

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาระบบของไอโซไซม์ที่เหมาะสม

พันธุ์พริกที่ใช้ในการศึกษาเป็น *Capsicum annuum* สายพันธุ์แท้ประกอบด้วยพันธุ์ห้วยสีทน และพริกขอมข. ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์จาก ผศ. ดร. สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร และพริกพันธุ์พื้นเมืองจังหวัดเลยพันธุ์ปากป่วน (*C. frutescens*) นำพริกทั้ง 3 สายพันธุ์มาปลูกในกระถาง และทำโรงเรือนตาข่ายป้องกันแมลงเข้าทำลาย กล้าพริกที่นำมาทำอิลেকโตรโฟเรซิส จะแบ่งเป็น 4 ระยะการเจริญเติบโต คือ เมื่ออายุ 25 35 45 และ 55 วัน โดยจะเปรียบเทียบความคมชัดของแถบไอโซไซม์ในกล้าพริกพันธุ์ห้วยสีทนที่อายุ 90 วัน ในการสกัดเอนไซม์จะใช้ส่วนของใบพริกจำนวน 0.5 กรัม บดกับสารสกัดเอนไซม์ 2 ชนิด ชนิดที่ 1 (ดัดแปลงจาก Shigyo, เอกสารไม่ได้ตีพิมพ์) ประกอบด้วย ทริส-ไฮดรอกซีเมทิล อะมิโนมีเทน (tris-hydroxymethyl aminomethane) 0.3 M. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) 0.1 M. แอสคอร์บิก แอซิด (Ascorbic acid) 0.2 M และไตรตันเอ็กซ์-100 (Triton X-100) 2 % ชนิดที่ 2 (Suur et al., 1989) ประกอบด้วย tris-hydroxymethyl aminomethane 0.05 M กลีเซอรอล (glycerol) 20 % และ เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (β -mercapto ethanol) 1 % อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับสารสกัดเอนไซม์ 1 : 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) (Suur et al., 1989) ในการบดตัวอย่างพืชจะบดในโกรงที่แช่น้ำแข็งอยู่ตลอดเวลา นำน้ำคั้นพืชที่ได้ใส่หลอดไมโครทิวบ์ (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4°C. แยกเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant extract) มาทำอิลেকโตรโฟเรซิส ใช้ความเข้มข้นของตัวกลางที่เป็นโพลีอะคริลาไมด์ 2 ความเข้มข้น คือ 7.5 และ 10 % โดยขั้นตอนการทำอิลেকโตรโฟเรซิสสรุปไว้ในภาพที่ 2

การทำอิลেকโตรโฟเรซิส

ระบบของอิลেকโตรโฟเรซิสที่ใช้เป็นแบบ discontinuity คือเจลจะประกอบด้วยส่วนของเจลที่มีความเข้มข้นต่ำซึ่งเรียกว่า สแตคกิ้งเจล (stacking gel) ในการทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้น 5 % และส่วนที่มีความเข้มข้นของเจลสูงซึ่งเรียกว่าแซพพาเรตเจล (separate gel) ในการทดลองนี้จะใช้ความเข้มข้นที่ 7.5 และ 10 % โดยขั้นตอนการเตรียมเจลจะปฏิบัติตามวิธีของ Suur และคณะ

(1989) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้เป็นแบบตั้ง (Vertical electrophoresis) รุ่น ATTA AE-6200 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) รุ่น ATTA AE-3131 ขนาดของแผ่นเจล 16 x 16 ซม. ใช้ 0.025 M ทริส-ไกลซีน (Tris-glycine) pH 8.6 เป็นสะพานไฟ (electrode buffer) ใช้ โบรโม-ฟีนอลบลูเป็นมาร์คเกอร์ ก่อนการใส่ตัวอย่างลงในเจลจะต้องตรวจหาปริมาณที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ให้แถบคมชัดที่สุดเสียก่อน จากการทดลองครั้งนี้พบว่า ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้แถบที่คมชัดที่สุดในระบบที่ต้องการศึกษา ในการปฏิบัติแต่ละครั้งใช้กระแส 15 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 250 โวลต์ ภายใต้อุณหภูมิ 4^o ซ นาน 150 นาที

ขั้นตอนการเตรียมเจล

Stock solution	% Separate gel			% Stacking gel
	5 %	7.5 %	10 %	
1. Acrylamide (ml)	7.5	11.4	15	4
2. Gel buffer (ml)	15	15	15	-
3. Electrode buffer (ml)	-	-	-	2.5
4. Distilled water (ml)	31.5	27.6	24	24.5
5. TEMED (ul)	-	-	-	36
6. 0.2 % Ammoniumpersulphate(ml)	6	6	6	6

หมายเหตุ

1. Acrylamide = 40 % Acrylamide + 1.6 % N-N-methylene bis-acrylamide
2. Gel buffer = 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9) + 0.24 % TEMED
3. electrode buffer = 0.025 M Tris-Glycine (pH 8.6)

ขั้นตอนการทำ

1. ประกอบกระจก (sandwich glass) ให้รอยต่อปิดสนิทไม่มีรอยรั่วโดยใช้แผ่นยางซิลิโคนที่เป็นชุดมากับกระจกหรืออาจใช้กิลีเซอร์ลินฉีกม้วนรอยต่อไว้เพื่อป้องกันการรั่วของเจล
2. เตรียมสารละลาย ของ separate gel และ stacking gel ตามสูตร (ดูค้ำขอกจากสารละลายทั้ง 2 ชนิด ก่อนเทลงในช่องว่างของกระจก)

3. เทส่วนที่เป็น separate gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกให้ห่างจากขอบบนประมาณ 1.5 นิ้ว ค่อยๆเติมน้ำลงบนส่วนบนของเจลประมาณ 0.5 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 1.5 ชม. (ขณะเติมน้ำต้องทำด้วยความระมัดระวัง)

4. เมื่อเจลแข็งตัว (เกิดการ polymerization)ให้เอียงกระจกเทน้ำออกแล้วจึงเติมสารละลายส่วนที่เป็น stacking gel สูงประมาณ 1.5 นิ้ว เสียบหวี (wel comb) ระหว่างกระจก ค่อยๆเอียงใส่น้ำให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ 1 ชม. หรือรอจนเจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์จึงถอดหวีออก

การย้อมเอนไซม์

ในการทดลองนี้ศึกษาเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด คือ เพอร์ออกซิเดส (peroxidase, Prx) กลูตาเมตออกซาโลอะซิเตต ทรานสอะมิเนส (glutamate oxaloacetate transaminase, GOT) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase, Pgm) กลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (glucosphate isomerase, Pgi) และลิวซีนอะมิโนเปปติเดส (leucine aminopeptidase, LAP) โดยการย้อมเอนไซม์ 4 ระบบแรกคือ Prx GOT Pgm และ Pgi ย้อมตามวิธีการของ Tanksley และ Orton (1983) ส่วนการย้อมเอนไซม์ LAP จะย้อมตามวิธีการของ Pasteur (1988) เมื่อการย้อมเอนไซม์สมบูรณ์แล้วจะหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ เมธิลอลกอฮอล์ : กรดอะซิติกเข้มข้น : น้ำ ในอัตราส่วน 4:1:15 โดยปริมาตร (Suur et al., 1989) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

เพอร์ออกซิเดส (Prx)

สารละลาย A = Sodiumacetate trihydrate 50 mM pH 4.5	100	มล.
สารละลาย B = N,N dimethyl formamide (DME)	3	มล.
5-amino 2-naphthol (5A2N)	50	มล.
สารละลาย C = H ₂ O ₂ 3.5 %	0.75	มล.

วิธีการย้อม

ละลาย 5A2N ใน DME แล้วจึงเทใส่ในสารละลาย A ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นเติมสารละลาย C ก่อนการย้อมเล็กน้อย บ่มเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที

จะ ปรากฏแถบขึ้น จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารหยุดปฏิกิริยาประมาณ 5 นาที เทสารหยุดปฏิกิริยาทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง บันทึกข้อมูล

กลูตาเมตออกซาโลอะซิเตต ทรานสอะมิเนส (GOT)

GOT buffer pH 7.4	100	มล.
(K ₂ HPO ₄ 0.1 M. ปรับ pH ด้วย 0.1 M KH ₂ PO ₄) 01.มล.		
α- ketoglutarate	0.1	ก.
L - aspartic acid	0.1	ก.
Fast - Blue-BB salt	0.15	ก.

วิธีการย้อม

เทสารต่าง ๆ ลงใน GOT buffer ก่อนการย้อมเล็กน้อย บ่มเจลในที่มืด อุณหภูมิห้องนาน 15-60 นาที แถบจะปรากฏขึ้น หยุดปฏิกิริยาด้วยสารหยุดปฏิกิริยานาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง บันทึกข้อมูล

ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Pgm)

Tris-HCl 0.1 M pH 7.5	100	มล.
MgCl ₂ 6 H ₂ O 1 M	1	มล.
Glucose-1-P	150	มก.
NADP ⁺	15	มก.
MTT	20	มก.
PMS	4	มก.
Glucose-6-P DH	40	ยูนิต

วิธีการย้อม

ผสมสารเคมีทั้งหมดยกเว้น Glucose-6-P DH. ใน Tris-HCl ก่อนการย้อมจึงเติม Glucose-6-P DH บ่มเจลในที่มืด นาน 15-60 นาที หรือจนกว่าแถบของไอโซไซม์จะปรากฏ หยุด

ปฏิกิริยา บันทึกลงผล

กลูโคสฟอสเฟต ไโซเมอเรส (Pgi)

Tris-HCl 0.1 M pH 7.5	100	มล.
MgCl ₂ 6 H ₂ O 1 M	1	มล.
Fructose-6-P (Na ₂)	80	มก.
NADP ⁺	20	มก.
PMS	4	ก.
Glucose-6-P DH	20	ยูนิต

วิธีการย้อม

ขั้นตอนการย้อมเหมือนการย้อมฟอสโฟกลูโคมิวเตส

ลิวซีน อะมิโนเปปติเดส (LAP)

Tris-malate 0.2 M pH 5.5	100	มล.
L - leucyl-B-Naphthylamide	100	มก.
MgCl ₂ 0.5 M.	5	มก.
Black-K-salt	30	มก.

วิธีการย้อม

ก่อนการย้อมเติม Black-K-salt บ่มเจลในที่มืด ประมาณ 1-4 ชม.หรือจนกว่าแถบจะปรากฏ ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วจึงหยุดปฏิกิริยา ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง บันทึกลงผล

2. เลือกระบบที่รวดเร็วและประหยัด

การเลือกระบบที่รวดเร็วคือระบบที่สามารถทำได้ในกล้าที่มีอายุน้อย ส่วนการเลือกระบบที่ประหยัดค่าใช้จ่ายจะเลือกโดยการประเมินจากราคาสารเคมีที่ใช้ทั้งระบบ และนำระบบที่ได้รับเลือกมาใช้จำแนกความแตกต่างของพริก 2 ชนิด ระหว่าง *Capsicum annum.L* ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์ ห้วยสีทันและพริกขี้หนู มข. และ *C. frutescens. L* คือพริกพันธุ์ปากป่วน

การบันทึกข้อมูล

1. การแปลผลความคมชัดของแถบที่ปรากฏบนเจลที่มีความเข้มต่างกัน

D = สามารถแปลผลทางไอโซไซม์ได้ (detectable)

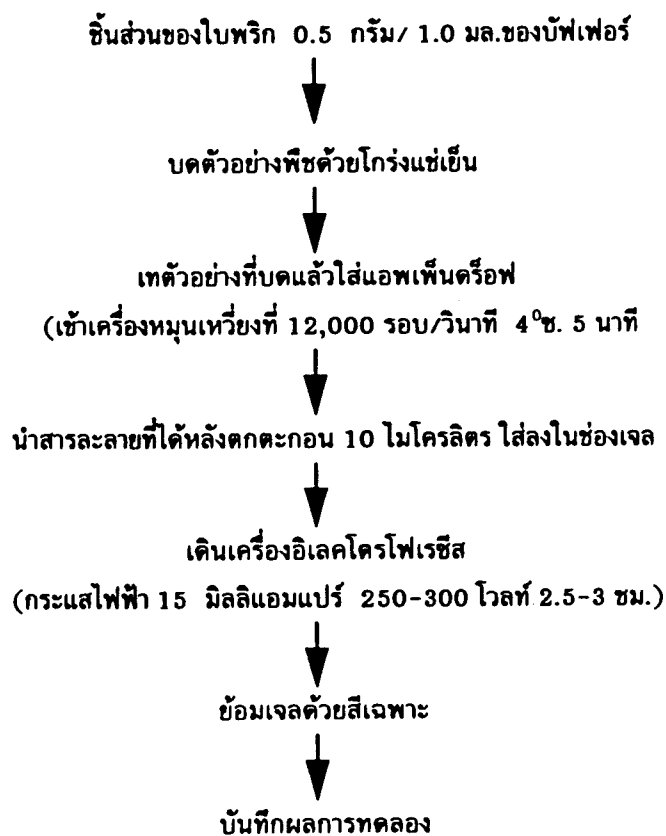
ND= ไม่สามารถแปลผลทางไอโซไซม์ได้ (non-detectable)

2. ชนิดของสารสกัด วัดความคมชัดเจนโดย

D = สามารถแปลผลทางไอโซไซม์ได้ (detectable)

ND= ไม่สามารถแปลผลทางไอโซไซม์ได้ (non-detectable)

3. วัดการเคลื่อนที่ของแถบ วัดไซโมแกรมเพื่อเปรียบเทียบพันธุ์



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของไอโซไซม์ในพริก

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์ศึกษาค้นคว้าและพัฒนาเกษตรกรรมภาคตะวันออกเฉียงเหนือและห้องปฏิบัติการเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2535 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2536 รวมระยะเวลาที่ศึกษา 9 เดือน