สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	23
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	24
วัสดุ	24
อุปกรณ์	27
วิธีการ	28
3. ผลการทดลอง	39
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	71
5. สรุป	80
เอกสารอ้างอิง	82
ภาคผนวก	91
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวขาวดอกมะลิ 105	60
2	สูตรอาหาร Hoagland	95

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	แบบแผนโครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต	4
2	ไดอะแกรมแสดงกลไกการนำไนเตรตไปใช้ในเซลล์พืช (nitrate assimilation pathway)	10
3	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์และแอมโมเนีย ซึ่งจะใช้ต่อในการสังเคราะห์กรดอะมิโนสำคัญคือ กลูตาเมต	11
4	เส้นทางการเข้า-ออกของไนเตรต (NO_3^-) ภายในเซลล์	12
5	ไดอะแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซึมไนเตรตไปใช้และกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช	14
6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของต้นข้าว	20
7	ต้นกล้าข้าวที่ปลูกในดินที่บรรจุอยู่ในกระถางและได้รับแสงธรรมชาติ	28
8	การปลูกต้นกล้าข้าวโดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค (Hydroponic system)	30
9	ผลของเกลือต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าว 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ที่ระยะเวลาการปลูก 1 เดือน และได้รับ 10 mM KNO_3 ก่อนเก็บตัวอย่าง 4 วัน	40
10	ความสูงของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ อายุ 1 เดือน ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland โดยใช้ระบบไฮโดรโพนิค อายุ 1 เดือน และเก็บตัวอย่างวันที่ 5 หลังจากเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM	42
11	ผลของการเพิ่มเกลือในสารละลายธาตุอาหารต่อความยาวของใบ (A) และความยาวของราก (B) ของต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ที่ได้รับเกลือเป็นเวลา 5 วัน	44
12	ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดของต้น (A) และราก (B) ในข้าว 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม	45

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร Hoagland ความเข้มข้น ½ เท่าและเก็บตัวอย่างต้นข้าว วันที่ 5 หลังจากเติมเกลือ	46
14	ผลของเกลือต่อน้ำหนักสดของต้นข้าวและรากในพันธุ์กู้เมืองหลวงและขาวดอกมะลิ 105	48
15	แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้รับเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50,75 และ 100 mM เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ในข้าว 2 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B)	50
16	ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบข้าว 3 สายพันธุ์ คือ กู้เมืองหลวง ขาวดอกมะลิ 105 และดอกพยอม ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Hoagland ความเข้มข้น ½ เท่าซึ่งเติมเกลือที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 mM	52
17	ปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland ที่มีความเข้มข้นของไนเตรต 6 mM และเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM	53
18	ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบของข้าว 2 สายพันธุ์คือ กู้เมืองหลวง (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ซึ่งเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 25, 50, 75 และ 100 mM	54
19	ปริมาณไนเตรตที่เหลือในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution และเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง 0, 25, 50, 75 และ 100 mM	55
20	การเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดใบข้าวไว้ในเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C และหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในวันที่ 0 (A) วันที่ 7 (B) และวันที่ 30 (C)	58
21	การแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจากสารสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของต้นข้าวด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 และหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (A540)	59

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22	การแยกเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากต้นข้าวด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	61
23	แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (หลังจากชะด้วย 0-0.6 M NaCl)	63
24	แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (จากการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel) ที่ได้จากการตัดเจล	64
25	แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE โดยการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (A) และย้อมทับด้วยสีคูมาซีบลู (B)	65
26	การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากต้นกล้าข้าวโพดในซีรัมกระต่าย	67
27	การทำ Western blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมสี Ponceau S (A) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพด (B) ของสารสกัดจากต้นข้าวและข้าวโพด	68
28	การทำ Dot blot เปรียบเทียบระหว่างการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (A) กับการย้อมด้วยแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพด (B)	70
29	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ NO_2^- (μmole) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (OD_{540} nm)	92

ตัวย่อและสัญลักษณ์

น.	=	นาฬิกา
A	=	absorbance
BSA	=	bovine serum albumin
CM-cellulose	=	carboxymethyl-cellulose
DAB	=	3, 3′-diaminobenzidine
DEAE-sephacel	=	diethylaminoethyl-sephacel
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
GOGAT	=	glutamine synthetase-glutamate synthase
g	=	acceleration (cm/sec^2)
M	=	molar
Mo-MPT	=	molybdenum-molybdopterin
mA	=	milliampare
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NiR	=	nitrite reductase
NR	=	nitrate reductase
nmole	=	nanomole
OD	=	optical density
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	=	phenylmethylsulfonylfluoride

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

pH	=	-log hydrogen ion concentration
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulphate- polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	=	Tris buffer saline
TEMED	=	N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
μmole	=	micromole
%	=	percent
β	=	beta