บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์(Autoclave) บริษัท Hirayama manufacturing Corporation model HA-3D

เครื่องเขย่า(Rotary shaker) ความถี่ 80 รอบต่อนาที ห้างหุ้นส่วนจำกัด เปสไซเอนติฟิค

Incubator shaker บริษัท Meto Birkcrod model 02 PT 623

เครื่องระเหยสารภายใต้สภาวะสูญญากาศ(Rotary Vacuum evaporator) พร้อมอ่างควบคุมอุณหภูมิ(Water bath) BUCHI RE III

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatografhy, HPLC) Shimadzu LC-3A

กล้องจุลทรรศน์ Nikon model UFX-11

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง(pH meter) บริษัท RADIOMETER model PHM 83 Autocal

เครื่องกรองจุลินทรีย์(Swinnex)พร้อมกระดาษกรองขนาด 0.45ไมโครเมตร

ตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีบรรยากาศปลอดเชื้อ (Larminar Flow) บริษัท ISSCO model 25

เครื่องอบไมโครเวฟ(Microwave Oven) บริษัท NEC model MC-300 TE

คอลัมน์สำเร็จรูป Sep-Pak C-18 cartridge บริษัท Waters Associates

2.1.2 สารเคมี

2.1.2.1 ไมโออินโนสิทอล (Myoinositol) บริษัท Sigma

2.1.2.2 กรดนิโคตินิค (Nicotinic acid) บริษัท Sigma

2.1.2.3 อะมิโนไกลซีน (Aminoglycine) บริษัท Fluka

2.1.2.4 ไพริด็อกซิน ไมโนไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine monohydrochloride) บริษัท Sigma

2.1.2.5 ไทอะมีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine hydrochloride)บริษัท Sigma

2.1.2.6 กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติค (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) บริษัท Fluka

2.1.2.7 เบนซิลอะดีนีน (Benzyl adenine) บริษัท Sigma

2.1.2.8 กรดอินโดลอะซิติค (Indoleacetic acid) บริษัท Sigma

2.1.2.9 โคเลสเตอรอล (Cholesterol) บริษัท Sigma

2.1.2.10 กรดเมวาโลนิค (Mevalonic acid) บริษัท Sigma

2.1.2.11 สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล(Stigmasterol-Sitosterol) สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยน้ำหนัก 1 กรัม มีสติกมาสเตอรอล 0.4014 กรัม และ ซิโตสเตอรอล 0.4158 กรัม คิดเป็นความบริสุทธิ์ 80.17 เปอร์เซ็นต์

2.1.2.12 อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ชนิด HPLC grade บริษัท E. Merck Damstadt, Germany

2.1.2.13 เมทธิลแอลกอฮอล์ (Methyl alcohol) ชนิด analytical grade บริษัท Mallinckrodt, Inc. U.S.A.

2.1.2.14 เอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ชนิด analytical grade บริษัท BDH, England

2.1.2.15 ผงวุ้น (Agar Powder) ห้างหุ้นส่วนจำกัด วอร์ด เมดิก

สารเคมีอื่นๆ นอกจากนี้เป็นสารในเกรดวิเคราะห์จากบริษัท Siggma, Fluka และ BDH

2.2 ตัวอย่างพืช

2.2.1 ชิ้นส่วน ต้น ใบ และเปลือก ของต้นไข่เน่า (Vitex glabrata R.Br.) จาก อ. บางเขน กรุงเทพมหานคร อายุ 7 ปี

2.2.2 แคลลัสส่วนต้น ใบ และเปลือก ส่วนหนึ่งได้รับจาก นส.ปัทมา ถาวรนิธิ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบางส่วนทำการเพาะเลี้ยงมาจากส่วนของพืชจากธรรมชาติ

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัส

ใช้สูตรอาหารที่พัฒนาโดย ปัทมา ถาวรนิธิ (ปัทมา, 2533) โดยใช้อาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS medium) (Murashige and Skoog, 1962) ครึ่งสูตร (1/2 MS) ที่เสริมด้วย auxin คือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ cytokinin คือ benzyladenine (BA) 1 กับ 2 ppm ผงวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เท่ากับ 5.6 (ดูภาคผนวก 1) นำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4 อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า

2.4.1 อาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ปรับ pH 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2.4.2 อาหารเหลวสูตร B-5 (Gamborg, 1970) ทำการเตรียมอาหารแล้วเสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 กับ 2 ppm ปรับ pH 5.6 นำไปอบฆ่าที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2.5 วิธีเตรียมสารละลายโคเลสเตอรอล (Cholesterol)

ละลายโคเลสเตอรอล 100 และ 200 มิลลิกรัมในเอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ อย่างละ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 ° ซ แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

016513

2.6 วิธีเตรียมสารละลายกรดเมวาโลนิค (Mevalonic acid)

ละลายกรดเมวาโลนิค 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้เก็บไว้ได้นาน เมื่อจะใช้นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

2.7 วิธีเตรียมสารละลายสติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล (Stigmasterol-Sitosterol)

ละลายสติกกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล 100 และ 200 มิลลิกรัม ในเอธิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ อย่างละ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 ° ซ แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

2.8 การเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์แคลลัส (ปัทมา, 2533)

2.8.1 วิธีฟอกฆ่าเชื้อ

2.8.1.1 ตัดกิ่งของต้นไข่เน่า ความยาวจากปลายยอดประมาณ 1 ฟุต ล้างด้วยน้ำจนสะอาด

2.8.1.2 ตัดใบออกจากกิ่งและตัดส่วนกิ่งให้เป็นท่อน ๆ ยาวท่อนละประมาณ 1 นิ้ว เช็ดด้วย 70 % เอธิลแอลกอฮอล์

2.8.1.3 แยกแต่ละส่วน(ใบและกิ่ง) ลงแช่ใน 10 % คลอรอกซ์ที่มี Tween 20 ประมาณ 4-5 หยด เพื่อลดแรงตึงผิวเป็นเวลานาน 10 นาที เขย่าตลอดเวลาที่แช่

2.8.1.4 ย้ายลงแช่ใน 5 % คลอรอกซ์ที่มี Tween 20 นาน 15 นาทีเขย่าตลอดเวลาที่แช่

2.8.1.5 ล้างคลอรอกซ์ และ Tween 20 ออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนกระทั่งไม่มีฟองของ Tween 20 เหลืออยู่ (ประมาณ 3 ครั้ง)

2.8.2 การตัดชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อ ทำบนจานเพาะแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.8.2.1 ชิ้นส่วนพืชที่นำมาทดลอง

ใบ ใช้ใบอ่อนบริเวณปลายยอด (0.5 x 0.5 ซม.)

เปลือก โดยการนำกิ่งที่ฟอกแล้วมาลอกส่วนเปลือกออก

(0.5 x 0.5 ซม.)

ต้น โดยการนำกิ่งที่ไม่ได้ลอกเปลือกแต่ฟอกแล้วตัดตามขวาง

ให้ได้ขนาดความหนา 0.2 ซม.

2.8.2.2 ย้ายเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยใช้ปากคีบที่ชุบแอลกอ-ฮอล์ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วปล่อยให้เย็นสักครู่ คีบชิ้นส่วนที่ต้องการไปเจริญบนอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ตามข้อ 2.3 ปิดจุกนำไปเลี้ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2° ซ (รูปที่ 6)

2.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัส

เมื่อชิ้นส่วนพืชพัฒนาเป็นก้อนแคลลัสขึ้นแล้วประมาณ 2-3 สัปดาห์ ทำการย้ายก้อนแคลลัสมาสู่อาหารแข็งสูตรมาตรฐาน 1/2 MS ขวดใหม่ ทิ้งไว้ให้ก้อนแคลลัสเจริญต่อไปจนขนาดใหญ่ขึ้นอีกเล็กน้อยเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม. ทำการตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเดิมของพืชที่ยังมีติดอยู่ออก แยกเอาเฉพาะกลุ่มเซลล์แคลลัสออกมาเลี้ยงบนอาหารแข็งขวดใหม่อีกครั้งหนึ่ง จากนี้ทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเช่นนี้ทุกๆ 3 สัปดาห์ จนได้ปริมาณแคลลัสเพิ่มขึ้นมากพอที่จะใช้ในการวิจัยต่อไป

2.10 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าในอาหารเหลว

นำแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนใบ เปลือก และต้น ของพืชไข่เน่าที่มีลักษณะนิ่มฟู (friable) มาบันทึกน้ำหนักและถ่ายลงขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวสูตร 1/2 MS (ข้อ 2.4.1) โดยใช้แคลลัสหนัก 10 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มล. ทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เขย่าในเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความถี่ 80-100 รอบต่อนาที ให้แสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่งโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2° ซ (รูปที่ 7)

เมื่อทำการเลี้ยงครบ 3 สัปดาห์ ย้ายเซลล์ทั้งหมดลงเลี้ยงในอาหารใหม่ สูตรเดิมปริมาตร 200 มล.ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่สภาวะมาตรฐานจนครบ 3 สัปดาห์ นำเซลล์ทั้งหมดมากรองผ่านผ้ากรอง(Nylon mesh) ขนาดความกว้างของ

รูปที่ 6 ภาพแสดงชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

รูปที่ 7 ภาพแสดงเครื่องเขย่าสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืช

รู 560 ไมโครเมตร เพื่อแยกกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ออกไปแล้วนำเซลล์ส่วนที่อยู่ในอาหารเหลวมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บเซลล์ที่กรองได้บนกระดาษกรองทั้งหมดนำไปเลี้ยงในภาชนะและสภาวะเดิมอีกนาน 3 สัปดาห์ เซลล์ที่ได้นี้จะเป็นเซลล์เริ่มต้นสำหรับการทดลองต่างๆ ต่อไป โดยจะนำเซลล์เหล่านี้มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ปริมาตรอาหาร 50 มล. ตามจำนวนที่ต้องการ

2.11 การวัดการเจริญของเซลล์ในอาหารเหลว

เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าสามารถติดตามการเจริญได้เป็น 2 แบบ คือ

2.11.1 การวัดปริมาตรของเซลล์ตกตะกอน (Packed Cell Volume, PCV)

ดูดเซลล์แขวนลอย 10 มล. ด้วยปิเปตปลายตัดลงในหลอดพลาสติกปลายแหลม (Centrifuge tube) ที่มีสเกลบอกปริมาตร ทำการปั่น 400 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที อ่านค่าปริมาตรของเซลล์ที่ตกตะกอน แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับปริมาตรเดิม 10 มล. ซึ่งเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

2.11.2 การหาค่าน้ำหนักแห้ง

ดูดเซลล์แขวนลอย 1 และ 10 มล. ด้วยปิเปตปลายตัดทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่ทราบน้ำหนัก โดยใช้วิธี suction นำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 40° ซ เป็นเวลา 30 นาที โดยเครื่องอบ microwave ชั่งน้ำหนักจะทราบค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เป็นกรัม

2.11.3 การหาค่าโปรตีน

นำกระดาษกรองที่มีเซลล์อบแห้งจากการหาค่าน้ำหนักแห้งในข้อ 2.11.2 มาทำการวัดค่าโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951) จะได้ค่าโปรตีนของเซลล์ คำนวณค่าโปรตีนเป็นมิลลิกรัม

2.12 การเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ระดับเบตา-เอคไดโซน

2.12.1 การเก็บเซลล์

ทำการเก็บเซลล์ตามกำหนดเวลา โดยนำเซลล์แขวนลอยมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เซลล์ที่ได้บนกระดาษกรองนำไปอบแห้งที่ 55° ซ จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่

บันทึกค่าน้ำหนักแห้ง

2.12.2 การเก็บตัวอย่างส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์

นำส่วนของอาหารเหลวที่เหลือจากการกรองเอาเซลล์ออกไปแล้วทั้งหมดมาวัดปริมาตร ถ่ายใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปอบที่ 55° ซ

2.13 การสกัดแยกสารเบตา-เอคไดโซนจากเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์ที่อบแห้ง ชั่งน้ำหนัก 0.2 กรัม ไปสกัดด้วย 95 % เอธิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน น้ำหนักแห้ง 1.0 กรัม ต่อเอธิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร โดยวิธี Soxhlet เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator

2.14 การสกัดแยกสารเบตา-เอคไดโซนจากส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์

นำตัวอย่างที่อบแห้งจากข้อ 2.12.2 มาสกัดด้วย 95 % เอธิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วนน้ำใส 100 มล. ต่อเอธิลแอลกอฮอล์ 10 มล. ทำการเขย่าที่ 55° ซ เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator

2.15 วิธีเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC (ปัทมา, 2533)

นำสารตัวอย่างสกัดที่อบแห้งแล้วมาละลายด้วยเมทธิลแอลกอฮอล์ปริมาตร 1.0 มล. ทำการเขย่ากับเฮกเซนปริมาตร 2.0 มล. ดูดชั้นเฮกเซนทิ้งนำส่วนที่เหลือไปอบแห้งที่ 55° ซ จากนั้นนำมาละลายน้ำกลั่น 5 มล. นำไปผ่านคอลัมน์ Sep-pak c-18 ทำการชะครั้งแรกด้วยสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์เมทธานอลในน้ำ และครั้งที่สองด้วย 10 มล.ของสารละลาย 80 เปอร์เซ็นต์เมทธานอลในน้ำ เก็บสารละลายที่ได้นำไปอบแห้งที่ 55 °°ซ จากนั้นนำมาละลายด้วยเมทธิลแอลกอฮอล์สมบูรณ์ปริมาตร 0.5 มล. นำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนต่อไป

2.16 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC (ปัทมา, 2533)

นำสารละลายจากข้อ 2.15 มาทำการวิเคราะห์โดยการฉีดสารละลาย 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadzu LC - 3A) โดยมีสภาวะดังนี้

Colomn size	;	25 cm x 4.6 mm I.D.
Absorbent	;	DUPONT SORBAX ODS
Injection pressure	;	300 Kg/cm
Solvent	;	14 % acetonitrile in 2 % acetic acid
Flow rate	;	1 ml/min
Detector	;	UV 254 nm

โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของเบตา-เอคไดโซน เท่ากับ 22 นาที (ภาคผนวกที่ 3)

คำนวณค่าเบตา-เอคไดโซน จากเส้นกราฟมาตราฐาน (ภาคผนวกที่ 4)