บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุ

1.1.1 พืชทดลอง

กล้วยไม้รองเท้านารี 11 ชนิด คือ *Paphiopedilum bellatulum* (Reichb. f.) Stein, *P. callosum* (Reichb. f.) Stein, *P. charleswortii* (Rolfe) Pfitzer, *P. concolor* (Lindl.) Pfitzer, *P. exul* (Ridley) Rolfe, *P. godefroyae* (Godefroy – Lebeuf) Stein, *P. hirsutissimum* (Lindl. Ex Hook.) Stein, *P. niveum* (Reichb. F.) Stein, *P. parishii* (Reichb. f.) Stein, *P. villosum* (Lindl.) Stein และ *P.* x *ang-thong* (ลูกผสมตามธรรมชาติ) ซึ่งปลูกเลี้ยงที่สถานีวิจัย และฝึกอบรม ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

1.1.2 สารเคมี

1.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสารสกัด (extraction buffer) มีดังนี้

- 0.1 M Tris-HCl pH 7
- 0.001 M Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)
- 0.002 M Dithiothreitol (DTT)
- 0.01 M β-Mercaptoethanol (MSH)
- 1 % Polyvinylpyrrolidone M.W. 360,000 (PVP-360)

1.1.2.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel มีดังนี้

- acrylamide stock solution 30 % (acrylamide 30 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8
- 3 M Tris-HCl pH 8.8
- Ammonium persulfate (APS) 1.5 % เตรียมทันทีก่อนใช้
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)

1.1.2.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ tracking dye มีดังนี้

- Glycerol 50 %
- Bromphenol blue 0.5 %
- Sucrose 40 %

1.1.2.4 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ running buffer มีดังนี้

- 0.025 M Tris
- 0.192 M Glycine pH 8.4

1.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

- 0.1 M Tris-HCl pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5
- 0.05 M Tris-HCl pH 8.0
- 0.1 M Na-phosphate pH 6.0
- 0.2 M Na-phosphate pH 7.0
- 0.1 M Na-acetate pH 5.0
- 0.05 M Citric acid pH 6.0
- 1 M Calcium chloride
- 1 M Magnesium chloride
- 2, 6-Dichlorophenol-indophenol (DCIP)
- 3-Amino-9-ethylcarbazol
- α-Ketoglutaric acid
- α-D-Glucose
- α-Naphthyl acetate
- β-Naphthol
- β-Naphthyl acetate
- β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP)
- β-Nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD)
- β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (β-NADH)
- L-Aspartic acid
- L-Glutamic acid
- L-Leucine β-naphthylamide, HCl
- L-Malic acid

- o-Dianisidine salt
- Acetaldehyde
- Acetic acid
- Acetone
- cis-Aconitic acid
- Arsenic acid, sodium salt
- Dithiothreitol (DTT)
- EDTA
- Ethanol
- Fast Blue BB salt
- Fast Garnet GBG salt
- Formic acid, sodium salt
- Fructose-1,6-bisphosphate
- Fructose-6-phosphate
- Glucose-1-phosphate, disodium salt
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- Hydrogen peroxide
- Isocitric dehydrogenase
- Isocitric acid
- Naphthol AS-BI phosphate, sodium salt
- Nitro blue tetrazolium (NBT)
- Phenazine methosulfate (PMS)
- Riboflavin
- Pyridoxal-5'-phosphate
- Shikimic acid
- Tetrazolium thiazolyl blue (MTT)
- Urea

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา

- อุปกรณ์ใช้วัด และจดบันทึก
- ป้าย และลวดสายโทรศัพท์
- กล้องถ่ายภาพ และฟิล์ม

1.2.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

- เครื่องชั่งแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge)
- เครื่องทำน้ำแข็ง ตู้เย็น และตู้แช่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
- ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส Mini-Protean®II (Bio-Rad)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น POWER PAC 300 (Bio-Rad)
- ตู้บ่ม (incubator)
- เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่องดูดอากาศ (degasser)
- ไนโตรเจนเหลว และถังบรรจุ
- ไมโครปิเปตชนิดที่ปรับปริมาตรได้
- หลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (eppendorf tube)
- หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร
- ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)
- เครื่องแก้วแบบต่างๆ
- อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กล้องถ่ายภาพพร้อมฟิล์ม ขาตั้งกล้อง ช้อนตักสาร ใบมีดโกน ปากกาเขียนแก้ว ถุงมือ ฯลฯ

2. วิธีวิจัย

การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา และรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลรองเท้านารี แบ่งการทดลองดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 บันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของรองเท้านารีชนิดที่ทำการศึกษา ทำการบันทึกลักษณะต่างๆที่สังเกตได้ของ ต้น ใบ และดอก

การทดลองที่ 2 การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การทดลองนี้ แบ่งเป็นการทดลองย่อยดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์

เปรียบเทียบวิธีการสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างพืช 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 นำใบที่หนึ่งจากยอดของกล้วยไม้รองเท้านารี ที่เป็นต้นเดียวกับที่ใช้บันทึกในการทดลองที่ 1 มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ชั่งใบมา 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลว แล้วบดตัวอย่างจนละเอียดเป็นผง จากนั้นเติมน้ำยาสกัดที่แช่เย็นจัดตามสูตรของ Apavatjrut *et al.* (1999) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 % w/v PVP-10, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol 1.5 มิลลิลิตร แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แล้วดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ แช่ในน้ำแข็งระหว่างรอเพื่อทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 2 ขั้นตอนการสกัดเหมือนกรรมวิธีที่ 1 แต่ดัดแปลงน้ำยาสกัดเป็น 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.2 pH ของน้ำยาสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบ pH น้ำยาสกัดเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 5 กรรมวิธี คือ pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 ส่วนประกอบอื่นเหมือนกรรมวิธีที่ 2 ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.3 เนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของต้น 5 ส่วน คือ ใบ (ตำแหน่งที่ 3 จากยอด) ใบอ่อน (ตำแหน่งที่ 1 จากยอด) ดอก (บานเต็มที่) ดอกอ่อน (ดอกตูม) และราก นำตัวอย่างของแต่ละส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งแต่ละตัวอย่างมา 0.5 กรัม นำมาสกัดด้วยน้ำยาสกัดที่ได้จากการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.4 น้ำหนักชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบน้ำหนักสดจากเนื้อเยื่อที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2.3 โดยเปรียบเทียบน้ำหนัก 3 กรรมวิธี คือ 0.25, 0.5, และ 0.75 กรัม นำมาสกัดด้วยน้ำยาสกัดที่ได้จากการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.5 ความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบความเข้มข้นของ separating gel ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 11 และ 12 % ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 2.1 ถึง 2.5 ใช้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) เป็นวัสดุทดลองย้อมสีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ MDH, GOT, EST และ LAP โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ทุกการทดลอง ดำเนินการบันทึกข้อมูลโดยเปรียบเทียบจำนวน ขนาด และความคมชัดของแถบสีในแต่ละกรรมวิธี เพื่อเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการทดลองที่ 3

การทดลองที่ 3 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาศึกษารูปแบบไอโซไซม์กับกล้วยไม้รองเท้านารี 11 ชนิด คือ *P. bellatulum*, *P. callosum*, *P. charlesworthii*, *P. concolor*, *P. godefroyae*, *P. exul*, *P. hirsutissimum*, *P. niveum*, *P. parishii*, *P. villosum* และ *P.* x *ang-thong* โดยวิเคราะห์เอนไซม์ 20 ระบบ คือ acid phosphatase (ACP), alcohol dehydrogenase (ADH), alkaline phosphatase (ALP), diaphorase (DIA), esterase (EST), formate dehydrogenase (FDH), glucose dehydrogenase (GDH), glutamate dehydrogenase (GLD), glutamic-oxaloacetate transminase (GOT), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), shikimate dehydrogenase (SKD), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), leucine aminopeptidase (LAP), aconitase (ACO), phosphoglucoisomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM) และ urease (URE) โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น และทำการทดลอง 2 ครั้ง

วิธีทดลองในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ มีดังนี้

1. การสกัดเอนไซม์

   ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 1 ของการทดลองที่ 2.1

2. การเตรียม slab gel

2.1 ประกอบชุดแผ่นกระจกของชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส Mini-Protean®II (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน

2.2 นำสารละลาย separating gel (การเตรียมสารละลายอยู่ในภาคผนวก) มาหยอดลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ เหลือที่ว่างด้านบนไว้ประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจล และน้ำ

2.3 ดูดน้ำออก แล้วเติมสารละลาย stacking gel (การเตรียมอยู่ในภาคผนวก) พร้อมกับเสียบหวี (comb) ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศในช่องที่เสียบหวี ทิ้งไว้ประมาณ 60 นาที เมื่อเจลแข็งตัว ดึงหวีออกจะเห็นเป็นช่อง (well) แล้วล้างช่อง ด้วยน้ำกลั่น

3. การทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

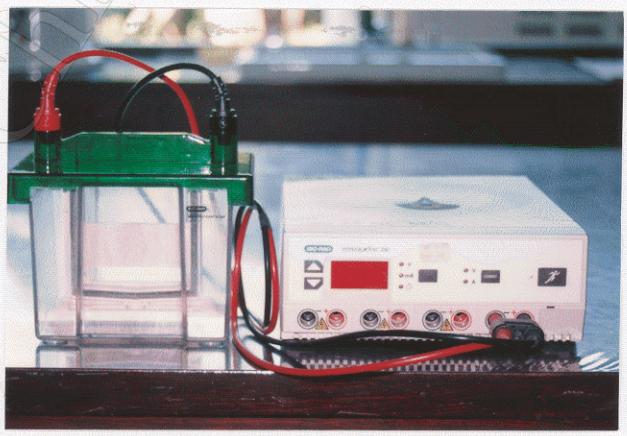
3.1 ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber 500 มิลลิลิตร

3.2 หยอดตัวอย่างที่ผสมกับ tracking dye ในอัตราส่วน 50 : 1 ลงในช่องของ stacking gel ปริมาตร 28 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย

3.3 ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟ เปิดสวิทช์ ตั้งค่ากระแสคงที่ที่ 14 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ stacking gel และ 24 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ separating gel แล้วดำเนินการผ่านกระแส

3.4 ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อ tracking dye เคลื่อนที่ลงมาถึงปลายด้านล่างของเจล

3.5 นำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลออกจากแผ่นกระจก ตัดมุมของเจลเพื่อทำเป็นเครื่องหมาย แล้วนำมาวางบนจานแก้ว (plate) เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป



ภาพ 1 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส Mini-Protean®II (Bio-Rad)

4. การย้อมสีเอนไซม์

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ชนิดต่างๆ รอจนเกิดแถบสี แล้วล้างสีส่วนเกินออก

5. การบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 นำเจลที่เกิดแถบสีมาบันทึก ค่าระยะทางของ tracking dye พร้อมทั้งบันทึกตำแหน่ง ขนาด จำนวนของแถบสี และรูปแบบการเกิดแถบสีของเอนไซม์แต่ละชนิด

5.2 นำระยะทางการเคลื่อนที่ (ตำแหน่ง) มาคำนวณหาค่า การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration)

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ tracking dye}}$$

5.3 การวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) ด้วยรูปแบบไอโซไซม์ กำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit และแถบสีเป็นลักษณะ (character) โดยค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากการมีแถบสีหรือไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่าง แล้วแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าไม่มีแถบสีเป็น 0 นำค่าที่ได้นี้มาวิเคราะห์ผลด้วย UPGMA cluster โดยใช้โปรแกรม SPSS

สถานที่ดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

สถานีวิจัย และฝึกอบรม ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เคมี เรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการโครงการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU-AgBiotech) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

เดือนมีนาคม 2543 - เดือนพฤศจิกายน 2545