ภาคผนวก

1. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ประยุกต์วิธีของ Nakamura and Ikawa (1993)

การเตรียมกราฟมาตรฐานไนไทรต์

1. เตรียมหลอดทดลองที่มีไนไทรต์ 0.02,0.04,0.06, 0.08 และ 0.1μmoles ในสารละลายปริมาตร 1 ml โดยใช้สารละลาย 0.2 mM KNO_2

2. เติม 1 %(w/v) sulfanilamide in 1.5 M HCl 0.5 ml

3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02%(w/v)N-(1-napthyl)ethylenediamine.2HCl เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 20 นาที

4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

incubation medium ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	Assay (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	0.4	0.7
1 M Tris-HCl buffer pH 7.5	0.1	0.1
0.1 M KNO_3	0.1	0.1
Sample	0.3	-

1. เริ่มปฏิกิริยาโดยเติม 1 mM NADH 0.1 ml ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10, 20, 30 และ 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1 %(w/v) sulfanilamide ใน1.5 M HCl 0.5 ml

3. ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02%(w/v) N-(1-napthyl)ethylenediamine.2HCl เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 20 นาที

4. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. การหาค่าปริมาณโปรตีน

ประยุกต์วิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 2 mg/ml นำมาใส่หลอดทดลองให้ได้ปริมาณโปรตีน 20 , 40, 60, 80 และ 100 μg ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 0.1 ml/หลอด

การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ส่วนประกอบ	Assay (ml)	Blank (ml)
น้ำกลั่น	-	0.1
สารละลายโปรตีนมาตรฐาน	0.1	-
10% Deoxycholate	0.4	0.4
2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH	3.0	3.0
1%$CuSO_4$+2%Na/K tartrate (1:1)	0.1	0.1

เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม สารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น(1:1) 0.3 ml เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การหาปริมาณโปรตีนจากสารตัวอย่าง

เจือจางโปรตีนในสารตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 20-100 μg/0.1ml นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับการวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

3. การวัดปริมาณไนเทรต

โดยประยุกต์วิธีของ Cataldo *et. al.* (1975)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ไนเทรต

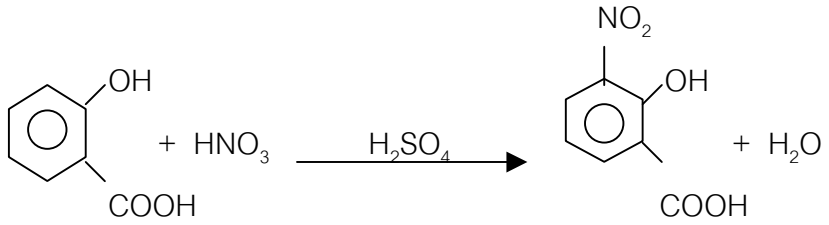
เตรียมหลอดทดลองที่มี KNO_3 เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ,0.5 และ 0.6 μmol/0.2mL จากสารละลาย 5 mM KNO_3

ส่วนประกอบ	Assay(ml)	blank(ml)
น้ำกลั่น	-	0.2
KNO_3 ความเข้มข้นต่างๆ	0.2	-
5%Salicylic acid ใน conc. H_2SO_4	0.8	0.8

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม 4 N NaOH 9.5 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็นลง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

การวัดปริมาณไนเทรตในสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่กำจัดไอออนแล้วให้ได้ปริมาณไนเทรตอยู่ในช่วง 0.1-0.5 μmol/0.2ml นำมาใส่หลอดทดลองแล้วหาปริมาณไนเทรตเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน ไนเทรต



รูปที่ 35 แสดงปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซาลิซิลิก (สมศักดิ์ มณีพงษ์, 2537)

4. การปลูกข้าวด้วยระบบไฮโดรโพนิคในห้องทดลอง

สภาพทั่วไป

ห้องทดลองขนาด 3x6 ตารางเมตร ติดพัดลมระบายอากาศที่ผนังห้องเพื่อให้มีการหมุนเวียนอากาศ และยังช่วยไม่ให้อุณหภูมิในห้องสูงกว่าภายนอกเกินไป โดยอุณหภูมิห้องเป็น 35 องศาเซลเซียสในตอนกลางวัน และ 23 องศาในตอนกลางคืน ใช้กระดาษสีดำปิดกระจกเพื่อกั้นไม่ให้แสงจากภายนอกห้องเข้ามารบกวน

<u>แหล่งกำเนิดแสง</u>

แหล่งกำเนิดแสงได้จากหลอดฟลูออเรสเซนส์ (Philips TL 20W /54, Philips TL 40W /33, Mazdafluor TF 40W /AVIVA) ซึ่งให้ความเข้มแสงประมาณ 6,000 lux หรือประมาณ 270 μmoles/m^2/s ใช้ timer ควบคุมการเปิดปิดแสงโดยให้พืชได้รับแสงนาน 12 ชั่วโมงต่อวัน

การเตรียมต้นกล้า

นำเมล็ดข้าวมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยน้ำยาไฮเตอร์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วแช่เมล็ดในน้ำกลั่น 1 คืน จากนั้นนำมาเพาะให้งอกบนกระดาษนุ่มที่ชุ่มด้วยน้ำกลั่น ตั้งไว้ในที่มืด คอยเติมน้ำกลั่นให้กระดาษชุ่มอยู่เสมอ ประมาณ 4 วัน ต้นกล้าข้าวจะงอกได้ความสูงประมาณ 2-4 เซนติเมตร จึงนำไปใช้ปลูก

สูตรอาหารสำหรับปลูกข้าว

ใช้อาหารสูตรของ Hoagland and Arnon (1950) ที่มีความเข้มข้นลดลง 4 เท่า ในระหว่างการปลูกจะมีการปรับปริมาตรของสารละลายธาตุอาหารโดยการเติมน้ำกลั่นวันละครั้ง รักษาระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุ และ ปรับพีเอชของสารละลายด้วย HCl และ NaOH ให้อยู่ในช่วง 6.5 $\pm$ 0.3 โดยปรับทุกๆ 1-2 วัน และเปลี่ยนอาหารใหม่ 4 วันต่อครั้ง ยกเว้นบางการทดลองที่เตรียมอาหารเพียงครั้งเดียว

ตารางที่ 6 สูตรอาหาร Hoagland and Arnon, (1950)

สารเคมี	น้ำหนักสูตร	ปริมาณสาร mol/10 L	G/10L	รวม (mol/10L)
$NH_4H_2PO_4$	115.0	0.01	1.15	NH_4=0.01
KNO_3	101.11	0.06	6.06	PO_4^{2-}=0.01
$Ca(NO_3)_2$	236.15	0.028	6.61	K=0.06
$MgSO_4.7H_2O$	246.48	0.019	4.68	NO_3^-=0.116
Fe-EDTA			0.4	Ca=0.028
$FeSO_4$	69.50		0.17	Mg=0.019
EDTA	93.01		0.23	SO_4^{2-}=0.019
H_3BO_3	61.83	$4.6x10^{-4}$	$2.8x10^{-2}$	
$MnCl_2.4H_2O$	197.91	$0.9x10^{-5}$	$1.78x10^{-2}$	
$ZnSO_4.7H_2O$	287.54	$7.6x10^{-6}$	$2.2x10^{-3}$	
$CuSO_4.5H_2O$	249.68	$3.2x10^{-6}$	$7.9x10^{-4}$	
$H_2MoO_4.H_2O$			$2.0x10^{-4}$	

รูปที่ 36 การปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหารในห้องทดลอง