สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาโปรตีน BADH2 เป็นโปรตีนบ่งชี้ในการคัดแยกข้าวหอมมะลิ

Development of BADH2 protein as a protein marker for Jasmine rice selection

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
SB
191
.R5
ธ592ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 131138
วัน,เดือน,ปี 22 มี.ค. 2557

b.12607514
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การพัฒนาโปรตีน BADH2 เป็นโปรตีนบ่งชี้ในการคัดแยกข้าวหอมมะลิ
แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2555
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
นาย ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ สังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

BADH2 เป็นโปรตีนที่พบในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่มีกลิ่นหอมโดยในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะมีโปรตีน BADH2ครบสมบูรณ์แต่ในข้าวหอมมะลิจะไม่สมบูรณ์ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงอาศัยความแตกต่างของโปรตีน BADH2 ในข้าวสองสายพันธ์มาเป็นโปรตีนบ่งชี้เพื่อนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวไม่มีกลิ่นหอมในข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิค Western blot และ ELISA ผลที่ได้เมื่อสกัดเอาโปรตีนจากข้าวหอมมะลิ (KDML 510) และข้าวไม่มีกลิ่นหอม (ปทุมธานี 1) นำมาตรวจหา BADH2 ที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-BADH2 antibody เป็นตัวตรวจจับพบว่าตรวจพบแถบโปรตีนในข้าวไม่มีกลิ่นหอมและไม่พบแถบโปรตีนในข้าวหอมมะลิ และเมื่อนำเอาโปรตีนที่สกัดมาตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ Anti-BADH2 antibody เป็นตัวตรวจจับพบว่าสามารถตรวจสอบความแตกต่างของสีที่เกิดขึ้นที่ปริมาณโปรตีนรวมในช่วง 0.625 ถึง 1.250 ไมโครกรัม โดยโปรตีนที่สกัดจากข้าวไม่หอมจะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าโปรตีนที่สกัดจากข้าวหอมมะลิ ดังนั้นจากผลที่ได้แสดงว่าเราสามารถตรวจจับข้าวไม่มีกลิ่นหอมด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ BADH2 เป็น protein marker ได้ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน BADH2 มีความสามารถสูงที่จะนำไปพัฒนาในการเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการแบ่งแยกสายพันธ์ข้าวหอมมะลิ

คำสำคัญ : ข้าวหอมมะลิ แอนติบอดี โปรตีนบ่งชี้ ELISA Western blot BADH2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Development of BADH2 protein as a protein marker for Jasmine rice selection

Researcher: Dr. Tipachai Vatanavicharn

Faculty: Science **Department:** Chemistry

ABSTRACT

BADH2 is a protein found in rice, jasmine and non-fragrance rice. In non-fragrance, BADH2 protein is produced in a function enzyme while jasmine rice, a part of the protein is not translated and the enzyme cannot function. Therefore, in this study, the difference of BADH2 protein in the two rice species was used as a protein marker in order to determine the contamination of rice in jasmine rice with Western blot and ELISA technique. Protein from rice (KDML 105) and non-fragrant rice (Pathum Thani 1) were extracted and complete BADH2 protein was detected by Western blot technique using Anti-BADH2 antibody as a detector. The results showed that complete BADH2 protein was detected only in non-fragrance rice and wasn't in jasmine rice. Detection of BADH2 protein with ELISA techniques using Anti-BADH2 antibody as a sensor, the absorption values at 405 nm are different at range of 0.625 to 1.25 microgram of total protein extracted from both jasmine rice and non-fragrance. These results indicated that protein BADH2 have a highly efficiency to be developed to identify protein and separate rice species.

Keywords : Jasmine rice BADH2 Antibody ELISA Western blot Protein marker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 5

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 14

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 14

3.2 สารเคมี 14

3.3 วิธีการทดลอง 14

3.3.1 การออกแบบและสังเคราะห์สายเปปไทด์และการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 14

3.3.2 การสกัดโปรตีนจากเมล็ดข้าว 15

3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis 15

3.3.4 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี Western blot 15

3.3.5 การวิเคราะห์หาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี ELISA 15

บทที่ 4 ผลการวิจัย 17

4.1 ลำดับของกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ออกแบบ 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผล ELISA ของแอนติบอดีที่จำเพาะกับสายเปปไทด์ที่สังเคราะห์ 18
4.3 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี Western blot 19
4.4 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี ELISA 19
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 21
5.1 สรุปผลการวิจัย 21
5.2 ข้อเสนอแนะ 21
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง 22
ภาคผนวก 25
ประวัตินักวิจัย 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 โครงสร้างโมเลกุลของ 2-Acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นที่มาของกลิ่นในข้าวหอมมะลิ 1

1.2 ลักษณะของเมล็ดข้าวหอมมะลิ 2

2.1 แสดงการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน 10

2.2 แสดงการเข้าจับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีแบบ Two-step detection 10

4.1 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ BADH2 ในข้าวหอมมะลิและในข้าวธรรมดา โดยบริเวณที่อยู่ในสี่เหลี่ยมปีนส่วนที่นำมาสังเคราะห์เป็นเปปไทด์ 17

4.2 ผล ELISA ของแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายสองตัว (6580 และ 6581) 18

4.3 แสดงผลการแยกโปรตีนทั้งหมดในข้าวหอมมะลิ KDML105 (F) และข้าวไม่หอมมะลิ ปทุมธานี (NF) และโปรตีนขนาดมาตรฐาน (M) 19

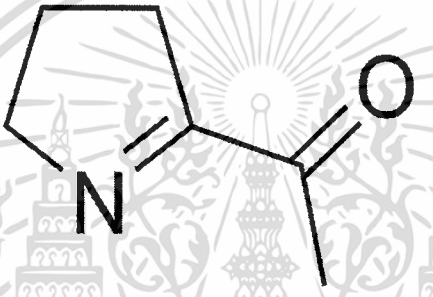
4.4 แสดงผล ELISA ของการตรวจหา BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานี 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวหอมมะลิ (Thai jasmine หรือ Thai Hom mali) เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญสามารถสร้างรายได้และนำเงินตราเข้าประเทศปีละประมาณ 48,000 ล้านบาท หรือคิดเป็น 40.22% ของมูลค่าข้าวทั้งหมดที่ส่งออกและมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร) ข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย มีลักษณะกลิ่นหอมคล้ายใบเตยที่เกิดจากสารระเหยชื่อ 2-Acetyl-1-pyrroline ดังรูป



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโมเลกุลของ 2-Acetyl-1-pyrroline ซึ่งเป็นที่มาของกลิ่นในข้าวหอมมะลิ

ข้าวหอมจัดเป็นข้าวคุณภาพสูงทั้งในประเทศและต่างประเทศและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในกลุ่มของเกษตรกร พ่อค้า และผู้บริโภคมาเป็นเวลาช้านาน มีการปลูกข้าวหอมโดยทั่วไปในหลายประเทศ เช่น ข้าวพันธุ์บาสมาติของประเทศอินเดียและปากีสถาน พันธุ์ Malagkit sungsong และ Milagrosa ของประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ Seratus malam ของประเทศอินโดนีเซีย พันธุ์ Goolarah ของประเทศออสเตรเลีย พันธุ์ Hieri ของประเทศญี่ปุ่น พันธุ์ Della และ Dellmont ของประเทศสหรัฐอเมริกา และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ของประเทศไทย เป็นต้น (วาสนา, 2538) แต่ข้าวหอมที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคทั่วโลกมากที่สุด ได้แก่ ข้าวบาสมาติ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 เนื่องจากมีกลิ่นหอมและมีคุณภาพการหุงต้มดี (Sakthivel et al., 2009)

เมื่อปี พ.ศ. 2497 นายสุนทร สีหเนิน พนักงานข้าว จังหวัดฉะเชิงเทรา ได้รวบรวมพันธุ์ข้าวหอมในเขตอำเภอบางคล้า ได้จำนวน 199 รวง แล้ว ดร.ครุย บุณยสิงห์ (ผู้อำนวยการกองบำรุงพันธุ์ข้าวในขณะนั้น) ได้ส่งไปปลูกคัดพันธุ์บริสุทธิ์และเปรียบเทียบพันธุ์ที่ สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง (ขณะนี้เป็นสถานีข้าวลพบุรี) ดำเนินการคัดพันธุ์โดยนักวิชาการเกษตรชื่อนายมังกร จูมทอง ภายใต้การดูและของนายโอภาส พลศิลป์ หัวหน้าสถานีทดลองข้าวโคกสำโรงจนกระทั่งปี พ.ศ. 2502 ได้พันธุ์บริสุทธิ์ข้าวขาวดอกมะลิ 4-2-105 และคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ ข้าวได้อนุมัติให้เป็นพันธุ์ส่งเสริมแก่เกษตรกร เมื่อ วันที่ 25 พฤศจิกายน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ. 2502 โดยเกษตรกรทั่วไปเรียกว่า (ขาวดอกมะลิ 105) ต่อมาได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (ขาวดอกมะลิ 105) จนได้ข้าวพันธุ์ (กข 15) ซึ่งกระทรวงพาณิชย์ประกาศให้ ข้าวทั้ง 2 พันธุ์เป็นข้าวหอมมะลิไทย ข้าวหอมมะลิที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายคือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ พันธุ์ กข 15 ซึ่งปัจจุบันราคาข้าวหอมมะลิราคาตกต่ำลงมาเรื่อยๆ เนื่องจาก ข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 ให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวหอมมะลิ 105 โดยผลผลิตต่อไร่เฉลี่ย 80-100 ถัง/ไร่ ปลูกได้หลายครั้งต่อปี และสามารถปลูกได้ดีในที่ลุ่มบริเวณที่ราบภาคกลาง ขณะที่ข้าวหอมมะลิ 105 นั้นจะให้ผลผลิตต่อไร่เพียง 30-40 ถัง/ไร่ และปลูกได้ดีในบางพื้นที่เท่านั้น ทางรัฐบาลจึงส่งเสริมให้ชาวนา เน้นการปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 มากกว่าพันธุ์ปทุมธานี 1 แม้ว่าจะมีความหอมคล้ายข้าวหอมมะลิ แต่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิ

รูปที่ 1.2 ลักษณะของเมล็ดข้าวหอมมะลิ

สายพันธ์ข้าวที่กระทรวงพาณิชย์ได้ประกาศให้เป็นข้าวหอมมะลิไทยมี 2 สายพันธ์คือ ข้าวหอมมะลิ 105 และ กข 15 ซึ่งเป็นพันธ์ที่ได้รับการปรับปรุง แต่ในปัจจุบันด้วยราคาข้าวหอมมะลิที่เพิ่มสูงขึ้นรวมถึงมีการแข่งขันทางการค้ามากขึ้น จึงมีการปลอมแปลงข้าวหอมมะลิโดยนำข้าวชนิดอื่นมาผสมเพื่อลดต้นทุน เช่น นำข้าวพันธ์ชัยนาท 1 หรือ ข้าวพันธ์ปทุมธานี 1 มาผสมกับข้าวหอมมะลิซึ่งจะสังเกตได้ยากและนำมาจำหน่ายในราคาถูก เมื่อนำมาหุงกลิ่นจะไม่หอมฟุ้ง สีของข้าวจะเปลี่ยนไป และเมล็ดจะเริ่มแข็งตัว ถึงแม้จะมีวิธีการตรวจสอบข้าวหอมมะลิอย่างคร่าวๆ เช่น การดูลักษณะของเมล็ดข้าวหรือการตรวจสอบปริมาณอมิโลสไม่สามารถตรวจแยกข้าวพันธ์ปทุมธานี1 ออกจากข้าวหอมมะลิได้ โดยวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน คือ DNA sequencing ซึ่งเทคนิคในการหา DNA sequence นั้นมีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธี ด้วยกัน คือ วิธีที่หนึ่ง พัฒนาขึ้นโดย Allan Maxam และ Walter Gilbert โดยใช้สารเคมีตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งต่างๆ กัน วิธีนี้เรียกว่า Maxam-Gilbert sequencing ส่วนอีกวิธีหนึ่งนั้นเรียกว่า dideoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดย Fred Sanger โดยวิธีการใช้ enzyme มาต่อสาย DNA จาก primer ในปัจจุบันวิธี dideoxy เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด วิธีการหาลำดับเบสนั้นได้รับการพัฒนามาตลอด จนปัจจุบันนี้สามารถทำได้ง่าย และไม่ซับซ้อนยุ่งยากนัก การหาลำดับเบสนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษายีนต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งในคน สัตว์ และพืช โดยในคน human genome project เป็นโครงการที่จะศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของคน ซึ่งได้เริ่มและดำเนินการติดต่อกันมาหลายปีแล้ว

แต่วิธีการตรวจดีเอ็นเอซึ่งเป็นการตรวจสอบพันธ์ข้าวที่มีความถูกต้องสูงก็ยังมีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานานรวมถึงเทคนิคและเครื่องมือมีความซับซ้อนดังนั้นวิธีการตรวจที่รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย และไม่ซับซ้อนจะช่วยลดการปลอมแปลงข้าวหอมมะลิได้ วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและนิยมนำมาใช้คือวิธีทาง Enzyme Immunoassay (EIA) คือ เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณแอนติเจน (สารที่ต้องการตรวจสอบ) อย่างจำเพาะในสารตัวอย่างโดยใช้แอนติบอดีเป็นตัวตรวจจับ ดังนั้นสิ่งสำคัญของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค EIA คือแอนติเซรัมที่ผลิตโดยใช้แอนติเจนที่เป็นโปรตีนบ่งชี้ (Protein marker) ต้องมีความจำเพาะและสามารถคัดแยกระหว่างข้าวหอมมะลิกับข้าวไม่หอมมะลิได้โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ายีนBADH2 ที่แปลรหัสให้เอนไซม์ Betain Aldehyde Dehydrogenase หรือ BADH2 เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) ซึ่งเป็นสารระเหยหลักที่ให้กลิ่นหอมของข้าวหอมมะลิ ในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม BADH2 จะทำหน้าที่สลาย 2-AP ทำให้ข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมมีปริมาณ 2-AP ต่ำกว่าข้าวหอมมะลิที่มีเอนไซม์ BADH2 เช่นกัน แต่จากการศึกษาในระดับอณูทิยาในข้าวพบว่า มิวเตชั่นแบบ 8-bp deletion ใน exon 7 ของยีน BADH2 ซึ่งทำให้โปรตีน BADH2 สูญเสียหน้าที่การทำงานไป จึงไม่สามารถไปทำลาย 2-AP ได้ ก่อให้เกิดความหอมขึ้น (Bradbury et al., 2005; Wanchana, 2005) และต่อมา Shi et al. (2008) รายงานว่า 7-bp deletion ใน exon 2 ของยีน BADH2 ก็ทำให้เกิดความหอมในข้าวเช่นเดียวกัน ในปัจจุบันพบว่ามีมิวเตชั่นแบบต่างๆ รวม 9 แบบ (single point mutation, insertion และ deletion) ในยีน BADH2 ของข้าวที่ทำให้เกิดความหอม (Kovach et al., 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการใช้ความแตกต่างของเอนไซม์ BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่มีกลิ่นหอมนำไปผลิตแอนติซีรัมเพื่อนำไปคัดแยกข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิค EIA ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

เพื่อสามารถแยกความแตกต่างของข้าวหอมมะลิ (KDML 105) และข้าวไม่มีกลิ่นหอม(ปทุมธานี 1) ได้ด้วยวิธีทาง Enzyme Immunoassay (EIA)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ตรวจสอบความจำเพาะของ Anti-BADH2 Antibody ด้วยเทคนิค Western blot และ เทคนิค ELISA

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

1.4.1 ค้นหาและหาความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของยีน BADH2 จากข้าวหอมมะลิและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน Badh2 จากข้าวหอมมะลิและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ โดยเปรียบเทียบเพื่อหาบริเวณที่แตกต่างกันด้วยวิธีชีวสารสนเทศ

1.4.2 ออกแบบและสังเคราะห์สายเปปไทด์และนำไปผลิตแอนติบอดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกแบบสายเปปไทด์โดยเลือกลำดับกรดอะมิโนบริเวณที่มีความแตกต่างกันระหว่าง BADH2 ของข้าวหอมมะลิและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม และส่งลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปสังเคราะห์สายเปปไทด์และผลิตแอนติบอดีที่บริษัทเอกชน

1.4.3 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ BADH2 ในข้าวทั้งสองสายพันธุ์

นำเมล็ดข้าวหรือใบอ่อนของข้าวทั้งสองสายพันธุ์มาบดด้วยสารละลาย lysis buffer และทำการทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค ELISA และ Western blot โดยใช้แอนติบอดีต่อ BADH2 (Anti-BADH antibody) เป็นตัวตรวจจับ

1.4.4 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อดูความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจข้าวปลอมปนในข้าวหอมมะลิหรือนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบข้าวหอมมะลิต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำไปใช้ในการต่อยอดสำหรับผลิตเป็นชุดตรวจสอบการปลอมปนขาวไม่หอมมะลิในข้าวหอมมะลิได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ข้าวหอมมะลิ (Fragrant rice)

ข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยที่สร้างชื่อเสียงให้กับไทยมากที่สุด (อรอนงค์, 2547) มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตยเป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกที่ไหนในโลกไม่ได้คุณภาพดีเท่ากับปลูกในไทยและเป็นพันธุ์ข้าวที่ทำให้ข้าวไทยเป็นสินค้าส่งออกที่รู้จักไปทั่วโลกข้าวหอมมะลิหรือข้าวดอกมะลิ พันธุ์ข้าวจะออกดอกในวันที่กลางคืนยาวกว่ากลางวันเท่านั้น คือช่วงฤดูหนาวทำให้สามารถปลูกได้เฉพาะนาปี (เดือนพฤษภาคม-กันยายน)เท่านั้น ส่วนชื่อเรียกว่าข้าวหอมมะลินั้นมีที่มาจากสีของข้าวที่ขาวเหมือนดอกมะลิ แต่มีกลิ่นหอมเหมือนใบเตย ลักษณะที่สำคัญของข้าวหอมมะลิ คือ เมื่อหุงหรือนึ่งสุกแล้วเมล็ดข้าวสุกจะอ่อนนิ่มมากกว่าข้าวเจ้าทั่วไปแต่ร่วนน้อยกว่าและมีกลิ่นหอมตามธรรมชาติ ลักษณะข้าวเปลือกจะเรียวยาว เมื่อสีเป็นข้าวสารจะได้เมล็ดข้าวที่เรียว ยาวและขาวใสเป็นเงา เป็นข้าวที่มีคุณภาพดีที่สุดและราคาแพงที่สุดของประเทศไทยเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศ และต่างประเทศ ปริมาณการส่งออกเพิ่มจาก 148,544 ตัน ในปี 2532 ในปี 2536 ประเทศที่เป็นลูกค้าข้าวหอมมะลิได้แก่ ฮ่องกง สิงคโปร์ ข้าวหอมมะลิจัดเป็นข้าวที่มีอะมิโลสต่ำคือประมาณ12-18%ทำให้ข้าวสุกมีความอ่อนนุ่มนิ่มชื่อที่ผู้บริโภคและผู้ประกอบการค้าข้าวนิยมเรียกโดยเพี้ยนมากจาก “ขาวดอกมะลิ” และมีชื่อเป็นทางการว่า “ขาวดอกมะลิ105”ซึ่งมีความหมายว่าประเภทข้าวขาวเพราะข้าวเปลือกมีสีขาวหรือสีฟางและมีกลิ่นหอม คล้ายกลิ่นดอกมะลิสำหรับหมายเลข 105 นั้น ได้มาจากขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคทั่วโลกมากที่สุดได้แก่ข้าวบาสมาติและข้าวขาวดอกมะลิ105 เนื่องจากมีกลิ่นหอมและมีคุณภาพการหุงต้มดี (Sakthivel et al., 2009) การรักษาความหอมของข้าวหอมที่ดีต้องเริ่มตั้งแต่ การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาข้าวเปลือกการสีข้าวและการเก็บรักษาข้าวที่สีเรียบร้อยแล้วการจะรักษาความหอมของข้าวเอาไว้ต้องพยายามหลีกเลี่ยงภาวะแวดล้อมที่ร้อนอบอ้าว และมีความชื้นสูง การตากแดดหรือใกล้สถานที่ร้อนจัดเป็นเวลานานๆ เป็นสิ่งที่ควรหลีกเลี่ยงอย่างยิ่งสภาวะที่เหมาะสมคือที่ที่มีอากาศค่อนข้างเย็น มีการถ่ายเทของอากาศดี ความชื้นไม่สูง

2.1.2 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP)

ความหอมเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดคุณภาพและราคาของข้าว ส่งผลให้ข้าวหอมถูกจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีคุณภาพสูงด้วยความหอมที่เป็นเอกลักษณ์ จึงทำให้ข้าวหอมเป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคโดยทั่วไปซึ่งความหอมของข้าวหอมมะลิเกิดจากสารระเหยชื่อ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ($BADH_2$) บนโครโมโซมที่ 8 (Bradbury et al., 2005) เป็นสารเดียวกันกับที่พบในใบเตย และดอกชมนาดซึ่งเป็นสารที่ระเหยหายไปได้มีความไวต่อแสงและอุณหภูมิซึ่งจะส่งผลให้มีปริมาณสารหอมลดลงจนใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ไม่หอมหากเก็บรักษาไว้นานเกินไปโดยข้าวหอมจะสร้างสาร2-acetyl-1-pyrrolineขึ้นมาเมื่ออยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาวะเครียดและเก็บสะสมไว้ในทุกส่วนของข้าวยกเว้นราก สาร2-acetyl-1-pyrolineเป็นสารประกอบในกลุ่ม pyrrole มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนห้าเหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเกาะอยู่ในวงมีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเป็นพันธะคู่หนึ่งพันธะและมีหมู่acetylเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่สองของวงสาร 2-acetyl-1-pyrroline มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า 5-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_9NO มีสมบัติทางกายภาพเป็นของเหลวใสไม่มีสีและมีคุณสมบัติเป็นเบสเล็กน้อยเมื่อเก็บไว้นานจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีน้ำตาลเข้มระเหยง่ายและไม่เสถียรเมื่ออยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ (Buttery et al. 1982) แหล่งเพาะปลูกที่แตกต่างกันในประเทศไทยต่อปริมาณ 2AP ในข้าวหอมมะลิพบว่า ข้าวกล้องจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณทุ่งกุลาร้องไห้ มีปริมาณ 2AP มากที่สุด (Yoshihashi และคณะ (2004)) ทั้งนี้เนื่องจากชนิดและความอุดมสมบูรณ์ของดินที่มีลักษณะเป็นดินเหนียวร่วนปนทราย รวมถึงการใส่ปุ๋ยและมีน้ำปริมาณที่พอเหมาะ มีอุณหภูมิต่ำในขณะที่ข้าวสร้างยอดอ่อนและออกรวง การเก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่เหมาะสมโดยไม่ปล่อยให้ข้าวสุกคาต้นและไม่ตากข้าวในนาเป็นเวลานานเกินควร นอกจากนี้ข้าวหอมมะลิที่เก็บได้จากช่วงฤดูแล้ง พบ 2AP ในปริมาณต่ำมาก เนื่องจากเป็นข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสงจากปริมาณน้ำที่มีอยู่อย่างจำกัด ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง 2AP ลดลง (อานันต์ ผลวัฒนะ และคณะ , 2535)

2.1.3 betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2)

ยีนที่ควบคุมการสร้าง 2-acetyl-1-pyrroline คือ ยีน betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2)เป็นโปรตีนที่พบในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมโดยทั่วไปโปรตีน BADH2จะมีขนาด 60 KDa โดยจะทำหน้าที่สลาย 2-AP ทำให้กลิ่นหอมของข้าวหายไป ส่วนข้าวหอมมะลิโปรตีนนี้จะมีการกลายพันธุ์ทำให้ได้โปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ สาร 2-AP จึงไม่ถูกสลาย BADH2 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะความหอมในข้าว ยีน BADH2 ประกอบไปด้วย 15 exons และ 14 introns ส่วนตำแหน่งที่เฉพาะต้อการแสดงออกถึงความหอมและไม่หอมในข้าวนั้นแบ่งออกเป็นตำแหน่งของ insertions/deletions หรือ InDels และ single nucleotide polymorphisms หรือ SNPs (Shi et al., 2008) ซึ่ง InDels นั้นมี 2 ตำแหน่งคือ 7-bp deletion (5'-CGGGCGC-3') ใน exon 2 (Shi et al., 2008) และ 8-bp deletion (5'-GATTATGG-3') ใน exon 7 (Bradbury et al., 2005)ส่วนตำแหน่งของ SNPs นั้นมี 3 SNPs ใน exon 7 (Bradbury et al., 2005) เป็นที่เชื่อกันว่า BADH2เกี่ยวพันถึงกันสะสมของ 2AP ซึ่งเป็นสารประกอบอโรมาติกหลักที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมในข้าวหอมมะลิ เอนไซม์ตัวนี้สามารถออกซิไดส์ ω-aminoaldehydesเพื่อให้สอดคล้องกับ ω-amino

2.1.4 เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)

แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ co-dominant marker และ dominant marker โดยเครื่องหมายแบบ co-dominance จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างกันและสามารถแยกระหว่างต้นที่มีพันธุกรรมเป็น homozygous และ heterozygous ได้ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลแบบ dominant นั้นจะปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอซึ่งเครื่องหมายชนิดนี้ไม่สามารถแยก homozygous และheterozygous ได้ (Collardet al., 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก(marker assisted selection, MAS) เพื่อเลือกต้นพืชที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการนั้นมี 2 แบบคือ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนที่ต้องการช่วยในการคัดเลือก (indirect MAS; iMAS หรือ linked marker หรือ flaking markers) และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนช่วยในการคัดเลือก (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS) ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิด iMAS นั้นจะมีความแม่นยำในการคัดเลือกน้อยกว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด fMAS เนื่องจากมีโอกาสที่จะเกิด crossing over ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับตำแหน่งยีนที่ต้องการได้ทำให้เกิดการผิดพลาดในการคัดเลือกขึ้น ส่วนในเครื่องหมายโมเลกุลชนิด fMAS นั้นมีความแม่นยำมากเนื่องจากเป็นการใช้ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนที่ต้องการมาเป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (Collardet al., 2005 and Sreewongchai et.al., 2010)

2.1.5 Antibody

โดยโครงงานพิเศษนี้ใช้เทคนิค EIA โดยใช้ Antibody เป็นตัวตรวจจับโปรตีนBADH2ซึ่ง Antibody คือ สารโปรตีนที่มีอยู่ในเซรุ่ม น้ำคัดหลั่งต่าง ๆ ที่ร่างกายของคนหรือสัตว์สร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านต่อแอนติเจนที่เข้ามาในร่างกาย ซึ่งแอนติบอดีจะมีปฏิกิริยาจำเพาะแอนติเจนที่มากระตุ้นเท่านั้น แอนติบอดีมีความสามารถในการรู้จักและรวมกับแอนติเจนที่จำเพาะต่อมันได้ และปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทำให้เกิดผลต่าง ๆ ตามมา เช่น ทำให้มีการรวมกันของโปรตีนหลายตัวในเซรุ่ม ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียหรือเซลล์ที่มีแอนติบอดีจับอยู่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินได้ จากการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลตลอดจนสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแอนติบอดี พบว่าโมเลกุลของแอนติบอดีทุกตัว มีส่วนที่คล้ายกันมากจึงเรียกชื่อรวม ๆ กันว่าเป็น อิมมิวโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) หรือ Ig ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 5 กลุ่ม คือ IgG, IgA, IgM, Igd และ IgE โมเลกุลของอิมมิวโนโกลบูลินแต่ละหมู่ประกอบด้วยสารพอลิเพปไทด์ 2 หมู่ คือ Heavy (H) Chain 1 คู่ และ Light (L) Chain 1 คู่ อิมมิวโนโกลบูลินสามารถถูกตัดออกเป็นชิ้น ๆ ได้โดยใช้เอนไซม์บางชนิด เช่น ปาเปอิน (Papain) และ เพปซิน (Pepsin) เป็นต้น อิมมิวโนโกลบูลิน แต่ละหมู่มีสมบัติแตกต่างกันดังนี้

1) อิมมิวโนโกลบูลิน G (Immunoglobulin G หรือ Ig) เป็นอิมมิวโนโกลบูลินที่พบมากที่สุดในเซรุ่ม คือประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ ของอิมมิวโนโกลบูลินทั้งหมด เป็นอิมมิวโนโกลบูลินที่สามารถผ่านรกจากมารดาไปยังทารกในครรภ์ได้ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันไม่ให้ทารกแรกเกิดติดเชื้อได้ เช่น โรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส บาดทะยัก เป็นต้น

2) อิมมิวโนโกลบูลิน M (Immunoglobulin M หรือ IgM) มีอยู่ในเซรุ่มประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ของอิมมิวโนโกลบูลินทั้งหมด จะไม่พบอิมมิวโนโกลบูลินชนิดนี้ในทารกหรือเด็กแรกเกิด และจะพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย มีบทบาทในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ไวรัส ที่เข้าไปในร่างกาย

3) อิมมิวโนโกลบูลิน A (Immunoglobulin A หรือ IgA) เป็นอิมมิวโนโกลบูลินที่สามารถพบได้ทั้งในเซรุ่ม เนื้อเยื่อ และน้ำคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น น้ำตา น้ำมูก น้ำลาย น้ำเมือกในหลอดอาหาร ในลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และในกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น อิมมิวโนโกลบูลินชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าไปในร่างกาย

4) อิมมิวโนโกลบูลิน D (Immunoglobulin D หรือ IgD) เป็นอิมมิวโนโกลบูลินที่มีอยู่ในเซรุ่มของคนปรกติประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อเซรุ่ม 100 มิลลิลิตร หรือประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของอิมมิวโนโกลบูลินทั้งหมด

5) อิมมิวโนโกลบูลิน E (Immunoglobulin E หรือ IgE) เป็นอิมมิวโนโกลบูลินที่มีอยู่ในเลือดน้อยที่สุด คือมีประมาณ 0.03 มิลลิกรัมต่อเซรุ่ม 100 มิลลิลิตร หรือประมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ของอิมมิวโนโกลบูลินทั้งหมด

2.1.6 แอนติเจน (Antigen)

แอนติเจน(Antigen) คือ สารที่สามารถกระตุ้นให้คนหรือสัตว์มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือสร้างแอนติบอดีขึ้น ซึ่งแอนติบอดีที่เกิดขึ้นนั้นมีสมบัติที่จะทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อแอนติเจนชนิดนั้นเท่านั้น ตำแหน่งบนผิวแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับแอนติบอดีนั้นเรียกว่า Antigenic Determinant ซึ่งตำแหน่งนี้มีรูปร่างหรือโครงสร้างที่แตกต่างกันไป จึงทำให้แอนติเจนสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้หลายชนิด (Multispecific) และหลายโมเลกุล (Multivalent)

ตารางที่ 2.1 แสดงสารที่สามารถเป็นแอนติเจนได้

ชนิดของแอนติเจน	แหล่งที่พบ
โปรตีน (Protein)	โปรตีนในน้ำเลือด โปรตีนในเนื้อเยื่อ โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัส แบคทีเรีย และจุลินทรีย์อื่น ๆ โปรตีนในพืชและเอนไซม์
ลิโพโปรตีน (Lipoprotein)	ลิโพโปรตีนในน้ำเลือดและในเยื่อหุ้มเซลล์
พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharides)	แคปซูลของแบคทีเรียพวกนิวโมค็อกคัส (Pneumococcus)
ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (Lipopolysaccharides)	ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ
ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein)	สารที่อยู่ที่ผิวเม็ดเลือดแดงหมู่ A และ B
พอลิเพปไทด์ (Polypeptide)	ฮอร์โมน เช่น อินซูลิน ฮอร์โมนโกรท
กรดนิวคลิอิก (Nucleic Acid)	นิวคลิโอโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งที่จัดเป็นแอนติเจน จะต้องมีสมบัติดังนี้

1) เป็นสิ่งแปลกปลอม (Foreign Body) สำหรับร่างกาย

2) เป็นสารที่เซลล์สร้างแอนติบอดีจำไม่ได้ว่าสารนั้นเป็นของตัวเอง

3) มีโมเลกุลนาดใหญ่

4) อยู่ในลักษณะของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ หรือเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งของเซลล์มนุษย์หรือสิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เนื้อเยื่อ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย เห็ดรา เกสรพืช เป็นต้น

ทางที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย แบ่งออกเป็น 2 ทาง คือ

1) เข้าสู่ร่างกายได้เอง (Natural Ways) หมายถึง ทางที่แอนติเจนสามารถเข้าสู่ร่างกายได้เอง เช่น ทางระบบทางเดินหายใจ ทางระบบทางเดินอาหาร หรือทางรกซึ่งเป็นทางที่แอนติเจนจากแม่และลูกมีการแลกเปลี่ยนกัน

2) เข้าสู่ร่างกายโดยกระทำ (Artificial Ways) หมายถึง ทางที่แอนติเจนสามารเข้าสู่ร่างกายได้โดยการกระทำของคน เช่น การฉีด การให้เลือด การปลูกถ่ายอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ

2.1.6 Immunoblotting

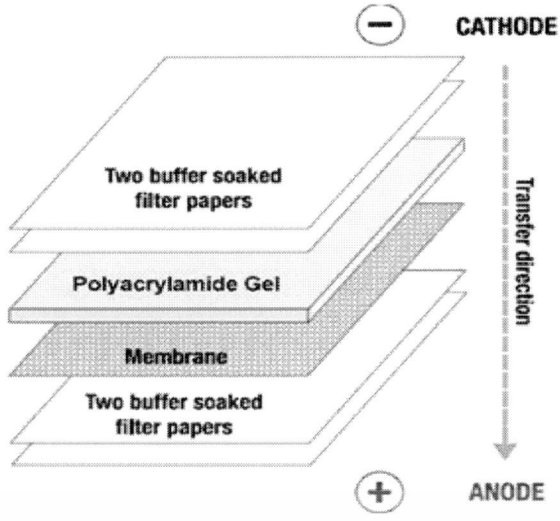
2.1.6.1 เจลอิเลคโตรฟอเรซีส (gel electrophoresis)

เป็นการแยกโปรตีนตัวอย่างโดย แยกตามขนาดโปรตีน (molecular weight) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างนิยมทำกันมาก เพราะง่าย เจลที่ใช้สำหรับการแยกซึ่งในการแยกโปรตีนทำได้ทั้งแบบ native gel หรือ denature gel หรือที่เรียกว่า sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) SDS เป็นสาร ionic detergent ที่จะเข้าไปจับกับโปรตีนทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพและกลายเป็นประจุลบ จึงทำให้การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จะเป็นการแยกตามขนาดโมเลกุล

2.1.6.2 Western blot

เป็นการย้ายโปรตีนผ่านการแยกด้วยเจลอิเลคโตรฟอเรซีสแล้วย้ายสู่เมมเบรนที่มีประจุบวก เช่น nitrocellulose หรือ polyvinylidene fluoride (PVDF) ในปัจจุบันวิธีการย้ายโปรตีนสามารถทำได้ 3 แบบ คือ wet tank transfer เป็นการย้ายโดยอาศัย buffer tank ซึ่งวิธีค่อนข้างต้องใช้บัฟเฟอร์เยอะและใช้เวลานานพอสมควรในการย้ายโปรตีน วิธีที่สอง semi-dry transfer เป็นวิธีนิยมใช้กันมากในปัจจุบันเนื่องจากไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์เยอะและสามารถทำการย้ายโปรตีนได้หลายแผ่นในเวลาเดียวกัน และสามารถย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนได้เกือบ 100% (figure 3) วิธีสุดท้ายเป็นการย้ายแบบ dry bufferless transfer คือทำการย้ายโปรตีนโดยไม่ต้องใช้บัฟเฟอร์และใช้เวลาน้อยประมาณ 7 นาที ทำให้ลดกระบวนการเตรียมสารต่างๆ รวมถึงให้ประสิทธิภาพในการย้ายดีมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

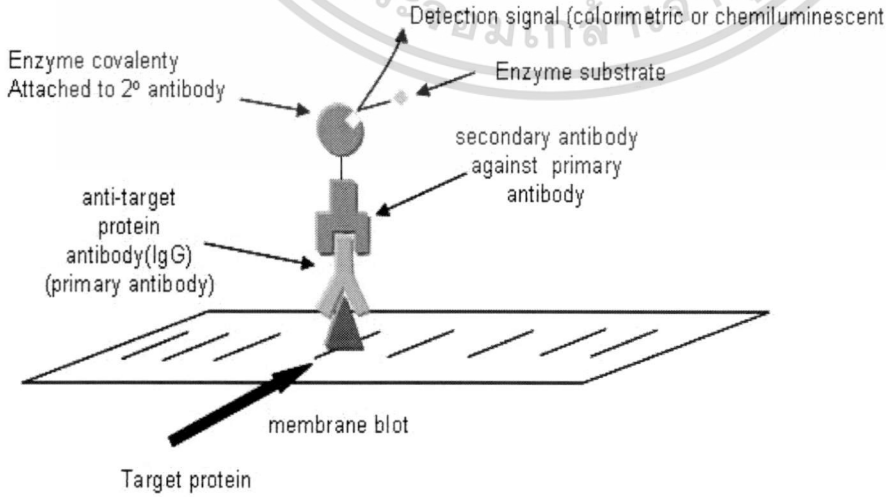


รูปที่ 2.1 แสดงการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน

ในขั้นตอนการติดตามผลนั้นจะมีการ probe เมมเบรนเพื่อโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีซึ่งอาจมีการลิงค์ด้วยเอนไซม์ หรือสารเรืองแสงอื่น และเมื่อทำปริกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้มีสีเกิดขึ้นหรือมีการเปล่งแสงออกมา ซึ่งแบ่งเป็น two step detection และ one-step detection

- Two-step detection เป็นการใช้แอนติบอดี เข้าไปจับโปรตีนที่มีความจำเพาะ เช่น ใช้ 1° Ab จับโปรตีนที่สนใจ บ่มเอาไว้เพื่อให้เกิดการจับกันอย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นทำการล้างเพื่อชะ non-specific binding ออกไป แล้วจึงใช้ 2° Ab ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สารรังสี หรือสารอื่นๆที่สามารถติดตามการเกิดสีหรือเรืองแสงได้ ซึ่ง 2°Ab จะเข้ากับกับ 1°Ab อย่างจำเพาะ

- One-step detection เป็นการใช้แอนติบอดีที่มีการติดฉลากด้วยเอนไซม์เรียบร้อยแล้ว ให้เข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายได้และสามารถทำให้เกิดสีได้ทันทีหลังจากเติมสารตั้งต้น โดยไม่ต้องผ่านการใช้ 2° Ab เข้าจับอีกที



รูปที่ 2.2 แสดงการเข้าจับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีแบบ Two-step detection

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.6.3 การวิเคราะห์ผล (Analysis)

หลังจากทำการบ่มแผ่นเมมเบรนด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแล้ว จากนั้นจะเป็นวิธีการติดตามว่าแอนติบอดีไปเกาะกับโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งใด ซึ่งการติดต่อวิเคราะห์ผลก็ขึ้นอยู่กับว่าแอนติบอดีที่ใช้ ติดฉลากด้วยสารอะไร แบ่งได้เป็น

- Colorimetric detection เป็นการติดตามผลโดยดูการเกิดสี ที่เกิดจากเอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นแล้วเกิดขึ้นบนแผ่นเมมเบรน

- Chemiluminescent detection เป็นการติดตามผลโดยการเรืองแสง ซึ่ง substrate ที่ใช้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นมา อาจต้องติดตามด้วย photographic filter หรือกล้อง CCD เพื่อจับภาพของเมมเบรน

- Radioactive detection การติดตามเป็นวิธีนี้ไม่ต้องใช้ substrate เพราะแอนติบอดี ถูกติดฉลากด้วยสารรังสีซึ่งจะเกิดการเปล่งแสงออกมา ต้องติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

- Fluorescent detection การวิเคราะห์และติดตามผลแบบนี้แอนติบอดีจะถูกติดฉลากมาด้วยสารเรืองแสง (fluorescent) ซึ่งจะต้องมีการกระตุ้น (excitation) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม และมีการปล่อยแสง (emission) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน ดังนั้นจะต้องดูผลโดยการใช้กล้อง photosensor เช่นกล้อง CCD ที่มี filter ในช่วงความยาวคลื่นตรงกันกับสารเรืองแสงเหล่านั้นในการจับภาพ

2.1.7 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

เป็นการวิเคราะห์การปรากฏของสารที่จำเพาะเจาะจงทั้งปริมาณและคุณภาพ ในตัวอย่างที่เป็นของเหลว โดยวิธีการที่ใช้ยังคงเป็นสารที่เป็นของเหลว ในระหว่างการวิเคราะห์ (เช่น การควบคุมลำดับปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยจะสร้างสัญญาณซึ่งสามารถวัดได้ง่าย ซึ่งเป็นตัวชี้วัดถึงปริมาณของสารในตัวอย่าง) ซึ่งยังต้องเป็นของเหลวอยู่ภายในห้องเกิดปฏิกิริยา หรือต้องเก็บสารทำปฏิกิริยาให้ดี ซึ่งตรงกันข้ามกับ dry lab ที่สามารถใช้แถบแบบแห้งได้ ถึงแม้ว่ากลุ่มตัวอย่างเป็นของเหลวELISA จะให้ antigen หรือ antibody ที่เกาะอยู่บน phase เช่น microtiter plate, bead หรือ disk ปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอนจะต้องมีการล้างเพื่อเอาส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกจึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก เอ็นไซม์ที่นิยมใช้ใน ELISA ได้แก่ Horseradish peroxidase (substrate ที่นิยมใช้ คือ hydrogen peroxide -phenylenediamine ให้สีน้ำตาล) alkaline phosphatase (substrate ที่นิยมใช้ คือ p-nitrophenylphosphate ให้สีเหลือง) เป็นต้นแบ่งเป็น 2 วิธี

2.1.7.1 Indirect method

เป็นวิธีการตรวจหา antibody ต่างๆ มีหลักการคือ ให้ antibody ที่ต้องการตรวจทำปฏิกิริยากับ antigen ซึ่งทราบชนิดแล้วและติดอยู่บนผิวของ solid phase และใช้ anti-immunoglobulin ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง

2.1.7.2 Double antibody sandwich method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นวิธีตรวจหา antigen โดยมีหลักการ คือ เคลือบพื้นผิวของ solid phase ด้วย antibody เติม antigen ที่ต้องการหาลงไปทำปฏิกิริยา ล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติม antibody (ตัวเดียวกับที่เคลือบ solid phase) ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ลงไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

[Vesennyaya1, Solnechniy, Zaporozhye , 2005] ลักษณะเฉพาะของตัวบ่งชี้โปรตีนในดอกทานตะวันของแต่ละสายพันธ์ การศึกษาการตัวบ่งชี้โปรตีนในดอกทานตะวัน 30 สายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาโดยวิธีการผสมเกสรในตัวเอง ระหว่างการพัฒนาสายพันธ์ ลักษณะของพืชที่ถูกเลือกจะอยู่บนพื้นฐานเชิงสัณฐานวิทยาและ electrophoretic spectrum ของแหล่งเก็บสะสมโปรตีนในเมล็ดพืช ในทางพันธุกรรมดอกทานตะวันที่บริสุทธิ์จะอยู่บนพื้นฐาน electrophoretic spectrum ของแหล่งเก็บสะสมโปรตีนในเมล็ดพืช ทานตะวันแต่ละสายพันธ์จะแตกต่างกันในสเปกตรัมของสาย polypeptide ของ helianhtin (โปรตีนหลักในเมล็ดพืช) พารามิเตอร์นี้จะใช้ในการระบุยีนที่เฉพาะของแต่ละสายพันธ์ สายพันธ์ใหม่ 5 ชนิดจะถูกพัฒนาต่อไปสำหรับสายพันธุ์ดอกทานตะวันในอนาคต

[Nisachon Jangpromma, Supansa Kitthaisong , Sakda Daduang , Prasit Jaisiland Sompong , 2008] แหล่งสะสมของโปรตีน 18 KDa ในใบของอ้อยภายใต้สภาวะความแห้งแล้งอย่างยิ่งยวดการเปลี่ยนแปลงของการสังเคราะห์โปรตีนหรือการย่อยสลายเป็นหนึ่งในกระบวนการเผาผลาญอาหารพื้นฐานที่มีผลต่อการทนแล้ง เพื่อการตรวจสอบโปรตีนของอ้อยที่ทนแล้งได้ อ้อยที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกันสองสายพันธ์ ขอนแก่น 1 และ k86-161 ถูกบังคับให้ขาดน้ำอย่างหนักเป็นเวลา 20 วันภายใต้สภาวะที่แห้งแล้งอย่างรุนแรง สายพันธุ์ขอนแก่น1 นั้นจะไวต่อสภาวะขาดน้ำ การเปลี่ยนแปลงของใบสามารถสังเกตได้ภายใน2สัปดาห์หลังการขาดน้ำใบของขอนแก่น1จะเริ่มเหลืองและหลุดร่วง ในขณะที่ใบของK86-161ใบยังเขียวอยู่ค่าความชื้นสัมพัทธ์: relative water content (RWC)ในขอนแก่น 1 ลดลงถึง 60 % ในวันที่ 20 ในขณะที่ RWC ของK86-161นั้นลดลงเพียงเล็กน้อยและยังคงเหลืออยู่ถึง 86% ขึ้นอยู่กับแรงดันน้ำ นอกจากนี้เมื่อทำ two-dimensional electrophoresis เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในใบพบการสะสมของโปรตีน18 kDa ในฤดูแล้งในสายพันธุ์ K86-161 แอนติเซรั่มจะเพิ่มขึ้นเพื่อกำจัดโปรตีนชนิดนี้ ทำให้บริสุทธิ์จาก SDS-PAGE ถูกนำมาใช้เป็น probe ในการตรวจสอบโปรตีนในใบอ้อยโดยใช้ Western blotting technique โดย titer ของปฏิสัมพันธ์แอนติเจนและแอนติบอดี มีค่าอยู่ประมาณ 1:100 นอกจากนี้ polyclonal antibody ถูกใช้ในการตรวจหาแหล่งสะสมของโปรตีน18 kDaในใบของ K86-161 และขอนแก่น 1 โดยใช้ Western blotting technique ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แถบโปรตีน 18 kDaใน K86-161มีความหนาแน่นสูงกว่าขอนแก่น 1 มากในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า โปรตีน18 kDa มีความสามารถสูงที่จะนำไปพัฒนาในการเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการแบ่งแยกสายพันธุ์อ้อยที่ทนแล้งได้

[ปาริฉัตร รัตนผล และธานี ศรีวงศ์ , 2553] การประเมินหาปริมาณอะมิโลสตามวิธีปกตินั้นจะใช้ปริมาณตัวอย่างจำนวนมากและเป็นการวิธีเคราะห์แบบทำลายตัวอย่างการวิจัยครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสโดยใช้ปริมาณตัวอย่างที่น้อยลง ซึ่งใช้ตัวอย่างข้าวจำนวน 10 เมล็ด โดยการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บดตัวอย่างเมล็ดข้าวในครกบดยาขนาดเล็กจะได้แป้งข้าว ประมาณ 100 มิลลิกรัม และจะใช้ตัวอย่างแป้งข้าว จำนวน 20 มิลลิกัรมในการวิเคราะห์ ซึ่งตัวอย่างและปริมาณสารที่ใช้จะลดลง 5 เท่าจากวิธีปกติ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นสามารถวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสในสายพันธุ์ที่ทราบปริมาณอะมิโลสแล้วได้ค่าการจัดกลุ่มอะมิโลส เช่นเดิม ส่วนสายพันธ์ทดสอบนั้นสามารถวิเคราะห์หาปริมาณอะมิโลสได้ ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณอะมิโลสในสายพันธุ์ปรับปรุงชั่วแรกๆ ที่มีปริมาณเมล็ดน้อยได้ ซึ่งจะใช้เป็น ข้อมูลในการตัดสินใจเลือกพันธุ์ข้าวที่มีประมาณอะมิโลสที่ต้องการได้

[ปาริฉัตร รัตนผล , ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย ,2555] การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าวนั้นเป็นประโยชน์ต่อการช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมในข้าว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมานั้นได้ออกแบบให้คล่อมตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของเบสจำนวน 8 เบสที่ exon 7 ของยีน Badh2 ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะความหอมในข้าวเมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ออกแบบใหม่มาทดสอบทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยวิธี Polyacrylamide GelElectrophoresis (PAGE) ใน พันธุ์ข้าว 2 กลุ่มคือ ข้าวที่มีกลิ่นหอมและไม่หอมนั้นพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมานั้นสามารถแบ่งข้าว ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือข้าวที่มีกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่นหอม โดยมี PCR product ขนาด 236 bp และ 244 bp ตามลำดับ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้เป็นเครื่องหมายประเภท Codominance และเป็นการจำแนกส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนโดยตรงจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำในการตรวจสอบเหมาะสำหรับการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. microcentrifuge tube
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง
3. เครื่อง semidry blot
4. Microplate
5. Spectrophotometer
6. เครื่องแก้วต่างๆ

3.2 สารเคมี

1. Anti-BADH2 antibody from rabbit (Biosynthesis)
2. NBT/BCIP solution kit (Bio-Rad)
3. Alkalinephospatase conjugated Mouse anti-rabbit antibody (Jackson Immunolab)
4. NaOH 3N
5. separating gel
6. stacking gel
7. blocking solution (BIO-RAD, USA)
8. Mini-Protein III Cell (Bio-Rad, U.S.A)
9. Coomassie brillant blue R-250 solution
10. Tris-base48 mM
11. glycine buffer 39 mM
12. 20%menthanol
13. Tris-HCl 10 mM
14. NaCl 150 mM

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การออกแบบสายเปปไทด์และการผลิตแอนติบอดีต่อ BADH2

ทำการศึกษางานวิจัยก่อนหน้าเพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับของกรดอะมิโน BADH2 ทั้งในข้าวหอมมะลิและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม จากนั้นเลือกบริเวณที่พบเฉพาะใน BADH2 ของข้าวไม่หอมมะลิและสั่งสังเคราะห์เปปไทด์ตามลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการ นำเอาเปปไทด์สังเคราะห์ที่ได้ส่งไปฉีดในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะโดยเหมาจ้างบริษัท Biosynthesis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1 การสกัดโปรตีน (Protein extraction)

นำเมล็ดข้าวเปลือกมาบดเป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ lysis buffer (0.01N NaOH) 500 ml และบดต่อเพื่อทำให้โปรตีนทั้งหมดละลายออกมา จากนั้นปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาทีที่ 10,000 xg ที่ 4 °C เก็บส่วนสารละลายที่ใสลงในหลอด microcentrifuge tube 1.5 ml และวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford

3.3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี gel electrophoresis

One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)ใช้ 15% separating gel และ 4% stacking gel ผสมโปรตีนที่สกัดได้ 0.1 μg กับ loading dye และนำไปโหลดลงใน SDS-PAGE และแยกโปรตีนด้วย Mini-Protein III Cell (Bio-Rad, U.S.A) จนกระทั่งสีที่ติดตามเลื่อนลงไปถึงขุดล่างสุดของตัวเจล โดยมีแถบโปรตีนมาตรฐาน (Prestain Protein marker)(Promega, U.S.A) เป็นแถบขนดโปรตีนอ้างอิง และนำเจลที่ได้ส่วนหนึ่งไปย้อมสีด้วย Coomassie brillant blue R-250 solution และอีกส่วนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot

3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนอย่างจำเพาะด้วยวิธี Western blot

หลังจากโปรตีนถูกแยกขนาดด้วย SDS-PAGE โปรตีนจะถูกถ่ายโอนไปยัง nitrocellulose membrane (GE healthcare bioscience, USA) บัฟเฟอร์ที่ใช้ถ่ายโอนจะประกอบด้วย Tris-base48 mM , glycine buffer 39 mM และ 20%menthanol จากนั้นนำไปถ่ายโอนด้วยเครื่อง semidry blot โดยให้กระแสไฟ 130 mA เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นนำเมมเบรนบ่มไว้ใน blocking solution(BIO-RAD, USA)ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2ชั่วโมง ต่อจากนั้นเมมแบรนที่ประกอบด้วยโปรตีนจะถูกบ่มไว้กับแอนติบอดี้ปฐมภูมิ(rabbit Anti-BADH2 antibody) ที่เจือจาง 1:100 ด้วย blocking solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1ชั่วโมง หลังจากที่ล้างเมมแบรนด้วย wasing buffer(Tris-HCl 10 mM , NaCl 150 mM pH 7.4) สามครั้งครั้งละ 5 นาที บ่มเมมแบรนใน alkaline phosphatase conjugated mouse anti-rabbit IgG (1:500 ใน blocking buffer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมมแบรนจะถูกล้างอีกครั้งด้วย wasing buffer สามครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจสอบแถบโปรตีน $BADH_2$ด้วย detection buffer pH 9.5 (30 μl NBT/BCIP solution และ 5 ml ของ 100 mMTris-base, 100 mM NaCl 50 mM $MgCl_2 \cdot 6H2O$) เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยา

3.3.4 การวิเคราะห์หาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2ด้วยวิธี ELISA

เจือจางโปรตีนที่สกัดได้ด้วย extraction buffer 2 เท่าทั้งหมด 4 ความเข้มข้นบ่มโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆลงใน 96-well microplate หลุมละ 100 μl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 200 μl washing buffer 5 นาที 3ครั้ง เติม blocking buffer 200 μl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทออกแล้วเติม 100μl Rabbit anti-$BADH_2$ antibody เจือจาง 1:100 ใน blocking buffer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทออกจากนั้นล้างด้วย 200 μl washing buffer 5 นาที 3ครั้ง เติม 100 μl alkaline phosphatase conjugated mouse anti-rabbit IgG (1:500 ใน blocking buffer) บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิห้องตรวจสอบโปรตีนด้วย Alkalinephosphatase detection kit for ELISA (BIO-RAD) หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N NaOH นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm

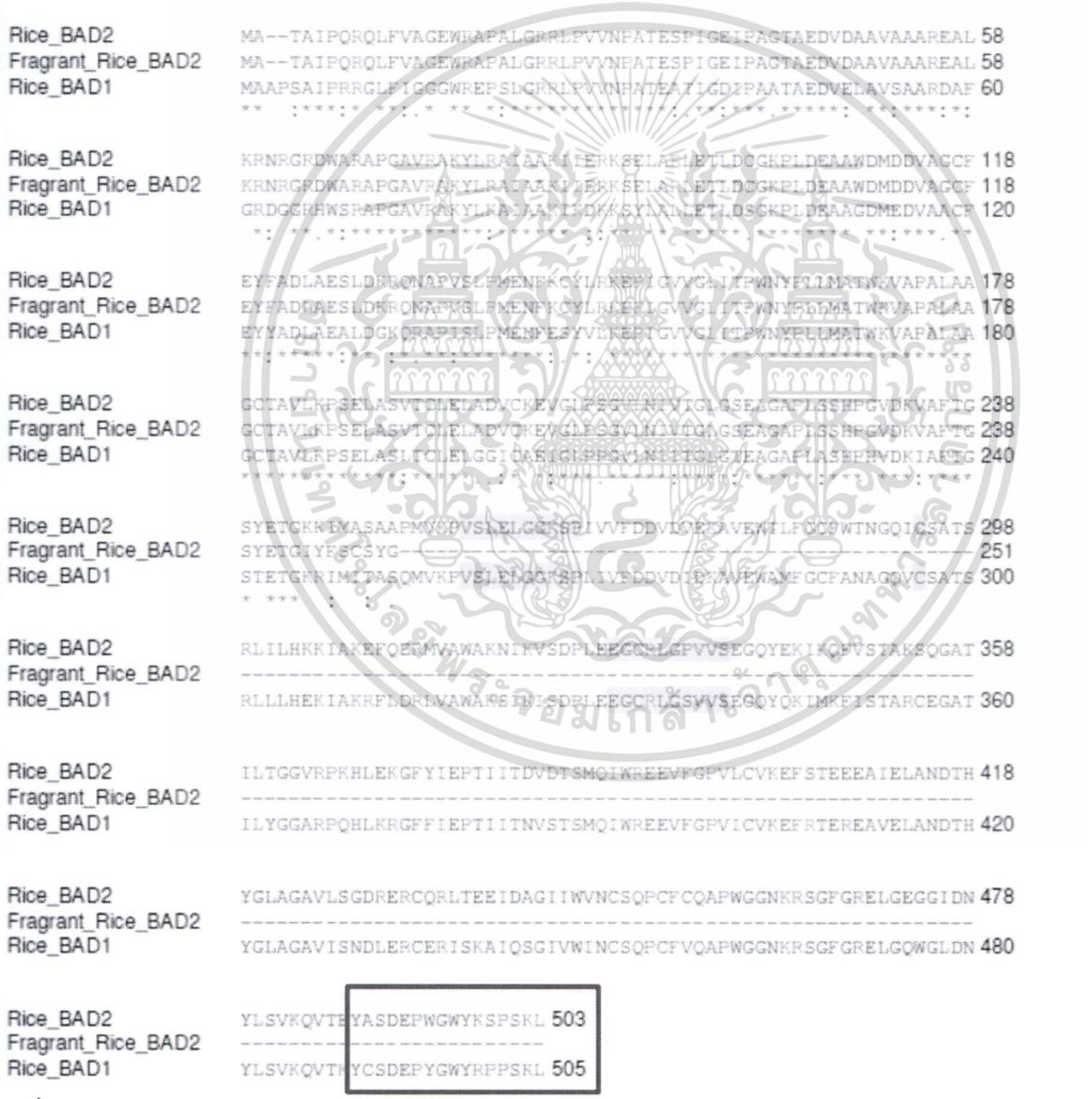
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ลำดับของกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ออกแบบ

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าลำดับของกรดอะมิโนของยีน BADH2 ของข้าวหอมมะลิและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะมีบริเวณที่แตกต่างกันคือ กรดอะมิโนของโปรตีน BADH2 ของข้าวหอมมะลิทางด้านปลายคาร์บอกซิลิกจะหายไปบางส่วนเนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ของยีน BADH2 ดังรูป



รูปที่4.1 การเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของ BADH2 ในข้าวหอมมะลิและในข้าวธรรมดา โดยบริเวณที่อยู่ในสี่เหลี่ยมปีนส่วนที่นำมาสังเคราะห์เป็นเปปไทด์

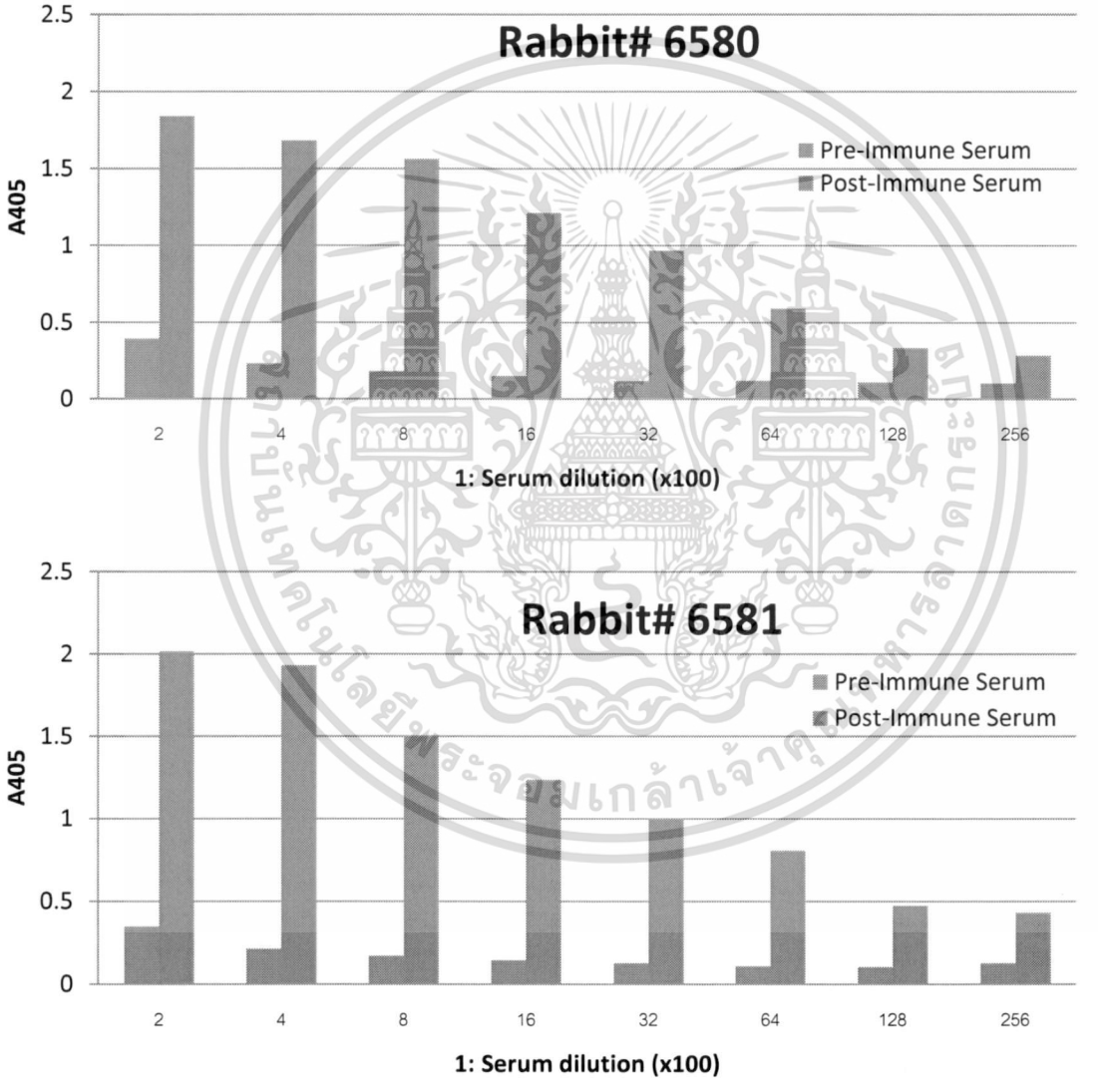
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

131138

ดังนั้นเราจึงได้ใช้บางส่วนที่พบในเฉพาะ BADH2 ในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม โดยลำดับของกรดอะมิโนที่เลือกไปสังเคราะห์เป็นสายเปปไทด์คือ NH_2-CSDEPWGWYKSPSKL-COOH ในเปปไทด์จะมีการเติมกรดอะมิโน Cysteine ไว้ที่ปลายอะมิโนเพื่อใช้เชื่อมต่อกับ keyhole limpet hemocyanin (KLH) เพื่อใช้กระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในกระต่าย

4.2 ผล ELISA ของแอนติบอดีที่จำเพาะกับสายเปปไทด์ที่สังเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ได้ส่งผลิตแอนติบอดีต่อเปปไทด์สังเคราะห์โดยใช้กระต่ายสองตัวทำการเก็บซีรั่มก่อนกระตุ้นและทำการฉีดกระตุ้นเป็นเวลา 8 สัปดาห์และทำการเก็บซีรั่มตัวอย่างอีกครั้ง เมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีต่อสายเปปไทด์สังเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA ให้ผลดังรูป



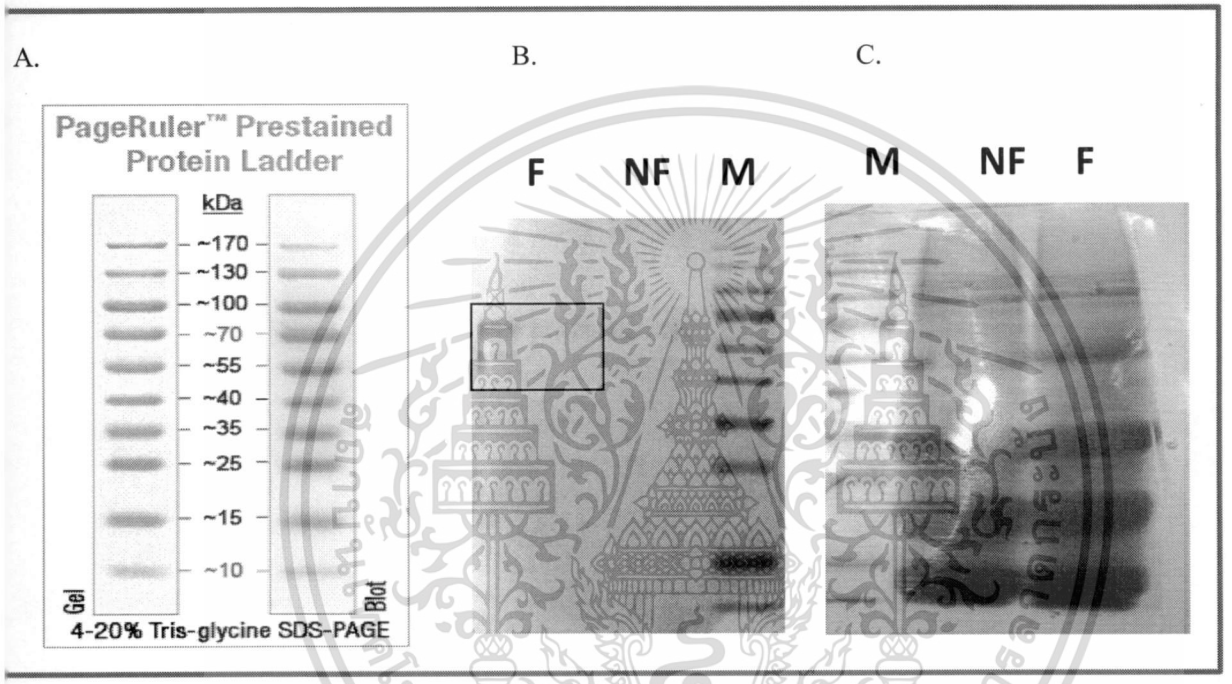
รูปที่ 4.2 ผล ELISA ของแอนติบอดีที่ผลิตจากกระต่ายสองตัว (6580 และ 6581)

จากผล ELISA จะเห็นได้ว่าซีรัมจากกระต่ายรหัส 6581 จะให้แอนติบอดีที่ตอบสนองกับเปปไทด์สังเคราะห์ได้ดีว่าซีรัมจากกระต่ายรหัส 6580 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ซีรัมจากกระต่ายรหัส 6581 มาใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี Western blot

เมื่อได้แอนติบอดีต่อเปปไทด์สังเคราะห์ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็นส่วนหนึ่งของข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมแล้ว เราจึงได้ทำการทดสอบแอนติบอดีนี้ต่อโปรตีน BADH2 ทั้งในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี Western blot ข้าวที่นำมาใช้เป็นเมล็ดข้าวเปลือกซึ่งนำมาสกัดทั้งเมล็ดให้ได้โปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 5 µg แล้วจึงนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE จากนั้นจึงส่งผ่านลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแล้วนำไปหาแถบโปรตีน BADH2 ด้วย แอนติบอดี้ ผลที่ได้เป็นดังรูป



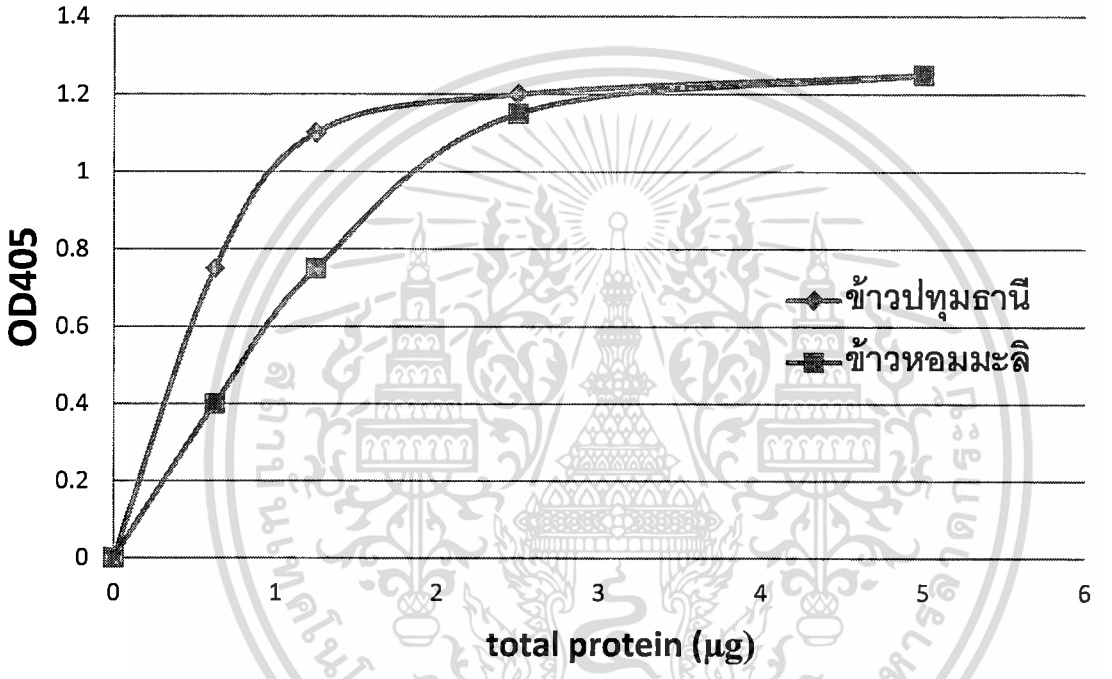
รูปที่ 4.3 แสดงผลการแยกโปรตีนทั้งหมดในข้าวหอมมะลิ KDML105 (F) และข้าวไม่หอมมะลิ ปทุมธานี (NF) และโปรตีนขนาดมาตรฐาน (M) โดยรูป A แสดงขนาดต่างๆของโปรตีนมาตรฐาน รูป B แสดงผลการทำ Wester-blot โดยที่อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมคือโปรตีน BADH2 และรูป C แสดงผลของ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G

จากผลที่ได้จะพบแถบโปรตีนหลายขนาดเมื่อย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue G solution แต่เมื่อตรวจหาโปรตีนอย่างจำเพาะด้วยแอนติบอดีจะพบเฉพาะแถบโปรตีนขนาดประมาณ 65 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีน BADH2 และพบแถบนี้ในตัวอย่างของข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมดังนั้นแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะกับโปรตีน BADH2 ในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม

4.4 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิด้วยวิธี ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากได้ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับโปรตีน BADH2 ในข้าวเปลือกแล้ว เราก็ทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ซึ่งจะเป็นวิธีที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในชุดคิตต่างๆ ในการทดลองนี้จะเจือจางโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวหอมมะลิให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อดูว่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถแยกการจับกันของแอนติบอดีในข้าวหอมมะลิกับข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมออกจากกันได้ โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้คือ 5 μg ต่อหลุมและความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.625 μg ต่อหลุม โดยเราใช้วิธี spectrophotometry วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จับกับ BADH2 ในแต่ละหลุม ซึ่งผลที่ได้ให้ผลดังรูป



รูปที่ 4.4 แสดงผล ELISA ของการตรวจหา BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานี

จากรูปจะเห็นได้ว่าที่ 0.625-1.25 μg เป็นช่วงความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่สามารถแยกการจับกันของแอนติบอดีในข้าวหอมมะลิกับข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมออกจากกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่กระตุ้นด้วยเปปไทด์สังเคราะห์ที่ออกแบบจากส่วนหนึ่งของโปรตีน BADH2 มีความจำเพาะกับโปรตีน BADH2 ในข้าวเปลือกพันธุ์ปทุมธานี ซึ่งจัดเป็นข้าวที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิด้วยวิธี Western-blot และเมื่อนำแอนติบอดีไปใช้ในการตรวจหา BADH2 ในข้าวปทุมธานีและข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิค ELISA เพื่อใช้ในการคัดแยกข้าวไม่หอมมะลิกับข้าวหอมมะลิพบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานีอยู่ในช่วง 0.625-1.25 μg ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตมานั้นมีความสามารถในการแยกชนิดของข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานีได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเฉพาะความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิ และข้าวปทุมธานี ซึ่งในการทดลองเราแยกข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานีออกจากกัน ดังนั้นถ้าหากต้องการนำไปใช้จริงจะต้องนำไปศึกษาความสามารถในการตรวจสอบการปนของข้าวปทุมธานีในข้าวหอมมะลิได้ด้วยการผสมข้าวหอมมะลิและข้าวปทุมธานีในสัดส่วนต่างๆและตรวจสอบว่าแอนติบอดีที่ผลิตนี้สามารถตรวจสอบการปลอมปนข้าวปทุมธานีที่น้อยที่สุดเท่าไรเพื่อที่จะได้นำไปใช้ในการผลิตและออกแบบเป็นชุดตรวจสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา คุ้มวงษ์. 2549.**การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะซิติกด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาแบบวิวิธพันธ์.**มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ฯ. จำนวน 10 หน้า

กรมการข้าวกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. **ความรู้คู่เมล็ดข้าว. กรุงเทพมหานคร.**

ยุวธิดา สูงห้างหว้า. 2553. **โครงงานข้าว.** โรงเรียนฝางวิทยายนสำนักงานเขตพื้นที่การศึกษามัธยมศึกษา เขต 25 ขอนแก่น.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง. 2553. **ยีนความหอมและลักษณะพื้นฐานทางอณูพันธุศาสตร์ของข้าวหอม.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเกษตรศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ปาริฉัตร รัตนผล และ ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. **เทคนิคการตรวจสอบปริมาณอะมิโลสโดยใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย.** จำนวน 6 หน้า

ปาริฉัตร รัตนผล , ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2555. **การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าว.** จำนวน 7 หน้า

โรงสี สินสมบูรณ์. สำนักงาน กรุงเทพฯ ลาดพร้าว 87.

Bradbury, L.M.T., R.J. Henry, Q.S. Jin, R.F. Reinke, and D. L. E. Waters. 2005. **A perfect marker for fragrance genotyping in rice.** Mol. Breed. 16:279-283.

Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q.S. Jin, and D.L.E. Waters. 2005. The gene for fragrancein rice. **Plant Biotechnology Journal.**3: 363–370.

Bradbury, L.M.T., S.A. Gillies, D.J. Brushett, D.L.E. Waters, and R.J. Henry. 2008. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. **Plant Molecular Biology**. 68: 439–449.

Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q.S. Jin and D.L.E. Waters. 2005. **The gene for**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

fragrance in rice. Plant Biotechnol. J.3: 363–370.

Buttery, R.G., L.C. Ling, B.O. Juliano and J.G. Turnbaugh. 1983. **Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline.** J. Agric. Food Chem.31: 823–826.

Buttery, R.G., L.C. Ling, and B.O. Juliano. 1982. 2-acetyl-1-pyrroline an important aroma component of cooked rice. **Chemistry and Industry.** 12: 958-959.

Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, and E.C.K. Pang. 2005. **An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement**: The basic concepts. Euphytica 142: 169–196.

James W.Moffett.,Oliver C.Zafiriou. 1993 **.The photochemical decomposition of hydrogenperoxide in surface waters of the eastern Caribbean and Orinoco.** Journal of geophysical research.

Kovach, M.J., M.N. Calingacion, M.A.Fitzgerald, and S.R. McCough. 2009. **The origin and evolution of fragrance in rice** (Oryza sativa L.). Proc Natl Acad Sci USA 106:14444-14449.

Nisachon Jangpromma, Supansa Kitthaisong , Sakda Daduang, Prasit Jaisiland Sompong Thammasirirak.**18 kDa protein accumulation in sagacane leaves under drought stress conditions.**Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University,Khon Kaen.

Sakthivel, K., R.M. Sundaram, N. Shobha Rani, S.M. Balachandran, and C.N. Neeraja. 2009. Genetic and molecular basis of fragrance in rice.**Biotechnology Advances.** 27: 468–473.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shi, W, Y., Yang, S. Chen, and M. Xu. 2008. **Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties.** Mol. Breed. 22:185-192.

Sreewongchai, T., T. Toojinda, N. Thanintorn, C. Kosawang, A. Vanavichit, D. Tharreau and P. 2010. **Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs.** Plant Breeding129: 176-180.

William J. Cooper และคณะ. 2006.**Sunlight Induced Photochemical Decay of Oxidants in Natural Waters : Implications in Ballast Water Treatment.** Maimi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล นาย ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

   Name Mr.Tipachai Vatanavicharn ,Ph.D.

2. เลขบัตรประชาชน 3101400448879

3. การศึกษา

   - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีวเคมี) เกียรตินิยมอันดับสอง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2003
   - วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2009

4. งานวิจัย

   มีประสบการณ์ในการทำงานวิจัยด้านศึกษาการทำงานและหน้าที่ของสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต และมีผลงานวิจัยในสถานะผู้ร่วมวิจัยดังนี้

   - Vatanavicharn T, Supungul P, Puanglarp N, Yingvilasprasert W, Tassanakajon A. 2009. Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustin*Pm*5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. Compartive Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology 153:244-252.
   - Prapavorarat A, Vatanavicharn T., Soderhall K., Tassanakajon A. 2010. A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Journal of Biochemstry 285(2):21467-77
   - Vatanavicharn T, Pongsomboon S, Tassanakajon A. 2012. Two plasmolipins from the black tiger shrimp, Penaeus monodon and their response to virus pathogens. Dev Comp Immunol. 38(2):389-94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้