2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อมาจากบริษัทต่างๆดังนี้

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	Merck
Acetic anhydride	102.09	Merck
Acrylamide	71.1	Merck
Agar	-	วิทยาศรม
Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Merck
Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.7	Merck
Bicinchoninic acid	388.3	Sigma
Bovine serum albumin (BSA)	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Chitin	-	Sigma
Coomassie brilliant blue G 250	854.0	Sigma
Coomassie brilliant blue R 250	826.0	Sigma
Cupric sulphate ($CuSO_4$)	249.68	Sigma
Diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose)	-	Whatman
3,5 – Dinitrosalicylic acid $(NO_2)_2C_6H_2(OH)COOH$	228.19	Fluka Chemika
Ethanol	46.07	Merck
Fluorescent brightener 28	960.9	Sigma
Glycerol	92.09	Carlo Erba
Glycine	75.07	Fluka Chemika
Glycol chitosan	-	Sigma

Laminarin (*Laminaria digitata*)	-	Sigma
Lima bean agar	-	Difco
2- mercaptoethanol	78.13	Merck
Methanol	32.04	Carlo Erba
N- Acetylglucosamine	221.2	Sigma
N,N-methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N-tetramethylenediamine (TEMED)	116.2	Sigma
Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzene)	126.1	Sigma
Phosphoric acid	98.0	Baker Analyzed
Potassium ferricyanide	329.26	Sigma
Potassium sodium tartrate	282.22	Sigma
Potato dextrose agar	-	Difco
Potato dextrose broth	-	Difco
Scopoletin	192.2	Sigma
Sephadex G-50	-	Sigma
Silver stain kit	-	Biorad
Sodium acetate anhydrous	82.03	BDH
Sodium azide (NaN_3)	65.01	Merck
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	84.01	Merck
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	105.99	Merck
Sodium chloride (NaCl)	58.44	BDH
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.4	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40	BDH
Tricine	179.18	Fluka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121.1	Merck
Triton X-100	-	Sigma
Tween-20	-	Fluka Chemika

อุปกรณ์

1. กระบอกตวง ขนาด 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร
2. กล่องพลาสติกสำหรับเก็บแผ่นเจล
3. บีกเกอร์ ขนาด 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 2 ลิตร
4. ปิเปตแก้ว ขนาด 2, 5 และ 5 มิลลิลิตร
5. ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิพขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
6. ขวด Duran ขนาด 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร
7. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
8. คอลัมน์ขนาด 2.5×25 และขนาด 1.5×90 เซนติเมตร
9. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 และ 11 เซนติเมตร
10. กล้องถ่ายรูป Nikon (Japan) และ Olympus SC 35 (Japan)
11. ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
12. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ Autoclave SS-320 Tomy (Japan)
13. คอลัมน์ PD-10 (Pharmacia)
14. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
15. Orbital shaker incubator, Paton scientific model 013422 (South Australia)
16. Centrifuge J2-21 operation, Beckman (USA)
17. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
18. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
19. Automatic fraction collector model 2110, Biorad (USA)
20. Microtube pump MP-3 EYELA (Japan)
21. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
22. Electrophoresis apparatus, ATTA Cooperation (Japan)
23. Spectrofluorometer Jasco, model FP-777 (Japan)
24. Shimazu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
25. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator, Sanyo (Japan)
26. UV box, Vilber Lourmat (France)

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมใบยางพารา

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้ใบยางพารา 2 พันธุ์คือ พันธุ์ BPM-24 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อรา *P. botryosa* และ พันธุ์ RRIM600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อรา *P. botryosa* ยางพาราทั้งสองพันธุ์เป็นยางพันธุ์ชั้นหนึ่งซึ่งจัดอันดับโดยสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร และได้แนะนำให้เกษตรกรปลูกเนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตได้สูงกว่าพันธุ์อื่นๆ ในแง่การต้านทานโรคสถาบันวิจัยยางจัดอันดับให้พันธุ์ BPM-24 เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อราชนิดนี้มากที่สุด (อันดับที่ 1) และพันธุ์ RRIM600 เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อราชนิดนี้น้อยที่สุด (อันดับที่ 5) (กรมวิชาการเกษตร, 2542) เนื่องจากยางพาราทั้งสองพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานโรคแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นยางพาราทั้งสองพันธุ์ที่เลือกมาใช้ในการทดลองนี้จึงเป็นตัวแทนที่ดีของพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ

2.2 การเตรียมเชื้อรา *P. botryosa* ให้บริสุทธิ์

เชื้อรา *P. botryosa* เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงและเส้นดำในยางพารา (Chee, 1969) เชื้อราดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลา ทางศูนย์วิจัยยางสงขลาได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรค ผู้วิจัยนำเชื้อรา *P. botryosa* ที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งก่อนนำไปใช้ทดลองด้วยการใช้เข็มเขี่ยปลอดเชื้อสัมผัสบริเวณเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นนำมาเขี่ย (streak) ให้เป็นเส้นยาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA (ดูภาคผนวก) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) หลังจากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนอาหาร PDA อีกครั้งเลี้ยงต่อไปอีกหนึ่งสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จึงสามารถนำไปใช้งานได้ (รูปที่ 3)

2.3 การเตรียมอิลิซิตินจากเชื้อรา *P. botryosa*

ตัดเชื้อรา *P. botryosa* บนอาหาร PDA บริเวณที่กำลังเจริญเติบโตดีให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อราสูตร PDB (ดูภาคผนวก) โดยใช้เชื้อรา จำนวน 15 ชิ้นต่ออาหารเหลว PDB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน เชื้อรา *P. botryosa* จะค่อยๆผลิตอิลิซิตินออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตรวจหาปริมาณโปรตีนรวม (total protein)

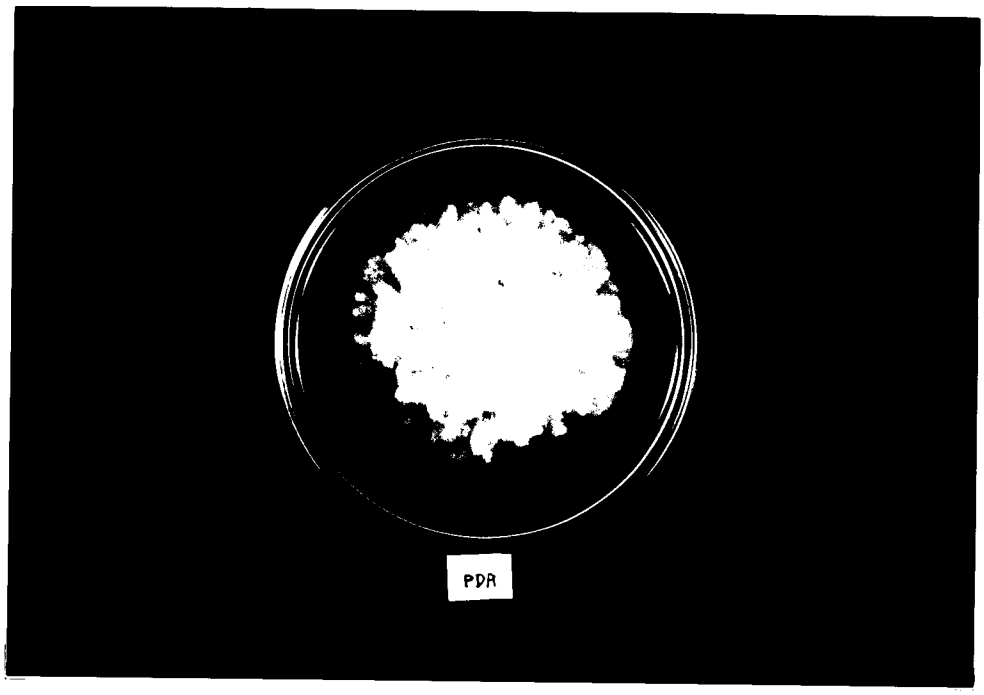
ทุกๆ 5 วัน โดยวิธีแบรดฟอร์ด เมื่อตรวจพบว่าโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นคงที่จึงเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4) ไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมอิลิซิตินให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.4 การเตรียมอิลิซิตินจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa*

นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *P. botryosa* จากข้อ 2.3 ปริมาตร 1 ลิตรมากรองเอาสายราออกไปด้วย suction flask จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 90% แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ JA-21 ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เทส่วนใสทิ้งไป นำตะกอนที่ได้มาละลายกลับใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมที่ได้ทั้งหมดโดยวิธีใช้กรดไบซินโคนินิค จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้มากำจัดเอาเกลือออกไปด้วยคอลัมน์ PD-10

คอลัมน์ PD-10 เป็นคอลัมน์สำเร็จรูปบรรจุ Sephadex G-25 (ปริมาตร 9 มิลลิลิตร) ปรับคอลัมน์ PD-10 ให้สมดุลด้วย 20 mM Tris-HCl, pH7.0 แล้วนำสารละลายโปรตีนรวมที่ได้ผ่านลงในคอลัมน์ PD-10 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (O.D.280) รวมสารละลายหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงและสามารถทำให้ไบยางพาราเกิดนีโครซีสได้เข้าด้วยกัน (fraction 3 และ 4) แล้วแบ่งสารละลายไว้ตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธีใช้กรดไบซินโคนินิค และตรวจหาความบริสุทธิ์โดยวิธี Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) ตามวิธีการในข้อ 2.7

หลังจากการผ่านคอลัมน์ PD-10 จะได้สารละลายปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE- cellulose และ Sephadex G-50 ตามลำดับ



รูปที่ 3 เชื้อรา *P. botryosa* ในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

รูปที่ 4 เชื้อรา *P. botryosa* ในอาหารเหลว PDB พร้อมนำไปเตรียมอิลิซิติน

2.5 การทำบริสุทธิ์อิลิซิตินด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose

2.5.1 การเตรียมคอลัมน์ DEAE-cellulose

ใช้ DEAE-cellulose จำนวน 20 กรัม ทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 0.5 M กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นเทสารละลายส่วนบนซึ่งมีกรดผสมอยู่ออกไป แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายส่วนบนมี pH ประมาณ 7.0 จากนั้นเติม 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทเอาส่วนใสออก ล้างด้วยน้ำกลั่นต่อไปจนมี pH เป็น 7.0 หลังจากนั้นนำ DEAE-cellulose มาแช่ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วบรรจุลงคอลัมน์ขนาด 2.5 × 25 เซนติเมตร (มีปริมาตร DEAE-cellulose ประมาณ 60 มิลลิลิตร) จากนั้นปรับคอลัมน์ DEAE-cellulose ให้สมดุลโดยการชะด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร DEAE-cellulose ในอัตราการไหลผ่านคอลัมน์ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.2 การแลกเปลี่ยนประจุของโปรตีนกับ DEAE-cellulose

นำสารละลายโปรตีนในข้อ 2.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรความเข้มข้น 6.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสด้วยอัตราเร็วในการไหลผ่านคอลัมน์ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 เพื่อชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกให้หมด เก็บสารละลายด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วนหลอดละ 3 มิลลิลิตร ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ถูกชะออกมาที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีกซึ่งสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรเข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 M อยู่ด้วยเพื่อชะเอาโปรตีนที่แลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ออกมาด้วยอัตราการไหลและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า O.D.280 รวมสารละลายหลอดที่ให้ค่า O.D.280 สูงและสามารถทำให้ไบยางพาราเกิดนีโครซีสได้เข้าด้วยกัน แล้วแบ่งสารละลายไว้ตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธีใช้กรดไบซินโคนินิคและตรวจความบริสุทธิ์โดยวิธี Tricine-SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 2.7

หลังจากการผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose จะได้สารละลายอิลิสซิตินปริมาตร 90 มิลลิลิตรซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer จนได้สารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50

2.6 การทำให้อิลิซิตินบริสุทธิ์มากขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-50

2.6.1 การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G-50

นำ Sephadex G-50 จำนวน 20 กรัมมาแช่ให้พองตัวในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 10 ชั่วโมงแล้วแช่ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 อีก 5 ชั่วโมงก่อนที่จะบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.5×150 เซนติเมตร (มีปริมาตรเจล 200 มิลลิลิตร) จากนั้นปรับคอลัมน์ Sephadex G-50 ให้สมดุลด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล ให้อัตราไหลผ่านคอลัมน์ 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

2.6.2 การแยกโปรตีนขนาดต่าง ๆกันด้วย Sephadex G-50

นำสารละลายโปรตีนในข้อ 2.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรซึ่งมีความเข้มข้น 7.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-50 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันโดยการชะด้วยอัตราเร็ว 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วนหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (O.D.280) รวมสารละลายหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงและสามารถทำให้ไบยางเกิดนีโครซีสได้เข้าด้วยกัน ตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธีใช้กรดไบซินโคนินิค และความบริสุทธิ์โดยวิธี Tricine-SDS-PAGE ตามวิธีการในข้อ 2.7

หลังจากผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 จะได้สารละลายอิลิซิตินปริมาตร 180 มิลลิลิตรซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้งานทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหิดแห้ง จะได้สารละลายอิลิซิตินเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือ 3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

2.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิลิซิติน

ผู้วิจัยได้ดัดแปลงจากวิธีของ Schagger และ Von Jagow (1987) และย้อมเจลด้วยซิลเวอร์-ไนเตรต

2.7.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

โพลีอะคริลไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (Slab gel) ขนาด 7×8 เซนติเมตร หนา 0.75 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วนคือเจลส่วนบน (Stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (Separating gel) มีความสูง 6 เซนติเมตร ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลดังต่อไปนี้

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (16.5%)
Acrylamide-bisacrylamide mixture	0.5 ml	5.0 ml
3.0 M Tris-HCl, pH 8.45 + 0.3% SDS	1.55 ml	5.0 ml
10% Ammonium persulphate	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Deionized water	4.20 ml	5.0 ml
Total Volume	6.30 ml	15.0 ml

2.7.2 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

ในการเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน ผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% sucrose, 5% SDS (Sodium dodecyl sulphate), 2 % β -mercaptoethanol และ 0.1 % bromophenol blue ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนตามที่ต้องการ เตรียมโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีการเดียวกัน ก่อนการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสนำสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที

2.7.3 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานใส่ในแต่ละช่องของเจล ทำอิเล็กโทรฟอริซิสในบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris - 0.1 M Tricine - 0.1 % SDS, pH 8.25 เปิดกระแสไฟคงที่ที่ 30 mA ประมาณ 5 ชั่วโมง สีโบรโมฟีนอลบลูจะเคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 0.5 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟ แล้วนำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

2.7.4 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

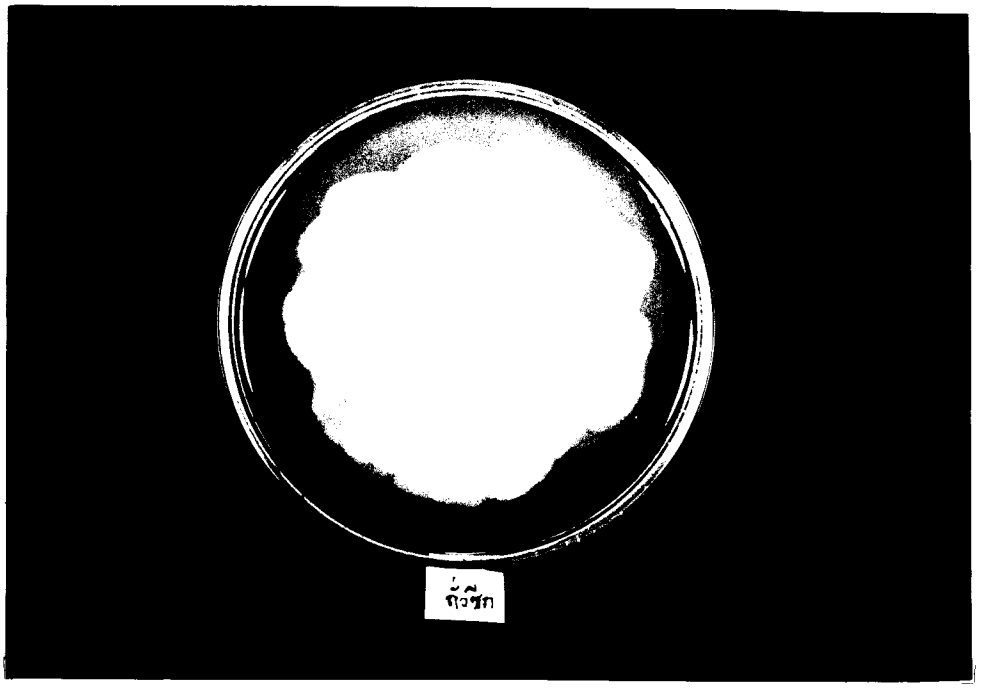
แช่เจลในสารละลายผสมระหว่าง 40 % เมธานอลกับ 10 % กรดอะซิติกนาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลายออกซิไดเซอร์ 5 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออน 3 ครั้งเป็นเวลา 15 นาทีพร้อมเขย่าเบาๆ จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลายซิลเวอร์นาน 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออนอีกครั้งแล้ว แล้วแช่ในสารละลายดีเวอลอปเปอร์จนกว่าจะเห็นแถบโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 5 % กรดอะซิติก ล้างเจลด้วยน้ำปลอดไอออนและเก็บเจลใน 50 % เมธานอล

2.8 การเลือกใช้ใบยางพาราในการทดลอง

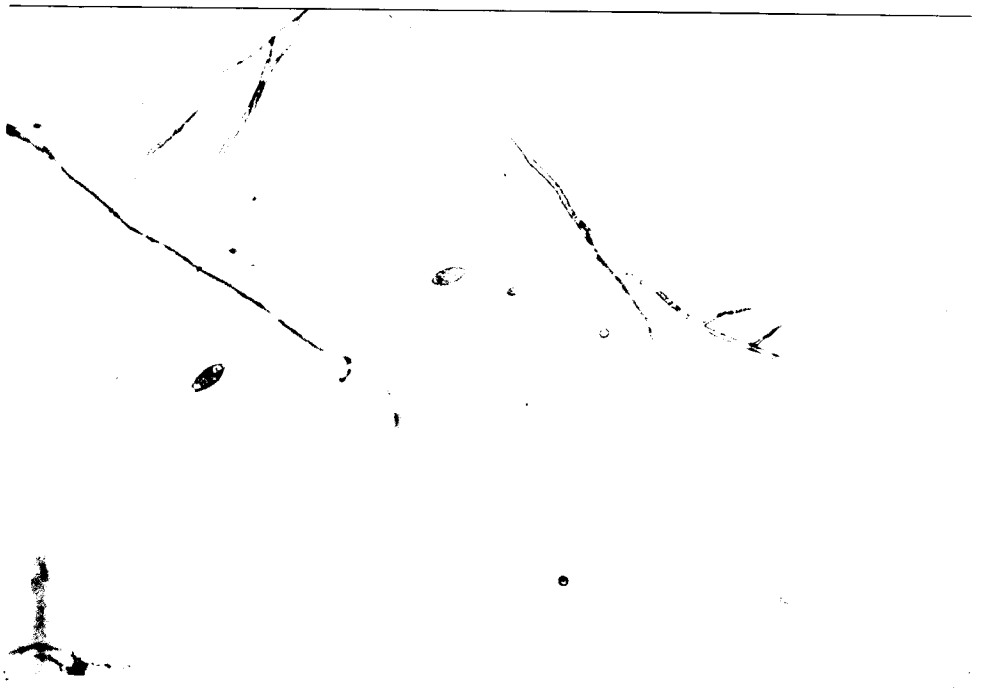
ในการทดลองใช้ใบยางพารา 2 พันธุ์ 1) BPM-24 (ต้านทานต่อเชื้อรา *P. botryosa*) และ 2) RRIM600 (อ่อนแอต่อเชื้อรา *P. botryosa*) ยางทั้งสองพันธุ์ติดตาบนต้นตอพันธุ์พื้นเมือง อายุของใบยางที่ใช้คือ stage B_2-C (Breton *et al.*, 1997) โดยใช้ใบที่มีน้ำหนักประมาณ 0.5-1.0 กรัม ในการทดลองชุดเดียวกันการเลือกใช้ใบต้องมีความพิถีพิถันมากทั้งนี้เพื่อลดการแปรปรวนของผลการทดลอง เช่น เลือกใช้ใบจากต้นและกิ่งเดียวกัน และเลือกใบที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันด้วย ไม่ใช้ใบที่มีรอยกัดของแมลงหรือใบที่มีรอยไหม้ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อใดๆมาก่อน นอกจากนี้เลือกใช้ใบชุดควบคุมและใบชุดทดลองจากก้านเดียวกัน

2.9 การเตรียมซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. botryosa*

ถ่ายเชื้อรา *P. botryosa* จากที่เลี้ยงไว้บน PDA มาเลี้ยงบน Lima bean agar (ดูภาคผนวก) เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์แรงเจียม (Chee, 1969) หลังจากนั้น 7 วันถ่ายเชื้อรา *P. botryosa* อีกครั้งจาก Lima bean agar มาเลี้ยงบน 10 % ถั่วซีก เพื่อกระตุ้นเชื้อราให้สร้างสปอร์แรงเจียมได้มากขึ้น หลังจากนั้น 1 สัปดาห์สามารถสกัดซูโอสปอร์ออกมาได้โดยการเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงบนสายราแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที สปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. botryosa* จะแตกออก ปล่อยให้ซูโอสปอร์ซึ่งอยู่ข้างในว่ายน้ำออกมาได้ นับจำนวนซูโอสปอร์ทั้งหมดที่ได้แล้วทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้น 5×10^6, 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (รูปที่ 5 และ 6)



รูปที่ 5 เชื้อรา *P. botryosa* ในถาดอาหาร 10 % ถั่วซีก อายุ 7 วัน พร้อมใช้งาน



รูปที่ 6 สายรา (mycelium) และสปอร์แรงเจียม (sporangium) ของเชื้อรา *P. botryosa* ซึ่งมีซูโอสปอร์อยู่ภายใน กำลังขยาย 100 เท่า

2.10 ศึกษาลักษณะและขนาดของรอยไหม้ (นีโครซีส) หลังจากกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินที่เตรียมได้จากเชื้อรา *P. botryosa*

2.10.1 การบ่มเชื้อราบนใบยางด้วยซูโอสปอร์ (inoculation)

นำซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้น 5×10^6, 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมาหยดบนใบยางที่ได้เลือกไว้แล้วตามวิธีการในข้อ 2.8 แต่ละหยดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหยดทางด้านขวาของใบยางจากความเข้มข้น 5×10^6, 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อหยดแทนน้ำสปอร์ โดยหยดทางด้านซ้ายของใบยาง การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในจานแก้วปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตรซึ่งมีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น (รูปที่ 7) เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงซับหยดน้ำและหยดสปอร์ในชุดควบคุมและชุดทดลองออกไป เปรียบเทียบลักษณะและขนาดของรอยไหม้ในแต่ละความเข้มข้นของใบยางพันธุ์ BPM-24 และพันธุ์ RRIM600 บันทึกผลเพิ่มเติมเมื่อเวลาผ่านไป 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ

รูปที่ 7 ตัวอย่างใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ในจานแก้วปลอดเชื้อ สำหรับทดลอง ด้านซ้ายของแต่ละใบวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ส่วนด้านขวาวางหยดสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ

2.10.2 การหาความเข้มข้นของ Tween-20 ที่เหมาะสมต่อการทำงานของอิลิซิติน

เนื่องจากอิลิซิตินเป็นโปรตีน จึงไม่สามารถเจาะเข้าไปในใบยางได้เหมือนกับสปอร์ ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารบางชนิดเป็นตัวนำอิลิซิตินเข้าไปภายในเซลล์ ผู้วิจัยเลือกใช้ Tween-20 เป็นตัวนำอิลิซิตินเข้าไปภายในเซลล์ของใบยาง เนื่องจาก Tween-20 เป็น detergent จึงสามารถลดแรงตึงผิวของอิลิซิตินให้ต่ำลงและช่วยละลายไขมัน (fat) กับไข (wax) ที่ปกคลุมผิวใบ ทำให้อิลิซิตินสามารถซึมเข้าสู่ช่องเปิดบริเวณปากใบแล้วผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของใบยางได้ โดยหันด้านที่เป็น nonpolar เข้าหาไขมันหรือไข และด้านที่เป็น polar เข้าหาอิลิซิติน นอกจากนี้ Tween-20 ยังเป็น detergent ชนิด nonionic จึงมีผลต่อประจุไฟฟ้าและรูปร่างของโปรตีนน้อยมากและไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติอีกด้วย โดยนำอิลิซิติน (จากข้อ 2.6.2) เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรมาละลายใน Tween-20 ซึ่งเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 0.05%, 0.1%, 0.2% และ 0.5% ตามลำดับ หยดทางด้านขวาของใบยาง แต่ละหยดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้สารละลาย 0.05%, 0.1%, 0.2% และ 0.5% Tween-20 ซึ่งไม่มีอิลิซิตินหยดแทนโดยหยดทางด้านซ้ายของใบ จากนั้นปล่อยให้สารละลายแทรกเข้าไปในเซลล์ของใบยางจนหมดแล้วจึงวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนบริเวณเดิม การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในจานแก้วปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตรซึ่งมีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น (รูปที่ 7) สังเกตการเรืองแสงด้วยตาเปล่าโดยนำใบยางไปส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) ทุก 4 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นซับหยดสารละลาย Tween-20 และหยดอิลิซิตินในชุดควบคุมและชุดทดลองออกไป เปรียบเทียบขนาดของรอยไหม้ (นีโครซีส) ในแต่ละความเข้มข้นของ Tween-20 บนใบยาง

2.10.3 การทดสอบใบยางด้วยอิลิซิติน

นำอิลิซิตินที่ได้จากข้อ 2.6.2 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย 0.2 % Tween-20 (เลือกใช้ความเข้มข้น 0.2 % จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 2.10.2) โดยหยดสารละลายอิลิซิตินลงบนใบยางที่เลือกไว้ตามวิธีการในข้อ 2.8 แต่ละหยดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดทางด้านขวาของใบจากความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้สารละลาย 0.2 % Tween-20 หยดแทนสารละลายอิลิซิตินโดยหยดทางด้านซ้ายของใบ ปล่อยให้สารละลายแทรกเข้าไปในเซลล์ของใบยางจนหมด จากนั้นวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนบริเวณเดิม การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในจานแก้วปราศจากเชื้อ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงซับหยดสารละลาย 0.2 % Tween-20 และหยดอิลิซิตินในชุดควบคุมและชุดทดลองออกไป เปรียบ

เทียบลักษณะและขนาดของนีโครซีสในแต่ละความเข้มข้นของอิลิซิตินบนใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ จากนั้นบันทึกผลเพิ่มเติมเมื่อเวลาผ่านไป 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ

2.11 ศึกษาการสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซินที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. botryosa*

2.11.1 การบ่มเชื้อราบนใบยางด้วยซูโอสปอร์ (inoculation)

นำซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้น 5×10^6, 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมาหยดบนใบยางที่ได้เลือกไว้แล้วตามวิธีการในข้อ 2.8 แต่ละหยดมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยหยดทางด้านขวาของใบยางจากความเข้มข้น 5×10^6, 1×10^7 และ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อหยดแทนน้ำสปอร์ โดยหยดทางด้านซ้ายของใบยาง การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในจานแก้วปราศจากเชื้อ (รูปที่ 7) สังเกตผลการเรืองแสงด้วยตาเปล่าโดยการนำใบยางมาส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) ทุกๆ 4 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

2.11.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตอเล็กซินที่ได้จากการบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์

เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงหลังจากบ่มเชื้อบนใบยาง ดูดแต่ละหยดเก็บในหลอดแล้ววางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรกลับลงไปยังบริเวณเดิม นำสารตัวอย่างที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฟโตอเล็กซินต่อไป จากนั้นเมื่อเวลาผ่านจนครบ 24 ชั่วโมง ดูดแต่ละหยดเก็บในหลอดแล้ววางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรกลับลงไปยังบริเวณเดิมอีก นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันนี้เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นนำสารตัวอย่างที่เวลาต่างๆมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำสารตัวอย่างที่ได้มาเจือจางลง 25 เท่าในน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร กล่าวคือใช้สารตัวอย่าง 120 ไมโครลิตรในน้ำกลั่น 2880 ไมโครลิตร แล้วจึงนำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Scp) (ไฟโตอเล็กซินที่พบในใบยางพารา) (Garcia *et al.*, 1995; Breton *et al.*, 1997) คำนวณหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิตินที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.01 - 0.05 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของใบยางพาราพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) และปริมาณของสคอพอลิติน (Scp) ในแต่ละความเข้มข้นของซูโอสปอร์

2.11.3 การทดสอบใบยางด้วยอิลิซิติน

นำอิลิซิตินที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในสารละลาย 0.2%Tween-20 หยดลงบนใบยางที่เลือกไว้ แต่ละหยดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตรโดยหยดทางด้านขวาของใบจากความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้สารละลาย 0.2%Tween-20 หยดแทนสารละลายอิลิซิตินโดยหยดทางด้านซ้ายของใบ ปล่อยให้สารละลายแทรกเข้าไปในเซลล์ของใบยางจนหมด จากนั้นวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนบริเวณเดิม การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในในจานแก้วปราศจากเชื้อ สังเกตผลการเรืองแสงด้วยตาเปล่า โดยการนำใบยางไปส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเล็ต (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) ทุกๆ 4 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

2.11.4 การวิเคราะห์ปริมาณไฟโตอเล็กซินที่ได้จากการทดสอบใบยางด้วยอิลิซิติน

เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงหลังจากบ่มใบยางด้วยสารละลายอิลิซิติน ดูดแต่ละหยดเก็บในหลอดแล้ววางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรกลับลงไปยังบริเวณเดิม นำสารตัวอย่างที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปอีก 4 ชั่วโมง ดูดแต่ละหยดเก็บในหลอดแล้ววางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรกลับลงไปยังบริเวณเดิมอีก เก็บสารตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บสารตัวอย่างด้วยวิธีการเดียวกันนี้เมื่อเวลาผ่านไป 16, 24 และ 32 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นนำสารตัวอย่างที่เวลาต่างๆมากรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเจือจางลง 10 เท่าในน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตรกล่าวคือใช้สารตัวอย่าง 300 ไมโครลิตรในน้ำกลั่น 2700 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Garcia *et al.*, 1995; Breton et al., 1997) คำนวณหาปริมาณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสคอพอลิตินที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.01 - 0.05 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิตินของใบยางทั้งสองพันธุ์และปริมาณของสคอพอลิตินที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อิลิซิตินความเข้มข้นต่างๆ

2.12 ศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนส)ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P.botryosa*

2.12.1 การบ่มเชื้อราบนใบยางด้วยซูโอสปอร์

นำซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมาหยดบนใบยางที่ได้เลือกไว้แล้วตามวิธีการในข้อ 2.8 โดยหยดทางด้านขวาของใบยาง แต่ละหยดมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดห่างกัน 4 หยดต่อตารางนิ้ว สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อหยดบนใบยางแทนน้ำสปอร์ โดยหยดทางด้านซ้ายของใบยาง การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในจานปลอดเชื้อซึ่งมีกระดาษกรองและน้ำกลั่นเป็นตัวให้ความชื้น เมื่อครบ 24 ชั่วโมงซับหยดน้ำและหยดสปอร์ในชุดควบคุมและชุดทดลองออกไป จากนั้นตัดใบยางบริเวณที่ทำการบ่มด้วยเชื้อราไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดตามวิธีการในข้อ 2.12.3 ต่อไป และทุกๆ 24 ชั่วโมงถัดไปเก็บตัวอย่างใบยางเช่นเดิมจนครบ 96 ชั่วโมง

2.12.2 การทดสอบใบยางด้วยอิลิซิติน

นำอิลิซิตินเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย 0.2 % Tween-20 มาหยดบนใบยางที่ได้เลือกไว้ โดยหยดทางด้านขวาของใบ แต่ละหยดมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดห่างกัน 4 หยดต่อตารางนิ้ว เลี้ยงใบไว้ในจานปลอดเชื้อซึ่งมีกระดาษกรองและน้ำกลั่นเป็นตัวให้ความชื้น สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้สารละลาย 0.2 %Tween-20 หยดแทนอิลิซิติน โดยหยดทางด้านซ้ายของใบยาง จากนั้นปล่อยให้สารละลายแทรกเข้าไปในเซลล์ของใบยางจนหมด จากนั้นวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนบริเวณเดิม เมื่อครบ 8 ชั่วโมง ซับหยดสารละลาย 0.2 % Tween-20 และหยดอิลิซิตินในชุดควบคุมและชุดทดลองออกไป จากนั้นตัดใบยางบริเวณที่ถูกกระตุ้นด้วยอิลิซิตินไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดตามวิธีในข้อ 2.12.3 ต่อไป และทุกๆ 8 ชั่วโมงถัดไปเก็บตัวอย่างใบยางเช่นเดิมจนครบ 32 ชั่วโมง

2.12.3 การสกัดโปรตีนจากใบยางพารา

นำใบยางชุดควบคุมและชุดทดลองทั้งที่บ่มด้วยซูโอสปอร์และกระตุ้นด้วยอิลิซิตินพันธุ์ละหนึ่ง กรัมใส่ในครกขนาดเล็ก จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตรบดให้ละเอียด แล้วเติม 0.5 มิลลิลิตรของ 50 mM โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 บดให้เข้ากัน ตักสารที่บดได้ทั้งหมดใส่กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรซึ่งภายในมีสำลีและกระดาษกรองบรรจุอยู่ คั้นเอาเฉพาะน้ำจะได้สารละลายประมาณ 0.8 มิลลิลิตร จากนั้นเซนตริฟิวจ์สารละลายที่ได้ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ส่วนที่เป็นกากทิ้งไป วัดปริมาตรส่วนใส แล้วนำสารสกัดจากใบยางพาราไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด จากนั้นนำไปกำจัดน้ำ

ตาลออกตามวิธีการในข้อ 2.12.4 ก่อนนำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และไคติเนส

2.12.4 การกำจัดน้ำตาลในสารสกัดจากใบยางพารา

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส คือ น้ำตาลกลูโคส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสับสเตรตด้วยเอนไซม์ไคติเนส คือ น้ำตาล-N-acetyl-D-glucosamine ดังนั้นจึงต้องนำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.12.3 มากำจัดน้ำตาลภายในสารละลาย (internal sugar) ออกไปเสียก่อน เพื่อไม่ให้รบกวนวิธีการตรวจวัดความว่องไวของเอนไซม์โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัล-เฟต ที่ความอิ่มตัว 70 % จากนั้นเซนตริฟิวจ์สารละลายด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไปนำตะกอนที่ได้มาละลายกลับใน 50 mM โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตรวจหาปริมาณโปรตีนอีกครั้งโดยวิธีแบรดฟอร์ด แล้วจึงนำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและไคติเนสตามลำดับ

2.12.5 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

ความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสใช้วิธีการตรวจวัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Burner (1964) คือใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรของน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) (ดูภาคผนวก) กำหนดให้ความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับ 1 ไมโครโมลของน้ำตาลกลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยลามินาริน (laminarin) ซึ่งเป็นสับสเตรตด้วยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นเวลา 1 นาทีใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ศึกษาทั้งปริมาณและอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยใช้สารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรผสมกับ 90 ไมโครลิตรของลามินารินเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แช่และเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 0.2 มิลลิลิตร และ 0.1 M โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีแล้วเติมน้ำกลั่นอีก 0.9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2.12.6 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส

ดัดแปลงจากวิธีของ Tsujibo *et al.* (1991) ใช้สารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับคอลลอยดอลไคติน (colloidal chitin) (ดูภาคผนวก) 90 ไมโครลิตร และ 0.1 M โซเดียม-อะซิเตต pH 5.0 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร แช่และเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำเฉพาะส่วนใส 750 ไมโครลิตรมาเติมสารละลาย Schales reagent (ดูภาคผนวก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดอีก 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine กำหนดให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับ 1 ไมโครโมลของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายคอลลอยดอลไคตินเป็นเวลา 1 นาทีใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตต pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาทั้งปริมาณและอัตราเร็วในการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ไคติเนส

2.13 การตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธี Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

2.13.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้

2.13.1.1 Glycol chitin 0.01 %

บด glycol chitosan 5 กรัม ใน 10 % กรดอะซิติก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ค้างคืนที่ 22 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเมธานอล 450 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง เติม acetic anhydride 7.5 มิลลิลิตร (ขณะที่เติมต้องคนตลอดเวลา) ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จะได้เจลเกิดขึ้น นำเจลที่ได้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆแช่ในเมธานอลให้ท่วมแล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นนาน 4 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนเจลไว้เติมเมธานอลอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ปั่นและเซนตริฟิวจ์อีกครั้ง จากนั้นนำตะกอนมาเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรซึ่งมี 0.02 % sodium azide ปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียดอีก 4 นาที จะได้ glycol chitin solution ความเข้มข้น 0.01%

2.13.1.2 Fluorescent brightener 28 0.01 %

ละลาย fluorescent brightener 28 (Calcofluor white M2R) 0.01 กรัมใน 0.5 M Tris-HCl pH 8.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายตัวนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

2.13.2 การย้อมความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส

ดัดแปลงจากวิธีของ Trudel and Asselin (1989) โดยเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล ให้เจลชั้นล่างซึ่งใช้แยกสารออกจากกัน มีอะคริลาไมด์ 15 % glycol chitin 0.01 % และ SDS 0.1 % ส่วนโพลีอะคริลาไมด์เจลชั้นบนซึ่งไม่ได้ใช้แยกสารมีโพลีอะคริลาไมด์ 5 % เพียงอย่างเดียว นำสารสกัดจากใบยางพาราทั้งสองพันธุ์ทั้งก่อนและหลังการบ่มด้วยเชื้อรามาแยกด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรฟอริซิสที่ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 30 มิลลิแอมแปร์นานประมาณ 8-10 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้มาแช่ใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 เขย่าแรงๆนาน 5 นาที หลังจากนั้นนำไปเขย่าใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ซึ่งมี 1% Triton X-100 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง Triton X-100 จะทำให้ SDS ค่อยๆหลุดออกจากเจล เอนไซม์ไคติเนสจึงเกิด renature และมีความว่องไวกลับคืนมา สามารถย่อย glycol chitin บนแผ่นเจล เมื่อนำไปย้อมด้วย 0.01% fluorescent brightener 28 ในที่มืดนาน 10 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จะมองเห็นแถบใสไม่มีสี (lytic zone) แต่เมื่อมองผ่านแสงอุลตร้าไวโอเล็ตจะเห็นเป็นแถบสีม่วง บันทึกภาพโดยใช้ฟิลเตอร์สีแดงเพื่อศึกษาแถบไอโซไซม์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา

2.14 ศึกษาการสร้างลิกนิน (lignification) ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์และอิลิซิตินของเชื้อรา *P. botryosa*

นำซูโอสปอร์ที่ความเข้มข้น 1×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาหยดบนใบยางที่ได้เลือกไว้ แต่ละหยดมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยหยดทางด้านขวาของใบยาง สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อหยดแทนสปอร์โดยหยดทางด้านซ้ายของใบยาง การทดลองจะหยดทางด้านหลังใบและเลี้ยงใบไว้ในจานแก้วปราศจากเชื้อซึ่งมีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น หยดห่างกัน 4 หยดต่อตารางนิ้ว เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 24 ชั่วโมงซับหยดน้ำออกทั้งชุดควบคุมและชุดทดลอง การสร้างลิกนินจะเกิดบริเวณรอบๆนีโครซีส ดังนั้นจึงทำการตรวจหาการสร้างลิกนินรอบบริเวณรอยไหม้ โดยตัดชิ้นส่วนของใบยางขนาด 1×1 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 2%Phloroglucinol ประมาณ 2 วัน หลังจากนั้นนำชิ้นใบยางที่เวลาต่างๆ วางบนแผ่นสไลด์ ทำให้เป็นกรดด้วยการหยดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงบนใบยาง ถ้าใบยางมีการสร้างลิกนิน ลิกนินจะทำปฏิกิริยากับกรดเห็นเป็นสีแดงชัดเจนรอบๆรอยไหม้สังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ส่วนอิลิซิตินทำการทดลองเช่นเดียวกับซูโอสปอร์โดยใช้อิลิซิตินความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรในสารละลาย 0.2 % Tween-20 มาหยดบนใบยางปริมาตร 10 ไมโครลิตรปล่อยให้สารละลายแทรกเข้าไปในเซลล์ของใบยางจนหมด จากนั้นวางน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนบริเวณเดิม การทดลองชุดควบคุมใช้สารละลาย 0.2 %Tween-20 หยดแทนอิลิซิตินเมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 24 ชั่วโมงซับหยดน้ำออกทั้งชุดควบคุมและชุดทดลอง ตัดชิ้นส่วนของใบยางบริเวณนีโครซีส ขนาด 1X1 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 2 % Phloroglucinol ประมาณ 2 วัน จากนั้นนำชิ้นใบยางที่เวลาต่างๆ วางบนแผ่นสไลด์ ทำให้เป็นกรดด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น สังเกตผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์