# บทที่ 3

# การดำเนินงานวิจัย

## ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกอยู่ในสภาพดินเหนียว และดินทรายด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 1 และ 2 มิติ (2D-PAGE)
2. ศึกษาปัจจัยความเครียดจากปริมาณของเกลือ NaCl กรดอะมิโน โดยปลูกในภาวะมีแสงและไม่มีแสงที่มีผลต่อรูปแบบของโปรตีน (SDS-PAGE) ที่สกัดได้จากใบของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในภาวะควบคุม

## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.1. เปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกอยู่ในสภาพดินเหนียว และดินทรายด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 1 และ 2 มิติ (2D-PAGE)

3.1.1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในเขตดินเหนียว และดินทรายที่อยู่ในระยะเก็บเกี่ยว โดยทำการเก็บตัวอย่างเมล็ดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในเขตดินเหนียวจากนาข้าวของเกษตรกร บ้านดงหมี ต. เนินกุ่ม อ. บางกระทุ่ม จ. พิษณุโลก และเก็บตัวอย่างเมล็ดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในเขตดินทรายจากนาข้าวของเกษตรกร บ้านหนองหญ้าปล้อง ต. ชมพู อ. เนินมะปราง จ. พิษณุโลก ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2546 โดยทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดที่อายุการเก็บเกี่ยวของข้าวหอมมะลิ 105

3.1.2. การเก็บรักษาตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในถุงพลาสติกชนิด polyethylene (PE) โดยทำการดูดอากาศออกจากถุงที่เก็บตัวอย่างด้วยเครื่อง vacuum sealing เพื่อให้ตัวอย่างถูกเก็บในสภาวะสุญญากาศ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส และเริ่มทำการทดลองในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547

3.1.3. การสกัดโปรตีน และการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ประมาณ 5 กรัม ที่แกะเปลือกด้วยมือก่อนการทดลองไม่เกิน 24 ชั่วโมง บดให้ละเอียดใน liquid $N_2$ จากนั้นนำไปเติม 0.2 M Tris-HCl buffer pH 7.8 (reagent grade) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไป vortex ด้วยความแรงสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนสารละลายออกจากส่วนตะกอน นำส่วนสารละลายตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloroacetic acid (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10%) และนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนสารละลายออกจากส่วนตะกอน ซึ่งส่วนนี้ คือ โปรตีน นำส่วนตะกอนไปล้างด้วย acetone (reagent grade) ที่เย็นจัด ปริมาตร 16 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเท acetone ทิ้ง และระเหย acetone ออกให้หมดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารพันธุกรรมเข้มข้น (LABCONCO, Kansas City, Missouri, USA) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ความดัน 30 บาร์ของปรอท เป็นเวลา 2 นาที แล้วละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.2 M Tris-HCl buffer pH 7.8 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยเติม Bio-Rad dye binding protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA) และใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 20 มิลลิกรัมของโปรตีนต่อมิลลิลิตร เป็น standard protein โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวก ค1)

3.1.4. การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 1 มิติ (SDS-PAGE)

ศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 1 มิติ ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยปิเปตสารละลายโปรตีน (10 ไมโครกรัม) มาผสมกับ loading buffer (ประกอบด้วย 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS และ 5% $\beta$-Mercaptoethanol) นำมา loaded บน 12.5% SDS-PAGE separating gel (ขนาด 16 x 15 ซม.) และ 4% stacking gel ใช้ SDS-PAGE standards, broad range (Bio-Rad, Richmond, CA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ทำการ electrophoresed ที่ 100 มิลลิแอมแปร์ ต่อ 1 เจล เป็นเวลา 5 ชม. ด้วยเครื่อง Hoefer electrophoresis model SE600 (Amersham Phamacia Biotech, San Francisco, CA) จนกระทั่งสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนไปจนเกือบสุดความยาวของเจล จากนั้นแกะเจลออกจากกระจก ใส่เจลลงในกล่องพลาสติก เพื่อย้อมเจลด้วยสารละลายผสม 1% Coomassie Blue R-250 ที่ละลายใน 40% methanol และ 5% acetic acid และล้างเจลในสารละลายผสม 60% methanol และ 20% acetic acid จากนั้นบันทึกภาพด้วย Kodak DC 120 digital camera (Kodak, Rochester, NY) และเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนด้วย Kodak Digital Science 1D Image Analysis Soft ware (Kodak, Rochester, NY)

3.1.5. การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 2 มิติ (2D-PAGE)

การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 2 มิติ ตามวิธีของ O'Farrell (1975) โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าว ปริมาณ 20 เมล็ด มาแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ใส่ลงในโกร่ง เติมสารละลาย lysis buffer (ประกอบด้วย 8% urea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte 3-10) ซึ่งทำหน้าที่ break cell ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นบดให้เป็นเนื้อเดียวกันนาน 5 นาที จนมีลักษณะหนืด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยเติม Bio-Rad dye binding protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA) และใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 20 มิลลิกรัมของโปรตีนต่อมิลลิลิตร เป็น standard protein โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวก ค1)

ปิเปตสารละลายโปรตีน ปริมาณ 50 ไมโครกรัม นำไปผสมกับ rehydration buffer จนได้สารละลายผสมที่มีปริมาตรรวม 500 ไมโครลิตร เทลงใน well และใส่ IPG stripe 3 – 10 pI ชนิด non - linear (Amersham Phamacia Biotech, San Francisco, USA) ขนาดความยาว 13 ซม. ทำการ electrophoresed ที่ 50 ไมโครแอมแปร์ ต่อ 1 stripe เป็นเวลา 12 ชม. ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham Phamacia Biotech, San Francisco, USA)

นำ IPG stripe ที่ทำ electrophoresed แล้วมาทำการ electrophoresed อีก 1 มิติ โดย loaded บน 12.5% SDS-PAGE separating gel (ขนาด 16 x 15 ซม.) และ 4% stacking gel ใช้ SDS-PAGE standards, broad range (Bio-Rad, Richmond, CA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ทำการ electrophoresed ที่ 100 มิลลิแอมแปร์ ต่อ 1 เจล เป็นเวลา 5 ชม. ด้วยเครื่อง Hoefer electrophoresis model SE600 (Amersham Phamacia Biotech, San Francisco, CA) จนกระทั่งสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนไปจนเกือบสุดความยาวของเจล จากนั้นแกะเจลออกจากกระจก ใส่เจลลงในกล่องพลาสติก เพื่อย้อมเจลด้วยสารละลาย Plusone silver staining kit (Amersham Phamacia Biotech, San Francisco, CA) จากนั้นบันทึกภาพด้วย Kodak DC 120 digital camera (Kodak, Rochester, NY) และเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนด้วยการวิเคราะห์จุดของโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D (Kodak, Rochester, NY) โดยกำหนดตำแหน่งจุดของโปรตีนด้วยการวัดระยะโดยใช้ไม้บรรทัดวัด 4 ตำแหน่ง และใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปกำหนดตำแหน่งจุดของโปรตีนบนรูปแบบโปรตีนแบบ 2D ทั้งสองแผ่น จากนั้นนำรูปแบบโปรตีนแบบ 2D ที่ผ่านการกำหนดตำแหน่งจุดของโปรตีนแล้วมาซ้อนกันด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป และให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ความใกล้เคียงกันของแต่ละจุดของโปรตีนในแต่ละแผ่นเจล ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชนิดของโปรตีนที่แยกได้จากตัวอย่างเมล็ดของข้าวจากดินเหนียว และดินทราย

**3.2. ศึกษาปัจจัยความเครียดจากปริมาณของเกลือ NaCl กรดอะมิโน โดยปลูกในภาวะมีแสง และไม่มีแสงที่มีผลต่อรูปแบบของโปรตีน (SDS-PAGE) ที่สกัดได้จากใบของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในภาวะควบคุม**

3.2.1. การเพาะกล้า และการสร้างสภาพความเครียด

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML) จำนวน 500 เมล็ด มาแช่น้ำประปาสะอาด ในอัตราส่วน ข้าว: น้ำ เท่ากับ 1:2 (กรัม : มิลลิลิตร) เป็นเวลา 3 วัน จนเริ่มมีรากงอกแล้วทำการเพาะเมล็ดตัวอย่างข้าวในกระถางที่มีทรายชนิดละเอียด (ที่ผ่านการล้างโดยการปล่อยน้ำประปาผ่านจนน้ำที่ออกมามีลักษณะใส และแช่น้ำประปาสะอาด 1 คืน) ด้วยการหว่านเมล็ดข้าวที่งอกลงบนผิวหน้าของทรายที่ผ่านการล้างแล้ว แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด (รูปที่ 7) เมื่อครบกำหนด 33 วัน นำใบของต้นข้าวไปทำการสกัดโปรตีนตามวิธีข้อ 3.1. ก่อนทำการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

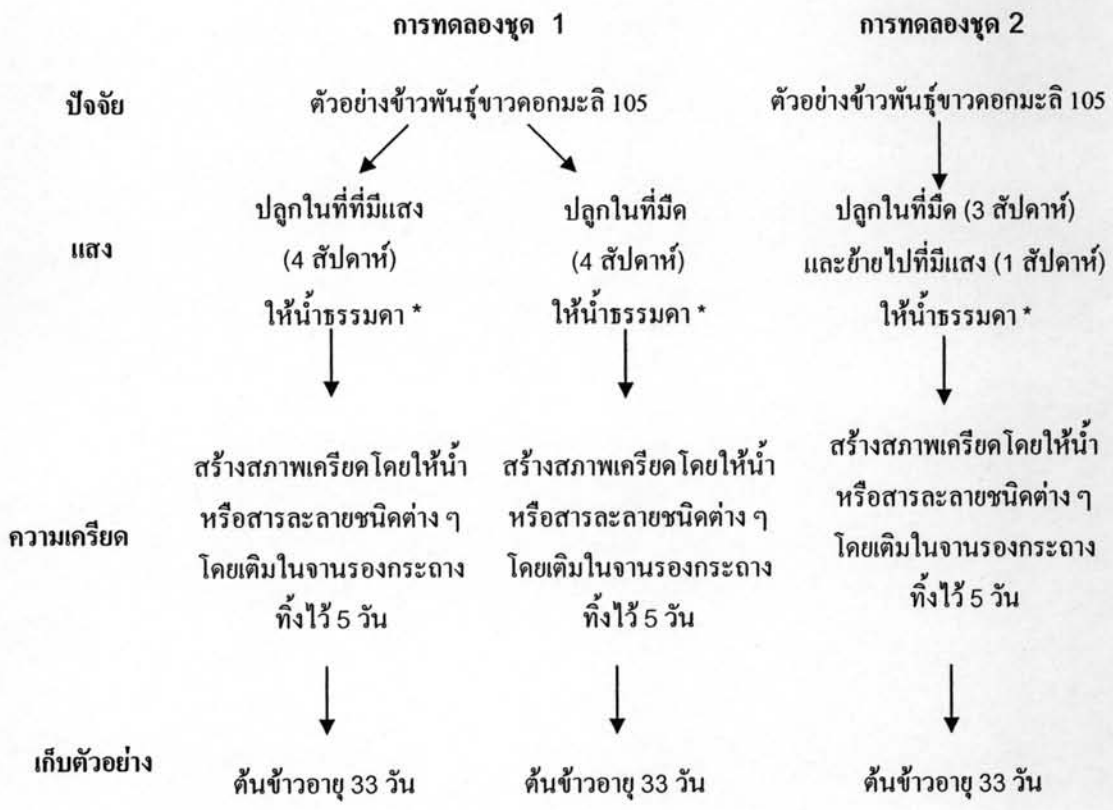
การสร้างสภาพความเครียดโดยใช้สารละลายผสมชนิดต่าง ๆ (โดยดัดแปลงวิธีการทดลองจากวิธีของ Sultana และคณะ, 1999, 2000 และ Hien และคณะ, 2003) ประกอบด้วย NaCl (Analytical grade, BDH Laboratory Suppiles, Poole, England), L-Arginine (Analytical grade, HiMedia Laboratories Limited, India) และ L-Proline (Analytical grade, Sigma-Aldrich, Germany) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เติมลงในจานรองกระถาง ๆ ละ 50 มิลลิลิตร ทุก ๆ สารละลายโดยทำการเติมวันที่ 29 ของการทดลองเพียงครั้งเดียวโดยไม่มีการรดน้ำอีก ดังต่อไปนี้

1. น้ำประปา (Control)
2. สารละลายเกลือ 200 mM NaCl
3. สารละลาย 1 mM L-Proline
4. สารละลายเกลือ 200 mM NaCl และ 1 mM L-Proline อัตราส่วน 1:1 (v/v)
5. สารละลาย 1 mM L-Arginine
6. สารละลายเกลือ 200 mM NaCl และ 1 mM L-Arginine อัตราส่วน 1:1 (v/v)
7. สารละลาย 1 mM L-Proline และ1 mM L-Arginine อัตราส่วน 1:1 (v/v)
8. สารละลายเกลือ 200 mM NaCl และ 1 mM L-Proline และ 1 mM L-Arginine อัตราส่วน 1:1:1 (v/v/v)

3.2.2. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบของต้นข้าวที่อายุ 33 วัน ประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยแผ่นอลูมิเนียม (Aluminium foil) ก่อนนำไปแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำไปแช่ liquid $N_2$ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ

-80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการสกัดโปรตีนด้วยวิธีการสกัดโปรตีนตามข้อ 3.1. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และรูปแบบและชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)




หมายเหตุ * สภาวะการปลูกในที่มีแสง คือ แสงตามธรรมชาติ 16 ชั่วโมง มืด 8 ชั่วโมง และในที่ไม่มีแสง คือ ในที่มืดสนิท

**รูปที่ 7** แผนผังวิธีการปลูก การให้น้ำ การสร้างสภาพเครียด และการเก็บตัวอย่างของข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

3.2.3. การสกัดโปรตีน และการวัดปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างใบข้าวที่เก็บไว้ทุก treatments ประมาณ 5 กรัม มาบดให้ละเอียดใน liquid $N_2$ จากนั้นนำไปเติม 0.2 M Tris-HCl buffer pH 7.8 (reagent grade) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไป vortex ด้วยความแรงสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนสารละลายออกจากส่วนตะกอน นำส่วนสารละลายตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloroacetic acid (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ

10%) และนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปแยกตะกอนด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนสารละลายออกจากส่วนตะกอน ซึ่งส่วนนี้ คือ โปรตีน นำส่วนตะกอนไปล้างด้วย acetone (reagent grade) ที่เย็นจัด ปริมาตร 16 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 x g อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเท acetone ทิ้ง และระเหย acetone ออกให้หมดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารพันธุกรรมเข้มข้น (LABCONCO, Kansas City, Missouri, USA) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ความดัน 30 บาร์ของปรอท เป็นเวลา 2 นาที แล้วละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.2 M Tris-HCl buffer pH 7.8 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) โดยเติม Bio-Rad dye binding protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA) และใช้ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 20 มิลลิกรัมของโปรตีนต่อมิลลิลิตร เป็น standard protein โดยสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวก ค1)

3.2.4. การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 1 มิติ (SDS-PAGE)

การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส แบบ 1 มิติ ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยปิเปตสารละลายโปรตีน มา 10 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading buffer (ประกอบด้วย 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS และ 5% $\beta$-Mercaptoethanol) นำมา loaded บน 12.5% SDS-PAGE separating gel (ขนาด 16 x 15 ซม.) และ 4% stacking gel ใช้ SDS-PAGE standards, broad range (Bio-Rad, Richmond, CA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ทำการ electrophoresed ที่ 100 มิลลิแอมแปร์ ต่อ 1 เจล เป็นเวลา 5 ชม. ด้วยเครื่อง Hoefer electrophoresis model SE600 (Amersham Phamacia Biotech, San Francisco, CA) จนกระทั่งสีของ Bromophenol Blue เคลื่อนไปจนเกือบสุดความยาวของเจล จากนั้นแกะเจลออกจากกระจก ใส่เจลลงในกล่องพลาสติก เพื่อย้อมเจลด้วยสารละลายผสม 1% Coomassie Blue R-250 ที่ละลายใน 40% methanol และ 5% acetic acid และล้างเจลในสารละลายผสม 60% methanol และ 20% acetic acid จากนั้นบันทึกภาพด้วย Kodak DC 120 digital camera (Kodak, Rochester, NY) และเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนด้วย Kodak Digital Science 1D Image Analysis Soft ware (Kodak, Rochester, NY)