บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105
2. เมล็ดพันธุ์ข้าวชัยนาท 1
3. ชุดอุปกรณ์ gel electrophoresis
4. โกร่งบดตัวอย่าง
5. เครื่องชั่งชนิดละเอียด ชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
7. เครื่องเหวี่ยง centrifuge
8. ขวดรูปชมพู่
9. ช้อนตักสาร
10. เครื่องแก้วอื่นๆ เช่น ปิเปตต์ ไมโครปิเปตต์ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร ขวดใส่สารละลายเข้มข้น
11. หลอดหยดและจุกยาง
12. กล่องใส่น้ำแข็ง
13. วัสดุอื่นๆ เช่น กระดาษเลเบล พาราฟิล์ม ไม้บรรทัด ตระกร้าเพาะเมล็ดพันธุ์ เป็นต้น

2. สารเคมี

1. สารละลายทริสบัฟเฟอร์เพื่อสกัดเอนไซม์

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

2. Stock solution สำหรับเตรียม Polyacrylamide Gel

- Acrylamide-bisacrylamide
- Tris-HCl 3 M pH 8.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Tris-HCl 0.3 M pH 6.8
- APS 1.5 %
- Water 1.5 %
- TEMED

3. Electrode buffer

- Tris-HCl 0.025 M
- Glycine 0.192 M
- Water

4. สีย้อม esterase (EST)

- Tris-HCl 0.1 M pH 7.0
- A-Napthyl acetate
- B-Napthyl acetate
- O-Dianisidine salt

5. สีย้อม leucine aminopeptidase (LAP)

- Na phosphate 0.1 M pH 6.0
- $MgCl_2$ 1 M
- L-Leucine B-naphyl acid
- O-Dianisidine

6. 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

7. สีย้อม malic enzyme (ME)

- Tris-HCl 0.1 M pH 7.5
- $MgCl_2$ 1 M
- L-malic acid
- $NADP^+$ 10 % in water

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- NBT 10 % in water
- PMS 10 % in water

8. สีย้อม alcohol dehydrogenase (ADH)

- Tris-HCl 0.1 M pH 7.5
- NAD^+ 10 % in water
- NBT 10 % in water
- PMS 10 % in wat

3. วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์คัดจำนวน 2 สายพันธุ์คือ พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท1 จากศูนย์วิจัยและสถานีทดลองพันธุ์ข้าวในประเทศไทยจำนวน 10 แห่ง

3.2 การหาไอโซไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงโดยเทคนิค electrophoresis

1. การเตรียมพืชทดลอง

ใช้เมล็ดพันธุ์ตัวอย่างข้าวหอมมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท1 ที่เป็นพันธุ์คัด มาเพาะโดยแช่เมล็ดข้าวด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ประมาณ 3 วัน จึงนำเมล็ดลงปลูกในกะบะให้ได้รับแสงและน้ำสม่ำเสมอ จนต้นกล้าอายุได้ 7 วัน ตัดส่วนรากทิ้ง แล้วนำส่วนที่เหลือมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว นำเนื้อเยื่อที่บดแล้วมาห่อด้วย aluminium foil เก็บไว้ที่ –20°C เพื่อนำไปสกัดไอโซไซม์

2. การสกัดเอนไซม์

นำสารละลายที่เตรียมไว้มาสกัดด้วย extraction buffer (Pooler and Simon, 1993) โดยใช้ตัวอย่างพืช 0.5 กรัม ต่อสารละลาย buffer 1 ml ใช้เครื่องบดเนื้อเยื่อพืชและสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำสารละลายที่ได้ใส่ eppendrof tube ใหม่ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปแยกด้วย polyacrylamide gel electrophoresis

3. การเตรียม slab gel

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)

3.2 เตรียมสารละลายของ separating gel 10% ที่ยังไม่ polymerize โดยผสมสารต่างๆดังนี้ Arylamide-bisacrylamide (30:0.8g.) 0.62 ml, Tris-HCL 3 M pH 6.8 1.25 ml และ Water

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.81 ml สำหรับ APS 1.5% 0.5 g และ TEMED 10 µl จะใส่หลังดูดอากาศออกโดยใช้ปั๊มประมาณ 10 นาที

3.3 ค่อยๆ ผสม APS และ TEMED ลงในสารละลายที่ดูดอากาศออกแล้วเทสารละลาย gel นี้ใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อยๆ หยอดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจลทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลอยู่อย่างชัดเจน

3.4 เตรียมสารละลาย stacking gel โดยผสมสาร Arylamide-bisacrylamide (30:0.8g.)3.33 ml,Tris-HCL 3 M pH 8.8 1.25 ml, Water 1.8 ml, APS 1.5% 0.25 g และ TEMED 15 เข้าด้วยกัน ดูดอากาศออกจากสารละลายโดยปั๊มประมาณ 10 นาที

3.5 ค่อยๆล้าง separating gel ด้วยน้ำกลั่นและดูดน้ำออกให้แห้ง สอด comb ลงใน gel plate

3.6 ใส่ APS 1.5% จำนวน 0.25 ml และ TEMED 10 ml ใน 10 ml ของ stacking gel ที่ดูดอากาศออกแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 – 45 นาที

3.7 ดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่องสำหรับใส่สารที่ต้องการแยกบนเจล หยอดน้ำกลั่นลงในช่อง เพื่อล้างอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นดูดน้ำออกจนเห็นเป็นช่องๆ

4. การทำ electrophoresis

4.1 ต่อชุดอิเลคโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ใน chamber

4.2 ใส่สารละลายเอ็นไซม์ที่สกัดได้ลงในช่องบน stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อยๆหยอดผ่าน buffer ลงในช่องเจล

4.3 ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่างและขั้วลบเข้ากับ chamber บน และเปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสคงที่ที่ 15.0 mA สำหรับ stacking gel และ 25 mA สำหรับ separating gel (150-200V)

4.4 ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง

4.5 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาดเพื่อตรวจหาตำแหน่งของไอโซไซม์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การย้อมสีเอนไซม์

เตรียม staining solution ของไอโซไซม์โดยการย้อมสีเอนไซม์ esterase, glutamate oxaloacetate trasaminase, leucine amino peptidese, malic enzyme และ malate dehydrogenase ตามสูตรของ Vellejoe (1983) แล้วนำเจลบนแผ่นแก้วมาใส่ใน plate ที่มี staining solution อยู่แล้วนำไป incubate ในที่มืด อุณหภูมิ 37°C ทิ้งไว้ประมาณ 15-60 นาที จนปรากฏแถบ

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล (analysis)

วิเคราะห์ค่าที่ได้จากการมีแถบสีหรือไม่มีแถบสีของแต่ละตำแหน่งแล้วแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าที่ไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sneath and Sokal, 1973) แล้วหาแถบที่มีค่าเป็น 1 อย่างเดียวหรือ เป็น 0 อย่างเดียวของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved