บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

โกร่ง

บีกเกอร์ขนาด 25, 50,100, 250 ml

ปิเปตอัตโนมัติขนาด 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 μl (Gilson)

กระบอกตวงขนาด 10, 100 ml

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AG204 Mettler Toledo)

เครื่องเซนติฟิวจ์ (LABQUIP 1000 Series)

Cuvette ขนาด 1 ml

Visible Spectropotometer (Jenway 6400)

UV-VIS Sepectropotometer (Jenway)

ELISA Plate Reader (Bio-Rad,USA)

Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml

pH meter (HACH Sension 1)

Vortex (Eyela mixer MA-1)

96-well microplate

Electrophoresis apparatus (OTTO, Japan and Biorad, USA)

3.1.2 สารเคมี

di-Potassium hydrogen phosphate (Fluka)

Potassium dihydrogen phosphate (Merck)

Bradford reagent (Pierce)

Hydrogen peroxide (Carlo Erba)

Ammonium molybdate (Baker Analyzed)

BSA (Pierce)

PVP (Sigma)

Hydrochloric acid (BDH)

3.2 สายพันธุ์พริกและสายพันธุ์ *Colletotrichum capsici*

3.2.1 สายพันธุ์พริก

ผลพริก : สีแดง สีเขียว จากท้องตลาด

ใบพริก : สายพันธุ์ฮอทฮิต อายุ 5-6 เดือน ได้จากการปลูกในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552 ในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10, 15, 20 เซนติเมตร โดยใช้ดินยี่ห้อดินหลักสิบในการปลูกและรดน้ำทุกวันในช่วง 3-4 เดือนแรก และรดน้ำวันเว้นวันในเดือนถัดมา

สายพันธุ์ซุปเปอร์ฮอท สายพันธุ์จินดา สายพันธุ์ทองขาว สายพันธุ์ช่อไสว พริกขี้หนูหอมขอนแก่น (มข.) อายุ 3 เดือน ได้มาจากคณะเกษตรศาสตร์ที่ปลูกในวันที่ 26 ตุลาคม 2552

- เมล็ดพันธุ์พริก : จินดา

3.2.2 สายพันธุ์ *Colletotrichum capsici*

SKP16, F8-5B โดยความอนุเคราะห์จาก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม)

CC.1.6, CC. 1.9, CC.1.12 จากการแยกเชื้อรา ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อพริก

นำเนื้อเยื่อพริก (ผล หรือ ใบพริกสด) น้ำหนัก 0.12, 0.25 และ 0.5 กรัม ไปสกัดด้วย 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 ml ที่มี 0%, 1% และ 2% PVP ต่อน้ำหนักสด บดให้ละเอียดในโกร่งเย็นและถ่ายใส่ microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 ml นำไปเซนติฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปทดสอบปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976)

เจือจางโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อพริกแบบ 2 fold dilution ให้มีปริมาตร 20 µl หรือ 50 µl ด้วยน้ำกลั่น ด้วยวิธี เติม 200 µl Bradford reagent (Pierce) หรือ 200 µl 1X Bradford reagent (ประกอบด้วย 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250 ใน 25 % methanol และ 42.5 % orthophosphoric acid) ทิ้งไว้ทำปฏิกิริยา 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน BSA ตัวอย่างละ 2 หรือ 3 ซ้ำ

3.3.3 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส (Góth, 1991)

หลักการ : เป็นการติดตามคะตะเลสโดยวัดปริมาณ H_2O_2 ที่เหลืออยู่ด้วยการทำปฏิกิริยากับ ammonium molybdate แล้วให้สารประกอบสีเหลืองที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 nm

3.3.3.1 การทดสอบปริมาณ ammonium molybdate ในการทำปฏิกิริยากับ H_2O_2

เมื่อทดสอบ working volume 1000 µl เพื่อทดสอบว่า 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 500 µl เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mM ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 500 µl ด้วยการเติม 32.4 mM ammonium molybdate ทิ้งไว้ทำปฏิกิริยา 10 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $[H_2O_2]$ และค่า A_{405}

เมื่อทดสอบ working volume 200 µl ใช้ 32.4 mM ammonium molybdate 100 µl ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mM ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 100 µl เป็นเวลา 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร แล้วเขียนกราฟมาตรฐาน H_2O_2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $[H_2O_2]$ และค่า A_{405}

3.3.3.2 การติดตามกิจกรรมคะตะเลส

นำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากใบพริกด้วย 1% PVP 50 mM phosphate buffer pH 7.0 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส ณ เวลา 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที ด้วยการเตรียมตัวอย่างและ blank ดังตาราง

Reaction mixture	1000 µl				200 µl			
	Blank 1	Blank 2	Blank 3	Sample	Blank 1	Blank 2	Blank 3	Sample
50 mM phosphate buffer pH 7.0 (µl)	520	20	500	-	100	75	75	50
Protein extract (µl)	-	-	20	20	-	-	25	25
50 mM H_2O_2 (µl)	-	500	-	500	-	25	-	25

เมื่อครบเวลาแล้วเติม 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 500 µl ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm รายงานผลในหน่วยของ µmol H_2O_2 ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน H_2O_2 โดยกำหนดให้

1 หน่วยเอนไซม์ = การสลาย H_2O_2 ไป 1 µmol / 1 นาที

H_2O_2 ที่ถูกสลาย = (Total H_2O_2) – (H_2O_2 ที่เหลืออยู่)

= [(Blank2+Blank3)-Blank1]-[Sample-Blank1]

การติดตามกิจกรรมคะตะเลสในแต่ละครั้งทำ 3 หรือ 4 ซ้ำ และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้ One Way ANOVA

3.3.3.3 ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากใบพริกปริมาณ 0.25 กรัม ด้วย 1% PVP ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 ml มาเจือจางด้วย 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ให้มีปริมาณโปรตีน 1, 2, 4, 6, 8 µg/25 µl ใน microtiter plate ดังตาราง

Reaction mixture	Blank 1	Blank 2	Blank 3	Sample
50 mM phosphate buffer pH 7.0 (µl)	100	75	75	50
Protein extract (µl)	-	-	25	25
50 mM H_2O_2 (µl)	-	25	-	25

เมื่อดำเนินปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 นาทีแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วย 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 100 µl ทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm รายงานผลในหน่วยของ µmol H_2O_2 ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน H_2O_2 โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้ One Way ANOVA

3.3.3.4 ผลของปริมาณสับสเตรตที่มีต่อกิจกรรมคะตะเลส

เจือจาง H_2O_2 เป็นลำดับขั้นให้มีความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 mM ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 25 µl เติมสารสกัดโปรตีน 2 µg/ 25 µl ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 4 นาที เติม 32.4 mM ammonium molybdate ปริมาตร 100 µl ทิ้งไว้ 10 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate Reader วิเคราะห์ปริมาณ H_2O_2 ในหน่วย µmol H_2O_2 ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน H_2O_2 รายงานผลในหน่วยเอนไซม์ โดย 1 หน่วยเอนไซม์ = การสลาย H_2O_2 ไป 1 µmol / 1 นาที

3.3.4 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

3.3.4.1 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีทางสเปคโตสโคปี (Chance and Maehly, 1955)

นำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากใบพริกปริมาณด้วย 1% PVP ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 มาเจือจางด้วย 100 mM phosphate buffer pH 6.0 ให้มีปริมาณโปรตีน 1, 2, 4, 6, 8 µg/ 50µl ใน microtiter plate ปรับปริมาตรให้เป็น 100 µl ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม 30 mM Guaiacol in 100 mM phosphate buffer pH 6.0

ปริมาตร100 μl เขย่าให้เข้ากันดี แล้วเริ่มปฏิกิริยาด้วย 20 mM H_2O_2 in 50 mM phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 50 μl และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ tetraguaiacol ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 470 nm โดยใช้ kinetic protocol ประมาณ 5 นาที คำนวณหาค่าความเร็วของปฏิกิริยาและรายงานกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในหน่วย μmole tetraguaiacol/mg protein/min หรือ μmole tetraguaiacol/min/g fresh weight โดยคำนวณจาก tetraguaiacol extinction coefficient of 26.6 mM^{-1} cm^{-1} ที่ A_{470}

3.3.4.2 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยวิธีทางอิเลคโตรโฟรีซิส (Shimoni and Reuveni, 1988)

แยกโปรตีนจาก crude extract ปริมาณโปรตีน 20 μg ด้วย 12.5% ND-PAGE แช่เจลในสารละลาย 15 mM phosphate buffer pH 6.0 ที่มี 1 mM H_2O_2 and 0.1 mM guaiacol เป็นเวลาประมาณ 15 – 30 นาที จนกว่าจะเห็นแถบสีน้ำตาล บันทึกภาพด้วยการ scan หรือถ่ายรูป จากนั้นนำไปย้อมแถบโปรตีนด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in water : methanol : glacial acetic acid 5:5:2 จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน แล้วบันทึกภาพด้วยการ scan หรือถ่ายรูป

3.3.5 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

3.3.5.1 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสด้วยวิธีทางสเปคโตสโคปี (Beauchamp and Fridovich, 1971)

เติม 2X reaction mixture ที่ประกอบด้วย 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.8, 0.2 mM EDTA, 20 μM ferricytochrome C, 100 μM xanthine ปริมาตร 100 μl ใน microtiter plate เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วย xanthine oxidase ในปริมาณที่สามารถให้อัตราการเกิดซูเปอร์ออกไซด์ได้ค่าเท่ากับ 0.025 A_{550}/min ในปริมาตรรวม 200 μl ด้วยน้ำกลั่น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยใช้ kinetic protocol ประมาณ 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากใบพริกปริมาณด้วย 1% PVP ใน 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 50μl รายงานกิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสโดย 1 หน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเกิดรีดักชั่นของ cytochrome c ได้ 50%

3.3.5.2 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสด้วยวิธีทางอิเลคโตรโฟรีซิส (McCord and Fridovich, 1969)

แยกโปรตีนจาก crude extract ปริมาณโปรตีน 20 μg ด้วย 12.5% ND-PAGE แช่เจลในสารละลาย 2.45 mM Nitroblue tetrazolium ประมาณ 20 นาที จากนั้นจุ่มลงใน 28 μM riboflavin และ 28 mM TEMED ใน 36 mM potassium phosphate buffer pH 7.8 ประมาณ 15 – 30 นาที นำ gel วางลงบนกระจก อย่าให้แห้ง ฉายไฟ (15W) ประมาณ 5-10 นาที สังเกตผล บริเวณที่มี SOD จะไม่มีสี เนื่องจาก $O_2^{\cdot-}$ ที่เกิดจาก TEMED และ riboflavin ถูกกำจัดแล้ว เปรียบเทียบแถบ SOD ที่ได้กับแถบโปรตีนที่ย้อมด้วย 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in water : methanol : glacial acetic acid 5:5:2 บันทึกภาพด้วยการถ่ายรูป

3.3.6 *Colletotrichum capsici* : การเพาะเชื้อและการเก็บสปอร์

ใช้เข็มเขี่ยปลายงอแตะเชื้อราสายพันธุ์ SKP16, F8-5B, CC.1.6, CC. 1.9, CC.1.12 ลงบนตรงกลางผิวหน้าบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการ autoclave โดยใช้ความร้อน 121°C เป็นเวลา 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน

เมื่อต้องการเก็บสปอร์ทำได้โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ลงบนจานอาหารหรือหลอดทดลองที่มีเชื้อราเจริญอยู่จากนั้นใช้ลูปหรือเข็มเขี่ยปลายงอแตะเบา ๆ เพื่อให้สปอร์หลุดและให้เส้นใยหลุดมาน้อยที่สุด นับจำนวนสปอร์ด้วย Hemacytometter ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1×10^6 spore/ml

3.3.7 การเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อพริกให้เกิดโรค

3.3.7.1 การหยดเชื้อบนใบพริก

ทำความสะอาดผิวใบพริกโดยแช่ 10% cloroxเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีและวางใน moistened chamber ปลอดเชื้อ เตรียม suspension ของสปอร์ราให้มีความเข้มข้น 1×10^6 spore/ml แล้วหยดเชื้อราลงบนใบพริกปริมาตร 0.1 ml บ่มที่อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 1-7 วัน บันทึกผลการทดลองด้วยเครื่อง scanner เพื่อบันทึกเป็นไฟล์ภาพดิจิตอล (JPEG file) หาพื้นที่การเกิดรอยช้ำ (lesion) โดยใช้ Adobe Photoshop (version 3.2) ตามวิธีของ Jame and Newcobe (2000) โดยเทียบกับพื้นที่มาตรฐาน 4x4 cm^2

3.3.7.2 การสเปรย์บนใบพริก

ทำความสะอาดผิวใบพริกโดยแช่ 10% cloroxเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีและวางใน moistened chamber ปลอดเชื้อ เตรียม suspension ของสปอร์ราให้มีความเข้มข้น 1×10^6 spore/ml แล้วสเปรย์เชื้อราลงบนใบพริก 1 ครั้งมีปริมาตร 0.12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการก่อโรคของใบพริกด้วยการถ่ายภาพแสดงบริเวณเกิดโรค

3.3.7.3 สเปรย์ต้นอ่อนพริก

สเปรย์ suspension ของสปอร์ที่มีความเข้มข้น 1×10^7 spore/ml ปริมาตร 0.12 ml บนใบต้นอ่อนพริกที่วางเรียงในกล่องพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิ $30^{\circ}C$ เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการก่อโรคของต้นพริกอ่อนด้วยการถ่ายภาพแสดงบริเวณเกิดโรค