 6.05 กรัม นำมาละลายในน้ำประมาณ 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตรโดยการเติมน้ำกลั่น

ข. สารละลาย extraction buffer ชั่ง SDS (BIO-RAD) มา 1.5 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 ประมาณ 30 มิลลิลิตร เติม 2-mercaptoethanol (BIO-RAD) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5

3.2.1.2 วิธีสกัดโปรตีนจากเปลือกผลลำไย ชั่งเปลือกผลลำไยสดตัวอย่างละ 3 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งที่แช่เย็นค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส โดยบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม extraction buffer (SDS 1.5% (W/V) ที่มี 2-mercaptoethanol 10% (W/V) และ 0.5 M Tris-HCl buffer pH 7.5) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที ปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที รินเอาเฉพาะส่วนที่ใสเก็บไว้ใน micro centrifuge แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป สารที่สกัดได้จากเปลือกผลลำไยเรียกว่า สารสกัดหยาบ

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี dye binding

3.2.2.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS)

- สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ชั่งโซเดียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (Merck) น้ำหนัก 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ชั่งไดโซเดียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Merck) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 นำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตรมาปรับพีเอชด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ลงในสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พร้อมกับคนสารละลายผสมตลอดเวลาจนพีเอชของสารละลายผสมเท่ากับ 7.5

- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (Merck) น้ำหนัก 11.7467 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS) นำสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 มา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

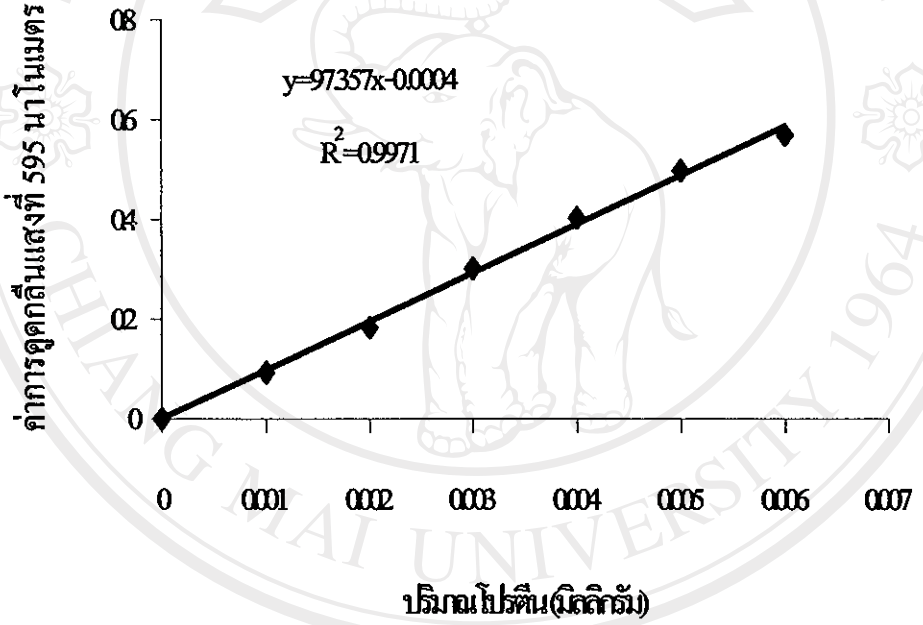
ข. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ชั่งโปรตีน bovine serum albumin (BSA ; Fluka) มา 0.2500 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร โดยการเติมสารละลาย PBS จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. สารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ชั่ง coomassie brilliant blue G-250 (BIO-RAD) น้ำหนัก 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอล 99% (Merck) ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% (Merck) ลงไป 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ที่มีความเข้มข้น 0.05% ในเอทานอล 5% และกรดฟอสฟอริก 10%

3.2.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS) ลงในหลอดแต่ละหลอดโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง (ภาพที่ 5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (สารสกัดหยาบ) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS) ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 5 กราฟโปรตีนมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การหารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3.2.3.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลาย SDS 10% ชั่ง SDS (BIO-RAD) มา 1.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข. สารละลาย acrylamide 30% ที่มี bis 0.8% ชั่ง acrylamide (Pharmacia Biotech) น้ำหนัก 30.00 กรัม และ N,N'-methylene-bis-acrylamide (Fluka) น้ำหนัก 0.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ค. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ พีเอช 8.8 ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 22.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตรปรับพีเอชให้เป็น 8.8 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ง. สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.8 ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 7.57 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตรปรับพีเอชให้เป็น 6.8 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

จ. สารละลาย electrode buffer (Tris 0.0083 M-glycine 0.192 M, pH 8.3 ที่มี SDS 0.1%) ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 4.02 กรัม ไกลซีน (BIO-RAD) 57.76 กรัม และ SDS (BIO-RAD) 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 3.5 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 8.3 โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 4.0 ลิตร โดยน้ำกลั่น

ฉ. สารละลาย ammonium persulphate 1.0% ชั่ง ammonium persulphate (BIO-RAD) น้ำหนัก 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้)

ช. สารละลาย sample buffer ชั่ง bromophenol blue (BIO-RAD) น้ำหนัก 0.0125 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติม glycerol (Merck) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม SDS (BIO-RAD) 1 กรัม ค่อยๆ คนจน SDS ละลายหมด เติม 2-mercaptoethanol (BIO-RAD) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range ; BIO-RAD) ปริมาตร 50.00 ไมโครลิตรเติม sample buffer ลงไป 950.00 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นโปรตีนชนิดละ 0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ฌ. สารละลายตัวอย่าง ผสมสารละลายตัวอย่างกับ sample buffer ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และเติมซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปนำสารละลายตัวอย่างไปต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที แล้วตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ญ. สารละลายสีย้อม (coomassie brilliant blue R-250 0.1% ที่มี methanol 50% และ acetic acid 10%) ชั่ง coomassie brilliant blue R-250 (BIO-RAD) 1.00 กรัม ละลายใน methanol (Advance Industries) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Merck) จำนวน 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนสีละลายหมดปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกประมาณ 2-3 ครั้ง

ฎ. สารละลาย destainner (methanol 25% ที่มี acetic acid 7%) ตวง methanol (Advance Industries) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Merck) ลงไป 140 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 2.0 ลิตรสารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำสารละลายที่ล้างครั้งหลังๆ กลับมาใช้ได้อีก

3.2.3.2 การเตรียมเจล

ก. การเตรียม 10% separating gel ผสมสารต่างๆ ดังนี้

Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ พีเอช 8.8	15.00	มิลลิลิตร
acrylamide 30% ที่มี bis 0.8%	10.00	มิลลิลิตร
SDS 10%	0.30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.16	มิลลิลิตร
TEMED	0.04	มิลลิลิตร
ammonium persulphate 1.0%	1.50	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	30.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การเตรียม stacking gel ผสมสารต่างๆ ดังนี้

Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.8	10.00	มิลลิลิตร
acrylamide 30% ที่มี bis 0.8%	2.00	มิลลิลิตร
SDS 10%	0.20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.76	มิลลิลิตร
TEMED	0.04	มิลลิลิตร
ammonium persulphate 1.0%	1.00	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	มิลลิลิตร

3.2.3.3 การเตรียมเจลแผ่น

ประกอบแผ่นกระจกที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 แผ่นเข้าด้วยกัน โดยมี spacer คั่นระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองด้าน ยึดกระจกทั้งสองด้านเข้าด้วยกันให้แน่น แล้วนำไปประกอบเข้ากับส่วนที่เป็นฐานรอง ใช้สกรูยึดส่วนกระจกกับฐานรองให้แน่น (ภาพที่ 6) ผสมสารละลาย separating gel เข้าด้วยกันแล้วค่อยๆ ใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกด้วยหลอดหยดจนได้ความสูง 11 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปปิดผิวหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาพอลีเมอไรเซชันที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที (ภาพที่ 7) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เทน้ำที่ปิดผิวหน้าเจลทิ้งไป แล้วเติมสารละลาย stacking gel ที่เตรียมไว้ลงบนหน้าเจลที่ได้ให้เกือบเต็มช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก เสียบแผ่นหวีตามทันทีเพื่อให้เกิดช่องว่างไว้ใส่สารละลายตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นหวีออก คลายสกรูที่ยึดระหว่างกระจกและฐานรองออก แล้วประกอบกระจกเข้ากับ chamber ส่วนบน ใช้สกรูยึดให้แน่น แล้วนำไปใส่ลงใน chamber ส่วนล่าง ที่มี electrode buffer อยู่ประมาณครึ่งหนึ่ง เท electrode buffer ลงใน chamber ส่วนบนจนท่วมเส้นลวด

3.2.3.4 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใช้ micro syringe ดูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมเท่ากันหมดในแต่ละกรรมวิธี หยอดลงในช่องว่างบน stacking gel โดยหยดผ่าน buffer ลงในช่องเจล ส่วนด้านข้างระหว่างช่องเจลของตัวอย่างได้เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงไปด้วยทั้ง 2 ด้าน (ภาพที่ 8) ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber ด้านซ้ายและด้านขวา เปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแส 20 มิลลิแอมแปร์ต่อช่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 50 มิลลิแอมแปร์ต่อช่อง จนกระทั่งสีของ bromophenol blue วิ่งลงมาห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตรซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ภาพที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9) นำแผ่นกระจกออกจาก chamber วัดระยะห่างระหว่างขอบเจลกับ bromophenol blue ทำเครื่องหมายโดยตัดขอบเจลด้านบนเพื่อเป็นสัญลักษณ์ให้ทราบว่าตัวอย่างเริ่มต้นที่ใด ค่อยๆแกะเจลออกจากแผ่นกระจก นำเจลมาวางในกล่องพลาสติกที่มีสารละลายสีย้อมโปรตีน

3.2.3.5 การย้อมสีโปรตีนโดยวิธี coomassie brilliant blue R-250

เทสารละลายสีย้อมลงไปให้ท่วมแผ่นเจลในกล่องพลาสติก นำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) นาน 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนสารละลายในกล่องพลาสติกเป็นสารละลาย destainner เพื่อล้างสีย้อมที่ไม่จับกับโปรตีนออก เปลี่ยนสารละลาย destainner บ่อยๆ จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน วัดระยะทางที่โปรตีนแต่ละแถบเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับความยาวเจลที่ bromophenol blue เคลื่อนที่ เพื่อคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_m)

3.2.3.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

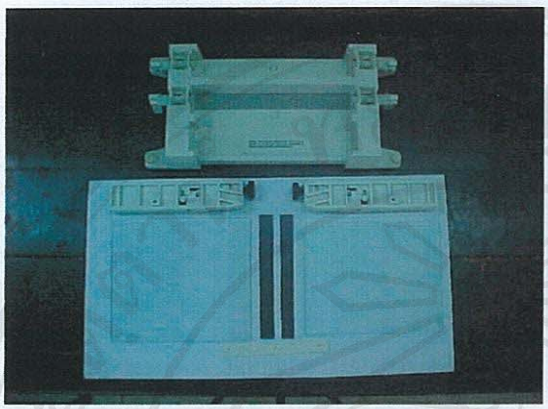
วัดการเคลื่อนที่ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน ดังแสดงในตารางที่ 3 จากการเคลื่อนที่ไปใน separating gel แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด จากสมการ

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ หรือ (relative mobility, } R_m\text{)} = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนแต่ละแถบเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ bromophenol blue เคลื่อนที่}}$$

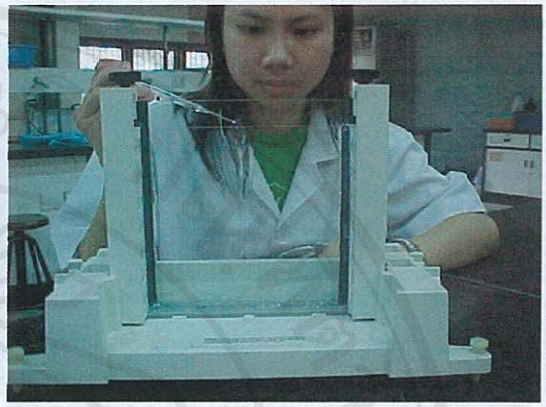
นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_m) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดมาเขียนกราฟกับค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 10) จากนั้นนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบโปรตีนจากเปลือกผลลำไยไปอ่านค่าเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละแถบจากกราฟมาตรฐาน

นำแผ่นเจลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนไปถ่ายภาพและวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้เครื่อง Gel Document ของบริษัท Adivision of Synoptic Ltd., U.S.A. (ภาพที่ 11) ที่วิเคราะห์โดยวิธี lowest slope กำหนดความกว้างของ peak ต่ำสุดเท่ากับ 2 พิกเซล ความสูงของ peak ต่ำสุด เท่ากับ 1.9 พิกเซล volume ของ peak ต่ำสุดเท่ากับ 1% และความสูงของ filter ระบบ savisky-golay filter ต่ำสุดเท่ากับ 3 พิกเซลตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 ชุดอุปกรณ์การเตรียมเจลแผ่น

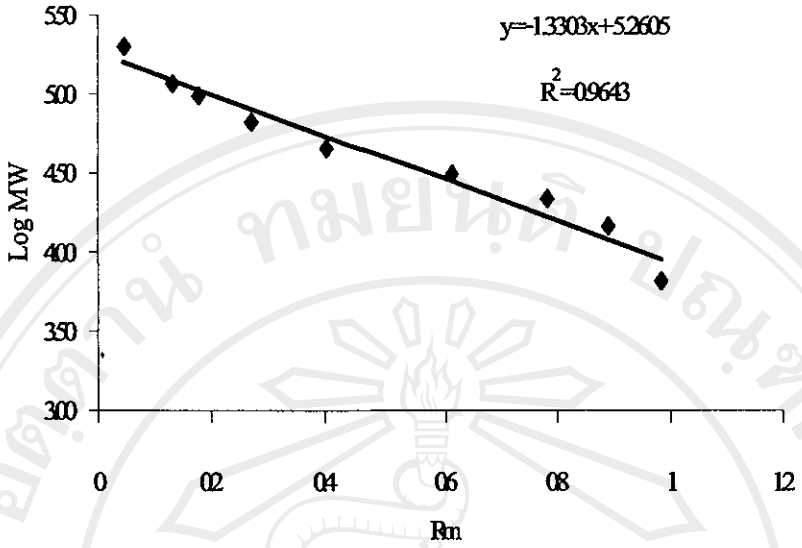


ภาพที่ 7 การเตรียมเจลแผ่น

ภาพที่ 8 การหยอดสารละลายตัวอย่าง

ภาพที่ 9 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 10 กราฟความสัมพันธ์ของค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_m

ตารางที่ 3 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานสำหรับ SDS-PAGE

ชนิดของโปรตีน	แหล่งที่มา	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)
Myosin	Rabbit skeletal muscle	200,000
β-galactosidase	*E. coli*	116,250
Phosphorylase b	Rabbit muscle	97,400
Serum albumin	Bovine serum	66,200
Ovalbumin	Hen egg white	45,000
Carbonic anhydrase	Bovine	31,000
Trypsin inhibitor	Soybean	21,500
Lysozyme	Hen egg white	14,400
Aprotinin	Bovine pancreatic	6,500

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 11 เครื่อง Gel Document ของบริษัท Adivision of Synoptic Ltd., U.S.A.

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิสูงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและรูปแบบของแถบโปรตีนที่เปลือกของผลลำไยระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจนเกิดอาการสะท้านหนาว

เลือกผลการทดลองที่ให้ผลของปริมาณโปรตีนทั้งหมดและรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างไปจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน (หรือเปลี่ยนแปลงไป) จากผลการทดลองที่ 1 มาทำซ้ำที่อุณหภูมิสูงและเวลาที่ได้ผลดี นำผลลำไยมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสโดยการบรรจุผลลำไยในกล่องกระดาษขนาดกว้าง × ยาว × สูง เท่ากับ 29 × 41.80 × 9 เซนติเมตรที่เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตรจำนวน 4 รูทางด้านข้างของกล่องด้านละ 2 รู บรรจุผลลำไย 3 กิโลกรัมต่อกล่องสุ่มตัวอย่างออกมาทุก 2 วัน ซึ่งแต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 0.5 กิโลกรัมจนหมดอายุการเก็บรักษา เพื่อวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีต่าง ๆ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) จากเปลือกผลลำไยโดยวิธี dye binding (Caprette, 1997) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.5 วิเคราะห์หารูปแบบของโปรตีน (protein patterns) โดยวิธี polyacrylamide slap gel electrophoresis (Copeland, 1993) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2.6 การวัดสีเปลือกด้านนอกและด้านในของผลลำไย

วัดสีเปลือกด้านนอกและด้านในของผลลำไยระหว่างการเก็บรักษา โดยใช้เครื่อง Chromameter รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta ซึ่งค่าที่วัดได้เป็นค่า L*, a* และ b* ดังนี้

ค่า L* แสดงความสว่างเมื่อมีค่าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าใกล้ 0

ค่า a* ที่เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีแดง ค่า a* ที่เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีเขียว

ค่า b*ที่เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีเหลือง และที่เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีน้ำเงิน

โดยการวัดสีเปลือกด้านนอกและด้านในด้านละ 1 ครั้งต่อผล จำนวน 10 ผลต่อซ้ำ คำนวณหาค่า chroma (C*) และ hue angle (H°) จากสมการ ดังนี้ (McGuire, 1992)

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$H^\circ = \text{arctangent}\ (b^*/a^*)$$

3.2.7 การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักของผลลำไยก่อนและหลังการเก็บรักษา จำนวน 3 ซ้ำแต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 0.5 กิโลกรัม โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด รุ่น BA3100P ของบริษัท Sartorius จากนั้นนำมาคำนวณหาการสูญเสียน้ำหนัก ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ตามสูตร

$$A = \frac{(B - C) \times 100}{B}$$

โดยที่ A คือ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

B คือ น้ำหนักเริ่มต้นของผลลำไย

C คือ น้ำหนักสุดท้ายของผลลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.8 การรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ออกจากเปลือกผลลำไย

3.2.8.1 การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ชั่งแมนนิทอล น้ำหนัก 72.86 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วย น้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

3.2.8.2 การวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์

เจาะเปลือกผลลำไยด้วยเครื่องมือเจาะ (cork borrer) หัวกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตรจำนวน 15 ชิ้นต่อซ้ำ นำไปล้างด้วยน้ำกลั่น deionized และซับด้วยกระดาษทิชชูเบาๆให้แห้ง แช่ตัวอย่างเปลือกผลลำไยในสารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายมาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ โดยเครื่อง Conductivity meter ของ Hanna รุ่น HI8819N และนำตัวอย่างเดิมไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ทั้งหมดอีกครั้ง แล้วคำนวณหาค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ต่อปริมาณอิเล็กโตรไลต์ทั้งหมดซึ่งคำนวณได้ตามสูตร (McCollum and McDonald, 1991)

$$A = \frac{B}{C} \times 100$$

โดยที่ A คือ เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์
B คือ ค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ที่รั่วไหลออกมาจากตัวอย่าง
C คือ ค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ทั้งหมดในตัวอย่าง

3.2.9 ลักษณะปรากฏของอาการสะท้านหนาว

โดยใช้ระบบการให้คะแนน 5 ระดับ คือ

1 = ไม่มีอาการ
2 = มีอาการเล็กน้อย น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์
3 = มีอาการปานกลาง ตั้งแต่ 5-25 เปอร์เซ็นต์
4 = มีอาการรุนแรง ตั้งแต่ 25-50 เปอร์เซ็นต์
5 = มีอาการรุนแรงมาก มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Chaplin *et al.*, 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองสมบัติทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 6.0

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการพืชสวน ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved