หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง ยาสูบ 2 ชนิด คือ Nicotiana tabacum Linnaeus
   Nicotiana rustica Linnaeus
2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และธาตุอาหารรอง (micronutrients) มาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ (analytical grade) ตามสูตรของ Murashige and Skoog (1962) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

2.2 สารเร่งการเจริญ IAA (indoleacetic acid)
2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
Kinetin (6-furfuryl-aminopurine)

2.3 สารอินทรีย์ วุ้นผง (ใช้มาตรฐานสำหรับทำยา)
น้ำตาลทราย (table sugar)

2.4 น้ำยาฆ่าเชื้อ clorox (ซึ่งมี sodium hypochlorite 5.25%)
เอธิลแอลกอฮอล์ 90 %

2.5 สารเคมีที่ช่วยลดแรงตึงผิว tween-20

2.6 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Disc electrophoresis โดยมี
polyacrylamide gel เป็นตัวกลาง
Trizma base Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
1 N HCl

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองตาม Murashige and Skoog (1962)

สารประกอบ	ปริมาณ (มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1,690.0
KNO_3	1,900.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0
$MgSO_4.7H_2O$	370.0
KH_2PO_4	170.0
ธาตุอาหารรอง	
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.4H_2O$	22.300
$ZnSO_4.4H_2O$	8.600
KI	0.830
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.300
$FeSO_4.7H_2O$	27.800

TEMED (N,N,N',N' tetramethylethylene-diamine)

Acrylamide

Bis (N',N'-Methylene bis acrylamide)

Ammonium persulphate

Riboflavin

Glycine

Tris

Bromophenol blue

3-Amino-9-ethyl carbazole

B-Napthol

Acetone

Acetic acid

H_2O_2

Glycerol

DTT (DL-Dithiothreitol)

Polyvinylpyrrolidone (PVP)

3. อุปกรณ์

3.1 ขวดแก้วขนาด 4x7.5 ซ.ม. พร้อมฝาเกลียวพลาสติคทนความร้อน สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.2 ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 200 มล.

3.3 อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น Petri dish, มีดผ่าตัด ปากคีบ กระบอกตวง ปิเปต บีกเกอร์ ฯลฯ

3.4 อุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการ run electrophoresis เช่น โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช น้ำแข็ง

refrigerated centrifuge ของ HITACHI Type 20 PR-52 กล่องพลาสติคขนาดใหญ่สำหรับย้อมสี ฯลฯ

3.5 เครื่องมือในการ run electrophoresis แบบ vertical slab gel

3.5.1 Electrophoresis Cell ของ BIO-RAD PROTEAN™ II ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

gel mould (ประกอบด้วยแผ่นกระจกขนาด 19x15 ซม. wel comb) upper electrode, upper electrode chamber, lower electrode, lower electrode chamber

3.5.2 Power Supply ของ HIRANUMA MODEL EP-1500 ชนิดกระแสตรง (direct current) ซึ่งมี constant voltage output 0-1500 volt และมี constant current output 0-100 mA

3.6 Densitometer ของ Hiranuma Model HAD-501

3.7 Spectrophotometer ของ HITACHI

4. ชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ

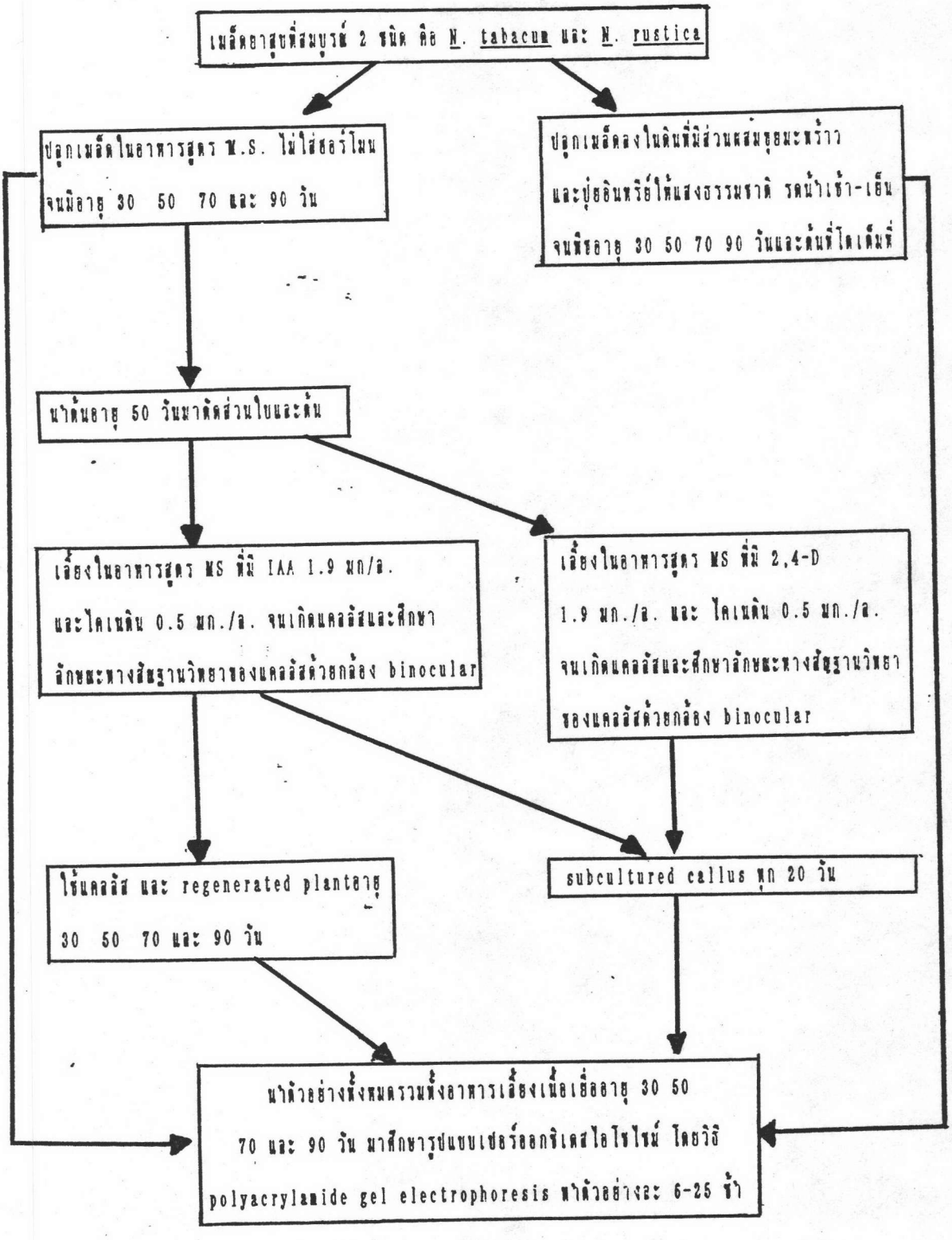
สภาพแวดล้อมของชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้ความเข้มแสงประมาณ 1200 ลักซ์ จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ชนิด TL 40/33 ช่วงสว่าง:ช่วงมืดคือ 16:8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60 เปอร์เซนต์

<u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

1. แผนดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนในการดำเนินการทดลองตลอดโครงการแสดงดังแผนภาพที่ 1

<u>แผนภาพที่ 1</u> แผนดำเนินงานวิจัยโดยสังเขปตลอดโครงการ



2. การเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

2.1 สูตรอาหารสำหรับเพาะเมล็ดและเลี้ยงต้นกล้าในสภาพปลอดเชื้อ สารอาหารหลักและรอง ตาม MS (1962) และน้ำตาล 30 กรัม/ล. pH 5.6

2.2 สูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัสยาสูบ มี 2 สูตรดังนี้

<u>สูตรที่ 1</u> ประกอบด้วย

สารอาหารหลักและสารอาหารรองตาม MS (1962) ตามตารางที่ 1

IAA	1.9	มก./ล.
Kinetin	0.5	มก./ล.
Myo-inositol	100	มก./ล.
Thiamine HCl	0.4	มก./ล.
น้ำตาลทราย	30,000	มก./ล.
วุ้นผง	80,000	มก./ล.
pH	5.6	

<u>สูตรที่ 2</u> ประกอบด้วย

สารอาหารหลักและสารอาหารรอง เช่นเดียวกับสูตรที่ 1 แต่เปลี่ยนเฉพาะฮอร์โมนจาก IAA เป็น 2,4-D 1.9 มก./ล. ทำอาหารให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งในหม้อนึ่งอัดความดัน ปรับความดันที่ 1.1 กก./ตร.ซม. อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเพาะเมล็ดและการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1 การเพาะเมล็ด

3.1.1 นำเมล็ดยาสูบอุ่นด้วยน้ำที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ด เป็นเวลา 10 นาที

3.1.2 นำเมล็ดจากข้อ 3.1.1 ฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดยาสูบด้วย clorox ความเข้มข้น 15 เปอร์เซนต์ เติม tween-20 2-3 หยดต่อ 100 มล.ของสารละลาย clorox เป็นเวลา 30 นาที

3.1.3 ล้างเมล็ดยาสูบด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เก็บไว้ใน Petri dish

3.1.4 นำเมล็ดที่ได้เพาะในอาหารสำหรับเพาะเมล็ด

3.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส

3.2.1 นำต้นยาสูบอายุประมาณ 50 วัน มาตัดส่วนของลำต้นและใบออกเป็นส่วน ๆ กรีดแผ่นใบให้เกิดรอยแผล และนำไปเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสตามสูตรที่ 1 และ 2 แคลลัสจะเกิดตามบริเวณรอยแผลและรอยตัดเลี้ยงไว้ในอาหารเดิม จนได้แคลลัสและ regenerated plant อายุต่าง ๆ

3.2.2 นำแคลลัสจากข้อ 3.2.1 ส่วนหนึ่ง ย้ายลงอาหารใหม่

4. การปลูกยาสูบในสิ่งแวดล้อมภายนอก

4.1 เพาะเมล็ดยาสูบ 2 ชนิด ลงในส่วนผสมของดิน ขุยมะพร้าว และปุ๋ยอินทรีย์ในอัตราส่วน 2:2:1 ให้แสงธรรมชาติ รดน้ำเป็นประจำเช้า-เย็น

5. การเตรียม stock ของสารเคมี เพื่อทำ polyacrylamide gel electrophoresis ดัดแปลงจาก Williams and Reisfeld, (1964) ดังนี้

5.1 การเตรียม running gel stock solution

ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของ running gel stock solution

สารประกอบ	ปริมาณ
stock A	
Trizma base	181.0 กรัม
1N-HCl	240.0 มล.
TEMED	1.2 มล.
เติมน้ำให้เป็น	1,000.0 มล.
stock B	
Acrylamide	300.0 กรัม
Bis	8.0 กรัม
เติมน้ำให้เป็น	1,000.0 มล.
stock C (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)	
Ammonium persulphate	140.0 มก.
เติมน้ำให้เป็น	100.0 มล.

เมื่อจะใช้ผสม stock A:B:C ในอัตราส่วน 1:1:2 คือใช้ 40:40:80 มล. ต่อ 4 slab gel

5.2 การเตรียม Spacing gel stock solution ดังตาราง ที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของ Spacing gel stock solution

สารประกอบ	ปริมาณ
stock D	
Trizma base	29.9 กรัม
1N-HCl	240.0 มล.
TEMED	2.3 มล.
เติมน้ำให้เป็น	1,000.0 มล.
stock E	
Acrylamide	75.0 กรัม
Bis	12.5 กรัม
เติมน้ำให้เป็น	1,000.0 มล.
stock F	
Riboflavin	20.0 มก.
เติมน้ำให้เป็น	1,000.0 มล.

เมื่อจะใช้ผสม stock D:E:F ในอัตราส่วน 1:2:1 คือใช้ 10:20:10 มล.ต่อ 4 slab gel

5.3 การเตรียม reservoir buffer stock solution และ bromo-phenol-blue-tris-glycine solution (BPB) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของ reservoir buffer และ bromophenol blue stock solution

สารประกอบ	ปริมาณ
stock reservoir buffer	
Glycine	144.0 กรัม
Tris	30.0 กรัม
เติมน้ำให้เป็น	5,000.0 มล.
stock BPB	
Bromophenol blue	100.0 มก.
Reservoir buffer	10.0 มล.
เติมน้ำให้เป็น	100.0 มล.

เมื่อจะใช้ reservoir buffer ให้ใช้ครั้งละ 500 มล. และเจือจางลงด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า เป็น 5,000 มล. เพื่อใส่ลงใน chamber ในการ run electrophoresis ไม่ควรใช้ buffer ซ้ำเกิน 2 ครั้ง ควรจะเตรียมใหม่

เมื่อจะใช้ BPB ใช้ครั้งละ 50 ไมโครลิตรต่อ 4 slab gel

5.4 การเตรียม stock สำหรับสีย้อมเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของ stock สีย้อมเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์

สารประกอบ	ปริมาณ
stock G	
3-Amino-9-Ethylcarbazole	1.05 กรัม
B-Napthol	725.0 มก.
Acetone	500.0 มล.
stock H	
Tris	3.257 กรัม
Acetic acid (glacial)	4.05 มล.
เติมน้ำให้เป็น	500.0 มล.
stock I (เตรียมทันทีที่ใช้)	
H_2O_2 (40 %)	0.79 มล.
เติมน้ำให้เป็น	10.0 มล.

เมื่อจะใช้ผสม stock G:H:I ในอัตราส่วน 20:80:1 มล. ต่อ 1 slab gel

5.5 การเตรียม extract buffer stock solution ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของ extract buffer stock solution

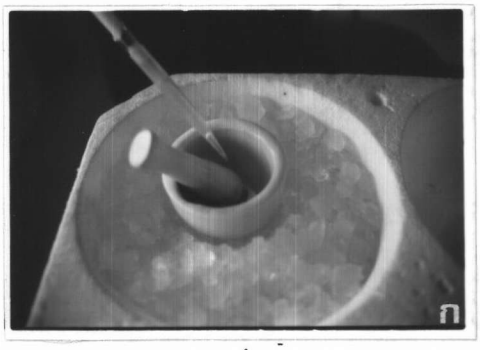
สารประกอบ	ปริมาณ
stock J	
Glycerol	50.4 กรัม
น้ำ	30.0 มล.
Tris	3.016 กรัม
น้ำ	100.0 มล.
stock K	
DTT	463.0 มก.
น้ำ	50.0 มล.

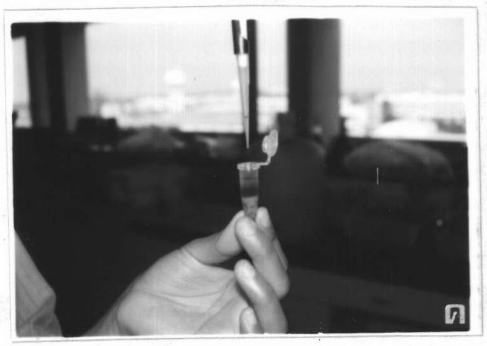
เมื่อจะใช้ผสม stock J:K:น้ำ ในอัตราส่วน 2.5:0.34:2.16 มล. การใส่ extract buffer ขึ้นกับน้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ โดยจะใช้ในอัตราส่วน 200 มก. (ของพืช) : 200 มก. (ของ PVP) : 2 มล. (ของ extract buffer)

6. การสกัดเอ็นไซม์ มีขั้นตอนแสดงดังแผนภาพที่ 2

แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดเอ็นไซม์

ตัวอย่างพืชผสมกับ polyvinylpyrrolidone (PVP) และ extract buffer ในอัตราส่วน 200 มก. (พืช) : 200 มก. (PVP) : 2 มล. (extract buffer)





รูปที่ 1 ขั้นตอนการสกัดเอ็นไซม์

ก. บดตัวอย่างพืชที่ผสมกับ extract buffer และ PVP ในโกร่งพื้นร่องอยู่บนน้ำแข็ง

ข. นำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้วใส่หลอดเหวี่ยงเข้าเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 17,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค. นำน้ำใสที่อยู่ตอนบนไปใช้ในการ run electrophoresis

บดในโกร่งที่แช่อยู่บนน้ำแข็งให้ละเอียด

(โกร่งเก็บในตู้แช่แข็ง)

↓

ใส่หลอดเหวี่ยง (centrifuge-tube)

↓

เข้าเครื่อง refrigerated centrifuge

ความเร็ว 17,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

↓

นำน้ำใสที่อยู่ตอนบน (supernatant) เก็บไว้ใช้

↓

run electrophoresis

7. การเตรียมแผ่น gel ในการทำ disc electrophoresis โดยมี polyacrylamide gel เป็นตัวกลาง (disc มาจาก discontinuity ซึ่งหมายความถึงระบบของ electrophoresis ที่ใช้ pH discontinuity)

7.1 ประกบกระจก 3 แผ่นเข้าด้วยกัน 2 ชุด (ทั้ง 2 ชุดให้ช่องสำหรับหยอด gel 4 ช่อง) โดยคั่นกระจกแต่ละแผ่นด้วยยางหนาประมาณ 1.5 ม.ม.ประกบกระจกให้แน่น จากนั้นนำไปตั้งบน stand ให้ตั้งฉากกับฐานของ stand แล้วยึดให้แน่นด้วยตัวยึด เพื่อให้กระจกประกบกันสนิท

7.2 เท running gel (เป็น gel ที่อยู่ในชั้นล่างสุด ซึ่งมีขนาดของ pore เล็ก โดย gel มีความเข้มข้นสูง 7.5 เปอร์เซนต์ และเตรียมในสารละลาย buffer ที่มีความเข้มข้นสูง ค่า pH สูงประมาณ 8.9 ซึ่งทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ช้า และแบ่งแยกกันได้ชัดเจน) ที่ผสมเตรียมไว้ โดยดูดอากาศออกก่อน แล้วจึงนำไปหยอดลงในช่องว่างระหว่างกระจก และปรับระดับของสารละลายให้อยู่ในระดับที่กำหนดไว้ โดยการใช้ suction ดูด

7.3 ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นประมาณ 1 มล. ลงไปบนชั้น running gel เพื่อปิดกั้นออกซิเจน ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง gel จะเกิด polymerization แข็งตัว แล้วจึงดูดน้ำออกด้วย suction

7.4 นำสารละลายของ spacing gel (เป็น gel ที่อยู่ชั้นบนเหนือชั้น running gel เป็นชั้นที่มีความเข้มข้นต่ำ 3.5 เปอร์เซนต์ เตรียมในสารละลาย buffer ที่มีความเข้มข้นต่ำ และค่า pH ประมาณ 6.7 ขนาดของ pore ใน gel มีขนาดใหญ่ ตัวอย่างจึงเคลื่อนผ่านชั้นนี้ได้อย่างรวดเร็ว) ที่ผสมเตรียมไว้โดยดูดอากาศออกก่อน แล้วจึงนำไปหยอดเหนือ running gel จนถึงระดับอีก 0.5 ซ.ม.จะถึงขอบกระจก

7.5 นำ wel comb มาเสียบระหว่างกระจก ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ นำไปวางในที่มีแสง เพื่อให้เกิดการ polymerization ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที

7.6 เมื่อสังเกตเห็น spacing gel มีสีขาวขุ่น ทิ้งไว้อีก 10 นาที จากนั้นจึงค่อย ๆ ดึง wel comb ออก

7.7 ล้างช่อง wel comb เพื่อล้างเอาส่วน spacing gel ที่ polymerize ไม่หมดออก โดยค่อย ๆ ล้างด้วย reservoir buffer ที่เจือจางแล้ว ใช้ suction ดูดออกทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไปใส่ใน electrophoresis cell เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับใส่ตัวอย่างต่อไป

8. วิธีการ run electrophoresis มีขั้นตอนแสดงดังแผนภาพที่ 3

<u>แผนภาพที่ 3</u> ขั้นตอนการ run electrophoresis

ติดตั้ง gel mould เข้ากับ electrophoresis cell ใน buffer chamber ที่ใส่ reservoir buffer 5000 มล. เอาไว้แล้ว

↓

หยอดตัวอย่างที่วัดปริมาณโปรตีนและคำนวณให้ทุกตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนเท่ากันทุกช่องก่อน ค่อยหยอดตัวอย่างและเติม BPB 35 ไมโครลิตร

↓

เดินเครื่อง electrophoresis กระแสไฟ 100 มิลลิแอมแปร์ต่อ 4 slab gel กระแสไฟวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

↓

เมื่อ indication line (BPB) เคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งที่กำหนดไว้ (ประมาณ 3 ซม.) ปิดเครื่องดึง gel mould ออก

↓

แช่ gel ลงในสีย้อม ซึ่งทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ประมาณ 20 นาที

↓

ล้างส่วนที่ติดสีเกินออกด้วยน้ำไหล

↓

Fix ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซนต์ ค้างคืน

↓

ห่อ gel ด้วยกระดาษเซลโลเฟน (cellophane) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

↓

นำไปอ่านผล

9. วิธีการบันทึกผล

9.1 ศึกษาผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ 2 ชนิด N. tabacum และ N. rustica โดยศึกษาลักษณะภายนอกของแคลลัสที่ได้และเปอร์เซนต์การเกิดเป็นต้นใหม่

9.2 ศึกษาการแปรรูปของรูปแบบไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยนับจำนวนแถบสีเปรียบเทียบในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาและเขียน zymogram

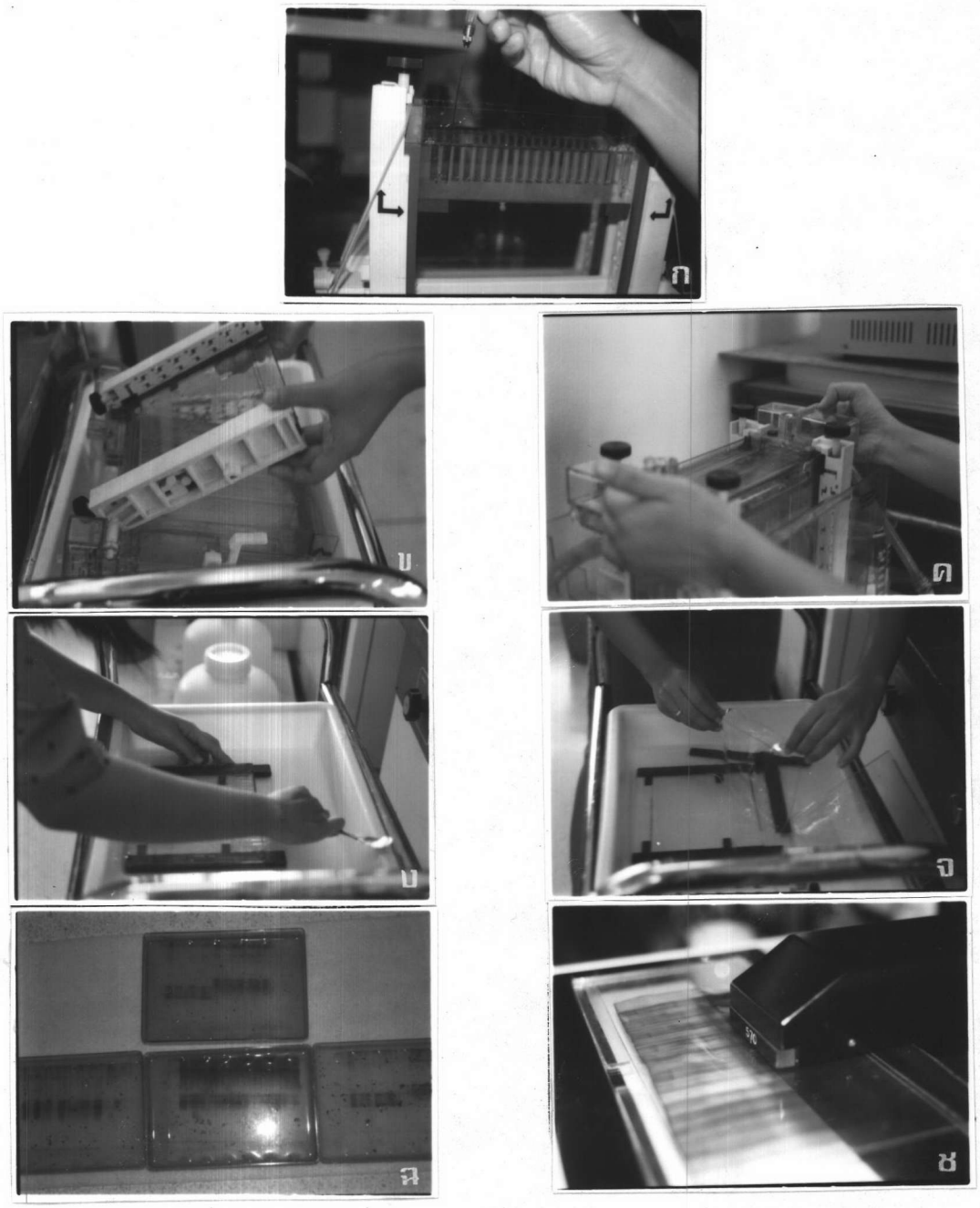
9.3 วัดความเข้มของแถบสี โดยใช้เครื่อง densitometer ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้บอกความเข้มของแถบสี อันเกิดจากการแยกสารโปรตีนที่ต้องการออกจากตัวอย่างโดยวิธี electrophoresis โดยระบบ recording system และบันทึกผลออกมาเป็นกราฟ

9.4 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี โดยวัดจากค่า Rf

$$\text{ซึ่งค่า Rf} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ marker (BPB) เคลื่อนที่ได้}}$$

9.5 ถ่ายรูป gel ทั้งหมดเก็บไว้

9.6 เปรียบเทียบข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้แล้วสรุปผล



รูปที่ 2 ขั้นตอนการ run electrophoresis

ก. การเตรียม gel ใส่ใน gel mould

ข. ติดตั้ง gel mould เข้ากับ electrophoresis cel

ค. หลังจากหยดตัวอย่างและ marker แล้วเดินเครื่อง electrophoresis เมื่อ marker เคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งที่กำหนดไว้ ปิดเครื่อง ดึง gel mould ออก

ง. และ จ. แกะแผ่น gel ออก

ฉ. แช่ gel ลงในสีย้อมประมาณ 30 นาที

ช. นำแผ่น gel ที่ได้ไปวัดความเข้มด้วย densitometer