2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

เมล็ดพันธุ์ข้าว

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา คือ ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จ.พัทลุง

ถังพลาสติกขนาด 2.5 ลิตร และขนาด 20 ลิตร

กระถาง

โฟม

ดินลำดวน

เสียม

กระติกไนโตรเจนเหลว

กระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง เพศผู้ (สายพันธุ์ New Zealand) น้ำหนักประมาณ 4 กิโลกรัม อายุ 10 เดือน ซึ่งเลี้ยงไว้ในหน่วยสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และให้อาหารปกติ

สารเคมี

สารเคมีชนิดวิเคราะห์ ที่ใช้ในการทดลองซื้อจากบริษัท ดังนี้

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	Lab-scan
Acrylamide	Sigma
Ammonium dihydrogen orthophosphate	BDH
Ammonium persulphate	Merck
Ammonium sulphate	Merck
Anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate	Sigma
Bisacrylamide (N, N′-methylene diacrylamide)	Fluka
Boric acid	Hopkins & Williams
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol blue	Merck
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka
Copper sulphate	Ajax chemicals
DEAE-Sephacel	Sigma
Deoxycholate Sodium salt	Fluka
3,3′-Diaminobenzidine	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid	Fluka
Folin-Ciocalteu's-phenol reagent	Merck
Freund's complete adjuvant	Sigma
Freund's incomplete adjuvant	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycine	Fluka
Hydrochroric acid	Merck
Iron (II) sulphate	Merck
Magnesium sulphate	Fluka
β-Mercaptoethanol	Merck

สารเคมีที่ใช้	บริษัทผู้ผลิต
Methanol	Lab-scan
N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride	Sigma
Nicotinamide adenine dinucleotide	Sigma
Nitrate reductase from corn seedling	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluoride	BDH
Potassium nitrate	Carlo Erba
Potassium sodium tartrate	Fluka
Salicylic acid	BDH
Sephadex G-25	Pharmacia
Sodium chloride	Lab-scan
Sodium dodecyl sulphate	Riedel-de Haen
Sodium hydroxide	BDH
Sodium molybdate	Merck
Sulfanilamide	Sigma
Sulfuric acid	Merck
N,N,N′, N′-Tetramethylethylenediamine	Fluka
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Sigma
Zinc sulphate	Hopkins & Williams

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	PG5002-S	Mettler
เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	GT410	Ohaus
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-S	Mettler
Centrifuge	5804 R	Eppendorf
Centrifuge	Avanti J-30 I	Beckman
Centrifuge	J-21	Beckman
Fraction collector	2110	BIO-RAD
Fluorescence light (day light)	FL 36W/T8/D	Toshiba
Magnetic Stirrer	MS101	Gem
Peristaltic pump	MP-3N	Eyela
pH meter	240	Corning
Polytron homogenizer	PT 10-35	Kinematica
Power Supply	AE-8130	ATTO
Slab gel electrophoresis apparatus	AE-6400	ATTO
Timer	TB179	National
Ultra-Low Freezer (-80°C)	TTU3710	TEFCOLD A/S
UV-visible spectrophotometer	8453	Hewlet Packard
Vortex	K-550-GE	Scientific Industries

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวและการปลูก

นำเมล็ดพันธุ์ข้าว ได้แก่ พันธุ์กู้เมืองหลวง พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ดอกพยอม ที่เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกไม่ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละสายพันธุ์ มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยน้ำยาไฮเตอร์ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วแช่เมล็ดในน้ำกลั่น 1 คืน แบ่งเมล็ดข้าวมาเพาะให้งอกบนกระดาษนุ่มที่ชุ่มด้วยน้ำกลั่น ตั้งไว้ในที่มืด เติมน้ำกลั่นให้กระดาษชุ่มน้ำอยู่เสมอประมาณ 4 วัน ต้นกล้าข้าวจะงอกได้ความสูงประมาณ 2-4 เซนติเมตร จึงนำไปปลูก

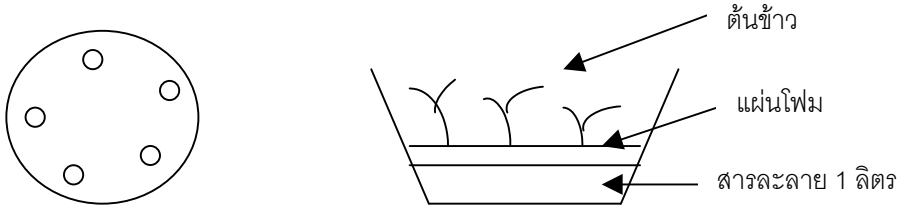
2.1.1 การปลูกข้าวในดิน

เตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวตามหัวข้อ 2.1 หลังจากแช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่น 1 คืน นำเมล็ดพันธุ์ข้าวหว่านลงในดินซึ่งบรรจุอยู่ในกระถางโดยให้แสงธรรมชาติและรดน้ำทุกวัน และได้รับไนเตรตในรูปของสารละลายเกลือ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 10 mM (กระถางละ 300 ml) ก่อนเก็บตัวอย่าง 4 วัน ดังรูปที่ 7

รูปที่ 7 ต้นกล้าข้าวที่ปลูกในดินที่บรรจุอยู่ในกระถางและได้รับแสงธรรมชาติ

2.1.2 การปลูกต้นกล้าข้าวโดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค

นำต้นกล้าข้าวที่เพาะให้งอกจากข้อ 2.1 มาปลูกโดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค (รูปที่ 8) ในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950) (ดังตารางที่ 2 ในภาคผนวก) ความเข้มข้น 1/2 เท่า โดยใส่สารละลายลงในถังพลาสติก ถังละ 1 ลิตร แล้วใช้โฟมที่เจาะเป็นรูยึดต้นกล้าข้าวตรงรูที่เจาะบนแผ่นโฟม (ปลูกต้นกล้าข้าวถังละ 20 ต้น) วางให้ลอยอยู่เหนือสารละลาย ดังรูป



แผ่นโฟมที่เจาะรู ถัง

ให้ต้นข้าวได้รับแสงประมาณ 6,000 ลักซ์หรือ 270 μmole/m^2/s เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ ปรับปริมาตรสารละลายด้วยการเติมน้ำกลั่น และปรับระดับ pH ในสารละลายทุก 1-2 วัน โดยการเติม HCl หรือ NaOH เพื่อรักษาระดับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.5 $\pm$ 0.3 เมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 1 เดือน จึงเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 25 mM, 50 mM, 75 mM และ 100 mM เก็บตัวอย่างสำหรับใช้ในการทดลองสองการทดลอง โดยการทดลองที่หนึ่งเก็บตัวอย่างวันที่ 5 และการทดลองที่สองเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 2, 4 และ 6 หลังจากเติมเกลือ

รูปที่ 8 การปลูกต้นกล้าข้าวโดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค (Hydroponic system)

2.2 การศึกษาผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าว

2.2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต้นกล้าข้าวที่ปลูกดังข้อ 2.1.1 ที่เวลา 10.00-12.00 น. โดยจะเก็บวันที่ 4 หลังจากให้ 10 mM KNO_3 และเก็บกระถางละประมาณ 1-2 กรัม จำนวน 3 ชุดการทดลอง ล้างใบและรากด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้ง บดต้นข้าวด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา เก็บตัวอย่างที่บดแล้วไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเตรียมสารสกัดและวัดแอคติวิตีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

2.2.2 การเตรียมสารสกัดและการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

นำตัวอย่างต้นข้าวซึ่งบดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้ว มาบดผสมกับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF และ 1 mM DTT ซึ่งในบัฟเฟอร์จะเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM NaCl โดยจะบ่มตัวอย่างกับบัฟเฟอร์ไว้นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมากรองผ่านผ้าก๊อซ 6-8 ชั้น นำน้ำสกัดที่ได้จากการกรองไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใสนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex

G-25 (ขนาด 0.8 ×10 เซนติเมตร) เก็บสารละลายที่ออกมาที่ void volume นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทันที

2.3 การศึกษาผลของเกลือต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้เลี้ยงต้นข้าว

2.3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ปลูกตามข้อ 2.1.2 วันที่ 5 (การทดลองแรก) และวันที่ 0, 2, 4 และ 6 (การทดลองที่สอง) หลังจากเติมเกลือ โดยเก็บจำนวน 3 ซ้ำ (1 ซ้ำ = 1 ถัง) แยกส่วนของต้นและรากออกจากกัน ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก แบ่งต้นที่แยกออกมาเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่จะนำไปหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ และกลุ่มที่จะนำไปหาปริมาณไนเตรต จากนั้นบดตัวอย่างกลุ่มที่จะนำไปหาค่าแอคติวิตีด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา เก็บตัวอย่างที่บดแล้วที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเตรียมสารสกัดและวัดแอคติวิตี

2.3.2 การเตรียมสารสกัดและการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

นำต้นข้าวที่บดแล้วมาใส่ในโกร่งบดยาโดยผสมกับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งประกอบด้วย 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF และ 1 mM DTT ในอัตราส่วน ใบข้าว 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการบด 1 นาที แล้วกรองผ่านผ้าก๊อซ 6-8 ชั้น นำน้ำที่ได้จากการกรองไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บส่วนใสนำมาผ่าน Sephadex G-25 column (ขนาด 0.8 × 10 เซนติเมตร) เก็บสารละลายที่ออกมาที่ void volume นำมาหาแอคติวิตีของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีนทันที

2.4 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดเอนไซม์มาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยดัดแปลงตามวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ใช้สารสกัดเอนไซม์ 200 ไมโครลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 0.1 M KNO_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 900 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม 1 M NADH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1% (w/v) sulfanilamide ใน 1.5 N HCl ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และทำให้เกิดสีโดยเติม 0.02% (w/v) *N*-(1-

naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (A540)

ไนไตรต์ที่เกิดขึ้นสามารถทำให้เกิดเป็นสารที่มีสีได้ โดยอาศัยปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ดังนี้

1) nitrite + sulfanilamide ⟶ diazonium salt

2) diazonium salt + *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ⟶ coloured complex (สีชมพูอมม่วง)

2.5 การหาปริมาณโปรตีน

ประยุกต์วิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยการผสมสารละลายโปรตีน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรกับ 10% Deoxycholate Sodium salt ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร, 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตและโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตรต (1% $CuSO_4$ + 2% Na/K tartrate ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol reagent ในน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1 : 1) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2.6 การสกัดและการหาปริมาณไนเตรตในใบข้าว

นำใบข้าวที่อบแห้งเป็นเวลา 2 วัน ที่ 65 องศาเซลเซียส มาบดโดยผสมกับน้ำกลั่นที่กำจัดไอออนแล้วในอัตราส่วนน้ำหนักใบ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที (2,655 x g) นาน 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้สำหรับวัดปริมาณไนเตรตโดยใช้ salicylic acid method ซึ่งประยุกต์วิธีของ Cataldo และคณะ (1975) โดยนำสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 5% salicylic acid ใน H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นปรับ pH ให้เป็นด่าง (>12) ด้วย 4 N NaOH ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายในหลอดจะเย็นลง หากมีไนเตรตสารละลายจะมีสีเหลืองซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรและใช้ KNO_3 ในการทำกราฟมาตรฐาน

2.7 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ต้นข้าวที่นำมาศึกษาเป็นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อายุประมาณ 1 เดือน ปลูกตามวิธีข้อ 2.1.1 บดต้นข้าวทั้งต้นด้วยไนโตรเจนเหลว เติมบัฟเฟอร์สกัด (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM EDTA-0.5 mM PMSF-1 mM DTT) นำไปโฮโมจีไนซ์ กรองผ่านผ้าก๊อซหนา 6-8 ชั้น และหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที (20,817 x g) นาน 30 นาที นำสารสกัดมาแบ่งใส่หลอด ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความอิ่มตัวเป็น 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50% ตามลำดับ โดยมีสารสกัดที่ไม่ใส่เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นการทดลองชุดควบคุม นำสารสกัดที่เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว 2 ชุดการทดลอง (ทำซ้ำ 2 ชุด) แยกเก็บที่ 4°C และ -20°C นำสารสกัดออกมาหาแอคติวิตีทันที (วันที่ 0), วันที่ 7 และวันที่ 30 ตามลำดับ

2.8 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 10 × 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วนคือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 7 เซนติเมตร

2.8.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Non-denaturing PAGE)

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 4-10% หรือ 6% ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังนี้

Composition	Stacking gel 3% (5 ml)	Separating gel		
		4%(3 ml)	6%(3 ml)	10%(3ml)
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.5	0.40	0.60	1.00
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	0.63	-	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	-	1.50	1.50	1.50
10% Ammonium persulphate (μl)	50	30	30	30
TEMED (μl)	5	3	3	3
Distilled water (ml)	3.82	1.07	0.87	0.47

2.8.1.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (M_r 669 กิโลดาลตัน), เฟอร์ริทิน (M_r 440 กิโลดาลตัน), คาทาเลส (M_r 232 กิโลดาลตัน), แลคเทสดีไฮโดรจีเนส (M_r 140 กิโลดาลตัน) และอัลบูมิน (M_r 67 กิโลดาลตัน) โดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) โดยให้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นโปรตีนพอเหมาะ และเตรียมโปรตีนมาตรฐานในทำนองเดียวกัน

2.8.1.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสใน Tris-glycine buffer, pH 8.3 (0.025 M Tris-HCl-0.192 M Glycine) เปิดกระแสไฟคงที่ที่ 15 mA นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจลปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมสี

2.8.1.3 การย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูมาซีบลู

ย้อมสีโปรตีนในเจลด้วยสีคูมาซีบลู (Coomassie brilliant blue R-250) โดยแช่เจลในสารละลาย 0.08% คูมาซีบลู-50% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย 18% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.8.1.4 การย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase)

ย้อมแอคติวิตีในแผ่นเจล โดยแช่เจลหลังทำอิเล็กโทรฟอรีซิสในสารละลาย 3,3′-Diaminobenzidine (DAB) 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งมี 0.005% H_2O_2 เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วย 18% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม

2.8 การเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากต้นกล้าข้าวโพด

เพื่อนำมาใช้ตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้รับเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.9.1 การกระตุ้นการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากต้นกล้าข้าวโพด (corn seedling) ในกระต่าย

กระต่ายที่ใช้สังเคราะห์แอนติบอดีเป็นกระต่ายขาว ตาแดง เพศผู้ หนักประมาณ 4 กิโลกรัม อายุ 10 เดือน ฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากต้นกล้าข้าวโพดของบริษัท Sigma

โดยฉีดกระตุ้นในผิวหนัง 3-4 จุด และใต้ผิวหนัง 2-3 จุด โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์และระยะเวลาการกระตุ้น ดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์สัปดาห์ละ 25 ไมโครกรัม ซึ่งผสมกับ Freund's complete adjuvant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และอีก 2 สัปดาห์ต่อมาฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ 25 ไมโครกรัม โดยผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดบริเวณหูทุกครั้งก่อนฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์แต่ละครั้ง และหลังจากการฉีดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ ตั้งเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมงเพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,250 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบแอนติบอดีต่อไป

2.9.2 การทดสอบแอนติบอดี

การทดสอบแอนติบอดีจากซีรัมกระต่ายด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) ดังนี้ เท 0.3% อะกาโรส (agarose) ใน 0.9% NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) ทิ้งให้อะกาโรสแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปอบที่ 80 องศาเซลเซียสจนอะกาโรสแห้งติดแผ่นสไลด์ จากนั้นเท 1.5% อะกาโรสใน 0.9% NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นสไลด์เดิม ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเจาะอะกาโรสให้เป็นหลุมทดสอบการมีแอนติบอดี โดยการเติมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ในหลุมกลาง แล้วเติมซีรัมของกระต่ายก่อนและหลังฉีดเอนไซม์ ลงในหลุมข้างรอบๆ หลุมกลาง เก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง ถ้ามีแอนติบอดีในซีรัมกระต่ายจะเห็นแถบการตกตะกอน (precipitin band) ของแอนติเจนและแอนติบอดีระหว่างหลุมที่ใส่ซีรัมกับหลุมที่ใส่แอนติเจน เพื่อให้เห็นแถบการตกตะกอนนี้ชัดเจน แช่สไลด์ใน 0.9% NaCl นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างโปรตีนที่ไม่ตกตะกอนออกโดยการเปลี่ยนน้ำกลั่นหลายครั้ง วางสไลด์ที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อให้อะกาโรสแห้งติดแผ่นสไลด์แล้วย้อมสไลด์ด้วยสีอะมิโดแบล็คบี (amido black B) (0.02% อะมิโดแบล็คบี-50% เอธานอล-5% กรดน้ำส้ม) นาน 2 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ตามวิธีของ พีรพงษ์ พึ่งแย้ม (2545)

2.10 การทำ Western blot ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

แยกสารตัวอย่างด้วย nondenaturing PAGE จากนั้นถ่ายโปรตีนในแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลส ตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979) โดยทำในบัฟเฟอร์ (0.025 mM Tris-0.192 mM glycine-10% methanol, pH 8.3) และใช้กระแสไฟที่ 300 mA นาน 2 ชั่วโมง ติดตามการถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสโดยย้อมด้วย 0.5% Ponceau S-1% กรดน้ำส้ม ล้างสี Ponceau S ออกด้วยน้ำกลั่น แล้วล้างต่อด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.5 M NaCl) จนสีออกหมด นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสไปบ่มด้วย 3% BSA ใน TBS (TBS-3% BSA) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TBS ที่มี 0.05% Tween 20 (TTBS) นาน 10 นาที 3 ครั้ง จากนั้นบ่มด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน TTBS-1% BSA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง บ่มด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเปอร์ออกซิเดส (anti-rabbit IgG peroxidase conjugate) จากบริษัท Sigma นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย 3,3′-Diaminobenzidine (DAB) 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ซึ่งมี 0.005% H_2O_2 เป็นการเริ่มต้นปฏิกิริยา

2.11 การทำ Dot blot ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นำสารสกัดตัวอย่างมาทดสอบด้วยวิธี Dot blot ดังนี้ นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสมาล้างด้วย TBS ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสารสกัดจากข้าวโพดและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกโดยได้รับเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ เจือจางด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนดังนี้ คือ 2.0, 1.6, 1.2, 0.8, 0.4 และ 0.2 mg/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารสกัดที่เจือจางแล้วปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นไนโทรเซลลูโลสที่เตรียมไว้ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นไนโทรเซลลูโลสด้วย TBS (25 mM Tris-HCl, pH 7.5-0.5 M NaCl) นาน 10 นาที 2 ครั้ง นำแผ่นไนโทรเซลลูโลสไปบ่มด้วย TBS-3% BSA ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS จากนั้นตัดแผ่นไนโทรเซลลูโลสเป็น 2 ชุด นำไปบ่มใน TTBS-1% BSA ที่มีและไม่มีแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธ์ของข้าวโพดแยกกัน นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS ที่มี 0.05% Tween 20 (TTBS) นาน 10 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นบ่มแผ่นไนโทรเซลลูโลสทั้ง 2 ชุด ด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเปอร์ออกซิเดส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS นาน 10 นาที 3 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย TBS นาน 10 นาที 2 ครั้ง จากนั้นย้อมด้วยสารละลาย DAB ตามวิธีข้อ 2.10

2.12 การสกัดและทำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้บริสุทธิ์

2.12.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract)

นำตัวอย่างต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในดิน อายุประมาณ 1 เดือน ซึ่งเติมไนเตรตล่วงหน้า 4 วัน (จากข้อ 2.1.1) นำใบมาล้างด้วยน้ำกลั่น ชั่งน้ำหนักต้นข้าวที่ซับแห้งแล้วมา 100 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดด้วยโกร่งบดยาให้ละเอียด ตักใส่บีกเกอร์ เติมบัฟเฟอร์สกัด (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM EDTA-0.5 mM PMSF-1 mM DTT) 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่อง Polytron homogenizer นาน 5 นาที แล้วกรองด้วยผ้าก๊อซหนา 6-8 ชั้น นำน้ำที่กรองได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 50 นาที เก็บสารละลายส่วนใสมาวัดปริมาตร หาปริมาณโปรตีนและความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์

2.12.2 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.12.1 มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 เปอร์เซ็นต์ หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที (20,817 x g) นาน 50 นาที เก็บตะกอนไปละลายด้วยบัฟเฟอร์สกัด จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (S1) เพื่อหาแอคติวิตีและใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.12.3 การแยกเอนไซม์โดยคอลัมน์ Sephadex G-25

เตรียม Sephadex G-25 ในคอลัมน์ขนาด 2.3 × 15 เซนติเมตร (ปริมาตรเรซิน 62 มิลลิลิตร) ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์สกัด จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (S1) ลงในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ รวมสารละลายในหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไว้ด้วยกันเพื่อนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อไป

2.12.4 การแยกเอนไซม์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียม DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.2 × 9 เซนติเมตร (ปริมาตรเรซิน 35 มิลลิลิตร) ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์สกัด จากนั้นเติมสารละลายรวมจากคอลัมน์ Sephadex G-25 ลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel แล้วล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร วัดค่า A280 ล้างคอลัมน์จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นแบบต่อเนื่องจาก 0-0.6 M (50 มิลลิลิตร + 50 มิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหลเท่าเดิมและเก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และ

ตรวจหา แอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.4 นำหลอดที่มีแอคติวิตีมาทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี nondenaturing PAGE

2.12.5 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม (Preparative PAGE)

Preparative PAGE เป็น nondenaturing PAGE แต่มีการเตรียมเจลให้มีขนาด 10 x 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในเจลส่วนบน 3% และเจลส่วนล่าง 4-10% เจลส่วนบนเตรียมให้มีช่องใส่สารตัวอย่างเพียงช่องเดียว ขนาด 2 x 9 เซนติเมตร จากนั้นผสมสารละลายเอนไซม์ 300 ไมโครลิตร กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 400 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้เติมลงในช่องใส่สารตัวอย่าง แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าคงที่ 15 mA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของเจล ปิดกระแสไฟ จากนั้นตัดเจลตรงกลางเป็นแถบกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาวตลอดแผ่นเจล แล้วนำเจลตรงกลางไปย้อมสีเจลด้วยสีคูมาซีบลู เมื่อปรากฏแถบโปรตีนให้นำไปเทียบกับเจลที่ไม่ย้อมสี หลังจากนั้นตัดเจลที่เหลือซึ่งไม่ได้ย้อมตามขวาง กว้างแถบละ 0.3 เซนติเมตร รวม 18 แถบ นำเจลแต่ละแถบมาบด (homogenate) ใน Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.5 โดยการเติม 0.5 M Na-acetate, pH 4.0 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร และใช้กระดาษลิตมัสเพื่อตรวจวัดค่า pH หลังจากนั้นบดเจลจนละเอียด นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที ดูดส่วนใสไว้เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี non denaturing PAGE ส่วนตะกอนที่เหลือทั้ง 18 หลอด นำมาเติมสารสำหรับวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามวิธีข้อ 2.4 สังเกตสีที่เกิดขึ้น แล้วนำไปเทียบกับเจลส่วนที่ย้อมสีคูมาซีบลู