4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของเกลือต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าว

การศึกษาผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากพันธุ์ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม อายุ 1 เดือน ให้แสงธรรมชาติ และก่อนเก็บตัวอย่าง 4 วัน ให้ 10 mM KNO_3 พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์กู้เมืองหลวง และดอกพยอม ตามลำดับ แต่แอคติวิตีของเอนไซม์จากต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น แสดงว่าเกลือ NaCl สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ ซึ่งให้ผลทำนองเดียวกับการศึกษาของ Ghoulam และคณะ (2002) ที่พบว่าเกลือจะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ sugar beets นอกจากนี้จากการศึกษาผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้น cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) โดยให้เกลือที่ความเข้มข้น 50 mM NaCl ก่อนเป็นเวลา 8 วัน เพื่อเป็นการชักนำให้เกิดการสะสมเกลือ หลังจากนั้นจะเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 100 mM เป็นเวลา 4 วัน พบว่าพืชจะมีการปรับตัวตอบสนองต่อเกลือที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้ดี แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ การดูดซึมและการสลายไนเตรตจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากเกลือจะไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อราก (root membrane) ทำให้ดูดซึมไนเตรตเข้าสู่ไซเลมเพื่อที่จะส่งไปยังใบน้อยลงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสน้อยลงด้วย (Silveira *et al*., 2001)

นอกจากความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกันจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแล้ว ยังพบว่าระยะเวลาของการได้รับเกลือก็มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน ได้มีการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวไร่โดยเขมิกา โขมพัตร (2545) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลา(วัน) ของการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยแอคติวิตีจะเหลือน้อยมากในช่วงเวลา 45-53 วันนับจากวันปลูก ดังนั้นการเก็บตัวอย่างต้นข้าวแล้วนำมาหาค่าแอคติวิตีที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน หลังจากเติมเกลือก็ยิ่งทำให้แอคติวิตีลดลง

4.2 ผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงต้นข้าว

4.2.1 ผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว

การศึกษาผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว 3 สายพันธุ์ คือพันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ซึ่งปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland โดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค และเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับเกลือที่ความเข้มข้นสูงใบจะเหลืองและเหี่ยว โดยเฉพาะข้าวพันธุ์ดอกพยอมจะพบลักษณะเช่นนี้มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทนทานต่อเกลือของข้าวพันธุ์ดอกพยอมน้อยกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ หรืออาจจะเนื่องมาจากลักษณะประจำพันธุ์ คือ มีต้นเล็ก ใบสั้น ทำให้ทนต่อเกลือที่ระดับสูงได้ไม่ดี ลักษณะใบเหลืองและเหี่ยวเกิดจากการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์และอัตราการสังเคราะห์แสงข้าวจะไวต่อเกลือมากในช่วงที่เป็นต้นกล้า (seedling) และช่วงแรกของการพัฒนา (early development stages) (Grattan *et al*., 2002) นอกจากนี้พบว่าปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทนทานต่อเกลือของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ เช่น อัตราการคายน้ำ การเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ และความแตกต่างในการดูดซึมอาหาร พันธุ์ต้านทานจะมีอัตราส่วนของโซเดียม (Na^+) ต่อโปแตสเซียม (K^+) ต่ำ (ดูดซึม K ได้สูงกว่า) ข้าวพันธุ์ต้านทานเกลือจะดูดซึม Na^+ และ Cl^- ได้ลดลงเมื่อเทียบกับพันธุ์ที่ต้านทานต่อเกลือต่ำ การเจริญทางด้านลำต้นอย่างรวดเร็วเป็นการเจือจางเกลือภายในเนื้อเยื่อของข้าวด้วย (Debermann and Fairhurst, 2000) ซึ่งจากการทดลองพบว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีแนวโน้มที่จะมีความต้านทานต่อเกลือได้ดีกว่าข้าวพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากลักษณะการเจริญทางด้านลำต้นดีที่สุด ต้นแข็งแรงที่สุด อย่างไรก็ตาม นอกจากความเข้มข้นของเกลือแล้วยังพบว่าระยะเวลาของการได้รับเกลือก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวด้วย

4.2.2 ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดของต้นและราก

จากการศึกษาผลของเกลือต่อน้ำหนักสดของต้นและรากของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland และเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเกลือมีผลต่อน้ำหนักสดของต้นและราก เนื่องจากเกลือทำให้ต้นกล้าข้าว ความยาวของใบและรากลดลง จึงส่งผลให้น้ำหนักสดของต้นและรากลดลงเช่นกัน สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ghoulam และคณะ (2002) ที่พบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบและราก ของ sugar beet จะลดลงอย่างมากเมื่อได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 200 mM แต่ไม่มีผลต่อจำนวนใบ นอกจากนี้ยังพบว่าความเค็มมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสของ sugar beet “Altissima” ที่ความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 30 mM (Hagege *et al*., 1990) และการศึกษาของ Gouia และคณะ (1994) ในถั่ว

(*Phaseolus vulgaris*) ซึ่งมีความไวต่อความเค็ม ดังนั้นเมื่อให้เกลือ NaCl จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในพืชทนเค็มเช่นฝ้าย (*Gossypium hirsutum*)

ต้นข้าวที่ได้รับเกลือ อาจมีการสะสมของไอออนบางชนิดภายในใบมากกว่าในราก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Na^+ และ Cl^- โดยการสะสมไอออนดังกล่าวมีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก (osmotic adjustment) ภายในเซลล์ และจากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเกลือที่ระดับสูงจะทำลายเนื้อเยื่อเซลล์ของข้าวจนไม่สามารถอยู่รอดได้ เนื่องจากมีการสะสมของพวกไอออนภายในเซลล์ (hyperionic) และมีการผ่านเข้าออกของไอออน (hyperosmotic) มากเกินไป (Glenn *et al*., 1999) เมื่อพิจารณาลักษณะลำต้น พบว่าพันธุ์ข้าวที่มีแนวโน้มทนทานต่อความเค็มได้มากที่สุด คือ ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง รองลงมาคือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และในปัจจุบันนิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ดินส่วนใหญ่เป็นดินเค็ม

4.2.3 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นและราก

เมื่อแยกส่วนต้นและรากของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland และเก็บตัวอย่างวันที่ 5 หลังจากเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าแอคติวิตีจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นในข้าวทุกสายพันธุ์ โดยความเข้มข้นเกลือ 0 และ 25 mM ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีแอคติวิตีสูงสุด ตามด้วยพันธุ์กู้เมืองหลวง แต่พันธุ์ดอกพยอมแอคติวิตีลดลงในทุกความเข้มข้นเกลือ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทนทานต่อเกลือที่ระดับต่ำได้ แต่จะไวต่อเกลือที่ระดับสูงตั้งแต่ 50-100 mM (รูปที่ 13) จากการทดลองของ Ghoulam และคณะ (2002) พบว่าต้น sugar beet เมื่อได้รับเกลือที่ระดับสูงขึ้นแอคติวิตีในใบจะลดลง อีกทั้งยังพบว่าใบอ่อนจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมากกว่าใบแก่ ขณะที่ Gouia และคณะ (1994) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในถั่วมีมากกว่าฝ้าย ซึ่งถั่วเป็นพืชที่ไวต่อเกลือมากกว่าฝ้าย เนื่องจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไม่ไวต่อผลของแรงดันออสโมติก (osmotic effect) ดังนั้นการยับยั้งของเกลืออาจจะเกิดจากการสะสม Na^+ และ Cl^- หรืออาจจะไปจำกัดการใช้ไนเตรตของพืชได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ข้างต้น ที่พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น บ่งชี้ให้เห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสอาจถูกยับยั้งได้หากมีปริมาณไอออนของ NaCl สูงในไซโทพลาสซึม เนื่องจากไปขัดขวางการดูดซึมไนเตรต

จากผลการศึกษา ข้าวพันธุ์ดอกพยอมจะทนทานต่อเกลือน้อยที่สุด และพบแอคติวิตีต่ำสุดทำให้ยากในการติดตามผล ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือพบว่าต้นข้าวมีการเจริญเติบโตต่ำและตายในที่สุด จึงได้ติดตามดูผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัก

เทสในข้าว 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105 โดยเก็บตัวอย่างต้นข้าวในวันที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังจากเติมเกลือ เพื่อเป็นการยืนยันว่าความเค็มมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยพบว่าความเข้มข้นเกลือที่ 0 และ 25 mM มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นข้าวเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 50, 75 และ 100 mM ปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจน แต่ขาวดอกมะลิ 105 มีแนวโน้มแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่ากู้เมืองหลวงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง มีการเจริญเติบโตของลำต้นดีที่สุดแต่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีการดูดซึมไนเตรตไปใช้ในการสังเคราะห์กระอะมิโนต่างๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวอาจมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

สำหรับในรากพบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสน้อยมาก (ไม่แสดงผล) เนื่องมาจากส่วนรากไม่ได้รับแสงจึงไม่มีกิจกรรมการสังคราะห์แสงเหมือนกับส่วนต้น อีกทั้งผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจากส่วนต้นมีการนำไปใช้มากกว่าการส่งมาสะสมในราก ดังนั้นจึงพบระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสต่ำมากในส่วนของราก (เขมิกา โขมพัตร, 2545)

4.2.4 ผลของเกลือต่อปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงต้นข้าว

การศึกษาผลของเกลือต่อปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบของข้าว 3 สายพันธุ์ พบว่ามีรูปแบบการตอบสนองต่อไนเตรตแตกต่างกัน โดยปริมาณไนเตรตจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 16 และรูปที่ 18) จากผลการทดลอง ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณไนเตรตสะสมในใบสูงที่สุด รองลงมาคือพันธุ์กู้เมืองหลวง และดอกพยอม ตามลำดับ สอดคล้องกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเมื่อพืชได้รับเกลือเข้าสู่เซลล์จะมีผลต่อการดูดซึมไนเตรต คือเมื่อเพิ่มระดับของเกลือจะทำให้การดูดซึมไนเตรตและการนำไนเตรตไปใช้ลดลง รวมถึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลงด้วย (Silveira *et al*., 2001)

สำหรับผลของเกลือต่อปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารหลังจากเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าปริมาณไนเตรตที่เหลือในอาหารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ โดยในอาหารที่ใช้เลี้ยงข้าวดอกพยอมมีปริมาณไนเตรตเหลือมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากข้าวดอกพยอมมีความต้านทานต่อเกลือได้น้อย ทำให้ไม่สามารถดูดซึมไนเตรตไปใช้ได้หรือมีการดูดซึมเพียงเล็กน้อยส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงด้วย ส่วนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าปริมาณไนเตรตเหลือน้อยที่สุด (รูปที่ 17) เนื่องจากสามารถดูดไนเตรตไปใช้ได้ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง ข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถดูดซึมไนเตรตไปใช้ได้หมด แต่มากหรือน้อยขึ้น

อยู่กับความสามารถในการต้านทานต่อเกลือของข้าวแต่ละพันธุ์ โดยข้าวพันธุ์ใดต้านทานต่อเกลือได้ดีก็สามารถดูดไนเตรตไปใช้ได้มาก เนื่องจากไม่มีการสะสมของ Na^+ และ Cl^- ภายในเซลล์เท่ากับพันธุ์อ่อนแอ โดยเฉพาะส่วนราก ซึ่งเป็นส่วนที่ดูดซึมไนเตรตแล้วส่งไปยังใบ เมื่อพืชดูดเกลือจากสารละลายธาตุอาหาร เนื้อเยื่อไซเลมของรากจะถูกทำลายส่งผลให้การดูดซึมน้ำและไนเตรตจากรากไปยังใบลดลง (Klobus *et al*., 1988; Gouia *et al*., 1994)

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารสอดคล้องกันอย่างเห็นได้ชัด นั่นคือเมื่อปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบมีน้อย ปริมาณไนเตรตที่เหลือในอาหารก็จะมีมาก ส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแตกต่างกันด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่ต้องชักนำด้วยซับสเตรตคือไนเตรต (substrate-inducible enzyme)

4.3 ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

การเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่สกัดจากต้นข้าวในเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ในเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ -20°C จะช่วยรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้นานกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน เช่นเดียวกับการทดลองของ Solomonson และคณะ (1975) ที่พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์สามารถเก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20°C ได้หลายเดือน ดังนั้นในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสควรจะหาค่าแอคติวิตีอย่างรวดเร็วหลังการสกัด เพื่อป้องกันการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ ดังนั้นในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจึงตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40% เพื่อให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด

4.4 การเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากข้าวโพดฉีดกระตุ้นกระต่ายแทนเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าว เนื่องจากการเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์จากต้นข้าวทำได้ยากและต้องผ่านกระบวนการแยกหลายขั้นตอน เช่น การเตรียมสารสกัดหยาบ การตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 แยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม จากการทำบริสุทธิ์เตรียมเอนไซม์ได้น้อยมาก แอคติวิตีลดลงอย่างรวดเร็วและมีการปนเปื้อนของแถบโปรตีนอื่น ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 660 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ถึงแม้ว่า

แถบโปรตีนดังกล่าวเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีจากการทำ Western blot ได้ก็ตาม แต่พบแถบแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังย้อมด้วยสารละลาย DAB เช่นกัน ซึ่งคาดว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (รูปที่ 25) จึงไม่นำเอนไซม์ดังกล่าวมาฉีดกระตุ้นกระต่ายเพื่อให้สร้างแอนติบอดี แต่มีการรายงานของ Campbell (1999) ว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพดมีไอโซฟอร์ม (isoform) เดียวกันกับข้าวคืออยู่ในรูปของ NADH-NR ซึ่งน่าจะมีระบบการทำงานและลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นในการทดลองจึงใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากข้าวโพดเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

จากผลการทดลอง พบว่ากระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้หลังจากการฉีดเอนไซม์ครั้งที่ 2 แสดงว่าการฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเข้าใต้ผิวหนังร่วมกับการฉีดในผิวหนังใช้ปริมาณแอนติเจนไม่มากก็สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อได้ ซึ่งไม่มีรายงานการฉีดกระต่ายด้วยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในปริมาณต่ำเช่นนี้มาก่อน

4.5 การศึกษา Western blot ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการทำ Western blot โดยใช้สารสกัดจากข้าวโพดและข้าว พบแถบของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ขนาดโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกันทั้งในข้าวและข้าวโพดแตกต่างจากการทำ Ouchterlony double immunodiffusion ที่ไม่พบแถบการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงดังรูปที่ 26 และ 27 จากผลการทดลองแสดงว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพด สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวซึ่งเป็นพืชที่ต่างสกุลกัน แต่แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากข้าวโพดมีความจำเพาะกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 น้อย จึงไม่สามารถเห็นแถบการตกตะกอนในการทำ Ouchterlony double immunodiffusion แตกต่างจากการทำ Western blot ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจจับสูงกว่าจึงสามารถตรวจพบได้

จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทั้งในข้าวและข้าวโพดอาจจะมีลักษณะและลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันทำให้แอนตอบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดสามารถจดจำลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวได้ เช่นเดียวกับ Campbell (1999) ที่พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพดมีไอโซฟอร์ม (isoform) เดียวกันกับข้าวที่อยู่ในรูปของ NADH-NR ซึ่งน่าจะมีระบบการทำงานที่คล้ายคลึงกัน

4.6 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยวิธี Dot blot

เมื่อนำสารสกัดต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันมาทำ Dot blot กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพด เพื่อศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดต้นข้าว โดยบ่มเปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มีแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพด หลังจากบ่มแผ่นไนโทรเซลลูโลสทั้ง 2 ชุด ด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเปอร์ออกซิเดส แล้วย้อมด้วยสารละลาย DAB จากผลการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์มีความเข้มของสีจุดมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่บ่มด้วยแอนติบอดีทั้งที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน ซึ่งสังเกตได้ชัดเจนเมื่อปริมาณโปรตีนของสารสกัดเป็น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อจุด (รูปที่ 28) แต่จากผลการทดลองไม่สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของเกลือที่ความเข้มข้นใดส่งผลยับยั้งหรือกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว เนื่องจากในสารสกัดหยาบมีการปนเปื้อนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูง โดยพบแถบแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแผ่นเจลหลังย้อมด้วยสารละลาย DAB มากกว่า 4 แถบ แสดงดังรูปที่ 25 ดังนั้นในการทดลองจึงควรใช้เอนไซม์ชนิดอื่นที่ยึดติดกับแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายแทนเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เช่น เอนไซม์อัลคาไลฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) เพื่อหลีกเลี่ยงผลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ปนเปื้อนในสารสกัด

4.7 การสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว

หลังจากสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าการตกตะกอนสารสกัดหยาบด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 40% จากนั้นนำส่วนตะกอนโปรตีนที่ละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์สกัดผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 เพื่อแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและสีของคลอโรฟิลล์ ทำให้แอคติวิตีรวมของเอนไซม์ลดลงจากเดิม เนื่องจากช่วงที่สารสกัดผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 อาจมี Mg^{2+} ซึ่งเป็นไอออนที่ยับยั้งเอนไซม์ตกค้างภายในคอลัมน์ โดยจะส่งผลต่อการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แต่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใกล้เคียงกับสารสกัดที่ไม่ผ่านการตกตะกอน

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 มาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบโปรตีน 1 พีค ถูกล้างออกมาจากคอลัมน์ก่อนการชะด้วยสารละลายเกลือ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินและไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อชะคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือแบบต่อเนื่อง 0-0.6 M NaCl พบโปรตีนถูกชะออกมาเพียงพีคเดียวซึ่งตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.18 เท่าเมื่อ

เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ แสดงว่าการแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel สามารถแยกโปรตีนที่ปนเปื้อนได้ ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เมื่อเก็บสารละลายหลอดที่มีแอคติวิตีหลังจากผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ใน 30% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้นานกว่า 3 เดือน แต่แอคติวิตีจะลดลงอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้

4.8 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม

หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียมแล้วย้อมโปรตีนเปรียบเทียบด้วยสีคูมาซีบลู เมื่อตัดแยกแถบโปรตีนในเจลนำไปบดแล้วหาแอคติวิตีและทำ nondenaturing PAGE พบแถบโปรตีนแถบที่ 8 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นแถบโปรตีนหลักและสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแถบเจลดังกล่าว (รูปที่ 24 แถวที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่ายกับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 480 กิโลดาลตัน จากการทำ Western blot แสดงดังรูปที่ 26 แต่จากการทดลองพบแถบโปรตีนจาง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 660 กิโลดาลตัน ย้อมติดสีคูมาซีบลู ซึ่งตรงกับตำแหน่งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบ P2 (รูปที่ 24 แถวที่ 10 และรูปที่ 25)

จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืชชั้นสูงที่พบว่ามีขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 110-115 กิโลดาลตัน (Campbell, 1999) แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 อาจประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยย่อย เช่นเดียวกับการทดลองของ Lopes และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายผมนาง (*Gracilaria tenuistipitata*) มีขนาดโมเลกุล 440 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 110 กิโลดาลตัน

สำหรับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 660 กิโลดาลตัน สามารถตรวจพบปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์กับแถบโปรตีนดังกล่าว จากการทำ Western blot แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เนื่องจากตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบ P2 หลังการย้อมแอคติวิตีในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลด้วยสารละลาย DAB (รูปที่ 25) ขณะที่แถบโปรตีนขนาด 480 กิโลดาลตัน ไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากการย้อมแผ่นเจล จากผลการทำ Western blot คาดว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 660 กิโลดาลตัน เป็นแถบโปรตีนที่เป็นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ถูกขนถ่ายลงแผ่นไนโทรเซลลูโลสก่อนการบ่มด้วยแอนติบอดีและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับเอนไซม์เปอร์

ออกซิเดส ดังนั้นเมื่อย้อมด้วยสารละลาย DAB แถบโปรตีนขนาดมากกว่า 660 กิโลดาลตัน จึงปรากฏแถบปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้ (รูปที่ 25 และรูปที่ 26)