บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ผลิตเมล็ดพันธุ์แท้

ปลูกมะระขี้นกสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ (accession number) ซึ่งนำมาจากศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตรได้แก่ สายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 นำเมล็ดพันธุ์มะระขี้นกที่ได้มาปลูก ณ แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2544 ถึงวันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2544

1.1 การเตรียมต้นกล้า

ตัดส่วนปลายของเปลือกหุ้มเมล็ดมะระขี้นกลึกประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จากนั้นนำเมล็ดไปจุ่มในน้ำเดือด (อุณหภูมิประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วินาที หลังจุ่มน้ำเดือดครบเวลาที่กำหนดรีบนำเมล็ดจุ่มลงในน้ำที่อุณหภูมิห้องทันทีและแช่เมล็ดไว้ในน้ำประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำเมล็ดไปเพาะโดยเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษเพาะชื้น ซึ่งน้ำที่ใส่ลงในกระดาษเพาะควรใส่ยากันเชื้อราด้วย จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มีความชื้น เมื่อเมล็ดงอก (ประมาณ 7 วันหลังเพาะเมล็ด) ย้ายลงถาดหลุมที่มีวัสดุเพาะกล้า และ เมื่อต้นกล้ามีใบจริงจำนวน 2 ใบ (ประมาณ 20-25 วันหลังเพาะเมล็ด) จึงย้ายลงในแปลงปลูก

1.2 การปลูก และดูแลรักษา

เตรียมแปลงปลูก 12 แปลง ขนาด 4 × 7.5 เมตร ปลูกทั้งหมด 4 แถว ๆ ละ 5 ต้น ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร ระยะห่างระหว่างต้น 1.5 เมตร โดยนำปุ๋ยคอกเก่าใส่ในอัตรา 0.5 กิโลกรัมต่อหลุมและปุ๋ยสูตร 15-15-15 ใส่ในอัตรา 1 ช้อนโต๊ะ (15 กรัม) ลงคลุกกับดินเพื่อรองพื้นก่อนปลูก เมื่อต้นกล้ามะระขี้นกอายุได้ 30 วันหลังปลูกจนถึงเริ่มออกดอกให้ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือสูตร 16-16-16 โดยใส่ในอัตรา 1 ช้อนโต๊ะ (15 กรัม) ต่อหลุมและรดน้ำหลังจากใส่ปุ๋ยทุกครั้ง ให้น้ำเช้าและเย็นโดยใช้สายยาง ใช้สารฆ่าแมลงและสารกำจัดเชื้อราฉีดพ่นป้องกันโรค และแมลงเมื่อมีแมลงรบกวน และโรคราน้ำค้างและงดฉีดยา 15 วันก่อนเก็บตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์โปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตัน กำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานคนเมื่อมีวัชพืชโดยเฉลี่ยประมาณ 3-4 ครั้งต่อการปลูกหนึ่งฤดูกาล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การผสมเกสร

ทำการผสมตัวเอง (self-pollination) โดยการคลุมดอกเพศเมียของมะระขี้นกด้วยถุงกระดาษและหนีบดอกเพศผู้ที่ยังไม่บานด้วยลวดอะลูมิเนียมวิธีนี้จะทำในเวลาเย็นของวันก่อนดอกบาน (ดอกเพศเมียและดอกเพศผู้พร้อมที่จะผสมเกสร) 1 วัน ซึ่งการผสมเกสรนั้นจะทำในเวลาเช้าประมาณ 7.30-11.00 นาฬิกาของทุกวัน หลังจากผสมเกสรแล้วติดป้ายวันที่ทำการผสม

1.4 เก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์

เก็บเมล็ดพันธุ์จากผลสุกแก่ มีสีส้ม และผ่านการผสมตัวเอง เพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ ผ่าผลมะระขี้นกแล้วนำเมล็ดมะระขี้นกที่ถูกหุ้มด้วยเยื่อสีแดงใส่ในถุงตาข่ายไนลอนล้างเนื้อเยื่อสีแดงออกจากเมล็ดด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นนำเมล็ดที่ได้ไปผึ่งให้แห้งในที่ที่พรางแสงประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน โดยเมล็ดที่ได้หลังจากตากแห้งแล้วมีลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ดสีเข้มมากกว่าเมล็ดที่ยังไม่ได้ตากแห้งจากนั้นนำเมล็ดที่ได้เก็บไว้ที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ (10-12 องศาเซลเซียส)

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบพันธุ์มะระขี้นก

2.1 แบบและวิธีการทดลอง

เตรียมแปลงทั้งหมด 12 แปลง ขนาด 4×7.5 เมตร ปลูกทั้งหมด 4 แถว ๆ ละ 5 ต้น ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร ระยะห่างระหว่างต้น 1.5 เมตร วางแผนการทดลองสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (randomized complete block design; RCBD) โดยให้มะระขี้นกสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ เป็นกรรมวิธี มี 3 ซ้ำ (block) ปลูกทดสอบ ณ แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 29 สิงหาคม พ.ศ. 2545

2.2 การปลูกและดูแลรักษา

เตรียมแปลงปลูก 12 แปลง ขนาด 4 × 7.5 เมตร ปลูกทั้งหมด 4 แถว ๆ ละ 5 ต้น ระยะห่างระหว่างแถว 1 เมตร ระยะห่างระหว่างต้น 1.5 เมตร โดยนำปุ๋ยคอกเก่าใส่ในอัตรา 0.5 กิโลกรัมต่อหลุมและปุ๋ยสูตร 15-15-15 ใส่ในอัตรา 1 ช้อนโต๊ะ (15 กรัม) ลงคลุกกับดินเพื่อรองพื้นก่อนปลูก เมื่อต้นกล้ามะระขี้นกอายุได้ 30 วันหลังปลูกจนถึงเริ่มออกดอกให้ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 โดยใส่ในอัตรา 1 ช้อนโต๊ะ (15 กรัม) ต่อหลุมและรดน้ำหลังจากใส่ปุ๋ยทุกครั้ง ให้น้ำเช้าและเย็นโดยใช้สายยาง พ่นสารป้องกันกำจัดโรคและแมลง ตามความจำเป็นและเหมาะสม งดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว 7 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลของแต่ละสายพันธุ์ (รูป 2) ดังนี้

- ใบ ได้แก่ ลักษณะปลายใบ สีใบ จำนวนแฉกของใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ ความยาวก้านใบ เก็บตัวอย่าง 10 ใบต่อซ้ำรวม 30 ใบต่อสายพันธุ์
- ดอกได้แก่ วันออกดอก 50% และตำแหน่งข้อที่ดอกเพศเมียดอกแรกบาน เก็บตัวอย่าง 5 ต้นต่อซ้ำรวม 15 ต้นต่อสายพันธุ์ ส่วนจำนวนดอกตัวเมียต่อต้น และจำนวนดอกตัวผู้ต่อต้น เก็บตัวอย่าง 6 ต้นต่อซ้ำรวม 18 ต้นต่อสายพันธุ์
- ผล ได้แก่ สีผล เก็บตัวอย่าง 10 ตัวอย่างต่อซ้ำรวม 30 ตัวอย่างต่อสายพันธุ์ ความยาวผล เส้นผ่าศูนย์กลางผล ความหนาเนื้อ ความยาวก้านผล ความยาวก้านผลถึงใบประดับไร้ก้าน (sessile bract) ขนาดใบประดับไร้ก้าน เก็บตัวอย่าง 12 ผลต่อซ้ำรวม 36 ผลต่อสายพันธุ์
- ผลผลิต ได้แก่ จำนวนผลต่อต้น และน้ำหนักต่อไร่เก็บตัวอย่าง 6 ต้นต่อซ้ำรวม 30 ต้นต่อสายพันธุ์ น้ำหนักสดต่อผล เก็บตัวอย่าง 10 ผลต่อซ้ำรวม 30 ผลต่อสายพันธุ์ จำนวนผลสดต่อครั้งที่เก็บ ผลผลิตต่อไร่
- ความยาวเถา และจำนวนกิ่งแขนง เก็บตัวอย่าง 10 ต้นต่อซ้ำรวม 30 ต้นต่อสายพันธุ์

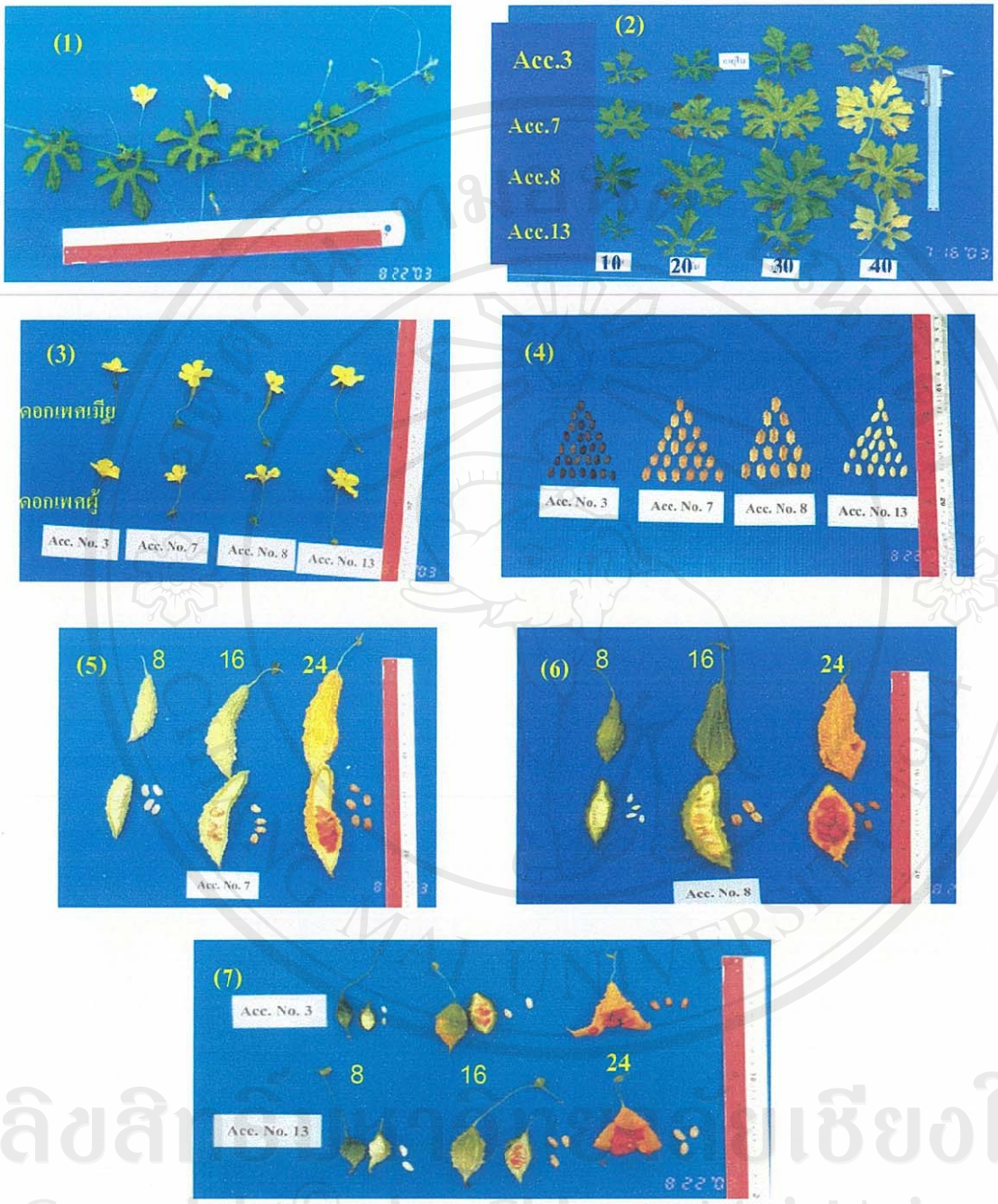
หมายเหตุ:

ผลผลิตปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันต่อไร่ [1]

$$= \left| \begin{array}{l} \text{จำนวนเมล็ดต่อผล} \times \text{จำนวนผลต่อต้น} \times \text{จำนวนครั้งที่เก็บ} \times \\ \text{ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันของเอนโดสเปิร์มที่อายุ} \\ \text{24 วันหลังดอกบาน} \end{array} \right| \times 1600$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

[1] พื้นที่เก็บเกี่ยว คือ 9 ตารางเมตร, โดย 1 ไร่มี 1600 ตารางเมตร



รูป 2 รูปมะระขี้นก (1) ต้น (2) ใบระยะ10, 20, 30 และ 40 วันหลังใบคลี่ (3) ดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย (4) เมล็ด (5) ผลเบอร์ 7 ที่ 8, 16 และ 24 วันหลังดอกบาน (6) ผลเบอร์ 8 ที่ 8, 16 และ 24 วันหลังดอกบาน (7) ผลเบอร์ 3 และเบอร์ 13 ที่ 8, 16 และ 24 วันหลังดอกบาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดสี

การวัดสีผิวภายนอกของผลและใบในมะระขี้นก โดยใช้เครื่องวัดสี Minolta CR-300 Model : DP-301 เครื่องวัดสีมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหัววัดขนาด 8 มิลลิเมตร การวัดสีแสดงค่าเป็น L*, a* และ b* (รูป 3) ซึ่งนำไปคำนวณหาค่า chroma และ hue angle (h°)

ค่า L* แสดงความสว่างเมื่อมีค่าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าใกล้ 0

ค่า a* เป็นบวกแสดงว่าผลผลิตมีสีแดง ค่า a* เป็นลบแสดงว่าผลผลิตมีสีค่อนไปทางสีเขียว

ค่า b* เป็นบวกแสดงว่าผลผลิตมีสีเหลือง ค่า b* เป็นลบแสดงว่าผลผลิตมีสีน้ำเงิน

ค่า chroma เป็นค่าที่แสดงถึงความอิ่มตัวของสีจากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

$$\text{chroma (C)} = ((a^* \times a^*)+(b^* \times b^*))^{1/2}$$

ค่า hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา หาได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{hue angle } (h^{\circ}) = \text{arctangent } b^*/a^*$$

$$\text{THETA} = (\text{ATAN}(b^*/a^*)/6.2832) \times 360$$

ถ้า $a^* > 0$ และ $b^* \geq 0$ เพราะฉะนั้น h = THETA

ถ้า $a^* < 0$ และ $b^* \geq 0$ เพราะฉะนั้น h = 180+THETA

ถ้า $a^* < 0$ และ $b^* < 0$ เพราะฉะนั้น h = 180+THETA

ถ้า $a^* > 0$ และ $b^* < 0$ เพราะฉะนั้น h = 360+THETA

ค่า h° เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ (รูป 4) คือ

0°- 45° แสดงสีม่วงถึงสีส้มแดง

45°- 90° แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง

90°- 135° แสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว

135°- 180° แสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว

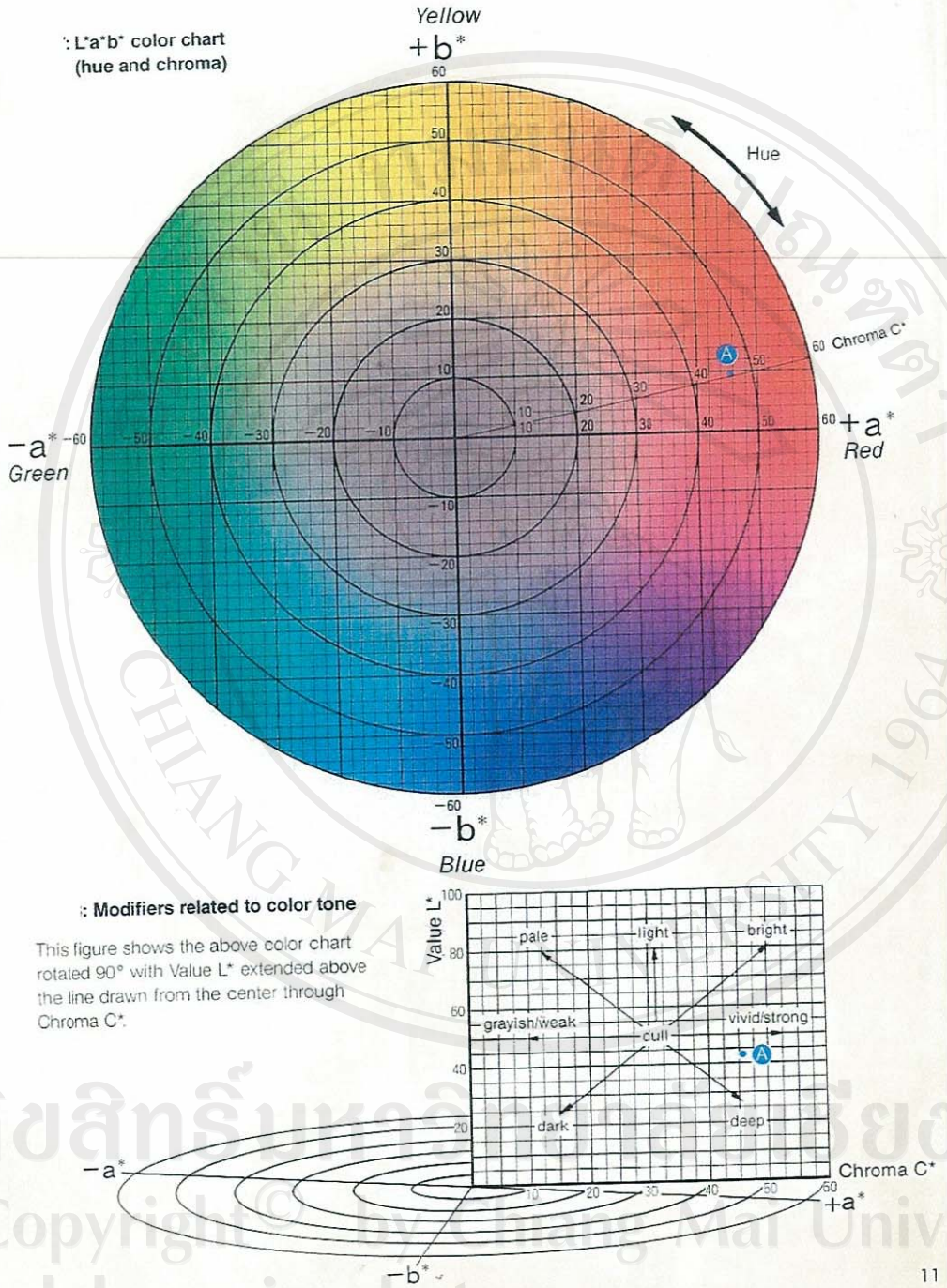
180°- 225° แสดงสีเขียวแดงถึงสีน้ำเงินเขียว

225°- 270° แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน

270°- 315° แสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง

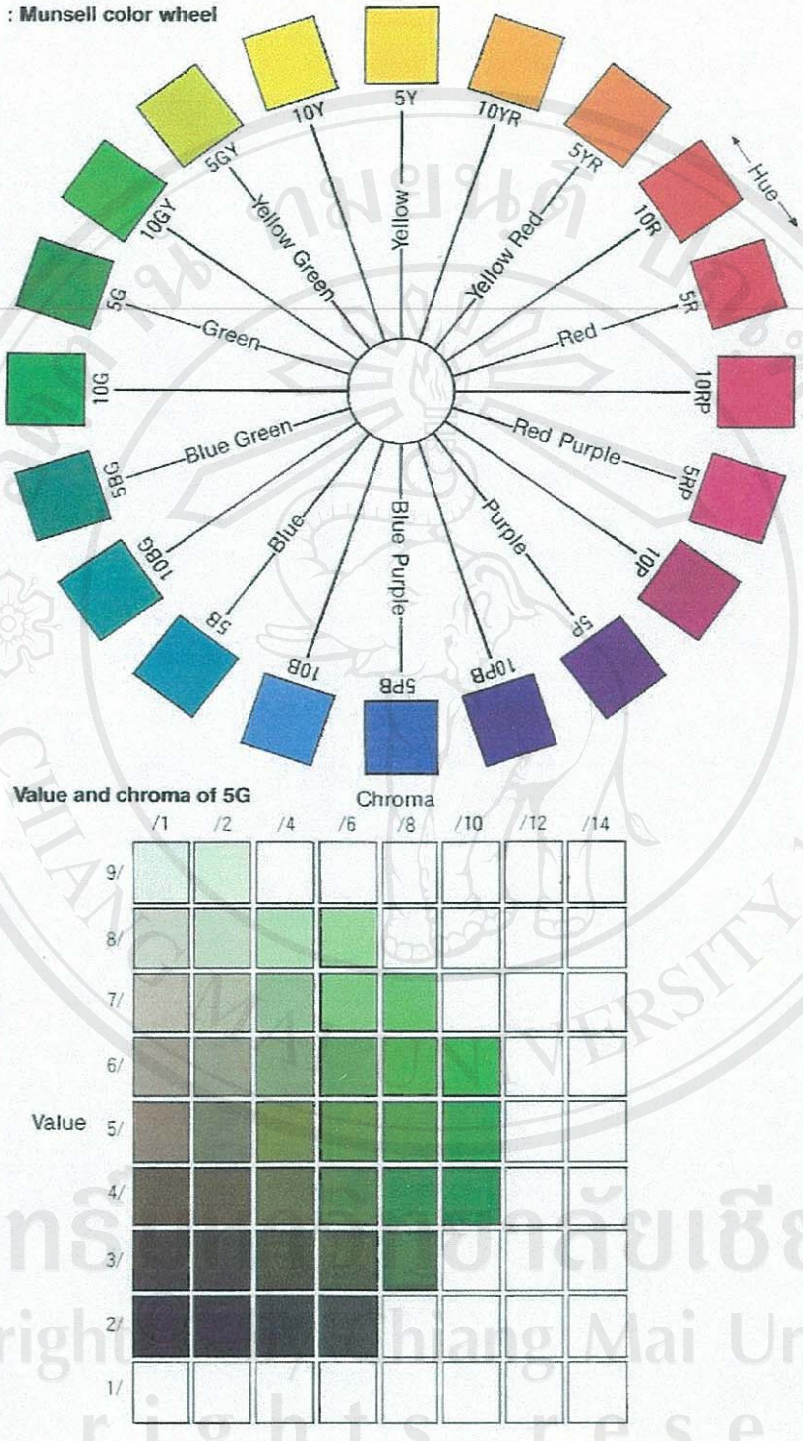
315°- 360° แสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 3 แผ่นเทียบสีของค่า L*, a* และ b* ที่ได้จากเครื่องวัดสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 4 ช่วงสำหรับเทียบสีของค่า chroma และ hue

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์โปรตีนที่ 30 กิโลดัลตัน

3.1 เตรียมแปลงปลูก

เตรียมแปลงจำนวน 8 แปลง ขนาด 2 × 7.5 เมตร โดยปลูก 2 แถว ๆ ละ 5 ต้น ระยะปลูกระหว่างต้น 1.5 เมตร ระยะปลูกระหว่างแถว 1 เมตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ โดยให้มะระขี้นกสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 มี 3 ซ้ำ ในแต่ละสายพันธุ์ โดย 1 ซ้ำมี มะระขี้นก 10 ต้น ปลูกทดสอบ ณ แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2546

3.2 วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อสกัดโปรตีนที่ 30 กิโลดัลตัน (รูป 2)

เก็บตัวอย่างใบที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วันหลังจากใบเริ่มเกิดบริเวณข้อ ในแต่ละระยะใช้น้ำหนักใบ 5 กรัมต่อ 1ซ้ำ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มี 3 ซ้ำ ผลที่นำมาสกัดโปรตีนที่ 30 กิโลดัลตันเป็นผลที่ได้จากการผสมเกสรด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 ในการเก็บตัวอย่างเก็บผลที่มีอายุ 8, 16 และ 24 วันหลังผสมเกสร ในแต่ละระยะใช้เฉพาะเนื้อผล (คว้านไส้ออก) หนัก 5 กรัมต่อ 1 ซ้ำ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มี 3 ซ้ำ นำเมล็ดที่ได้จากการผสมเกสรด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 ใช้เมล็ดที่มีอายุ 8, 16 และ 24 วันหลังผสมเกสร เป็นจำนวน 5 กรัมต่อ 1 ซ้ำ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มี 3 ซ้ำ

3.3 วิธีสกัดโปรตีนที่ได้แบบหยาบ (crude extract)

การสกัดแยกโปรตีนจากส่วนของ ใบ เนื้อผล และเมล็ดมะระขี้นกที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในระยะเวลาที่ต่างกัน โดยวิธีการสกัดแยกปรับปรุงมาจากวิธีการของ Lee-Huang *et al.* (1990) และ Jiratchaiyakul (2001) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างมะระขี้นกที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาบดด้วยโกร่งแช่เย็นให้ละเอียดพร้อมเติมสารละลาย 0.85% NaCl (normal saline) 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
2. กรองหยาบด้วยผ้าขาวบาง หลังจากนั้นกรองละเอียดด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1 ; diameter 110 mm.) และปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่อง pH meter ให้ได้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 3.6-4.0 ด้วย 1 M HCl
3. นำสารละลายที่กรองได้ไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Kubota รุ่น 6930 ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง การปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 1 ถึง 3 จะเก็บสารละลายที่ได้ (ทิ้งตะกอน) และบันทึกปริมาตรครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อใส่ $(NH_4)_2SO_4$ โดยหลังจากปั่นเหวี่ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ครั้งที่ 2 เรียบร้อยแล้วจึงใส่ 16% $(NH_4)_2SO_4$ โดยปริมาตรของสารละลายที่ได้ และผสมให้เข้ากันด้วย vortex และเมื่อปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 3 เรียบร้อยแล้วจึงใส่ 50% $(NH_4)_2SO_4$ โดยปริมาตรของสารละลายที่ได้แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex

4. เมื่อปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 4 เสร็จเรียบร้อยทิ้งสารละลาย (เก็บตะกอน) โดยล้างตะกอนด้วย 50mM Na_2PO_4 ใช้ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร
5. นำสารละลายที่ได้จากการล้างตะกอนมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี dialyse ในน้ำกลั่นนาน 24 ชั่วโมงเพื่อเอาเกลือของแอมโมเนียมออก หลังจากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ไว้ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาโปรตีนโดยรวม และโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันต่อไป นำสารละลายส่วนที่เหลือทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วชั่งน้ำหนักโปรตีนที่สกัดได้แบบหยาบ (crude extract)

3.4 วิธีการสกัดโปรตีน

3.4.1 วิธีการหาโปรตีนรวม (total protein) (Kantawong, 2546)

เตรียมโปรตีนมาตรฐาน คือ BSA (Bovine serum albumin) ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ไมโครลิตร และ 0 (น้ำกลั่น) ปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้มาจำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน plate สำหรับหาโปรตีน ปิเปตสารละลายตัวอย่างมะระขี้นกจำนวน 10 ไมโครลิตรลงใน plate สำหรับหาโปรตีนเตรียมตัวตรวจสอบโปรตีนมาตรฐาน (standard) dye reagent ละลายในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 4 เท่า หลังจากนั้นใส่ dye reagent 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ใน plate ที่มีสารละลายที่จะหาปริมาณโปรตีน นำ plate เข้าเครื่อง Titertek Multiscan MCC/340 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน

3.4.2 วิธีการหาโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตัน (Kantawong, 2546)

1. การแยกโปรตีนด้วย hydroxyapatite column chromatography

นำเมล็ดแก่ของมะระขี้นกมาสกัดตามวิธีการจากการทดลองที่ 3.3 นำผง crude extract มาละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นบรรจุ (pack) hydroxyapatite ใส่ใน column ขนาด 2×15 เซนติเมตร (Bio-Rad, CA) และทำการแยกสารละลาย crude extract ออกด้วยการล้าง (elute) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 10 และ350 mM sodium phosphate โดยเก็บสารละลาย 1 มิลลิลิตรต่อหลอด (tube) หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เมื่อได้ peak ออกมา เลือกสารละลายที่อยู่ใน peak ที่ 3 ออกมา ทำ dialyse ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer หลังจากนั้นนำผงที่ได้มาละลายน้ำแล้วนำสารละลายที่ได้มา coat plate เพื่อหาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การผลิต polyclonal antibody

การเตรียม polyclonal antibody โดยนำโปรตีนที่ได้ใน peak ที่ 3 มาผสมกับ Complete Freund's Adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1 : 1 ผสมจนเข้ากันแล้วนำไปฉีดให้กับกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์อย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ เก็บเลือดกระต่ายมา 10 มิลลิลิตร ใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บซีรัม นำซีรัมไปทดสอบหาแอนติบอดี้ต่อไป

3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

วิธี ELISA เป็นวิธีที่สามารถบ่งบอกถึงการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี้ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบได้ โดยเริ่มจากการนำแอนติเจนมาทำให้เจือจางด้วย coating buffer เพื่อให้แอนติเจนเคลือบอยู่บนไมโครเพลท (microplate) โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ คือ 50 mM sodium carbonate มีความเป็นกรดเป็นด่างที่ 9.6 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้คือ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- Direct ELISA

เคลือบไมโครเพลทขนาด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 8, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์คาร์บอเนต ใส่สารละลายแอนติเจนจำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ (incubate) 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียสหรือ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบตามเวลาเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง (การล้างใช้ 200 ไมโครลิตรต่อหลุมต่อครั้ง) blocked plate ด้วย 1% BSA จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามเวลาเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง ใส่สารละลายระหว่างซีรัมกับ PBS-tween ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000 และ 1 : 10000 โดยใส่ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง ใส่ alkaline phosphatase-conjugated second antibody (IgG ของกระต่าย) ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามเวลาเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ chromogenic substrate จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 5 ถึง10 นาทีเพื่อให้เกิดสี ขั้นสุดท้ายใส่ 5 N NaOH จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไมโครเพลทเข้าเครื่อง Titertek Multiscan MCC/340 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405/690 นาโนเมตร

- Competitive ELISA (Competitive Solution Phase Assay)

เคลือบไมโครเพลทขนาด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนโปรตีนที่หาปริมาณโปรตีนแล้ว โดยใช้ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมในบัฟเฟอร์คาร์บอเนตใส่ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียสหรือ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบตามเวลาเทสารละลายทิ้ง ล้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง (การล้างใช้ 200 ไมโครลิตรต่อครั้ง) blocked plate ด้วย 1% BSA จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามเวลาเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง นำหลอดโพลีโพพิลีนใช้เป็นภาชนะในเตรียมระหว่างสารละลายแอนติเจนและสารละลายแอนติบอดี้ (อัตราส่วนของแอนติบอดี้ที่ คือ 1 (แอนติบอดี้) : 5000 (PBS-tween)) เพื่อเตรียมแอนติเจนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยที่ความเข้มข้นที่ศูนย์ใช้ซีรัมผสมกับแอนติบอดี้ (อัตราส่วน 1 : 1) และเตรียมตัวอย่างระหว่างสารละลายตัวอย่างมะระขี้นกที่ได้จากการทดลอง 3.3 ผสมกับแอนติบอดี้ในอัตราส่วน 1 : 1 ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส นำสารละลายตัวอย่างมะระขี้นก และสารละลายแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆใส่ลงในไมโครเพลทที่ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนจำนวน 50 ไมโครกรัมต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง เติม alkaline phosphatase-conjugated second antibody ใส่ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-tween จำนวน 3 ครั้ง เติม chromogenic substrate 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 ถึง 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดสี ขั้นสุดท้ายใส่ 5 N NaOH จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไมโครเพลทเข้าเครื่อง spectrophotometer รุ่น Titertek Multiscan MCC/340 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405/690 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved