บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุพืช ผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ ที่เก็บเกี่ยวในระยะแก่ทางการค้า ผลมีสีเขียว มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 250 - 280 กรัม ซื้อมาจากสวนเกษตรกร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ปลิดขั้วผลปล่อยให้ยางที่ขั้วไหลออกจนหมด เลือกเอาเฉพาะผลที่มีความแก่ คือจมในน้ำเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์ (จริงแท้, 2542) หลังจากนั้นล้างทำความสะอาดและผึ่งให้ผิวผลแห้ง แล้วคัดเอาเฉพาะผลที่มีความสม่ำเสมอในด้านรูปร่างและขนาดมาทำการศึกษาวิจัย

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของชนิดถุงพลาสติกที่ใช้ในการบรรจุและอุณหภูมิที่เก็บรักษาต่ออาการสะท้านหนาวของผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ 2×3 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 2 ผล ปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 คือชนิดของถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่ใช้ในการบรรจุผลมะม่วง 2 ชนิดคือ ชนิดความหนาแน่นสูง (High Density Polyethylene, HDPE) และชนิดความหนาแน่นต่ำ (Low Density Polyethylene, LDPE) ขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 15.24 × 22.86 เซนติเมตร ของบริษัท Krantadavin

ปัจจัยที่ 2 คือระดับอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา 2 ระดับ คือ 1±1 และ 5±1 องศาเซลเซียส

นำมะม่วงบรรจุในถุงทั้ง 2 ชนิด แล้วนำไปแยกเก็บรักษาในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 1±1 และ 5 ±1 องศาเซลเซียส โดยวางในตะกร้าพลาสติก บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 5 วัน ดังนี้

1. การสูญเสียน้ำหนัก (% weight loss)

ชั่งน้ำหนักของผลมะม่วง โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด รุ่น BA3100P ของบริษัท Sartorius จากนั้นนำมาคำนวณหาการสูญเสียน้ำหนัก ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ตามสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

โดยที่ A คือ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

B คือ น้ำหนักเริ่มต้นของผลมะม่วง

C คือ น้ำหนักสุดท้ายของผลมะม่วง

2. การรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์

สารเคมีที่ใช้

- *สารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์* เตรียมโดยชั่งแมนนิทอล (mannitol, Merck) มา 72.86 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

2.1 ปอกเปลือกผลมะม่วงให้มีความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตรด้วยมีดปอกผลไม้ เจาะเนื้อส่วนเปลือกที่ปอกด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร นำเนื้อเยื่อที่เจาะแล้วจำนวน 7 ชิ้น (น้ำหนักประมาณ 1.5 กรัม) ล้างด้วยน้ำกลั่น และน้ำที่ปราศจากอิออน (deionized water) แล้วนำมาแช่ในสารละลายแมนนิทอลที่เตรียมไว้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ที่รั่วไหลออกมาจากเซลล์ โดยใช้เครื่อง conductivity meter ของบริษัท Hanna รุ่น HI 8819 N

2.2 นำตัวอย่างในสารละลายแมนนิทอลเดิมไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดความดัน (autoclave) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ปล่อยไว้ให้เย็นก่อนนำไปวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ทั้งหมดที่อยู่ภายในเซลล์อีกครั้ง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ตามสูตร (McCollum and McDonald, 1991)

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

โดยที่ A คือ เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์

B คือ ค่า การนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ที่รั่วไหลออกมา

C คือ ค่า การนำไฟฟ้าของสารอิเล็กโตรไลต์ทั้งหมดภายในเซลล์

ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้เครื่อง Hand Refractometer รุ่น N1E ของบริษัท ATAGO (0-32 องศาบริกซ์) โดยนำผลมะม่วงมาปั่นแยกน้ำแยกเนื้อ ด้วยเครื่องสกัดน้ำผลไม้ของบริษัท Moulinex รุ่น 753 หยดน้ำมะม่วงลงบนแผ่นปริซึมของเครื่องมือแล้วอ่านค่าที่ได้ (วัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำแล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย)

4. ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรตได้

สารเคมีที่ใช้

- *สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล* เตรียมโดยชั่งสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, Merck) มา 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

วิธีการ

นำผลมะม่วงมาปั่นแยกน้ำแยกเนื้อ โดยใช้เครื่องสกัดน้ำผลไม้ของบริษัท Moulinex รุ่น 753 แล้วชั่งของเหลวที่ปั่นได้น้ำหนัก 25 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.2 โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท SCHOTT รุ่น CG 842 วัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำแล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ในการคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรตได้ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรดังนี้ (AOAC, 2000)

$$\% \text{ กรดทั้งหมดที่ไตเตรตได้} = \frac{\text{normality of NaOH} \times \text{equi wt. of acid} \times \text{vol. NaOH} \times 100}{\text{wt. of sample use}}$$

normality of NaOH เท่ากับ 0.1 N

equivalence weight of acid คือ น้ำหนักกรัมสมมูลของกรดซิตริก เท่ากับ 0.070

5. การเปลี่ยนแปลงสีผิว

การเปลี่ยนแปลงสีผิวภายนอกของผลมะม่วง วัดโดยใช้เครื่อง Chromameter รุ่น CR- 300 ของบริษัท Minolta หัววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* แล้วคำนวณหาค่า chroma และ hue angle (H°)

ค่า L* แสดงความสว่างเมื่อมีค่าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าใกล้ 0

ค่า a* ที่เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีแดง ค่า a* ที่เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีเขียว

ค่า b* ที่เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีเหลืองและที่เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีน้ำเงิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความเข้มของสีจากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

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

ถ้ามีค่าเข้าใกล้ศูนย์แสดงว่าวัตถุมีสีซีดจาง (เทา) ถ้ามีค่าสูงเข้าใกล้ 60 แสดงว่าวัตถุมีสีเข้ม

ค่า hue angle (H°) ที่เป็นค่าแสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

$$THETA = (\text{arctangent } (b^*/a^*) / 6.2832) \times 360$$

ถ้า $a > 0$ และ $b > 0$; ค่า H° = THETA ถ้า $a < 0$ และ $b > 0$; ค่า $H^{\circ} = 180 + THETA$

ถ้า $a < 0$ และ $b < 0$; ค่า $H^{\circ} = 270 + THETA$ ถ้า $a > 0$ และ $b < 0$; ค่า $H^{\circ} = 360 + THETA$

ค่า H° เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

$0^{\circ} - 45^{\circ}$ แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง $180^{\circ} - 225^{\circ}$ แสดงสีเขียวแดงถึงสีน้ำเงินเขียว

$45^{\circ} - 90^{\circ}$ แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง $225^{\circ} - 270^{\circ}$ แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน

$90^{\circ} - 135^{\circ}$ แสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว $270^{\circ} - 315^{\circ}$ แสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง

$135^{\circ} - 180^{\circ}$ แสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว $315^{\circ} - 360^{\circ}$ แสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

6. ลักษณะปรากฏของอาการสะท้านหนาว

โดยใช้ระบบการให้คะแนน 5 ระดับ คือ

1 = ไม่มีอาการ

2 = มีอาการเล็กน้อย ตั้งแต่ 1 - 25 เปอร์เซ็นต์

3 = มีอาการปานกลาง ตั้งแต่ 26 - 50 เปอร์เซ็นต์

4 = มีอาการรุนแรง ตั้งแต่ 51 - 75 เปอร์เซ็นต์

5 = มีอาการรุนแรงมากตั้งแต่ 76 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Chaplin *et al.* 1986)

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิสูงในรูปน้ำร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและรูปแบบของโปรตีนในเนื้อมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ 2×5 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ผล ปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับอุณหภูมิของน้ำที่ใช้แช่ผลมะม่วง คือ 40±1 และ 45±1 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ใช้แช่ผลมะม่วงคือ 0, 30, 45, 60 และ 75 นาที

นำผลมะม่วงมาแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 40±1 และ 45±1 องศาเซลเซียสใน water bath เป็นเวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที ตามลำดับ (การเปลี่ยนแปลงระดับอุณหภูมิภายในผลมะม่วงแสดงดัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพผนวกที่ 1) จุ่มผลมะม่วงในน้ำเย็นทันทีหลังจากแช่ในน้ำร้อนเพื่อลดอุณหภูมิ ผึ่งผลมะม่วงให้ผิวนอกแห้ง นำผลมะม่วงบรรจุในกล่องกระดาษขนาด กว้างXยาวXสูง เท่ากับ 29.5X50X9 เซนติเมตร ที่มีการเจาะรูด้านข้าง แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-75 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างผลมะม่วงออกมาทุก 4 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี dye binding (Caprette, 1997) และวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยวิธี Polyacrylamide slap gel electrophoresis (Copeland, 1993) รวมทั้งวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

1. การสกัดโปรตีนจากเนื้อมะม่วง

1.1 การเตรียมสารละลาย

1.1.1 สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5

ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) มา 6.05 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรโดยการเติมน้ำกลั่น

1.1.2 สารละลาย extraction buffer

ชั่ง SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, BIO-RAD) มา 1.50 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ประมาณ 30 มิลลิลิตร เติม 2-mercaptoethanol (BIO-RAD) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ (สาร ก.)

1.2 วิธีสกัดโปรตีนจากเนื้อมะม่วง

ชั่งเนื้อมะม่วงตัวอย่างละ 3 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งที่แช่เย็นค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม extraction buffer (SDS 1.5% (W/V) ที่มี 2-mercaptoethanol 10% (W/V) และ Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที ปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge, Kubota รุ่น 6930) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ปิเปตเอาเฉพาะส่วนที่ใสเก็บไว้ในหลอด micro centrifuge แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป สารที่สกัดได้จากเนื้อมะม่วงนี้เรียกว่า สารสกัดหยาบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding

2.1 การเตรียมสารละลาย

2.1.1. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ Phosphate Buffer Saline (PBS)

ก. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (Merck) น้ำหนัก 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Merck) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เตรียมโดย นำสารละลาย ก. 100 มิลลิลิตรมาปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลาย ข. โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย ข. ลงในสารละลาย ก. พร้อมกับคนสารละลายผสมตลอดเวลาจนความเป็นกรด-ด่างของสารละลายผสมเท่ากับ 7.5

ง. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ (Merck) น้ำหนัก 11.7467 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

จ. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS) เตรียมโดยนำสารละลายบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 (สาร ค.) มา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ (สาร ง.) ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.1.2. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ชั่งโปรตีน BSA (Bovine Serum Albumin, Fluka) มา 0.2500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร โดยการเติมสารละลาย PBS จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

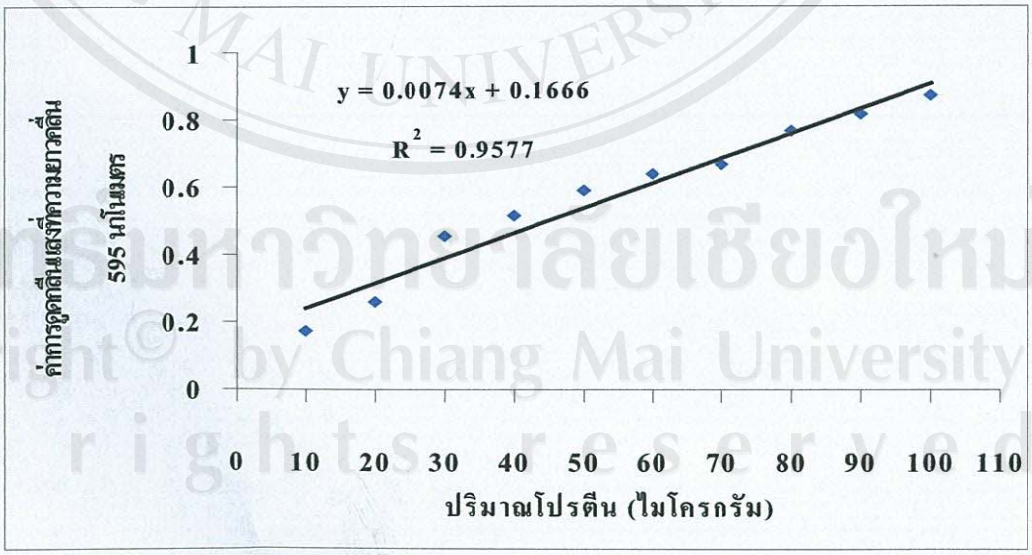
2.1.3. สารละลาย coomassie brilliant blue G-250

ชั่ง coomassie brilliant blue G-250 (BIO-RAD) น้ำหนัก 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดฟอสฟอริก (Merck) ความเข้มข้น 85% ลงไป 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ความเข้มข้น 0.05% ในเอทานอล 5% และกรดฟอสฟอริก 10%

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปีเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม สารละลาย PBS ลงในหลอดแต่ละหลอดโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer รุ่น SPECTRO 22 ของบริษัท Labo Med, Inc. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กราฟโปรตีนมาตรฐาน สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (สารสกัดหยาบ) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติม สารละลาย PBS ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน

3. การหารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลาย SDS 10% เตรียมโดยชั่ง SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, BIO-RAD) มา 1.00 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.1.2 สารละลาย Acrylamide 30% ที่มี bis 0.8% เตรียมโดยชั่ง acrylamide (Pharmacia Biotech) น้ำหนัก 30.00 กรัม และ N,N'-methylene-bis-acrylamide (Fluka) น้ำหนัก 0.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.3 สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 8.8 เตรียมโดยชั่ง Tris (hydroxymethyi) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 22.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตรปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.8 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.4 สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เตรียมโดยชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 7.57 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.5 สารละลาย Electrode buffer (Tris 0.0083 M glycine 0.192 M, pH 8.3 ที่มี SDS 0.1%) เตรียมโดยชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 4.02 กรัม ไกลซีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Merck) 57.76 กรัม และ SDS 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 3.5 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 8.3 โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 4 ลิตร

3.1.6 สารละลาย Ammonium persulphate 1.0 % เตรียมโดยชั่ง ammonium persulphate (BIO-RAD) น้ำหนัก 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้)

3.1.7 สารละลาย Sample buffer เตรียมโดยชั่ง bromophenol blue (BIO-RAD) 0.0125 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติม กลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม SDS 1 กรัม ค่อย ๆ คนจน SDS ละลายหมด เติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.1.8 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range, BIO-RAD) ปริมาตร 50.00 ไมโครลิตร เติม sample buffer ลงไป 950.00 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 5 นาที ได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละชนิด 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.1.9 สารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยผสมสารละลายตัวอย่างกับ sample buffer ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และเติมสารละลายน้ำตาลซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไป นำสารละลายตัวอย่างไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.1.10 สารละลายสีย้อม (Coomassie 0.1% ที่มี methanol 50% และ acetic acid 10%) เตรียมโดยชั่ง coomassic brilliant blue R-250 (BIO-RAD) 1.00 กรัม ละลายในเมทานอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Merck) 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนสีละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกประมาณ 2-3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.11 สารละลาย Destainner (methanol 25% ที่มี acetic acid 7%) เตรียมโดยตวง methanol ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Merck) ลงไป 140 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 2.0 ลิตร สารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำสารละลายที่ล้างครั้งหลัง ๆ กลับมาใช้ได้อีก

3.2 การเตรียมเจล

3.2.1 การเตรียม 10% Separating gel ผสมสารละลายชนิดต่าง ๆ ดังนี้

Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ pH 8.8	15.00	มิลลิลิตร
acrylamide 30% ที่มี bis 0.8%	10.00	มิลลิลิตร
SDS 10%	0.30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.16	มิลลิลิตร
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	0.04	มิลลิลิตร
ammonium persulphate 1.0%	1.50	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	30.00	มิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียม Stacking gel ผสมสารละลายชนิดต่าง ๆ ดังนี้

Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ pH 6.8	10.00	มิลลิลิตร
acrylamide 30% ที่มี bis 0.8%	2.00	มิลลิลิตร
SDS 10%	0.20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.76	มิลลิลิตร
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	0.04	มิลลิลิตร
ammonium persulphate 1.0%	1.00	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมแผ่นเจล

ประกอบแผ่นกระจก 2 แผ่นเข้าด้วยกัน โดยมีแผ่นกั้น (spacer) คั่นระหว่างแผ่นกระจก ยึดกระจกทั้งสองด้านเข้าด้วยกันให้แน่น แล้วนำไปประกอบเข้ากับส่วนที่เป็นฐานรอง ใช้สกรูยึดส่วนกระจกกับฐานรองให้แน่น ผสมสารละลาย separating gel เข้าด้วยกัน แล้วค่อย ๆ ใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกด้วยหลอดหยดจนได้ความสูง 11 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปปิดผิวหน้าเจล วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาพอลีเมอไรเซชัน (polymerization) ประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เทน้ำที่ปิดผิวหน้าเจลออกไป เตรียมสารละลาย stacking gel แล้วเติมลงบนผิวหน้าของ separating gel ให้เกือบเต็มช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก เสียบแผ่นหวีตามทันที เพื่อให้เกิดช่องว่างไว้ใส่สารละลายตัวอย่าง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นหวีออก ดึงสกรูที่ยึดระหว่างกระจกและฐานรองออก แล้วประกอบกระจกเข้ากับ chamber ส่วนบนใช้สกรูยึดให้แน่น แล้วนำไปใส่ลงใน chamber ส่วนล่าง ที่มี electrode buffer อยู่ประมาณครึ่งหนึ่ง เท electrode buffer ลงใน chamber ส่วนบนจนท่วมเส้นลวดที่เป็นตัวนำไฟฟ้า

3.4 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใช้ micro syringe ดูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 30 ไมโครกรัมเท่ากันหมดในแต่ละกรรมวิธี หยดลงในช่องว่างบน stacking gel ผ่าน buffer ลงในช่องเจลส่วนด้านข้างระหว่างช่องเจลของตัวอย่างได้เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงไปด้วยทั้ง 2 ด้าน ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส เปิดสวิทช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแส 20 มิลลิแอมแปร์ต่อช่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 50 มิลลิแอมแปร์ต่อช่อง จนกระทั่งแถบสีของ bromophenol blue เคลื่อนลงมาห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตรซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber ค่อย ๆ นำแผ่นเจลออกจากกระจก วัดระยะห่างระหว่างขอบเจลกับ bromophenol blue ทำเครื่องหมายโดยตัดขอบเจลด้านบนเพื่อเป็นสัญลักษณ์ให้ทราบว่าตัวอย่างเริ่มต้นที่ใด นำเจลมาวางในกล่องพลาสติกที่มีสารละลายสีย้อมโปรตีน

3.5 การย้อมสีโปรตีนโดยวิธี Coomassie brilliant blue R-250

เทสารละลายสีย้อมลงไปให้ท่วมแผ่นเจลในกล่องพลาสติก นำไปวางบนเครื่องเขย่า นาน 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนสารละลายในกล่องพลาสติกเป็นสารละลาย destainner เพื่อล้างสีย้อมที่ไม่จับกับโปรตีนออก เปลี่ยนสารละลาย destainner บ่อย ๆ จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน วัดระยะทางที่โปรตีนแต่ละแถบเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับความยาวเจลที่ bromophenol blue เคลื่อนที่ เพื่อคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility, R_m)

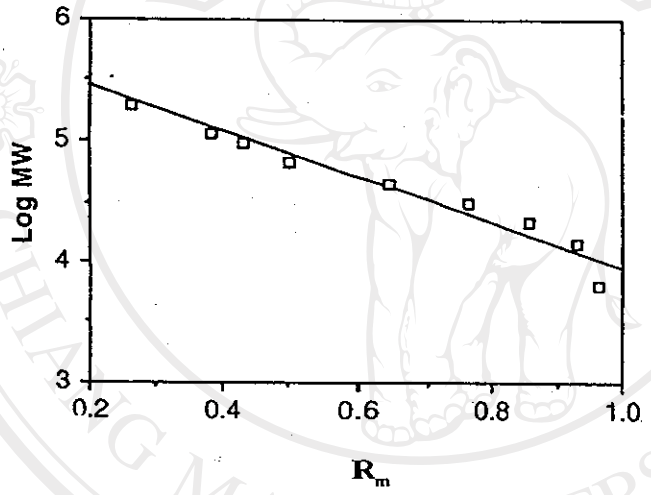
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

3.6.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนดังแสดงในตารางที่ 6 วัดระยะทางที่โปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดเคลื่อนที่ไปใน separating gel แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด จากสมการ

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

นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน (R_m) แต่ละชนิดมาเขียนกราฟกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนนั้น ๆ (ภาพที่ 4) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีน (R_m) จากเนื้อมะม่วงไปอ่านค่าหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_m

3.6.2 ถ่ายภาพและวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในแผ่นเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation and Analysis System ของบริษัท Synoptic Ltd., (U.S.A.) (ภาพที่ 5) ที่วิเคราะห์โดยกำหนดความกว้างของ peak ต่ำสุดเท่ากับ 7 พิกเซล ความสูงของ peak ต่ำสุดเท่ากับ 3 พิกเซล volume ของ peak ต่ำสุดเท่ากับ 1% และความสูงของ Filter ระบบ Savisky-Golay filter ต่ำสุดเท่ากับ 3 พิกเซล และเลือกใช้วิธีการแบบ Lowest slope ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 5 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation and Analysis System)

ตารางที่ 6 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานสำหรับ SDS-PAGE

ชื่อโปรตีน	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

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่แถบโปรตีนมาตรฐาน เคลื่อนที่กับความสูง peak และความสัมพันธ์ของค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐาน ที่วัดด้วยเครื่อง Gel Documentation and Analysis System แสดงดังภาพผนวกที่ 2 และ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ผลของอุณหภูมิสูงในรูปน้ำร้อนและการบรรจุในถุงพลาสติกต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และการเกิดอาการสะท้านหนาวในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

วิธีการ เลือกผลการทดลองที่มีผลของปริมาณโปรตีนทั้งหมดและรูปแบบของโปรตีนที่แตกต่างไปจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน (หรือเปลี่ยนไป) จากผลการทดลองที่ 2 มาทำซ้ำ โดยแช่ผลมะม่วงในน้ำร้อนที่ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณและรูปแบบของโปรตีนเปลี่ยนแปลงจากการทดลองที่ 2 จุ่มผลมะม่วงในน้ำเย็นทันทีหลังจากแช่ในน้ำร้อนเพื่อลดอุณหภูมิ ผึ่งผลมะม่วงให้ผิวนอกแห้ง นำผลมะม่วงบรรจุในถุงพลาสติกชนิดที่เกิดอาการสะท้านหนาวน้อยที่สุดจากการทดลองที่ 1 แล้วนำผลมะม่วงมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±5 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างผลมะม่วงออกมาทุก 4 วัน (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 2 ผล) เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลอง สมบัติทางกายภาพ และส่วนประกอบทางเคมี มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 6.0

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved