บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะของเอื้องน้ำต้นที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง คือ **การทดลองที่ 1** การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา **การทดลองที่ 2** การศึกษาความผันแปรของลักษณะหัว ใบ และดอก **การทดลองที่ 3** การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา **การทดลองที่ 4** การศึกษาเซลล์วิทยา และ **การทดลองที่ 5** การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

อุปกรณ์และวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอื้องน้ำต้นที่รวบรวมมาจากแหล่งเจริญเติบโตและกระจายพันธุ์ 3 แหล่ง ซึ่งมีสภาพทางนิเวศวิทยาที่แตกต่างกัน

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ เอื้องน้ำต้นที่คัดจากต้นที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์โดยสุ่มจากต้นที่คัดเลือกไว้ให้ได้ต้นที่เป็นตัวแทนของแหล่งเจริญเติบโตและกระจายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 3 แหล่ง แหล่งละ 5 ต้น โดยที่ให้รหัสของกลุ่มที่กระจายพันธุ์ในแหล่งที่มีความสูงประมาณ 800, 1,000 และ 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล เป็นกลุ่ม HCC08, HCC10 และ HCC12 ตามลำดับ

1.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ สมุด ไม้บรรทัด ยางลบ เวอร์เนีย ดินสอดำ HB และ 2B สำหรับร่างภาพ ปากกาหมึกซึมขนาดไส้ 0.1 และ 0.05 มม กระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช แว่นขยาย มีดผ่าตัด และปากคีบ

1.2 วิธีการ

1.2.1 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของส่วนประกอบของต้นพืชทดลองซึ่ง ได้แก่ ราก หัว ใบ ดอก ช่อดอก และฝัก โดยบันทึกข้อมูลดังกล่าวจากต้นพืชทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหล่งละ 5 ต้น ในระยะที่ส่วนต่างๆ ของต้นพืช เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว พร้อมทั้งวาดภาพทางพฤกษศาสตร์ของส่วนประกอบเพื่อแสดงรายละเอียดเสริมให้กับภาพถ่ายให้ได้ความชัดเจนของลักษณะให้มากขึ้น

1.2.2 บันทึกจำนวนและขนาดของส่วนประกอบต่างๆ ของต้นพืชดังนี้

1.2.2.1 **หัว** นับจำนวนหัวต่อต้น จำนวนปล้องของหัว จำนวนสันของหัว และวัดขนาดหัว

1.2.2.2 **ต้น** วัดความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายของใบที่ยาวที่สุด

1.2.2.3 **ใบ** นับจำนวนใบต่อต้น และวัดความกว้างและความยาวของใบที่ 3 จากโคนต้น

1.2.2.4 **ช่อดอก** วัดความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของก้านช่อดอก และนับจำนวนดอกต่อช่อ

1.2.2.5 **ดอก** วัดความกว้างของดอกจากตำแหน่งที่กว้างที่สุดของดอก จากปลายสุดของกลีบเลี้ยงด้านบนถึงปลายกลีบปากด้านล่าง ส่วนความยาวของดอกวัดจากปลายกลีบเลี้ยงด้านซ้ายถึงปลายกลีบเลี้ยงด้านขวา วัดความกว้างและความยาวของกลีบเลี้ยง กลีบดอก กลีบปากของดอก ความยาวของก้านดอกย่อย ความกว้างและความยาวของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณู ความกว้างและความยาวของฝาอับเรณูของดอกที่บานเต็มที่ ในระยะของวันที่ 3 ของการบานของดอก และกลีบดอกยังไม่เปลี่ยนสี

1.2.2.6 **ฝัก** วัดความกว้างและความยาวของฝักที่แก่เต็มที่ แต่ฝักยังไม่แตก

การทดลองที่ 2 การศึกษาความผันแปรของลักษณะหัว ใบ และดอก

การศึกษาความผันแปรของลักษณะหัว ใบ และดอกของเอื้องน้ำต้น ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาที่กระทำกับประชากรเอื้องน้ำต้นซึ่งเจริญเติบโตในแปลงรวบรวมพันธุ์ซึ่งปลูกเลี้ยงต้นพืชที่รวบรวมมาจากแหล่งเจริญเติบโตและกระจายพันธุ์ทั้ง 3 แหล่งดังระบุในการทดลองที่ 1

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ ต้นเอื้องน้ำต้นที่มีลักษณะของหัว ใบ และดอกที่มีรูปทรงที่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 อุปกรณ์ ได้แก่ สมุด ไม้บรรทัด เวอร์เนีย ยางลบ ดินสอดำ HB และ 2B สำหรับใช้ร่างภาพ ปากกาหมึกซึมขนาดไส้ 0.1 และ 0.05 มม กระดาษสำหรับวาดภาพส่วนประกอบของต้นพืช แว่นขยาย มีดผ่าตัด และปากคีบ

2.2 วิธีการ

บันทึกภาพและวาดภาพทางพฤกษศาสตร์ของส่วนประกอบของหัว ใบ และดอกของเอื้องน้ำต้นที่แสดงลักษณะของการผันแปรและลักษณะที่หลากหลายของอวัยวะดังกล่าว แล้วนำความผันแปรของลักษณะมาเปรียบเทียบเพื่อแสดงความหลากหลายในลักษณะของส่วนประกอบของอวัยวะของต้นพืชที่เจริญเติบโตและกระจายพันธุ์ในระบบนิเวศน์ที่แตกต่างกันดังระบุไว้ในการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยา

ศึกษาลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อของราก ลำต้น ใบ ดอก และฝัก ของเอื้องน้ำต้นแล้วเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวของต้นพืชที่นำมาจากระบบนิเวศวิทยาที่แตกต่างกันดังระบุไว้ในการทดลองที่ 1 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อที่ตัดตามขวางและตามยาวของอวัยวะดังกล่าวตามวิธีการศึกษาเนื้อเยื่อแบบ paraffin embedding ที่บรรยายไว้โดย Johansen (1940) และ Sass (1966)

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1.1 เครื่องตัดชิ้นส่วนพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

3.1.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting microscope และ stereo microscope พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.1.3 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 ˚ซ

3.1.1.4 แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

3.1.1.5 เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 ˚ซ

3.1.1.6 แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่แช่ในพาราฟินจนอิ่มตัว ภายในตู้อบปรับอุณหภูมิ

3.1.1.7 กระดาษเคลือบมันใช้พับเป็นรูปแม่พิมพ์สำหรับฝังชิ้นส่วนพืช

3.1.1.8 แผ่นกระจกสไลด์ (slide) และแผ่นกระจกปิดสไลด์ (cover slip)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1.9 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดใส่ชิ้นส่วนพืช บีกเกอร์ และขวดย้อมสี

3.1.1.10 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ป้ายติดกาว พู่กันขนอ่อน มีดผ่าตัด ปากคีบ และเข็มเขี่ย

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixtative) ได้แก่ FAA (formalin - acetic acid - alcohol) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

95% ethyl alcohol	50	มิลลิลิตร (มล)
glacial acetic acid	5	มล
formalin	10	มล
น้ำกลั่น	35	มล

3.1.2.2 น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสารเคมีในน้ำยาที่ใช้สำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์พืชในแต่ละขั้นตอน

ขั้นตอน	ปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์ (%)	95 % ethyl alcohol (มล)	100 % ethyl alcohol (มล)	tertiary butyl alcohol (TBA)(มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2.3 สารตัวกลางที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อ (embedding media) ได้แก่ Paraplast

3.1.2.4 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

เตรียมน้ำยาเข้มข้น โดยการนำไข่ไก่มาแยกเอาเฉพาะส่วนของไข่ขาวเพียงอย่างเดียว นำไปตีจนเกิดฟองและมีลักษณะเหลวไม่ข้นเป็นก้อน จากนั้นใช้ช้อนตัก

เอาส่วนที่เป็นฟองทิ้งไปแล้วเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวนำไปกรองผ่านกระดาษกรองหรือสำลีอีกครั้ง เพื่อกรองเอาชิ้นส่วนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ในไข่ขาวหรือตะกอนทิ้งไป เนื่องจากชิ้นส่วนหรือตะกอนดังกล่าวอาจจะติดกับแผ่นกระจกอยู่ใต้เนื้อเยื่อทำให้เนื้อเยื่อพืชฉีกขาด หรือเกิดรอยตำหนิเมื่อนำเนื้อเยื่อไปย้อมสี นอกจากนี้อาจจะทำให้เนื้อเยื่อพืชติดกับแผ่นสไลด์ไม่แนบแน่น เมื่อย้อมสีจะได้เนื้อเยื่อที่มีบางส่วนเป็นรอยย่น จากนั้นนำไข่ขาวที่ผ่านการกรองแล้วบรรจุลงขวดปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °ซ เพื่อรอใช้งานต่อไป และเมื่อจะใช้จึงนำน้ำยาเข้มข้นที่เตรียมไว้นั้นมาเจือจาง โดยใช้น้ำยาเข้มข้น 1 มล มาเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มล แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองทุกครั้งเมื่อเตรียมน้ำยาเจือจางก่อนนำไปใช้ เนื่องจากโปรตีนของไข่ขาวจะตกตะกอนอยู่ตลอดเมื่อเก็บเอาไว้นาน ๆ

3.1.2.5 สีย้อมเนื้อเยื่อใช้สี Delafield's hematoxylin ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้

aluminium sulfate [$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$]	400	มล
hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$)	4	กรัม
95% ethyl alcohol	25	มล
methyl alcohol	100	มล
glycerol	100	มล

3.1.2.6 น้ำยาทำให้เนื้อเยื่อสะอาด (clearing reagent) คือ xylene

3.1.2.7 สารตัวกลางสำหรับปิดแผ่นกระจกสไลด์ (mounting media) คือ Canada balsam

3.2 วิธีการ

การเตรียมสไลด์ถาวรของชิ้นส่วนพืชมีขั้นตอนของวิธีการดังนี้

3.2.1 เก็บตัวอย่างของราก ลำต้น ใบ ดอก และ ฝักของพืชทดลองมาแช่ใน FAA ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วเพื่อฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ให้ใกล้เคียงกับเซลล์ในสภาพปกติให้มากที่สุด ในกรณีที่ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาแช่น้ำยามีขนาดใหญ่มาก ใช้มีดผ่าตัดหรือใบมีดโกนตัดชิ้นส่วนพืชให้มีขนาดที่เล็กลงประมาณ 0.5 x 0.5 ซม เพื่อให้น้ำยาสามารถซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้อย่างทั่วถึงและรวดเร็ว จากนั้นนำขวดที่แช่ชิ้นส่วนพืชดังกล่าวไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อ วิธีการนี้ช่วยให้น้ำยาแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้อย่างทั่วถึงก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ต่อไป ส่วนระยะเวลาในการแช่น้ำยาจะขึ้นอยู่กับสภาพของเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พืช ถ้าเป็นเป็นเนื้อเยื่อที่อ่อนการแช่เนื้อเยื่อในน้ำยาเพียง 18 – 24 ชั่วโมงก็เพียงพอ แต่ถ้าเนื้อเยื่อมีความแข็งควรแช่ไว้นาน 1 – 2 สัปดาห์ หรือนานกว่านี้ขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อพืช

3.2.2 นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยผ่านขั้นตอนของน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำยา 50, 70, 85, 95 และ 100 % จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่าน 100 % TBA ตามด้วยน้ำยาที่ประกอบด้วย TBA และพาราฟินเหลวในอัตราส่วน 1:1 ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาในการแช่เนื้อเยื่อ 1 คืน ยกเว้นในขั้นตอนที่ระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 100 % ซึ่งน้ำยานี้ผสมสี erythrosin ลงไปด้วยเพื่อให้เนื้อเยื่อติดสี ซึ่งจะช่วยให้การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินง่ายขึ้น เนื่องจากเห็นเนื้อเยื่อในพาราฟินได้ชัดเจน ควรจะแช่ในน้ำยาระดับนี้ให้นานพอที่ชิ้นส่วนจะติดสีทั่วถึง เมื่อผ่านน้ำยาต่าง ๆ เรียบร้อยแล้วจึงถึงขั้นตอนของการแทรกพาราฟินเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration)

3.2.3 เทน้ำยาในขวดแก้วออกให้หมดและระวังอย่าให้ชิ้นส่วนพืชหล่นเทพาราฟิน ที่หลอมเอาไว้ก่อนหน้านี้ลงในขวดแก้วจนท่วมชิ้นส่วนพืช จากนั้นนำขวดแก้วดังกล่าวไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 56 ˚ซ นานประมาณ 1 สัปดาห์หรือมากกว่า จนกระทั่งพาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อเต็มที่

3.2.4 เตรียมแม่พิมพ์สำหรับฝังชิ้นส่วนพืช โดยใช้กระดาษเคลือบมันตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 5 x 7 ซม หรือมากกว่า ขนาดของกระดาษเปลี่ยนแปลงได้ตามขนาดของชิ้นส่วนพืช พับกระดาษให้เป็นทรงสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ให้เป็นเบ้าเพื่อฝังพาราฟิน จากนั้นใช้กระดาษกาวปิดตามรอยพับของกระดาษเพื่อป้องกันการรั่วซึมของพาราฟินในขณะที่ฝังชิ้นส่วนพืช

3.2.5 นำชิ้นส่วนพืชมาฝังในพาราฟิน โดยนำพาราฟินที่หลอมเอาไว้เทลงในแม่พิมพ์ เอาชิ้นส่วนพืชใส่ลงไปแล้วจัดวางตำแหน่งของชิ้นส่วนให้อยู่ในแนวตั้งหรือแนวนอนตามที่ต้องการ

3.2.6 นำแท่งพาราฟินดังกล่าวที่แข็งตัวดีแล้วไปตัดแต่งให้เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยม ที่มีชิ้นส่วนพืชอยู่ตรงกลางแท่ง จากนั้นนำมาติดกับแท่งไม้แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน โดยตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 13-15 ไมครอน

3.2.7 นำแถบเนื้อเยื่อ (paraffin ribbon) ที่ตัดได้ ติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ด้วยน้ำยายึดเนื้อเยื่อพืช วางแผ่นกระจกสไลด์บนเครื่องอุ่นจนแถบชิ้นส่วนพืชแผ่ออกจนตึง จากนั้นซับเอาน้ำยาส่วนเกินออกเพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศแทรกอยู่กับแถบเนื้อเยื่อ ทิ้งเอาไว้จนแผ่นกระจกสไลด์แห้งเพื่อให้แถบเนื้อเยื่อติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์ และเพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อหลุดจากแผ่นกระจกไสลด์ในขั้นตอนการย้อมสี เมื่อแห้งแล้วนำไปเก็บไว้ในที่แห้งและไม่มีฝุ่นอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปย้อมสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.8 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อแล้วมาผ่านการละลายพาราฟินโดยแช่ใน xylene ให้พาราฟินละลายออกจากเนื้อเยื่อจนเนื่อเยื่อสะอาดก่อน แล้วจึงนำไปย้อมสี

3.2.9 นำกระจกสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีเนื้อเยื่อเรียบร้อยแล้วมาปิดด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด ทิ้งไว้ให้แห้ง

3.2.10 เมื่อแผ่นกระจกสไลด์แห้งสนิท นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

การทดลองที่ 4 การศึกษาเซลล์วิทยา

ศึกษาโครโมโซมจากเนื้อเยื่อปลายรากของพืชทดลองดังระบุไว้ในการทดลองที่ 1 ด้วยวิธี Feulgen's squash ที่ดัดแปลงเพื่อการศึกษาโครโมโซมปลายรากของเอื้องน้ำต้นโดยจารุวรรณ (2550)

4.1 วัสดุและอุปกรณ์

4.1.1 ปลายรากของพืชทดลอง

4.1.2 ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับเก็บตัวอย่างปลายรากพร้อมฝาปิด

4.1.3 แผ่นกระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์

4.1.4 ปรอทวัดความร้อน

4.1.5 น้ำกลั่น

4.1.6 อ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ

4.1.7 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ กระติกน้ำแข็ง กรรไกร ปากคีบ เข็มเขี่ย หลอดดูดสาร กระบอกตวงสารเคมี และน้ำยาเคลือบเล็บ

4.1.8 กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ photomicroscope

4.1.9 สารเคมี

4.1.9.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับหยุดวงชีพเซลล์ (pre-treatment) ได้แก่ para-dichlorobenzene (PDB)

4.1.9.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาในการรักษาสภาพเซลล์ (fixtative) คือ 95 % ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1

4.1.9.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับย่อยแยกเซลล์ (hydrolytic solution) คือ hydrochloric acid เข้มข้น 1 นอร์มอล (1 N HCl)

4.1.9.4 สีที่ใช้ย้อมโครโมโซม คือ carbol fuchsin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 วิธีการ

4.2.1 เตรียมปลายรากโดยเลือกรากที่กำลังเจริญเติบโต คือ ปลายรากที่เริ่มงอกออกมายาวประมาณ 1 ซม ตัดมาเฉพาะส่วนปลายเพียง 3-5 มม โดยเก็บตัวอย่างปลายรากในช่วงระยะเวลาประมาณ 8.00 น ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวในระยะเมตาเฟสมาก

4.2.2 นำปลายรากมาล้างเอาเศษดินที่ติดอยู่ออกด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด แล้วนำไปหยุดวงชีพเซลล์ โดยการแช่ปลายรากในสารละลาย PDB เพื่อยับยั้งการเกิดเส้นใยสปินเดิล และช่วยให้โครโมโซมในระยะการแบ่งเซลล์ดังกล่าวเกิดการหดตัวได้อย่างเต็มที่ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °ซ

4.2.3 เมื่อแช่ปลายรากจนครบตามเวลาที่กำหนด นำปลายรากออกมาจากสารละลาย PDB ล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ เพื่อตรึงเซลล์เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

4.2.4 ย่อยเซลล์ให้แยกจากกันโดยการแช่รากใน 1 N HCl นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °ซ แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่น

4.2.5 ย้อมเนื้อเยื่อปลายรากในสารละลายสี carbol fuchsin โดยแช่ปลายรากไว้ในน้ำยาสีนาน 30 นาที หลังจากนั้นคีบเนื้อเยื่อวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วใช้เข็มเขี่ยตัดเฉพาะส่วนปลายรากให้ยาวประมาณ 1 มม เขี่ยส่วนเกินทิ้งไป หยดสี 1 หยด ลงบนเนื้อเยื่อแล้วใช้เข็มเขี่ยเคาะหรือกดเนื้อเยื่อเบา ๆ เพื่อให้กลุ่มเซลล์ที่อยู่บริเวณปลายรากกระจายออกจากกัน คีบเศษเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ทิ้ง เพื่อป้องกันการปิดแผ่นกระจกไม่สนิทและไม่เป็นระนาบเดียวกัน จากนั้นปิดแผ่นกระจกปิดสไลด์บนบริเวณที่มีเนื้อเยื่อ ถ้าเกิดฟองอากาศด้านในให้ใช้ด้ามเข็มเขี่ยเคาะเบาๆ เพื่อไล่เอาฟองอากาศออกให้หมด วางกระดาษซับลงบนแผ่นปิดกระจกสไลด์แล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดลงไปเบา ๆ เพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัวแล้วซับเอาสีส่วนเกินออก จากนั้นใช้น้ำยาเคลือบเล็บทาบริเวณขอบโดยรอบของแผ่นกระจกปิดสไลด์ เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อแห้งและกันอากาศเข้าไปภายใน

4.2.6 นำแผ่นกระจกสไลด์ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสในระยะเมตาเฟสและมีการกระจายตัวของโครโมโซมดี สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างแม่นยำ ถ้าโครโมโซมไม่อยู่ในระนาบเดียวกันให้ใช้กระดาษซับพับหลายชั้นวางบนแผ่นกระจกปิดสไลด์ แล้วใช้ด้ามเข็มเขี่ยกดหรือเคาะเบา ๆ ตรงตำแหน่งของโครโมโซมดังกล่าวให้โครโมโซมแบนและอยู่ในระนาบเดียวกัน เมื่อได้เซลล์ที่ต้องการและโครโมโซมอยู่ในระนาบที่ต้องการแล้ว ให้นำเอาแผ่นกระจกสไลด์ไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สามารถบันทึกภาพได้ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมและบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 5 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชทดลองดังระบุในการทดลองที่ 1 โดยศึกษาจากเนื้อเยื่อของใบและใช้เอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, POX , SKD และ SOD ตามวิธีการของพสุ (2546) และสุทธินันท์ (2548)

5.1 วัสดุและอุปกรณ์

5.1.1 พืชทดลอง คือ ต้นเอื้องน้ำต้นที่เป็นตัวแทนของต้นพืช กลุ่ม HCC 08, HCC 10 และ HCC 12

5.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

5.1.2.2 โกร่งบดตัวอย่างพืช

5.1.2.3 ไนโตรเจนเหลว และถังบรรจุ

5.1.2.4 ตู้แช่แข็งที่ปรับอุณหภูมิเป็น -20 ° ซ และตู้เย็น

5.1.2.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

5.1.2.6 เครื่องเขย่าสาร

5.1.2.7 เครื่องวัดความเป็นกรด / ด่างของสารละลาย

5.1.2.8 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ slab gel

5.1.2.9 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Model 1000/500

5.1.2.10 ตู้บ่ม (incubator)

5.1.2.11 ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

5.1.2.12 หลอดใส่สาร (Eppendrof tube) ขนาด 1.5 มล

5.1.2.13 ชุดอ่านเจล (visible light transilluminator)

5.1.2.14 เครื่องแก้ว

5.1.2.15 หลอดใส่สารปรับปริมาตรได้ (syringe) ขนาด 50 ไมโครลิตร

5.1.2.16 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ กระดาษซับ ช้อนตักสาร พลาสติกใส ถาดพลาสติก กล่องพลาสติกใส กระดาษติดป้าย กล้องถ่ายรูป พร้อมฟิล์ม

5.1.3 สารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของสารสกัด (extraction buffer) คือ

5.1.3.1.1 0.5 M dithiothreitol (DTT)

5.1.3.1.2 0.5 M ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

5.1.3.1.3 14.3 M β-mercaptoethanol (MSH)

5.1.3.1.4 polyvinylpyrrolidone (PVP-10)

5.1.3.1.5 1.0 M tris-HCl pH 7

5.1.3.2 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ gel

5.1.3.2.1 30 % acrylamide stock solution (acrylation 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ˚ซ)

5.1.3.2.2 1.5 M tris-HCl pH 8.8

5.1.3.2.3 10 % ammonium persulfate (APS) เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

5.1.3.2.4 TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)

5.1.3.2.5 น้ำกลั่น

5.1.3.3 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ sample buffer

5.1.3.3.1 10 % glycerol

5.1.3.3.2 0.5 % bromophenol blue

5.1.3.4 สารเคมีที่ใช้เป็น running buffer

5.1.3.4.1 tris

5.1.3.4.2 glycine pH 8.3 ต่อน้ำกลั่น 500 มล

5.1.3.5 สารเคมีที่ใช้ย้อมเอนไซม์

5.1.3.5.1 0.05 M acetate buffer pH 4.8

5.1.3.5.2 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5

5.1.3.5.3 0.1 M tris-HCl pH 4.0

5.1.3.5.4 0.1 M tris-HCl pH 7.4

5.1.3.5.5 0.1 M tris-HCl pH 7.5

5.1.3.5.6 0.1 M tris-HCl pH 8.0

5.1.3.5.7 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.3.5.8 0.2 M phosphate buffer pH 6.0

5.1.3.5.9 fast blue BB salt

5.1.3.5.10 fast ganet GBC diasonium salt

5.1.3.5.11 fast blue B-salt

5.1.3.5.12 α-naphthyl acetate

5.1.3.5.13 α-D glucose

5.1.3.5.14 α-ketoglutaric acid

5.1.3.5.15 β-naphthol

5.1.3.5.16 L-leucine β–naphyl acid

5.1.3.5.17 L-malic acid

5.1.3.5.18 O-dianisidine salt

5.1.3.5.19 2, 6-dichloroindophenol sodium (DCIP)

5.1.3.5.20 3-amino-9-ethylcarbazole

5.1.3.5.21 3[4, 5-dimethyphiazol]2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

5.1.3.5.22 3 % H_2O_2

5.1.3.5.23 aspartic acid

5.1.3.5.24 disodium α-naphthyl phosphate

5.1.3.5.25 $MgCl_2$

5.1.3.5.26 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)

5.1.3.5.27 nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH)

5.1.3.5.28 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)

5.1.3.5.29 nitro blue tetrazolium (NBT)

5.1.3.5.30 phenazine methosulfate (PMS)

5.1.3.5.31 pyridoxal-5'-phosphate

5.1.3.5.32 riboflavin

5.1.3.5.33 shikimic acid

5.1.3.5.34 TEMED

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 วิธีการ

5.2.1 การสกัดเอนไซม์

นำใบของพืชทดลองในตำแหน่งของใบที่สามจากปลายยอดมาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นแล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งใบให้ได้น้ำหนัก 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัด เทไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งจนท่วมเศษชิ้นส่วนพืชแล้วบดอย่างรวดเร็วจนละเอียด จากนั้นเติม extraction buffer ตามสูตรดัดแปลงของ พสุ (2546) จำนวน 3 มล แล้วบดต่อจนตัวอย่างและ extraction buffer ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดใส่สารขนาด 1.5 มล ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปแช่ในกระติกน้ำแข็ง ส่วนโกร่งบดตัวอย่างล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้งก่อนนำไปบดตัวอย่างใหม่ เมื่อบดตัวอย่างจนครบนำหลอดทดลองทั้งหมดไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 ˚ซ เป็นเวลา 30 นาที เมื่อปั่นเสร็จดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสที่อยู่ด้านบนตะกอนด้วยไมโครปิเปตใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ ในขณะที่ดูดระวังอย่าให้เศษตะกอนเกิดการฟุ้งตัว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ˚ซ เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

5.2.2 การทำ polyacrylamide gel electrophoresis

5.2.2.1 นำแผ่นกระจกของ Mini-Protean® 3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) มาเช็ดทำความสะอาดด้วย 95 % ethyl alcohol แล้วนำแผ่นกระจกมาประกอบเข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลาย separating gel ของเจล 7.5 % โดยผสมสารจากส่วนผสมที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสารเคมีในการเตรียม separating gel (Kuntapanom and Smitamana, 1997) สำหรับเจล 4 แผ่น

สาร	ปริมาตร*
น้ำกลั่น	9.7 มล
1.5 M tris pH 8.8	5 มล
30% acrylamide	5 มล
10% APS	200 ไมโครลิตร
TEMED	10 ไมโครลิตร

*สำหรับ 7.5% separating gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2.2.2 นำสารทั้งหมดที่แสดงในตารางมาเทรวมกันในบีกเกอร์ ยกเว้น TEMED เนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติทำให้สารละลายเกิดการแข็งตัวได้เร็ว จากนั้นใช้แท่งแก้วคนสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงใช้ไมโครปิเปตดูดเอา TEMED ใส่ลงไปเป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนจะเทสารลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก

5.2.2.3 เมื่อเตรียมสารละลายเจลเรียบร้อยแล้วเทสารละลายดังกล่าวลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมเอาไว้อย่างรวดเร็วและระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในแผ่นเจล จากนั้นรีบเสียบหวี (comb) ลงไประหว่างแผ่นกระจกทั้งสองก่อนสารละลายจะแข็งตัวและระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศในช่องที่เสียบหวี รอจนแผ่นเจลแข็งแล้วจึงนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.2.2.4 เตรียมตัวอย่างที่ผสมกับ bromophenol blue ในอัตราส่วน 9:1 ลงในหลอดใส่สารขนาด 1.5 มล นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารเพื่อให้สารรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเก็บไว้ในที่เย็น

5.2.2.5 เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวดึงเอาหวีเสียบออก จากนั้นต่อชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม runnimg buffer ลงใน chamber แล้วหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ bromophenol blue ลงในช่องของ stacking gel ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อช่อง โดยไม่ให้ตัวอย่างแต่ละช่องปนกัน จากนั้นปิดฝาครอบ chamber แล้วต่อขั้วไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ให้กระแสไฟผ่านโดยใช้กระแสไฟ 20 มิลลิแอมแปร์ ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟเมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่เกือบถึงปลายล่างสุดของแผ่นเจล จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองออกมาวางในกล่องพลาสติกใสที่ใส่น้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยเพื่อรอการย้อมสีเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

5.2.3 การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 10 ชนิด คือ ACP, DIA, EST, GDH, GOT, LAP, MDH, SKD, POX และ SOD (ภาคผนวก)

5.2.4 การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีแล้วมาบันทึกตำแหน่ง จำนวน ขนาดของแถบไอโซไซม์ และค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีบนแผ่นเจล แล้วนำตำแหน่งระยะการเคลื่อนที่ดังกล่าวมาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) ตามสมการ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปวาดไซโมแกรม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

แสดงผลในรูปแบบของเดนโดรแกรม โดยวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแถบสีด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved