บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้

3.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือหลักที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1.1 เครื่อง MALDI-TOF MS (Reflex IV , BRUKER)

3.1.1.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent Model 110 Series)

3.1.1.3 เครื่อง Gas Chromatography (Agilent Model 110 Series)

3.1.1.4 เครื่อง Mass Spectrometry (Agilent Model 5973)

3.1.1.5 เครื่อง sieving machine รุ่น AS 200 (Retsch, Germany)

3.1.1.6 เครื่อง rotary beater mill (Retsch GmbH, Germany)

3.1.1.7 ชุดเครื่องมือ Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, (SDS-PAGE Amersham ECL Gel Box) และเครื่อง power supply สำหรับให้กระแสไฟฟ้า (Bucher instruments)

3.1.1.8 อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (ภาคผนวก ก)

3.1.2 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง

3.1.2.1 Amersham ECL Gel 10% (GE HealthCare, USA)

3.1.2.2 Albumin bovine serum (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2.3 Molecular weight standard marker (GE HealthCare, USA)

3.1.2.4. โปรตีนมาตรฐาน(Vivantis, Malaysia)

3.1.2.5 Coomassie Brilliant BlueR350

3.1.2.6 Coomassie Brilliant BlueR250

3.1.2.7 สารเคมีพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ (ภาคผนวก ก)

3.2 การวิเคราะห์โปรตีนชนิดต่างๆ

ทำการสกัดโปรตีนจากข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวหอมอุบล ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวเล้าแตก และข้าวหอมกัญญา โดยข้าวทั้งหมดได้จากเกษตรกรที่ปลูกข้าวในจังหวัดอุบลราชธานี โดยทำการศึกษาโปรตีนในข้าวเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในน้ำ

2 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลาย 0.1 M NaCl

3 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลาย 0.1 M HCl

4 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลาย 0.1 M NaOH

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างข้าว

นำข้าวทั้งทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวหอมอุบล ข้าวสินเหล็ก ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวเล้าแตก และข้าวหอมกัญญา มาบดให้ละเอียด จากนั้นนำมาแยกโดยใช้เครื่อง sieving machine โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 80 mesh เก็บตัวอย่างข้าวที่ได้ในถุงสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในน้ำในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์

ทำการศึกษาโปรตีนที่ละลายในน้ำจากข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยนำตัวอย่างข้าวที่บดละเอียดมา 100 กรัม ทำการสกัดโปรตีนโดยใช้น้ำกลั่น ในปริมาณ 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 ต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเพื่อแยกตะกอนข้าวออกไป จะได้ สารละลายที่มีโปรตีนในข้าวเหลืออยู่ นำไปอบให้แห้งและเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป

3.2.3 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลาย 0.1 M NaCl ในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2 แต่เปลี่ยนสารสกัดเป็น สารละลาย 0.1 M NaCl

3.2.4 ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในตัวทำละลาย 0.1 M HCl

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2 แต่เปลี่ยนสารสกัดเป็น 0.1 M HCl

3.2.5. ศึกษาโปรตีนชนิดละลายในสารละลายกรดหรือสารละลาย 0.1 M NaOH

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.2 แต่เปลี่ยนสารสกัดเป็นสารละลาย 0.1 M NaOH

วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์โดยวิธี Biuret โดยใช้ albumin bovine serum เป็นโปรตีนมาตรฐาน และนำโปรตีนชนิดต่างๆที่แยกได้แต่ละส่วนของตัวทำละลายมาตรวจสอบและหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี SDS- PAGE และนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนในขั้นตอนต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret

3.3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 250, 400, 500, 700 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม Biuret reagent หลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาคผนวก ข)

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างของสารละลายที่ต้องการทดสอบมาบรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณโปรตีน

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี AOAC, 2005 981.10

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ได้ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง กรุงเทพมหานคร โดยห้องปฏิบัติการกลาง จะวิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC, 2005 method 981.10

3.5 วิธีการทำ SDS-PAGE โดยใช้ Amersham ECL Gel Box และ Amersham ECL Gel 10%

3.5.1 การเตรียม SDS-PAGE

3.5.1.1 เตรียม Running บัฟเฟอร์ 1X โดยทำการ dilute 10X Amersham ECL Gel Running บัฟเฟอร์ โดยใช้น้ำปริมาตร 171 มิลลิลิตรผสมกับ 10X Amersham ECL Gel Running บัฟเฟอร์ ปริมาตร 190 มิลลิลิตร ต่อการทำอิเล็กโตรฟอริซิส 1 ครั้ง

3.5.1.2 เติมRunning Buffer 1X ปริมาตร 90 มิลลิลิตรลงในแต่ละ Tank ของ Amersham ECL Gel Box

3.5.1.3 ตัดซอง Amersham ECLเจล นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น

3.5.1.4 นำ Amersham ECL เจลใส่ใน Amersham ECL Gel Box ด้านที่เจลมีช่องใส่สารตัวอย่างหันไปในทิศทางขั้ว Cathode

3.5.1.5 ใส่ Safety lid ด้านบน Amersham ECL Box

3.5.1.6 เชื่อมต่อ Amersham ECL Box กับ Power supply กระแสตรงทำการ pre-run เจลนาน 12 นาที โดยใช้กระแสไฟฟ้า 160 V

3.5.1.7 เมื่อ pre-run เสร็จเรียบร้อยแล้วปิดสวิทซ์ Power Supply ดึง Safety lid ออก

3.5.1.8 ใช้ comb ในการทำให้เกิดช่องใส่สารตัวอย่าง (well)

3.5.1.9 เติม บัฟเฟอร์ 1X ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงใน well container

3.5.2 การใส่สารตัวอย่าง

3.5.2.1 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 175 -10.5 kDa และนำสารละลายตัวอย่าง โดยการเติม 2X sample บัฟเฟอร์ลงในสารตัวอย่างสัดส่วน 1:1

3.5.2.2 incubate sampleที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที

3.5.2.3 นำสารละลายตัวอย่างไปปั่นด้วยเครื่อง Microcentrifuge และใส่สารละลายตัวอย่างอย่างรวดเร็วในช่องใส่สารตัวอย่าง (well) ของเจล โดย Well แรกจะใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนหลายชนิด (11 ชนิด) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 175 -10.5 kDa ส่วน Well ที่ 2-10 จะใส่สารละลายตัวอย่าง

3.5.2.4 ปิด Safety lid ด้านบนเครื่อง Amersham ECL Gel Box

3.5.3 Running Conditions

ใช้กระแสไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลท์ นาน 60 นาที

3.5.4 การนำเจลออกจาก Amersham ECL Box

3.5.4.1 ปิดสวิซส์เครื่อง Power supply

3.5.4.2 นำเจลออกจาก Amersham ECL Box เพื่อทำการ Fixing นาน 30 นาที ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 หรือ สี Coomassie Brilliant Blue R 350 นาน 10 นาทีและล้างสีออกจากเจลต่อไป

3.5.4.3 เก็บเจลที่ล้างสีย้อมโปรตีนออกแล้วในสารละลาย Preservative ต่อไปเพื่อเก็บเจลได้นานไม่เสียสภาพและถ่ายภาพบันทึกผลการทดลอง ตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

3.6 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid profile)

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนจากข้าว โดยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) ได้ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง กรุงเทพมหานคร โดยห้องปฏิบัติการกลาง อ้างอิงวิธีตาม J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72(6). 1989 โดยมีรายละเอียดในการวิเคราะห์ดังนี้

HPLC : Agilent Model 1100 Series

Column : Pico tag Hydrolysate amino acid Column, 3.9x150mm

Injection volume : 20 µl

Detector : Diode Array (254 nm)

Column Oven : 40 $^{\circ}$C

Flow rate : 1 ml/min

ส่วนการวิเคราะห์ Tryptoplan จะใช้เครื่อง GC/MS ในการวิเคราะห์ โดยรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้

GC/MS condition

GC :Agilent Model 6890N

Column : Zebron Amino Acid, 10x0.25 mm

Injection : Spit 1:15@250 °C, 2 µl

Carrier Gas : Helium 1.1 ml/min constant flow

Oven program : 30 °C/min from 110 °C to 320 °C

MS : Agilent Model 5973

Source : 230 °C

Quad : 150 °C

Auxiliary : 320 °C

Scan range : 35-500 m/z

Sampling rate : 2^2 (3.15 scan/s)

3.7 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ Gamma aminobutyric acid (GABA)

การวิเคราะห์ปริมาณ Gamma aminobutyric acid ได้ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการกลาง กรุงเทพมหานคร โดยห้องปฏิบัติการกลาง วิเคราะห์ตามวิธีของ Mustafa, และคณะ, 2007

3.8 การตรวจวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดย เครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometry

สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีนโดยใช้เครื่อง MALDI-TOF MS นั้น โดยดำเนินการส่งวิเคราะห์ที่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทางคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ใช้เครื่อง MALDI-TOF MS (reflex IV , BRUKER) ในการตรวจวิเคราะห์

จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ไปสืบค้นเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีจะทำให้ทราบโปรตีนชนิดใหม่ที่มีอยู่ในข้าว

3.9 วิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์