2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

ตารางที่ 2 ชื่อสารเคมี น้ำหนักโมเลกุล และบริษัทผู้ผลิตที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	60.05	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
Bovine serum albumin (BSA)	67,000	Sigma
Bromophenol blue	-	Sigma
Calcium carbonate	100.09	Fluka
Coniferyl alcohol	180.2	Aldrich
Coomassie brilliant blue G 250	854.0	Sigma
Coomassie brilliant blue R 250	826.0	Sigma
3.3'-Dimetoxybenzidine dichloride (*o*-dianisidine)	317.2	Sigma
Di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate (Na_2HPO_4)	177.99	Riedel-de-Haen
Ethanol	46.07	Merck
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	372.24	Carlo Erba
Glycerol	92.09	Carlo Erba
Glycine	75.07	Fluka Chemika
Hydrochloric acid (HCl)	36.46	Riedel-de-Haen
Hydrogenperoxide (H_2O_2)	34.02	Riedel-de-Haen
L-ascorbic acid	176.13	UNILAB
2- mercaptoethanol	78.13	Merck

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	บริษัทผู้ผลิต
2-methoxyphenol (guaiacol)	124.1	Sigma
Methanol	32.04	Carlo Erba
N,N-methylene bisacrylamide	154.2	Merck
N,N,N,N-tetramethylenediamine (TEMED)	116.2	Sigma
L-Phenylalanine	165.19	Sigma
Phenylmethanesulfonyl fluoride	174.19	Sigma
Phosphoric acid	98.0	Baker Analyzed
Polyvinylpyrrolidone	PVP40	Sigma
Potato dextrose agar	-	Difco
Scopoletin	192.2	Sigma
Sephadex G-25	-	Sigma
Sodium acetate	136.08	Carlo Erba
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	105.99	Merck
Sodium chloride (NaCl)	58.44	BDH
Sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate (NaH_2PO_4)	156.01	Riedel-de-Haen
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	288.4	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	40.0	BDH
Syringaldazine	360.37	Sigma
Thioglycolic acid (Mercaptoacetic acid)	-	Sigma-Aldrich
Trans-cinnamic acid	148.16	Aldrich
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121.1	Merck

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง
2. กระบอกตวง ขนาด 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร
3. กล่องพลาสติกสำหรับเก็บแผ่นเจล
4. กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH 40 (Japan)
5. กล้องถ่ายรูป Nikon (Japan) และ coolpix4100 digital
6. ขวด duran ขนาด 0.1, 0.25, 0.5 และ 1 ลิตร
7. คอลัมน์ PD-10 (Pharmacia)
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
10. จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 และ 11 เซนติเมตร
11. ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร
12. ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)
13. บีกเกอร์ ขนาด 0.1, 0.25, 0.5, 1 และ 2 ลิตร
14. ปิเปตแก้ว ขนาด 2, 5 และ 5 มิลลิลิตร
15. ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิฟขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ Autoclave SS-320 Tomy (Japan)
17. Automatic fraction collector model 2110, Biorad (USA)
18. Centrifuge J2-21 operation, Beckman (USA)
19. Electrophoresis apparatus, ATTA Cooperation (Japan)
20. Freeze dryer และ Deep-freeze refrigerator, Sanyo (Japan)
21. Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)
22. Microtube pump MP-3 EYELA (Japan)
23. Orbital shaker incubator, Paton scientific model 013422 (South Australia)
24. pH meter Cyberscan 1000 (Singapore)
25. Power supply model 1000/500, Biorad (USA)
26. Shimazu UV-Vis recording spectrophotometer model UV160A (Japan)
27. Spectrofluorophotometer RF-1501 Shimadzu (Japan)
28. UV box, Vilber Lourmat (France)

วิธีการทดลอง

2.1 **การเตรียมเชื้อรา** *Phytophthora palmivora* (*P. palmivora*)

2.1.1 **การเตรียมเชื้อรา** *P. palmivora* **ให้บริสุทธิ์**

เชื้อรา *P. palmivora* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยยางสงขลา ทางศูนย์วิจัยยางสงขลาได้ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วง จากนั้นผู้วิจัยได้นำเชื้อรา *P. palmivora* ดังกล่าวมาทำการแยกให้บริสุทธิ์ (isolate) อีกครั้ง โดยการกระตุ้นการสร้างซูโอสปอร์ออกมา เพื่อให้ได้สปอร์เดี่ยว (monospore) แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA (Potato Dextrose Agar) ย้ายโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงบนอาหาร PDA อีกครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงต่อไปอีก 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส จึงจะสามารถนำไปใช้งานได้ (รูปที่ 13)

รูปที่ 13 เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ในอาหารแข็ง PDA ซึ่งเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.1.2 **การเตรียมซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora***

จากการเลี้ยงเชื้อราในข้อ 2.1.1 (บนอาหาร PDA) เมื่อต้องการซูโอสปอร์ สามารถกระตุ้นได้โดยการย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V_8 (รูปที่ 14) เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นสามารถกระตุ้นการสร้างซูโอสปอร์ได้โดยเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร บนสายราแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 30 นาที สปอร์แรงเจียมของเชื้อรา *P. palmivora* จะแตกออก และปล่อยให้ซูโอสปอร์ซึ่งอยู่ข้างในหลุดออกมาได้ จากนั้นนำซูโอสปอร์ที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$, $5x10^7$ และ $1x10^8$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวเจือจาง วิธีการหาความเข้มข้นของซูโอสปอร์ทำได้โดยการหยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีซูโอสปอร์ผสมอยู่บน Petroft Hauser counting chamber และนับจำนวนซูโอสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

$$\text{ความเข้มข้นของซูโอสปอร์ใน 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนซูโอสปอร์ทั้งหมดในพื้นที่}}{\text{ปริมาตรบน Petroft Hauser counting chamber}}$$

(ปริมาตร Petroft Hauser counting chamber คือ $4x10^{-6}$ มิลลิลิตร)

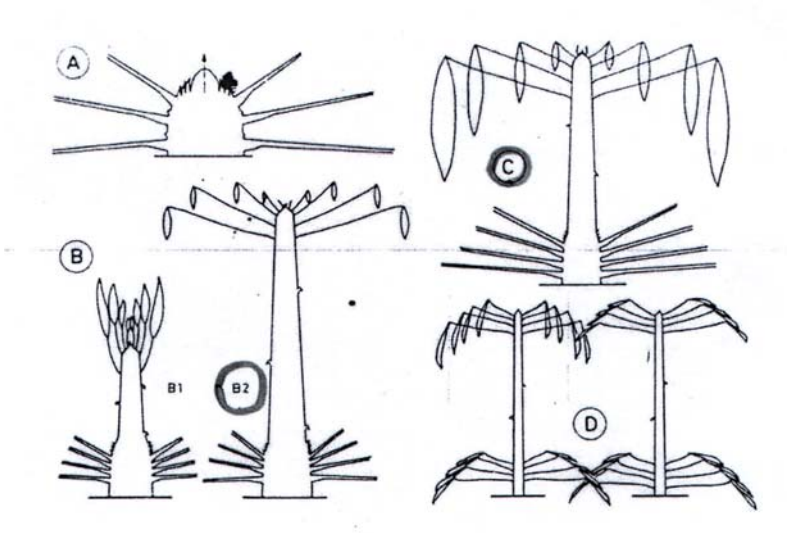
รูปที่ 14 ลักษณะของเชื้อรา *P. palmivora* ที่เจริญเติบโตในอาหารแข็ง V_8 ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.2 การเลือกใช้ใบยางในการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ยางพาราพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) พันธุ์ RRIT251 (พันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ) พันธุ์ PB235 (พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน) และพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) โดยจะคัดเลือกใบยางที่มีอายุอยู่ระหว่างขั้น B_2-C stage (Breton *et al*., 1997) (รูปที่ 15) โดยในการทดลองชุดเดียวกันการเลือกใบต้องมาจากต้นและกิ่งเดียวกัน ลักษณะใบต้องมีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ใบในชุดควบคุมและชุดทดลองต้องมาจากกิ่งเดียวกันเพื่อลดความแปรปรวนของผลการทดลอง และก่อนใช้ใบยางในการทดลองทุกครั้งต้องล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และซับให้แห้งเพื่อล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับใบยาง

ตารางที่ 3 ต้นกำเนิด (แม่ Xพ่อ) ของพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

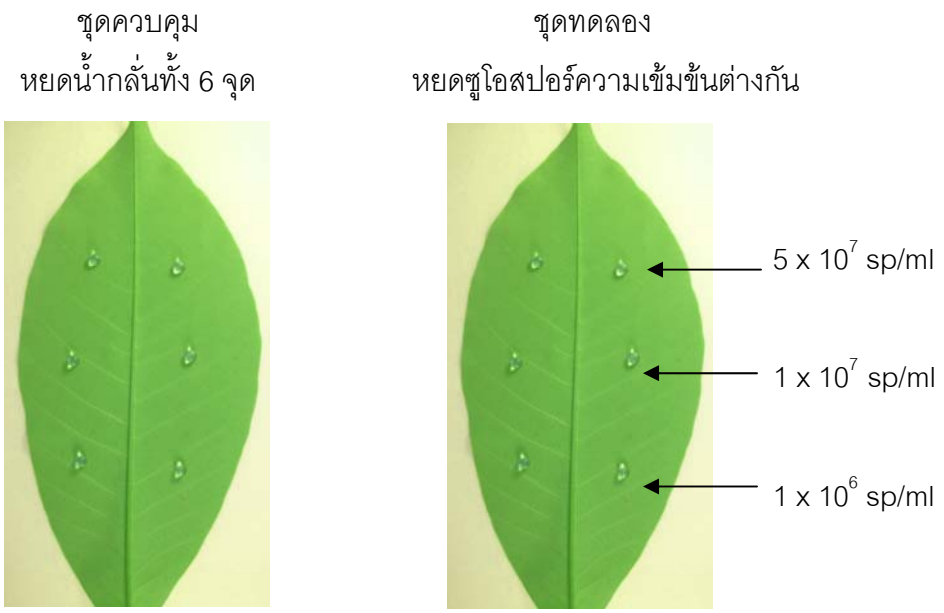
พันธุ์ยางพารา	แม่ X พ่อ	แหล่งกำเนิด
RRIM600	Tjir1 X PB86	ประเทศมาเลเซีย
RRIT251	ต้นกล้ายางจากแปลงเอกชน	ราชอาณาจักรไทย
(สถาบันวิจัยยาง 251)	ในจังหวัดสงขลา	
PB235	PB5/51 X PB S/78	ประเทศมาเลเซีย
BPM-24	GT1 X AVROS1734	สาธารณรัฐอินโดนีเซีย



รูปที่ 15 แผ่นภาพรูปแบบอายุใบยางพาราตั้งแต่ขั้นอายุ A, B, B1, B2, C และ D
(ที่มา : Breton *et al*., 1997)

2.3 การศึกษาลักษณะและขนาดรอยไหม้ (necrosis) หลังจากกระตุ้นใบยางพาราด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

นำซูโอสปอร์ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนได้ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร มาหยดบนหลังใบทางด้านซีกขวาของใบยาง เก็บใบยางในจานแก้วปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นเป็นตัวให้ความชื้น หยดซูโอสปอร์ความเข้มข้นละสองหยดต่อใบต่อพันธุ์ (พันธุ์ RRIM600 และ BPM-24) ปริมาตรหยดละ 20 ไมโครลิตร โดยใบยางพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) และพันธุ์ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) หยดซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร หยดเรียงตามความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนซูโอสปอร์โดยใช้ใบที่มาจากก้านเดียวกันกับใบยางชุดทดลอง (รูปที่ 16) วางไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างตลอดเวลา (day light 40 วัตต์) เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ซับหยดน้ำและซูโอสปอร์ออก ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบลักษณะและขนาดรอยไหม้บนใบยางทั้งสองพันธุ์ เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ในการทดลองต่อไป

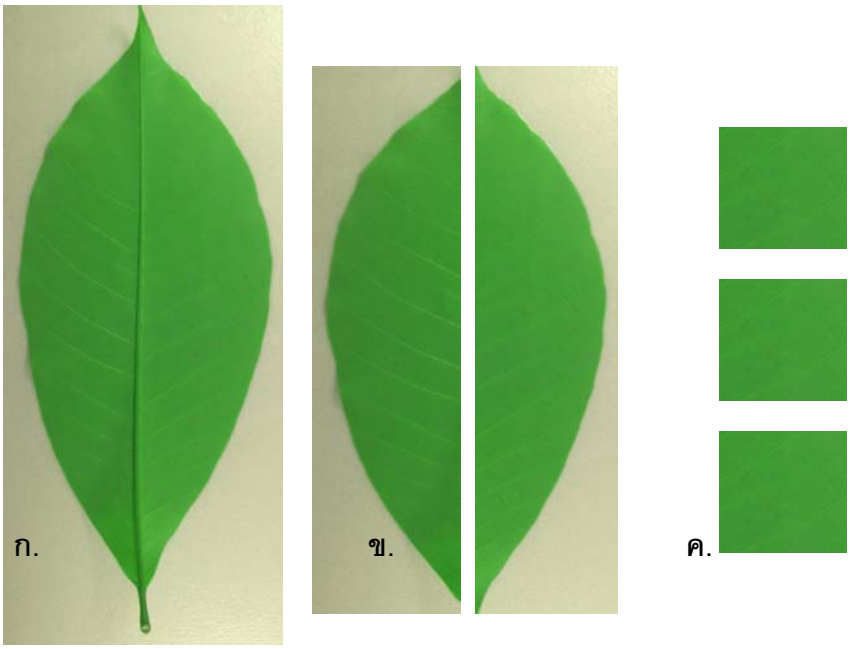


รูปที่ 16 การบ่มใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ BPM-24 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้นต่างๆ ในจานแก้วปราศจากเชื้อแต่ละใบวางหยดซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$ และ $5x10^7$ sp/ml ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (sp/ml = ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร)

2.4 การบ่มใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

2.4.1 การเตรียมใบยาง

นำใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ BPM-24 มาพันธุ์ละ 20-30 ใบ (อยู่ในกิ่งเดียวกัน) นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง แต่ละใบนำมาแบ่งครึ่งตามแนวยาว เป็นซีกซ้ายและซีกขวา หลังจากนั้นนำใบยางทั้งสองซีกมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร หรือ 1x1 ตารางนิ้ว ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการทดลอง โดยตัดให้ได้จำนวนชิ้นตาม time point ที่กำหนดไว้ในแต่ละวิธีการทดลอง นำชิ้นใบที่ตัดจากทางด้านซีกซ้ายทั้งหมดมาเป็นชุดควบคุม และซีกขวานำมาเป็นชุดทดลอง แต่ละ time point ก็จะได้ใบยาง 20-30 ชิ้น น้ำหนักประมาณ 2-3 กรัม แล้วแบ่งแต่ละชิ้นตามชั่วโมงที่จะเก็บผลการทดลอง เช่น 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 ลักษณะการตัดใบยางพารา

ก. รูปใบยางพาราที่สมบูรณ์

ข. ใบที่ตัดจากทางด้านซีกซ้ายทั้งหมดมาเป็นชุดควบคุมใบและด้านซีกขวาทั้งหมดมาเป็นชุดทดลอง

ค. ชิ้นใบสี่เหลี่ยมที่ตัดจากทางด้านซีกซ้ายและซีกขวา

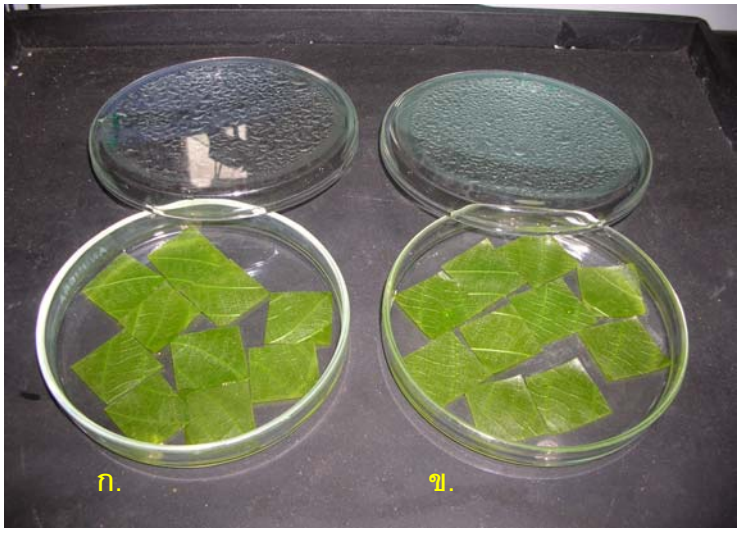
2.4.2 การบ่มใบยางพาราด้วยวิธีการแช่ใบในซูโอสปอร์

นำใบยางที่เตรียมได้ตามข้อที่ 2.4.1 ใส่จานแก้วขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 11 ซม.) แล้วนำมาแช่ซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (สำหรับใบยางพันธุ์ RRIM600) และแช่ซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร (สำหรับใบยางพันธุ์ BPM-24) ใช้ซูโอสปอร์ทั้งสองความเข้มข้น ปริมาตรจานละ 10 มิลลิลิตร โดยคว่ำทางด้านปากใบให้สัมผัสกับซูโอสปอร์ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง (เริ่มนับตั้งแต่ใบยางสัมผัสกับซูโอสปอร์) ให้หยิบชิ้นใบยางมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นนำใบยางมาวางบนถาดพลาสติกขนาด 30x30 ตารางเซนติเมตร ที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้น ส่วนชุดควบคุมให้แช่ในน้ำกลั่นแทนซูโอสปอร์ แล้วนำมาวางบนกระดาษกรองชื้นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ให้แสงอยู่ตลอดเวลา เมื่อบ่มใบยางครบตามเวลาที่ต้องการ คือ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง นำใบยางไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์หา PR-proteins ที่ถูกสร้างขึ้นต่อไปโดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

2.5 การศึกษาการสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

นำใบยางมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ซับให้แห้ง แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร โดยแบ่งเป็นชุดควบคุมและชุดทดลองอย่างละ 10 ชิ้น ซึ่งชุดทดลองจะแช่ชิ้นใบยางพันธุ์ RRIM600 ในซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนใบยางพันธุ์ BPM-24 แช่ในซูโอสปอร์ความเข้มข้น $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ใช้ซูโอสปอร์ทั้งสองความเข้มข้น ปริมาตรจานละ 5 มิลลิลิตร (รูปที่ 18) โดยคว่ำปากใบให้สัมผัสกับซูโอสปอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ จากนั้นจึงทำการเก็บสารละลายตัวอย่าง (น้ำแช่ใบยาง) ตามวิธีการทดลอง 2 แบบ คือ แบบสร้างใหม่ (newly synthesis) จะเก็บสารละลายตัวอย่าง แล้วเปลี่ยนน้ำกลั่นลงไปแทนที่เมื่อครบชั่วโมง 4, 8, 12, 16, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และแบบเก็บสะสม (accumulation) จะเก็บสารละลายตัวอย่างเมื่อครบตามเวลาที่กำหนด โดยไม่มีการแทนที่ด้วยน้ำกลั่น ส่วนชุดควบคุมแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เก็บสารละลายตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที แล้ววัดค่าการเรืองแสงของสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (λ excitation) 340 นาโนเมตร และความยาวคลื่นปลดปล่อย (λ emission) 440 นาโนเมตร

เปรียบเทียบปริมาณและอัตราเร็วในการสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) ของใบยางพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24



รูปที่ 18 การสังเคราะห์สคอพอลิติน (Scp) ที่เกิดจากการแช่ใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และ BPM-24 ด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรจานละ 5 ml (รูป ข) เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทน (รูป ก)

2.6 การตรวจหาปริมาณโปรตีนรวมและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (POD) จากสารสกัดใบยางพารา

2.6.1 การเตรียมสารสกัดใบยาง

นำใบยางชุดควบคุมและชุดทดลองที่บ่มด้วยซูโอสปอร์ ใส่ในครกขนาดเล็ก จากนั้นเติมไนโตรเจนเหลวปริมาตร 20 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตรครึ่งหนึ่งของน้ำหนักใบยางสด บดให้เข้ากัน ตักสารตัวอย่างที่บดได้ทั้งหมดใส่กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีสำลีบรรจุอยู่ คั้นเฉพาะน้ำจะได้สารละลายใบยาง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นกาก วัดปริมาตรส่วนใส แล้วนำสารสกัดจากใบยางไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford) (Bradford, 1976) และหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากนั้นนำไปกำจัดสีและไอออนต่างๆ ออกตามวิธีในข้อ 2.6.2 เพื่อเปรียบเทียบค่าโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก่อนและหลังกำจัดสีและไอออนต่างๆ

2.6.2 การกำจัดสีและไอออนต่างๆ ในสารสกัดจากใบยางพารา

การกำจัดสีและไอออนต่างๆ ในสารสกัดใบยางพารา ด้วยวิธีการทำบริสุทธิ์เพียงบางส่วน (partially purify) 3 วิธี ได้แก่ วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีการผ่านคอลัมน์ PD-10 และการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วนำมาผ่านคอลัมน์ PD-10 ซ้ำ

วิธีแรก คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 90% โดยเทียบปริมาตรของสารสกัดกับตารางการตกตะกอนเปอร์เซ็นต์เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วคำนวณหาน้ำหนักเกลือที่ต้องใช้ แล้วนำไปคนอย่างช้าๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ 4 °C จนเกลือละลายหมด แล้วนำสารละลายไปเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที นำส่วนตะกอนมาละลายกลับในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดปริมาตรครึ่งหนึ่งของสารสกัดเริ่มต้น

วิธีต่อไปนำสารสกัดจากใบยางพาราที่ได้มากำจัดสีและไอออนต่างๆ ออกด้วยคอลัมน์ PD-10 ซึ่งเป็นคอลัมน์สำเร็จรูปข้างในบรรจุ Sephadex G-25 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ปรับคอลัมน์ PD-10 ให้สมดุลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำสารสกัดจากใบยางพาราผ่านลงในคอลัมน์ PD-10 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วเก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD.280) รวมสารละลายหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงเข้าด้วยกัน (fraction 3 และ 4)

วิธีสุดท้าย คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ PD-10 ซ้ำ นำตะกอนที่ละลายกลับในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์ PD-10 ตามวิธีข้างต้น แล้วแบ่งสารละลาย (fraction 3 และ 4) ไว้ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด ตรวจหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และตรวจหาไอโซไซม์โดยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสทั้งแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) และแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ตามวิธีในข้อต่อไป

2.6.3 การหาปริมาณโปรตีนรวมจากสารสกัดใบยางพารา

สารละลาย Bradford : ละลาย Coomassie Blue G-250 100 มิลลิกรัม ใน ethanol 50 มิลลิลิตร และ 85% Phosphoric acid 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร กรองก่อนนำไปใช้

โปรตีนมาตรฐาน : ละลาย Bovine serum albumin (BSA) จำนวน 0.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น

นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายที่มีปริมาณของ BSA เท่ากับ 10, 20 ,30, 40, 60, 80 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ

วิธีวัดปริมาณโปรตีน : ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร และสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

2.7 การศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL)

การหาความว่องไวของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (PAL) โดยดัดแปลงตามวิธีการของ D' Cunha และคณะ (1996) ทำการทดลองโดยใช้ปฏิกิริยารวม 3 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl, pH 8.5 ที่มี 1 mM 2-mercaptoethanol และ 100 mM L-phenylalanine ปริมาตร 2.935 มิลลิลิตร แล้วเติมสารสกัดใบยางปริมาตร 0.015 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอุ่นพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 6 N กรดไฮโดรคลอริก 0.050 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณความว่องไวของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) โดยให้ 1 หน่วยของความว่องไวของเอนไซม์ PAL หมายถึง ปริมาณ 1 ไมโครโมลของกรดซินนามิกที่เกิดขึ้นต่อหนึ่งชั่วโมง

2.8 การศึกษาการสังเคราะห์ PR-proteins (เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส : POD) ที่เกิดจากการกระตุ้นใบยางด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora*

วัดความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้ *o*-dianisidine ตามวิธีของ Shannon และคณะ (1966) ทำการทดลองโดยการนำสารสกัดจากใบยางในขั้นตอนต่างๆ ที่ต้องการหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (เจือจางให้เหมาะสมก่อนนำมาทดสอบ) ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium acetate , pH 5.4 ปริมาตร 2.775 มิลลิลิตร และ 0.25% *o*-dianisidine 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติม 0.1 M H_2O_2 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร ด้วย UV-VIS spectrophotometer (Shimazu รุ่น 160A) บันทึกค่าทุกๆ 15 วินาที จนครบ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยให้ 1 หน่วยของความว่องไว หมายถึง เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของ *o*-dianisidine ใน

เวลา 1 นาที ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ *o*-dianisidine เป็นสับสเตรทของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 11.3 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Saeki *et al*., 1986)

2.9 การวัดความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา โดยใช้สับสเตรทเป็น *o*-dianisidine guaiacol ascorbate coniferyl alcohol และ syringaldazine

นำสารสกัดที่ผ่านคอลัมน์ PD-10 (sephadex G-25) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร (เจือจางให้เหมาะสม) มาทดสอบหาค่าความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 0.25% (w/v) *o*-dianisidine 0.1 M H_2O_2 ใน sodium acetate , pH 5.4 แล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่มี 0.25% (v/v) guaiacol 0.1 M H_2O_2 ในบัฟเฟอร์ potassium phosphate , pH 7.0 ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง เท่ากับ 26.6 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Perez *et al*., 2002) ส่วน ascorbate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสง เท่ากับ 2.8 $mM^{-1}cm^{-1}$(Converso and Fernandez, 1995) ในปฏิกิริยาของ coniferyl alcohol ประกอบด้วย 0.1 mM coniferyl alcohol 0.5 mM H_2O_2 ใน 0.05 M sodium acetate , pH 5.0 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง เท่ากับ 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Barcelo and Aznar-Asensio, 1999) และในปฏิกิริยาที่ใช้ syringaldazine ประกอบด้วย 20 ไมโครโมลาร์ syringaldazine 0.05 mM H_2O_2 ในบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium phosphate , pH 7.4 ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง เท่ากับ 27 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Quiroga *et al*., 2000) จากนั้นคำนวณและเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสระหว่างสารตั้งต้นแต่ละชนิด

2.10 การตรวจหาไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสจากสารสกัดใบยางพารา

การตรวจหาไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดส ทำได้โดยการแยกด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟริซีสทั้งแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) และแปลงสภาพ (SDS-PAGE) แล้วย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (พัชรากร รัตนภูมิ, 2543) โพลิอะคริคาไมด์เจลที่ใช้ในการศึกษาเป็นเจลแบบแผ่น (slab gel) ขนาด 7×8 ซม. หนา 0.75 มม. ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ เจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 ซม. และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 6 ซม. ซึ่งมีวิธีการอย่างละเอียดดังนี้

2.10.1 **การทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบไม่แปลงสภาพ** (native PAGE)

การตรวจหาไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนในโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟริซีส ทำได้โดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1964) ซึ่งใช้เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.063 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน ใช้โพลิอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7% ใน 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง เตรียมสารละลายโปรตีนที่ได้จากสารสกัดและโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลโดยผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ native PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์ตัวอย่างประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl , pH 6.8 , 8 mM EDTA , 40% glycerol และ 0.4% bromophenol blue หลังจากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 15 ไมโครกรัมต่อ 1 ช่องเจล สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟริซีส คือ 0.025 M Tris-HCl ที่มี 0.2 M glycine , pH 8.3 กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ต่อเจล 1 แผ่น รอจนสี bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ปิดกระแสไฟฟ้าย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจลด้วย Coomassie brillient blue R-250 , 50% เมทานอล และ 7.5% กรดอะซิติก นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลายผสมของ เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของเจลอิเล็คโตรโฟริซีสแบบไม่แปลงสภาพ (native PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (3%)	Separating gel (7%)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.50 ml	3.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.25 ml
10% Ammonium persulfate	50 μl	200 μl
0.2 M EDTA	50 μl	200 μl
TEMED	10 μl	13 μl
Distilled water	3 ml	6 ml
Total volume	5 ml	13 ml

2.10.2 การทำอิเล็คโตรโฟริซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

ใช้โพลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.125 M Tris-HCl , pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน ใช้โพลิอะคริละไมด์เจลความเข้มข้น 7% ใน 0.375M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง เตรียมสารละลายโปรตีนจากสารสกัด โดยการผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์ตัวอย่างประกอบด้วย 0.2 Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 4% glycerol, 40% SDS, 4% β-mercaptoethanol และ 0.4% bromophenol blue ใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 15 ไมโครกรัมต่อเจล 1 ช่อง ทำอิเล็คโตรโฟริซีสใน 0.025 M Tris, 0.2 M glycine, 1% SDS, pH 8.3 หลังจากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับใน Native PAGE

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของเจลอิเล็คโตรโฟริซีสแบบแปลงสภาพ (SDS–PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (3%)	Separating gel (7%)
30%Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.50 ml	3.00 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	3.25 ml
10% Ammonium persulfate	50 μl	200 μl
0.2 M EDTA	50 μl	200 μl
10% SDS	50 μl	200 μl
TEMED	10 μl	13 μl
Distilled water	3 ml	6 ml
Total volume	5 ml	13 ml

2.10.3 การย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็คโตรโฟริซีส

กรณีที่เป็นการแยกโดย native PAGE นำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 0.25% *o*-dianisidine ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และ 0.1 M H_2O_2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แช่แผ่นเจลในสารละลายนี้เป็น

เวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แถบโปรตีนที่มีเปอร์ออกซิเดสอยู่จะมีสีน้ำตาลแดง-ส้ม

ในกรณีที่เป็นการแยกโดย SDS-PAGE จะต้องนำแผ่นเจลไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ โดยแช่แผ่นเจลในบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 นาน 30 นาที เพื่อขจัด SDS ออก แล้วจึงนำไปย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยนำแผ่นเจลมาแช่ในสารละลายเดียวกับอิเล็คโตรโฟริซีสแบบ native PAGE

2.10.4 ตรวจหาไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค (เฉพาะไอโซไซม์ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *P. palmivora*) ในใบยางพาราทั้งสองพันธุ์

นำใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 (พันธุ์อ่อนแอ) และ BPM-24 (พันธุ์ต้านทาน) มาตัดเป็น 2 ซีก แล้วแช่ซีกขวาในซูโอสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง ซับให้แห้ง แล้ววางบนกระดาษกรองที่มีน้ำกลั่นเป็นตัวให้ความชื้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมคือใบยางพาราซีกซ้าย ซึ่งนำมาวางบนจานแก้วที่มีกระดาษกรองและน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวให้ความชื้นโดยไม่แช่ซูโอสปอร์ จากนั้นสกัดโปรตีนตามวิธีในข้อ 2.6.3 แล้วนำสารละลายที่ได้มาตรวจหาไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีในข้อ 2.10.2 และวิเคราะห์แถบโปรตีนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของชุดทดลองที่แตกต่างจากชุดควบคุม

2.10.5 ทำบริสุทธิ์เฉพาะไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา

การทำบริสุทธิ์เฉพาะไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดส ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา ทำได้โดยนำแผ่นเจลที่ได้จาก native PAGE มาแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M sodium acetate, pH 5.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 0.25% *o*-dianisidine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 0.1 M H_2O_2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยแช่แผ่นเจลไว้ในสารละลายนี้เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นนำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จะเห็นแถบโปรตีนที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นสีน้ำตาลแดง-ส้ม แล้วนำมาเทียบกับเจลอีกแผ่นที่ยังไม่ได้ย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตัดเจลเฉพาะส่วนที่มีความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสไปบดในบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000

รอบ/นาที นาน 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดเจลแต่ละส่วนไปหาความว่องไวของเปอร์ออกซิเดสและโปรตีนตามข้อ 2.6 แล้วจึงนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซีสแบบ native PAGE และ SDS-PAGE ตามลำดับ

2.11 ศึกษา substrate specificity ของไอโซไซม์ของเปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของยางพารา

นำสารละลายที่ได้จากสารสกัดใบยางมาย้อมความว่องไวของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อใช้สับสเตรทที่แตกต่างกัน ได้แก่ *o*-dianisidine guaiacol ascorbate coniferyl alcohol scopoletin และ syringaldazine สำหรับ *o*-dianisidine coniferyl alcohol และ acorbate จะใช้ปฏิกิริยาเดียวกับการหาค่าความว่องไวในข้อ 2.9 แต่เพิ่มปริมาตรของปฏิกิริยารวมตามความเหมาะสม ส่วน guaiacol จะใช้ 0.05 M Tris HCl, pH 6.8 แล้วทำปฏิกิริยากับ 0.1 M H_2O_2 และ guaiacol เข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เปรียบเทียบไอโซไซม์ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ปรากฏ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาปฏิกิริยา lignification ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องใน plant defense ต่อไป

2.12 ศึกษาปฏิกิริยา lignification ในใบยางพันธุ์อ่อนแอ (RRIM600) และพันธุ์ต้านทาน (BPM-24) ด้วยการตรวจหาปริมาณลิกนินโดยใช้วิธีของ Bruce และ West (1989)

นำใบยางพาราพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ BPM-24 มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ซับให้แห้ง แล้วแบ่งเป็นสองซีก คือ ซีกซ้าย (ชุดควบคุม) และซีกขวา (ชุดทดลอง) นำทั้งสองซีกมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 ตารางนิ้ว ซึ่งชุดทดลองจะแช่ในสารละลายซูโอสปอร์ความเข้มข้น $1x10^7$ และ $5x10^7$ ซูโอสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง (นับตั้งแต่ใบยางสัมผัสซูโอสปอร์) นำใบยาง 0.7 กรัม มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วปั่นในเมทานอล 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวทั้งหมดมาผ่านกระดาษกรอง นำกากที่ได้บนกระดาษไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำกากแห้งของใบมา 50 มิลลิกรัม มาเติมกรดไฮโดรคลอริก 2 N ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และกรดไธโอไกลคลอริกปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดในหลอดทดลองที่ปิดฝาสนิทไปวางในน้ำเดือด 4 ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งสารละลายใสปราศจากสี เติม 0.5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อสกัดลิกนินไธโอไกลคอเลท หลังจากนั้นนำสารละลายมาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว

3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำส่วนใสมาเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ลิกนินไธโอไกลคลอลิกตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ได้ตะกอนสีน้ำตาล-ส้ม ละลายตะกอนที่ได้ใน 0.5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ปริมาณลิกนินแสดงเป็นหน่วยการดูดกลืนแสงต่อน้ำหนักของใบยางพาราแห้งที่ใช้สกัดลิกนิน [(OD_{290}) / 50 mg dry mass]