บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง

วัสดุ และอุปกรณ์

1. ถุงพลาสติก
2. เสียม
3. เครื่องวัดความเข้มแสง
4. แผ่นป้าย (label)
5. กล้องถ่ายรูป
6. กระถางปลูกขนาด 4 นิ้ว 6 นิ้ว 10 นิ้ว และ 12 นิ้ว
7. เครื่องปลูกที่มีส่วนผสมของ ขุยมะพร้าว ทราย ใบไม้ผุ และปุ๋ยอินทรีย์ อัตราส่วน 1:1:1:1
8. บัวรดน้ำ
9. ปุ๋ยออสโมโค้ท สูตร 14-14-14
10. ปุ๋ยทางใบ ทวินเฟอร์ตี้ สูตร 21-21-21
11. ยาป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น ไดเทนเอ็ม 45 เมตาแลกซิล เบนเลท รอฟรัล
12. ยาป้องกันกำจัดแบคทีเรีย เช่น แคงเกอร์ เอ๊กซ์
13. เครื่องพ่นสารเคมี
14. วัสดุปลูกสำเร็จรูป ของบริษัทเพื่อนเกษตรกร
15. ถาดย้ายกล้า

วิธีการวิจัย

1. การสำรวจตัวอย่างพืช โดยออกสำรวจป่าที่คาดว่าจะพบบีโกเนียที่มีขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ หรือสภาพที่สมบูรณ์ ในช่วงต้นฤดูฝน ตั้งแต่เดือนเมษายนเป็นต้นไป

2. การเก็บตัวอย่างพืช โดยการขุดต้นบีโกเนียให้ได้ดินกับรากบ้างเล็กน้อย เขียนรายละเอียดชนิดพืช เก็บในถุงพลาสติก ปิดปากถุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3. การเก็บตัวอย่างดิน โดยขุดดินจำนวน 1.5 กิโลกรัม รอบๆ ต้นบีโกเนีย เขียนรายละเอียดเก็บในถุงพลาสติก นำมาผึ่งในร่มให้แห้ง เป็นเวลา 5 วัน นำตัวอย่างดินส่งวิเคราะห์ธาตุอาหารที่ฝ่ายวิเคราะห์ดิน สำนักงานพัฒนาที่ดิน เขต 6 จังหวัดลำปาง

4. การเก็บรักษาตัวอย่างพืช โดยนำตัวอย่างพืชที่ได้จากการสำรวจมาปลูกในกระถาง

5. การบันทึกข้อมูล

- สภาพป่าที่ต้นบีโกเนียขึ้น
- สภาพแวดล้อม เช่น ลักษณะดิน ความสมบูรณ์ของดิน ความเข้มแสง
- สัณฐานวิทยาของพืช เช่น ลักษณะลำต้น ใบ (ภาคผนวกที่ 1) ดอกตัวผู้ ดอกตัวเมีย ผล หัว

การทดลองที่ 2 การศึกษาจำนวนโครโมโซม

วัสดุ และอุปกรณ์

1. รากของบีโกเนียที่เก็บรวบรวมได้ 6 ชนิด
2. ขวดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างราก
3. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
4. เข็มเขี่ย
5. ปากคีบ
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. กล้องจุลทรรศน์
8. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาจำนวนโคร โมโซม

8.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดการสร้างเส้นใย (pre-treatment) ได้แก่ paradichlorobenzene

8.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมน้ำยาหยุดการเจริญของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ (fixative) คือ เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 3 : 1

8.3 เอนไซม์สำหรับย่อยผนังเซลล์ คือเพคติเนส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูเลส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

8.4 สารเคมีสำหรับทำให้เซลล์แยกออกจากกัน (hydrolytic solution) คือ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มอล

8.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมสีโครโมโซม คือ lactopropionic orcein

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างราก เตรียมปลายราก จากส่วนต่างๆของบีโกเนีย เช่น รากที่เริ่มงอกจากเมล็ด รากจากการชำเหง้า กิ่งชำ รากที่งอกจากหัว โดยเก็บตัวอย่างปลายรากในเวลา 7.00-8.00 น. ในวันที่มีแสงแดดปกติ นำตัวอย่างมาล้างในน้ำสะอาด 3 ครั้ง

2. การหยุดการเจริญของเส้นใย โดยแช่รากในสารละลาย paradichlorobenzene เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เพื่อตรึงเนื้อเยื่อปลายรากให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวที่ระยะเมทาเฟส

3. การรักษาสภาพเซลล์ หลังจากแช่รากใน paradichlorobenzene ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น นำรากไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์นาน 5 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น

4. การย่อยผนังเซลล์ นำรากที่ได้จากข้อ 3 นำไปย่อยผนังเซลล์โดยใช้เอนไซม์ เพคติเนส 1 เปอร์เซ็นต์ และเซลลูเลส 1 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที

5. การแยกเซลล์ แยกเซลล์โดยแช่รากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ล้างรากด้วยน้ำกลั่น

6. การขยี้เนื้อเยื่อ ขยี้เนื้อเยื่อปลายรากบนแผ่นสไลด์ หยดสี lactopropionic orcein ปิดสไลด์ด้วยแผ่นแก้วสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ใช้กระดาษซับวางบนแผ่นสไลด์บริเวณที่ปิดแผ่นสไลด์ กดหัวแม่มือลงไปเพื่อให้เซลล์กระจายและเพื่อซับสีที่มากเกินไปออก

7. การเก็บแผ่นสไลด์ เก็บแผ่นสไลด์จากข้อ 6 ที่ได้ในกล่องพลาสติกนาน 6-12 ชั่วโมงโดยให้ความชื้นที่บริเวณด้านใต้ของสไลด์เพื่อให้สีติดเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น

8. การบันทึกข้อมูล นำแผ่นสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกเซลล์ที่มีการแบ่งตัวในระยะเมทาเฟส โดยเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายไม่ทับกัน นับจำนวนโครโมโซม บันทึกภาพ

9. การวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลของจำนวนโครโมโซมของบีโกเนียแต่ละชนิดมาหาค่าฐานนิยม (mode) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของสภาพความยาวของวันที่มีต่อการเจริญและการออกดอกของบีโกเนีย

วัสดุ และอุปกรณ์

1. ต้นบีโกเนีย (*Begonia yunnannensis*) ที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน จำนวน 15 ต้น
2. กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว
3. พลาสติกสีดำสำหรับคลุมเพื่อให้พืชได้รับวันสั้น
4. หลอดไฟฟ้าขนาด 60 วัตต์
5. เครื่องควบคุมเวลาการปิด-เปิดไฟ
6. เทอร์โมมิเตอร์
7. ไม้บรรทัด
8. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา
    - 8.1 เครื่องตัดล้อหมุน (rotary microtome)
    - 8.2 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
    - 8.3 ตู้อบ (hot air oven)
    - 8.4 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
    - 8.5 ขวดแก้ว
    - 8.6 ขวดแก้วสำหรับย้อมสี (staining jar)
    - 8.7 มีดผ่าตัด
    - 8.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์
    - 8.9 เข็มเขี่ย
    - 8.10 แท่งไม้สำหรับยึดเนื้อเยื่อที่ฝังพาราฟิน
    - 8.11 ปากคีบ
9. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา
    - 9.1 เอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
    - 9.2 เอธิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์
    - 9.3 เอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์
    - 9.4 ฟอร์มาลีน
    - 9.5 กรดกลาเซียลอะซีติก

9.6 ทีบีเอ (tertiary butyl alcohol = TBA)

9.7 พาราฟิน (paraffin)

9.8 พาราพลาสต์ (paraplast)

9.9 อัลบูมิน (albumin)

9.10 ไซลีน (xylene)

9.11 สีดาลาฟิลด์ฮีมาทอกซิลิน (dalafield's hematoxylin)

9.12 สารตัวกลาง คานาดา บาลซัม (Canada balsam)

วิธีการวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) มี 3 กรรมวิธี คือ สภาพความยาวของวัน 3 ระดับ ได้แก่ วันธรรมชาติ วันสั้น และวันยาว แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง

2. การเตรียมต้นพืชทดลอง เตรียมต้นพันธุ์บีโกเนียที่เก็บรวบรวมได้ 1 พันธุ์ จำนวน 15 กระถาง ปลูกในกระถาง กระถางละ 1 ต้น โดยใช้วัสดุปลูกสำเร็จรูป เบอร์ 1 ของบริษัทเพื่อนเกษตรกร และทรายอัตราส่วน 1:1 จัดให้ได้รับสภาพวันธรรมชาติ 5 กระถาง สภาพวันสั้น 5 กระถาง และสภาพวันยาว 5 กระถาง

3. การควบคุมความยาวของวัน สภาพวันธรรมชาติ คือพืชได้รับแสงตามธรรมชาติ ไม่มีการเพิ่มหรือลดแสง สภาพวันสั้น คือพืชได้รับแสงตามธรรมชาตินานเพียง 10 ชั่วโมงต่อวัน ระหว่างเวลา 8.00–18.00 น. ส่วนสภาพวันยาว คือพืชได้รับแสงตามธรรมชาติและเพิ่มแสงตอนกลางของช่วงมืด ระหว่างเวลา 22.00–01.00 น.

4. การบันทึกข้อมูล หลังจากปลูกเลี้ยงต้นบีโกเนีย โดยควบคุมความยาวของวัน 3 สภาพ คือ สภาพวันธรรมชาติ สภาพวันสั้น และสภาพวันยาว เป็นเวลา 10 20 30 40 50 และ 60 วัน บันทึกข้อมูลดังนี้

4.1 ความสูง วัดความสูงของต้นจากผิวดินถึงปลายพุ่ม

4.2 จำนวนกิ่ง นับจำนวนกิ่งทั้งหมดของต้น

4.3 จำนวนใบ นับจำนวนใบทั้งหมดของต้น

4.4 จำนวนช่อดอก นับจำนวนช่อดอกทั้งหมดของต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลของความสูง จำนวนกิ่ง จำนวนใบ และจำนวนช่อดอกมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม Statistix version 3.5

5. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยศึกษาจากตายอดหลังจากได้ทำการทดลองไปแล้ว 6 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างจากปลายยอดของพืชทดลองจากแต่ละกรรมวิธี นำมาศึกษาตามวิธีการ paraffin embedding technique ของ Johansen (1940) ดังนี้

5.1 เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยตัดชิ้นส่วนปลายยอดพืชทดลอง นำไปแช่ในน้ำยาที่ทำให้หยุดการทำงานของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ด้วยน้ำยา FAA (ภาคผนวกที่ 2)

5.2 แทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ โดยการผ่านเนื้อเยื่อจาก FAA เริ่มจากใช้น้ำยาที่มีระดับของแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำคือ 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วเพิ่มความเข้มข้นเป็น 70 85 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.3 ซึมผ่านพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช โดยใช้ส่วนผสมของ TBA กับพาราฟินเหลว อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง

5.4 นำส่วนผสมจากข้อ 5.3 มาเทรวมกับพาราพลาสต์ที่หลอมไว้ล่วงหน้าให้มีอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร นำไปอบในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 56-58 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.5 เปลี่ยนมาใช้พาราพลาสต์ที่หลอมไว้ล่วงหน้า เก็บไว้ในตู้อบนาน 1 สัปดาห์

5.6 ฝังชิ้นส่วนของพืชในพาราพลาสต์เก็บไว้ในตู้เย็น

5.7 นำชิ้นส่วนที่ฝังในพาราพลาสต์มาตัดด้วยเครื่องตัดล้อหมุน ให้มีความหนา 10 ไมครอน

5.8 นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดได้ติดบนกระจกสไลด์ด้วยอัลบูมิน แล้วนำสไลด์ไปอุ่นบนเครื่องอุ่นสไลด์ เพื่อให้เนื้อเยื่อตึง

5.9 นำแผ่นสไลด์ไปย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี ดาลาฟิลด์ ฮีมาทอกซิลิน โดยผ่านขั้นตอนการละลายพาราพลาสต์ ออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้ xylene หลังจากนั้นนำไปย้อมสีแล้วปิดแผ่นสไลด์โดยใช้คานาดา บาลซัม เป็นตัวยึดแผ่นสไลด์ถาวร

5.10 การบันทึกข้อมูล โดยนำแผ่นสไลด์ไปศึกษาการพัฒนาของตายอดและบันทึกภาพไว้

การทดลองที่ 4 อิทธิพลของความเข้มแสงที่มีต่อการเจริญเติบโตของบีโกเนีย

วัสดุ และอุปกรณ์

1. ตู้ growth chamber
2. ตาข่ายพลาสติกดำเพื่อพรางแสง
3. กระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว
4. ต้นบีโกเนีย (*Begonia* sp.) จำนวน 15 ต้น
5. เทอร์โมมิเตอร์
6. เครื่องวัดแสง
7. ไม้บรรทัด
8. ปุ๋ยออสโมโค้ท สูตร 14-14-14

วิธีการ

1. การแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยมี 3 กรรมวิธี คือความเข้มแสง 3 ระดับ ได้แก่ 720 4,900 และ 9,200 ลักซ์ แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง

2. การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง เพาะเมล็ดบีโกเนีย โดยใช้วัสดุปลูกสำเร็จรูปของบริษัทเพื่อนเกษตรกร และทรายหยาบ อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร เมื่อต้นมีอายุ 4 เดือน ย้ายปลูกในกระถางขนาด 6 นิ้ว

3. การควบคุมความเข้มแสง ความเข้มแสง 9,200 ลักซ์ อยู่ภายใต้โรงเรือนพรางแสง ส่วนความเข้มแสง 4,900 และ 720 ลักซ์ ใช้ตาข่ายพลาสติกสีดำบุภายในตู้ growth chamber ให้ได้ความเข้มแสงที่ต้องการ

4. การบันทึกข้อมูล หลังจากปลูกเลี้ยงต้นบีโกเนียภายใต้สภาพโรงเรือนพรางแสง ความเข้มแสง 9,200 ลักซ์ และในตู้พรางแสง ความเข้มแสง 4,900 และ 720 ลักซ์ เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน วัดความเข้มแสงในเวลา 12.00 น. ในวันที่มีแสงแดดเต็มที่ ข้อมูลที่บันทึกได้แก่

4.1 ความสูง วัดความสูงของต้นจากผิวดินถึงปลายพุ่ม

4.2 จำนวนใบ นับจำนวนใบทั้งหมดของต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลของความสูงและจำนวนใบ มาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้โปรแกรม Statistix version 3.5 และนำค่าเฉลี่ยของความสูงกับความเข้มแสง ค่าเฉลี่ยของจำนวนใบกับความเข้มแสง มาหาความสัมพันธ์ในลักษณะเชิงเส้น

การทดลองที่ 5 การจำแนกบีโกเนียโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิส

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างใบแก่ของบีโกเนียที่เก็บรวบรวมได้ 6 ชนิด
2. สารเคมี
   - 2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ extraction buffer มีดังนี้
     - phosphate buffer 0.1 M pH 7.5
     - polyvinyl – pyrrolidone (PVP) 5 %
   - 2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของเจลมีดังนี้
     - acrylamide stock solution (acrylamide 28 กรัม และ bis-acrylamide 0.74 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เก็บไว้ในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส)
     - Tris-chloride buffer pH 8.9 (กรองและเก็บไว้ในขวดสีชา)
     - Tris-chloride buffer pH 6.7 (กรองและเก็บไว้ในขวดสีชา)
     - ammonium persulfate (APS) เตรียมทันทีก่อนใช้
   - 2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ marker dye solution
     - glycerol
     - Tris-chloride buffer pH 6.7
     - bromophenol blue
   - 2.4 สารเคมีที่ใช้เป็น electrode buffer
     - Tris
     - glycine
     - NaOH
     - น้ำกลั่น

2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

- phosphate buffer 0.1 M pH 6.0
- fast blue B Salt
- α-naphthyl acetate
- absolute alcohol
- 3-amino–9– ethylcarbazole
- β-naphthol
- acetone
- Tris buffer 0.1 M pH 4
- Tris–(hydroxymethyl) aminomethane
- acetic acid
- hydrogen peroxide 3% (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

3. เครื่องทำความเย็น ตู้เย็นและตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
4. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบชนิดแผ่น (slab gel electrophoresis)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refrigerated centrifuge)
6. เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. โกร่งบดตัวอย่าง
9. หลอดใส่สารขนาดเล็ก (eppendrof tube) ขนาด 5 มิลลิลิตร
10. Micro syringe
11. Micropipette ชนิดปรับปริมาตรได้ model piperman
12. เครื่อง degasser
13. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูป ฯลฯ

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช คือ เลือกใบแก่ที่สะอาดไม่เป็นโรค เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม stock สารละลาย (ภาคผนวกที่ 3)

3. การสกัดเอนไซม์

3.1 นำใบแก่ที่ตัดเส้นใบออกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วสกัดด้วย phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 + 5 % polyvinyl-pyrrolidone (PVP) โดยใช้ตัวอย่าง 1.00 กรัม ต่อสารละลาย 1.00 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบดในโกร่งที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 นำตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 3.1 ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แยกสารละลายใสด้านบนที่ได้ใส่ใน eppendrof tube ที่สะอาด เก็บในตู้แช่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis

4. การเตรียม slab gel

4.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจล ตามความต้องการ (0.75 – 1.00 มิลลิเมตร) คำนวณปริมาณของเจลที่จะให้โดยจะใส่ stacking gel (upper gel) เหนือ separating gel (lower gel)

4.2 เทสารละลายของเจล 8.5 % ที่ยังไม่ได้ polymerize ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ให้สูง 12.5 ซม. จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำที่คลุมผิวเจลได้ชัดเจน

4.3 ค่อยๆ ล้างส่วนของ seperating gel ด้วยน้ำกลั่น แล้วเท stacking gel ลงบน seperating gel สอด comb ลงใน gel plate ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของหวี ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

4.4 ดึงหวีออกจาก stacking gel หยอดน้ำกลั่นลงในช่องซึ่งเกิดขึ้นหลังจากดึงหวีออก เพื่อล้างช่องนั้น หลังจากนั้นดูดน้ำกลั่นออกจนเห็นช่องว่างเหล่านั้นชัดเจน

5. การทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

5.1 ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer ลงใน chamber

5.2 ใส่ตัวอย่างเอนไซม์ที่ผสม marker dye solution ลงในช่องบน stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อยๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่องเจล

5.3 ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่างและขั้วลบเข้ากับ chamber บน และเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสที่ 200 โวลต์

5.4 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อเวลาผ่านไป 3-4 ชั่วโมง สีของ bromophenol blue จะเคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล

5.5 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบน plate เพื่อย้อมเอนไซม์ต่อไป

6. การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์แต่ละชนิด เทลงบน plate ที่มีเจลอยู่ นำไปเก็บในที่มืดในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีจนปรากฏแถบสี

7. การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนของไอโซไซม์ สามารถกำหนดตำแหน่ง จำนวน ขนาดของแถบสีที่เกิดขึ้น บันทึกภาพถ่ายของแถบสีที่ปรากฏบนเจล เขียนแผนภาพ (zymogram) จากแถบโปรตีนของไอโซไซม์แต่ละชนิด แสดงค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ของแถบโปรตีนของไอโซไซม์ทั้งหมด

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