ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA)

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 50-60 °C ก่อนเทใส่จานเลี้ยงเชื้อจานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา V_8

นำ V_8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ3 กรัม เติมผงวุ้น 20 กรัม ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไป autoclave ที่ 121 °C ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลานาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 °C และเทใส่จานปราศจากเชื้อเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ใน 95 % เอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 85% phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

4. การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

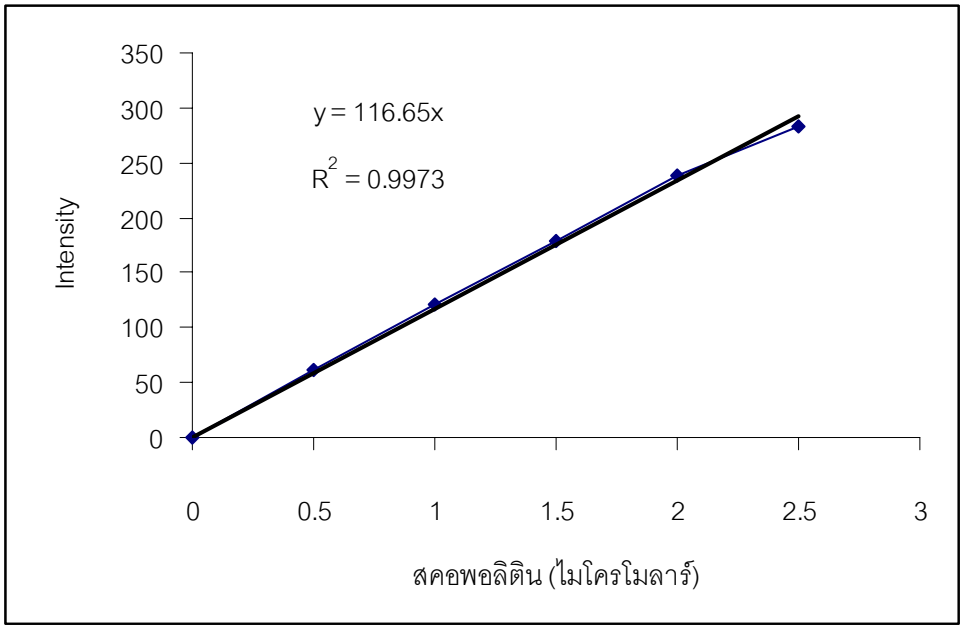
ละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) จำนวน 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

5. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้สารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวนหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

6. การเตรียมสคอพอลิตินมาตรฐาน

ละลายสคอพอลิติน (Scp) จำนวน 96.1 มิลลิกรัมใน 95 % เอทานอล 10 มิลลิลิตร จะได้สคอพอลิตินที่มีความเข้มข้น 50 mM จากนั้นเจือจางสารละลายสคอพอลิตินแบบ serial dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสคอพอลิตินเท่ากับ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตรและความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน (Scp) (ไฟโตอเล็กซินที่พบในใบยางพารา)



รูปที่ 44 กราฟมาตรฐานสคอพอลิติน โดยใช้ความเข้มข้นของสคอพอลิตินเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครโมลาร์ อ่านค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 340 นาโนเมตร (λ excitation) และความยาวคลื่นปลดปล่อย 440 นาโนเมตร (λ emission) ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสคอพอลิติน

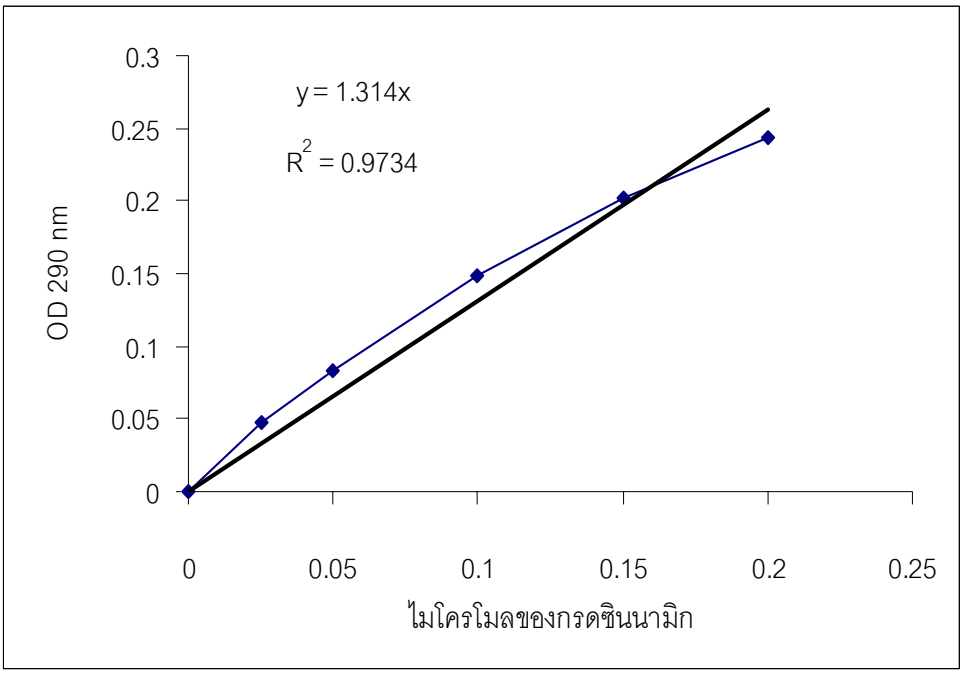
7. การหาความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL) จากกราฟมาตรฐานของ *trans*-cinnamic acid

ละลาย *trans*-cinnamic acid 0.015 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้ *trans*-cinnamic acid ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ จากนั้นนำมาเจือจาง 10 เท่า ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วเตรียมหลอดทดลองและเติมสารต่างๆ ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 26 ปริมาตรของสารต่างๆ ที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาการทำกราฟมาตรฐานของ *trans*-cinnamic acid

สารที่เติม (มล.)	หมายเลขทดลอง					
	1	2	3	4	5	6
1mM *trans*-cinnamic acid	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
0.1 M L-phenylalanine ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5	2,950	2,900	2,850	2,750	2,650	2,550
0.6 N HCl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

ผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น Blank นำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความยาวคลื่น 290 นาโนเมตรกับไมโครโมลของ *trans*-cinnamic acid



รูปที่ 45 กราฟกราฟมาตรฐานระหว่างความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร กับไมโครโมลของ *trans*-cinnamic acid

8. การคำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การคำนวณค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในหน่วย International Unit ต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณค่าความว่องไว} = \frac{V_t \times OD \times 1000}{E.D.V} \quad \text{ยูนิต/มล.}$$

โดยที่ V_t = ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มล.)

V = ปริมาตรของสารสกัดเอนไซม์ที่ใช้ (มล.)

OD= ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลง 1 นาที

1000 = ค่าคงที่

E = สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงโมลาร์ (Molar extinction coefficient : ε_M)

(ลิตร/มิลลิโมล/เซนติเมตร)

D = ระยะทางที่แสงผ่าน 1 เซนติเมตร

ตัวอย่างเช่น

ในปฏิกิริยารวมปริมาตร 3 มล.

สารสกัดที่ต้องการวัดค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 0.025 มล.

ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงโมลาร์ของ *o*-dianisidine เท่ากับ 11.3 $mM^{-1}cm^{-1}$

ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงในเวลา 1 นาที เท่ากับ 0.65 OD/min

นำค่าต่างๆ ข้างต้นนี้ มาแทนในสมการหาปริมาณความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

$$\text{ปริมาณค่าความว่องไว} = \frac{(3\text{มล.})(0.65\ \text{OD/min})(1000)}{(11.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})(1\ \text{cm})(0.025\text{มล.})}$$

$$= 6{,}902\ \text{mmole/min/1000ml}$$

$$= 6.092\ \text{mmole/min/ml}$$

μmole/min เท่ากับ ยูนิต

ดังนั้น ค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้ *o*-dianisidine เท่ากับ 6,902 ยูนิต/มล.

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์

นุรอามาลี ดีนามอ และนันทา เชิงเชาว์. 2548. ไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา. การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 3. 11 มีนาคม 2548, ศูนย์ปาฐกถาประดิษฐ เชยจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา