บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาการทดสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม โดยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส กระทำโดยจัดหาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ 2029S จากเกษตรกร จำนวน 10 ราย และขอความอนุเคราะห์พันธุ์พ่อ แม่ และเมล็ดพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ 2029S จากภาคเอกชนเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ การทดสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมโดยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชไร่ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประกอบด้วย 2 การทดลองดังนี้

<u>การทดลองที่1</u> การจำแนกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมจากพันธุ์พ่อแม่ โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ 2029S และพันธุ์พ่อ แม่

1.2 เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ NK 48, DK 979, Big 949, Big 919 และซูเปอร์สวีท

1.3 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge)

1.6 โกร่งบด

1.7 ไนโตรเจนเหลวและถังบรรจุ

1.8 micropipette และ adjustable automatic pipette พร้อม tip

1.9 eppendofe tube ขนาด 1.5 ml.

1.10 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบ Mini Protein II ของ BIORAD (รูป 2)

1.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

1.12 เครื่องทำความเย็น (cooling unit) ตู้แช่ที่ 4 และ -20 องศาเซลเซียส

1.13 เครื่องคนสารละลาย (magnetic stirrer)

1.14 ถุงมือยาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.15 เครื่องแก้วต่าง ๆ

1.16 ตู้บ่ม (incubator)

1.17 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

1.18 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ช้อนตักสาร ปากคีบ ใบมีดและด้ามมีด ถุงพลาสติก แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ กระดาษกรอง ถาดพลาสติก กล้องถ่ายรูป

2. สารเคมี

1.1 สารละลายทริสบัฟเฟอร์เพื่อสกัดเอนไซม์

- Tris-HCl 0.05 M pH 6.8
- PVP 5%
- DTT 2 mM
- B-MSH 10 mM

1.2 Stock solution สำหรับเตรียม Polyacrylaminde Gel

- Acrylamide-bisacrylamide
- Tirs-HCl 3 M pH 8.8
- APS 1.5%
- Water
- TEMED

1.3 Electrode buffer

- Tirs-HCl 0.025 M
- Glycine 0.192 M
- Water

1.4 marker dye solution

- Bromophenol blue
- Glycerol

1.5 สีย้อม esterase (EST)

- Tris-HCl 0.1 M pH 7.0
- α-napthyl acetate
- β-napthyl acetate
- O-Dianisidine salt

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6 สีย้อม peroxidase (PER)

- 3 amino-9 ethylcarbazole
- β-napthol
- acetone
- tris-HCl
- tris buffer 0.1 M pH 4.0
- H_2O_2 3%

1.7 สีย้อม glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)

- Tris-HCl 0.1 M pH 7.5
- A-Ketoglutaric acid
- Aspartic acid
- Pyridoxal 5-phosphate 10% in water
- Fast Blue BB

3. วิธีการ

3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำมาปลูกในถาดเพาะกล้า จนต้นกล้ามีอายุได้ 15 วัน ตัดส่วนรากทิ้ง นำส่วนที่เหลือไปชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดเอนไซม์

นำต้นกล้าข้าวโพดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาบดในโกร่งพร้อมเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อให้บดง่ายขึ้น หลังจากนั้นเติมสารสกัดเอนไซม์ (Pooler and Simon, 1993) จำนวน 2 ml. และบดเนื้อเยื่อพืช และสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวใส (supernatant) ที่ได้ใส่ eppendofe tube ใหม่ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90% กับ marker (bromophenol blue) 10% เขย่าให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบ Mini Protein II ของ BIORAD

3.3 การเตรียมเจล

3.3.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของ gel ตามความต้องการ (0.75 – 1.00 mm) คำนวณปริมาณของ gel ที่ใช้โดยที่จะใส่ stacking gel (upper) ที่มีความสูงประมาณ 1-2 cm. เหนือ separating gel (lower)

3.3.2 เตรียมสารละลายของ gel (separating gel) 10% ที่ยังไม่ polymerize โดยผสมสารต่าง ๆ ดังนี้ Arylamide – bisacrylamide 30% 3.3 ml, Tris – HCI 3 M pH 6.8 1.25 ml และ water 4.8 ml สำหรับ APS 1.5% 0.50 ml และ TEMED 10 ul จะใส่หลังดูดอากาศออกโดยใช้ปั๊มประมาณ 10 นาที

3.3.3 ค่อย ๆ ผสม APS และ TEMED 10 ul ลงในสารละลายที่ดูดอากาศออกแล้วเทสารละลาย gel นี้ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็ง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลอยู่อย่างชัดเจน

3.3.4 เตรียมสารละลาย Stacking gel โดยผสม Arylamide-bisacrylamide 30% 0.75 ml, Tris-HCL 3 M pH 8.8 1.25 ml, water 2.7 ml, APS 1.5% 0.25 ml และ TEMED 15 ul เข้าด้วยกัน ดูดอากาศออกจากสารละลายโดยปั๊มประมาณ 10 นาที

3.3.5 ค่อย ๆ ล้าง separating gel ด้วยน้ำกลั่นและดูดน้ำออกให้แห้ง สอด comb ลงใน gel plate

3.3.6 ใส่ APS 1.5% จำนวน 0.25 ml และ TEMED 10 ul ใน 10 ml. ของ stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน separating gel ระวังอย่างให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 – 45 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.7 ดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่องสำหรับใส่สารที่ต้องการแยกบนเจล หยอดน้ำกลั่นลงในช่องเพื่อล้างอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นดูดน้ำออกจนเห็นเป็นช่อง ๆ

3.4 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.4.1 ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ใน chamber

3.4.2 ใส่สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ลงในช่องบน stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อย ๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่องเจล

3.4.3 ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้ากับ chamber บน และเปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสคงที่ที่ 15.0 mA สำหรับ stacking gel และ 25 mA สำหรับ separating gel (150-200V)

3.4.4 ปิดเครื่องจ่ายไฟฟ้า เมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง

3.4.5 นำแผ่นแก้วออกจาก Chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาดเพื่อตรวจหาตำแหน่งของไอโซไซม์ต่อไป

3.5 การย้อมสีเอนไซม์

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์โดยการย้อมสีเอนไซม์ esterase (EST), peroxidase (PER) และ glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) ตามสูตรของ Vallejoe (1983) แล้วนำเจลบนแผ่นแก้วมาใส่ใน plate ที่มี staining solution อยู่แล้วนำไป incubate ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ประมาณ 15-60 นาที จนปรากฏแถบ

3.6 การบันทึกข้อมูล

บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของพันธุ์ข้าวโพดเป็นภาพถ่ายของแถบสี และวาดแผนภาพ ไซโมแกรมของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงตำแหน่ง จำนวนแถบสี และวัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี ตามสมการต่อไปนี้ (อาภัสสรา, 2537)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าที่ได้จากการมีแถบสีของแต่ละตำแหน่งแล้วแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าที่ไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sneath and Sokae, 1973) แล้วหาแถบที่มีค่าเป็น 1 เพียงอย่างเดียว หรือเป็น 0 อย่างเดียวของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

<u>การทดลองที่ 2</u> การตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

<u>การทดลองที่ 2.1</u> การตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

หลังจากทดสอบหาเอนไซม์ที่สามารถการจำแนกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม 2029S จากพันธุ์พ่อแม่แล้ว นำเอนไซม์ชนิดนั้นมาตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมที่รวบรวมมาจากเกษตรกรจำนวน 10 ราย โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส และทำการตรวจสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ

<u>การทดลองที่ 2.2</u> การตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ 2029S จากภาคเอกชน (พันธุ์ต้นแบบ)

1.2 เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ 2029S จากเกษตรกรจำนวน 10 ราย

1.3 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.4 อุปกรณ์ในการวัด และจดบันทึก

1.5 ลวดและป้าย

1.6 กล้องถ่ายภาพ

1.7 แผ่นเทียบสี

2. วิธีการ

บันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ต้นแบบเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากเกษตรกรลักษณะที่ศึกษา คือ

2.1 น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม) 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

2.2 สีของโคนเมล็ด และสีของเมล็ด 100 เมล็ดต่อตัวอย่าง

2.3 ความสูงของต้นกล้า วัดจากโคนต้นส่วนที่โผล่พ้นดินจนถึงบริเวณโคนก้านใบสุดท้าย 100 ต้นต่อตัวอย่าง

2.4 ลักษณะของใบ (ใบตั้งตรง หรือโค้งลง) 100 ต้นต่อตัวอย่าง

2.5 สีของต้นกล้า 100 ต้นต่อตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลองที่ 2.2 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง Treatments ด้วย Least Signification Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved