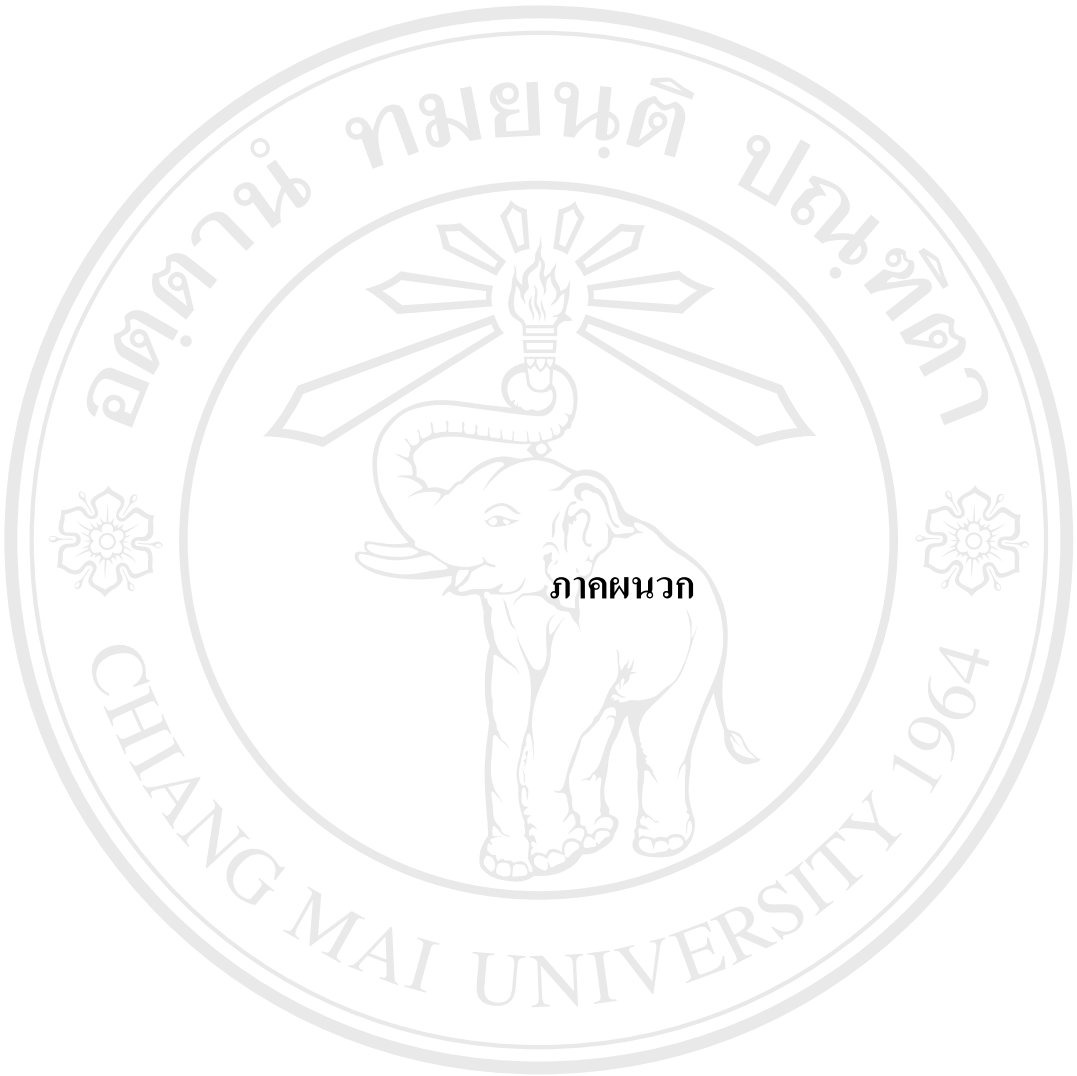


ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณกรดตามวิธีของ Helrich (1990)

การเตรียมสาร

1. สารละลาย sodium hydroxide 0.01 นอร์มัล

NaOH	0.40	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชา หรือหุ้มภาชนะบรรจุด้วยกระดาษอลูมิเนียม

2. phenolphthalene

indicator	1.00	กรัม
ethanol	60.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

การคำนวณปริมาณกรดจากการวิเคราะห์

$$\text{จากสูตร} \qquad Z = \frac{V \times N \times \text{meq.Wt} \times 100}{Y}$$

เมื่อ Z = เปอร์เซ็นต์ของกรดในสารตัวอย่าง (%)

V = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรท

N = normality ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรท

meq.Wt = milliequivalent of acid (กรดซิตริก = 0.064)

Y = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีตามวิธีของ Lowry *et al.* (1945)

การเตรียมสาร

1. สารละลาย 2,6-dichlorophenol

2,6-dichlorophenol	0.25	กรัม
sodium bicarbonate	0.21	กรัม
น้ำกลั่น	250.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร กรองและเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น

2. สารละลาย meta-phospharic acid

meta-phospharic acid	15.00	กรัม
acetic acid	40.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นโดยเตรียมก่อนใช้ 2 วัน

การคำนวณปริมาณวิตามินซีจากการวิเคราะห์

$$\text{จากสูตร ปริมาณวิตามินซี} = Y \times \frac{100}{X}$$

เมื่อ Y = จำนวนมิลลิลิตรของ 2,6 –dichlorophenol

X = จำนวนมิลลิลิตรของ ascorbic acid (หาโดยใช้ขั้นตอนเดียวกันแต่เปลี่ยนสารตัวอย่างที่ใช้เป็น ascorbic acid มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.65)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณเพคตินตามวิธีดัดแปลงของ

international federation of fruit juice producer (ณรงค์, 2546)

การเตรียมสาร

1. สารละลาย ethanol ความเข้มข้น 63 เปอร์เซ็นต์

   ethanol 66.32 มิลลิลิตร

   ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย sodium hydroxide ความเข้มข้น 1 โมลาร์

   NaOH 4.00 กรัม

   น้ำกลั่น 100.00 มิลลิลิตร

   เก็บในขวดสีชา หรือหุ้มภาชนะบรรจุด้วยกระดาษอลูมิเนียม

3. สารละลาย ammonium oxalate ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

   ammonium oxalate 0.75 กรัม

   ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย carbazole ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

   carbazole 0.10 กรัม

   ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol ให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

5. การเตรียมกราฟมาตรฐาน

   5.1 เตรียม stock solution ของสารละลาย D-galacturonic acid ปริมาณ 120.5 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการขยายตัวของสายโมเลกุล D-galacturonic acid monohydrate สารละลายที่เตรียมได้นี้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม

   5.2 นำสารละลาย D-galacturonic acid ที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 มาทำให้เจือจาง โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 40, 50, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดสารละลาย stock solution มาครั้งละ 10, 20, 40, 50, 60 และ 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิกรัม

5.3 เตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเพคตินเช่นเดียวกับในตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย D-galacturonic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นทำให้ได้สมการเส้นตรงและนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบที่มีในตัวอย่าง

ขั้นตอนในการวิเคราะห์

1. แยกตะกอนสารประกอบเพคตินทั้งหมด

1.1 ปิเปตตัวอย่างมาครั้งละ 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลายเอธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคน จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นใช้แท่งแก้วคนเป็นบางครั้ง เมื่อครบเวลานำหลอด centrifuge ขึ้น ล้างแท่งแก้วคนด้วยเอธานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

1.3 นำหลอด centrifuge มาแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นค่อยๆเทส่วนของเหลวนั้นทิ้งไป นำตะกอนที่ได้มาสกัดต่อ

1.4 ทำการสกัดซ้ำตาม ข้อ 1.2 และ 1.3 โดยเติมเอธานอลความเข้มข้น 63 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ครั้งละ 40 มิลลิลิตร ทำการสกัดเช่นนี้ 2 ครั้ง ตะกอนที่ได้เป็นตะกอนของสารประกอบเพคติน

2. การแยกสารประกอบเพคตินจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ดังนี้

2.1 การแยกสารประกอบเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ (water soluble pectin)

2.1.1 นำตะกอนของสารประกอบเพคตินที่แยกได้ตามวิธีข้างต้น มาเติมน้ำกลั่นปริมาณ 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 แยกของเหลวใสชั้นบนใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดซ้ำด้วยน้ำกลั่นและแยกตะกอนตามขั้นตอนข้อ 2.1.1 อีกครั้ง

2.1.3 รวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ (water soluble pectin) ตะกอนที่เหลือนำไปสกัดเอาเพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต

2.2 การแยกสารประกอบเพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate soluble pectin)

2.2.1 นำตะกอนมาเติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ปริมาณ 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

2.2.2 แยกของเหลวใสชั้นบนใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดซ้ำด้วยสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต และแยกตะกอนตามขั้นตอนข้อ 2.2.1 อีกครั้ง

2.2.3 รวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลตให้ครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินที่ละลายได้ในสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate soluble pectin) ตะกอนที่เหลือนำไปสกัดเอาเพคตินที่ละลายได้ในด่างต่อไป

2.3 การแยกสารประกอบเพคตินที่ละลายได้ในด่าง (alkaline soluble pectin)

2.3.1 นำตะกอนมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง โดยใช้อัตราเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 แยกของเหลวใสชั้นบนใส่ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดซ้ำด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และแยกตะกอนตามขั้นตอนข้อ 2.3.1 อีกครั้ง

2.3.3 รวมของเหลวที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งเข้าด้วยกัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นกรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 สารละลายที่ได้นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินที่ละลายได้ในด่าง (alkaline soluble pectin)

3. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเพคติน

นำสารละลายเพคตินในรูปของเพคตินในรูปของเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ (water soluble pectin) เพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต (ammonium oxalate soluble pectin) เพคตินที่ละลายได้ในด่าง (alkaline soluble pectin) มาวิเคราะห์ปริมาณเพคตินตามขั้นตอนดังนี้

3.1 ใช้หลอดทดลองขนาดใหญ่เตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

หลอด A เติมสารละลายเพคตินที่เตรียมได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และสารละลาย carbazole 0.5 มิลลิลิตร

หลอด B เติมสารละลายเพคตินที่เตรียมได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเอธานอล 0.5 มิลลิลิตร

หลอด C เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตร และสารละลาย carbazole 0.5 มิลลิลิตร

หลอด D เติมน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเอธานอล 0.5 มิลลิลิตร

3.2 หลังจากเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เรียบร้อยแล้ว เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาณ 6 มิลลิลิตร โดยปล่อยกรดซัลฟิวริกลงมาตามข้างหลอดช้าๆ แต่ให้หมดภายใน 7 วินาที

3.3 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเหวี่ยงผสม (vortex mixer) จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำหลอดออกมาทิ้งไว้ให้เย็น เป็นเวลา 15 นาที

3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ D-galacturonic acid โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$$y = ax + b$$

เมื่อ y = ปริมาณสารประกอบเพคติน มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิตร

a = ค่าความชันของเส้นกราฟ

x = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังหักลบด้วย blank หรือเขียนได้ว่า x = (ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด A- ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด B) * (ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด C - ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด D)

b = ค่าคงที่ของสมการ

คำนวณค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง โดยแทนเป็นค่า x ในสมการข้างต้น เพื่อคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งจำเป็นต้องนำมาคำนวณให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมของตัวอย่างเริ่มต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีดัดแปลงของ Hiratsuka *et al.* (ปนัดดา, 2541)

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารสกัด (extraction buffer)

0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.5	100.00 มิลลิลิตร
PVP-40	5.00 กรัม
polyvinyl-polypyrolidone (PVPP)	3.00 กรัม
tween 20	125.00 ไมโครลิตร
mercaptoehanol	1.00 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.5

stock A : 0.2 M NaH_2PO_4 0.556 กรัมต่อน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

stock B : 0.2 M Na_2HPO_4 5.365 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลายจาก stock A 16 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายจาก stock B 84 มิลลิลิตร จากนั้น ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร

3. การเตรียม electrode buffer (10x)

Tris (HCl) aminomethane	6.00 กรัม
glycine	28.80 กรัม

เตรียมสารละลายโดยการละลาย Tris 6.00 กรัม และ glycine 28.80 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้ให้นำมาปรับปริมาตรในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 คือสารละลาย electrode buffer 100 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียม marker dye solution

bromophenol blue	0.05 กรัม
glycerol	1.00 มิลลิลิตร

5. การเตรียมเจล

stock A : acrylamide stock 30 เปอร์เซ็นต์

acrylamide	29.20 กรัม
N,N'-methylene bis acrylamide	0.80 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock B : 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.8

สาร X : Tris HCl	1.41 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
สาร Y : 0.1 M HCl	0.83 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย X 50.00 มิลลิลิตร มาผสมกับสาละลาย Y 8.10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย NaOH หรือ HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร กรองและเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock C : 10% ammonium persulfate

ammonium persulfate	0.10 กรัม
น้ำกลั่น	1.00 มิลลิลิตร

อัตราส่วนในการเตรียมเจล (สำหรับ 4 เจล)

stock slution	separating gel	
	7.5 %	8.5 %
A (มิลลิลิตร)	5.00	5.66
B (มิลลิลิตร)	5.00	5.00
C (ไมโครลิตร)	200.00	150.00
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	9.70	9.04
TEMED (ไมโครลิตร)	10.00	10.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การเตรียม acetate buffer 0.5 M pH 5.0

stock A : 0.5 M acetic acid	2.89 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
stock B : 0.5 M sodium acetate	6.80 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลายจาก stock A 14.80 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายจาก stock B 35.20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 5.0 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

7. การเตรียม phosphate buffer 0.2 M pH 6.0

stock A : 0.2 M monobasic sodium phosphate	2.72 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
stock B : 0.2 M dibasic sodium phosphate	3.48 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารละลายจาก stock A 87.70 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายจาก stock B 12.30 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 6.0 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

8. การเตรียม Tris buffer 0.1 M pH 4.0

Tris-hydroxymethyl aminomethane	0.3024 กรัม
acetic acid	0.3240 มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

9. การเตรียม Tris 0.05 M pH 8.0

Tris-HCl	0.6057 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์ (สำหรับ 4 เจล)

10.1 acid phosphatase (ACP)

Fast Garnet GBC	0.10 กรัม
α - napthyl acid phosphate	0.05 กรัม
acetate buffer 0.5 M pH 5.0	100.00 มิลลิลิตร

10.2 esterase (EST)

stock A : α - napthyl acetate	0.03	กรัม
absolute alcohol	3.00	มิลลิลิตร
stock B : fast blue-B salt	0.10	กรัม
phosphate buffer 0.2 M pH 6.0	100.00	มิลลิลิตร

10.3 peroxidase (POX)

stock A : 3 amino-9 ethylcarbazole	42.00	มิลลิกรัม
β-napthol	29.00	มิลลิกรัม
acetone	20.00	มิลลิลิตร
stock B : Tris buffer 0.1 M pH 4.0	80.00	มิลลิลิตร
stock C : H_2O_2 3 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)	100.00	ไมโครลิตร

เตรียมจาก H_2O_2 30 เปอร์เซ็นต์ 10.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

10.4 superoxide dismutase (SOD)

Riboflavin	8.00	มิลลิกรัม
EDTA	4.00	มิลลิกรัม
Nitro blue tetrazolium (NBT) 10%ในน้ำ	200.00	ไมโครลิตร
Tris-HCl 0.05 M pH 8.0	100.00	มิลลิลิตร

(เก็บไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที แล้วนำมาไว้ในที่มีแสง)

11. น้ำยาเก็บรักษาเจลและล้างสีส่วนเกิน

glacial aetic acid	35.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	465.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

เตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Hiratsuka *et al*. (ปนัดดา, 2541) คือเก็บตัวอย่างใบที่เจริญเต็มที่ของฝรั่งแต่ละสายพันธุ์ ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด เช็ดใบให้แห้ง ตัดใบให้เป็นชิ้นเล็ก นำไปชั่งตัวอย่างละ 1 กรัม เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ใบแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็ง บดตัวอย่างใบในโกร่งพร้อมกับเติมไนโตรเจนเหลว เพื่อให้การบดง่ายขึ้น ใส่ extraction buffer 3 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด นำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รินเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) เก็บไว้ในหลอด eppendrof สำหรับใช้ทดสอบในลำดับต่อไป เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90 เปอร์เซ็นต์ กับ marker 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน

1.1 การเตรียม slab gel

ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ดูดสารละลาย separating gel ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสองด้านอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ สอดหวีเสียบลงในเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีเสียบออกจากเจล

1.2 การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสเข้าด้วยกัน เติม electrode buffer ลงใน chamber

1.3 การหยอดตัวอย่าง

ใช้หลอดใส่สารปรับปริมาตรดูดตัวอย่างพืชลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละ 20 ไมโครลิตร โดยใส่ 1 ช่องต่อ 1 ตัวอย่าง ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย และเกิดฟองอากาศ

1.4 การผ่านกระแสไฟฟ้า

ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber ด้านซ้ายและขวา เปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า กำหนดกระแสไฟฟ้าเป็น 60 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง หรือดูจากสีของ bromophenol blue เมื่อห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber ทำเครื่องหมายโดยตัดขอบเจลด้านล่างเพื่อเป็นสัญลักษณ์ให้ทราบว่าตัวอย่างเอนไซม์เริ่มต้นที่ใด

2. การย้อมสี

ค่อยๆแกะเจลออกจากแผ่นกระจก นำเจลมาวางบนกล่องพลาสติกที่มีสีย้อมเอนไซม์แต่ละชนิดอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การบันทึกข้อมูล

บันทึกภาพถ่ายของแถบสีที่ปรากฏบนเจล ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์จากตำแหน่ง จำนวนและความหนาแถบสีที่เกิดขึ้น เขียนไซโมแกรมค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm) ตามสูตรของอาภัสรา (2537)

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue}}$$

4. การวิเคราะห์กลุ่มพืช

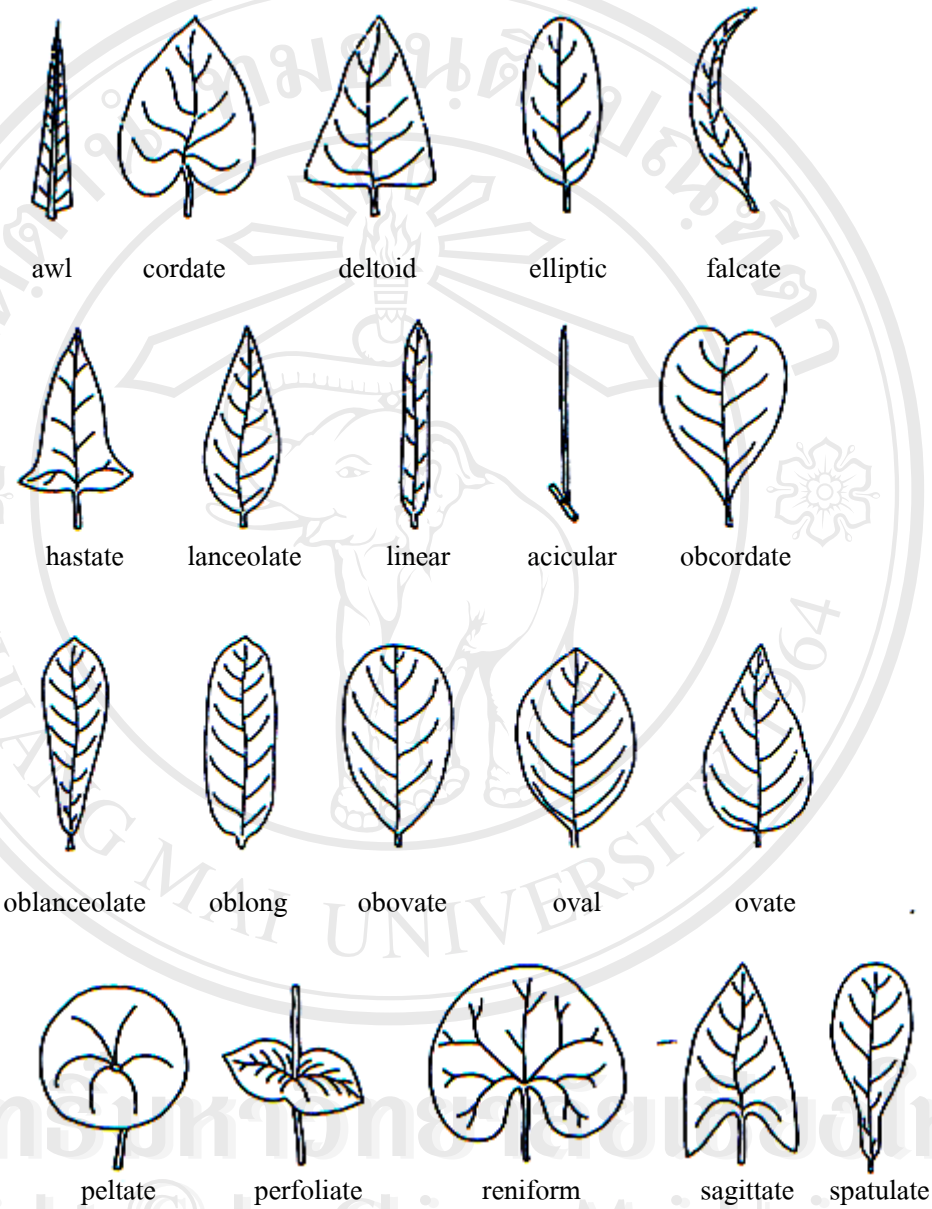
นำค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) โดยกำหนดให้ตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic unit (OTU) และแถบสีเป็นลักษณะ (Sokal and Sneath, 1973) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ฝรั่งด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม SPSS release 6.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวกที่ 1 การออกดอกของต้นฝรั่งลูกผสม 12 พันธุ์ ที่ปลูกทดสอบในแปลงของหน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง ปี พ.ศ. 2543

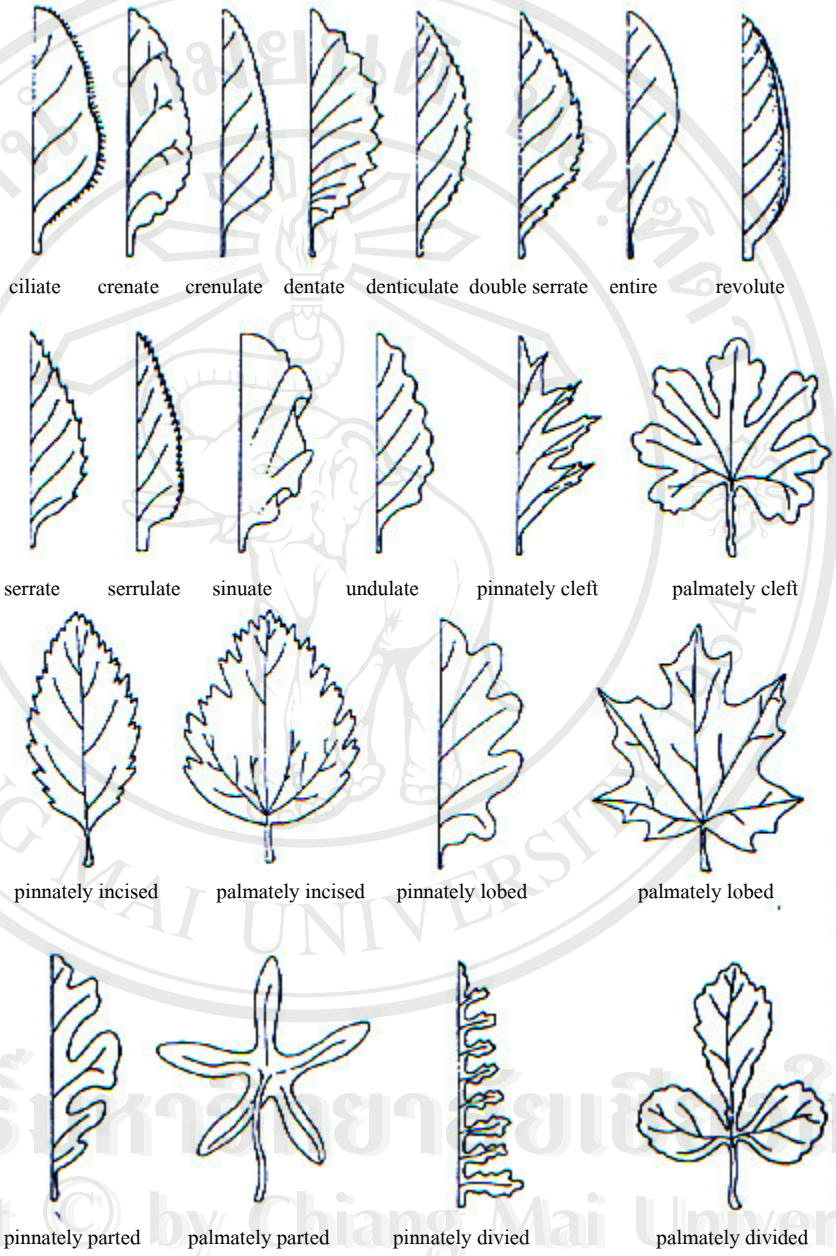
ต้นที่	จำนวนดอกของฝรั่งลูกผสม											
	ACA	AKS	AWT	BAF	BBK	BCA	BKS	BWT	CAF	CBM	CKS	CWT
1	1	46	0	4	29	10	8	0	6	1	0	0
2	0	28	0	7	67	1	34	2	15	3	0	0
3	0	23	0	102	53	33	33	6	2	0	0	0
4	0	6	0	33	82	3	15	1	10	0	0	0
5	0	48	0	27	67	0	43	31	1	0	0	0
6	0	20	0	101	68	6	9	18	3	0	0	5
7	0	57	0	86	3	0	4	16	1	0	0	0
8	0	15	3	44	4	0	26	10	1	0	0	0
9	0	17	0	103	15	5	5	27	0	0	2	0
10	1	-	0	7	8	7	44	0	1	0	3	0
11	0	-	1	4	17	45	6	19	7	0	0	0
12	2	-	0	25	4	31	37	5	10	0	0	11
13	0	-	1	3	37	7	38	15	0	1	0	8
14	4	-	0	0	33	12	31	2	0	0	0	0
15	0	-	0	3	50	50	24	17	0	9	0	0
16	0	-	0	15	49	22	20	2	0	2	0	0
17	0	-	0	0	4	26	17	29	0	0	0	3
18	0	-	0	3	44	41	22	16	0	7	0	0
19	5	-	0	27	63	0	11	0	0	0	0	2
20	0	-	0	0	54	11	42	0	3	2	0	0
21	0	-	0	0	62	5	15	0	0	0	3	0
22	5	-	0	30	57	55	24	12	0	0	0	0
23	0	-	1	73	19	33	18	0	0	4	0	0
24	0	-	1	18	23	5	39	0	13	0	0	0
25	0	-	0	2	19	-	4	0	4	0	0	0
26	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-
รวม	18	260	7	717	931	408	585	228	77	29	8	29

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



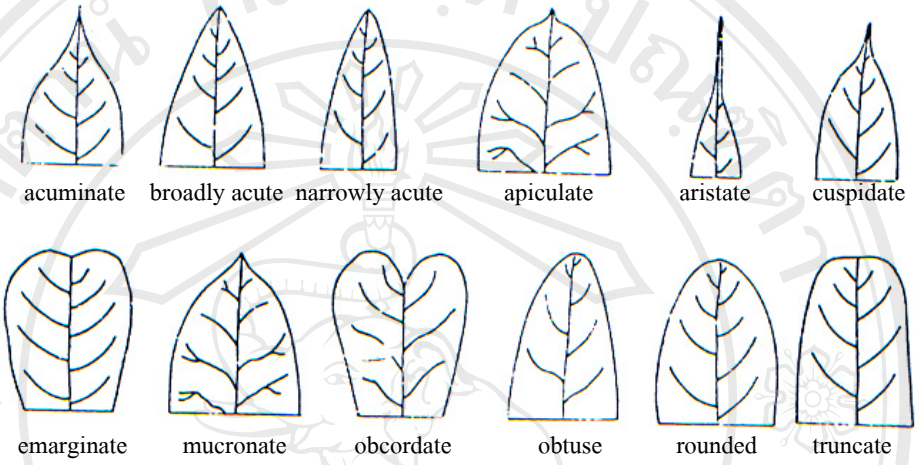
ภาพภาคผนวกที่ 1 ลักษณะรูปร่างใบ (Ramingwong, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

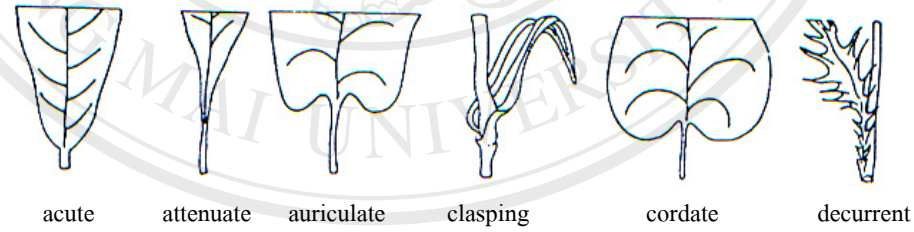


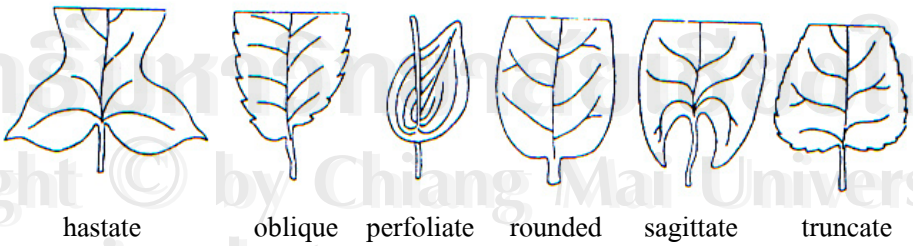
ภาพภาคผนวกที่ 2 ลักษณะขอบใบ (Ramingwong, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพภาคผนวกที่ 3 ลักษณะปลายใบ (Ramingwong, 2001)





ภาพภาคผนวกที่ 4 ลักษณะฐานใบ (Ramingwong, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A

B

C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพภาคผนวกที่ 5 ขั้นตอนการผลิตต้นฝรั่งลูกผสม

A การผสมเกสรข้ามระหว่างพันธุ์

B ต้นกล้าของฝรั่งลูกผสมที่ได้จากการเพาะเมล็ด

C ปลูกต้นพันธุ์ในแปลงทดสอบพันธุ์

A

B

ภาพภาคผนวกที่ 6 ต้นฝรั่งลูกผสม ที่ปลูกในแปลงทดสอบพันธุ์ของหน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง

A ต้นฝรั่งลูกผสมอายุประมาณ 4 เดือน

B ต้นฝรั่งลูกผสมที่ได้รับการตัดแต่งกิ่ง อายุประมาณ 8 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A

B

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพภาคผนวกที่ 7 ต้นฝรั่งลูกผสมที่ปลูกในแปลงทดสอบพันธุ์ของสถานีเกษตรหลวงปางดะ

A แปลงทดสอบพันธุ์ต้นฝรั่งลูกผสม

B ต้นฝรั่งลูกผสมที่ได้รับการตัดแต่งกิ่ง อายุประมาณ 1 ปี

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวปานจิตต์ พัวพันธ์รักษกุล

วัน เดือน ปีเกิด 6 กรกฎาคม 2521

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่จบการศึกษา
ประถมศึกษา	โรงเรียนปิยมิตรวิทยา	2532
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนเชียงคำวิทยาคม	2535
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย เชียงใหม่	2538
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2542

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 96 หมู่ 10 ตำบลเชียงบาน อำเภอเชียงคำ จังหวัดพะเยา 56110

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved