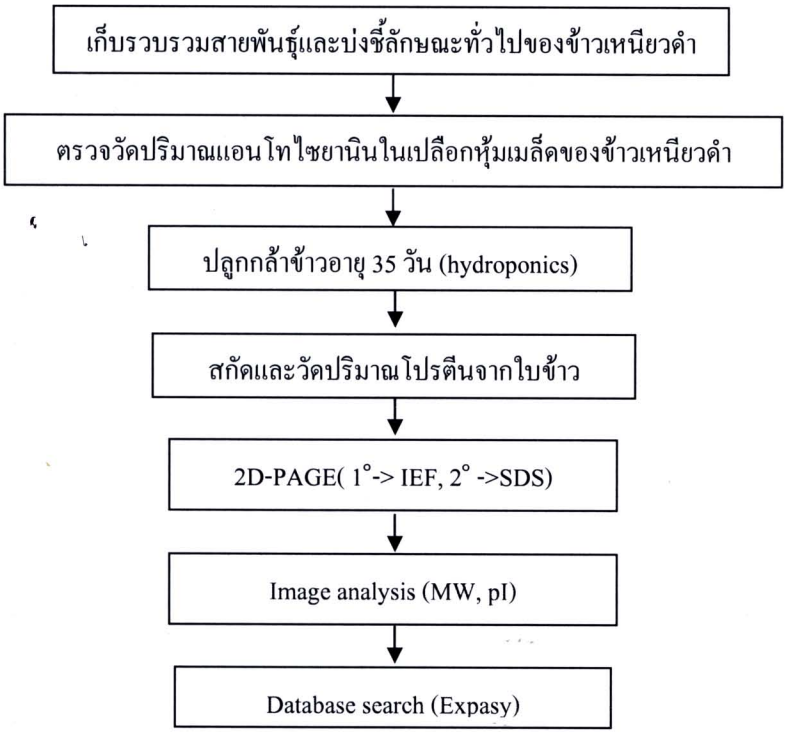
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำ โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE มีขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย ดังที่แสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แผนภาพสรุปขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

แต่ละขั้นตอนของการดำเนินงานในการศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำ โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE มีรายละเอียดดังนี้

3.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำ

ทำการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำที่มีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยขอความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำที่มีเก็บรวบรวมไว้แล้วตามสถานที่ราชการ และเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำจากเกษตรกรผู้ปลูกข้าวเหนียวดำโดยตรงจากจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำที่ได้มาจัดเรียงลำดับของการได้มา แล้วทำการบ่งชี้ลักษณะทั่วไป เช่น สีข้าวเปลือก สีข้าวเปลือกและปลูกข้าวเหนียวดำทั้ง 90 สายพันธุ์ในสารละลายธาตุอาหารพืช เพื่อระบุลักษณะสีของใบข้าว และเปอร์เซ็นต์การงอก เก็บเมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำไว้ในถุงซิบและเก็บในกล่องพลาสติกอีกหนึ่งชั้นเพื่อกันความชื้น แล้วเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวเหนียวดำ

คัดเลือกเมล็ดข้าวเหนียวดำ 30 สายพันธุ์ โดยการคัดเลือกจากความเข้มของสีเปลือกเมล็ด (ภาคผนวก ข ภาพที่ 12) มาทำการศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินตามวิธีการของ สุรัตน์ นักหล่อ (2544) โดยนำเมล็ดข้าวเหนียวดำทั้ง 30 สายพันธุ์มาแกะเปลือกเมล็ดออก และชั่งข้าวกล้องแต่ละสายพันธุ์มา 0.5 กรัม มาสกัดในสารละลายเอทาโนลิค ซึ่งประกอบด้วย เอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 98:2 (โดยปริมาตร) ในการสกัดสารแอนโทไซยานินโดยนำเมล็ดข้าวมาแช่ในสารละลายเอทาโนลิค ครั้งละ 10 มิลลิลิตร เปลี่ยนสารละลายวันละ 2 ครั้ง รวมเวลาที่แช่ในสารละลาย คือ 72 ชั่วโมง และเก็บรวบรวมสารละลายที่ได้ในแต่ละครั้งไว้ในขวดรูปชมพู่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการสกัด ทำการกรองสารละลายที่ได้ทั้งหมดด้วยกระดาษกรอง 2 ครั้ง ปรับปริมาตรสารที่สกัดได้สุดท้ายด้วยสารละลายเอทาโนลิคให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณของแอนโทไซยานิน (%) ตามสูตร ดังต่อไปนี้

$$\text{การดูดกลืนแสง} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ x ปริมาตรสุดท้าย x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (\%)} = \frac{\text{การดูดกลืนแสง}}{98.2}$$

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำ โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE

3.3.1 การปลูกข้าว

ปลูกต้นกล้าข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวเหนียวขาว ใบสีเขียว คือ กข 6 และข้าวเหนียวดำ ใบสีม่วง ตัวอย่างหมายเลข 19 โดยแช่เมล็ดข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเมล็ดเริ่มงอก นำเมล็ดไปปลูกบนกระจาดที่วางอยู่บนถังพลาสติก ความสูง 30 เซนติเมตร ความจุ 4 ลิตร โดยปลูกในน้ำเป็นเวลา 3 วัน แล้วย้ายไปปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (Gregorio *et al.*, 1997 ดัดแปลงจาก Yoshida *et al.*, 1976) จนอายุครบ 35 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างของต้นกล้าข้าว แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัดโปรตีนจากใบข้าว

1) นำใบข้าวแต่ละสายพันธุ์มาบดในโกร่งที่แช่ในกระบะน้ำแข็ง แล้วเติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เพื่อช่วยในการบด แล้วทำการบดตัวอย่างให้เป็นผงละเอียดเหมือนผงแป้ง

2) นำของเหลวที่ได้ใส่ลงไปในหลอดทดลองแล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่ในหลอดขนาดเล็ก เก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำส่วนใสบางส่วนไปทำการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) และใช้โปรตีนโบไวน์ซีรั่มแอลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.3.3 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE ตามวิธีการของ Berkelman and Stenstedt (1998)

1) การแยกโปรตีนในทิศทางที่ 1 (Isoelectric focusing; IEF) โดยใช้เครื่อง Ettan IPGphor II ของบริษัท Amersham Biosciences

ทำให้ IPG dry strip ความยาว 7 เซนติเมตร อิ่มตัวด้วย 125-x ไมโครลิตร ของสารผสม (rehydrant buffer 122 µl, 1 M DTT 2.275 µl, IPG 0.625 µl) (x=ปริมาตรของโปรตีนที่ต้องแยก) ใน strip holder โดยคว่ำหน้าเจล IPG dry strip ให้แนบกับสารผสมอย่างระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศระหว่างสารผสมกับหน้าเจล จากนั้นปิดทับเจลด้วย oil cover fluid 650 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันการแห้งของสารตัวอย่าง แช่เจลทิ้งไว้ 13 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่แพร่เข้าสู่ IPG strip ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อครบ 13 ชั่วโมง ปิเปตน้ำสกัดโปรตีน (ใช้น้ำสกัดโปรตีนปริมาตร 8 ไมโครกรัมในการย้อมโปรตีนด้วยสีย้อมซิลเวอร์ไนเตรท) ลงไปใน strip holder แล้วนำ strip holder ไปวางลงเครื่อง IPGphor II เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าโดยให้กระแสไฟฟ้า 5 ระดับคือ ระดับที่ 1; 150 V 2 h ระดับที่ 2; 300 V 200 Vh ระดับที่ 3; 1,000 V 300 Vh ระดับที่ 4; 5,000 V 4000 Vh และ ระดับที่ 5; 5,000 V 2000 Vh

เมื่อครบเวลา นำ IPG strip ไปแช่ใน 5 มิลลิลิตร Equilibration buffer ที่เติมสาร DTT (1,4-Dithiothreitol) 50 มิลลิกรัม นำไปเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นย้าย IPG strip ไปแช่ใน 5 มิลลิลิตร Equilibration buffer ที่เติม IAA (Iodoacetamide) 125 มิลลิกรัม แล้วนำไปเขย่าเบาๆ ต่อเป็นเวลา 15 นาที

2) การแยกโปรตีนทิศทางที่ 2 (second dimension by SDS-PAGE)

เมื่อครบเวลานำ IPG strip ออกมาวางบนกระดาษกรอง นำ IPG strip ไปวางบนเจลสำหรับใช้ในการแยกแบบ SDS-PAGE อย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศระหว่าง IPG strip กับหน้าเจล จากนั้นเชื่อมรอยต่อของ IPG strip กับหน้าเจลด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล เกิดขึ้นแล้วให้กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมแปร์ ประมาณ 1.30 ชั่วโมง แล้วทำการแยกโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ที่แยกโดยอาศัยค่ามวลโมเลกุล

3.4 การย้อมสีแถบโปรตีนด้วยสีซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining)

นำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟริซิส มาทำการตรึงแถบโปรตีนและชะสารที่รบกวนการย้อม เช่น สารพวกดีเทอร์เจนท์ต่างๆ โดยเฉพาะ SDS ออกไป โดยนำไปแช่ในสารละลาย Fixation เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย sensitizing เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water; DI) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วทำการย้อมแถบโปรตีนโดยการนำมาแช่ในสารละลาย silver nitrate reagent เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดแถบสีของโปรตีนโดยเติมสารละลาย developer โดยทำการเขย่าและเปลี่ยนสารละลายดังกล่าวบ่อยๆ จนเห็นแถบสีน้ำตาลของโปรตีนชัดเจนขึ้น แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำ DI จากนั้นจึงเก็บเจลไว้ในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ หรือถ่ายรูปแล้วทำให้แห้งต่อไป

3.5 การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

ทำการสแกนแผ่นเจลโดยใช้เครื่อง cannon scanner บันทึกนามสกุลของไฟล์เป็นแบบ TIFF แล้ววิเคราะห์แบบแผนโปรตีนโดยใช้ 2-dimentional software คือ image master 2D platinum version 5 หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบมวลโมเลกุลและค่า pI ของโปรตีนที่ได้กับฐานข้อมูลโปรตีน Expasy (วิธีวิเคราะห์แบบแผนโปรตีน ดังแสดงในภาคผนวก ค)