

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุพันธุ์พืช

ผลลำไยพันธุ์ดอที่เก็บเกี่ยวในระยะแก่ทางการค้าชั้นมาตรฐาน AA จากสวนเกษตรกร ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ บรรจุในกล่องกระดาษกล่องละ 10 กิโลกรัม ขนส่งมาห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาคัดแต่งก้านออกให้เหลือประมาณ 0.5 เซนติเมตร และคัดเลือกผลลำไยที่มีขนาดผลสม่ำเสมอและไม่มีความเสียหายมาใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องผลิตก๊าซโอโซน (ozone generator) กำลังการผลิต 1,500 มิลลิลิตร/ชั่วโมง
2. ตู้รวม (chamber) ขนาด 34.5 x 44.5 x 45 เซนติเมตร
3. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
4. เครื่องถ่ายภาพเจล gel logic 100 imaging system
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Miton Ron Company รุ่น Spectronic 21
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Spectrophotometer) ยี่ห้อ Lambda 25 รุ่น Lambda 25 1.23
7. ตู้เย็นอุณหภูมิ 5 °C

สารเคมี

1. Tris-HCl (hydroxymethyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) (Merck)
2. sodium dodecyl sulfate ; SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) (BIO-RAD)
3. 2-mercaptoethanol ($HOCH_2CH_2SH$) (BIO-RAD)
4. sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (Merck)
5. disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
6. sodium chloride (NaCl) (Merck)
7. โบรตีน bovine serum albumin (BSA)
8. coomassie brilliant blue G-250 (BIO-RAD)
9. ethanol (CH_3CH_2OH) 99% (Merck)

10. potassium salts of orthophosphoric acid ความเข้มข้น 85% (Merck)
11. acrylamide 30% ที่มี bisacrylamide 0.8% (BIO-RAD® U.S.A.)
12. hydrogen chloride (HCl) เข้มข้น
13. sodium hydroxide (NaOH)
14. ammonium phosphate [(NH₄)₃PO₄]
15. bromophenol blue
16. glycerol (C₃H₈O₃)
17. tetramethylethylenediamine ; TEMED (C₆H₁₆N₂)
18. dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄)
19. potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄)
20. methanol (CH₃OH) 40%
21. โปรตีนมาตรฐานสำหรับ SDS-PAGE
22. acetic acid (CH₃COOH)
23. metaphosphoric acid (HPO₃)
24. standard ascorbic acid (C₆H₈O₆)
25. sodium bicarbonate (NaHCO₃)
26. 2,6-dichloroindophenol Na salt (DCIP)
27. polyvinylpyrrolidone (PVP)
28. ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈/((HOOC-CH₂)₂NCH₂)₂)
29. magnesium chloride (MgCl₂)
30. titanate tetrachloride (TiCl₄)
31. acetone (C₃H₆O)
32. hydrogen peroxide (H₂O₂)

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของโอโซนต่อการควบคุมโรคของลำไยหลังการเก็บเกี่ยว
นำผลลำไยที่ผ่านกรรมวิธี โดยแบ่งผลลำไยเป็นชุดการทดลอง ดังนี้

1. ชุดควบคุม
2. ชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนความเข้มข้น 200 ppm เป็นเวลา 60 นาที
3. ชุดที่รมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์

โดยรมในตู้ (chamber) ขนาด 34.5 x 44.5 x 45 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิห้อง $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ แล้วนำลำไยบรรจุกล่องพลาสติกขนาด 11.5 x 16 x 7 เซนติเมตร จำนวน กล่องละ 20 ผล และปิดด้วยพลาสติกชนิดพีวีซียืดหยุ่นห่ออาหาร ขนาด 30 เซนติเมตร x 30 เมตร x 10 ไมครอน นำมาเก็บรักษาโดยเปรียบเทียบอุณหภูมิ 2 ระดับ คือ

1. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27°C) เป็นเวลา 3 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยสุ่มตัวอย่างทุกวัน
2. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สุ่มตรวจตัวอย่างทุก สัปดาห์ มาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเก็บตัวอย่างทั้งเนื้อและเปลือกไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยการให้คะแนนเป็น 5 ระดับ ดังนี้

คะแนน 1 = ไม่ปรากฏให้เห็นเชื้อราจนถึงปรากฏเชื้อราที่ผลลำไยไม่เกิน 20% ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 2 = ปรากฏเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 21 - 40% ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 3 = ปรากฏเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 41 - 60% ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 4 = ปรากฏเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 61 - 80% ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 5 = ปรากฏเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 81 - 100% ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

รวมระดับคะแนนทุกผล = คะแนนเฉลี่ย

จำนวนผล

นำระดับคะแนนเฉลี่ยเทียบเป็น % จากการปรากฏเชื้อราที่ผลลำไย

การทดลองที่ 2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน และรูปแบบของโปรตีนของเปลือกและเนื้อลำไย

2.1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน โดยวิธี dye binding (Bradford, 1976)

วิธีการสกัดโปรตีนจากเปลือกและเนื้อผลลำไย

นำเปลือกลำไยมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งให้ได้น้ำหนักตัวอย่างละ 3 กรัม มาบดรวมกับ extraction บัฟเฟอร์ SDS 1.5% (w/v) ที่มี β -mercaptoethanol 10% (w/v), Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 M, pH 7.5 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในโถงที่แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C โดยบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที รินเอาเฉพาะส่วนที่ใสเก็บไว้ในหลอด eppendorf แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับใช้วิเคราะห์ในลำดับต่อไป ส่วนเนื้อผลลำไยใช้วิธีการสกัดโปรตีนเช่นเดียวกับวิธีการสกัดโปรตีนจากเปลือกผลลำไย

1. การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย NaPO_4 บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M, pH 7.5 ที่มี NaCl 0.1 M ลงในหลอดแต่ละหลอดโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานโปรตีนระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย NaPO_4 บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M, pH 7.5 ที่มี NaCl 0.1 M, ลงในหลอดแต่ละหลอดโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีน จากกราฟมาตรฐานโปรตีนระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง

2.2 รูปแบบของโปรตีน โดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) (Copeland, 1993)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเปลือกและเนื้อผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C และ 5 °C

นำผลลำไยมาทำการคัตขนาดผลให้มีความใกล้เคียงกัน บรรจุใส่ตะกร้าพลาสติกที่ใช้รมด้วยก๊าซโอโซนความเข้มข้น 200 ppm 60 นาที และชุดที่รมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในตู้รม โดยการซั่งเปลือกผลลำไยสดตัวอย่างละ 1 กรัม แล้วเก็บรักษาเปลือกไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป นำตัวอย่างมาสกัดโปรตีนจากเปลือกผลลำไยโดยวิธีของ Bradford (1976) เช่นเดียวกับการทดลอง 2.1 หลังจากนั้นนำโปรตีนทั้งหมดมาแยกด้วย SDS-PAGE 10% จากนั้นนำรูปแบบของแถบสีมาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล โดยเครื่องถ่ายภาพเจล gel logic 100 imaging system

1. การเตรียมแผ่นเจล

ประกอบแผ่นกระจกที่ใช้ทำ electrophoresis 2 แผ่น เข้าด้วยกัน โดยมี spacer กั้นระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองด้าน ยึดกระจกทั้งสองเข้าด้วยกันให้แน่นแล้วนำไปประกอบกับส่วนที่เป็นฐานรอง แล้วใช้สกรูยึดส่วนกระจกกับฐานรองให้แน่น (ภาพ 3) ผสมสารละลาย separating gel เข้าด้วยกันแล้วใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกทีละน้อยด้วยหลอดหยดจนได้ความสูง 11 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ (ภาพ 4) เติมน้ำกลั่นลงไปปิดผิวหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เทน้ำที่ปิดผิวหน้าเจลทิ้ง แล้วรินสารละลาย stacking gel ที่เตรียมไว้ลงบนหน้าเจลที่ได้ให้เกือบเต็มช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก เสียบหวีตามทันทีเพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่สารตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว แล้วจึงดึงแผ่นหวีออก ดึงสกรูที่ยึดระหว่างกระจกและฐานรองออก แล้วประกอบกระจกเข้ากับ chamber บน ใช้สกรูยึดให้แน่น แล้วนำไปใส่ลงใน chamber ล่างที่มี electrode บัฟเฟอร์อยู่ประมาณครึ่งหนึ่ง เท electrode บัฟเฟอร์ ลงใน chamber บนจนท่วมเส้นลวด

2. วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใช้ micro syringe คูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 30 ไมโครกรัม เท่ากันหมดในแต่ละชุดการทดลอง หยดลงในช่องว่างบน stacking gel ผ่านบัฟเฟอร์ลงในช่องเจล ส่วนด้านข้างระหว่างช่องเจลของตัวอย่าง (ภาพ 5) โดยเติมโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล ลงไปด้วยทั้ง 2 ด้าน ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และเปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมป์ (mA) ต่อช่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเพิ่มกระแสไฟฟ้าเป็น 50 mA ต่อช่อง (ภาพ 6) จนกระทั่งแถบสีของ bromophenol

blue เคลื่อนลงมาห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 5 - 6 ชั่วโมง ปิด สวิตช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber ค่อยๆ นำแผ่นเจลออกจากกระจก นำเจลแช่ในกล่องพลาสติกที่มีสารละลาย staining สำหรับใช้ย้อมโปรตีน เขย่าทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง และล้างออกด้วย destainer จนเห็นแถบโปรตีน

3. การย้อมสีโปรตีนในเจล โดยวิธี coomassie brilliant blue R-250

การเตรียม staining solution coomassie brilliant blue R-250 0.1% (w/v) ในสารละลายผสม 40% และ acetic acid 10% (v/v) เมื่อสีละลายหมดแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

การเตรียม destainer ด้วยสารละลายผสม methanol 40% และ acetic acid 10% เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ destainer หลายครั้ง

เทสารละลายย้อมลงไปให้ท่วมแผ่นเจลในกล่องพลาสติก นำไปวางบนเครื่องเขย่า นาน 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนสารละลายในกล่องพลาสติกเป็น destainer เพื่อล้างสีย้อมที่ไม่จับกับโปรตีน ออก เปลี่ยนสารละลาย destainer บ่อยๆ จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน

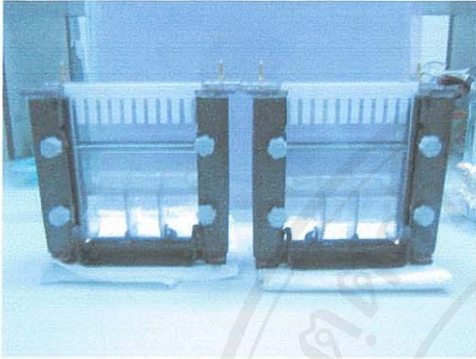
4. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนัก โมเลกุลที่แน่นอน (ตาราง 8)

ตาราง 8 น้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนมาตรฐานสำหรับ SDS-PAGE

ชื่อโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)
Ferritin horse	450
Catalase bovine	240
Aldolase rabbit	160
Albumin bovine (BSA)	67
Albumin egg	45
Chymotrypsinogen A	25
Myoglobine equine	17.8
Cytochrome C	12.4
DNP-L-Alanine	0.255

2. การถ่ายภาพและการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนบนแผ่นเจลด้วยเครื่อง gel logic 100 imaging system



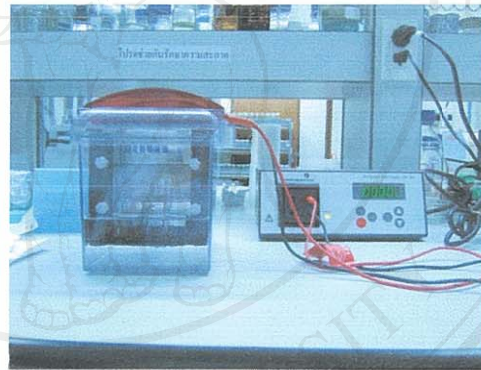
ภาพ 3 อุปกรณ์การเตรียมแผ่นเจล



ภาพ 4 การใส่สารละลายเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจก



ภาพ 5 การหยดสารละลายตัวอย่างลงในช่องว่างบน stacking gel



ภาพ 6 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพ 7 เครื่องถ่ายภาพเจล gel logic 100 imaging system

การทดลองที่ 3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบแอนติออกซิแดนซ์ของเปลือกและเนื้อลำไย หลังจากได้รับโอโซนระหว่างการเก็บรักษา

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระบบแอนติออกซิแดนซ์ ได้แก่

3.1 ปริมาณ peroxide ทั้งหมด โดยใช้วิธี titanium method (Brennan and Frenkel, 1977)

วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างที่แช่แข็ง 3.33 กรัม เติม acetone แช่เย็น 16.67 ไมโครลิตร บดในโกร่งแช่เย็นที่ -20 °C ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นเวลา 3 นาที บนน้ำแข็ง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ peroxides ทั้งหมด

นำสารที่สกัดได้มา 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่น 4 ไมโครลิตร แล้วเติม titanium reagent (ที่มี 20% titanous tetrachloride ใน HCl เข้มข้น) 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และนำมาวัดโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณเป็นปริมาณ peroxides ทั้งหมดเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ภาพภาคผนวก 2)

3.2 ปริมาณกรดแอสคอร์บิก โดยวิธี 2,6-dichloroindophenol titrimetric method (AOAC, 2000)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

สุ่มตัวอย่างลำไยตามชุดการทดลองจำนวน 3 ผล คั้นน้ำให้ได้ 2 มิลลิลิตร คูดน้ำคั้นเปลือกหรือเนื้อ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วเติมฟีนอล์ฟทาลีน 1% จำนวน 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำสารละลายไปไทเทรตกับ 2,6-dichloroindophenol จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน จึงจดบันทึกปริมาตรของ 2,6-dichloroindophenol ที่ใช้ในการไทเทรตเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอร์บิกตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณกรดแอสคอร์บิก} = \frac{b \times 0.001 \times 100 \times 100}{a \times c}$$

โดยที่ a = ปริมาตรของน้ำคั้นที่ใช้ 2 มิลลิลิตร

b = ปริมาตรของ 2,6-dichloroindophenol ที่ใช้ในการไทเทรตกับสารละลายตัวอย่าง

c = ปริมาตรของ 2,6-dichloroindophenol ที่ใช้ในการไทเทรตกับกรดแอสคอร์บิก
มาตรฐาน

3.3 ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ catalase โดยวิธี UV spectrometer method

(Polle *et al.*, 1994)

วิธีการสกัด

นำเปลือกและเนื้อลำไยมาแยกบดตัวอย่างละ 1 กรัม บดร่วมกับ 3 มิลลิลิตร ของ 100 mM, K_2HPO_4 pH 7 (ที่มี 1 mM, EDTA และ 1% (w/v) PVP) นำไปปั่นแยกโดยเครื่อง centrifuge ที่ 15,000 กรัม เป็นเวลา 20 นาที ได้สารสกัดหยาบ

วิธีวิเคราะห์ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ; CAT (Aebi, 1984)

ใส่บัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร (ที่มี 100 mM, K_2HPO_4 pH 7, 15 mM, H_2O_2 และสารสกัดหยาบที่ปั่นได้จากการสกัดมา 50 ไมโครลิตร) เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองการเปลี่ยนแปลงโปรตีน และระบบแอนติออกซิแดนซ์ของผลลำไยพันธุ์คอรระหว่างการเก็บรักษามวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 6.0

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ Plant Genome ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
3. สถานีวิจัยการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2549