บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุ

1.1.1. พืชทดลอง

บัวที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเป็นบัวในกลุ่มอุบลชาติ ได้แก่ บัวสาย บัวผัน และบัวฝรั่ง รวม 10 พันธุ์ ได้แก่ Colorado, Maroon Beauty, บัวสายไทยสีขาว, ชมพูซีลอน, Dauben, Sir Galahad, Shiryl Bryne, บัวผันสีชมพู, นางกวัก และ จงกลนี โดยส่วนของพืชที่ใช้ในการทดลองคือ ใบที่เจริญเต็มที่ ใบอ่อน และดอกอ่อน และบัวที่ใช้ในการทดลองเพื่อจำแนกพันธุ์โดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์ เป็นบัวกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในการทดลองข้างต้น และบัวในกลุ่มอุบลชาติที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์ 6 ชนิด โดยส่วนที่ใช้ในการทดลองคือ ใบที่เจริญเต็มที่ และใบอ่อน

นำพันธุ์บัวทั้งหมดมาปลูกเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ บริเวณเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 1 ปีก่อนเริ่มทดลอง

1.1.2. สารเคมี

1.1.2.1. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer

- Tris -HCl
- EDTA.2Na
- $MgCl_2.6H_2O$
- PVP-40
- 2-mercaptoethanol
- Sucrose

1.1.2.2. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์ เจล

- Acrylamide
- Bisacrylamide
- Tris-HCl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Ammonium persulfate (APS)
- SDS
- TEMED (N,N,N',N' –tetramethyl ethylenediamine)
- Water-saturated 2-butanol

1.1.2.3. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ sample buffer

- Glycerol
- Bromophenol blue
- SDS

1.1.2.4. สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ running buffer

- Tris
- Glycine
- SDS

1.1.2.5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bradford method)

- NaCl
- Coomassie brilliant blue G-250
- Ethanol
- Phosphoric acid

1.1.2.6. สารเคมีที่ใช้เป็น staining solution (SDS-PAGE)

- Coomassie brilliant blue R-250
- Methanol
- Acetic acid

1.1.2.7. สารเคมีที่ใช้เป็น destaining solution (SDS-PAGE)

- Methanol
- Acetic acid

1.1.2.8. สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

- Tris
- β-naphthylacetate
- α-naphthylacetate
- O-Dianisidine
- 3-amino-9-ethylcarbazole

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- β-naphtol
- Acetone
- Hydrogen peroxide (H_2O_2)
- β - nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)
- β - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$)
- β - nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH)
- Nitro blue tetrazolium (NBT)
- Phenazine methosulfate (PMS)
- 3-(4, 5 - Dimethylthiazol-2-yl) (MTT)
- 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP)
- α -ketoglutaric acid
- L-malic acid
- Aspartic acid
- Shikimic acid
- L-glutamic acid
- Isocitric acid
- L-leucine β-naphthyl acid
- Calcium chloride ($CaCl_2$)
- Magnesium chloride ($MgCl_2$)
- Pyridoxal 5 – phosphate
- Fast Blue BB
- TEMED
- Riboflavin
- α-D glucose
- Sodium phosphate
- Sodium acetate
- Naphtol-AS BI phosphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2. อุปกรณ์

1.2.1. ชุดสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ vertical slab gel

1.2.2. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

1.2.3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

1.2.4. เครื่องทำความเย็น ตู้เย็น และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.2.5. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)

1.2.6. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2.7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

1.2.8. เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

1.2.9. โกร่งบดตัวอย่าง

1.2.10. ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ model pipetman

1.2.11. หลอดใส่สารขนาดเล็ก (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.2.12. หลอดทดลอง

1.2.13. orbital shaker

1.2.14. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น เครื่องแก้ว ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร หลอดฉีดยา ถาดพลาสติก แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กล้องถ่ายรูป ฯลฯ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด

1.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนโดย Bradford Method

1.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดโปรตีน

นำใบอ่อนและใบที่เจริญเต็มที่ของบัวแต่ละพันธุ์จากต้นบัวที่ปลูกเลี้ยงไว้ในสภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 1 ปี จำนวน 1 ซ้ำต่อพันธุ์ มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และสกัดด้วย extraction buffer สูตร 1 (ภาคผนวก 4)โดยใช้ตัวอย่างพืช 0.5 กรัม ต่อสารสกัด 1.5 มิลลิลิตร บดในโกร่งแช่เย็น จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แยกสารละลายใสด้านบนที่ได้ใส่ใน Eppendorf tube ที่สะอาด เก็บในตู้แช่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบปริมาณโปรตีน โดยสารที่สกัดสามารถเก็บไว้ได้หนึ่ง สัปดาห์

1.1.2 การเตรียมโปรตีนสำหรับทำกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ผสม Bovine serum albumin เข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร กับ 0.15 M NaCl ให้ได้ 100 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Coomassie brilliant blue solution (ภาคผนวก 9) หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A_{595}) เพื่อทำกราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

1.1.3 การทดสอบปริมาณโปรตีน

นำสารสกัดที่ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.15 M NaCl 950 ไมโครลิตร และ Coomassie brilliant blue solution 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{595} เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในแต่ละพันธุ์ โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงจากกราฟมาตรฐาน

1.2 การทดสอบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดโปรตีน

เตรียมตัวอย่างพืชและสกัดโปรตีนเช่นเดียวกับ 1.1.1 แล้วผสมกับ marker dye (ภาคผนวก 3) ในอัตราส่วน 1 : 4 และนำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 นาทีก่อนการทดสอบด้วย SDS-PAGE

1.2.2 การเตรียม slab gel

1.2.2.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2.2 เตรียมสารละลาย separating gel (12% T) (ภาคผนวก 25) เข้าด้วยกัน แล้วดูดสารละลายเจลนี้ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อยๆหยอดสารละลาย Water-saturated 2-butanol ให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่ออย่างชัดเจน แล้วค่อยๆ ล้างส่วนบนนี้ออกด้วยน้ำกลั่นและซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

1.2.2.3 เตรียม stacking gel (ภาคผนวก 26) คำนวณปริมาณของเจลที่ใช้โดยใส่ stacking gel (upper gel) สูงประมาณ 1 – 2 เซนติเมตร เหนือ separating gel (lower gel)

1.2.2.4 หลังจากผสมสารละลายเข้ากันแล้วเทลงบน separating gel สอด comb ลงใน gel plate ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

1.2.2.5 ดึง comb ออกจาก stacking gel ล้างช่อง (well) ที่เกิดขึ้นด้วยน้ำกลั่นและดูดออกจนเห็นช่องชัดเจน

1.2.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.2.3.1 ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม SDS running buffer (ภาคผนวก 6) ลงใน chamber

1.2.3.2 ใส่ตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1 ลงในช่องๆละ 26 ไมโครลิตร

1.2.3.3 ต่อขั้วบวกและขั้วลบกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 16-24 มิลลิแอมแปร์

1.2.3.4 เมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจล ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

1.2.3.5 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วมาวางบน plate เพื่อย้อมโปรตีนต่อไป

1.2.4 การย้อมโปรตีนในเจลโดยวิธี Coomassie Brilliant Blue R-250 (Smith, 1948)

1.2.4.1 นำแผ่นเจลใส่ลงในถาดที่มี staining solution (ภาคผนวก 8) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และควรเขย่าเบาๆ ตลอดเวลาโดยวางลงบน orbital shaker

1.2.4.2 ล้างสีน้ำเงินในเจลออกด้วย destaining solution (ภาคผนวก 8) หลายๆครั้งจนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวอุบลชาติโดยใช้รูปแบบไอโซไซม์

2.1 การคัดกรองไอโซไซม์ที่เหมาะสม

2.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัด

เตรียมตัวอย่างพืชที่ทราบชื่อพันธุ์และสกัดเอนไซม์เช่นเดียวกับ 1.1.1 และใช้ตัวอย่างพืชชุดเดียวกันนี้สกัดด้วย extraction buffer สูตร 2 (Ausubel, 1999) (ภาคผนวก 5) รวม 20 ตัวอย่างผสมกับ marker dye (ภาคผนวก 2) ในอัตราส่วน 100 : 5

2.1.2 การเตรียม slab gel

2.1.2.1 ต่อชุดแผ่นแก้วเหมือนข้อ 1.2.2.1 เตรียมสารละลาย 11% separating gel (ภาคผนวก 26) เทใส่ระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ รอให้เจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้านบนเจลด้วยน้ำกลั่น

2.1.2.2 เตรียมสารละลายของ stacking gel 4.5% (ภาคผนวก28) แล้วเทลงบน separating gel สอด comb ลงใน gel plate ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วดึง comb ออกจาก stacking gel ล้างช่อง (well) ที่เกิดขึ้นด้วยน้ำกลั่นและดูดน้ำกลั่นออกจนเห็นช่องชัดเจน

2.1.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1.3.1 ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber

2.1.3.2 ใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1.1 ลงในช่องๆละ 26 ไมโครลิตร

2.1.3.3 ต่อขั้วบวกและขั้วลบกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 14 มิลลิแอมแปร์สำหรับ stacking gel และกระแสไฟฟ้า 24 มิลลิแอมแปร์สำหรับ separating gel

2.1.3.4 เมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจล ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.1.3.5 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

2.1.4 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์แต่ละชนิด (ภาคผนวก 10-24)ได้แก่ esterase, aldehyde oxidase, diaphorase, glucose dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase, malic enzyme, peroxidase, shikimate dehydrogenase, superoxide dismutase, aspartate amino transferase,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

acid phosphatase, alkaline phosphatase และ leucine aminopeptidase เทลงบน plate ที่มีเจลอยู่ นำไปบ่มในที่มืด ยกเว้น esterase บ่มในที่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 15-60 นาที จนปรากฏแถบสี ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น

2.1.5 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วปรากฏแถบสีมาศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากตำแหน่ง จำนวน ขนาด และนำค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์ หาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) จากสมการ

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี bromophenol blue}}$$

2.1.6 เลือกระบบไอโซไซม์ที่ปรากฏแถบมาทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง วิเคราะห์ผลด้วย UPGMA cluster โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS release 6.0

2.2 การศึกษารูปแบบจำเพาะ (specific pattern) ที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของบัวอุบลชาติกลุ่มบัวผัน บัวสาย และบัวฝรั่ง

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดเอนไซม์

แบ่งบัวตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อพันธุ์ออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะใบ ได้แก่ กลุ่มบัวผัน ขอบใบจักมนไม่เป็นระเบียบ (ภาพ 2) กลุ่มบัวฝรั่ง ใบกลม ขอบใบเรียบ (ภาพ 3) และกลุ่มบัวสาย ขอบใบจักแหลม (ภาพ 4) โดยใช้เนื้อเยื่อจากใบอ่อนจากตัวอย่างที่แตกต่างกัน 5 ชนิดในกลุ่มเดียวกัน ใช้สารสกัด extraction buffer สูตร 1 ด้วยวิธีสกัดเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 1.1.1

2.2.2 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและการย้อมเอนไซม์

นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 2.1.3 และย้อมด้วย staining solution ของเอนไซม์ esterase (EST), shikimate dehydrogenase (SKD), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) และ peroxidase (POX)

2.2.3 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาความสัมพันธ์ของบัวอุบลชาติและรูปแบบของไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่ม วิเคราะห์ผลด้วย UPGMA cluster โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS release 6.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมี หน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการเคมี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. ระยะดำเนินการวิจัย

มิถุนายน 2544 – กรกฎาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved