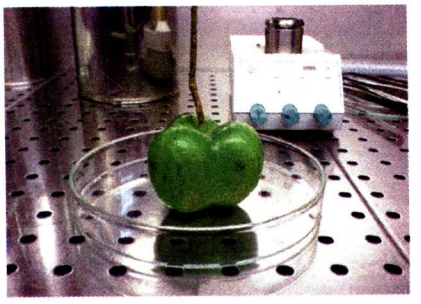
วิธีการทดลอง

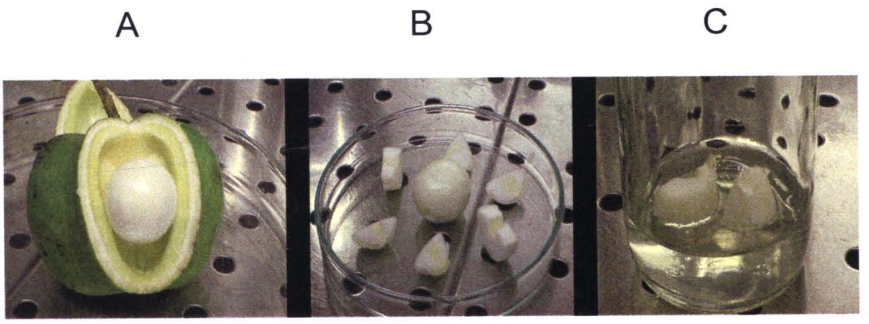
1. การชักนำเซลล์แขวนลอยจากเมล็ดอ่อนยางพารา

1.1 การคัดเลือกผลและชักนำคัลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา

นำผลของยางพาราพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ *P. palmivora*) อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ หลังการผสมเกสร (ดังแสดงในรูปที่ 1) มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกโดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % แล้วลนไฟ ทำเช่นนี้ 1–2 ครั้ง จนแน่ใจว่าผิวภายนอกสะอาดปราศจากเชื้อ จากนั้นเปิดเปลือกผลออกจะเห็นเมล็ดอ่อนรูปร่างกลมขนาดเล็กติดอยู่กับรก ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดแยกเมล็ดออกจากผล ผ่าครึ่งเพื่อแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วผ่าอีกครั้งตามขวางเพื่อแบ่งเมล็ดอ่อกเป็น 3 ส่วน ดังนั้น 1 เมล็ดสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ส่วน นำเมล็ดที่ตัดแบ่งเป็นส่วน ๆ ไปเลี้ยงในอาหารชักนำคัลลัส อาหารที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการดัดแปลงตามตารางที่ 1 (MS-1) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล sucrose 5%, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 mg/l, benzyladenine (BA) 1 mg/l และทำให้อาหารแข็งโดยการเติมวุ้นไฟตาเจลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.15% เมื่อเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพาราในอาหารสูตร MS-1 ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25-27 °C เป็นเวลา 3 - 4 สัปดาห์ (ดูขั้นตอนการเพาะเลี้ยงในรูปที่ 2) เอ็นโดสเปอร์มและเปลือกหุ้มเมล็ดจะใช้เวลาพัฒนาเป็นคัลลัสภายใน 3-4 สัปดาห์ (รูปที่ 3A) จากนั้นทำการย้ายเฉพาะคัลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ด (integument derived callus) ไปเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มปริมาณคัลลัส MS-2 ซึ่งลดน้ำตาล sucrose ลงเหลือ 3% (ตารางที่ 1) เมื่อครบ 4 สัปดาห์จะได้คัลลัสดังรูปที่ 3B



รูปที่ 1 ผลอ่อนยางพาราพันธุ์ BPM-24 อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์ หลังการผสมเกสร



รูปที่ 2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงคัลลัสจากเมล็ดอ่อนยางพารา (A) กรีดเปลือกของผลออก (B) แบ่งเมล็ดอ่อนออกเป็น 6 ส่วน (C) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-1

รูปที่ 3 คัลลัสที่ชักนำจากเมล็ดอ่อนยางพารา (A) คัลลัสที่เจริญจากเปลือกหุ้มเมล็ดและจากเอ็นโดสเปอร์ม หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร MS-1 ประมาณ 3-4 สัปดาห์ (B) คัลลัสเฉพาะส่วนที่เจริญจากเปลือกหุ้มเมล็ด หลังจากย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS-2 เพื่อเพิ่มขนาดประมาณ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตรชักนำคัลลัส MS ซึ่งดัดแปลงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา

องค์ประกอบ	**ปริมาณ** (mg/l)	
	ชักนำคัลลัส (MS-1)	**เพิ่มปริมาณคัลลัส** (MS-2)
KNO_3	1900	1900
NH_4NO_3	1650	1650
$CaCl_2.2H_2O$	322.2	322.2
$MgSO_4.7H_2O$	180.7	180.7
KH_2PO_4	170	170

$MnSO_4.H_2O$	16.9	16.9
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	8.6
H_3BO_3	6.2	6.2
KI	0.83	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025
Na_2EDTA	37.25	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	27.85
Thiamine.HCl	0.02	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10	0.10
Nicotinic acid	0.10	0.10
Glycine	0.4	0.4
Myo-inositol	100	100
BA	1.0	1.0
2,4-D	1.0	1.0
Sucrose (%)	5	3
Phytagel agar (%)	0.23	0.23
pH	5.7	5.7

(ที่มา: ดัดแปลงจากประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538)

1.2 การชักนำเซลล์แขวนลอยโดยการเขย่าคัลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ด

หลังจากย้ายเลี้ยงคัลลัสที่ได้จากรูปที่ 3B จำนวน 3 ครั้ง (ทุก 4 สัปดาห์) นำก้อนคัลลัสที่มีลักษณะร่วน (รูปที่ 4A) ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 2) เขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 ± 4 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 4B) ทำการย้ายเซลล์ที่หลุดออกจากก้อนคัลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมอีก 14 วัน ในการย้ายเลี้ยงใช้เซลล์แขวนลอยเริ่มต้น 0.3 g ต่อ 30 ml ของอาหาร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 ml หลังจากย้ายเลี้ยงแบบเดิมอีก 2-3 ครั้ง จะได้เซลล์สีเหลืองอ่อนที่มีขนาดเกือบเท่ากัน (รูปที่ 4C)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (mg/l)
	ชักนำเซลล์แขวนลอย
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$CaCl_2.2H_2O$	322.2
$MgSO_4.7H_2O$	180.7
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.H_2O$	16.9
$ZnSO_4.7H_2O$	8
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Thiamine.HCl	0.02
Pyridoxine.HCl	0.10
Nicotinic acid	0.10
Glycine	0.4
Myo-inositol	100
2,4-D	1.0
TDZ	0.1
Sucrose (%)	3
pH	5.7

(ที่มา : ดัดแปลงจากเมฆา และสมปอง, 2536)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

A B C

รูปที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์แขวนลอย (A) เลือกคัลลัสที่เกาะกันหลวมๆ (B) ย้ายลงในอาหารสูตรชักนำเซลล์แขวนลอยเพื่อเขย่าเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (C) เซลล์แขวนลอยหลังจากการย้ายเลี้ยง 2-3 ครั้ง และเจริญเติบโตในอาหารใหม่เป็นเวลา 14 วัน

2. การเตรียม culture filtrate จากเชื้อ *P. palmivora*

เลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* บนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ที่ 25-27°C เป็นเวลาประมาณ 5 วัน ตัดเชื้อ *P. palmivora* บนอาหาร PDA บริเวณที่กำลังเจริญเติบโตด้วย cork borer ลงในอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth) โดยใช้เชื้อ 15 ชิ้นต่ออาหารเหลว ปริมาตร 150 ml หลังจากนั้นนำไปวางบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเป็นวงกลมที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่ 25-27 °C เป็นเวลา 21 วัน เชื้อ *P. palmivora* จะค่อยๆ ผลิตอิลิซิเตอร์ออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ทุก 5 วันทำการตรวจหาโปรตีนรวมโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) ใน culture filtrate จะประกอบไปด้วยอิลิซิเตอร์อย่างน้อย 2 ชนิดคือ 10 kDa และ 75 kDa สำหรับอาหารเหลวสูตร Henninger (ตารางที่ 3) ทำการทดลองเหมือนกับการเลี้ยงในอาหาร PDB แต่เขย่าเลี้ยงเพียง 15 วัน เก็บ culture filtrate ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดสอบกับเซลล์แขวนลอยต่อไป

2.1 การหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด

ใช้โปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นละ 100 µl และ culture filtrate ที่ต้องการหาปริมาณโดยใช้ปริมาตรตามความเหมาะสม แต่ปรับให้เป็น 100 µl ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด 3 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสูตร Henninger (Henninger, H., 1963)

องค์ประกอบ	(ปริมาณ/ l ของน้ำกลั่น)
KH_2PO_4	0.5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.25 g
Asparagine	1.0 g
Thiamine	1.0 mg
Yeast extract	0.5 g
Glucose	25.0 g

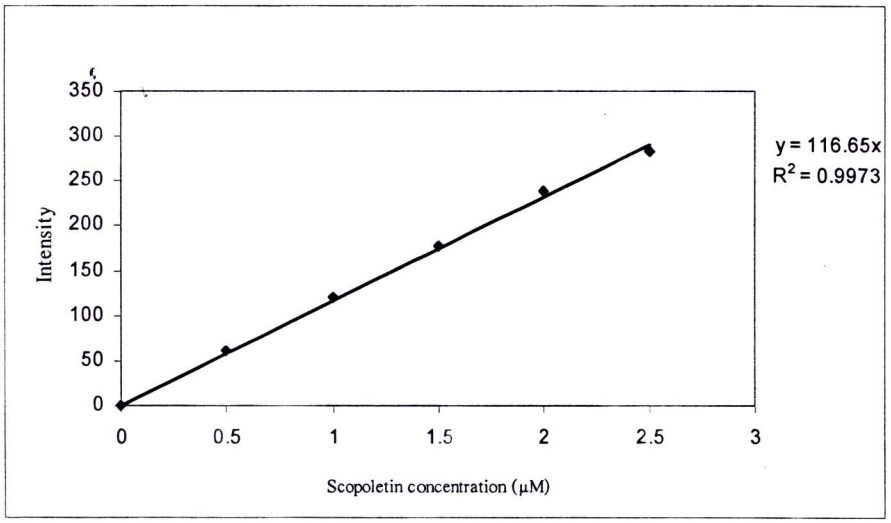
3. การทดสอบความสมบูรณ์ของเซลล์แขวนลอยยางพาราที่เตรียมได้

3.1 การทดสอบเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วย culture filtrate

หลังจากย้ายเซลล์แขวนลอยยางพาราพันธุ์ BPM-24 ในอาหารใหม่สูตรเดิม 3 ครั้ง จะได้เซลล์แขวนลอยสีเหลืองที่มีลักษณะสมบูรณ์ ในแต่ละ treatment จะใช้ 0.5 g ของเซลล์แขวนลอยดังกล่าวซึ่งมีอายุ 14 วัน มาปรับสภาพเป็นเวลา 6 ชม. ใน 5 ml ของอาหารที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Morpholine-ethanesulfonic acid (MES), 3% sucrose และ 5% MS หลังจากนั้นบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย culture filtrate พร้อมเขย่าเบาๆ เก็บแยกส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ (MES buffer) ไว้สำหรับวัดปริมาณการสะสมของ Scp เมื่อเวลาผ่านไป 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96 และ 104 ชม. ด้วยวิธี spectrofluorometry ส่วนตะกอนเซลล์นำไปสกัดด้วย buffer ที่ประกอบด้วย 0.1 M sodium phosphate, pH 7, 3% PVPP และ 0.25% TritonX-100 อัตราส่วน 1 g ของเซลล์ : 1 ml ของ buffer จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 20 นาที นำสารสกัดส่วนใสไปหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด (ดูรายละเอียดในข้อ 2.1) และหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย substrate จำเพาะคือ Scp (S-POD) และ guaiacol (G-POD) โดยแต่ละเวลาของการทดสอบใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม ในแต่ละ treatment ทำการทดลอง 2 ชุดเพื่อหาค่าเฉลี่ย และทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.1.1 การสะสม Scp

นำ MES buffer มาสังเกตการเรืองแสงของ Scp ภายใต้แสง UV หรืออาจนำไปวัดค่าการเรืองแสงก็ได้ เพราะ Scp ที่เซลล์แขวนลอยถูกกระตุ้นให้ผลิตเพิ่มขึ้นจะถูกปลดปล่อยออกมาใน MES buffer ด้วย การวัดค่าการเรืองแสงของสารตัวอย่างใช้เครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของ Scp คำนวณหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Scp (0 - 2.5 μM, รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของ Scp (0-2.5 μM)

3.1.2 การสังเคราะห์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การวัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อใช้ Scp เป็น substrate ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Edwards และคณะ (1997) โดยนำ 10 μl ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยในข้อ 3.1 มาผสมกับ 0.970 ml ของ 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5, 0.1 ml ของ 10 mM Scp และ 0.1 ml ของ 0.1 M H_2O_2 วัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร บันทึกค่าทุก ๆ 15 วินาที จนครบ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำค่าที่ได้มาหาความว่องไวของเอนไซม์ โดยให้ 1 หน่วยของความว่องไว หมายถึงเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ออกซิไดซ์ 1 μmole ของ Scp ในเวลา 1 นาที

ความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเมื่อใช้ guaiacol เป็น substrate ทำการทดลองตามวิธีของ Perez และคณะ (2002) โดยนำ 25 µl ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยในข้อ 3.1 มาผสมกับ 2.6 ml ของ 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.4, 0.1 ml ของ 0.25% guaiacol และ 0.1 ml ของ 0.1 M H_2O_2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร บันทึกค่าทุก 15 วินาที จนครบ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์ โดยให้ 1 หน่วยของความว่องไว หมายถึงเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ออกซิไดซ์ 1 µmole ของ guaiacol ในเวลา 1 นาที

3.2 การปรับสภาพเซลล์แขวนลอยโดยการเขย่าเลี้ยงใน MES buffer

นำเซลล์แขวนลอยอายุ 14 วัน จำนวน 2.5 g ใน 5 ml ของ MES buffer มาทดลองเขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชม.ก่อนทดสอบการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ หลังจากนั้นแยกตะกอนเซลล์ออกจาก MES buffer นำทั้งสองส่วนไปวัดปริมาณโปรตีนรวม(ด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด), กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และแอคติวิตีของ PI

3.2.1 การสังเคราะห์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

นำตะกอนเซลล์จากการเขย่าเลี้ยงใน MES buffer เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชม.(ข้อ 3.2) มาสกัดเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 เมื่อต้องการตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ให้ผสม 10 µl ของสารสกัดกับ 90 µl ของ laminarin ความเข้มข้น 2.0 mg/l (ซึ่งละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0) นำไปแช่และเขย่าเบาๆในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 2 นาที หลังจากนั้นเติม 0.2 ml ของสารละลาย DNS (dinitrosalicylic acid) และ 0.2 ml ของ 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ตั้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.9 ml ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาหาค่าความว่องไวเป็นยูนิต (unit) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส กำหนดให้ 1 ยูนิต เท่ากับเอนไซม์ที่สามารถย่อย laminarin ให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส 1 µmole ในเวลา 1 นาที

3.2.2 การสังเคราะห์ PI

นำตะกอนเซลล์จากการเขย่าเลี้ยงใน MES buffer เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชม. (ข้อ 3.2) มาสกัดเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.1 แต่หลังจากวัดปริมาตรส่วนใสแล้ว ให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเซนตริฟิวจ์อีกครั้งก่อนเก็บ

สารละลายส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์ หรือนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป เมื่อต้องการทดสอบแอคติวิตีของ PI ให้ทดลองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin, chymotrypsin และ subtilisin โดยปิเปต 50 µl ของสารสกัด PI ลงในหลอด eppendorf ซึ่งมีเอนไซม์ต่างๆ คือ trypsin (10 µg/ml ใน 1 mM HCl), chymotrypsin (10 µg/ml ใน 1 mM HCl) และ subtilisin (30 µg/ml ใน 20 mM Tris-HCl pH 8.3),ปริมาตร 20 µl, 20 µl และ 30 µl ตามลำดับ ปรับด้วย 20 mM Tris-HCl , pH 7.8 , 0.1 M $CaCl_2$ ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 600 µl วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติม 100 µl ของสารละลาย 1% azocasein (w/v) ลงไป วางทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 10% trichloroacetic acid (TCA) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ml เซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสม 400 µl ของสารละลายส่วนใส กับ 600 µl ของ 0.5 M NaOH เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ กับค่าจากการย่อย 1% azocasein โดยเอนไซม์มาตรฐานแต่ละชนิดเมื่อไม่เติมสารสกัด PI

4. การบ่มเซลล์แขวนลอยด้วย $CuSO_4$

นำเซลล์แขวนลอย (ตะกอนเซลล์ 2.5 g) ซึ่งผ่านการปรับตัวใน 5 ml ของ MES buffer เป็นเวลา 6 ชม. มาเติม $CuSO_4$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 10, 20, 40, 80 และ 160 µM เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นนำกลับมาเลี้ยงใน MES buffer ที่ไม่มี $CuSO_4$ เก็บทั้ง MES buffer และตะกอนเซลล์มาติดตามการสังเคราะห์โปรตีนรวม (ด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด) และ PI ณ เวลา 24 และ 48 ชม.

5. อัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของ PI

นำเซลล์แขวนลอยยางพารามากระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้น 20 µM เก็บทั้ง MES buffer และตะกอนเซลล์มาติดตามการสังเคราะห์ PI ณ เวลา 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88 และ 96 ชม. เพื่อศึกษาอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของ PI

6. การ purify PI

6.1 วิธี anion exchange

กระตุ้นเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้น 20 µM เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำ 400 ml ของ MES buffer ไปผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B (anion exchange) ปริมาตรคอลัมน์ 25 ml ชะด้วยสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.1 M ใน 20 mM tris-HCl buffer, pH 7.0 โดยมีอัตราการไหล 0.5 ml ต่อนาที เก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

6.1.1 การวัดปริมาณโปรตีนหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B

หลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B นำสารละลายที่ได้ทุก ๆ 2 หลอดมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของแบรดฟอร์ด

6.1.2 การทดสอบหาแถบโปรตีนด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE

โพลีอะคริลาไมล์เป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 ซม. หนา 0.75 มม. ประกอบด้วย เจลส่วนบน (stacking gel) ความสูง 2.5 ซม. และเจลส่วนล่าง (separating gel) ความสูง 5.5 ซม. ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 4 นำสารละลายตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วย Phosphorylase b 97.0 kDa, Albumin 66.0 kDa, Ovalbumin 45.0 kDa, Carbonic anhydrase 30.0 kDa, Trypsin inhibitor 21.0 kDa, α-Lactalbumin 14.4 kDa) มาทำอิเลคโตรฟอรีซิสใน Tris-HCl buffer 0.1 M, Tricine 0.1 M และ SDS 0.1 %, pH 8.25 เปิดกระแสไฟคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Tricine-SDS-PAGE

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (16.5%)
49.5% Acrylamide-bisacrylamide	0.40 ml	4.33 ml
3.0 M Tris-HCl,pH 8.45+0.3% SDS	1.2 ml	4.33 ml
10% Ammonium persulfate	50 µl	200 µl
TEMED	10 µl	13 µl
Deionized water	3.34 ml	4.00 ml
Total volume	5.0 ml	13.0 ml

(ที่มา: ดัดแปลงจากวิธีของ Hermann, S., 2006)

6.2 **การทำบริสุทธิ์ PI ด้วยวิธี** preparative gel electrophoresis

6.2.1 **การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี** Native-preparative gel electrophoresis

โพลีอะคริลาไมล์เจลที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) ความสูง 2.5 ซม. และเจลส่วนล่าง (separating gel) ความสูง 6 ซม. ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 5 Load สารละลายตัวอย่างลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยใช้ Tris-HCl 0.025 M, Glycine 0.2 M , pH 8.3 เป็น running buffer และใช้ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 เป็น buffer สำหรับชะตัวอย่าง เปิดกระแสไฟคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์จนหมดจึงจะเริ่มเก็บตัวอย่าง โดยมีอัตราการไหล 1 ml ต่อนาที และเก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Native-preparative gel electrophoresis

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (12%)
30% Acrylamide-bisacrylamide	2.68 ml	20 ml
1.5 M Tris-HCl,pH 8.8	-	12.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml	-
10% Ammonium persulfate	100 µl	250 µl
TEMED	20 µl	25 µl
Deionized water	12.2 ml	17.225 ml
Total volume	20 ml	50 ml

6.2.2 **การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี** SDS-preparative gel electrophoresis

โพลีอะคริลาไมล์เจลที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) ความสูง 2.5 ซม. และเจลส่วนล่าง (separating gel) ความสูงประมาณ 6 ซม. ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 6 Load สารละลายตัวอย่างลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยใช้ Tris-HCl 0.025 M, Glycine 0.2 M, pH 8.3, 1% SDS เป็น running buffer และใช้ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 เป็น buffer สำหรับชะตัวอย่าง เปิดกระแสไฟคงที่ 25 มิลลิแอมแปร์ ทิ้งไว้จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์จนหมดจึงจะเริ่มเก็บตัวอย่าง โดยใช้อัตราการไหล 1 ml ต่อนาที และเก็บตัวอย่างหลอดละ 3 ml

6.2.2.1 การกำจัด SDS และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น

นำตัวอย่างที่ได้จากการผ่าน SDS-preparative gel electrophoresis ซึ่งมีแถบโปรตีนมา pool รวมกัน เติมน้ำตาล sucrose ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4% แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีนกับอะซิโตน โดยใช้อะซิโตนปริมาตรเป็นสี่เท่าของปริมาตรสารตัวอย่าง นำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C นาน 25 นาที จากนั้นวางในตู้ที่มีการไหลของอากาศเป็นเวลา 30 นาที เพื่อระเหยอะซิโตนที่เหลือออก ละลายตะกอนโปรตีนกลับด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปเซนตริฟิวจ์อีกครั้งเพื่อกำจัดตะกอนต่างๆ เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ SDS-preparative gel electrophoresis

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (12%)
30% Acrylamide-bisacrylamide	2.68 ml	20 ml
1.5 M Tris-HCl,pH 8.8	-	12.5 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml	-
10% Ammonium persulfate	100 µl	250 µl
10% SDS	100 µl	250 µl
TEMED	20 µl	25 µl
Deionized water	12.1 ml	17.125 ml
Total volume	20 ml	50 ml

7. การศึกษาคุณสมบัติของ PI

7.1 ความคงตัวที่ pH ต่างๆ

นำ PI บริสุทธิ์มาบ่มที่ pH 2-10 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 7.0 ก่อนนำไปวัดแอคติวิตีของ PI โดยใช้ azocasein เป็น substrate

7.2 **ความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ**

นำ PI บริสุทธิ์ มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปรับอุณหภูมิโดยการแช่ในกระบะน้ำแข็งก่อนนำไปวัดแอคติวิตีของ PI โดยใช้ azocasein เป็น substrate

7.3 **การยับยั้ง subtilisin ได้เป็นครึ่งหนึ่งของการยับยั้งทั้งหมด (IC_{50})**

นำ PI บริสุทธิ์ มาเจือจางให้มีปริมาณ 0.0157, 0.0785, 0.157 และ 0.314 µg ก่อนนำไปยับยั้ง subtilisin ในปริมาตร 600 µl (ตามวิธีการในข้อ 3.2.2) จากนั้นนำมา plot กราฟระหว่างปริมาณของ PI (µg) กับแอคติวิตีของ PI

7.4 **ผลของ PI ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora***

นำ PI บริสุทธิ์ จำนวน 500 ng มาผสมกับซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น 5 x 10^4 ซูโอสปอร์/ml อัตราส่วน 80 µl : 20 µl (ปริมาตรรวม 100 µl) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น

7.4.1 ปิเปตสารละลายผสม 10 µl ลง Petroff Hausser counting chamber เพื่อนับจำนวนซูโอสปอร์ และสังเกตการเกิด germination ใต้กล้องจุลทรรศน์ ในเวลา 2 ชม.

7.4.2 นำส่วนผสมอีก 20 µl มาหยดลงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ประมาณ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25-27 °C สังเกตการยืดยาวของ mycelium

7.4.3 นำส่วนผสมอีก 30 µl หยดลงบนใบยางซึ่งเลี้ยงไว้บนถาดที่มีน้ำกลั่นและกระดาษกรองเป็นตัวให้ความชื้น ทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน ที่อุณหภูมิ 25-27 °C สังเกตการเกิด necrosis และบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์