บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* 2 ชนิด คือ บานดึกและเอื้องดินลาว ที่รวบรวมมาจากพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าและป่าเต็งรังในเขตป่าสงวนแห่งชาติขุนแม่กวง แล้วนำมาปลูกเลี้ยงไว้ในพื้นที่รวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ป่า ภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ การทดลองที่ 3 การศึกษาโครโมโซม** และ **การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์**

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลอง มีอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 **พืชทดลอง** ได้แก่ บานดึก และ เอื้องดินลาว ต้นพืชที่ใช้เป็นตัวแทนเพื่อการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้น คือ ต้นพืชที่คัดเลือกมาชนิดละ 5 ต้น จากต้นที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์

1.1.2 **อุปกรณ์** ได้แก่ ไม้บรรทัด สมุด ดินสอ แว่นขยาย มีดผ่าตัด ปากคีบ และกระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช

1.2 วิธีการ

1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของพืชทดลองแต่ละชนิด ได้แก่ หัว ใบ ช่อดอก ดอก และ ฝัก ในระยะที่ส่วนต่างๆ ของต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว และวาดภาพทางพฤกษศาสตร์แสดงส่วนประกอบของต้นพืช เพื่อเป็นการแสดงลักษณะโดยละเอียด สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชนี้นอกจากศึกษาลักษณะของอวัยวะต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว ยังได้ศึกษาลักษณะของกลีบดอกของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ในรายละเอียดอีกด้วย ทั้งนี้เป็นการศึกษาที่สืบเนื่องมาจากการสังเกตพบในระยะที่ออกสำรวจและรวบรวมต้นพืชว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้นพืชที่รวบรวมมาดังกล่าวมีความผันแปรในลักษณะของกลีบดอก จึงใช้ตัวอย่างดอกจากต้นพืชมากกว่า 5 ต้นจากแต่ละชนิดนั้น เพื่อบันทึกลักษณะของกลีบดอกที่มีรายละเอียดแตกต่างกัน การบันทึกนี้ทำให้ได้ข้อมูลของการผันแปรของลักษณะทางสัณฐานของกลีบดอกในกลุ่มต้นพืชที่รวบรวมไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์

1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบของต้นดังนี้

1.2.2.1 **หัว** จำนวนหัวต่อต้น จำนวนปล้องต่อหัว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว โดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของหัว

1.2.2.2 **ต้น** ความสูงของต้น โดยวัดความยาวจากโคนต้นจนถึงปลายใบของใบที่ยาวที่สุด

1.2.2.3 **ใบ** จำนวนใบต่อต้น และขนาดความกว้างและความยาวของใบในตำแหน่งใบที่ 3 นับจากโคนต้น

1.2.2.4 **ช่อดอก** ความกว้างและความยาวของก้านช่อดอก และจำนวนดอกต่อช่อ

1.2.2.5 **ดอก** ขนาดของดอก โดยวัดความยาวจากปลายของกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปาก ความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก และ กลีบปากของดอกที่บานเต็มที่ ความยาวของก้านดอกย่อย ความกว้างและความยาวของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณูและ ความกว้างและความยาวของฝาอับเรณู

1.2.2.6 **ฝัก** จำนวนฝักต่อช่อ และ ความกว้างและความยาวของฝัก

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อของ ราก ลำต้น ใบ ดอก และฝักของพืชทดลอง โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าว ตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่กล่าวไว้โดย Johansen (1940)

อุปกรณ์และวิธีการของการทดลองนี้มีดังนี้

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง คือ บานดึกและเอื้องดินลาว

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.2.1 เครื่องดูดอากาศ

2.1.2.2 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ˚ซ โดยประมาณ

2.1.2.3 แผ่นให้ความร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2.4 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มจนอิ่มตัวในพาราฟิน

2.1.2.5 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome) พร้อมใบมีด

2.1.2.6 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.1.2.7 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ˚ซ โดยประมาณ

2.1.2.8 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วขนาดเล็ก แผ่นกระจกสไลด์ (slide) แผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip) บีกเกอร์ กระบอกตวงสารเคมี ขวดย้อมสี และหลอดหยด

2.1.2.9 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ กระดาษกาว ป้ายติดกาว ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ยปลายงอ ปากคีบ มีดผ่าตัด พู่กันขนอ่อน และ กระดาษเยื่อ

2.1.3 สารเคมี

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

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

2.1.3.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

2.1.3.3 สารตัวกลางที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

2.1.3.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive) โดยเตรียมน้ำยาเข้มข้นจากส่วนผสมของไข่ขาว 1 มล ต่อน้ำกลั่น 49 มล เมื่อจะใช้จึงนำน้ำยาเข้มข้นมาเจือจางโดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ในแต่ละขั้นตอน

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

2.1.3.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

glycerol	100	มล
methyl alcohol	100	มล
95% ethyl alcohol	25	มล
hematoxylin	4	กรัม
aluminium sulfate	400	มล

2.1.3.6 น้ำยาละลายพาราฟิน คือ xylene

2.1.3.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ คือ Canada balsam

2.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

2.2.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของส่วนประกอบของพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และ ฝัก มาใส่ในขวดแก้วที่มีน้ำยา FAA บรรจุอยู่ภายใน นำขวดแก้วดังกล่าวใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่อากาศออกจากเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาในการแช่เนื้อเยื่อพืชในน้ำยา FAA แตกต่างกันไปตามลักษณะทางกายภาพของเนื้อเยื่อ กล่าวคือชิ้นส่วนพืชที่อ่อนนุ่ม เช่น ใบและดอก แช่ไว้นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับชิ้นส่วนพืชที่แข็ง คือ ราก ลำต้น และ ฝัก แช่ตัวอย่างไว้นาน 1-2 สัปดาห์ หรือนานกว่า

2.2.2 นำชิ้นส่วนพืชมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยให้ผ่านน้ำยาที่มีระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จาก 50% ไปจนถึงระดับ 100% ทิ้งไว้นาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 คืน จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชไปผ่าน 100 % TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 แต่ละขั้นตอนแช่ชิ้นส่วนพืชทิ้งไว้นาน 1 คืน เป็นอย่างต่ำแล้วนำเนื้อเยื่อไปผ่านขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ

2.2.3 เทน้ำยาในขั้นตอนสุดท้ายของข้อ 2.2.2 ออก แล้วเติมพาราฟินที่หลอมแล้วลงไปแทนที่ จากนั้นนำขวดแก้วไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 ˚ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้เต็มที่

2.2.4 นำกระดาษที่พับเป็นแม่พิมพ์รูปสี่เหลี่ยมมาวางบนแผ่นให้ความร้อน จากนั้นเทพาราฟินที่หลอมแล้วลงในแม่พิมพ์ นำชิ้นส่วนพืชฝังลงไปแล้วคอยใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟจนร้อนจุ่มลงไปในพาราฟินเพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด จัดชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการ

2.2.5 นำแท่งพาราฟินรูปสี่เหลี่ยมที่มีเนื้อเยื่อฝังอยู่นั้นมาตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่เล็กลงและเหมาะสมกับขนาดของเนื้อเยื่อโดยให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลาง นำมาติดกับแท่งไม้ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้หนา 10-15 ไมครอน

2.2.6 ติดแถบชิ้นส่วนพืช (paraffin ribbon) ซึ่งได้จากการตัดในข้อ 2.2.5 ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อ นำแผ่นสไลด์นั้นวางบนเครื่องอุ่นสไลด์จนแถบชิ้นส่วนพืชแห้งและติดกับแผ่นสไลด์

2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่มีแถบชิ้นส่วนพืชไปย้อมสี โดยเริ่มจากการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene ตามด้วยส่วนผสมของ xylene กับ ethyl alcohol 100 % ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมาผ่านน้ำยาที่มีระดับความเข้มข้นของ ethyl alcohol จาก 95% 70% 50% ไปสู่ 30% ตามลำดับ แล้วนำไปแช่ในขวดย้อมสีที่บรรจุสารละลายสี hematoxylin เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำ 1 ครั้ง นำมาผ่าน ethyl alcohol จากระดับความเข้มข้นต่ำไปหาสูงคือ 30% 50% 70% ไปหา 95% ตามลำดับ ต่อด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ xylene กับ ethyl alcohol 100 % ในอัตราส่วน 1:1 และสิ้นสุดด้วยการผ่านในขวดแก้วบรรจุ xylene โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 3-5 นาที

2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ที่มีแถบชิ้นส่วนพืชที่ย้อมสีแล้วด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam ยึด

2.2.9 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาโครโมโซม

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลอง ด้วยวิธีขยี้เซลล์ตามเทคนิค Feulgen's squash ที่ดัดแปลงโดยจารุวรรณ (2550)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ เครื่องมือ และ อุปกรณ์

3.1.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

3.1.1.2 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิให้เป็น 60 ˚ซ

3.1.1.3 ปรอทวัดความร้อน

3.1.1.4 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก

3.1.1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

3.1.1.6 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้วขนาดเล็ก แผ่นกระจกสไลด์ แผ่นกระจกปิดสไลด์ หลอดหยด กระบอกตวงสารเคมี และ บีกเกอร์

3.1.1.7 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ปากคีบ มีดผ่าตัด เข็มเขี่ย ป้ายติดกาว กระดาษเยื่อ และน้ำยาเคลือบเล็บ

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ คือ para-dichlorobenzene (PDB)

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ คือ 95 % ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

3.1.2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ คือ กรดเกลือ เข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N HCl)

3.1.2.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

3.2 วิธีการ

3.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโต คือ รากที่เพิ่งงอกออกมายาวประมาณ 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 3-5 มม เก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงเวลา 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00, 15.00, 16.00 และ 17.00 น.

3.2.2 แช่ปลายรากในสารละลาย PDB เพื่อหยุดวงชีพเซลล์ แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 ˚ซ เป็นเวลา 2, 4, 6, 8, 10 และ 15 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วซับน้ำด้วยกระดาษเยื่อ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเซลล์ ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

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

3.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากในสารละลายสี carbol fuchsin แช่เนื้อเยื่อไว้ในสีนาน 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง จากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้มีดตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากเพียง 1 มม ขยี้ปลายรากด้วยเข็มเขี่ยแล้วหยดสี 1 หยด ลงบนเนื้อเยื่อ ใช้เข็มเขี่ยเคาะเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจาย คีบเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออก แล้วปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นกระจกสไลด์ กดแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยนิ้วหัวแม่มือเพื่อให้เซลล์กระจาย ซับสีที่มากเกินไปออก

3.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและเป็นเซลล์ที่มีโครโมโซมขดแน่นและกระจายตัวดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการแล้วใช้นิ้วกดลงบนแผ่นกระจกปิดสไลด์อีกเพื่อให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อแห้งโดยการใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบแผ่นกระจกปิดสไลด์ ตรวจแผ่นกระจกสไลด์ใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซม และบันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลอง โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อของใบใช้เอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, POX, SKD และ SOD ตามวิธีการของพสุ (2546) และสุทธินันท์ (2548)

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 วัสดุ เครื่องมือ และ อุปกรณ์

4.1.1.1 เนื้อเยื่อใบของพืชทดลองซึ่งปลูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกัน

4.1.1.2 โกร่งบดตัวอย่างพืช

4.1.1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

4.1.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด/ด่างของสารละลาย

4.1.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

4.1.1.6 หลอดใส่สารขนาด 1.5 มล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.1.7 ไนโตรเจนเหลวในถังบรรจุ

4.1.1.8 ตู้เย็นที่ปรับอุณหภูมิเป็น 4 ๐ซ และตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 ๐ซ

4.1.1.9 ไมโครปิเปตที่ปรับปริมาตรได้

4.1.1.10 เครื่องเขย่าสารให้รวมเป็นเนื้อเดียว

4.1.1.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1,000/500

4.1.1.12 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ slab gel (Mini Protein II ของบริษัท Bio-Rad)

4.1.1.13 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต แท่งแก้ว กระบอกตวงสารเคมี และ ขวดสีชา

4.1.1.14 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระติกน้ำแข็ง ถุงพลาสติก ช้อนตักสาร แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือยาง กระดาษชั่งสาร กระดาษเยื่อ แผ่นพลาสติกใส ถาดพลาสติก กล่องพลาสติก กรรไกร ป้ายติดกาว ปากกา สมุด ไม้บรรทัด และกล้องถ่ายรูปดิจิตอล

4.1.2 สารเคมี

4.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer คือ

4.1.2.1.1 0.5 M ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

4.1.2.1.2 14.3 M β-mercaptoethanol (MSH)

4.1.2.1.3 polyvinylpyrrolidone (PVP-10)

4.1.2.1.4 0.5 M dithiothreitol (DTT)

4.1.2.1.5 1.0 M tris-HCl pH 7

4.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

4.1.2.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 ๐ซ)

4.1.2.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

4.1.2.2.3 10 % ammonium persulfate (APS) เตรียมสารเมื่อต้องการใช้

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

4.1.2.2.5 น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ loading dye

4.1.2.3.1 10 % glycerol

4.1.2.3.2 0.5 % bromophenol blue

4.1.2.4 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer

4.1.2.4.1 tris

4.1.2.4.2 glycine pH 8.3 (100 มล ในน้ำกลั่น 500 มล)

4.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

4.1.2.5.1 0.05 M acetate buffer pH 4.8

4.1.2.5.2 fast ganet GBC diasonium salt

4.1.2.5.3 disodium α-naphthyl phosphate

4.1.2.5.4 $MgCl_2$

4.1.2.5.5 0.1 M tris-HCl pH 8.0

4.1.2.5.6 β-nicotinamide adenine dinucleotide; reduced form (β-NADH)

4.1.2.5.7 2, 6-dichloroindophenol sodium (DCIP)

4.1.2.5.8 3[4,5-dimethyphiazol] 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

4.1.2.5.9 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

4.1.2.5.10 fast blue B-salt

4.1.2.5.11 α-naphthyl acetate

4.1.2.5.12 0.1 M tris-HCl pH 7.5

4.1.2.5.13 α-D glucose

4.1.2.5.14 β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)

4.1.2.5.15 nitro blue tetrazolium (NBT)

4.1.2.5.16 phenazine methosulfate (PMS)

4.1.2.5.17 0.1 M tris-HCl pH 7.4

4.1.2.5.18 α-ketoglutaric acid

4.1.2.5.19 aspartic acid

4.1.2.5.20 pyridoxal-5'-phosphate

4.1.2.5.21 fast blue BB salt

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2.5.22 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6

4.1.2.5.23 L-leucine β–naphthylamide, HCl

4.1.2.5.24 O-dianisidine salt

4.1.2.5.25 L-malic acid

4.1.2.5.26 shikimic acid

4.1.2.5.27 β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP)

4.1.2.5.28 0.1 M tris-HCl pH 4.0

4.1.2.5.29 3-amino-9-ethylcarbazole

4.1.2.5.30 β-naphthol

4.1.2.5.31 3 % H_2O_2

4.1.2.5.32 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5

4.1.2.5.33 TEMED

4.1.2.5.34 riboflavin

4.2 วิธีการ

4.2.1 การสกัดเอนไซม์

นำใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ของพืชทดลองมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ใช้กระดาษเยื่อเช็ดให้แห้ง ชั่งใบตัวอย่างละ 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งแล้วเทไนโตรเจนเหลวลงไปพอท่วม บดตัวอย่างจนละเอียด จากนั้นเติม extraction buffer ตามสูตรดัดแปลงของพสุ (2546) ลงไป 3 มล บดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทของเหลวที่สกัดได้ในหลอดใส่สารขนาด 1.5 มล นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2˚ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20˚ซ เพื่อนำไปผ่านขั้นตอนของการทำโพลีอคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

4.2.2 การทำโพลีอคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini-Protean®3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลาย separating gel โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม separating gel สำหรับเจล 6 แผ่น (Smitamana and Kuntapanom, 1997)

สาร	7.5% separating gel
1.5 M tris pH 8.8	7.5 มล
30% acrylamide	7.5 มล
10% APS	300.00 ไมโครลิตร
TEMED	15.00 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	14.55 มล

เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วนำมาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้แล้วเสียบหวีทันที โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศในช่องหวีเสียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว จากนั้นประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber ประมาณ 500 มล จากนั้นค่อย ๆ หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 9:1 ลงในช่องของ separating gel ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber เปิดสวิทช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟผ่านที่ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟเมื่อ loading dye เคลื่อนที่อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 ซม นำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิด

4.2.3 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, POX, SKD และ SOD (ภาคผนวก)

4.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี เขียนไซโมแกรม บันทึกการมีและไม่มีแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ตามสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

แสดงผลในรูปแบบของเด็นโดรแกรม โดยวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแถบสีด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved