3. ผลการทดลอง

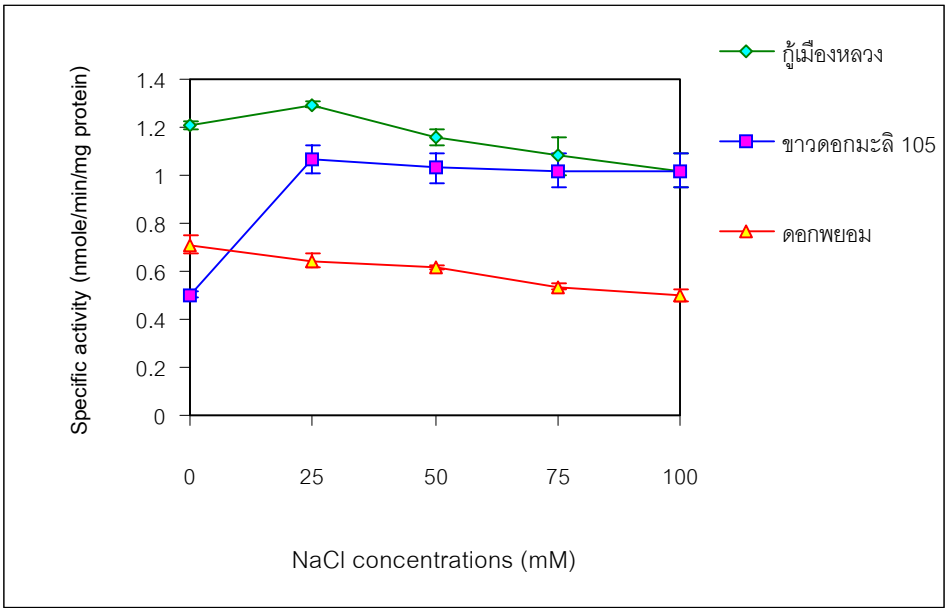
3.1 ผลของเกลือต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าว

จากการศึกษาผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบต้นข้าว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม อายุ 1 เดือนครึ่งที่ปลูกในดินที่ได้รับแสงธรรมชาติและได้รับ 10 mM KNO_3 ก่อนเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 4 วัน หลังจากทำการสกัดเพื่อหาแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่าบัฟเฟอร์สกัด 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 0.5 mM PMSF, 1 mM EDTA และ 1 mM DTT และเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแตกต่างกันในข้าวแต่ละสายพันธุ์ แสดงในรูปที่ 9 โดยพบว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105 มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงขึ้นเมื่อได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 25 mM แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์จะลดลง โดยที่แอคติวิตีของข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงลดลงมากกว่าข้าวขาวดอกมะลิ ในขณะที่แอคติวิตีของข้าวพันธุ์ดอกพยอมลดต่ำลงเมื่อได้รับเกลือที่ทุกระดับความเข้มข้น

3.2 ผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว และแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงต้นข้าว

3.2.1 ผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว

จากการศึกษาผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ด้วยระบบไฮโดรโพนิค ในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่า โดยเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM เมื่อต้นข้าวอายุ 1 เดือน เก็บตัวอย่างต้นข้าวที่เวลา 10.00-12.00 น. หลังจากเติมเกลือ 5 วัน จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตด้วยการวัดความยาวของใบและรากของต้นข้าวแต่ละสายพันธุ์ จากการสังเกตลักษณะภายนอกพบว่า ข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์มีการตอบสนองต่อความเค็มแตกต่างกัน ดังรูปที่ 10A ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบความสูงของข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม โดยข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีความสูงมากที่สุด รวมทั้งมีจำนวนใบเหี่ยวกับใบเหลืองน้อยกว่าพันธุ์อื่น รองลงมาคือข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ส่วนข้าวพันธุ์ดอกพยอมลักษณะต้นแคระแกร็นและมีใบมีสีเหลืองมากที่สุด ดังนั้นข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงจึงมีแนวโน้มที่ทนต่อความเค็มได้ดีกว่าข้าวสายพันธุ์อื่น



รูปที่ 9 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ที่ระยะเวลาการปลูก 1 เดือน และได้รับ 10 mM KNO_3 ก่อนเก็บตัวอย่าง 4 วัน

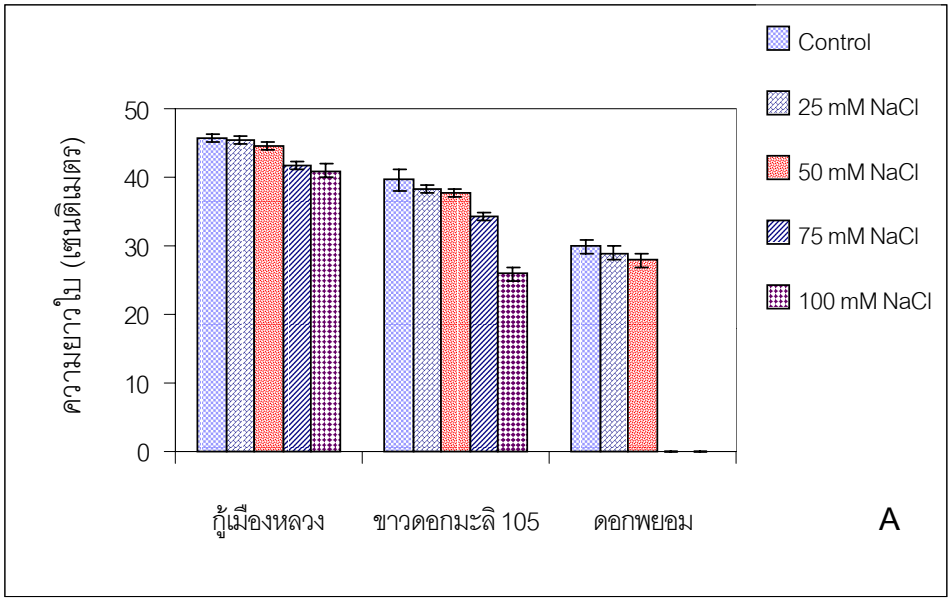
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

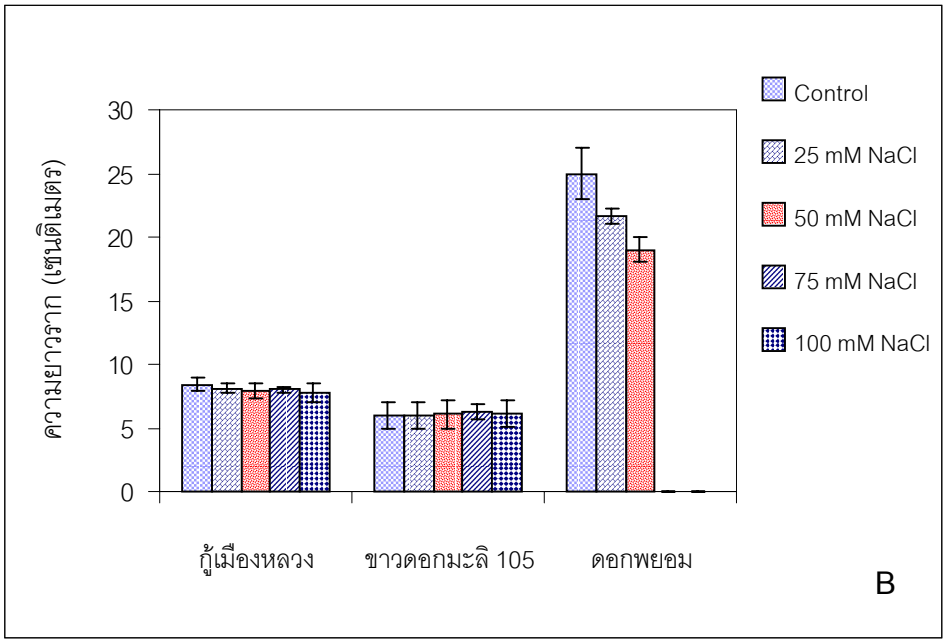
เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของต้นข้าวที่ได้รับเกลือที่ความเข้มข้นต่างกันพบว่าต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีขนาดเล็กลงรวมทั้งมีจำนวนของใบเหี่ยวและใบ สีเหลืองเพิ่มขึ้น แต่ความยาวของใบจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงดังรูป 10B นอกจากนี้ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไม่สามารถอยู่รอดได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 75 และ 100 mM และเมื่อเปรียบเทียบความยาวของใบจากข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีความยาวของใบมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ดอกพยอม ตามลำดับ (รูปที่ 11 A) สำหรับความยาวราก ข้าวพันธุ์ดอกพยอมมีความยาวรากมากสุด รองลงมาคือข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงและพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ (รูปที่ 11B) จากการศึกษาน้ำหนักสดของต้นและรากของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า น้ำหนักสดของต้นข้าวลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น โดยข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีน้ำหนักสดของต้นสูงสุด รองลงมาคือข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ตามลำดับ (รูปที่ 12A) สำหรับน้ำหนักสดของราก พบว่าข้าวพันธุ์ดอกพยอมมีน้ำหนักสดของรากมากที่สุด ซึ่งสูงกว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง และขาวดอกมะลิ 105 ในทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ความเข้มข้น 75 และ 100 mM NaCl ไม่สามารถเก็บผลการทดลองได้ เนื่องจากต้นข้าวพันธุ์ดอกพยอมไม่สามารถอยู่รอดได้ที่ความเข้มข้นเกลือดังกล่าว (รูปที่ 12B)

รูปที่ 10 ความสูงของต้นข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ อายุ 1 เดือน ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland โดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค (เก็บตัวอย่างวันที่ 5 หลังจากเติมเกลือ) ความสูงของต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ได้รับเกลือ 50 mM (A) และความสูงของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 mM (B) จากภาพเป็นตัวแทนจากต้นข้าวทั้งหมด 20 ต้น/ถัง

3.2.2 ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นและราก

เมื่อแยกส่วนต้นและรากออกจากกันนำไปสกัดแล้วหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นในข้าวทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 13) โดยที่ความเข้มข้นของเกลือ 0 และ 25 mM แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีค่าใกล้เคียงกันและแนวโน้มแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ 25 mM NaCl ซึ่งข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กู้เมืองหลวง และพันธุ์ดอกพยอมมีค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 2.45$\pm$0.06, 1.60$\pm$0.02 และ 0.60$\pm$0.02 nmole/min/mg protein ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเป็น 50, 75 และ 100 mM พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีแอคติวิตีสูงที่สุด รองลงมาคือพันธุ์กู้เมืองหลวงและพันธุ์ดอกพยอม ตามลำดับ ขณะที่ในข้าวพันธุ์ดอกพยอมที่ความเข้มข้นเกลือ 75 และ 100 mM ไม่สามารถอยู่รอดได้ทำให้ไม่สามารถหาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ สำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ในรากข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าน้อยมากจึงไม่แสดงผลการทดลอง

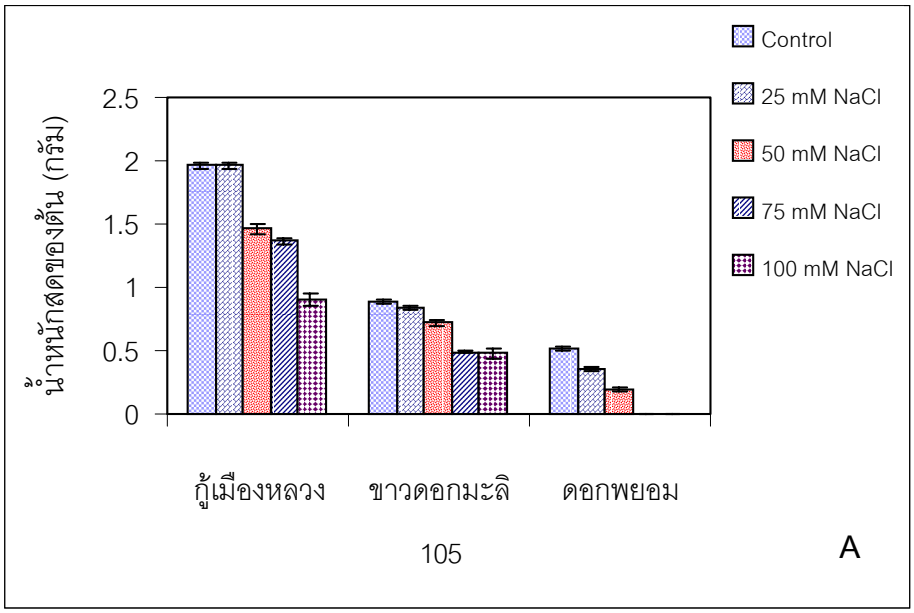


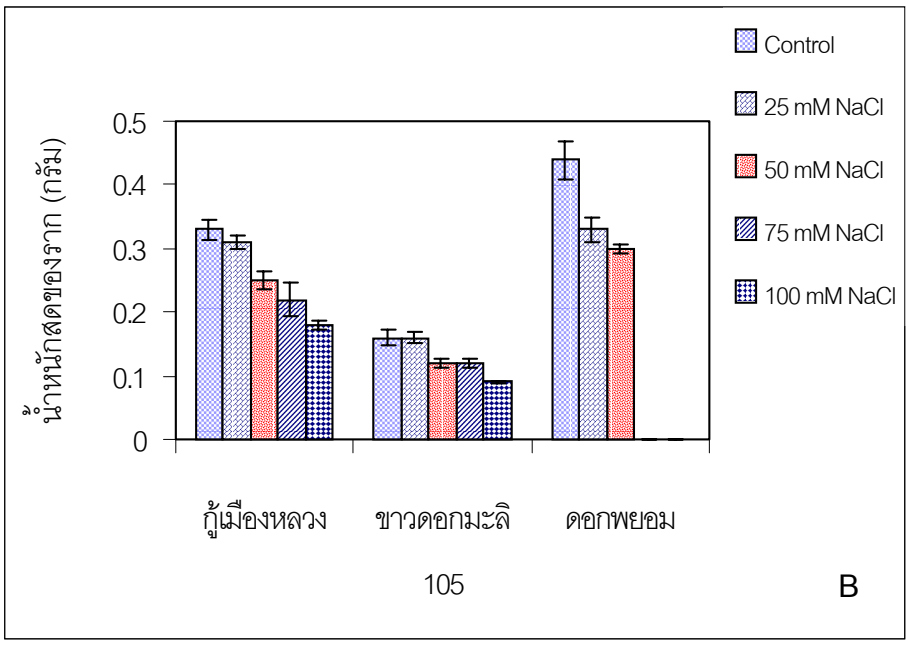


รูปที่ 11 ผลของการเพิ่มเกลือในสารละลายธาตุอาหารต่อความยาวของใบ (A) และความยาวราก (B) ของต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 ดอกพยอม ที่ได้รับเกลือเป็นเวลา 5 วัน

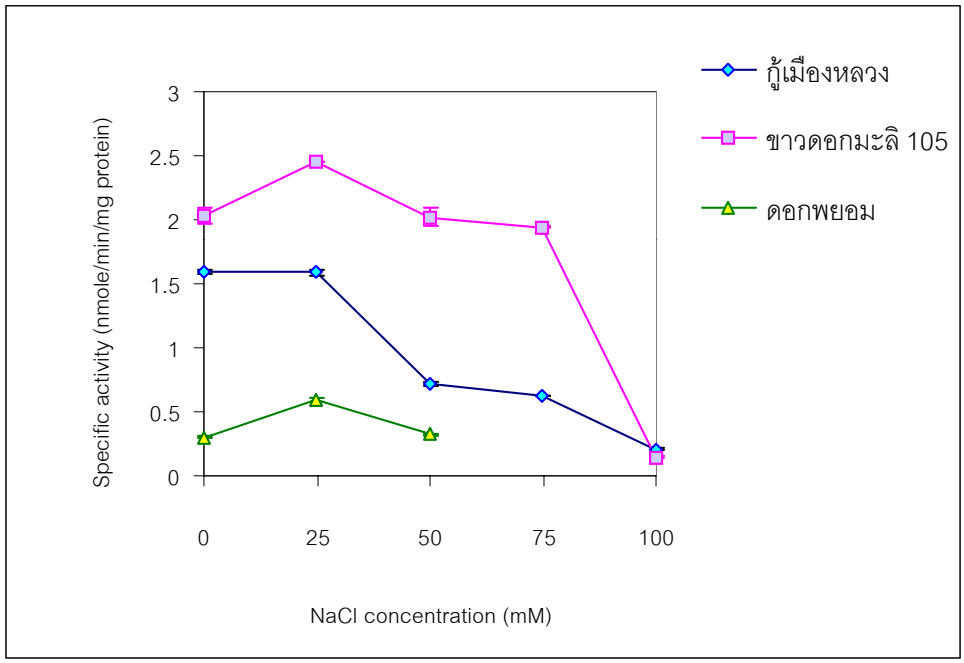
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

(ที่ 75 และ 100 mM ข้าวดอกพยอมไม่สามารถอยู่รอดได้)





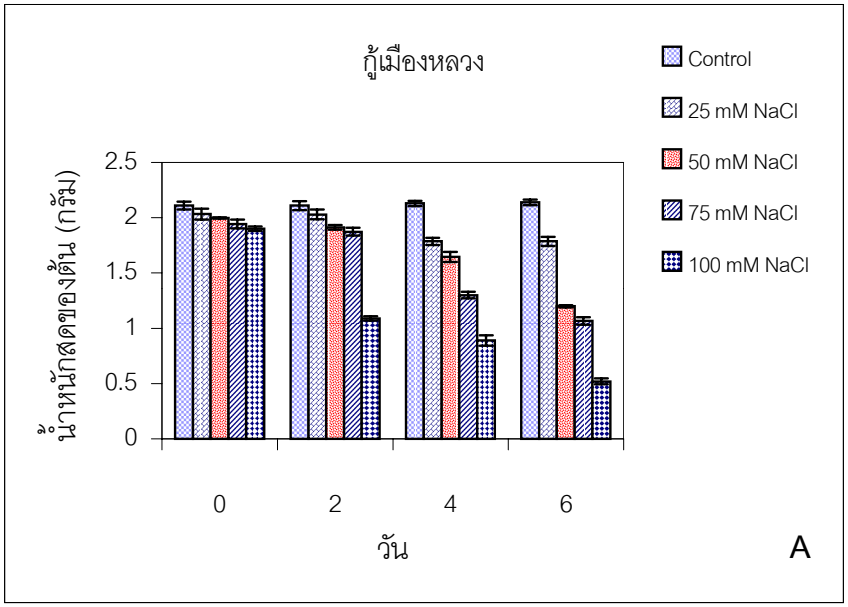
รูปที่ 12 ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดของต้น (A)และราก (B) ในข้าว 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

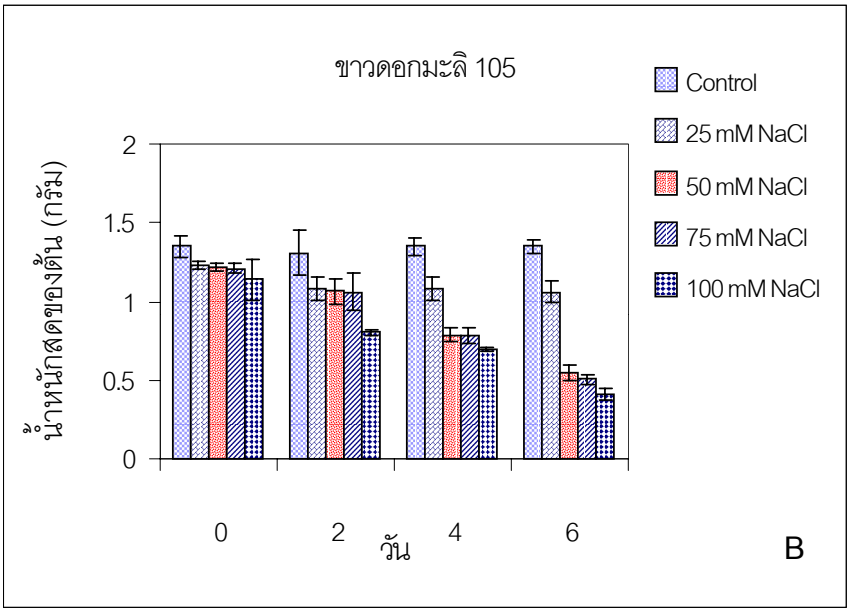


รูปที่ 13 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร Hoagland ความเข้มข้น ½ เท่า และเก็บตัวอย่างต้นข้าววันที่ 5 หลังจากเติมเกลือที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM (ที่ 75 และ 100 mM ข้าวดอกพยอมไม่สามารถอยู่รอดได้)
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

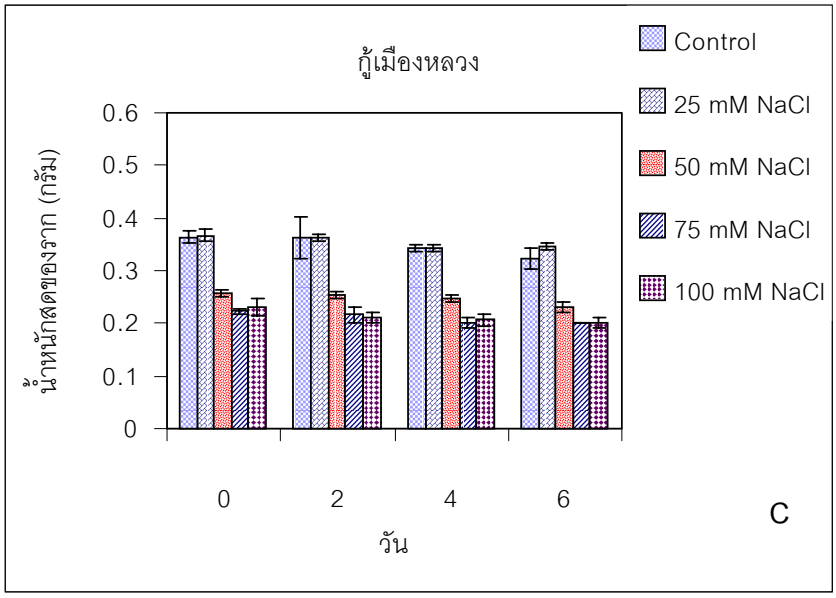
เพื่อเป็นการยืนยันว่าความเค็มมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวจริง จึงได้ทำการทดลองปลูกข้าว 2 สายพันธุ์ที่ทนทานต่อเกลือได้ คือ ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105 ในระบบไฮโดรโพนิค เมื่อครบ 1 เดือน เติมเกลือที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM เก็บตัวอย่างต้นข้าวหลังการเติมเกลือวันที่ 0, 2, 4 และ 6 ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างต้นข้าวในช่วงเวลา 10.00-12.00 น. แยกส่วนต้นและรากออกจากกัน ชั่งน้ำหนักของต้นข้าวและราก พบว่า น้ำหนักสด (กรัม) ของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดระหว่าง 2 สายพันธุ์ พบว่าต้นข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีน้ำหนักสดสูงกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (รูปที่ 14A, 14B) เช่นเดียวกับน้ำหนักสดของราก (กรัม) จากต้นข้าว 2 สายพันธุ์ ซึ่งน้ำหนักสดของรากจะลดลงที่ความเข้มข้นของเกลือสูง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของรากระหว่าง 2 สายพันธุ์ พบว่าน้ำหนักสดของรากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงจะสูงกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (รูปที่ 14C, 14D)

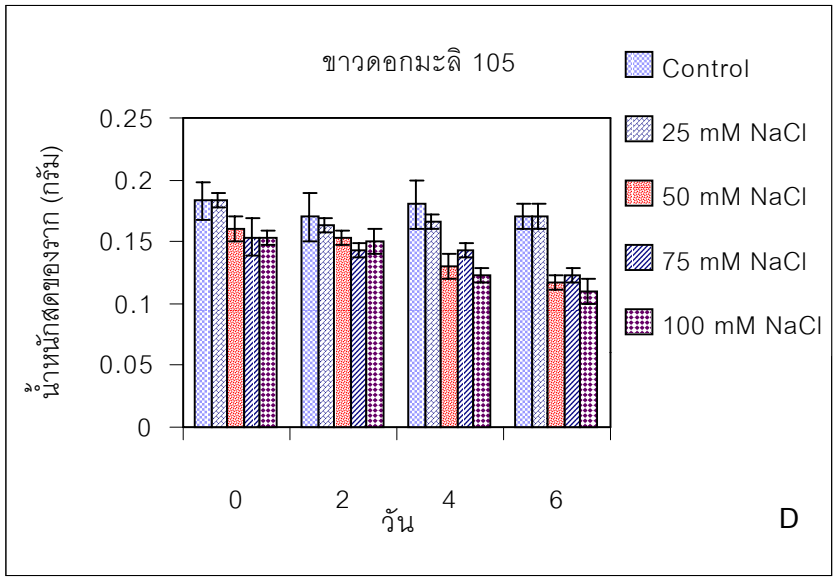
การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าว 3 สายพันธุ์หลังจากได้รับเกลือแล้ว 5 วัน พบว่าเกลือส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง (รูปที่ 13) จึงได้ติดตามดูผลของเกลือต่อแอคติวิตีของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105 ในระยะแรก ดังวิธีการข้อ 2.3.1 แต่เก็บตัวอย่างต้นข้าวในวันที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังจากเติมเกลือ โดยแยกส่วนของต้นข้าวและรากออกจากกัน นำไปชั่งน้ำหนักสด (กรัม) และหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเฉพาะในส่วนต้นเท่านั้นเนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนราก จากการทดลองพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ ลดลงเมื่อได้รับเกลือที่ความเข้มข้น 50 mM, 75 mM และ 100 mM ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถแบ่งกลุ่มของ specific activity ของเอนไซม์ ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 25 mM ส่วนอีกกลุ่มคือ กลุ่มที่มีแอคติวิตีลดลงได้แก่ กลุ่มที่ได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 50 mM 75 mM และ 100 mM แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 0 และ 25 mM ไม่มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ และเมื่อเปรียบเทียบข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105 มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสค่อนข้างใกล้เคียงกันโดยเฉพาะในวันแรก (วันที่ 0) และหลังจากเติมเกลือในอาหารที่ความเข้มข้น 0 และ 25 mM พบว่าหลังจากเติมเกลือในวันที่ 4 แอคติวิตีของเอนไซม์ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สูงสุดและลดลงในวันที่ 6 อย่างไรก็ตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ยังคงสูงกว่าพันธุ์กู้เมืองหลวง (รูปที่ 15)



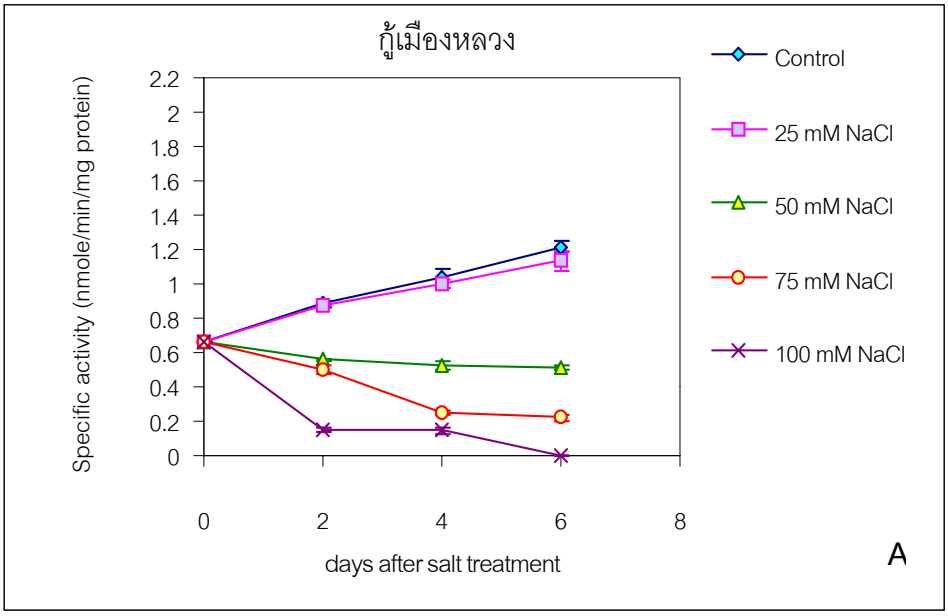


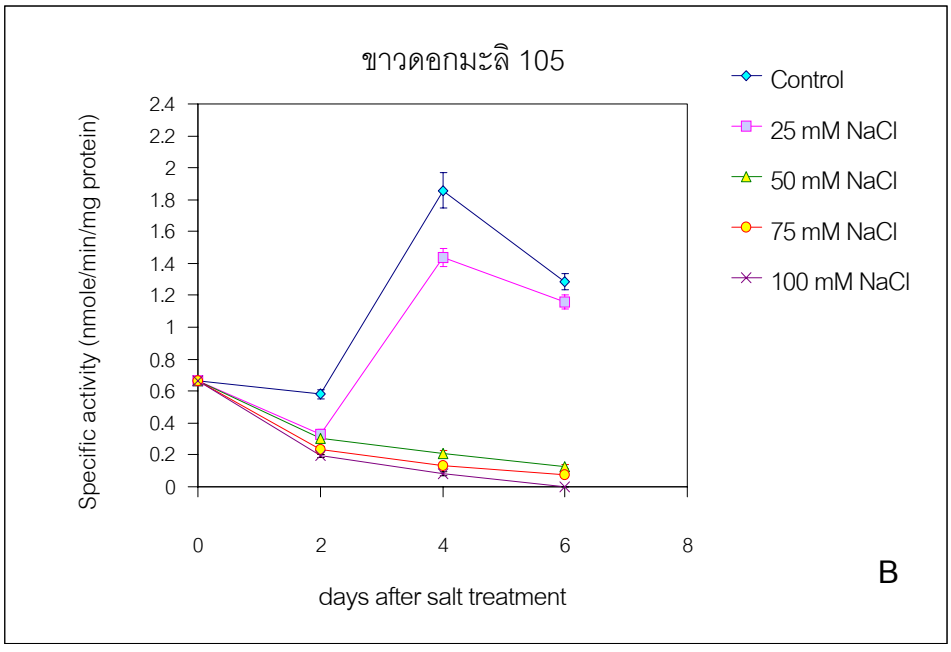
รูปที่ 14 ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดของต้นข้าวและรากในพันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105
A, C : ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดและรากในข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง ตามลำดับ
B, D : ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดและรากในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.


กู้เมืองหลวง
Control
25 mM NaCl
50 mM NaCl
75 mM NaCl
100 mM NaCl
น้ำหนักสดของราก (กรัม)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2
4
6
วัน
C


ขาวดอกมะลิ 105
Control
25 mM NaCl
50 mM NaCl
75 mM NaCl
100 mM NaCl
น้ำหนักสดของราก (กรัม)
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
2
4
6
วัน
D

รูปที่ 14 (ต่อ)





รูปที่ 15 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้รับเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ในข้าว 2 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B)
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

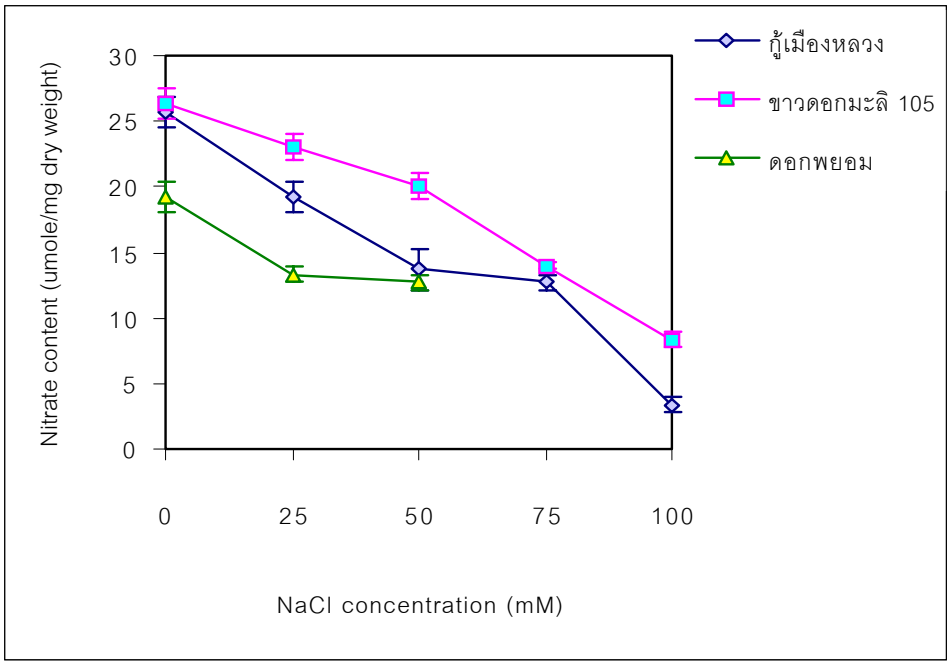
3.2.3 ผลของเกลือต่อปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงต้นข้าว

จากการเปรียบเทียบปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบของต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น และปริมาณไนเตรตสะสมในใบสูงที่สุดในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รองลงมาคือพันธุ์กู้เมืองหลวง และพันธุ์ดอกพยอม ตามลำดับ (รูปที่ 16) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับค่าแอคติวิตีเพราะแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 13, 15) ส่วนการหาปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหาร พบว่ามีปริมาณไนเตรตเหลือมากขึ้นในสารละลายธาตุอาหารเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโดยปริมาณไนเตรตในอาหารที่ใช้เลี้ยงข้าวพันธุ์ดอกพยอมเหลือมากที่สุด รองลงมาคือข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง และขาวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ (รูปที่ 17) สอดคล้องกับปริมาณไนเตรตในใบข้าว (รูปที่ 18) โดยพบว่าปริมาณไนเตรตในสารละลายอาหารลดลงขณะที่ปริมาณไนเตรตในใบเพิ่มขึ้นและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณไนเตรตในใบมากที่สุดและมีปริมาณไนเตรตที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยที่สุด ตามด้วยกู้เมืองหลวง และดอกพยอม ตามลำดับ จากปริมาณของไนเตรตที่แสดงในรูปที่ 16 และรูปที่ 17 บ่งชี้ว่า ปริมาณของเกลือในอาหารมีอิทธิพลต่อการดูดซึมไนเตรตของต้นข้าวขณะเจริญเติบโต

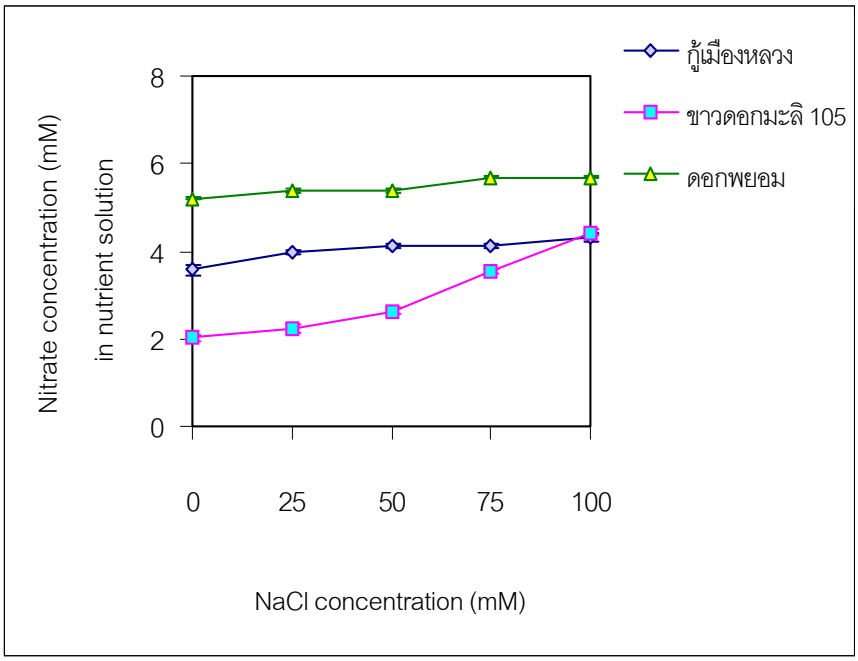
จากการหาปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบข้าว 2 สายพันธุ์คือพันธุ์กู้เมืองหลวงและพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เลี้ยงในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland,s solution โดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค เมื่อครบ 1 เดือนจะเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM เก็บตัวอย่างเวลา 10.00-12.00 น. ในวันที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังจากเติมเกลือ เมื่อนำมาหาปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบพบว่า ปริมาณไนเตรตในใบของข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณไนเตรตสะสมในใบสูงกว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงอย่างเห็นได้ชัด และพบว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 50 mM ข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณไนเตรตลดลงเช่นเดียวกัน (รูปที่ 18) สอดคล้องกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ดังรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบสูงขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณไนเตรต แต่จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ

เมื่อหาปริมาณไนเตรตที่เหลืออยู่ในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณไนเตรตที่เหลืออยู่ในอาหารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นใน

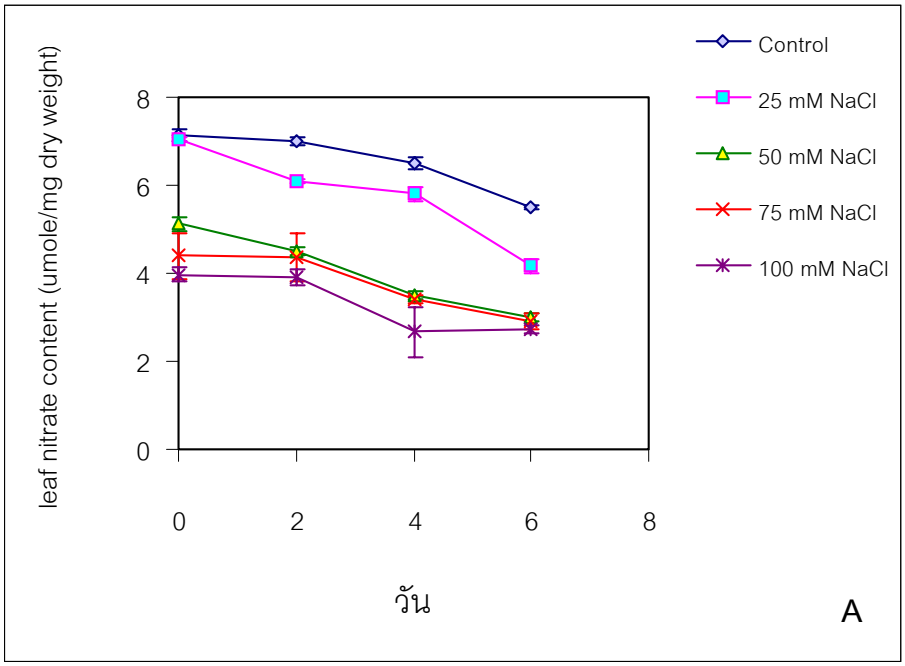
ข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเฉพาะในข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารสูงกว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (รูปที่ 19) แต่ปริมาณไนเตรตที่เหลือในอาหารซึ่งเติมเกลือความเข้มข้นต่างๆสำหรับใช้เลี้ยงข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของเกลือ 100 mM พบว่ามีปริมาณไนเตรตเหลืออยู่มากที่สุด

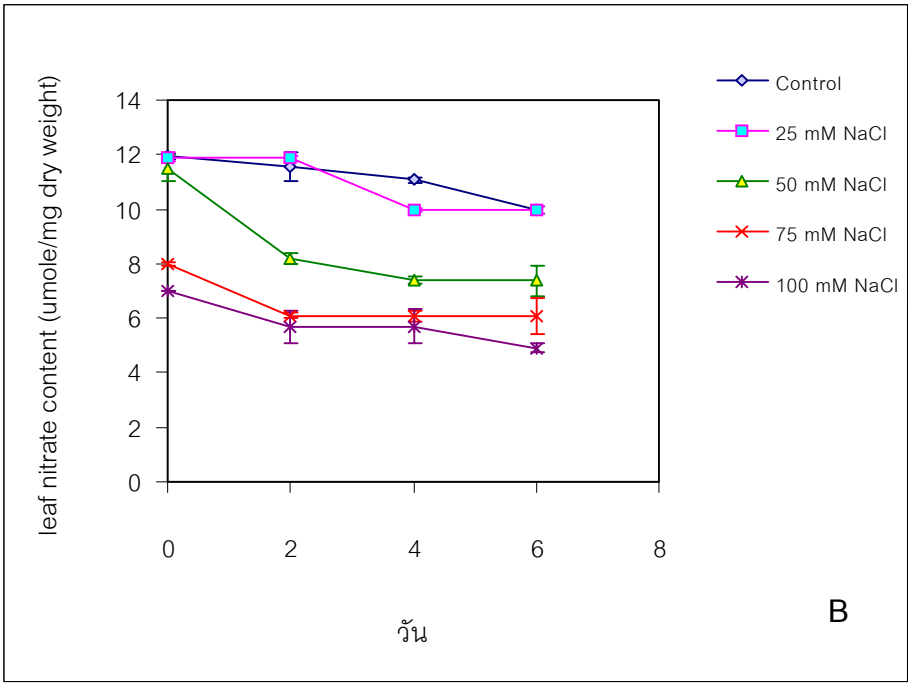


รูปที่ 16 ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบข้าว 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Hoagland ความเข้มข้น ½ เท่าซึ่งเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง $\pm$ S.D.



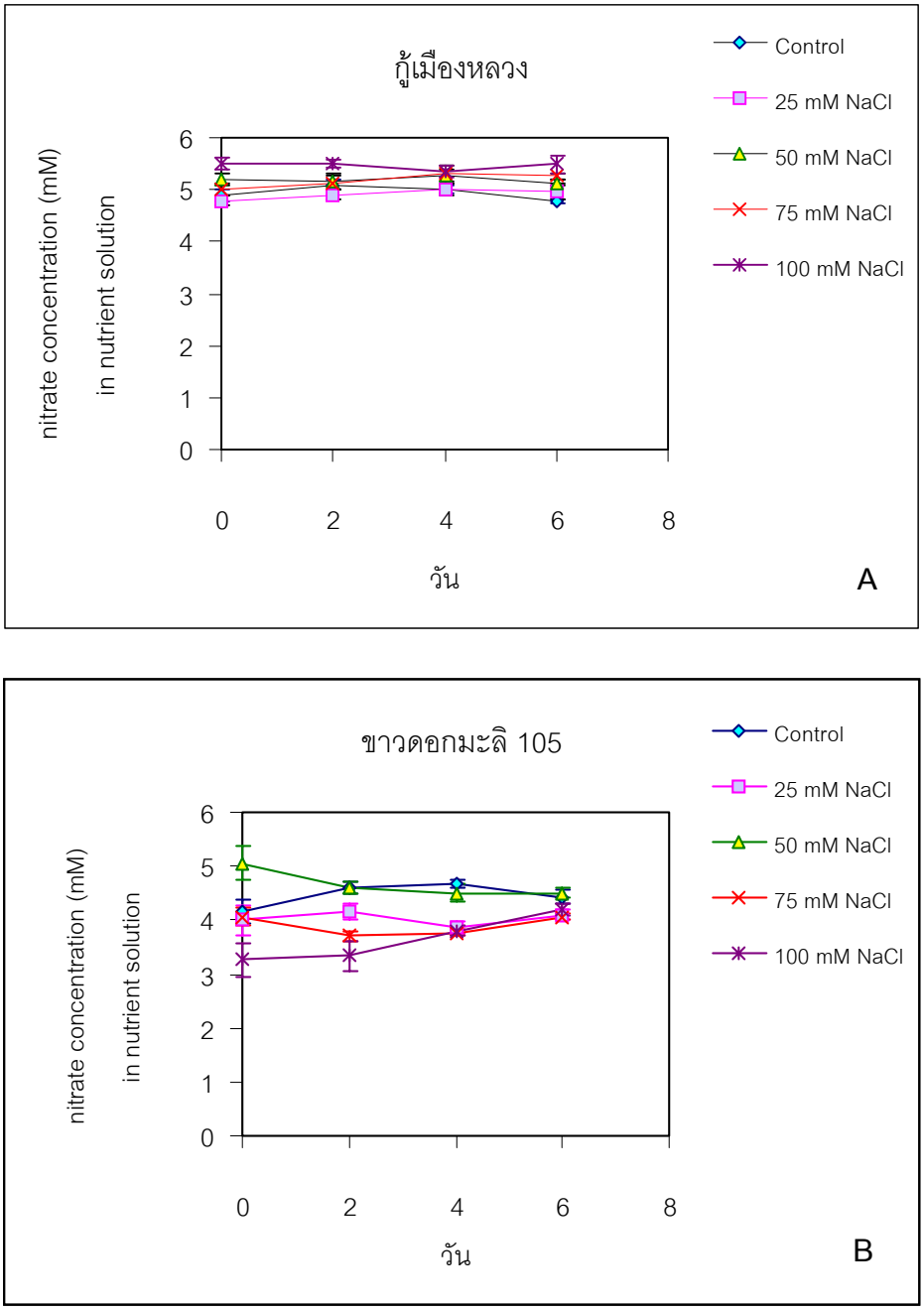
รูปที่ 17 ปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นคือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.





รูปที่ 18 ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบของข้าว 2 สายพันธุ์คือ กู้เมืองหลวง (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Hoagland ความเข้มข้น ½ เท่า ซึ่งเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM NaCl

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง ± S.D.



รูปที่ 19 ปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland และเติมเกลือ NaCl

ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

3.3 ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสารสกัดต้นข้าวในสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C เป็นเวลา 7 และ 30 วันแล้วนำมาหาแอคติวิตี พบว่าในวันที่ 0 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C มีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่อุณหภูมิ -20°C มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าที่อุณหภูมิ 4°C เล็กน้อย (รูปที่ 20A) และแอคติวิตีของเอนไซม์ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C จะลดลงในวันที่ 7 โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4°C ลดลงอย่างรวดเร็วและมากกว่าเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (รูปที่ 20A และ 20B) เมื่อครบ 1 เดือน แอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4°C (รูปที่ 20C) จากผลการทดลองพบว่าแอคติวิตีจะสูงที่สุดเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ในเกลือแอมโมเนียมที่ความอิ่มตัว 40% แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ -20°C สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 4°C

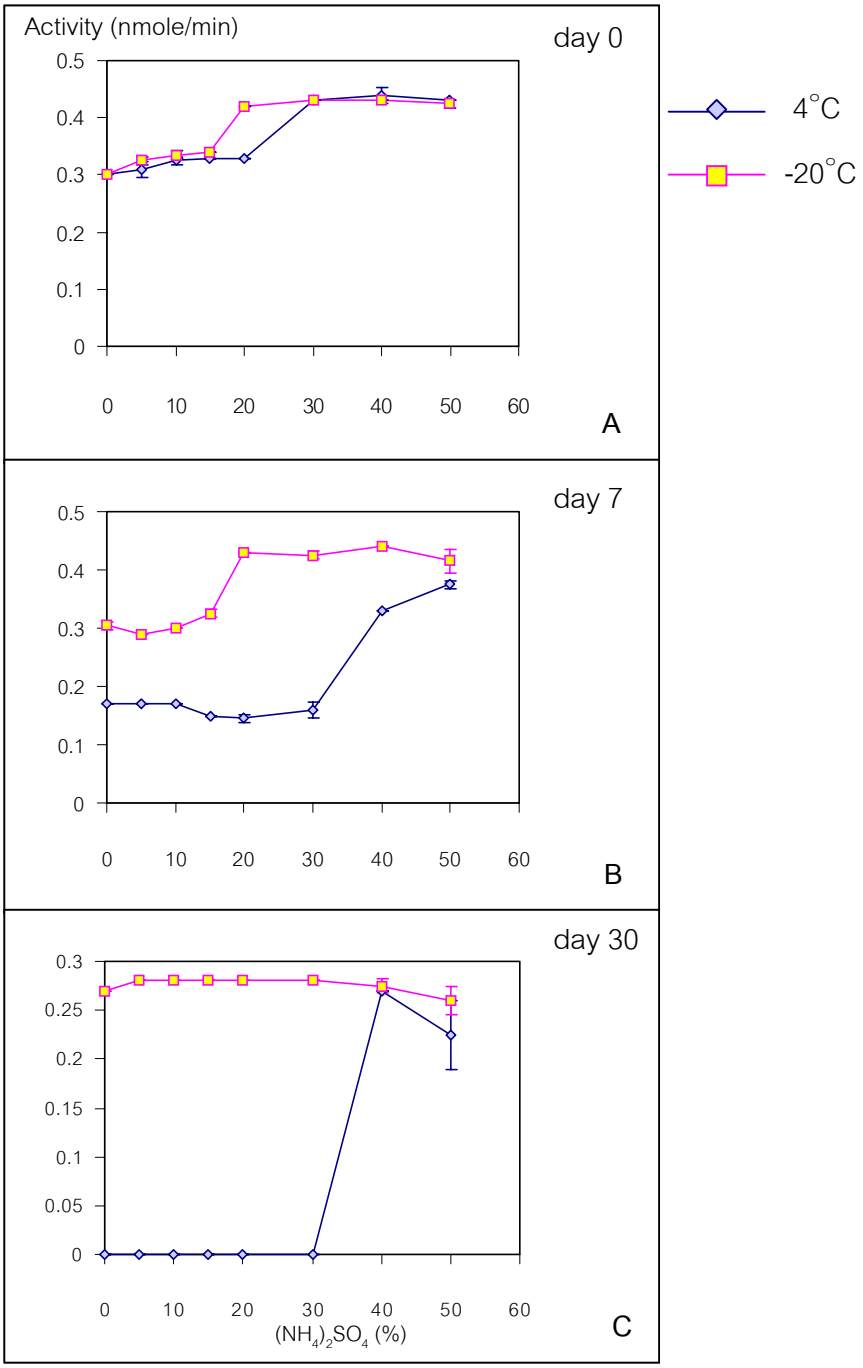
3.4 การสกัดและทำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้บริสุทธิ์

จากการสกัดต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด 100 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์สกัด 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF และ 1 mM DTT ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบ หลังจากหาโปรตีนและแอคติวิตี พบว่ามีปริมาณโปรตีน 1,667.5 มิลลิกรัม (5.75 mg/ml) มีแอคติวิตีทั้งหมด 183.40 nmole/min และมี specific activity เท่ากับ 0.110 nmole/min/mg protein ดังตารางที่ 1 และเมื่อนำสารสกัดหยาบไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 40% และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที 50 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์สกัดและนำมาหาปริมาณโปรตีนได้ 227.4 มิลลิกรัม (37.9 mg/ml) แอคติวิตีทั้งหมด 2.05 nmole/min และมีค่า specific activity เท่ากับ 0.009 nmole/min/mg protein ซึ่งมีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบเริ่มต้น (ดังตารางที่ 1)

นำสารละลายที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ขนาด 2.3 x 15 เซนติเมตร แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์สกัด เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่า A280 ปรากฏว่ามี 2 พีค แต่ตรวจพบเอนไซม์เฉพาะในพีค S1 เท่านั้น แสดงดังรูปที่

21 เมื่อหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยการวัดค่า A540 ปรากฏว่ามีสารละลายที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงที่สุดคือหลอดที่ 23-33 ในพีค S1 (รูปที่ 21) เมื่อรวมสารละลายหลอดที่ 23-33 (ปริมาตร 11 มิลลิลิตร) พบว่ามีปริมาณโปรตีน 105.60 มิลลิกรัม แอคติวิตีทั้งหมด 18.69 nmole/min และมี specific activity เท่ากับ 0.177 nmole/min/mg protein

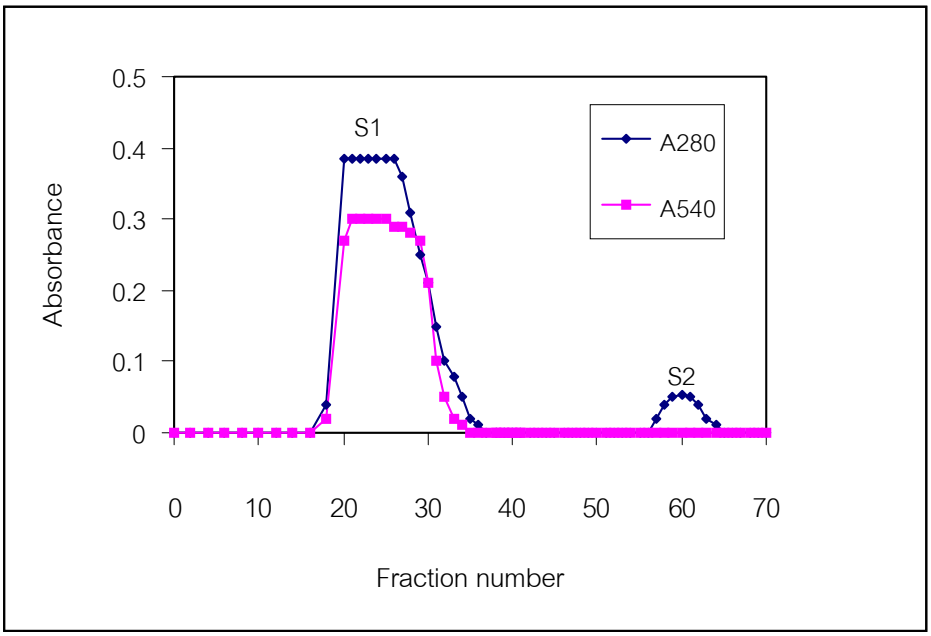
เมื่อนำสารละลายรวมหลอดที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 มาแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ขนาด 2.2 × 9 เซนติเมตร ชะด้วยบัฟเฟอร์สกัดแล้วเก็บสารละลายหลอดละ 5 มิลลิลิตร หลังจากวัดค่า A280 พบว่ามีโปรตีน 1 พีค (D1) ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อนการชะด้วย NaCl ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินและไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แสดงดังรูปที่ 22 หลังจากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.6 M เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 ปรากฏว่าโปรตีนถูกชะออกมาเพียงพีคเดียวคือพีค D2 โดยถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.26 M จากนั้นตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่ามีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 5.18 เท่า (ตารางที่ 1) และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแล้วย้อมด้วยสีคูมาซีบลู พบแบบแผนของโปรตีนบนโพลีอะคริลาไมด์เจล แสดงดังรูปที่ 23



รูปที่ 20 การเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสารสกัดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไว้ในเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C และหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในวันที่ 0 (A) วันที่ 7 (B) และ

วันที่ 30 (C)

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง $\pm$ S.D.

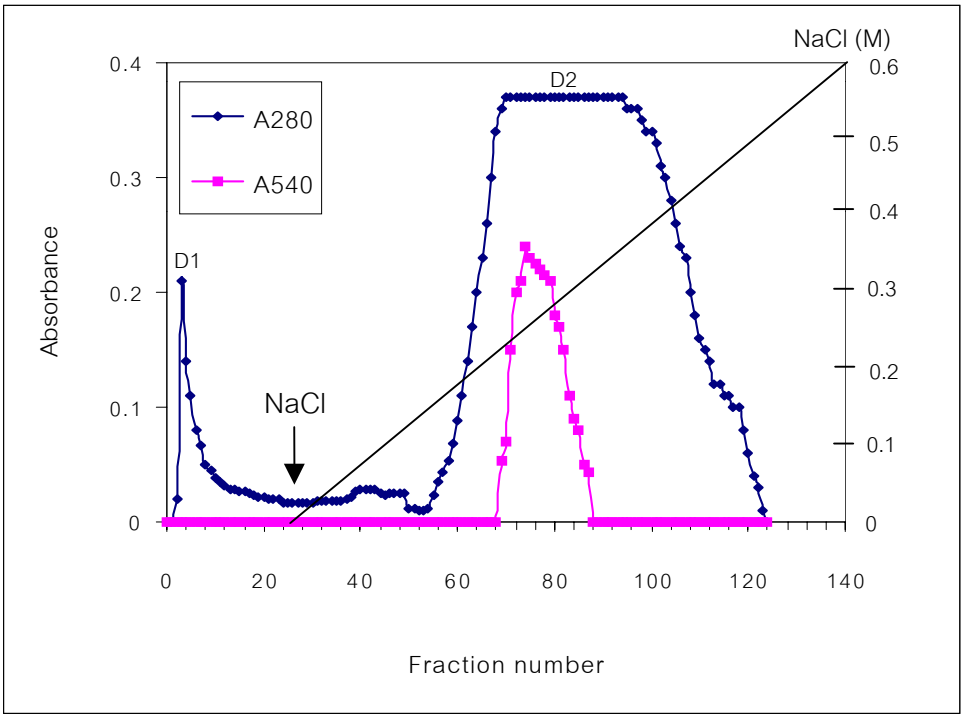


รูปที่ 21 การแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจากสารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นข้าวด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 และค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไน เตรตรีดักเทส (A540)

แยกสารสกัดหยาบของต้นข้าวที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัว 40% ปริมาตร 6 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 227.4 มิลลิกรัม) ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 (2.3 x 15 เซนติเมตร) ชะคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105

Purification step	Total protein (mg)	Yield (%)	Total activity (nmole/min)	Specific activity (nmole/min/mg protein)	Purification (fold)
Shoot extract	1,667.50	100	183.40	0.110	1
$(NH_4)_2SO_4$ precipitation (40%)	227.40	1.12	2.05	0.009	0.08
Sephadex G-25	105.60	10.24	18.69	0.177	4.92
DEAE-Sephacel	4.54	1.4	2.60	0.570	5.18



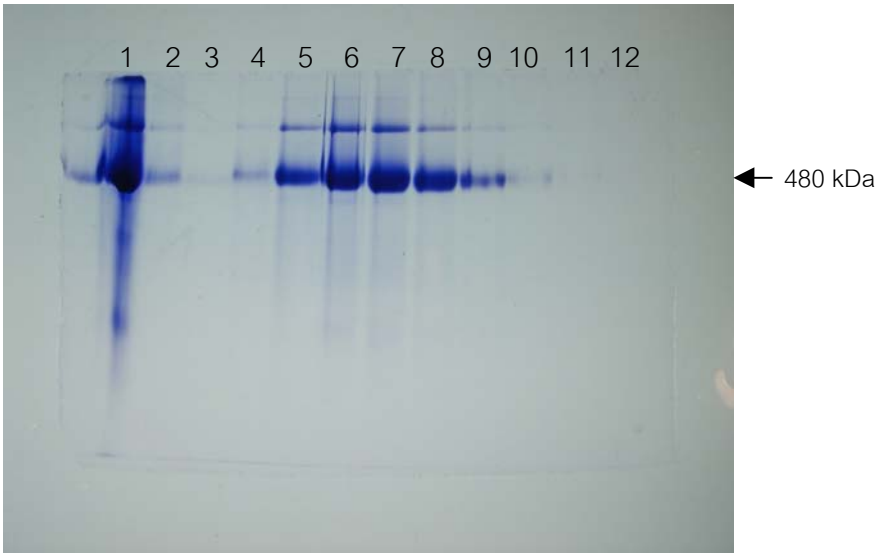
รูปที่ 22 การแยกเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel แยกเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสารละลายรวมหลอดที่ 23-33 ของคอลัมน์ Sephadex G-25 ปริมาตร 11 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 105.60 มิลลิกรัม) โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.2 x 9 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF เก็บสารละลายหลอดละ 5 มิลลิลิตร จน A280 เป็นศูนย์ แล้วชะด้วย NaCl ที่มีความเข้มข้นต่อเนื่องจาก 0-0.6 M ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร

3.5 การแยกเอนไซม์โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)

หลังจากแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel นำมาหาแอคติวิตีและทำ nondenaturing PAGE พบว่าหลอดที่ 74 หลังชะด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.6 M มีค่าแอคติวิตีสูงที่สุด (รูปที่ 22 และ 23) จึงนำมาเติม glycerol เพื่อรักษาแอคตวิตีของเอนไซม์ไว้ จากนั้นนำไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบเตรียม หลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซิสตัดแผ่นเจลตามแนวขวางจากขอบบนของเจลกว้างแถบละประมาณ 0.3 เซนติเมตร บดแถบเจลแต่ละแถบแยกกัน เติมบัฟเฟอร์แล้วปั่นแยกส่วนใสเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์บน nondenaturing PAGE หลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแล้วย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบลู พบแถบของโปรตีนหลังการตัดเจลตรงกับแถบเจลแถบที่ 8 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน แสดงดังรูปที่ 24 แถวที่ 10 ซึ่งเป็นแถบโปรตีนหลักและแถบโปรตีนจางๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 660 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับตำแหน่งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแถบ P2 (รูปที่ 25) สอดคล้องกับการตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในแถบเจลที่ผ่านการบดให้ละเอียดแล้วปรับ pH ให้เป็นกลางเพื่อหาแอคติวิตี (รูปที่ 24)

3.6 การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase)

เมื่อนำสารสกัดจากต้นข้าวโพดและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หลังจากทำ nondenaturing PAGE นำแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลมาย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสารละลาย DAB เพื่อหาตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบแถบแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากกว่า 4 แถบในสารสกัดจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ขณะที่สารสกัดจากต้นข้าวโพดมีแถบแอคติวิตีที่บางมาก (รูปที่ 25 ชุด A) เมื่อนำแผ่นเจลที่ผ่านการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมาย้อมทับด้วยสีคูมาซีบลู พบแถบโปรตีนจำนวนมากรวมทั้งแถบโปรตีนขนาด 480 กิโลดาลตัน ที่ไม่ปรากฏแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แสดงดังรูปที่ 25 ชุด B

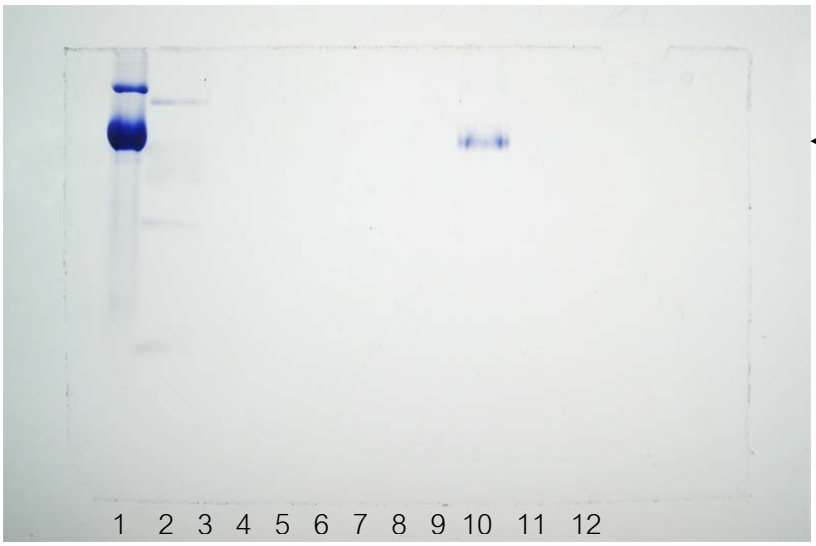


รูปที่ 23 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (หลังจากชะด้วย 0-0.6 M NaCl)

แถวที่ 1 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ Sephadex G-25

แถวที่ 2 สารละลายพีค D1

แถวที่ 3-12 สารละลายพีค D2 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

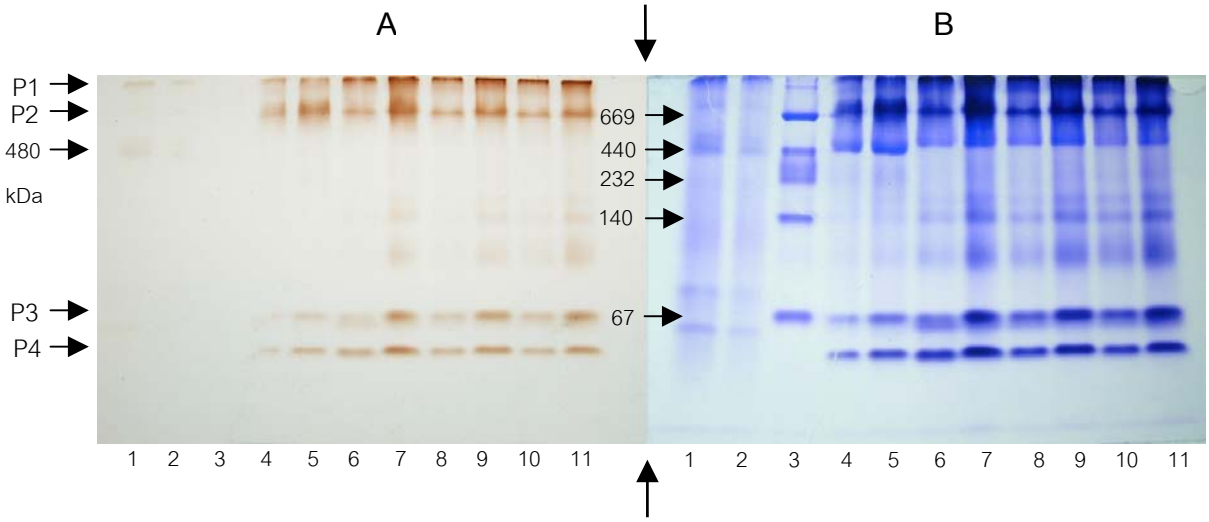


รูปที่ 24 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (จากการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel) ที่ได้จากการตัดเจล

แถวที่ 1 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แถวที่ 2 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 3-12 สารละลายจากการตัดเจลแถบที่ 1-10



รูปที่ 25 แบบแผนโปรตีนใน nondenaturing PAGE โดยการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (A) และย้อมทับด้วยสีคูมาซีบลู (B)

แถวที่ 1 สารสกัดหยาบจากข้าวโพด

แถวที่ 2 สารสกัดหยาบจากข้าวโพด

แถวที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน (kDa)

แถวที่ 4 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (control)

แถวที่ 5 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (control)

แถวที่ 6 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (25 mM NaCl)

แถวที่ 7 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (25 mM NaCl)

แถวที่ 8 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (50 mM NaCl)

แถวที่ 9 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (50 mM NaCl)

แถวที่ 10 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (75 mM NaCl)

แถวที่ 11 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (75 mM NaCl)

แถวที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 ปริมาณโปรตีนแถวละ 20 ไมโครกรัม

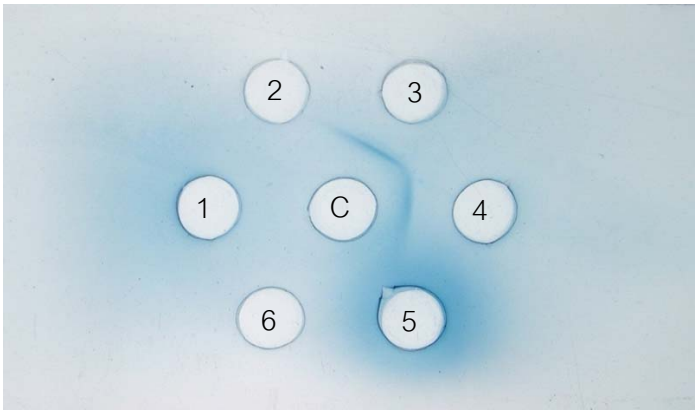
แถวที่ 1, 5, 7, 9 และ 11 ปริมาณโปรตีนแถวละ 40 ไมโครกรัม

3.7 การเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของต้นกล้าข้าวโพดจากบริษัท Sigma โดยฉีดครั้งละ 25 ไมโครกรัมในผิวหนังกระต่าย 3-4 จุด และใต้ผิวหนัง 2-3 จุด พบว่าหลังการทำ Ouchterlony double immunodiffusion กระต่ายสามารถสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ได้ โดยพบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์กับสารสกัดจากต้นกล้าข้าวโพด จากการทดลองกระต่ายเริ่มสังเคราะห์แอนติบอดีหลังการฉีดเอนไซม์บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 หรือหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งแรก 2 สัปดาห์ แต่จากการทดลองไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับซีรัมกระต่ายก่อนและหลังการฉีดแอนติเจนครั้งแรก รวมทั้งโปรตีน BSA เช่นเดียวกับสารสกัดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 26

3.8 การทำ Western blot ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

หลังจากแยกสารตัวอย่างด้วย nondenaturing PAGE แล้วขนถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส เมื่อนำมาทำ Western blot โดยบ่มแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วยซีรัมกระต่ายหลังการฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพดครั้งที่ 3 เพื่อตรวจจับแถบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดตัวอย่างบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส พบว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่ายสามารถทำปฏิกิริยากับแถบโปรตีนในสารสกัดต้นข้าวโพดได้ ซึ่งเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดต้นข้าวโพดมีขนาดโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับการตรวจพบแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันในสารสกัดต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพดได้เช่นกัน (รูปที่ 27) แตกต่างจากการทำ Ouchterlony double immunodiffusion ที่ไม่พบแถบการตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากต้นกล้าข้าวโพดในซีรัมกระต่าย

C สารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นกล้าข้าวโพด

1 ซีรัมก่อนฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์

2 ซีรัมหลังฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ ครั้งที่ 1

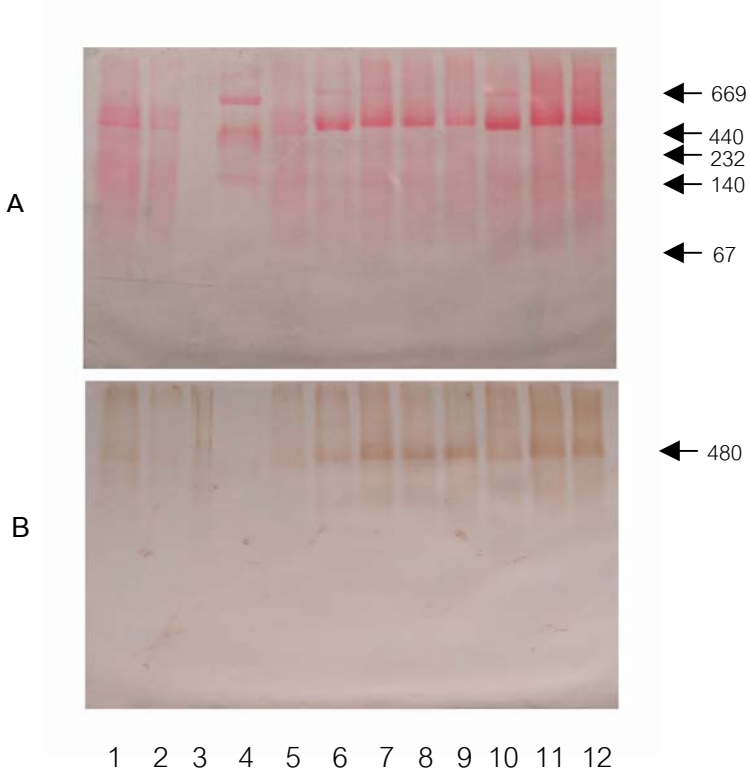
3 ซีรัมหลังฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ ครั้งที่ 2

4 ซีรัมหลังฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ ครั้งที่ 3

5 สารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105

6 Bovine serum albumine

ปริมาณโปรตีนหลุมละ 150 ไมโครกรัม



รูปที่ 27 การทำ Western blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมสี Ponceau S (A) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพด (B) ของสารสกัดจากต้นข้าวและข้าวโพด

แถวที่ 1 สารสกัดหยาบจากข้าวโพด
แถวที่ 2 สารสกัดหยาบจากข้าวโพด (13 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากข้าวโพด
แถวที่ 4 โปรตีนมาตรฐาน (kDa)
แถวที่ 5 สารสกัดหยาบจากข้าวโพด
แถวที่ 6 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (control)
แถวที่ 7 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (25 mM NaCl)
แถวที่ 8 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (50 mM NaCl)
แถวที่ 9 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (75 mM NaCl)
แถวที่ 10 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (control)
แถวที่ 11 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (25 mM NaCl)
แถวที่ 12 สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (50 mM NaCl)

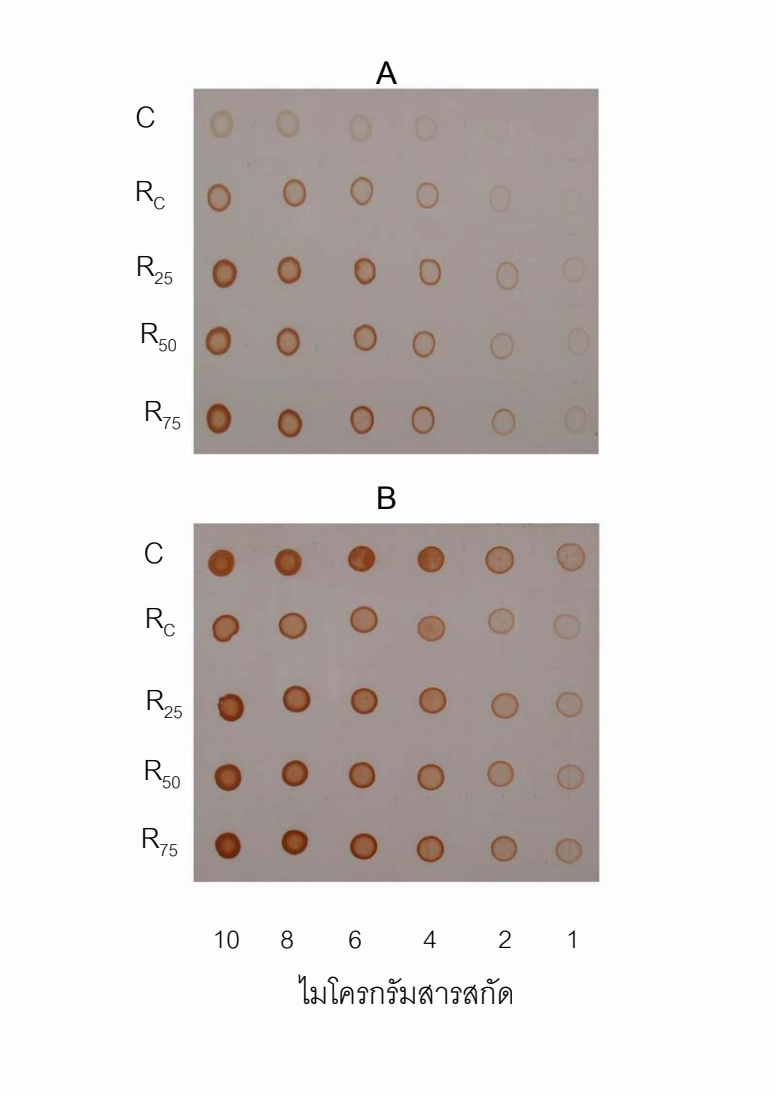
แถวที่ 5, 6, 7, 8 และ 9 ใช้ปริมาณโปรตีนหลุมละ 20 ไมโครกรัม

แถวที่ 1, 10, 11 และ 12 ใช้ปริมาณโปรตีนหลุมละ 40 ไมโครกรัม

3.9 การทำ Dot blot ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพดมาทำ Dot blot สำหรับศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับเกลือความเข้มข้นต่างๆ โดยนำแผ่นไนโทรเซลลูโลสที่ผ่านการหยดสารสกัดข้าวโพดและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกัน (10, 8, 6, 4, 2 และ 1 ไมโครกรัม) มาบ่มเปรียบเทียบระหว่างมีและไม่มีแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพด หลังจากนั้นบ่มแผ่นไนโทรเซลลูโลสทั้ง 2 ชุด ด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเปอร์ออกซิเดส แล้วย้อมด้วยสารละลาย DAB จากการทดลองพบปฏิกิริยาการจับของแอนติบอดีกับสารสกัดตัวอย่างข้าวโพดอย่างชัดเจนในชุดการทดลองที่บ่มด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่าย (รูปที่ 28 ชุด B แถว C) แตกต่างจากชุดการทดลองที่ไม่บ่มด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ซึ่งไม่พบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แสดงดังรูปที่ 28 ชุด A แถว C

สำหรับสารสกัดต้นกล้าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันพบความแตกต่างเพียงเล็กน้อยทั้งชุดการทดลองที่บ่มและไม่บ่มด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์บริสุทธิ์ในซีรัมกระต่าย โดยพบว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยแอนติบอดีมีความเข้มของสีจุดมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่บ่มด้วยแอนติบอดีทั้งที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน ซึ่งสังเกตได้ชัดเจนเมื่อปริมาณโปรตีนของสารสกัดเป็น 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อจุด แสดงดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 การทำ Dot blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (A) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพด (B)

แถว C สารสกัดหยาบจากข้าวโพด

แถว R_C สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (control)

แถว R_{25} สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (25 mM NaCl)

แถว R_{50} สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (50 mM NaCl)

แถว R_{75} สารสกัดหยาบจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 (75 mM NaCl)

ปริมาณโปรตีนเป็น 10, 8, 6, 4, 2 และ 1 ไมโครกรัม ตามลำดับ