# อุปกรณ์และวิธีการ

**การทดลองที่ 1 ศึกษาอาการสะท้านหนาวในพริก 3 ชนิด**

ซื้อผลพริก 3 ชนิดจากแปลงเกษตรกร โดยพริกหยวกจากจังหวัดราชบุรี พริกชี้ฟ้า พันธุ์บางช้าง จากจังหวัดนครปฐม พริกขี้หนู พันธุ์ Super Hot จากจังหวัดราชบุรีและนครปฐม ในระยะเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมจากเกษตรกร คัดเลือกผลปราศจากโรคและแมลงเข้าทำลาย มีความสม่ำเสมอในเรื่องขนาด รูปทรง น้ำหนัก สีผิวและความสด ล้างทำความสะอาดและจุ่มผลในสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 200 µl/l เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว นำมาผึ่งให้แห้ง เก็บรักษาในภาชนะบรรจุ 2 ชนิด คือ ตะกร้า และถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติก PVC แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 3 ระดับคือ อุณหภูมิ 5 10 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85-90 % และอุณหภูมิห้อง

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 3 ซ้ำ โดยผลพริกชี้ฟ้าซ้ำละ 10 ผล พริกหยวก ซ้ำละ 7 ผล พริกขี้หนู ซ้ำละ 20 ผล การบันทึกผลการทดลองจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยบันทึกทันทีหลังจากนำออกมาจากห้องเก็บรักษา และหลังจากย้ายมาไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้ว 2 วัน ซึ่งบันทึกข้อมูลในวันที่ 4 8 12 และ 16 ของการเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงสีของเมล็ด วัดการเปลี่ยนสีของเมล็ดในระบบ Hunter's scale โดยใช้เครื่องวัดสี Minolta CR 300 รายงานผลเป็นค่า L a และ b

ค่า L หมายถึงความสว่าง โดย L = 0 หมายถึง สีดำ และ L = 100 หมายถึงสีขาว
ค่า a ค่าเป็น บวก หมายถึง สีแดง ค่าเป็นลบ หมายถึงสีเขียว
ค่า b ค่าเป็นบวก หมายถึง สีเหลือง ค่าเป็นลบ หมายถึงสีน้ำเงิน

2. อาการสะท้านหนาวและดัชนีอาการสะท้านหนาว โดยให้คะแนนแล้วคำนวณดัชนีการเกิดอาการสะท้านหนาว

2.1 อาการสีน้ำตาลที่เมล็ด โดยให้คะแนน 0-5
2.2 อาการฉ่ำน้ำที่ผิวผล โดยให้คะแนน 0-5

2.3 อาการปุ่มที่ผิวผล โดยให้คะแนน 0-5

0 = ผลไม่มีเมล็ดสีน้ำตาล/ฉ่ำน้ำ/ผิวปุ่ม

1 = ผลเกิดเมล็ดสีน้ำตาล/ฉ่ำน้ำ/ผิวปุ่ม 10 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

2 = ผลเกิดเมล็ดสีน้ำตาล/ฉ่ำน้ำ/ผิวปุ่ม 11-20 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

3 = ผลเกิดเมล็ดสีน้ำตาล/ฉ่ำน้ำ/ผิวปุ่ม 21-30 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

4 = ผลเกิดเมล็ดสีน้ำตาล/ฉ่ำน้ำ/ผิวปุ่ม 31-40 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

5 = ผลเกิดเมล็ดสีน้ำตาล/ฉ่ำน้ำ/ผิวปุ่มมากกว่า 40 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

คะแนนการเกิดสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำที่ผิวผลและอาการปุ่ม จะมาคำนวณแยกกันเป็นดัชนีการเกิดอาการสะท้านหนาว ดังสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดอาการสะท้านหนาว} = \frac{\text{ระดับคะแนน x จำนวนผลที่เกิดอาการที่ระดับคะแนนนั้น}}{\text{จำนวนผลทั้งหมดใน treatment}}$$

3. การรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage) ดัดแปลงวิธีการของศิริลักษณ์ (2538) และ Hakim *et al*. (1999)โดยใช้เมล็ด 1 กรัม และส่วนของไส้กลาง (placenta) ที่ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก น้ำหนักรวม 1 กรัม ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มีประจุ (deionize) 3 ครั้ง แล้วใส่ฟลาสค์ ที่มีสารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ มาวัดหาค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง conductance meter (Consort model C381, Turnhout, Belgium) แล้วทำลายเนื้อเยื่อโดยนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายอีกครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของประจุโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรั่วประจุ} = \frac{\text{ค่าการนำไฟฟ้าก่อนเข้า autoclave x 100}}{\text{ค่าการนำไฟฟ้าหลังเข้า autoclave}}$$

**การทดลองที่ 2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวัยกับอาการสะท้านหนาวในพริกขี้หนู**

2.1 ระยะการพัฒนาผลกับอาการสะท้านหนาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำๆละ 20 ผล โดยนำผลพริกขี้หนูใน 3 ระยะการพัฒนาของผล คือ ระยะผลสีเขียว (immature) ระยะผลเริ่มเปลี่ยนสี (breaker stage) และระยะผลสีแดง (mature) มาล้างทำความสะอาด บรรจุในตระกร้า แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส บันทึกข้อมูลเมื่อเริ่มต้นการทดลองและในวันที่ 4 8 12 และ 16 หลังจากเก็บรักษา โดยบันทึกข้อมูลทันทีหลังนำออกจากห้องเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

1. ดัชนีอาการสะท้านหนาว (CI index)
2. การรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage)

2.2 อายุของผลพริกกับอาการสะท้านหนาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ผล นำพริกขี้หนู อายุ 15 20 25 และ 30 วันหลังดอกบานมาล้างทำความสะอาด บรรจุในตะกร้า แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส บันทึกข้อมูลเมื่อเริ่มต้นการทดลองและในวันที่ 4 8 12 และ 16 หลังจากเก็บรักษา โดยบันทึกข้อมูลทันทีหลังนำออกจากห้องเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

1. ดัชนีอาการสะท้านหนาว (CI index)
2. การรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage)

**การทดลองที่ 3 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในเมล็ดของผลพริกที่เกิดอาการสะท้านหนาว**

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำ นำผลพริกขี้หนู อายุ 15 และ 25 วันหลังดอกบานมาล้างทำความสะอาด บรรจุในตะกร้า แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นำผลออกจากห้องเก็บรักษาในวันที่ 2 4 6 8 10 และ 12 วันของเก็บรักษา และแยกเมล็ดออกจากผล นำมาแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาสกัดและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนี้

3.1 ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด (ดัดแปลงจากวิธีของ Toivonen and Stan, 2004)

นำเมล็ดพริกน้ำหนักสด 1 กรัม ผสมกับ methanol ความเข้มข้น 70 % ปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ 100 รอบต่อนาทีนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียด (homogenize) ด้วยเครื่องปั่นละเอียด (polytron homogenizer) แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที นำส่วนใสปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาณ 7 มิลลิลิตร แล้วเติม Folin Ciocalteau reagent ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมด้วยเครื่องผสม (vortex) หลังจากนั้นทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงเติม $NaCO_3$ ความเข้มข้น 20% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ทำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Thermo Spectronic, model Genesys 10, Rochester, NY, USA) ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐานของ chlorogenic acid

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ PAL (ดัดแปลงวิธีของ Faragher and Chalmers, 1977 และ สุจิตรา, 2541)

นำเมล็ดพริกน้ำหนักสด 1 กรัม ผสมกับ 10 มิลลิลิตรของโซเดียมบอเรทบัพเฟอร์ (sodium borate buffer ; pH 8.8) ความเข้มข้น 0.1 mM แล้วบดให้ละเอียด (homogenize) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงที่ 20,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยเติม phenylalanine ความเข้มข้น 60 mM ปริมาณ 700 ไมโครลิตร และ sodium borate buffer ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมกับ ส่วนใสปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (vortex) และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม perchloric acid ความเข้มข้น 2N ปริมาณ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 g นาน 15 นาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เทียบกับสาร *trans*-cinnamic acid มาตรฐานที่วัดได้ แล้วนำมาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เป็น nmol *trans*-cinnamic acid ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ PPO POD และ CAT

นำเมล็ดพริกปริมาณ 1 กรัม มาบดละเอียดในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 ปริมาณ 10 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 17,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PPO POD และ CAT

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ทำตามวิธีของ Benjamin and Montgomery (1973) โดยนำส่วนใสไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 M วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์เป็น blank กิจกรรมของเอนไซม์ PPO หนึ่งหน่วยเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วยต่อเวลา 1 นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ POD โดยใช้ guaiacol ตามวิธีของ Wang *et al.* (2005) ผสมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ (pH 7) ความเข้มข้น 0.1 M สารละลาย guaicol ความเข้มข้น 8 mM สารละลาย $H_2O_2$ ความเข้มข้น 24 mM และ ส่วนใส ให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร กิจกรรมของเอนไซม์ POD หนึ่งหน่วยเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วยต่อเวลา 1 นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ทำตามวิธีของ Pukacka and Ratajczak (2005) ผสมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ (pH 7) ความเข้มข้น 0.1 M สารละลาย $H_2O_2$ ความเข้มข้น 24 mM และ ส่วนใส ให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร กิจกรรมของเอนไซม์ CAT หนึ่งหน่วยเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ที่ลดลงต่อเวลา 1 นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.4 กิจกรรมของเอนไซม์ SOD (ดัดแปลงวิธี Ukeda *et al*. 1997)

นำเมล็ดพริก 1 กรัมมาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM pH 8.0 ปริมาณ 5มิลลิลิตร อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 17,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ SOD โดยผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM pH 8.0 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 3 mM สารละลาย xanthine ความเข้มข้น 3 mM และสารละลาย XTT ( 2,3-bis(2-methoxy-

4-nitro-5-sulfophenyl)-2-H tetrazolium-5- carboxanilide) ความเข้มข้น 0.75 mM ปริมาตรอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาเริ่มขึ้นเมื่อเติม สารละลาย xanthine oxidase ความเข้มข้น 140 mU/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เมื่อเติมสารละลายใสที่สกัดได้เอนไซม์ SOD ในสารละลายใสยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ XTT การวัดกิจกรรมของ SOD วัดการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรต่อเวลา 1 นาที ในสภาพที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ SOD แสดงผลเป็น ยูนิต (Unit) ต่อมิลลิกรัมโปรตีน หนึ่ง ยูนิตหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ยับยั้งอัตราการลดลงของ XTT ได้ 50 %

3.5 กิจกรรมของเอนไซม์ lipoxygenase (ตามวิธีของ Anase and Sovrano, 2006)

นำเมล็ดพริก 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 17,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ส่วนผสมของสับสเตรท เตรียมโดยนำสาร linoleic acid 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 4 มิลลิลิตร เติม NaOH ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ Tween 20 ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเขย่า แล้วเติมน้ำเจือจางให้ปริมาณสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ LOX หนึ่งหน่วยเท่ากับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ที่เปลี่ยนไป 0.001หน่วยต่อเวลา 1 นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3.6 ปริมาณ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (ตามวิธีของ Health and Packer, 1968)

นำเมล็ดพริก 0.5 กรัม ผสมกับ 5 มิลลิลิตรของสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.1 % นำไปบดละเอียด แล้วต่อมานำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 23,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใส ปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเติมด้วย 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.5% thiobarbituric acid (TBA) ที่ทำละลายใน 20% TCA แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากครบเวลาให้ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วทำให้สารละลายใสโดยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,500 g นาน 10 นาที นำสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ TBARS โดยใช้สูตร

TBARS equivalents ($nmol.ml^{-1}$) = $[(A_{532}-A_{600})/155000]10^6$

3.7 ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์โดยวิธีของ Bradford (1976) ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0 20 40 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.8 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน (ตามวิธีของ AOAC, 1995)

นำเมล็ดพริก 5 กรัม สกัดไขมันด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (2:1) 3 ครั้งๆ ละ 30 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด vortex เก็บเฉพาะสารละลายชั้นล่างรวมกัน แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำมาใส่ใน round bottle flask แล้วนำไประเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกเป็นปริมาณ total fat แล้วเติมสารละลาย KOH ที่ทำละลายในเมทานอล ความเข้มข้น 0.5 M ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และ internal standard (C23:0) ที่ทำละลายด้วย dichloromethane ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ใน water bath shaker แล้วนำ flask ออกมาไว้ข้างนอกจนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายโบรอนไตรฟลูโอไรด์ในเมทานอล ความเข้มข้น 14 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 2 มิลลิลิตร นำไป reflux ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใน water bath shaker แล้วนำ flask ออกมาไว้ข้างนอกจนอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง เติม saturated NaCl solution ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วดูดมาใส่หลอดทดลอง สกัดต่อด้วย petrolium ether 3 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิลิตร นำเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนรวมกันใส่ใน round bottle flask แล้วนำไป evaporate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทำละลายสารที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษ nylon 0.45 μm แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Varian model CD 3800, USA) ฉีดตัวอย่างที่ละลายแล้ว 1 μl ผ่านคอลัมน์ DB-23 ความหนาฟิล์ม 0.25 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม. โดยใช้ C23:0 เป็น standard ใช้สภาวะดังต่อไปนี้ ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ flame ionize detector ที่อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตู้อบเริ่มต้นที่ 175 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึง 230 องศาเซลเซียส

**การทดลองที่ 4 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของเมล็ดพริกขี้หนู**

นำผลพริกที่อายุ 15 และ 25 วัน มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 4 วัน นำมาแยกเมล็ด และศึกษารูปร่างของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) (Jeol model JSM-35CF, Tokyo, Japan)โดยนำเมล็ดที่ได้ มาแช่ในสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 % แล้วใช้มีดผ่าแยกเมล็ดออกเป็นสองส่วน แล้วล้างเมล็ดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 แล้วดึงน้ำออกจากเมล็ดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากนั้นแช่เมล็ดใน amyl acetate นาน 10 นาที ทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer แล้วจึงนำเมล็ดมาติดที่แท่นติดตัวอย่าง (stub) หลังจากนั้นนำมาฉาบผิวด้วยด้วยทองคำ 2 ครั้ง เพื่อดูโครงสร้างของเซลล์ในเมล็ดด้วยเครื่อง SEM

**การทดลองที่ 5 การลดความเสียหายจากอาการสะท้านหนาว**

5.1 ศึกษาผลของอากาศร้อน (hot air) ต่ออาการสะท้านหนาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยซื้อพริกขี้หนูวัยสีเขียว จากเกษตรกร มาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วให้อุณหภูมิสูงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ หลังจากได้รับอุณหภูมิสูงแล้วนำผลพริกบรรจุในถาดโฟมห่อด้วยพลาสติก PVC เก็บรักษาในห้องอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยมีทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ผลพริกไม่ได้รับอากาศร้อน (ชุดควบคุม)
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกได้รับอากาศร้อน 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
ทรีตเมนต์ที่ 3 ผลพริกได้รับอากาศร้อน 40 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที
ทรีตเมนต์ที่ 4 ผลพริกได้รับอากาศร้อน 40 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
ทรีตเมนต์ที่ 5 ผลพริกได้รับอากาศร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
ทรีตเมนต์ที่ 6 ผลพริกได้รับอากาศร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

5.2 ศึกษาผลของน้ำร้อน (hot water) ต่ออาการสะท้านหนาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยซื้อพริกขี้หนูวัยสีเขียว จากเกษตรกร มาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง นำมาแช่น้ำร้อน แล้วซับให้แห้ง นำผลพริกบรรจุในถาดโฟมห่อด้วย

พลาสติก PVC เก็บรักษาในห้องอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 85-90% โดยมีทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ผลพริกไม่ได้แช่น้ำอุ่น (ชุดควบคุม)
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกแช่น้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกแช่น้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกแช่น้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกแช่น้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

5.3 ศึกษาผลของ 1-MCP ต่ออาการสะท้านหนาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยซื้อพริกขี้หนูวัยสีเขียว จากเกษตรกร มาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วรมด้วย 1-MCP ความเข้มข้น 5 และ 10 µl/l นาน 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปบรรจุในถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติก PVC จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยมีทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ผลพริกไม่ได้รับ 1MCP (ชุดควบคุม)
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกได้รับ 1-MCP ความเข้มข้น 5 µl/l
ทรีตเมนต์ที่ 3 ผลพริกได้รับ 1- MCP ความเข้มข้น 10 µl/l

5.4 ศึกษาผลของ methyl jasmonate (MJ) ต่ออาการสะท้านหนาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยซื้อพริกขี้หนูวัยสีเขียว จากเกษตรกร มาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วรมด้วย MJ ความเข้มข้น $10^{-4}$ และ $10^{-5}$ M นาน 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุในภาชนะ 2 ชนิด คือ ตระกร้าและถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติก PVC นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยมีทรีตเมนต์ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ผลพริกไม่ได้รับ MJ (ชุดควบคุม)
ทรีตเมนต์ที่ 2 ผลพริกได้รับ MJ ความเข้มข้น $10^{-4}$ M บรรจุในตะกร้า
ทรีตเมนต์ที่ 3 ผลพริกได้รับ MJ ความเข้มข้น $10^{-4}$ M บรรจุในถาดโฟม
ทรีตเมนต์ที่ 4 ผลพริกได้รับ MJ ความเข้มข้น $10^{-5}$ M บรรจุในตะกร้า

ทรีตเมนต์ที่ 5 ผลพริกได้รับ MJ ความเข้มข้น $10^{-5}$ M บรรจุในถาดโฟม

การทดลองที่ 5.1-5.4 บันทึกดัชนีอาการสะท้านหนาวและการรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage) เมื่อเริ่มต้นการทดลองและในวันที่ 4 8 12 และ 16 หลังจากเก็บรักษา โดยบันทึกข้อมูลทันทีหลังนำออกจากห้องเก็บรักษา

5.4.1 ผลของ methyl jasmonate ต่ออาการสะท้านหนาวในผลพริกอายุ 15 วัน

นำผลพริกอายุ 15 วันมารมด้วย methyl jasmonate ความเข้มข้น $10^{-4}$ และ $10^{-5}$ M นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุในตระกร้า นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

บันทึกดัชนีอาการสะท้านหนาวและการรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage) โดยบันทึกข้อมูลเมื่อเริ่มต้นการทดลองและในวันที่ 1 2 3 และ 4 หลังจากเก็บรักษา โดยบันทึกข้อมูลทันทีหลังนำออกจากห้องเก็บรักษา

**การทดลองที่ 6 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ LOX และ CAT และ โปรตีน aquaporin ในเมล็ดพริก**

นำผลพริกที่อายุ 15 และ 25 วัน มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน แล้วแยกเมล็ดออกจากผลหลังจากเก็บรักษานาน 2 4 6 และ 8 วัน นำเมล็ดแช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะสกัด RNA

6.1 การสกัด RNA (ดัดแปลงจากวิธีของ Verwoerd *et al*., 1989)

6.1.1 บดเมล็ดพริก 1 กรัมให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ด้วยโกร่ง ย้ายตัวอย่างใส่ micro tube ที่มีบัพเฟอร์ 750 ไมโครลิตร (บัพเฟอร์ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl 100 mM $LiCl_2$ 1% SDS 10 mM EDTA 2% sodium sulphite ) และ phenol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 10 นาที นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24 :1) ปริมาตรต่อปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำสารละลายใส ส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส เขย่าให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม $LiCl_2$ ความเข้มข้น 8M ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรส่วนใสที่เก็บได้ ปิดฝาให้สนิท แล้วพลิกหลอดคว่ำไป มา 1-2 ครั้ง นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน RNA แล้วจึงนำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน แล้วละลายตะกอนด้วย DEPC treated water แล้วเติมแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใส และเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของส่วนใส ผสมสารให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน แล้วล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู แล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วย vacuum ละลายตะกอนด้วย DEPC treated water ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ RNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบลักษณะ RNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ความเข้มข้น 0.8% ใน 0.5X TBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที เก็บรักษา RNA ที่ตรวจสอบคุณภาพแล้วไว้ในตู้แช่แข็ง-70 องศาเซลเซียส จนกว่าใช้งาน

6.2 การออกแบบ degenerate primer ของยีน *Lox*

สืบค้นข้อมูล amino acid และ ลำดับเบสของยีน *Lox* ของพืชชนิดต่างๆในตระกูล Solanaceae จากฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) นำข้อมูลมา alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL-W (http:www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html) วิเคราะห์หาส่วน amino acid sequences และลำดับเบสที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ประกอบกับข้อมูลที่ได้จาก Mizuno *et al.* (2003) แสดงตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์ 5 ตำแหน่งในยีน LOX และ Santino *et al.* (2003) แสดงลำดับเบสของยีน LOX ข้อมูลทั้งนำมาใช้ในการออกแบบ primer 2 ชุดโดย primer ชุดที่ 1 For 5′ GAY AGD RTT TAT GAC TAT G 3′ primer Rev 5′ATW GAS ACA CTG TTD GGD ATT CC 3′ ชุดที่ 2 For

5′ATG GAG AAC CGA TGA GGA GTT CG 3′ Rev 5′GCT TCT GCT CTA CAT GCA GCG G3′

6.3 การเพิ่มปริมาณของยีน *Lox* ด้วย degenerate primer โดยวิธี RT-PCR

สังเคราะห์ cDNA เส้นแรกด้วยชุดสำเร็จรูป Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Germany) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากข้อ 6.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เป็นแม่แบบและใช้ไพรเมอร์ Oligo dT18 ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ 1X buffer RT dNTP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ Omiscript RT 4 ยูนิต ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หยุดปฏิกริยาโดยใช้ความร้อน 93 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นสังเคราะห์เพิ่มปริมาณยีน LOX โดยใช้ cDNA เส้นแรกที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่แบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์คู่แรกที่ออกแบบไว้ ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ Taq DNA polymerase 0.625 ยูนิต (Qiagen, Germeny) เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 25 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่อง PCR PCR program เริ่มต้นด้วย แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย แยกสาย DNA แม่แบบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA ต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย สังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที จากนั้นทำ nest PCR โดยใช้ PCR product ที่ได้เป็นแม่แบบ ใช้ PCR program เหมือนเดิม แต่ใช้ primer ชุดที่สอง และอุณหภูมิจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ตรวจวิเคราะห์ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส และย้อมสีอะกาโรสเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบไมด์ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation (SYNGENE , Gene genius, Cambridge, U.K) แล้วแยกชิ้น DNA ของยีน LOX ขนาด 1500 คู่เบส โดยตัดเจลตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ตามต้องการภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต นำเจลที่ตัดไว้มาสกัดแยก DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germeny) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

6.4 การโคลนแถบ DNA ของยีน *Lox*

6.4.1 การเชื่อมต่อแถบDNA กับพลาสมิด pGEM® T Easy vector

นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR จากยีน LOX เข้าเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM® T Easy vector (Promega, USA) ที่มีขนาด 3,018 คู่เบส ในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X ligation buffer ปริมาณ 5 ไมโครลิตร pGEM® T Easy vector ปริมาณ 1 ไมโครลิตร DNA ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาณ 3 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

6.4.2 การบรรจุพลาสมิด DNA สายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรีย

การบรรจุพลาสมิดDNA สายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของแบคทีเรียใช้เทคนิค heat shock transformation โดยนำ ligation mixture จากข้อ 6.4.1 ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ในเซลล์แบคทีเรีย *E.Coli* สายพันธุ์ DH 5α (competent cell ) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นจุ่มในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เติมอาหารเหลว SOC ในเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียตกตะกอน แล้วดูดส่วนใสออก 750 ไมโครลิตร จากนั้นผสมตะกอนกับส่วนใสที่เหลือโดยใช้ ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลง และนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB แข็ง ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เติม X gal (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 40 ไมโครลิตรบนผิวอาหารแข็ง เลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกแบคที่เรียที่มีโคโลนีเดี่ยวสีขาวที่คาดว่าจะมี DNA สายผสม นำมาแยกเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวไว้เป็น master plate เพิ่มปริมาณ โคโลนีสีขาวในอาหารเหลว LB ผสมสารปฏิชีวนะ ampicilin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยชุดสำเร็จรูป QIA prep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germeny) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

6.4.3 การแยกชิ้น DNA ออกจากพลาสมิด

นำ DNA สายผสมที่สกัดได้จากเซลล์แบคทีเรีย มาตรวจสอบว่ามี DNA ของยีน LOX โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ECoRI (Fermentus) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA ปริมาณ 5 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ ECoRI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำ 12 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบผลการตัดเอนไซม์ด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 30 นาที จะได้ชิ้น DNA ขนาด 1500 คู่เบส

6.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA

การวิเคราะห์หาลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีน LOX ที่ได้จากการทำปฏิกริยา RT PCR โดยใช้บริการของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (DNA Technology Laboratory) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Lasergene (DNA STAR, USA) และวิเคราะห์ความเหมือน (identical) หรือความคล้ายคลึง (similarity) กับยีน LOX ในพืชอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

6.5 การสร้าง specific primer สำหรับยีน *Lox*

นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ hazelnut เพื่อทราบตำแหน่งของ intron แล้วเลือกลำดับเบสที่มีความยาว 308 คู่เบสที่ไม่มีตำแหน่ง intron มาเป็นตำแหน่ง specific primer

6.6 การสร้างDNA ตัวตรวจ (DNA probe) ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี

6.6.1 การได้ชิ้น DNA

นำโคโลนีที่เก็บใน -70 องศาเซลเซียส มาทิ้งให้ละลายในน้ำแข็งและเลี้ยงในอาหาร LB เหลว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรีย โดยชุดสำเร็จรูป QIA prep® Spin

Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต แล้วแยกชิ้น DNA ออกจากพลาสมิด ด้วยเอนไซม์ Eco RI หลังจากนั้นนำ DNA มาตรวจด้วย 0.8 % อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 30 นาที จะได้ชิ้น DNA ขนาด 1400 คู่เบส แล้วแยก DNA ออกจากเจล โดยตัดเจลตำแหน่งที่มีผลิตภัณฑ์ตามต้องการภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต นำเจลที่ตัดไว้มาสกัดแยก DNA ให้บริสุทธิ์โดยชุดสกัดสำเร็จรูป QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

6.6.2 การสร้างDNA ตัวตรวจ (DNA probe) ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี โดยใช้ DIG high Prime (Roche, Germany)

การสร้างDNA ตัวตรวจ (DNA probe) ซึ่งติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี โดยใช้ DIG high Prime โดยวิธี PCR ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 mM ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 10X PCR Dig labelling mix 5 ไมโครลิตร specific primer ความเข้มข้น 10μM อย่างละ 1 ไมโครลิตร Taq 0.5 ไมโครลิตร DNA ที่สกัดจากเจล 2 ไมโครลิตร PCR program เริ่มต้นด้วย แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย แยกสาย DNA แม่แบบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA ต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยสังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บ DNA probe ในหลอดที่ห่อด้วยกระดาษฟอลย์

6.7 ศึกษาการแสดงออกของยีน *Lox* ระหว่างเกิดอาการสะท้านหนาว

การศึกษาการแสดงออกของยีน *Lox* ใช้วิธี semiquantitative RT-PCR เนื่องจากไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกของยีนโดยวิธี northern blot ได้ นำผลพริกอายุ 15 และ 25 วันหลังดอกบานมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แล้วแยกเมล็ดออกมา และสกัด RNA จากเมล็ดในผลที่เก็บรักษานาน 0 2 4 6 และ 8 วัน แล้ว นำ RNA ที่ได้มา treated DNase หลังจากนั้นนำ RNA มาสังเคราะห์ cDNA แล้ว cDNA มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน LOX For 5′AGT AGC AGT GCC GGA CTC AAG 3′ Rev 5′TGC ATG AAG GGC TGT AAT CTG TCC 3′ โดยมี PCR program ดังนี้ แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย แยกสาย DNA แม่แบบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เริ่มต้นจับคู่ primer

กับ DNA ต้นแบบ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA ต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1นาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยสังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขนาดของ PCR product มีความยาวประมาณ 308 คู่เบส ตรวจดู PRC product ใน 1% อะกาโรสเจล ส่วน primer Actin For 5′ATC CAA TCG AGC ACG GAA TTG T 3′ Actin Rev 5′ GCA AGA TCC AAC GGA GAA TGG 3′ โดยมี PCR program ดังนี้ แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย แยกสาย DNA แม่แบบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA ต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 34 รอบ และตามด้วยสังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขนาดของ PCR product มีความยาวประมาณ 308 คู่เบส นำ DNA ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบปริมาณและขนาดในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

6.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CaCat1*

การศึกษาการแสดงออกของยีน *CaCat1* ใช้วิธี semiquantitative RT-PCR โดยมีลำดับเบสของ For 5′ GAT ATT CGC GGT TTT GCT GT 3′ Rev 5′ AAC TCT CCG GGA GGA AAG AG 3′ จากรายงานของ Kwon and An (2001) ได้ PCR product ขนาด 196 คู่เบสโดยมี PCR program ดังนี้ แยกสาย DNA แม่แบบเริ่มต้น ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย แยกสาย DNA แม่แบบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA ต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วยสังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำ DNA ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบปริมาณและขนาดในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

6.9 การศึกษาการแสดงออกของยีน aquaporin

การศึกษาการแสดงออกของยีน *CaPIP1* ใช้วิธี semiquantitative RT-PCR โดยมีลำดับเบสของ For 5′ AGC CAA CGT GGT TAA TCC TG 3′ Rev 5′ AGT TCC AGT GAT TGG TAT GG 3′ ได้ PCR product ขนาด 205 คู่เบสโดยมี PCR program ดังนี้ แยกสาย DNA แม่แบบ

เริ่มต้น ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย แยกสาย DNA แม่แบบ ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เริ่มต้นจับคู่ primer กับ DNA ต้นแบบ ที่ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที สังเคราะห์สาย DNA ต่อจาก DNA ต้นแบบ ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 31 รอบ และตามด้วยสังเคราะห์สาย DNA รอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำ DNA ที่สังเคราะห์จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบปริมาณและขนาดในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

**สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง**

สถานที่ทำการทดลอง หน่วยวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง มีนาคม 2546 – พฤษภาคม 2550