บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เมล็ดพันธุ์งาที่ใช้ในงานทดลองได้จากแปลงปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี ประกอบด้วย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ งาขาวพันธุ์มหาสารคาม 60, งาดำพันธุ์มก 18 และงาแดงพันธุ์อุบล 1 ทำการปรับความชื้นเมล็ดพันธุ์เป็น 2 ระดับ คือ ที่ความชื้นเมล็ดพันธุ์เริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นเมล็ดพันธุ์เริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่แก่เมล็ดพันธุ์งาโดยใช้เครื่องเรดิโอฟรีควอนซี่ที่สร้างและปรับปรุงโดย Institute of Agriculture Engineering, University of Göttingen ที่ความถี่ 27.12 เมกกะเฮิรต์ ระดับพลังงานเริ่มต้น 810 วัตต์ จำนวนเมล็ด 400 กรัม ที่อุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 60, 70, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 180 วินาที

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ระดับความชื้นเริ่มต้นของเมล็ดพันธุ์ 2 ระดับ คือ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระดับอุณหภูมิจากการให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่แก่เมล็ด 6 ระดับ ได้แก่ 0, 60, 70, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส

จำนวน 12 กรรมวิธี

เมล็ดที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ แล้วนำไปทดสอบดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ทดสอบคุณภาพเบื้องต้นของเมล็ดพันธุ์

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomization Design (CRD) โดยใช้เมล็ดพันธุ์งา 3 พันธุ์ ทำการทดสอบคุณภาพเบื้องต้น ดังต่อไปนี้

1.1 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed Germination)

ทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน โดยการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (Top of paper method) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 1999) ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาในแต่ละพันธุ์มาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เพาะบนกระดาษชื้นที่วางในจานแก้วที่มีฝาครอบ (petri dish) ปิดฝาภาชนะ จากนั้นเก็บไว้ในตู้เพาะเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจนับความงอกในวันที่ 7 หลังเพาะ ประเมินผลต้นกล้าปรกติ (normal seedling) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

1.2 ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed vigor test)

ทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated aging test) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 1999) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาในแต่ละพันธุ์มาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 กรัม ใส่ลงในขวดเร่งอายุที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมการน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 41 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดมาทดสอบความงอกมาตรฐานโดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (Top of paper method)

1.3 น้ำหนัก 1,000 เมล็ด

ทดสอบหาน้ำหนัก 1,000 เมล็ด โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาในแต่ละพันธุ์มาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 1,000 เมล็ด ชั่งหาน้ำหนัก 1,000 เมล็ด

1.4 การตรวจเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์งา

นำเมล็ดพันธุ์งาทั้ง 3 พันธุ์ ตรวจหาเชื้อราที่ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter Method) และวิธีวางเมล็ดบนบนอาหารวุ้น (Agar Method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) ดังนี้

ชุดที่ 1 ตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้นโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 1 แผ่นวางบนกระดาษฟางขนาดเท่ากัน 2 แผ่น ชุบน้ำกลั่นให้ชุ่มวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อ (petri dish) จากนั้นทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์จากแต่ละกรรมวิธีวางบนกระดาษในจานแก้ว จานละ 10 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

ชุดที่ 2 ตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีวางเมล็ดบนอาหารวุ้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA (Potato Dextrose Agar) ทำการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเปลือกหุ้มเมล็ดด้วยสารละลายคลอรอกซ์ (clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำเมล็ดพันธุ์งาแต่ละพันธุ์วางบนอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงจานละ 10 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ในขั้นตอนนี้ทำภายในตู้ปราศจากเชื้อ

นำจานเพาะเชื้อทั้ง 2 ชุดบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereoscopic microscope และ Compound microscope คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ด ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อรา = $\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในเมล็ดพันธุ์งาหลังจากให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomization Design (CRD) ทำการทดสอบดังนี้

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาจากแต่ละกรรมวิธีมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 5 กรัม อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการชั่งหาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป คำนวณและแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยมาตรฐานน้ำหนักสด (wet weight basis)

เปอร์เซ็นต์ความชื้น = $\frac{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ – น้ำหนักเมล็ดหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ}} \times 100$

การทดลองที่ 3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์งาหลังจากให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomization Design (CRD) โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบผลกับเมล็ดพันธุ์งาที่ไม่ผ่านการให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

3.1 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed Germination)

ทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานโดยทำการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (Top of paper method) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 1999) ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาในแต่ละกรรมวิธีมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เพาะบนกระดาษชื้นที่วางในจานแก้วที่มีฝาครอบ (petri dish) ปิดฝาภาชนะจากนั้นเก็บไว้ในตู้เพาะเมล็ดที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจนับความงอกในวันที่ 7 หลังเพาะ ประเมินผลต้นกล้าปรกติ (normal seedling) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

3.2 ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed vigor test)

ทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดโดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated aging test) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 1999) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาในแต่ละกรรมวิธีมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 กรัม ใส่ลงในขวดเร่งอายุที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

41 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดมาทดสอบความงอกมาตรฐาน โดยวิธีเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น (Top of paper method)

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส

ทดสอบโดยการวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase Activity) ตามวิธีของ Haufe, 1992

สารละลาย

สารละลาย Tris buffer pH 7.6 ที่ประกอบด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ของ TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) ในสารละลาย Mc-Ilvaine-buffer

วิธีการทดสอบ

1. บดเมล็ดในอัตรา 10 กรัมต่อสารละลาย Tris buffer 30 มิลลิลิตร
2. ผสมเมล็ดที่บดแล้วกับสารละลาย Tris buffer เขย่าเบาๆ ด้วยมือ
3. แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที
4. ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที
5. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 390
6. เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:5 – 1:20
7. อ่านค่าดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร
8. บันทึกผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การทดลองที่ 4 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของเมล็ดพันธุ์งาหลังจากให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomization Design (CRD) โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบผลกับเมล็ดพันธุ์งาที่ไม่ผ่านการให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

4.1 ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid)

ทดสอบโดยวิธีการทดสอบ oil และ fat ของ AOAC, 1995

การสกัดไขมันและน้ำมันด้วยตัวทำละลาย

1. บดตัวอย่างเมล็ดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้อนุภาคมีขนาดใกล้เคียงกันเพื่อง่ายต่อการสกัด
2. ชั่งตัวอย่างเมล็ดที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาจำนวน 3 กรัม ใส่ลงในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีจุกปิด เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์จำนวน 30 มิลลิลิตร ปิดจุก เขย่าให้เข้ากันประมาณ 3 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. กรองของเหลวที่ได้ผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่พับเป็นจีบใส่ลงในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
4. ทำการสกัดซ้ำ 2-3 ครั้ง
5. นำขวดที่บรรจุสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวทำละลายระเหย
6. อบที่อุณหภูมิ 98-105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
7. ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ชั่งหาน้ำหนักไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้เพื่อนำไปไตเตรทหาปริมาณกรดไขมันอิสระ

วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระ

การเตรียมตัวทำละลาย

1. ผสมสารละลายไดเอธิทอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร กับเอธิลแอลกอฮอร์ 25 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร
3. ไตเตรทตัวทำละลายผสมที่ได้ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ (ใช้ด่างประมาณ 2-3 หยด)

การไตเตรทหาปริมาณกรดไขมันอิสระ

1. ชั่งน้ำมันตัวอย่างโดยทราบน้ำหนักอย่างแน่นอน (2-5 กรัม) ใส่ลงในขวดชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิท
2. ละลายน้ำมันตัวอย่างในตัวทำละลายผสมที่เป็นกลาง
3. ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์
4. ไตเตรทจนกระทั่งได้สารละลายสีชมพูซึ่งคงตัวอยู่นานกว่า 15 วินาที
5. จดปริมาตรสารละลายที่ใช้คำนวณหาค่ากรดไขมันอิสระ

การคำนวณหาค่ากรดไขมันอิสระคำนวณอยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดโอเลอิคจากค่ามาตรฐานนี้ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ทำปฏิกิริยาสมบูรณ์พอดีกับกรดโอเลอิค 0.0282 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมในเมล็ด

ทดสอบโดยวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแป้งในเมล็ดโดยวิธี Anthrone (Yoshida *et al*., 1976)

สารเคมี

1. Anthrone reagent (Anthrone 1 กรัม ในสารละลาย conc.H_2SO_4 500 มิลลิลิตร) เตรียมสารละลายใหม่ทุกๆ 2 วัน เก็บไว้ในที่เย็นไม่ถูกแสง
2. 80 % ethanol
3. 9.2 N Perchloric acid : เจือจาง 793 มิลลิลิตรของ 70% $HClO_4$ จนครบ 1 ลิตร
4. 4.6 N Perchloric acid : เจือจาง 397 มิลลิลิตรของ 70% $HClO_4$ จนครบ 1 ลิตร

การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัมใส่ในหลอดขนาด 125 ซีซี
2. เติม 80 % ethanol จำนวน 20 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
3. นำเศษตัวอย่างพืชที่เหลืออบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง
4. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร แช่ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
5. ทิ้งให้เย็น เติม 9.2 N $HClO_4$ 2 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร
6. ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีนาน 15-20 นาที
7. แยกเฉพาะสารละลายที่ใสเก็บไว้
8. เติม 4.6 N $HClO_4$ 2 มิลลิลิตรในส่วนที่เหลือผสมให้เข้ากัน 15 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกตะกอนอีกครั้ง
9. นำสารละลายใสที่ได้รวมกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร
10. ดูดสารสกัดที่ได้จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบและหลอดสารมาตรฐาน แช่ในอ่างน้ำแข็ง เติม anthrone 10 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
11. นำหลอดทั้งหมดแช่ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 7.5 นาที เมื่อครบกำหนดทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น
12. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร
13. บันทึกผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 ปริมาณกรดอะมิโนรวมเมล็ด

ทดสอบโดยวิธี Dye-binding assay

การสกัดโปรตีน

สารสกัดบัพเฟอร์ : สารละลาย 125 mM Tris HCl pH 6.8, 0.2 % SDS , 0.2 % SDS, 1 % 2-mecaptoethanol

วิธีการสกัด

1. บดเมล็ดงาในโกร่งบดที่แช่เย็นบนน้ำแข็งในอัตรา 0.5 กรัมเมล็ดต่อสารสกัดบัพเฟอร์ 10 มิลลิลิตร
2. นำสารสกัดโปรตีนที่ได้ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงหมุนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
3. แยกสารละลายใสต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที
4. ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงหมุนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
5. แยกสารละลายใสเติมสารละลายอะซีโตนที่แช่เย็นในอัตรา 2:1 ของสารสกัดบัพเฟอร์
6. แยกเฉพาะสารละลายใสเก็บในหลอด eppendrof เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนโดยวิธี Dye binding

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin, BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 100 150 200 250 และ 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดแต่ละหลอดโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร
3. เติมสารละลาย Coomassie (0.05% Coomassie brilliant blue G-250 ใน 5% ethanol และ 10% phosphoric acid) หลอดละ 3 มิลลิลิตร
4. ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อครบกำหนดวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในเมล็ด

1. ปิเปตสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลาย Coomassie (0.05 % Coomassie brilliant blue G-250 ใน 5 % ethanol และ 10 % phosphoric acid) ลงไปหลอดละ 3.00 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
3. เมื่อครบกำหนดวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

4.4 รูปแบบของกรดอะมิโนในเมล็ด

วิเคราะห์โดยวิธี SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การเตรียมเจล

1. การเตรียม Separating gel

น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร
Monomer	4.8	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.8	3.0	มิลลิลิตร
SDS	0.120	มิลลิลิตร (120 ไมโครลิตร)
APS	0.060	มิลลิลิตร (60 ไมโครลิตร)
TEMED	0.020	มิลลิลิตร (20 ไมโครลิตร)

2. การเตรียม Stacking gel

น้ำกลั่น	3.6	มิลลิลิตร
Monomer	0.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.8	1.5	มิลลิลิตร
SDS	0.060	มิลลิลิตร (60 ไมโครลิตร)
APS	0.030	มิลลิลิตร (30 ไมโครลิตร)
TEMED	0.006	มิลลิลิตร (6 ไมโครลิตร)

monomer = rotiphorese Gel 30

SDS = Sodium dodecyl sulfate

APS = Ammonium persulfate

TEMED = N, N, N′, N′ - tetramethylethlenediamine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลาย Electrode (running) buffer pH 8.3

1. Tris base	30	กรัม
2. Glycine	144	กรัม
3. SDS	10	กรัม
4. น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียมแผ่นเจล

เจลถูกเตรียมขึ้นระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นที่สะอาด โดยแช่ในกรดโครมิกค้างคืน ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งแล้วตามด้วยเอทธานอท วางแผ่นกระจกบนกระดาษที่สะอาด โดยให้ด้านที่สัมผัสเจลหงายขึ้นแล้วเช็ดด้วยอะซีโตน หลังจากนั้นล้างด้วยเอทธานอลแล้ว ปล่อยให้แห้ง ประกบแผ่นกระจกทั้งสองเข้าด้วยกันโดยมี spacer รูปตัว U คั่นระหว่างกระจก โดย spacer จะเป็นตัวกำหนดความหนาของเจลยึดแผ่นกระจกด้วยที่หนีบแล้วนำไปประกอบกับส่วนที่เป็นฐานรอง ผสมสารละลาย separating gel โดยผสม ASP และ TEMD เป็นลำดับสุดท้าย ใช้ปิเปตดูดสารละลาย separating gel ปล่อยลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกจนมีความสูงประมาณ 8 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปิดผิวหน้าเจลอย่างระมัดระวังด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที ปรากฏรอยต่อที่คมชัดระหว่างชั้นน้ำและชั้นเจลทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวเทน้ำกลั่นที่ปิดผิวด้านหน้าเจลทิ้งไป ใช้ปิเปตดูดสารละลาย stackiing gel ที่เตรียมไว้ปล่อยลงไปบนชั้นของ separating gel จนเกือบเต็มช่องว่างระหว่างกระจก เสียบหวีลงไปเพื่อให้เกิดช่องสำหรับใส่สารตัวอย่างปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาพอลี่เมอไรเซชั่นอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีออก ล้างหน้าช่องด้วยสารละลายบัพเฟอร์สำหรับอ่างอิเล็กโทรด ดึงที่หนีบและ spacer ออกจากแผ่นกระจกทั้งสอง นำแผ่นกระจกที่มีเจลอยู่ใส่ลงในอ่างอิเล็กโทรดยึดกระจกให้เข้ากับอ่างให้แน่น

การทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

ต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสเข้าด้วยกันเติมเทสารสารละลาย Electrode buffer pH 8.3 (running buffer) ในอ่างอิเล็กโทรดทั้งบนและล่าง โดยสารละลายต้องกระจายทั่วส่วนบนของเจล และส่วนปลายล่างสุดของเจลต้องสัมผัสสารละลายบัพเฟอร์ ใส่สารสกัดโปรตีนที่เตรียมไว้ลงในช่องว่าง ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับอ่างอิเล็กโทรดด้านซ้ายและขวา เปิดสวิตช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแส 20 มิลลิแอมแปร์ต่อช่องใช้เวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง ปิดสวิตช์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจากอ่างอิเล็กโทรด วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ tracking dye แกะแผ่นเจลออกจากกระจกเพื่อทำการตรึงและย้อมสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การย้อมสีโปรตีนโดยใช้ Coomassie brilliant blue R-250

หลังจากเสร็จสิ้นการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วทำการตรึงโปรตีนในเจลโดยใช้ 12.5 % TCA นาน 30 นาที จากนั้นทำการย้อมสีเจลโดยแช่เจลในสารละลายเจือจาง 1:20 ของสารละลาย 1 % Coomassie brilliant blue R-250 ใน 12.5 % TCA นาน 1 ชั่วโมง แถบของโปรตีนจะปรากฏสีเข้มขึ้นเมื่อย้อมเสร็จทำการล้างสีย้อมด้วยสารละลายล้างสีย้อม (40% Methanol, 10% Acetic acid) เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ล้างหลายๆ ครั้งจนกระทั่งพื้นหลังปราศจากสีย้อม จะปรากฏแถบโปรตีนสีน้ำเงินอย่างชัดเจน

เมื่อได้แถบของโปรตีนและวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบสีเพื่อคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพันธ์ (Rf)

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

การทดลองที่ 5 ประสิทธิภาพการลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์งา

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomization Design (CRD)

โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์งาแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบผลกับเมล็ดพันธุ์งาที่ไม่ผ่านการให้คลื่นเรดิโอฟรีควอนซี่ ตรวจหาเชื้อราที่ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter Method) และวิธีเพาะบนอาหารวุ้น (Agar Method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) ดังนี้

ชุดที่ 1 ตรวจสอบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ด้วยวิธีเพาะบนกระดาษชื้นโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 จำนวน 1 แผ่นวางบนกระดาษฟางขนาดเท่ากัน 2 แผ่น ชุบน้ำกลั่นให้ชุ่มวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อ (petri dish) จากนั้นทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์จากแต่ละกรรมวิธีวางบนกระดาษในจานแก้ว จานละ 10 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

ชุดที่ 2 ตรวจสอบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ ด้วยวิธีเพาะบนอาหารวุ้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA (Potato Dextrose Agar) ทำการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเปลือกหุ้มเมล็ดด้วยสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำเมล็ดพันธุ์งาแต่ละพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วางบนอาหารวุ้นในจานเพาะเลี้ยงจานละ 10 เมล็ดจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ในขั้นตอนนี้ทำภายในตู้ปราศจากเชื้อ

นำจานเพาะเชื้อทั้ง 2 ชุดบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereoscopic microscope และ Compound microscope คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ด ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อรา = $\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิธี Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งทดลองที่ได้โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved