2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ถังพลาสติกขนาด 2.5 ลิตร และขนาด 20 ลิตร

ลวดตาข่ายขนาด 20 ลิตร

เหล็กฉาก และน็อต

แผ่นพลาสติกใส

ตาข่ายพลาสติก

สายยาง

เสียม

กระติกไนโตรเจนเหลว

เมล็ดพันธุ์ข้าวได้รับความเอื้อเฟื้อจากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

อุปกรณ์

Centrifuge ของ Eppendorf รุ่น 5804R, Centrifuge ของ Beckman รุ่น J-21, pH meter ของ Corning รุ่น 240, Vortex ของ Scientific Industry รุ่น K-550-GE, Polytron homogenizer ของ Kinematica รุ่น PT 10-35, Light meter ของ Extech, Microvolt integrator ของ AT Delta-T Devices LTD. รุ่น MV2, หลอดฟลูออเรสเซนส์ (Philips TL 20W/54, Philips TL 40W/33, Mazdafluor TF 40w/AVIVA), Spectrophotometer ของ Hewlet Packard Spectrophotometer รุ่น 8453, Electrophoresis apparatus ของ Hoefer Scientific Instrument รุ่น SE260, Timer ของ National รุ่น TB179, Magnetic Stirrer ของ GEM รุ่น MS 101, Peristaltic pump ของ Eyela รุ่น MP-3N, เครื่องชั่งแบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Mettler รุ่น H10, เครื่องชั่งจานเดียว ทศนิยม 3 ตำแหน่ง ของ OHAUS รุ่น GT 410

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่างๆ ดังนี้

จากบริษัท Ajax Chemicals ได้แก่ copper sulphate และ di-potassium hydrogen orthophosphate

จากบริษัท Carlo Erba ได้แก่ potassium nitrate, ammonium persulphate

จากบริษัท BDH ได้แก่ manganese chloride, manganese sulphate, phenyl-methylsulfonylfluoride(PMSF) , salicylic acid และ sodium hydroxide

จากบริษัท Bio-Rad ได้แก่ Affi-Gel® Blue Gel 100-200 mesh

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Coomassie brilliant Blue R-250, deoxycholate, ethylenediaminetetraacetic acid, potassium chloride, potassium sodium tartate และ N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

จากบริษัท Hopkins & Williams ได้แก่ zinc sulphate

จากบริษัท M&B ได้แก่ calcium phosphate

จากบริษัท Mallinckrodt ได้แก่ magnesium sulphate

จากบริษัท Merck ได้แก่ acetic acid, ammonium sulphate, bromophenol blue, calcium chloride, Folin-Ciocalteu's-phenol reagent, glycine, iron(II) sulphate, hydrogen molybdate, β-mercaptoethanol, potassium dihydrogen phosphate, sulphuric acid และ sodium carbonate

จากบริษัท Pharmacia ได้แก่ sephadex G-25

จากบริษัท Sigma ได้แก่ acrylamide, adenosine 5'-monophosphate, Blue sepharose, bovine serum albumin, dithiothreitol, flavin adenine dinucleotide, hydrochloric acid, lactate dehydrogenase, N-(1-napthyl)ethylenediamine dihydro-chloride, β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$), sodium pyruvate, sodium azide, sulfanilamide และ Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane

จากภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ ได้แก่ liquid nitrogen

วิธีการ

2.1 การศึกษาการทำงาน(activity)ของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและความสัมพันธ์กับปริมาณไนเทรตที่สะสมอยู่ในใบข้าวไร่

2.1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวไร่ที่ใช้ปลูก

เมล็ดพันธุ์ข้าวไร่ที่ใช้ปลูกได้แก่พันธุ์กู้เมืองหลวง และพันธุ์ดอกพยอม โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ปลูกโดยทั่วไปในนาน้ำขัง เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกไม่ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละสายพันธุ์

2.1.2 สถานที่ปลูก

โรงเพาะชำสำหรับปลูกข้าวมีขนาด 2 x 4.5 ตารางเมตร กั้นด้วยตาข่ายพลาสติกสีขาวทุกด้านเพื่อกันแมลง ส่วนบนมุงด้วยแผ่นพลาสติกใสเพื่อกันฝนและเพื่อให้ต้นข้าวได้รับแสงมากที่สุด

2.1.3 ดินที่ใช้ปลูก

ใช้ดินที่ได้จากนาข้าว ในเขตอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา มีค่า pH 5 มีปริมาณไนเทรต 1.2 ไมโครโมลต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม นำมาใส่ในถังพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ฟุต ระดับหน้าดินต่ำกว่าขอบกระถางประมาณ 4-5 นิ้ว

2.1.4 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

2.1.5 การปลูกข้าวลงดิน

เจาะหน้าดินให้ลึกประมาณ 3 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างหลุมประมาณ 1 นิ้ว นำต้นกล้าลงปลูก 2 ต้นต่อหลุม จำนวน 20 ต้น ต่อถัง ข้าวแต่ละสายพันธุ์จะปลูกจำนวน 3 ถัง

2.1.6 การให้ปุ๋ยและการให้น้ำ

ให้ปุ๋ยสูตร 20-20-0 ตอนเตรียมดินก่อนปลูกในอัตรา 2 กรัม/ถัง เติมน้ำให้มีระดับน้ำอยู่สูงจากผิวดิน 0.5-1 นิ้ว และเติมน้ำอีกครั้งเมื่อระดับน้ำลดต่ำลงมาถึงระดับผิวดิน

ให้ปุ๋ยครั้งที่สองเมื่อ ต้นข้าวอายุ 1 เดือนครึ่ง โดยให้ปุ๋ยชนิดและปริมาณเหมือนก่อนเริ่มปลูก

2.1.7 การเก็บตัวอย่างใบเพื่อนำมาศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

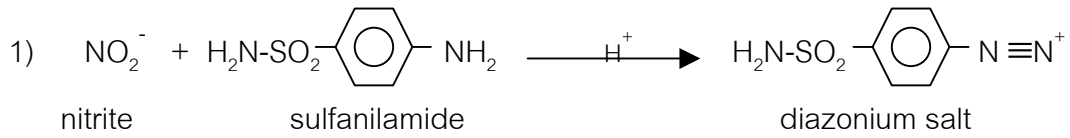
เริ่มเก็บตัวอย่างใบตำแหน่งที่ 2 จากยอดเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 4 วันหลังจากลงปลูก และเก็บทุกๆ 4 วัน เป็นระยะเวลา 80 วัน โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 10-11นาฬิกา ปริมาณใบที่เก็บประมาณถังละ 1-2 กรัม โดยแบ่งใบที่เก็บเป็นสองกลุ่มได้แก่ กลุ่มที่จะนำไปหาค่า แอคติวิตีของเอนไซม์ และกลุ่มที่จะนำไปวัดหาปริมาณไนเทรต

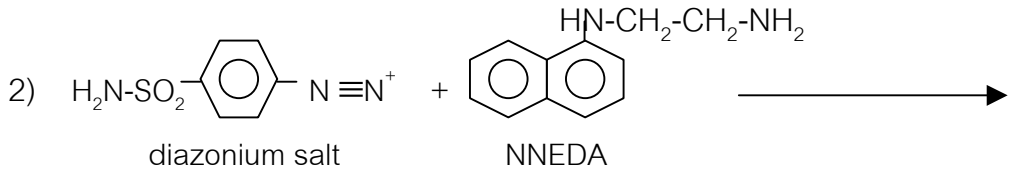
2.1.8 การเตรียม leaf extract สำหรับศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ (ทุกขั้นตอนทำที่ 4 องศาเซลเซียส) นำใบข้าวแต่ละพันธุ์ มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บดในโกร่งบดยาโดยผสมกับ 0.1 โมลาร์ Tris-HCl pH 7.5 ซึ่งมี 0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF และ 1 มิลลิโมลาร์ EDTA ในอัตราส่วน ใบข้าว 1 กรัม/บัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการบด 1 นาที แล้วกรองด้วยผ้าก๊อซ 4 ชั้น นำน้ำที่ได้จากการกรองไปหมุนเหวี่ยงในเครื่อง eppendorf centrifuge รุ่น 5804R ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใสนำมาผ่าน Sephadex G-25 column (ขนาด 0.8x10 เซนติเมตร) เก็บสารละลายที่ออกมาที่ void volume นำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทันที

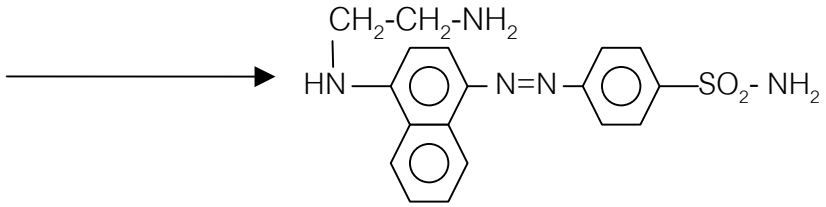
2.1.9 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ดัดแปลงจากวิธีของ Nakamura and Ikawa (1993) โดยนำเอนไซม์ที่สกัดได้มา 100-700 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ KNO_3 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 900 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม NADH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และหยุดปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ กันใน 1 ชั่วโมง โดยการเติม 1 %(w/v) sulfanilamide ใน HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02%(w/v) N-(1-napthyl)ethylenediamine dihydrochloride(รูปที่ 7) เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นอัตราการเพิ่มของไนไทรต์ต่อเวลา มีหน่วยเป็น nmol nitrite/min โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ KNO_2 (ภาคผนวก ข้อ 1)







coloured complex สีชมพูอมม่วง

วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร

รูปที่ 7 ปฏิกิริยาสองขั้นตอนในการเกิดสีของไนไทรต์ (Scott and Neyra, 1979; Coombs and Hall, 1982)

NNEDA = *N*-(1-napthyl)ethylenediamine dihydrochloride

2.1.10 การหาค่าปริมาณโปรตีน

ประยุกต์วิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน เริ่มต้นด้วยการผสมสารละลายโปรตีน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ deoxycholate 10% ปริมาตร 400 ไมโครลิตร, 2% Na_2CO_3 ใน NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ สารละลายคอปเปอร์ทาร์เทรต (1% $CuSO_4$+2%Na/K tartrate ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น(1:1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2.1.11 การหาค่าปริมาณไนเทรต

ใช้ salicylic acid method โดยประยุกต์วิธีของ Cataldo *et al.* (1975) โดยนำสารตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 5% salicylic acid ใน conc. H_2SO_4 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นปรับ pH ให้เป็นด่าง (>12) ด้วย NaOH ความเข้มข้น 4 นอร์มอล ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็นลง สารละลายจะมีสีเหลืองถ้ามีไนเทรต ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 410 นาโนเมตร และใช้ KNO_3 ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.1.11.1. การสกัดไนเทรตในพืช

นำพืชที่อบแห้ง 2 วัน ที่ 65 องศาเซลเซียส มาบดโดยผสมกับน้ำกลั่นที่กำจัดไอออนแล้ว ในอัตราส่วน น้ำหนักใบ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บส่วนสารละลายใสไว้สำหรับวัดไนเทรต (Cataldo *et al.,* 1975)

2.1.11.2 การสกัดไนเทรตในดิน

นำดินไปอบแห้ง 2 วันที่ 65 องศาเซลเซียส นำมาสกัดด้วย $Ca(OH)_2$ ที่อิ่มตัวในอัตราส่วนดิน 5 กรัมต่อ $Ca(OH)_2$ 10 มิลลิลิตร เขย่า 15 นาที นำมากรองผ่านผ้าก๊อซ 4 ชั้น จากนั้นนำส่วนสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้สำหรับหาปริมาณไนเทรต (Vendrell and Zupancic, 1990)

2.2 การศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อ แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

2.2.1 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (activity) **ใน ช่วงวัน**

2.2.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา

ก. ศึกษาในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงอายุ 8 สัปดาห์ ซึ่งปลูกในดินในโรงเพาะชำ และได้รับปุ๋ยสูตร 20-20-0 เป็นเวลา 4 วันก่อนวันเก็บตัวอย่าง มีปริมาณไนเทรต 2.67 $\pm$ 0.35 ไมโครโมลต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัม

ข. ศึกษาในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงอายุ 2 สัปดาห์ ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยได้รับธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น ¼ เท่า และได้รับแสงประมาณ 6,000 ลักซ์ หรือ 270 μmol/m^2/s. เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 วัน ปรับปริมาตรสารละลายด้วยการเติมน้ำกลั่น และปรับระดับค่าพีเอชในสารละลายทุก 1-2วัน ด้วย HCl และ NaOH ให้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.5 $\pm$ 0.3

2.2.1.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบที่ 2 และ 3 จากยอด และ ราก ที่เวลา 06.00 น., 09.00 น., 12.00 น., 15.00 น., 18.00 น., 21.00 น., 24.00 น., และ 03.00 น. โดยเก็บครั้งละประมาณ 1 กรัม จำนวน 6 ซ้ำ(1 ซ้ำ = 1 ถัง) ล้างใบและรากด้วยน้ำกลั่น ใช้ไนโตรเจนเหลวทำให้กรอบ แล้วบดในโกร่งบดยา เก็บตัวอย่างที่บดแล้วไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวัดแอคติวิตี

2.2.2 ผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสง (photo period) **และความสมบูรณ์ของธาตุอาหารต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส**

2.2.2.1 พันธุ์ข้าวที่ศึกษา ศึกษาในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงอายุ 2 สัปดาห์ ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค ในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น 1/2 เท่า และ ความเข้มข้น 1/20 เท่า โดยได้รับแสง ประมาณ 6,000 ลักซ์ หรือ 270 μ mol/m^2/s. เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน และ 10 ชั่วโมงต่อวัน และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 4 วัน และ12 ชั่วโมงก่อนเก็บตัวอย่าง ปรับปริมาตรสารละลายด้วยการเติมน้ำกลั่น และปรับระดับค่าพีเอชในสารละลายทุก 1-2 วัน โดยการเติม HCl หรือ NaOH เพื่อรักษาระดับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5 $\pm$ 0.3

2.2.2.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าว ที่เวลา 06.00 น., 09.00 น., 12.00 น., 15.00 น., 18.00 น., 21.00 น., 24.00 น., และ 03.00 น. โดยเก็บครั้งละ ประมาณ 0.25 กรัม จำนวนสาม ซ้ำใช้ในโตรเจนเหลวทำให้กรอบ แล้วบดในโกร่งบดยา เก็บตัวอย่างใบที่บดแล้วไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวัดแอคติวิตี

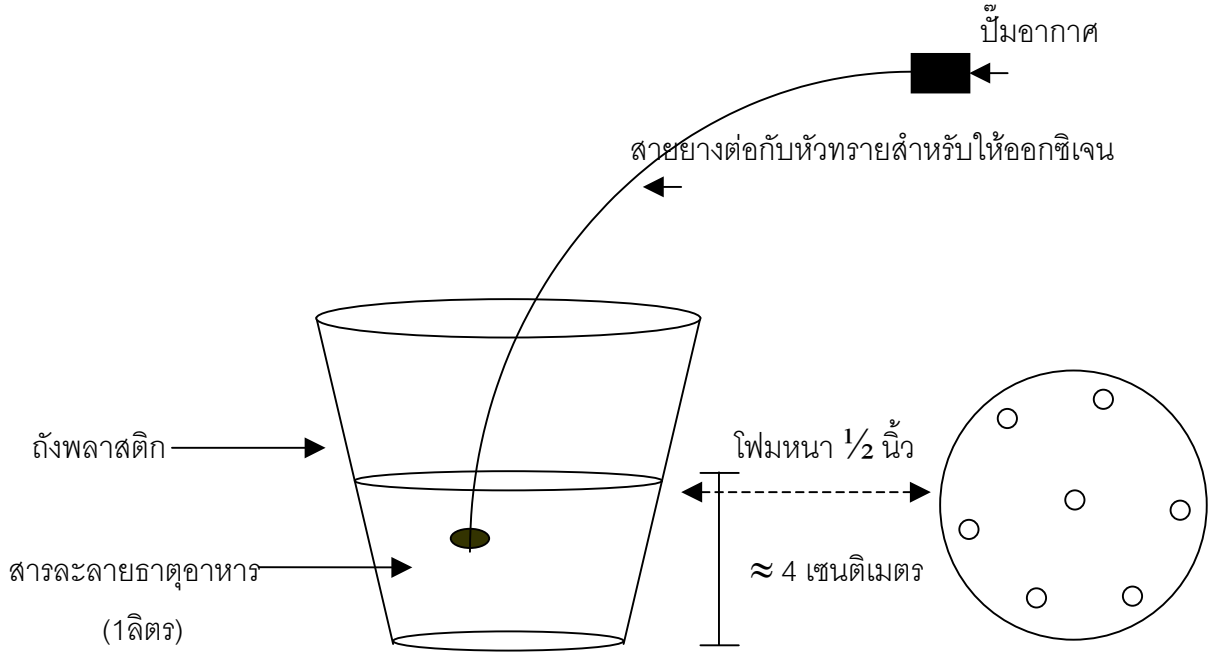
2.2.3 ผลการเติมอากาศในระบบการปลูกในสารละลายธาตุอาหาร ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

2.2.3.1 พันธุ์ข้าวที่ศึกษา

ศึกษาในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคโดยได้รับอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น ¼ เท่าเพียงครั้งเดียว และได้รับแสงประมาณ 6,000 ลักซ์ หรือ 270 μmol/m^2/s. เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ปรับปริมาตรสารละลายด้วยการเติมน้ำกลั่น และปรับระดับค่าพีเอชในสารละลายทุกวัน เปรียบเทียบผลการเติมอากาศลงไปในสารละลายธาตุอาหาร โดยใช้ที่เติมอากาศสำหรับตู้ปลาและปรับระดับความแรงของอากาศที่เติมให้อยู่ในระดับต่ำที่สุด กับการไม่เติมอากาศ

2.2.3.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวที่เวลา 11-12 นาฬิกา โดยเก็บใบทุกใบยกเว้นใบยอด ประมาณ 0.25 กรัม ต่อถัง (จำนวน 3 ซ้ำ ต่อกลุ่มการทดลอง) ทำให้ใบกรอบโดยใส่ไนโตรเจนเหลวก่อนบดในโกร่งบดยา แล้วเก็บตัวอย่างที่บดแล้วที่ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวัดแอคติวิตี และหาปริมาณโปรตีน เก็บตัวอย่างเมื่อต้นข้าวอายุ 7, 9, 13, 14 และ 16 วัน



รูปที่ 8 การเติมอากาศให้กับระบบการปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหาร

2.3 ผลของไนโตรเจนในรูปของไนเทรต แอมโมเนียม และไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม

2.3.1 พันธุ์ข้าวที่ศึกษา

ศึกษาในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และขาวดอกมะลิ105 ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค และได้รับแสง ประมาณ 6,000 ลักซ์ หรือ 270 μmol/m^2/s เป็นเวลา 12 ชั่ว-โมงต่อวัน

2.3.2 สูตรอาหารทดสอบ

ใช้ธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่า โดยดัดแปลงเป็น

1. สูตรไม่มีธาตุไนโตรเจน (N-free)
2. สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของไนเทรต ความเข้มข้น 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์
3. สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม ความเข้มข้น 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์
4. สูตรที่มีแหล่งไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเทรต (ในอัตราส่วน 1:1) ความเข้มข้น 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์

สำหรับสารละลายธาตุอาหารนี้จะเตรียมเพียงครั้งเดียวในตอนแรก จากนั้นปรับค่าพีเอชโดย การเติม HCl หรือ NaOH เพื่อรักษาระดับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5 $\pm$ 0.3 รวมทั้งเติมน้ำกลั่นเพื่อรักษาระดับปริมาตรของสารละลายให้คงที่อยู่เสมอทุกๆวัน

2.3.3 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวทุกใบยกเว้นยอด เริ่มเก็บในช่วงเวลา 11.00 น.–13.00 น. โดยเก็บครั้งละ ประมาณ 0.25 กรัม (จำนวน 3 ซ้ำ) ตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ แบ่งใบข้าวไปอบแห้งเพื่อหาปริมาณไนเทรตในใบ ใบข้าวอีกส่วนหนึ่งนำมาบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวทำให้กรอบก่อนบดจากนั้นเก็บตัวอย่างที่บดแล้วที่ –20องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรต รีดักเทส และปริมาณโปรตีน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 – 5 วัน โดยเก็บตั้งแต่เริ่มลงปลูก จนระดับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ลดลงเป็นศูนย์ หรือ 1 เดือนโดยประมาณ

2.4 การสกัดเอนไซม์ และทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่

ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

2.4.1 การเตรียม crude extract

ตัดใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงอายุประมาณ 1 เดือน จากต้นที่ปลูกในดิน และได้รับการเติมปุ๋ยล่วงหน้าเพื่อชักนำให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสก่อนการเกิบตัวอย่างเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยนำใบมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ชั่งใบมา 150 กรัม แล้วใช้ผ้าชุบน้ำบิดหมาดคลุมไว้เพื่อป้องกันใบแห้ง ตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ ตำในโกร่งบดยาให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวทำให้ใบกรอบ นำส่วนที่ตำละเอียดตักใส่บีกเกอร์ จากนั้นสกัดเอนไซม์ด้วย 600 มิลลิลิตร ของ 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ EDTA และ 0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF โดยนำไปโฮโมจีไนซ์ 5 นาที ด้วยเครื่อง Polytron homogenizer แล้วกรองด้วยผ้าก๊อซ 6-8 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนสารละลายมาวัดปริมาตร เก็บแยกไว้ 5 มิลลิลิตร เพื่อใช้หาปริมาณโปรตีนและความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์

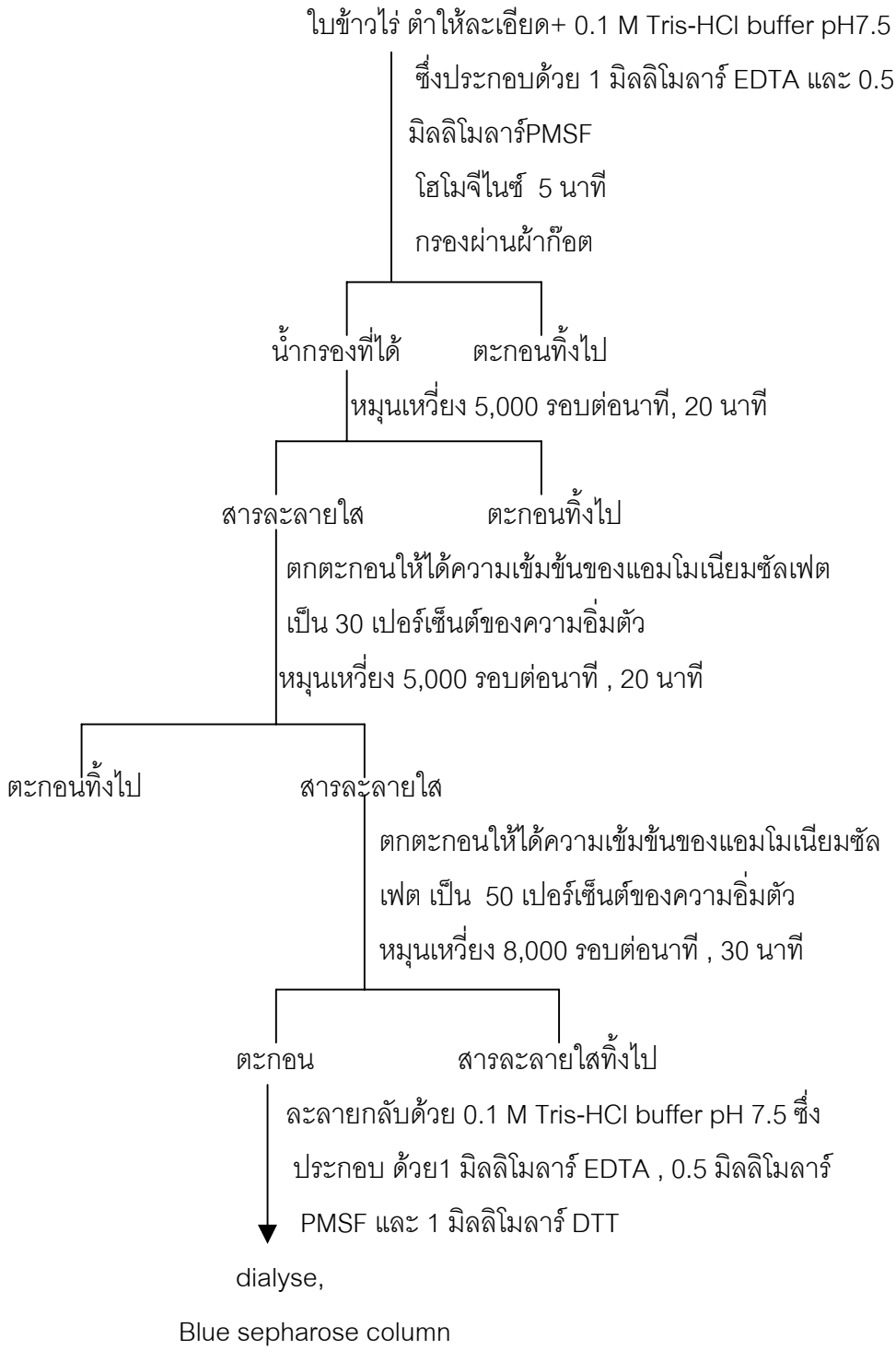
2.4.2. การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำส่วนสารละลายใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงมาเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 0-30 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัว โดยค่อยๆ เติมเกลือลงทีละน้อยๆ จนหมด คนช้าๆ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ EDTA, 0.5 มิลลิโม-ลาร์ PMSF และ 1 มิลลิโมลาร์ DTT แล้วนำไปไดอะไลซ์เอาเกลือออก เรียกส่วนนี้ว่าสารละลาย P1 (0-30%) สำหรับสารละลายส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนำมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 30-50 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงไปละลายด้วยบัฟเฟอร์เดิมแล้วนำไปไดอะไลซ์เอาเกลือออกเรียกส่วนนี้ว่าสารละลาย P2 (30-50%) สำหรับสารละลายส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนำมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 50-70 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้มาละลายด้วยบัฟเฟอร์เดิมจากนั้นนำไปไดอะไลซ์เอาเกลือออก เรียกสารละลายที่ได้ในขั้นตอนนี้ว่าสารละลาย P3 (50-70%) นำสารละลาย P1, P2 และ

P3 มาหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพื่อเลือกปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

หลังการสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในระดับความอิ่มตัวที่เหมาะสมแล้ว แบ่งสารละลายเอนไซม์ 1 ใน 4 ส่วน นำไปเก็บไว้สำหรับศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ ส่วนที่เหลือนำไปไดอะไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมเพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ต่อไป

2.4.3 **การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยใช้** Blue-sepharose **column chromatography**บรรจุ Blue-sepharose ลงในคอลัมน์ขนาด (1.5 cm x 20 cm) จากนั้นปรับสภาพคอลัมน์ ด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ EDTA, 0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF และ 1 มิลลิโมลาร์ DTT ปริมาตรเป็นสองเท่าของปริมาตรคอลัมน์ นำ dialysate ที่ได้มาใส่ลงในคอลัมน์ในอัตราปริมาณโปรตีน 5-7 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร bed volume จากนั้นชะด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ EDTA, 0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF และ 1 มิลลิโมลาร์ DTT โดยใช้อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ชะล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์นี้จนกระทั่งค่า OD. 280 เข้าใกล้ 0 จากนั้นชะด้วย 0.3 M KNO_3 ในบัฟเฟอร์เดิม และตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกๆ 5-10 หลอด รวมสารละลายที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสไว้ด้วยกัน แล้วนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ได้ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัวทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมงแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บส่วนของตะกอนมาละลายกลับใน 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ EDTA ,0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF และ 1 มิลลิโม-ลาร์ DTT แล้วนำไป dialyse ด้วย บัฟเฟอร์เดิม วัดปริมาตรและแบ่งเก็บไว้สำหรับหาปริมาณโปรตีน และความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์



รูปที่ 9 ไดอะแกรมการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จากใบข้าวไร่

2.5 การย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ ไนเทรตรีดักเทส บนแผ่นเจลโพลีอคริลาไมด์

2.5.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีสิสแบบไม่เสียสภาพธรรมชาติ (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, ND PAGE)

2.5.1.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจล

โพลีอะคริลาไมด์ที่ใช้ศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ในแผ่นกระจกขนาด 10x10x0.15 เซนติเมตร ประกอบด้วยเจลสองส่วนคือ เจลส่วนบน (stacking gel) และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงของเจล ประมาณ 3 เซนติเมตร และ 7 เซนติเมตร ตามลำดับ การเตรียมเจลทำตามวิธีของ Davis (1964) โดยมีส่วนประกอบของเจลดังนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel	Separating gel	
	3% (5ml)	5%(5ml)	10%(5ml)
30 % Acrylamide. 0.8 %bis(ml)	0.5	0.84	1.67
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	0.63	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	-	2.5	2.5
10% ammonium persulphate (μl)	50	50	50
TEMED (μl)	5	5	5
น้ำกลั่น (ml)	3.82	1.29	0.78

2.5.1.2 การเตรียมอิเล็กโทรฟอรีสิสบัฟเฟอร์

ใช้ Tris-glycine buffer,pH 8.3 [0.025 M Tris-HCl (3.03g/l)- 0.192 M Glycine (14.4 g/l)]

2.5.1.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

ผสมสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ 200 มิลลิโมลาร์Tris-HCl , pH 6.8 ซึ่งประกอบด้วย 40 % glycerol, 8 มิลลิโมลาร์ EDTA และ 0.4% bromophenol blue โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายโปรตีนเมื่อเติมส่วนผสมทั้งหมดแล้ว มีค่าปริมาณโปรตีนประมาณ 1 mg/ml

2.5.1.4 การทำอิเล็กโตรฟอรีสิส

นำสารตัวอย่างมาใส่ในแต่ละช่องของเจลส่วนบน ใช้กระแสไฟ 120 โวลต์นาน 4-5 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล ประมาณ 0.5 ซม. ปิดกระแสไฟ

2.5.1.5 การย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R 250

ย้อมเจลด้วย 0.08 % Coomassie brilliant blue R 250 ใน 50 %เมทานอล 7.5% กรดน้ำส้ม โดยแช่เจลประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่จับกับโปรตีนออกด้วย 50 % เมทานอล -7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วย 5%เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม 2-3 ครั้ง ด้วยปริมาตรที่มากเกินพอ

2.5.2การย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสบนแผ่นเจลโพลีอคริลาไมด์

2.5.2.1 การย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ทำตามวิธีของ Upcroft and Done (1974) โดยในระบบการย้อมแอคติวิตี การทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ให้ผลิตภัณฑ์เป็นไนไทรต์ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ sulfanylamide ในสภาวะที่เป็นกรด เกิดการฟอร์มเป็น diazonium ion ซึ่งต่อมาจะสามารถจับกับ naphthol เกิดเป็นบริเวณที่มีสีสามารถมองเห็นได้ สารละลายที่ใช้ในการย้อมแอคติวิตีประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วน คือส่วนที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา (A) และส่วนที่สองคือส่วนที่ใช้หยุดปฏิกิริยาและทำให้เกิดสี (B)

สารละลาย	ส่วนประกอบ
A	K-Phosphate,0.1 M, pH 7.5, 100 ml
	KNO_3, 150 mg
	Ethanol 95%, 2.5 ml
	NADH, 30 mg
	Alcohol dehydrogenase (Yeast enzyme), 100 units
B	Sulfanylamide 1% in HCl 1 N, 50 ml
	N-1-Naphthylethylenediamine.2HCl 0.01% in PO_4 buffer, pH 7.5, 50 ml

2.5.2.2 ขั้นตอนการย้อมแอคติวิตี

นำแผ่นเจลที่ต้องการย้อมมาแช่ในสารละลาย A ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น และนำไปจุ่มลงในสารละลาย B บริเวณที่มีแอค- ติวิตีของเอนไซม์จะเกิดเป็นแถบสีชมพูในเวลารวดเร็ว

2.6 การศึกษาข้อมูลพื้นฐาน และคุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่

2.6.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการรักษาสภาพของเอนไซม์ในตัวอย่างที่ยังไม่ได้สกัดที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ –20 องศา-เซลเซียส

ใบข้าวไร่ที่นำมาศึกษาเป็นพันธุ์กู้เมืองหลวงอายุประมาณ 2 เดือน ซึ่งปลูกในพื้นที่เดียวกัน และได้รับปุ๋ย 4 วันก่อนการเก็บ เมื่อบดใบข้าวโดยใช้ไนโตรเจนเหลวทำให้กรอบก่อนบดแล้วจะได้ใบข้าวเป็นผงเล็กๆ จากนั้นนำมาแบ่งใส่ในหลอดขนาดเล็ก (ประมาณ 0.5 กรัมน้ำหนักสด/หลอด) แยกเก็บที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ –20 องศา-เซลเซียส จากนั้นนำมาหาค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสทุกๆ 3-5 วัน โดยมีจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละอุณหภูมิที่ทดสอบ

2.6.2 การศึกษาผลของ PMSF ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract ที่ได้จากการสกัดใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงด้วย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์ และมี PMSF 0.5 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์เดียวกันที่ไม่มี PMSF โดยนำ crude extract ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทันทีให้เป็นเวลาที่ศูนย์ จากนั้นวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสทุกๆ ครึ่งชั่วโมงเป็นเวลา 7 ชั่วโมง

2.6.3 การศึกษาผลของการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว ในรูปของ dialysate และในรูปที่จับกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัล-เฟตที่ 20-50 % ของความอิ่มตัว มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกนำไปไดอะไลซ์เพื่อ

แยกเอาเกลือออกทันที ส่วนกลุ่มที่สองเก็บเอาไว้ในรูปเดิม นำเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มเก็บไว้บนน้ำแข็งตลอดการทดลอง วัดค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่อายุการเก็บต่างๆ กัน โดยเอนไซม์กลุ่มที่สองจะถูกแบ่งมาไดอะไลซ์เอาเกลือออกก่อนการวัดแอคติวิตี

2.6.4 การศึกษาคุณสมบัติ NAD(P)H–bispecific ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ใช้เอนไซม์ที่ได้มาจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัว และไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้วมาศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา ซึ่งสับสเตรตที่ใช้ศึกษาได้แก่ KNO_3 NADH และ NADPH แบ่งเป็น 2 ชุดการทดลองคือ

<u>ชุดที่ 1</u> ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรดักเทสเมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยศึกษาแอคติวิตีเช่นเดียวกับข้อ 2.1.9 ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรต KNO_3 ในช่วง 0 -10 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของสับสเตรต NADH ในช่วง 0 - 0.4 มิลลิโมลาร์

<u>ชุดที่ 2</u> ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรดักเทสเมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยศึกษาแอคติวิตีเช่นเดียวกับข้อ 2.1.9 แต่เติมเอนไซม์ lactate dehydrogenase 0.25 ไมโครโมลาร์ และไพรูเวท 1 มิลลิโมลาร์ลงในส่วนผสมที่ใช้วัดแอคติวิตีด้วย ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรต KNO_3 ในช่วง 0 -10 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของสับสเตรต NADPH ในช่วง 0 - 0.4 มิลลิโมลาร์

ค่า Km ของสับสเตรต หาได้จาก Lineweaver-Burk double reciprocal plot

2.6.5 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract และ 20-50% ammonium sulphate precipitate

ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ใน crude extract และในส่วนที่ผ่านการตกตะกอน

โปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัวที่ไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้ว วัดแอคติวิตีตามวิธีการในข้อ 2.1.9 โดยปรับค่าพีเอชของ 1 M Tris-HCl ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีให้มีค่าพีเอช 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 10.0,11.0, 12.0 และ 14.0

2.6.6 การศึกษาผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไน-เทรตรีดักเทส

2.6.6.1 ผลการเติม 5 µM FAD, 5 µM molybdenum และ 2.5µM FAD ร่วมกับ 2.5 µM molybdenum ในส่วนผสมที่วัดแอคติวิตี

ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัวและไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้ว โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม FAD และ molybdenum ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลเอนไซม์ลงในส่วนผสมที่ใช้วัดแอคติวิตี ใช้ความเข้มข้นของ FAD 5 ไมโครโมลาร์, molybdenum 5 ไมโครโมลาร์ และ FAD ร่วมกับ molybdenum (1:1) 5 ไมโครโมลาร์

2.6.6.2 ผลของ FAD ต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอน โปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัวและไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้วโดยแบ่งเอนไซม์เป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเติม FAD 5 ไมโครโมลาร์ ลงไปผสมกับเอนไซม์ กลุ่มที่สองไม่เติม FAD นำเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมาวัดแอคติวิตีตามวิธีเดียวกับข้อ 2.1.9 โดยวัดทุกๆสองวันจนหมดแอคติวิตี

2.6.7 การศึกษาผลของ Mg^{2+} ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัวที่ไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้ว โดยเติม $MgCl_2$ ลงในส่วนผสมของสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตี ในระดับความเข้มข้น ต่างๆกัน คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์

2.6.8 การศึกษาผลของ sodium azide (NaN_3) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัวที่ไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้ว โดยเติม sodium azide (NaN_3) ลงในส่วนผสมของสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตี ในระดับความเข้มข้น ต่างๆกัน คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครโมลาร์

2.6.9 การศึกษาผลของ 5′-AMP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัวที่ไดอะไลซ์เอาเกลือออกแล้วโดยเติม 5′-AMP ลงในส่วนผสมของสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตี ในระดับความเข้มข้น ต่างๆ กัน คือ 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง การมี $MgCl_2$ และไม่มี $MgCl_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อยู่ในส่วนผสมของสารละลายสำหรับวัดแอคติวิตี