

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ต้นพืชทดลองคือ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) จาก จ. แม่ฮ่องสอน
2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน
 - 2.1. วัสดุ อุปกรณ์ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - 2.1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดความนิยม 4 ตำแหน่ง
 - 2.1.2 เครื่องวัดความเป็นกรดค่าจ
 - 2.1.3 หม้อนึ่งความดันไอ
 - 2.1.4 เตาไมโครเวฟ
 - 2.1.5 ตู้เย็น
 - 2.1.6 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ได้แก่ ขวดใส่สารละลายเข้มข้น บีกเกอร์ กระจกบดวง ปริมาตร ขวดรูปชมภู กรวยแก้ว แท่งคนสาร และขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ เป็นต้น
 - 2.1.7 อุปกรณ์อื่น ได้แก่ ซ้อนตักสาร กระจกชามชาม และกระจกอบอุณหภูมิตนฟอยล์
 - 2.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ
 - 2.2.1 ตู้กรองอากาศ
 - 2.2.2 มีดผ่าตัด
 - 2.2.3 ปากคีบ
 - 2.2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 2.2.5 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ได้แก่ ขานเลี้ยงเชื้อ และบีกเกอร์ เป็นต้น
 - 2.2.6 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ แผ่นพลาสติก เป็นต้น
 - 2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
 - 2.3.1 ชั้นสำหรับวางขวดทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีหลอดไฟฟ้าฟลูออโรสเซนส์ ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์
 - 2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการบันทึกข้อมูล
 - 2.4.1 กล้องดำรูปดิจิทัล
 - 2.4.2 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ไม้บรรทัด และปากกา เป็นต้น

2.5 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

2.6 สารเคมี

2.6.1 สารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

2.6.1.1 Ethyl alcohol ความเข้มข้น 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

2.6.1.2 Mercuric chloride ของบริษัท J.T. Baker Chemical Company, USA

2.6.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.6.2.1 กลีโกล์ให้ธาตุอาหารหลักต่างๆ ของสูตร Murashige and Skoog (1962) (ตาราง 3.1)

2.6.2.2 กลีโกล์ให้ธาตุอาหารรองต่างๆ ของสูตร Murashige and Skoog (1962) (ตาราง 3.2)

2.6.2.3 วิตามินต่างๆ ของสูตร Murashige and Skoog (1962) (ตาราง 3.3)

2.6.2.4 Ferrous sulphate ของบริษัท J.T. Baker Chemical Company, USA (ตาราง 3.4)

2.6.2.5 Ethylene diamine tetraacetic acid dihydrate (EDTA) ของบริษัท E. Merck, Darmstadt (ตาราง 3.4)

2.6.2.6 วิตามินบี

2.6.2.6.1 Thiamine-HCl ของบริษัท Sigma Chemical Company

2.6.2.6.2 Pyridoxin-HCl ของบริษัท Sigma Chemical Company

2.6.2.7 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

2.6.2.7.1 α -Naphthalene acetic acid (NAA) ของบริษัท Sigma Chemical Company

2.6.2.7.2 N_6 -Benzyladenine (BA) ของบริษัท Sigma Chemical Company

2.6.2.8 น้ำตาลแอลกอฮอล์

2.6.2.8.1 Myo-inositol ของบริษัท Fluka Biochemical

2.6.2.8 Gelrite ของบริษัท Sigma Chemical Company

2.6.2.9 น้ำกลั่น

2.6.2.10 น้ำตาลซูโครส

2.6.3 สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรดด่าง

2.6.3.1 1 N HCl (hydrochloric acid)

2.6.3.2. 1 N NaOH (sodium hydroxide)

3. เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการย้ายต้นอ่อนขมิ้นชันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

- 3.1 ถุงดำ ขนาด 5 x 2.5 นิ้ว
- 3.2 ตะกร้าพลาสติก
- 3.3 ขุยมะพร้าว
- 3.4 ถ่านแกลบ
- 3.5 ทรายหยาบ
- 3.6 ข้อนปลูก
- 3.7 ถาดหลุมปลูก ขนาด 56 หลุม
- 3.8 ถุงพลาสติกใส ขนาด 24 x 30 นิ้ว

4. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน

- 4.1 ตู้บดร้อน
- 4.2 กรรไกร มีด เขียง
- 4.3 กระตาดแข็ง
- 4.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 4.5 ถุงพลาสติก
- 4.6 ยางรัด
- 4.7 ขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ และฝา
- 4.8 กระตาดกรอง whatman เบอร์ 1
- 4.9 Ultrasonic bath
- 4.10 Rotary evaporator
- 4.11 ตู้เย็น
- 4.12 ขวด universal
- 4.13 Buchner funnel
- 4.14 Flask 500 มล

4.15 เอทานอล 95%

4.16 อุปกรณ์ชุดกลั่นตัวทำลายให้บริสุทธิ์

5. เครื่องมือ วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography; TLC)

5.1. แผ่น TLC สำเร็จ ขนาด 20 x 10 ซม บริษัท Merck, Germany

5.2. เครื่องหยดตัวอย่างบนแผ่น TLC (Automatic TLC Sample 4) บริษัท CAMAG

5.3. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณสาร (Manual TLC Scanner 3) บริษัท CAMAG

5.4. ตู้ดูดควัน

5.4. Vertex

5.5. ขวดใส่สารทำ TLC

5.6. เอทานอล (ethanol)

5.7. คลอโรฟอร์ม (chloroform)

5.8. เฮกเซน (hexane)

5.9. สารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน บริษัท Sigma

5.10. แทงก์สารละลาย (developing tank)

5.11. เครื่องดูดจ่ายสารอัตโนมัติ (autopipette)

5.12. ทิป (tip)

6. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

6.1 การเตรียมธาตุอาหารหลัก

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นของสาร 10 เท่า ทำการเตรียมปริมาตร 1,000 มล ซึ่งใช้ปริมาณของสารดังตาราง 3.1

6.2 การเตรียมธาตุอาหารรอง

เตรียมธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962) โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นของสาร 100 เท่า ทำการเตรียมปริมาตร 1,000 มล ซึ่งใช้ปริมาณของสารดังตาราง 3.2

ตาราง 3.1 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 10 เท่า (ก/ล)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.50
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4.40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70

ตาราง 3.2 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	2.5
KI	0.830	83.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600	860.0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300	2,230.0
H_3BO_3	6.200	620.0
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250	25.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	2.50

6.3 การเตรียมวิตามิน

เตรียมวิตามินใน MS โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นของสาร 100 เท่า ปริมาตร 1,000 มล ซึ่งใช้ปริมาณของสารดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 ชนิดและปริมาณของสารละลายเข้มข้นของวิตามินสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (มก/ล)
Glycine	2.00	200
Myo-inositol	100.00	10,000
Thiamine-HCl	0.25	25
Pyridoxine-HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25

6.4 การเตรียมสารละลายเหล็กในรูป FeEDTA

การเตรียม FeEDTA ในสูตร MS (1962) ซึ่งประกอบด้วย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้นรวมไว้ในขวดเดียวกัน ซึ่งมีความเข้มข้นของสาร 100 เท่า ทำการเตรียมปริมาตร 1,000 มล ซึ่งใช้ปริมาณของสารดังกล่าว 3.4 เกรียมโดยชั่งน้ำหนักสารแต่ละชนิดแล้วแยกละลายน้ำให้มีปริมาตรสุดท้ายของสารแต่ละชนิด 500 มล แล้วนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน เก็บไว้ภายในขวดที่บดแสงหรือขวดที่หุ้มอลูมิเนียมป้องกันแสง

ตาราง 3.4 ชนิดและปริมาณของสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดของสาร	ปริมาณสารในอาหารสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในสารละลายเข้มข้น 100 เท่า (ก/ล)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	2.78
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	3.78

6.5 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

6.5.1 การเตรียม α -Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 100 มก/ล

ชั่ง NAA 10 มก ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาตรเล็กน้อยเพียงพอให้สารละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาขวดไว้ในตู้เย็นเก็บเป็นสารละลายเข้มข้นไว้ใช้ต่อไป

6.5.2 การเตรียม N_6 -Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 100 มก/ล

ชั่ง BA 10 มก ละลายด้วย 1N NaOH (sodium hydroxide) ปริมาตรเล็กน้อยเพียงพอให้สารละลายได้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น ปิดฝาขวดไว้ในตู้เย็นเก็บเป็นสารละลายเข้มข้นไว้ใช้ต่อไป

7. การเตรียมอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)

นำส่วนประกอบอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) จากสารละลายเข้มข้นที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3 มาผสมให้เข้ากัน โดยใช้สารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดดังแสดงไว้ในตาราง 3.5 ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมอาหารสูตร MS (1962) ดังนี้

ใส่น้ำกลั่นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มล ประมาณครึ่งขวด แล้วเติมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน เหล็ก น้ำตาลซูโครส และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเติมในปริมาตรตามตาราง 3.5 และคนสารละลายเข้มข้นให้เข้ากันในแต่ละครั้งที่เติมเพื่อป้องกันการตกตะกอน เติมน้ำตาล 30 ก คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มล ด้วยน้ำกลั่น ต่อจากนั้นเทสารละลายลงในบีกเกอร์เพื่อนำไปปรับความเป็นกรด่างให้ได้ 5.8 โดยใช้ 1N HCl หรือ 1N NaOH เมื่อปรับแล้วใส่ผง gelrite 2 ก ลงในสารละลายแล้วจึงนำไปต้มให้ gelrite ละลาย เติมหาอาหารใส่ในขวดเดือนเนื้อเยื่อแล้วปิดฝา หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ตาราง 3.5 ปริมาณของสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดในอาหารสูตร MS (1962)

ชนิดของสารละลาย	ปริมาณของสารละลายเข้มข้นในอาหาร 1 ล (มล)
ธาตุอาหารหลัก ความเข้มข้น 10 เท่า	100
ธาตุอาหารรอง ความเข้มข้น 100 เท่า	10
วิตามิน ความเข้มข้น 100 เท่า	10
เหล็ก ความเข้มข้น 100 เท่า	10
สารควบคุมการเจริญเติบโต	*
gelrite	2 ก
น้ำตาล	30 ก

* ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ในแต่ละกรรมวิธีในการทดลอง

8. การฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ

8.1. การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ

วิธีนี้จะใช้ฆ่าเชื้อในอาหาร และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ปากคีบ มีดผ่าตัด จานเลี้ยงเชื้อ กระดาษขาว และแผ่นพลาสติกที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยม ผ้าสำหรับเช็ดทำความสะอาด เป็นต้น โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ห่ออุปกรณ์ต่างๆ ช่างต้น ยกเว้น ผ้า ด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์
2. นำอุปกรณ์ที่ห่อแล้วรวมทั้งผ้า ใส่ในถุงพลาสติก รัดปากถุงด้วยยางรัด