บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของกล้วยไม้เอื้องน้ำต้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** การศึกษาการเจริญเติบโต **การทดลองที่ 2** การผสมเกสร และ **การทดลองที่ 3** การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา เซลล์วิทยา และรูปแบบไอโซไซม์

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโต

ศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของพืชทดลอง โดยบันทึกการเจริญเติบโตใน 1 วงจร คือ 1 ปี ตั้งแต่ช่วงเริ่มแทงช่อดอกและบานดอก ช่วงการเจริญเติบโตของใบและหัว จนถึงช่วงพักตัว

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลองคือ ต้นเอื้องน้ำต้นที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งการเจริญเติบโตและกระจายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 2 แหล่ง คือจากบ้านดง และบ้านแม่วองซึ่งอยู่ในระดับความสูงประมาณ 1,200 และ 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลตามลำดับ โดยใช้ต้นพืชกรรมวิธีละ 5 ต้น

1.1.2 อุปกรณ์ในการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชทดลอง คือ สมุดบันทึก เวอร์เนียแคลลิเปอร์ ไม้บรรทัด กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม และ ป้ายชื่อ

1.1.3 วัสดุปลูกได้แก่ ดิน และใบไม้แห้ง อัตราส่วน 2:1

1.2 วิธีการ

1.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของพืชทดลองซึ่งปลูกเลี้ยงในแปลงปลูกที่บรรจุวัสดุปลูกดังแสดงส่วนผสมใน 1.1.3 โดยการบันทึกการเจริญเติบโตของต้นพืชตั้งแต่ระยะเริ่มแทงหัวใหม่ตลอดไปจนถึงช่วงการเจริญเติบโตของใบ ช่วงแทงช่อดอกและช่วงบานดอก และช่วงที่หัวใหม่พักตัว แล้วแสดงวงจรการเจริญเติบโตใน 1 ปีในลักษณะของภาพวาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 บันทึกการเจริญเติบโตของหัว โดยการวัดความสูงของหัว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว

1.2.3 บันทึกการเจริญเติบโตทางใบในลักษณะของจำนวนใบต่อต้น และขนาดใบ

1.2.4 บันทึกการเจริญเติบโตของดอกโดยการสังเกตการเริ่มเกิดดอกบริเวณที่เกิดการสร้างดอก การเจริญเติบโตของดอก และคุณภาพของดอกและช่อดอกในลักษณะของจำนวนดอกต่อช่อ และขนาดของดอกย่อย

1.2.5 บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของหัวตั้งแต่เริ่มต้นการเจริญเติบโตจนถึงช่วงพักตัว

การทดลองที่ 2 การผสมเกสร

ศึกษาความเป็นไปได้ของการผสมเกสรของพืชทดลอง โดยการถ่ายละอองเกสรด้วยมือเพื่อให้เกิดการผสมเกสรในดอกเดียวกัน

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง คือ ต้นเอื้องน้ำต้นในช่วงที่มีการเจริญเติบโตของดอก

2.1.2 วัสดุที่ใช้ ได้แก่ ไม้ปลายแหลม ดินสอ และแผ่นป้ายพลาสติก

2.2 วิธีการ

2.2.1 การผสมเกสร

ทดลองผสมเกสรในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 4 ช่วง คือ ผสมเกสรในช่วงเวลา 8.00-9.00 น. 10.00-11.00 น. 16.00-17.00 น. และ 18.00-19.00 น. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ดอก ผสมเกสรโดยใช้ไม้ปลายแหลมที่สะอาดเขี่ยเกสรเพศผู้ออกมา แล้วนำไปใส่ยอดเกสรเพศเมียซึ่งเป็นแอ่งที่มีน้ำเมือกเหนียวใสคล้ายแป้งเปียกแล้วติดป้ายบันทึกข้อมูลการผสม

2.2.2 การบันทึกผล

บันทึกจำนวนดอกที่ผสมเกสร จำนวนดอกที่ผสมติด และติดตามการเจริญเติบโตของฝักตั้งแต่ติดฝักจนถึงฝักแก่

การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะ

การศึกษาลักษณะของพืชทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย โดยมีอุปกรณ์และวิธีการดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืช ได้แก่ หัว ใบ ดอก และฝัก โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลองที่รวบรวมมาจากแหล่งเจริญเติบโตและกระจายพันธุ์ 2 แหล่ง เช่นเดียวกับในข้อ 1.1.1 แหล่งละ 5 ต้น ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1.1 พืชทดลองคัดเลือกมาจากต้นที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ จำนวน 5 ต้น จากแต่ละแหล่งดังระบุในข้อ 1.1.1

3.1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ ไม้บรรทัด สมุด ดินสอ กระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช มีดผ่าตัด และปากคีบ

3.1.2 วิธีการ

3.1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของพืชทดลอง ได้แก่ หัว ใบ ดอก และฝัก ในระยะที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่ โดยบันทึกลักษณะกรรมวิธีละ 5 ต้น พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์แสดงลักษณะเหล่านั้น

3.1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

3.1.2.2.1 **หัว** นับจำนวนหัวต่อต้น วัดขนาดของหัว นับจำนวนปล้องของหัวและสันของหัว

3.1.2.2.2 **ใบ** นับจำนวนใบต่อต้น และวัดขนาดของใบที่ 3 จากโคนต้น

3.1.2.2.3 **ช่อดอก** วัดขนาดของช่อดอกและนับจำนวนดอกต่อช่อ

3.1.2.2.4 **ดอก** วัดขนาดของดอก

3.1.2.2.5 **ฝัก** วัดขนาดของฝัก

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของ ลำต้น ใบ ดอก ราก และฝัก โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่บรรยายไว้โดย Johansen (1940)

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1.1.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.2.1.1.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 °ซ

3.2.1.1.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.2.1.1.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 °ซ

3.2.1.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน

3.2.1.1.7 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

3.2.1.1.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และขวดย้อมสี

3.2.1.1.9 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด และปากคีบ

3.2.1.2 สารเคมี

3.2.1.2.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixtative) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

95% ethyl alcohol	50	มิลลิลิตร (มล)
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

3.2.1.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	95% ethyl alcohol (มล)	100% ethyl alcohol (มล)	tertiary butyl alcohol (TBA) (มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

3.2.1.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของ

ไข่ขาว	1	มล
น้ำกลั่น	49	มล

เมื่อจะใช้นำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

3.2.1.2.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

3.2.1.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

3.2.1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

3.2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

3.2.2.1 เก็บตัวอย่างของใบ ลำต้น ดอก รากและฝัก มาแช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว แล้วนำขวดดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

3.2.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านขั้นตอนของน้ำยา จากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50% ไปจนถึงระดับ 100% จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน 100% TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อลงไปในขวดแก้วที่บรรจุพาราฟินที่หลอมแล้ว นำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 °ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

3.2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

3.2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่ได้ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าโดยให้มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 13-15 ไมครอน

3.2.2.6 นำแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

3.2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อแล้วไปย้อมสี

3.2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

3.2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 3.3 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยดวงทิพย์ (2539) และ ประภัสสร (2543)

3.3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.3.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

3.3.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายราก

3.3.1.3 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

3.3.1.4 ปรอทวัดความร้อน

3.3.1.5 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.3.1.6 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ปากคีบ เข็มเขี่ย กระบอกตวงสารเคมี และน้ำยาเคลือบเล็บ

3.3.1.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1.8 สารเคมี

3.3.1.8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ สารละลายอิ่มตัวของ para-dichlorobenzene (PDB)

3.3.1.8.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixtative) คือ 95 % ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

3.3.1.8.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มอล

3.3.1.8.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.3.2 วิธีการ

3.3.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโตซึ่งบริเวณปลายมีสีขาวขุ่น ใช้ปลายรากที่งอกใหม่และมีความยาว 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 1-2 มม เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00-11.00 น.

3.3.2.2 หยุดวงชีพเซลล์โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เป็นเวลา 24 36 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 15 °ซ

3.3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

3.3.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

3.3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากใน carbol fuchsin แล้วแช่ไว้นาน 30 นาที 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดผ่าตัดตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาว 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยดตรงบริเวณปลายราก ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนเกินทิ้งแล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ วางกระดาษซับบนแผ่นกระจกสไลด์เพื่อซับสีที่มากเกินไปออก กดนิ้วหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจาย

3.3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้แม่นยำ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วกดแผ่นกระจกปิดสไลด์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์แบน และอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้ง นำแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองโดยศึกษาจากใบและใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ ACP และ เอนไซม์ POX โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของพสุ (2546) และ EST โดยดัดแปลงวิธีการศึกษาจากวิธีของรัติกาล (2543)

3.4.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.4.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.4.1.1.1 ใบพืชทดลอง

3.4.1.1.2 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 °ซ และตู้เย็น

3.4.1.1.3 ชุดอิเล็คโตรโฟรีซีสแบบ slab gel

3.4.1.1.4 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1000/500

3.4.1.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

3.4.1.1.6 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.4.1.1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

3.4.1.1.8 โกร่งบดตัวอย่างพืช

3.4.1.1.9 ไมโครปิเปต

3.4.1.1.10 หลอดใส่สาร (Eppendrof tube) ขนาด 1.5 มล

3.4.1.1.11 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

3.4.1.1.12 เครื่องแก้ว

3.4.1.1.13 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร

3.4.1.1.14 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ ช้อนตักสาร พลาสติกใส ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย กล้องถ่ายรูป และฟิล์มถ่ายรูป

3.4.1.2 สารเคมี

3.4.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ 0.2 M tris-HCl pH 8.4

3.4.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.2.2.1 30% acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 °ซ)

3.4.1.2.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

3.4.1.2.2.3 10% ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้

3.4.1.2.2.4 TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene-diamine)

3.4.1.2.2.5 น้ำกลั่น

3.4.1.2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye

3.4.1.2.3.1 10% glycerol

3.4.1.2.3.2 0.5% bromophenol blue

3.4.1.2.4 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer (ภาคผนวก)

3.4.1.2.4.1 tris

3.4.1.2.4.2 glycine pH 8.3 ต่อน้ำกลั่น 500 มล

3.4.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์ (ภาคผนวก)

3.4.1.2.5.1 0.1 M tris-HCl pH 4.0

3.4.1.2.5.2 3-amino-9-ethylcarbazole

3.4.1.2.5.3 β-naphthol

3.4.1.2.5.4 3% H_2O_2

3.4.1.2.5.5 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

3.4.1.2.5.6 fast blue B-salt

3.4.1.2.5.7 α-naphthyl acetate

3.4.1.2.5.8 0.05 M acetate buffer pH 4.8

3.4.1.2.5.9 fast garnet GBC diasonium salt

3.4.1.2.5.10 disodium α-naphthyl phosphate

3.4.2 วิธีการ

3.4.2.1 การสกัดเอนไซม์

นำใบที่สามจากปลายยอดของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งใบให้ได้น้ำหนัก 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัดแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บดตัวอย่างจนละเอียด จากนั้นเติม extraction buffer ตามสูตรของ Gottlieb, 1981 (อ้างโดย Kuntapanom and Smitamana, 1997) 3 มล และ polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) 0.05 กรัม แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

3.4.2.2 การทำ polyacrylamide gel electrophoresis

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean® 3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายของเจล 6.0% และ 8.5% สำหรับ separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม separating gel

สาร	6.0% separating gel	8.5% separating gel
น้ำกลั่น	10.70 มล	5.65 มล
1.5 M tris pH 8.8	5.00 มล	3.13 มล
30% acrylamide	3.13 มล	3.54 มล
10% APS	150.00 ไมโครลิตร	125.00 ไมโครลิตร
TEMED	10.00 ไมโครลิตร	7.50 ไมโครลิตร

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำสารละลายมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ จากนั้นต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม loading dye ลงใน chamber แล้วหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของ stacking gel 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ให้กระแสไฟผ่านโดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟเมื่อสีของ loading dye เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบนจานแก้วเพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

3.4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 3 ชนิด คือ ACP, EST และ POX (ภาคผนวก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี วาดไซโมแกรม บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน โดยคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ตามสมการข้างล่างนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

แสดงผลในรูปแบบของเดนโดรแกรม โดยวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างหาค่าความสัมพันธ์จากแถบสีด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's coefficient similarity โดยใช้โปรแกรม SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved