การพัฒนา Protein Marker ในการตัดแยกข้าวหอมมะลิ

PROTEIN MARKER DEVELOPMENT FOR SEPARATE FRAGRANCE RICE

จักรี โปฎก

กวินทิพย์ แก้วประเสริฐ

กษิดิศ ชูสูสีนภัย

ธนเดช ตันมงคล

โครงงานนี้เสนอเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2555

การพัฒนา Protein Marker ในการคัดแยกข้าวหอมมะลิ

PROTEIN MARKER DEVELOPMENT FOR SEPARATE FRAGRANCE RICE

จักรี โปฏก

กวินทิพย์ แก้วประเสริฐ

กษิดิศ สูญสิ้นภัย

ธเนตร ตันมงคล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2555

PROTEIN MARKER DEVELOPMENT FOR SEPARATE FRAGRANCE RICE

JAKGREE PODOK

KAWINTIP KRAWPRASERT

KASIDIT SOONSINPAI

TANATE TANMONGKON

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACANDEMIC YEAR 2012

โครงงานพิเศษ การพัฒนา Protein Marker

นักศึกษา นายจักรี โปฏก

นางสาวกวินทิพย์ แก้วประเสริฐ

นายกษิดิศ สูญสิ้นภัย

นายธเนตร ตันมงคล

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2555

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
อาจารย์กลิ่นสุคนธ์ สุวรรณรัตน์	.....
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	.....
ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น	.....

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษ การพัฒนา Protein Marker

นักศึกษา นายจักรี โปฏก

นางสาวกวินทิพย์ แก้วประเสริฐ

นายกษิดิศ สูญสิ้นภัย

นายธเนตร ตันมงคล

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

BADH2 เป็นโปรตีนที่พบในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่มีกลิ่นหอมโดยในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะมีโปรตีนBADH2 ครบสมบูรณ์แต่ในข้าวหอมมะลิจะไม่สมบูรณ์ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงอาศัยความแตกต่างของโปรตีน BADH2 ในข้าวสองสายพันธ์มาเป็น Protein marker เพื่อนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าวไม่มีกลิ่นหอมในข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิค Western blot และ ELISA ผลที่ได้เมื่อสกัดเอาโปรตีนจากข้าวหอมมะลิ (KDML 105) และข้าวไม่มีกลิ่นหอม (ปทุมธานี 1) นำมาตรวจหา BADH2 ที่สมบูรณ์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ Anti-BADH2 antibody เป็นตัวตรวจจับพบว่า ตรวจพบแถบโปรตีนในข้าวไม่มีกลิ่นหอมและไม่พบแถบโปรตีนในข้าวหอมมะลิ และเมื่อนำเอาโปรตีนที่สกัดมาตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ Anti-BADH2 antibody เป็นตัวตรวจจับพบว่าโปรตีนที่สกัดจากข้าวไม่หอมจะให้ผลเป็นบวก(สารละลายจะมีสีเหลืองเข้ม) แสดงว่ามีโปรตีน BADH2 ซึ่งเป็น protein marker อยู่ ในขณะที่โปรตีนที่สกัดจากข้าวหอมมะลิให้ผลเป็นลบ (สีเหลืองอ่อนๆ)ดังนั้นจากผลที่ได้แสดงว่าเราสามารถตรวจจับข้าวไม่มีกลิ่นหอมด้วยเทคนิค ELISAโดยใช้ BADH2 เป็น protein marker ได้ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน BADH2 มีความสามารถสูงที่จะนำไปพัฒนาในการเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการแบ่งแยกสายพันธ์ข้าวหอมมะลิ

คำสำคัญ:โปรตีนBADH2 Protein marker Western blot ELISA

Title	Protein markered development for separate fragrance rice.
Students	Jakgree Podok
	Kawintip Kaewprasert
	Kasidit Soonsinpai
	Tanate Tonmongkon
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Environmental chemistry
Advisor	Dr.TipachaiWathanavijarn

ABSTRACT

BADH2 is a protein found in rice, jasmine and non-fragrance rice. But in non-fragrance BADH2 is a complete protein while jasmine riceBADH2 is an incomplete protein. Therefore , in this study, the difference of BADH2 protein in rice 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 no fragrant rice (Pathum Thani 1) were extracted and complete BADH2 protein was detected by Western blot technique using Anti-BADH2 antibody as a sensor. The results showed that complete BADH2 protein was detected only in non-fragence rice and wasn't in jasmine rice. When try to detect BADH2 protein with ELISA techniques by using Anti-BADH2 antibody as a sensor, we found that the extracted protein from non-fragence rice was determined as positive (yellow solution) mean it have BADH2, the protein marker. Therefore, result show that we can detect jasmine rice with ELISA techniques by using BADH2 as a protein marker These results indicated that protein BADH2 have a highly efficiency to be developed to identify protein and separate rice's species

KEYWORDS: BADH2 Protein marker Western blot ELISA

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยเรื่องการพัฒนา Protein marker ในการแยกข้าวหอมมะลิ สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากอาจารย์ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ซึ่งได้สละเวลาให้ความรู้ คำแนะนำและช่วยแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตลอดโครงงาน ด้วยความเอาใจใส่ทุกๆขั้นตอนอีกทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีและเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

ขอขอบคุณทุนงบประมาณรายได้ประจำปี 2555 ประเภทส่งเสริมนักวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนในการทำโครงงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนในการทำโครงงานวิจัยครั้งนี้และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการปฏิบัติงาน อุปกรณ์การทดลองต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของผู้วิจัยสำเร็จลุล่วง

นายจักรี โปฏก

นางสาวกวินทิพย์ แก้วประเสริฐ

นายกษิดิศ สูญสิ้นภัย

นายธเนตร ตันมงคล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง V

สารบัญรูป VII

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 7

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 7

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี 8

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 20

3.2 สารเคมี 21

3.3 วิธีการทดลอง 21

3.3.1 การสกัดโปรตีน (Protein Extraction) 22

3.3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี gel electrophoresis 22

3.3.3 การวิเคราะห์โปรตีนอย่างจำเพาะด้วยวิธี Western blot 22

3.3.4 การวิเคราะห์หาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน BADH2 ด้วยวิธี ELISA 23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	24
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก ก	30
ภาคผนวก ข	42
ภาคผนวก ค	43
ภาคผนวก ง	47
ภาคผนวก จ	50
ภาคผนวก ฉ	52

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่2.1 แสดงสารที่สามารถเป็นแอนติเจนได้ 12

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่1.1 แสดงโครงสร้างของสาร 2-acetyl-1-pyrroline 1

รูปที่1.2 แสดงลักษณะของข้าวหอมมะลิ 105 2

รูปที่1.3 แสดงเมล็ดพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 3

รูปที่2.1 แสดงการย้ายโปนตีนจากผ่านเมมเบรน 14

รูปที่2.2 แสกงการเข้าจับแอนติเจนด้วยแอนติบอดีแบบ Two-step detection 15

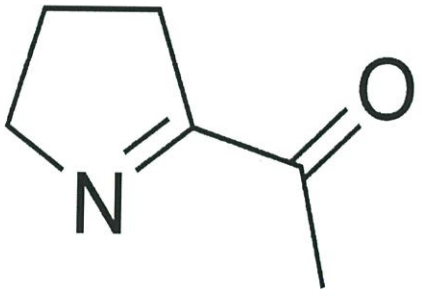
รูปที่ 4.1 แสดงแถบของโปรตีน BADH 2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่มีกลิ่นหอม 24

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

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 แสดงโครงสร้างของสาร 2-acetyl-1-pyrroline (Bradbury *et al.*, 2008)

ข้าวหอมจัดเป็นข้าวคุณภาพสูงทั้งในประเทศและต่างประเทศและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในกลุ่มของเกษตรกร พ่อค้า และผู้บริโภคมาเป็นเวลาช้านาน มีการปลูกข้าวหอมโดยทั่วไปในหลายประเทศ เช่น ข้าวพันธุ์บาสมาติของประเทศอินเดียและปากีสถาน พันธุ์ Malagkit sungsong และ Milagrosa ของประเทศ ฟิลิปปินส์ 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 พ.ศ. 2502 โดยเกษตรกรทั่วไปเรียกว่า (ขาวดอกมะลิ 105) ต่อมาได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (ขาวดอกมะลิ 105) จนได้ข้าวพันธุ์ (กข 15) ซึ่งกระทรวงพาณิชย์ประกาศให้ ข้าวทั้ง 2 พันธุ์เป็นข้าวหอมมะลิไทย

ข้าวหอมมะลิที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายคือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ 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 แสดงข้าวลักษณะของข้าวหอมมะลิ 105

แหล่งปลูกข้าวหอมมะลิที่สำคัญของไทย

ประเทศไทยถือเป็นแหล่งผลิตข้าวหอมมะลิที่มีคุณภาพดีที่สุดแห่งหนึ่ง โดยมีแหล่งเพาะปลูกสำคัญ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เขตทุ่งกุลาร้องไห้) และมีพื้นที่เพาะปลูกครอบคลุมกว่า 19 ล้านไร่ทั่วประเทศ โดยมีแหล่งผลิตสำคัญ คือ จังหวัดสุรินทร์ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ นครราชสีมา อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด รองลงมาคือภาคเหนือ เนื่องจากสภาพดินฟ้า-อากาศและพื้นที่เพาะปลูกของทั้งสองภาคคล้ายคลึงกัน เหมาะแก่การเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ กล่าวคือ สภาพพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ดอน ฝนจะเริ่มตกตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ชาวนาจะเริ่มหว่านไถในเดือนมิถุนายน และเพาะปลูกอยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม เมื่อฝนเริ่มหมด ปลายเดือนตุลาคม

จนถึงต้นเดือนพฤศจิกายน จึงเริ่มเก็บเกี่ยวช่วงเดือนพฤศจิกายนความชื้นจะน้อยเพราะเป็นช่วงที่ลมหนาวจากเมืองจีนเริ่มพัดเข้ามาในสองภาคนี้ ทำให้อากาศแห้งเหมาะในการเก็บเกี่ยว การตาก การนวด ก็ทำได้ง่าย เพราะน้ำแห้งนาหมดแล้ว ไม่มีฝน จึงทำให้ได้เมล็ดข้าวที่มีคุณภาพ สำหรับการปลูกข้าวหอมจะทำกันได้ดีเฉพาะที่ที่เป็นนาดอนเสียเป็นส่วนใหญ่

ข้าวปทุมธานี 1

ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ข้าว BKNA6-18-3-2 (พันธุ์แม่) กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ในปี พ.ศ. 2533

ลักษณะพันธุ์ข้าว

- เป็นข้าวเจ้าหอม สูงประมาณ 104-133 เซนติเมตร
- เป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง
- อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 104-126 วัน
- ทรงกอตั้ง ใบสีเขียวมีขนกาบใบและปล้องสีเขียว ใบธงยาวทำมุม 45 องศากับลำต้น
- เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง มีขน ส่วนมากมีหางสั้น
- ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 3-4 สัปดาห์
- เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง x ยาว x หนา = 2.1x 7.6 x.7 มิลลิเมตร - ปริมาณอมิโลส 17.8%
- คุณภาพข้าวสุก นุ่มค่อนข้างเหนียว มีกลิ่นหอมอ่อน

ลักษณะเด่น

- ให้ผลผลิตสูง
- เป็นข้าวเจ้าหอมที่ไม่ไวต่อช่วงแสง
- คุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105
- ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว
- ต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง

รูปที่ 1.3 แสดงเมล็ดพันธุ์ข้าว

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 ทั้งในคน สัตว์ และพืช โดยในคน human genome project เป็นโครงการที่จะศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของคนซึ่งได้เริ่มและดำเนินการติดต่อกันมาหลายปีแล้ว

Maxam-Gilbert DNA Sequencing

เป็นวิธีการที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่จะตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยที่สำคัญ DNA ที่เราจะนำมาทำการหาลำดับเบสนั้นจะต้องเป็น DNA ชนิดเดียวกัน และมีขนาดประมาณ 200-1000 bp ในตัวอย่างนี้ เราจะทำการหาลำดับเบสของสาย DNA ขนาด 10 bp ขั้นตอนต่างๆ ในการหาลำดับ nucleotide โดยวิธี Maxam-Gilbert มีดังนี้ คือ

ขั้นที่ 1 ติดฉลากสาย DNA ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (P32) โดยแต่ละ strand ของ double-stranded DNA จะถูกติดฉลากที่ปลาย 5' หรือ 3' จากนั้น DNA นั้นจะถูกนำมา denature ให้เป็น single strand โดยที่ในแต่ละ strand จะถูกติดฉลากที่ปลายข้างหนึ่งข้างใดเท่านั้น

ขั้นที่ 2 การตัดสาย DNA โดยในขณะนี้ สาย DNA จะมีลักษณะเป็น 32P 5' _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ 3' DNA จะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนจะถูกนำมาทำปฏิกิริยาเคมีที่ต่างกัน โดยจะทำการตัดสาย DNA นั้นที่ตำแหน่งของ base 1 ใน 4 นั้นๆ เช่น ในส่วนที่ 1 จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาทางเคมีโดยจะตัดที่ตำแหน่งที่มี base เป็น T หรือ C เท่านั้น สำหรับส่วนที่กำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง G นั้นจะตัดที่ตำแหน่ง A ด้วย แต่จะตัดที่ตำแหน่งที่เป็น G มากกว่า ในทำนองเดียวกัน ส่วนที่ถูกกำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง A จะตัดที่ G ด้วย แต่จะตัดที่ตำแหน่ง A มากกว่า

ขั้นที่ 3 เป็นการแยกขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีตามขั้นตอนที่ 2 DNA ที่ได้จะถูกนำมาแยกขนาดตามความยาวของเบสโดยใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis (เหมือนกับ agarose gel electrophoresis เพียงแต่ว่า polyacrylamide gel สามารถที่จะใช้แยกขนาดของ DNA ที่ต่างกันเพียงแค่ 1 bp ได้)

Dideoxy (Sanger DNA sequencing)

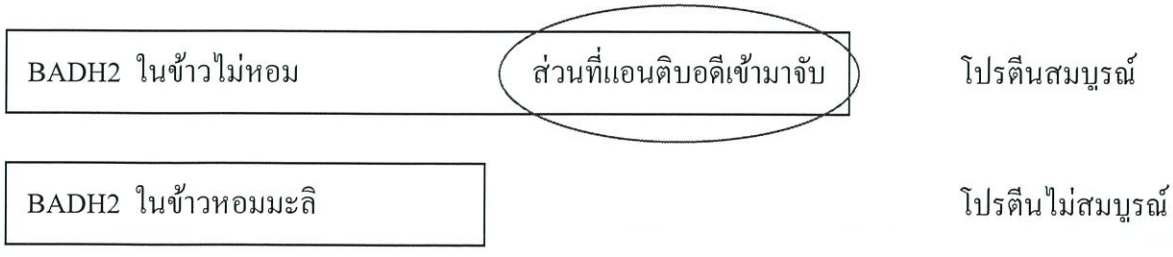
เช่นเดียวกับ Maxam-Gilbert sequencing โดยที่การหาลำดับเบสด้วยวิธีนี้ต้องการ DNA ที่เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็น DNA สายคู่ที่จะถูก denature ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน และ oligonucleotide สายสั้นๆ ซึ่ง complementary กับ DNA ส่วนที่ใกล้เคียงกับลำดับเบสที่เราต้องการทราบ (sequencing primer) โดยที่จะ anneal กับสาย DNA สายเดียวเท่านั้น

oligonucleotide primer จะถูกออกแบบให้ด้าน 3' อยู่ใกล้กับส่วนของ DNA ที่เราต้องการทราบลำดับของเบส โดย oligonucleotide นี้ จะทำหน้าที่เป็น primer เพื่อให้มีการสังเคราะห์ DNA สายที่ complementary กับ DNA template ต่อไป

จากนั้น DNA ที่ anneal กับ oligonucleotide primer แล้ว (เราเรียก DNA ที่ต้องการจะหาลำดับเบสนี้ว่าเป็น template หรือ DNA template) จะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วนแต่ละส่วนจะมี normal precursors ของ DNA เช่น dATP, dTTP, dCTP, dGTP และ DNA polymerase และ ตัว precursor นี้จะถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (32P) เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบสาย DNA ที่สร้างใหม่ใน DNA แต่ละส่วนนั้นจะต่างกันที่จะใช้ modified nucleotide คือ dideoxy nucleotide ต่างชนิดกัน dideoxy nucleotide กับ deoxynucleotide นั้นจะต่างกันที่ dideoxy nucleotide มี 3'-H ที่ deoxyribose sugar แทนที่ 3'-OH ถ้าเราใช้ dideoxy nucleotide ในขบวนการสังเคราะห์ DNA dideoxy จะเข้าไปใน สาย DNA ที่กำลังสังเคราะห์อยู่ได้ แต่สาย DNA นั้น จะไม่สามารถที่จะสังเคราะห์ให้มีความยาวต่อไปได้อีก การสังเคราะห์ DNA สายนั้นก็จะหยุด เพราะเหตุว่าการที่ไม่มี 3'-OH จะป้องกันการเกิด phosphodiester bond กับ 5'P ของ DNA precursor ตัวที่จะเข้ามาใหม่ sequencing reaction แต่ละส่วนจะมี ddATP หรือ ddCTP หรือ ddTTP หรือ ddGTP อย่างใดอย่างหนึ่งร่วมกับมี normal precursor ทั้ง 4 ชนิดคือ dATP dTTP dCTP และ dGTP ในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ จะมีการใช้ทั้ง dd NTP และ d NTP แบบสุ่มตัวอย่าง แต่โดยทั่วไป dideoxy จะมีปริมาณ 1 ใน 100 ของ normal precursors ดังนั้นส่วนใหญ่ก็จะมีการใช้ deoxynucleotide เหมือนเช่นการสังเคราะห์ DNA ตามปกติ ซึ่ง primer ก็จะถูกต่อโดย DNA polymerase โดยมีลำดับเบสที่ complementary กับ template ถ้า dideoxynucleotide ถูก incorporate เข้าไปในสาย DNA ที่กำลังสร้างอยู่ การสร้าง DNA สายนั้นก็จะหยุดลงไม่สามารถสร้างต่อไปได้อีก ส่วนสายที่มี deoxynucleotide incorporate เข้าไป ก็สามารถสังเคราะห์ไปได้เรื่อยๆ จนกว่าจะ incorporate dideoxynucleotide เข้าไป

ดังนั้น DNA สายใหม่ที่กำลังสร้างอาจจะหยุดได้ทุกตำแหน่งที่มีการ incorporate dideoxynucleotide เข้าไป เช่น ใน ddA reaction สายใหม่ขนาดต่างๆที่ถูกสร้างเหล่านี้ จะมีปลายสุดท้ายเป็น ddA เสมอ ในขณะเดียวกัน ddG ddC ddT reaction ก็จะมี DNA สายใหม่ที่มีเบสสุดท้ายเป็น ddG, ddC และ ddT ทั้งสิ้น จากนั้นสาย DNA จะถูกนำมาแยกขนาด โดย polyacrylamide gel elctrophoresis แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม x-ray ซึ่งเมื่อนำมาล้างและ develop แล้ว จะสามารถมองเห็นสาย DNA ได้โดย autoradiogram

จากขั้นตอนดังกล่าวการจะเห็นได้ว่าการตรวจดีเอ็นเอซึ่งเป็นการตรวจสอบพันธ์ข้าวที่มีความถูกต้องสูงก็ยังมีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานานรวมถึงเทคนิคและเครื่องมือมีความซับซ้อนดังนั้นวิธีการตรวจที่รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย และไม่ซับซ้อนจะช่วยลดการปลอมแปลงข้าวหอมมะลิได้ วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วและนิยมนำมาใช้คือวิธีทาง Enzyme Immunoassay (EIA) คือ เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณแอนติเจน (สารที่ต้องการตรวจสอบ) อย่างจำเพาะในสารตัวอย่างโดยใช้แอนติบอดีเป็นตัวตรวจจับ ดังนั้นสิ่งสำคัญของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค EIA คือ แอนติเซรัมที่ผลิตโดยใช้แอนติเจนที่เป็นโปรตีนบ่งชี้ (Protein marker) ต้องมีความจำเพาะและสามารถคัดแยกระหว่างข้าวหอมมะลิกับข้าวไม่หอมมะลิได้โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ายีน BADH2 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 betain aldehyde dehydogenase 2 (BADH2) ซึ่งทำให้โปรตีน BADH2 สูญเสียหน้าที่การทำงานไป จึงไม่สามารถไปทำลาย 2-APได้ ก่อให้เกิดความหอมขึ้น (Bradbury et al., 2005; Wanchana, 2005) และต่อมา Shi et al. (2008) รายงานว่า 7-bp deletion ใน exon 2 ของยีน BADH2 ก็ทำให้เกิดความหอมในข้าวเช่นเดียวกัน ในปัจจุบัน พบว่ามีมิวเตชั่นแบบต่างๆ รวม 9 แบบ (single point mutation, insertion และ deletion) ในยีน BADH2 ของข้าวที่ทำให้เกิดความหอม (Kovach et al., 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการใช้ความแตกต่างของเอนไซม์ BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่มีกลิ่นหอมนำไปผลิตแอนติซีรัมเพื่อนำไปคัดแยกข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิค EIA ได้



วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

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

ขอบเขตงานวิจัย

ตรวจสอบความจำเพาะของ Anti-BADH2 Antibody ด้วยเทคนิค Western blot

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำไปใช้ในการจำแนกข้าวหอมมะลิได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี

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

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

ความหอมเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดคุณภาพและราคาของข้าว ส่งผลให้ข้าวหอมถูกจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีคุณภาพสูงด้วยความหอมที่เป็นเอกลักษณ์ จึงทำให้ข้าวหอมเป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคโดยทั่วไปซึ่งความหอมของข้าวหอมมะลิเกิดจากสารระเหยชื่อ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (BADH2) บนโครโมโซมที่ 8 (Bradbury *et al.*, 2005) เป็นสารเดียวกันกับที่พบในใบเตย และดอกชมนาดซึ่งเป็นสารที่ระเหยหายไปได้มีความไวต่อแสงและอุณหภูมิซึ่งจะส่งผล

ให้มีปริมาณสารหอมลดลงจนใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ไม่หอมหากเก็บรักษาไว้นานเกินไปโดยข้าวหอมจะสร้างสาร2-acetyl-1-pyrrolineขึ้นมาเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดและเก็บสะสมไว้ในทุกส่วนของข้าวยกเว้นราก สาร2-acetyl-1-pyrolineเป็นสารประกอบในกลุ่ม pyrrole มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนห้าเหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเกาะอยู่ในวงมีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเป็นพันธะคู่หนึ่งพันธะและมีหมู่acetylเกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่สองของวงสาร2-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 นอกจากนี้ข้าวหอมมะลิที่เก็บได้จากช่วงฤดูแล้งพบ 2AP ในปริมาณต่ำมาก เนื่องจากเป็นข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสง จากปริมาณน้ำที่มีอยู่อย่างจำกัด ส่งผลให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง 2AP ลดลง (อานันต์ ผลวัฒนะ และคณะ , 2535)

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-aminoaldehydes เพื่อให้สอดคล้องกับ ω-amino

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) 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)

Antibody

โดยโครงงานพิเศษนี้ใช้เทคนิค EIA โดยใช้ Antibody เป็นตัวตรวจจับโปรตีน BADH2ซึ่ง Antibody คือ สารโปรตีนที่มีอยู่ในเซรุ่ม น้ำคัดหลั่งต่าง ๆ ที่ร่างกายของคนหรือสัตว์สร้างขึ้นมาเพื่อต่อต้านต่อแอนติเจนที่เข้ามาในร่างกาย ซึ่งแอนติบอดีจะมีปฏิกิริยาจำเพาะแอนติเจนที่มากระตุ้นเท่านั้น แอนติบอดีมีความสามารถในการรู้จักและรวมกับแอนติเจนที่จำเพาะต่อมันได้ และปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทำให้เกิดผลต่าง ๆ ตามมา เช่น ทำให้มีการรวมกันของโปรตีนหลายตัวในเซรุ่ม ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียหรือเซลล์ที่มีแอนติบอดีจับอยู่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินได้ จากการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล ตลอดจนสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแอนติบอดี พบว่าโมเลกุลของแอนติบอดีทุกตัว มีส่วนที่คล้ายกันมากจึงเรียกชื่อรวม ๆ กันว่าเป็น อิมมิวโนโกลบูลิน (Immunoglobullin) 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 อิมมิวโนโกลบูลินแต่ละหมู่มีสมบัติแตกต่างกันดังนี้

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

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

3) อิมมิวโนโกลบูลิน A (Immunoglobullin A หรือ IgA) เป็นอิมมิวโนโกลบูลินที่สามารถพบได้ทั้งในเซรุ่ม เนื้อเยื่อ และน้ำคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น น้ำตา น้ำมูก น้ำลาย น้ำเมือกในหลอดอาหาร ในลำไส้ และในกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น อิมมิวโนโกลบูลินชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าไปในร่างกาย

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

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

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

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

เทคนิค EIA ที่ใช้ในการบ่งชี้โปรตีน BADH2ในโครงงานพิเศษนี้ มี 2 วิธี ได้แก่ Western blot หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Immunoblot เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่างหรือโปรตีนที่สกัดมา Western blot หมายถึงการย้ายโปรตีนจาก acrylamide

gel สู่ nitrocellulose การย้ายโปรตีนไม่ได้ใช้การซับสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยกระดาษซับ แต่จะย้ายโปรตีนด้วยสนามไฟฟ้าแทนขบวนการในการทำ western blot ประกอบด้วย

1. การเตรียมโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการ

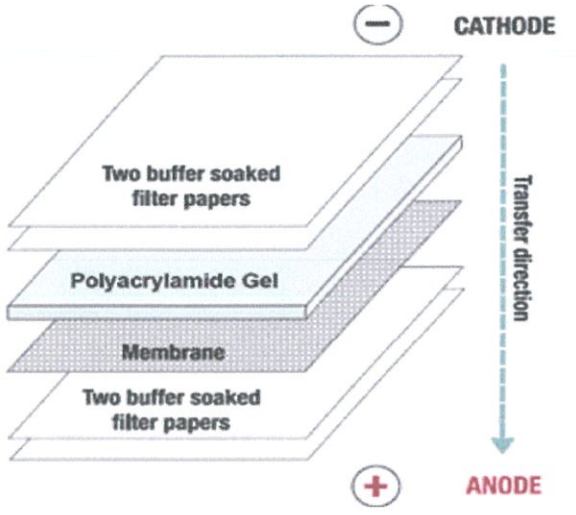
การสกัดโปรตีนนั้นจะต้องมีการเติมสาร protease inhibitor ด้วยเป็นการป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์

2. การทำเจลอิเลคโตรฟอเรซีส (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

3. การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (protein transfer)

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



รูปที่ 2.1 แสดงการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน

4. Blocking

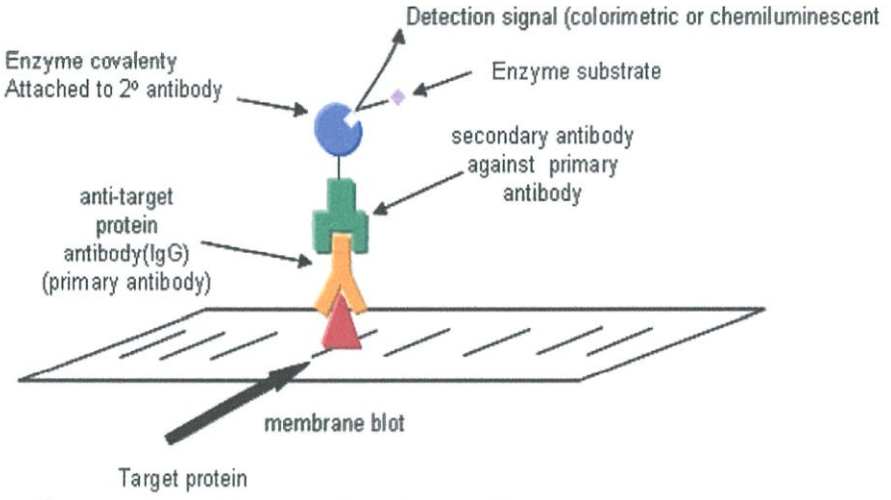
เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific โปรตีนอื่นๆเข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน หลังจากย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว โปรตีนจะจับอยู่กับเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ของแผ่นเมมเบรนอยู่ที่โปรตีนไม่ได้เข้าจับ ดังนั้นเพื่อป้องกันการจับของโปรตีนตัวอื่นหรือแอนติบอดีกับแผ่นเมมเบรน จึงต้องทำการ blocking ด้วย bovine serum albumin (BSA) หรือ non-fat dry milk ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรนยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว ดังนั้นการทำ blocking จึงมีความสำคัญ เพราะจะช่วยลดการเกิด false positives ด้วย

5. การติดตามผล (detection)

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

6. 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 เพราะแอนติบอดีถูกติดฉลากด้วยสารรังสีซึ่งจะเกิดการเปล่งแสงออกมา ต้องติดตามผลด้วยการประกบกับฟิล์มเอกซเรย์

- Fluorescent detection การวิเคราะห์และติดตามผลแบบนี้แอนติบอดีจะถูกติดฉลากมาด้วยสารเรืองแสง (fluorescent) ซึ่งจะต้องมีการกระตุ้น (excitation) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสม และมีการ ปล่อยแสง (emission) ในช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน ดังนั้น

จะต้องดูผลโดยการใช้กล้อง photosensor เช่นกล้อง CCD ที่มี filter ในช่วงความยาวคลื่นตรงกันกับสารเรืองแสงเหล่านั้นในการจับภาพ

การประยุกต์ใช้เทคนิค western blot นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการทำงานแต่ทั้งนี้โดยหลักการพื้นฐานต้องการดูความจำเพาะของโปรตีนเป้าหมายในตัวอย่างกับแอนติบอดีที่ติดฉลาก การนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้ เช่น งานทางด้าน immunohistochemitry, Elisa หรือการทำตรวจยืนยัน HIV test, RNAi และงานอื่นๆที่ต้องการดูการแสดงออกของโปรตีน

และอีกวิธีหนึ่งคือ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) นั้นเกี่ยวข้องกับการตรวจสอบ เช่น วิเคราะห์การปรากฏของสารที่จำเพาะเจาจงทั้งปริมาณและคุณภาพ 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

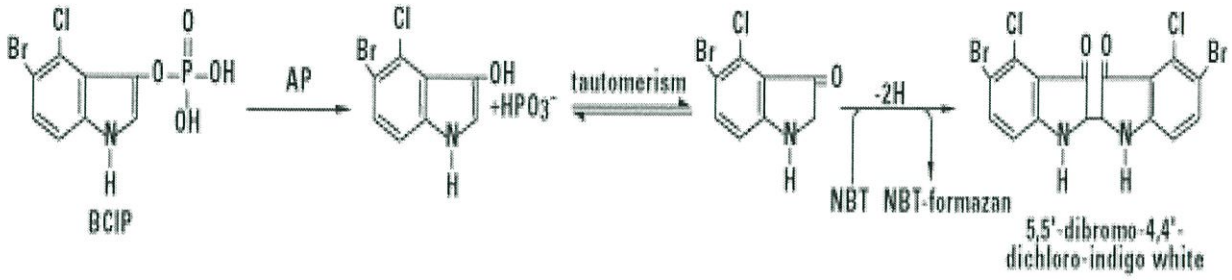
1. Indirect method

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

2. Double antibody sandwich method

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

กลไกการเกิดสี



ปฏิกิริยาทางเคมีของ NBTและ BCIP substrates กับเอนไซม์ alkaline phosphatase BCIP จะถูกไฮโดรไลซ์โดย alkaline phosphatase กลายเป็นสาร intermediate ผ่านทางกระบวนการ dimerization ซึ่งให้สีครามออกมา ส่วน NBT จะถูกรีดิวซ์ กลายเป็น NBT-formazan โดยการรีดิวซ์ทั้งสองครั้งเกิดขึ้นพร้อมกันในกระบวนการ dimerization ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดำเนินไปในอัตราที่คงที่ ซึ่งช่วยเพิ่มความแม่นยำในการควบคุมความว่องไวของปฏิกิริยา

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 การ

เปลี่ยนแปลงของใบสามารถสังเกตได้ภายใน2สัปดาห์หลังการขาดน้ำใบของขอนแก่น1จะเริ่มเหลืองและหลุดร่วง 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 kDa ใน K86-161มีความหนาแน่นสูงกว่าขอนแก่น 1 มากในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า โปรตีน18 kDa มีความสามารถสูงที่จะนำไปพัฒนาในการเป็นโปรตีนบ่งชี้ในการแบ่งแยกสายพันธุ์อ้อยที่ทนแล้งได้

[ปาริฉัตร รัตนผล และธานี ศรีวงศ์,2553] การประเมินหาปริมาณอะมิโลสตามวิธีปกตินั้นจะใช้ปริมาณตัวอย่างจำนวนมากและเป็นการวิธีเคราะห์แบบทำลายตัวอย่างการวิจัยครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสโดยใช้ปริมาณตัวอย่างที่น้อยลง ซึ่งใช้ตัวอย่างข้าวจำนวน 10 เมล็ด โดยการบดตัวอย่างเมล็ดข้าวในครกบดยาขนาดเล็กจะได้แป้งข้าว ประมาณ 100 มิลลิกรัม และจะใช้ตัวอย่างแป้งข้าวจำนวน 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 กลุ่มคือข้าวที่มีกลิ่นหอมและไม่หอม นั้นพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมานั้นสามารถแบ่งข้าว ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือข้าวที่มีกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่นหอม โดยมี PCR product ขนาด 236 bp และ 244 bp ตามลำดับ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้เป็นเครื่องหมายประเภท Codominance และเป็นการจำแนกส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนโดยตรงจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำในการตรวจสอบเหมาะสำหรับการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

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

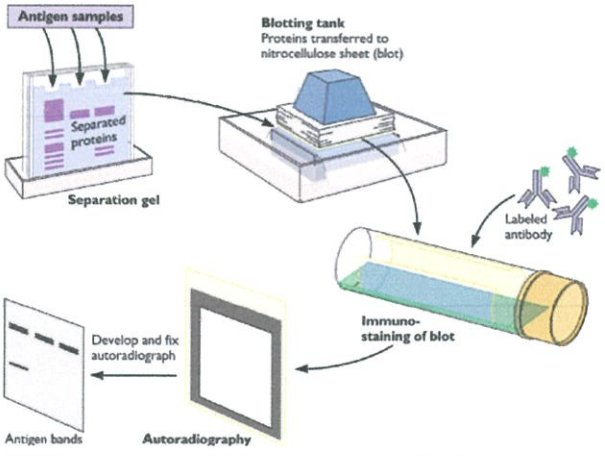
3.3 วิธีการทดลอง

ข้าวตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ

บดโดยใส่สารละลายที่ใช้ใน

ในการสลายเนื้อเยื่อและละลาย

โปรตีนออกมา



นำส่วนที่เป็นสารละลาย

โปรตีนตรวจหาโปรตีน

BADH2 ที่สมบูรณ์ด้วย

เทคนิค Enzyme Immuno

มีการตรวจพบแสดงว่ามีการเจือปนของข้าวไม่หอมมะลิ

ตรวจไม่พบแสดงว่าเป็นข้าวหอมมะลิแท้ 100%

3.3.1 การสกัดโปรตีน (Protein extraction)

บดเมล็ดข้าวให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ lysis buffer (0.01N NaOH) 500 ml และบดต่อเพื่อทำให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาทีที่ 10,000 xg ที่ 4 °C เก็บส่วนสารละลายที่ใสลงในหลอด microcentrifuge tube 1.5 ml วัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford

วัดความเข้มข้นโปรตีนด้วย Bradford

บดตัวอย่างข้าวให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่างชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.2-0.3 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่แช่ในน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Tris-HCL ผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ลงไป 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปโฮโมจิไนซ์นาน 1 นาที (ระวังอย่าให้เกิดความร้อน) จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์1

ปิเปตสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายแบรดฟอร์ดลงไป 5 มิลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นจับเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนในข้าว

3.3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี gel electrophoresis

One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)ใช้ 15% separating gel และ 4% stacking gel โหลดโปรตีนที่สกัดได้0.1 μg และแยกบน Mini-Protein III Cell (Bio-Rad, U.S.A) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ จนกระทั่งสีที่ติดตามเลื่อนลงไปถึงจุดล่างสุดของตัวเจลโดยแถบจะเลื่อนขนานตามโปรตีนมาตรฐาน (Prestain Protein marker)(Promega, U.S.A)โปรตีนจะถูกย้อมสีด้วย Coomassie brillant blue R-250 solution

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(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 เมมแบรนจะ

ถูกล้างอีกครั้งด้วย wasing buffer สามครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจสอบแถบโปรตีน BADH2ด้วย 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

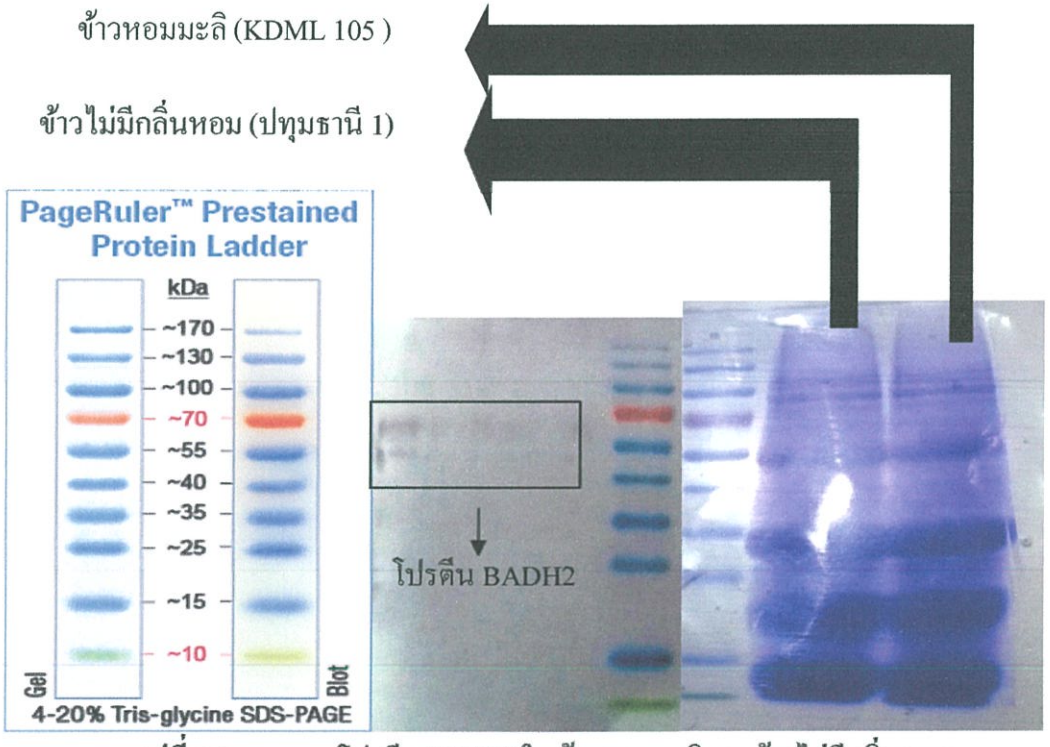
เจือจางโปรตีนที่สกัดได้ด้วย extraction buffer 2 เท่าทั้งหมด 4 ความเข้มข้นบ่มโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆลงใน 96-well microplate หลุมละ 100 µl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 200 µl washing buffer 5 นาที 3 ครั้ง เติม blocking buffer 200 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทออกแล้วเติม 100µl Rabbit anti-BADH2 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 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องตรวจสอบโปรตีนด้วย Alkalinephosphatase detection kit for ELISA (BIO-RAD) หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N NaOH นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 nm

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการวิจัย

การแยกโปรตีนด้วยวิธี Wastern blot โดยการการวิเคราะห์โปรตีนด้วย gel electrophoresis ในข้าวหอมมะลิ (KDML 105) และข้าวไม่มีกลิ่นหอม (ปทุมธานี 1) ได้ผลดังรูป

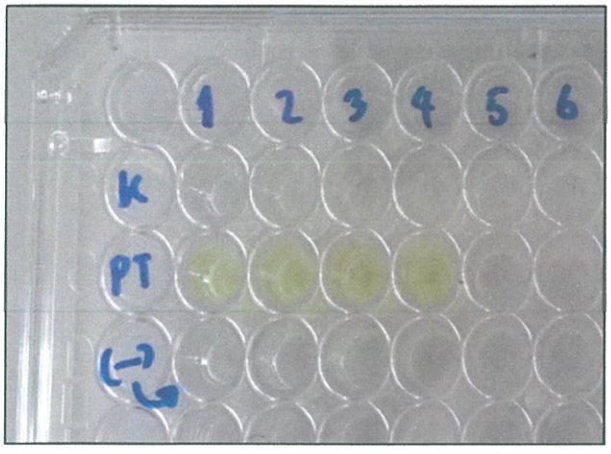


รูปที่ 4.1 แถบของโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่มีกลิ่นหอม

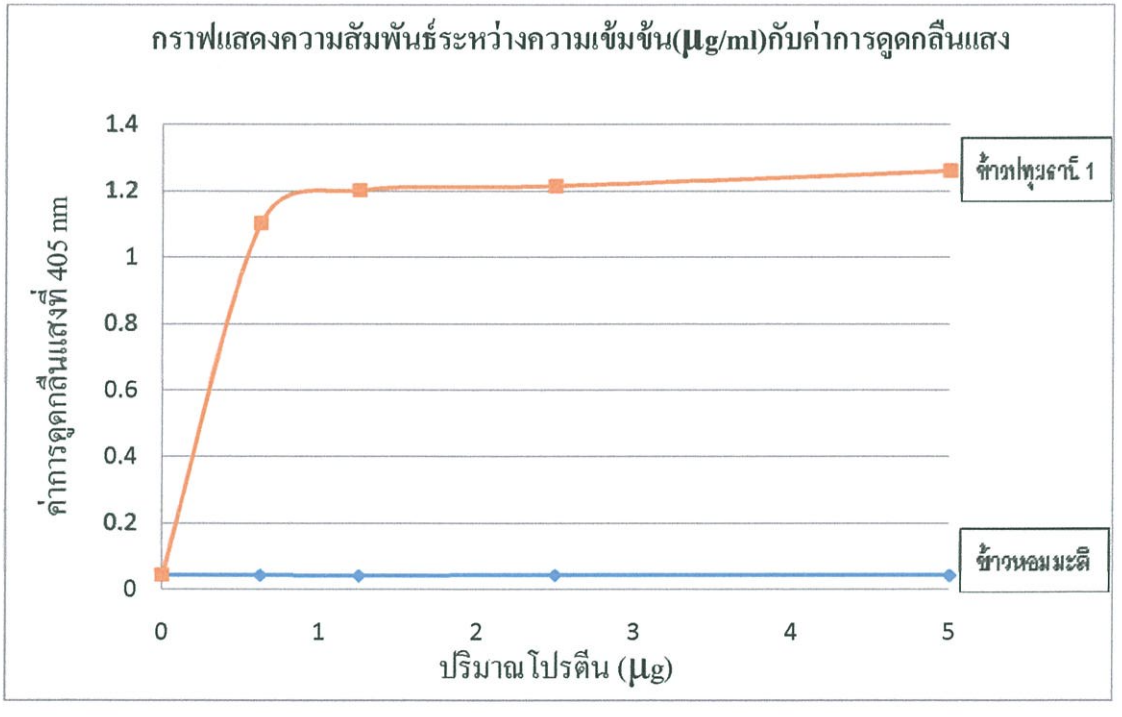
จากผลการทดลองที่ได้ดังรูปแสดงให้เห็นว่าในข้าวไม่มีกลิ่นหอม(ปทุมธานี1) แถบโปรตีน BADH2 จะเข้มกว่าข้าวหอมมะลิ (KDML 105)

การแยกโปรตีนด้วยวิธี **Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

ในข้าวหอมมะลิ (KDML 105) และข้าวไม่มีกลิ่นหอม (ปทุมธานี 1) ได้ผลดังรูป



96-well microplate



บทที่ 5

สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถใช้ความแตกต่างของโปรตีน BADH2 ในข้าวหอมมะลิและข้าวไม่หอมมะลิ มาแยกชนิดและตรวจสอบพันธุ์ข้าวหอมะลิ ได้ด้วยเทคนิค Western blot และ ELISA โดยผลจากเทคนิค Western blot เราจะพบว่า Antibody ที่ใช้ในการตรวจสอบมีความจำเพาะสูงกับโปรตีน BADH2ที่สมบูรณ์ (Complete BADH2) คือเห็นแถบโปรตีน BADH2 เพียงแถบเดียว ไม่พบแถบโปรตีนไม่จำเพาะแถบอื่นๆ และยังพบว่าจะพบ BADH2 ที่สมบูรณ์ในข้าวไม่หอมมะลิเท่านั้น ในส่วนผลจากเทคนิค ELISA เราพบว่าโปรตีนสกัดที่ได้จากข้าวไม่มีกลิ่นหอมจะให้ผลบวก ในขณะที่โปรตีนสกัดที่ได้ จากข้าวหอมมะลิให้ผลลบ ดังนั้นเราสามารถใช้เทคนิค ELISA กับ Anti-BADH2antibody มาตรวจหาข้าวไม่หอมมะลิได้

จากทั้งสองเทคนิคนี้ แสดงให้เห็นว่า Anti-BADH2 antibody มีความจำเพาะและสามารถแยกข้าวหอมมะลิกับข้าวไม่หอมมะลิออกจากกันได้ ดังนั้นในอนาคต เราสามารถปรับปรุงวิธีการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคอื่นๆที่รวดเร็วและง่ายมาตรวจหาโปรตีน BADH2 ซึ่งเป็น Protein Marker เช่น การใช้แถบตรวจสอบ หรือ ผลิตเป็นชุดตรวจสอบได้

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

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. IIenry. 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 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.

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

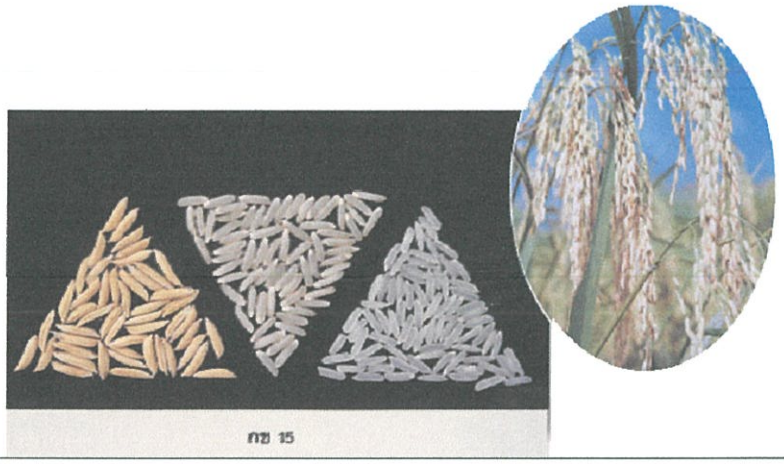
บริษัท กิบไทย จำกัด. 2555. **Western Blot.** (ออนไลน์).แหล่งที่มา: http://www.gibthai.com/corporate/contact.php. 25 ตุลาคม 2555.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลจำเพาะของสายพันธุ์ข้าว

ชื่อพันธุ์	ขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105)
ชนิด	ข้าวเจ้าหอม
ประวัติพันธุ์	ได้มาโดยนายสุนทร สีหะเนิน เจ้าพนักงานข้าว รวบรวมจากอำเภอบางคล้าจังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อ พ.ศ.2493-2494จำนวน 199 รวง แล้วนำไปคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) และปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง แล้วปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ในท้องถิ่น ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ **จนได้สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 4-2-105 ซึ่งเลข 4 หมายถึง** สถานที่เก็บรวงข้าว คืออำเภอบางคล้า เลข 2 หมายถึงพันธุ์ทดสอบที่ 2 คือ ขาวดอกมะลิ และเลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 จากจำนวน 199 รวง
การรับรองพันธุ์	**คณะกรรมการการพิจารณาพันธุ์ ให้ใช้ขยายพันธุ์เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 25** พฤษภาคม 2502
ลักษณะประจำพันธุ์	• เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140 เซนติเมตร • ไวต่อช่วงแสง • ลำต้นสีเขียวจาง ใบสีเขียวยาวค่อนข้างแคบ ฟางอ่อน ใบธงทำมุมกับคอรวง เมล็ดข้าวรูปร่างเรียวยาว • ข้าวเปลือกสีฟาง • อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 25 พฤศจิกายน • เมล็ดข้าวเปลือก ยาว x กว้าง x หนา = 10.6 x 2.5 x 1.9 มิลลิเมตร • เมล็ดข้าวกล้อง ยาว x กว้าง x หนา = 7.5 x 2.1 x 1..8 มิลลิเมตร • ปริมาณอมิโลส 12-17 %

ผลผลิต	ประมาณ 363 กิโลกรัมต่อไร่
ลักษณะเด่น	• ทนแล้งได้ดีพอสมควร • เมล็ดข้าวสารใส แกร่ง คุณภาพการสีดี • คุณภาพการหุงต้มดี อ่อนนุ่ม มีกลิ่นหอม • ทนต่อสภาพดินเปรี้ยว และดินเค็ม
ข้อควรระวัง	• ไม่ต้านทานโรคใบสีส้ม โรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ และโรคใบหงิก • ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และหนอนกอ
พื้นที่แนะนำ	• ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน

ชื่อพันธุ์	กข15 (RD15) 
ชนิด	ข้าวเจ้า
ประวัติพันธุ์	ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ โดยการใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสีแกมมาปริมาณ 15 กิโลแรด อาบเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในปี พ.ศ. 2508 แล้วนำมาปลูกคัดเลือกที่สถานีทดลองข้าวต่างๆ ในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนได้สายพันธุ์ KDML 105´65G_1U-45
การรับรองพันธุ์	คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 28 เมษายน 2521
ลักษณะประจำพันธุ์	• เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140 เซนติเมตร • ไวต่อช่วงแสง • **อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 10 พฤศจิกายน** • ลำต้นและใบสีเขียวอ่อน ใบธงทำมุมกับคอรวง รวงอยู่เหนือใบ ใบยาวค่อนข้างแคบ • **เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง ปลายบิดงอเล็กน้อย** • ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 7 สัปดาห์ • เมล็ดข้าวเปลือก ยาว x กว้าง x หนา – 10.7 x 2.5 x 1.9 มิลลิเมตร • **เมล็ดข้าวกล้อง ยาว x กว้าง x หนา =7.5 x 2.1 x 1.7 มิลลิเมตร** • ปริมาณอมิโลส 14-17 % • คุณภาพข้าวสุก นุ่ม มีกลิ่นหอม
ผลผลิต	ประมาณ 560 กิโลกรัมต่อไร่
ลักษณะเด่น	• **ทนแล้งได้ดีพอสมควร** • อายุเบา เก็บเกี่ยวได้เร็ว • คุณภาพการหุงต้ม นุ่ม มีกลิ่นหอม • คุณภาพการสีดี เมล็ดข้าวสารใส แกร่ง เรียวยาว

	• นวดง่าย • ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล
ข้อควรระวัง	• ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ • ไม่ต้านทานแมลงบั่ว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและหนอนกอ • ล้มง่าย ฟางอ่อน เมล็ดร่วงง่าย
พื้นที่แนะนำ	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ชื่อพันธุ์	พันธุ์ข้าว กข29 (RD29) (ชัยนาท 80)
ชนิด	ข้าวเจ้า
ประวัติพันธุ์	ได้จากการผสมสามทางระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 ของพันธุ์สุพรรณบุรี 60 และสายพันธุ์ IR29692-99-3-2-1กับสายพันธุ์ IR11418-19-2-3ที่ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท เมื่อ พ.ศ.2532 คัดเลือกจนได้สายพันธุ์ CNT89098-281-2-1-2-1ศึกษาพันธุ์และเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานีที่ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาทระหว่าง พ.ศ.2533-2541 จากนั้นนำเข้าเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานีที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก ศูนย์วิจัยข้าวลพบุรี และศูนย์วิจัยข้าวชัยนาทในฤดูนาปี พ.ศ.2541 ถึงฤดูนาปี พ.ศ.2547 นำเข้าเปรียบเทียบผลผลิตในนาราษฎร์ จังหวัดพิษณุโลก ลพบุรี สิงห์บุรี และชัยนาท ในฤดูนาปี พ.ศ.2542 ถึงฤดูนาปี พ.ศ.2547 นำเข้าทดสอบเสถียรภาพผลผลิต ที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก แพร่ อุบลราชธานีสกลนคร สุรินทร์ ปทุมธานี สุพรรณบุรี พัทลุง คลองหลวง ราชบุรี ชัยนาท ลพบุรีและฉะเชิงเทรา คัดเลือกเข้าทดสอบผลผลิตในนาเกษตรกร ในจังหวัดพิษณุโลก อุตรดิตถ์ พิจิตร สุโขทัย ชัยนาท และสิงห์บุรี ในฤดูนาปรัง พ.ศ.2544 ถึงฤดีนาปรัง พ.ศ.2548
การรับรองพันธุ์	คณะกรรมการรับรองพันธุ์ กรมการข้าว มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง ชื่อ กข29 (ชัยนาท 80) เพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูก เมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2550
ลักษณะประจำพันธุ์	- เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง - อายุเก็บเกี่ยว 103 วัน ในฤดูนาปี และ 99 วัน ในฤดูนาปรัง เมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม - กอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย - สูงเฉลี่ย 104 เซนติเมตร - ใบสีเขียวเข้ม ใบธงตั้งตรง รวงแน่นปานกลาง คอรวงยาว - เปลือกเมล็ดสีฟาง - ข้าวกล้องสีขาว เป็นท้องไข่น้อย รูปร่างเรียว ยาว 7.34 มิลลิเมตร กว้าง 2.23 มิลลิเมตร

	หนา 1.80 มิลลิเมตร
ผลผลิต	เฉลี่ย 836 กิโลกรัม/ไร่
ลักษณะเด่น	1. อายุสั้น มีอายุวันเก็บเกี่ยว 99 วัน ในฤดูนาปรัง และ 103 วันในฤดูนาปีเมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม 2. ผลผลิตสูง เฉลี่ย 876 กิโลกรัมต่อไร่ 3. ค่อนข้างต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่าง และโรคขอบใบแห้ง 4. คุณภาพการสีดีมาก สามารถสีเป็นข้าวขาว 100 เปอร์เซ็นต์ 5. มีปริมาณธาตุเหล็กในข้าวกล้อง 15.7 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม ในข้าวสาร 6.7 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม
ข้อควรระวัง	- ไม่ควรปลูกในช่วงกลางเดือนกันยายนถึงปลายเดือนพฤศจิกายน ซึ่งมีอากาศเย็นทำให้เมล็ดลีบ – กข29 อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในเขตจังหวัดนครปฐม ปทุมธานี ราชบุรี และฉะเชิงเทรา
พื้นที่แนะนำ	พื้นที่นาชลประทาน ภาคเหนือตอนล่างและภาคกลางตอนบน ที่ต้องการข้าวอายุสั้น โดยเริ่มปลูกในเดือนสิงหาคม ธันวาคม และเมษายน หรือสำหรับปลูกหลังถูกน้ำท่วมในฤดูฝน สามารถปลูกและเก็บเกี่ยวได้ 2 ครั้ง ในฤดูนาปรังก่อนถูกน้ำท่วม

ชื่อพันธุ์	สุพรรณบุรี 1 (Suphan Buri 1)
ชนิด	ข้าวเจ้า
คู่ผสม	IR253-53-2-3/ กข23// IR27316-96-3-2-3///SPRLR77205-3-2-1-1/ SPRLR79134-51-2-2
ประวัติพันธุ์	ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 ของ IR27316-96-3-2-3/ กข23// IR 27316-96-3-2-2 และลูกผสมชั่วที่ ๑ ของ SPRLR 77205-3-2-1-1/ SPRLR 79134-51-2-2 ที่สถานีทดลองข้าวสุพรรณบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2528 ปลูกคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPRLR 85163-5-1-2
การรับรองพันธุ์	คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 28 ตุลาคม 2537
ลักษณะประจำพันธุ์	- เป็นข้าวเจ้านาสวน สูงประมาณ 125 เซนติเมตร - ไม่ไวต่อช่วงแสง - อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 120 วัน - ทรงกอตั้ง ต้นแข็งไม่ล้ม ใบสีเขียวเข้ม มีขน กาบใบและปล้องสีเขียว ใบธงยาวค่อนข้างตั้งตรง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น - เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง - ระยะฟักตัวของเมล็ดประมาณ 22 วัน - เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง×ยาว×หนา = 2.2×7.3×1.8 มิลลิเมตร - ปริมาณอมิโลส 29 เปอร์เซ็นต์ - คุณภาพข้าวสุก ร่วน แข็ง
ผลผลิต	ประมาณ 806 กิโลกรัมต่อไร่
ลักษณะเด่น	1. ผลผลิตสูง 2. ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ย

	3. ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง ต้านทานโรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม ในสภาพธรรมชาติ 4. ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว
ข้อควรระวัง	พบโรคใบขีดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว
พื้นที่แนะนำ	ทุกภาคในเขตชลประทาน

ชื่อพันธุ์	พัทลุง (Patthalung)
ชนิด	ข้าวเจ้า
คู่ผสม	สุพรรณบุรี 90/ RP 2243-7-4 // IR 552280-117-1-1-3
ประวัติพันธุ์	ได้จากการผสมสามทาง ระหว่างสุพรรณบุรี 90 และสายพันธุ์ RP 2243-7-4 กับสายพันธุ์ IR 55280-117-1-1-3 ที่สถานีทดลองข้าวชัยนาทในปี พ.ศ.2535 ปลูกคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ CNT 62024-4-2-1-1
การรับรองพันธุ์	คณะกรรมการบริหารกรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์แนะนำ เมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม 2546
ลักษณะประจำพันธุ์	- เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 104 เซนติเมตร - ไม่ไวต่อช่วงแสง - อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 112 วัน (ปักดำ) และ 103 วัน (หว่านน้ำตม) - รูปแบบต้นดี กอตั้ง ใบสีเขียว ใบธงตั้งตรง รวงแน่น คอรวงสั้น ต้นแข็ง ไม่ล้ม - เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง - ระยะฟักตัวของเมล็ดประมาณ 6 สัปดาห์ - เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง×ยาว×หนา = 2.30×7.55×1.83 มิลลิเมตร - ปริมาณอมิโลส 28.9 เปอร์เซ็นต์ - คุณภาพข้าวสุก ร่วน แข็ง
ผลผลิต	ประมาณ 714 กิโลกรัมต่อไร่ (หว่านน้ำตม)
ลักษณะเด่น	ผลผลิตสูง
ข้อควรระวัง	ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล
พื้นที่แนะนำ	พื้นที่ภาคใต้ที่ต้องการข้าวอายุสั้นโดยเฉพาะในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง ที่มีการปลูกข้าวช่วงก่อนน้ำท่วมและหลังน้ำลด เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาน้ำท่วม ในช่วงฤดูนาปี เดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม

ชื่อพันธุ์	กข6 (RD 6)
ชนิด	ข้าวเหนียว
ประวัติพันธุ์	ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ โดยการใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแรด อาบเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วนำมาปลูกคัดเลือกที่สถานีทดลองข้าวบางเขนและสถานีทดลองข้าวพิมาย จากการคัดเลือกได้ข้าวเหนียวหลายสายพันธุ์ในข้าวชั่วที่ 2 นำไปปลูกคัดเลือกจนอยู่ตัวได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ สายพันธุ์ KDML 10565-G2U-68-254 นับว่าเป็นข้าวพันธุ์ดีพันธุ์แรกของประเทศไทยที่ค้นคว้าได้ โดยใช้วิธีชักนำพันธุ์พืชให้เปลี่ยนกรรมพันธุ์โดยใช้รังสี
การรับรองพันธุ์	คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร มีมติให้เป็นพันธุ์รับรองเมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2520
ลักษณะประจำพันธุ์	- เป็นข้าวเหนียว สูงประมาณ 154 เซนติเมตร - ไวต่อช่วงแสง - ทรงกอกระจายเล็กน้อย ใบยาวสีเขียวเข้ม ใบธงตั้ง เมล็ดยาวเรียว - เมล็ดข้าวเปลือกสีน้ำตาล - อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 21 พฤศจิกายน - ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 5 สัปดาห์ - เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง×ยาว×หนา = 2.2×7.2×1.7 มิลลิเมตร - คุณภาพข้าวสุก เหนียวนุ่ม มีกลิ่นหอม
ผลผลิต	ประมาณ 666 กิโลกรัมต่อไร่
ลักษณะเด่น	1. ให้ผลผลิตสูงและทนแล้งดีกว่าพันธุ์เหนียวสันป่าตอง 2. คุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม 3. ลำต้นแข็งปานกลาง 4. ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล 5. คุณภาพการสีดี

ข้อควรระวัง	- ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง และโรคใบไหม้ - ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว
พื้นที่แนะนำ	ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ภาคผนวก ข

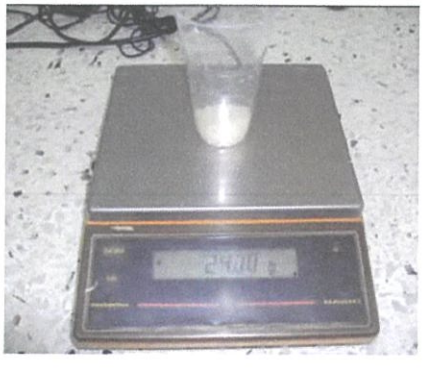
วิธีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวสาร

1.คลุกเคล้าข้าว 1 กิโลกรัมให้เข้ากัน

2.แบ่งข้าวเป็น 8 ส่วน ส่วนละ 125 กรัม

3.สุ่มข้าวแต่ละส่วนมาส่วนละ 30 กรัมและรวมแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน

4.คลุกเคล้าให้เข้ากัน



5.แบ่งข้าวเป็น 10 ส่วน ส่วนละ 24 กรัม เท่าๆกัน

6.สุ่มหยิบเมล็ดข้าวส่วนละ 3 เมล็ด จะได้ตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งหมด 30 เมล็ด

ข้อมูลจาก สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว

ภาคผนวก ค.

วิธีทดสอบหาปริมาณอมิโลส

1. เครื่องมือ

1.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

1.2 เครื่องชั่ง ที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.0001 กรัม

1.3 เครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

1.4 เครื่องบดเมล็ดข้าวที่บดให้ละเอียดได้ถึง 80-100 เมช (mesh)

1.5 ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) ขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร

1.6 ปิเปต แบบ volumetric pipette ขนาดความจุ 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร

1.7 ปิเปต แบบ measuring pipette ขนาดความจุ 1-10 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

2.1 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol : C2H5 OH) 95%

2.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH)

2.3 กรดเกลเซียลอะซิติก (glacial acetic acid : CH3COOH)

2.4 ไอโอดีน (iodine : I2)

2.5 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide : KI)

2.6 อมิโลส (potato amylose) มีความบริสุทธ์ไม่น้อยกว่า 95%

3. วิธีการเตรียมสารละลาย

3.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มัล (N) : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตร ขนาดความจุ 1,000 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายกรดเกลเซียลอะซิติกเข้มข้น 2 นอร์มัล (N) : ละลายกรดเกลเซียลอะซิติก ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ประมาณ 800 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิกรัม

3.3 สารละลายไอโอดีน : ชั่งไอโอดีน 0.2000 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2.000 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตรสีชาขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืน หรือจนไอโอดีนละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4. วิธีวิเคราะห์

4.1 บดเมล็ดข้าวขาวด้วยเครื่องบด ให้เป็นแป้ง ชั่งแป้งมา 0.100 กรัม ใส่ในขวดแก้ว ปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิท

4.2 เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ

4.3 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ตาม 3.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร

4.4 ปั่นกวนตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก นาน 10 นาที ให้เป็นน้ำแป้งแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4.5 เตรียมขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร ชุดใหม่ เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตรสารละลายกรดเกลเซียลอะซิติกปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

4.6 ดูดน้ำแป้งตาม 4.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตรที่เตรียมไว้ตาม 4.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4.7 วัดความเข้มของสีของสารละลายตาม 4.6 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยอ่านค่าเป็นAbsorbance ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร (nm) หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่าAbsorbance เท่ากับ 0 (ศูนย์)

4.8 นำ blank โดยเติมสารละลายกรดเกลเซียมอะซิติก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4.9 นำ absorbanceไปหาปริมาณ (ร้อยละ) อมิโลส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้

4.10 ปรับปริมาณอมิโลสในแป้งข้าวที่วิเคราะห์ได้ให้เป็นที่ระดับความชื้น ร้อยละ 14.0 จากสูตรปริมาณอมิโลสในแป้งข้าวที่ความชื้นร้อยละ 14.0 = A X 86100 - M

เมื่อ A = ปริมาณอมิโลสในแป้งข้าวที่วิเคราะห์ได้เป็นร้อยละ

M = ปริมาณความชื้นของแป้ งข้าวที่วิเคราะห์ได้ เป็นร้อยละ

5. การเขียนเส้นกราฟมาตรฐาน

5.1 ชั่งอมิโลส 0.0400 กรัม ใส่ในขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร (ตาม 1.5) ที่แห้งสนิทแล้วดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างตาม 4.2-4.4 เป็นสารละลายมาตรฐาน

5.2 เตรียมขวดแก้วปริมาตรขนาดความจุ 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เติมน้ำกลั่นขวดละ 70 มิลลิลิตรเติมสารละลายกรดเกลเซียลอะซิติก ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ในขวดที่ 1 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ในขวดที่ 2 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ในขวดที่ 3 ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร ในขวดที่ 4 และปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดที่ 5 ตามลำดับ แล้วเติมสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในแต่ละขวด

5.3 ดูดสารละลายมาตรฐานตาม 5.1 ปริมาตร 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่าปริมาณอมิโลสร้อยละ 8 16 32 และ 40 ตามลำดับ ใส่ในขวดที่เตรียมไว้ใน 5.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร และวัดค่า absorbance ที่ 620 นาโนเมตร หลังปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่า absorbance เท่ากับ 0 (ศูนย์)

5.4 นำ absorbance กับปริมาณอมิโลสในสารละลายมาตรฐานตาม 5.3 มาเขียนเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน

5.5 นำเส้นกราฟมาตรฐานที่ได้จาก 5.4 มาใช้แปลงค่า absorbance ให้เป็นปริมาณ (ร้อยละ) อมิโลส

วิธีทดสอบหาปริมาณอมิโลส

แบ่งตัวอย่าง

บดเมล็ดข้าวให้ละเอียด 80-100 เมช

ชั่งแป้ง 0.1000 กรัม

เติมแอลกอฮอล์และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ปั่นกวน 10 นาที

ดูดน้ำแป้ง 5 มล. ลงในสารละลายกรดและไอโอดีน

ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

วัดความเข้มของสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ภาคผนวก ง.

วิธีทดสอบหาปริมาณข้าวเจ้าอื่นที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิไทยปน

การหาค่าการสลายเมล็ดข้าวในด่าง

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องชั่ง ที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.0001 กรัม

1.2 ตู้อบ (oven)

1.3 ขวดแก้วปริมาตร (volumetric flask) ขนาดความจุ 1,000 มิลลิลิตร

1.4 จานพลาสติกใสพร้อมฝาปิด (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14.5 เซนติเมตร

1.5 บีกเกอร์แก้ว (beaker) ขนาด 1 – 2 ลิตร

1.6 เดซิกเคเตอร์ดูดความชื้น (desicator)

2. สารเคมี

2.1 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide : KOH) 87%

2.2 โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (potassium hydrogen phthalate : C8H5KO4)

2.3 ฟีนอล์ฟธาลีน (phenolphtalein : C20H14O4)

3. การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.7% + 0.05%

3.1 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ อาจทำได้ 2 วิธี

3.1.1 เตรียม working solution โดยตรง ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 19.54 กรัม ละลายในน้ำ

กลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.1.2 เตรียม working solution จาก stock solution

ก) ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 588.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้วปิด

ฝาทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution สำหรับเจือจางต่อไป

ข) นำ stock solution จาก ก) ปริมาตร 33 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็น working solution

3.2 การหาความเข้มข้นของสารละลาย working solution

3.2.1 อบสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทที่อุณหภูมิ 1300ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

3.2.2 ชั่งสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทตาม 3.2.1 ประมาณ 0.5000 กรัม โดยอ่านให้ได้น้ำหนักที่แท้จริง

3.2.3 ละลายสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทตาม 3.2.2 ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอล์ฟธาลีนเข้มข้น 1% ลงไป 3 หยด ไ ทเทรตกับสารละลาย working solution จนสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของ working solution ที่ใช้ไปเป็นมิลลิลิตร

3.2.4 ทำ blank ตามวิธีการเดียวกับ 3.2.3 โดยไม่ใช้สารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท

3.2.5 คำนวณหาความเข้มข้นของ working solution ดังนี้

$$\% \text{ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์} = \frac{P}{204.03} \times \frac{56.109}{V-B} \times 100$$

เมื่อ V = ปริมาตรของ working solution ที่ใช้ในการไทเทรตกับโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลท (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของ working solution ที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

P = น้ำหนักของสารโพแสสเซียมไฮโดรพทาเลท (กรัม)

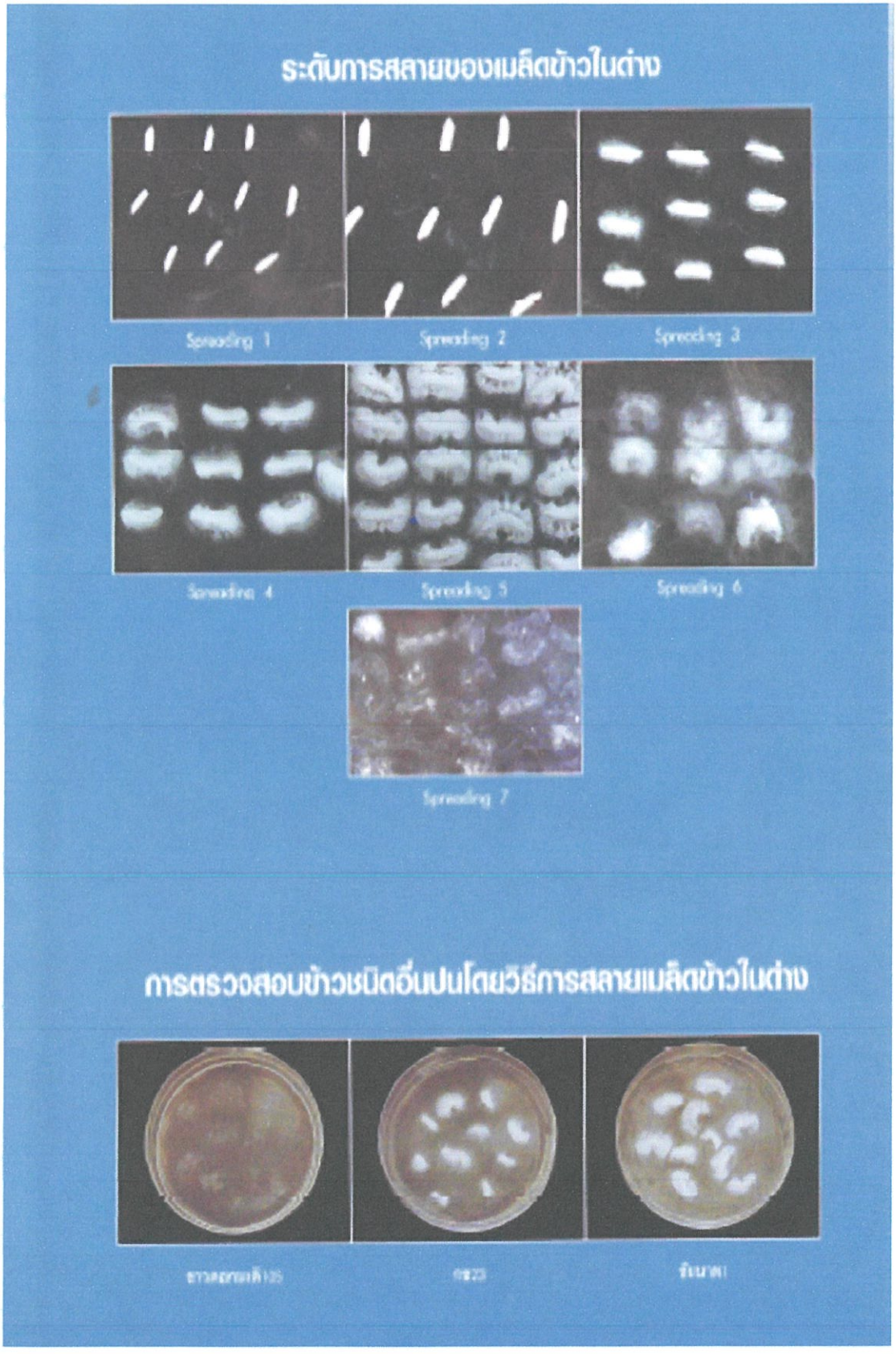
4. วิธีวิเคราะห์

4.1 สุ่มเมล็ดข้าวขาวเต็มเมล็ดมา 100 เมล็ด แบ่งใส่ในจานพลาสติกใส ตาม 1.4 จำนวน 4 จานๆ ละ 25 เมล็ด แล้ววางบนพื้นราบสีดำ

4.2 เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ลงในจานพลาสติกตาม 4.1 ประมาณจานละ 100 มิลลิลิตร ให้เมล็ดข้าวทุกเมล็ดจมอยู่ในสารละลาย และให้แต่ละเมล็ดอยู่ห่างกันพอสมควร แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้ อยู่กับที่ที่อุณหภูมิห้อง (30oซ + 5oซ) โดยไม่ขยับเขยื้อน เป็นเวลา 23 ชั่วโมง

4.3 ตรวจเมล็ดข้าวตาม 4.2 โดยพิจารณาระดับการสลายของเมล็ดข้าวในด่างแต่ละเมล็ดตามลักษณะการสลายตามตารางที่ 1

4.4 การวินิจฉัย เมล็ดข้าวที่มีระดับการสลายในด่าง ตั้งแต่ระดับ 1 ถึงระดับ 5 เป็นเมล็ดข้าวที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิไทย



ภาคผนวก จ

การตรวจสอบข้าวชนิดอื่นปนในข้าวหอมมะลิโดยวิธีการต้ม

วิธีตรวจสอบเมล็ดข้าวสุกที่ต้มในน้ำเดือด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ไม่ได้กำหนดไว้ในมาตรฐาน แต่เป็นวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นอย่างง่ายๆ เพื่อเป็นแนวทางในการบ่งชี้เท่านั้น

1. เครื่องมือ

1.1 หม้อต้มน้ำไฟฟ้า หรือหม้อหุงข้าวไฟฟ้าขนาด 1 ลิตร

1.2 ตะกร้าตะแกรงลวดปลอดสนิม

1.3 ช้อนหรือพายสำหรับเขี่ยเมล็ดข้าว

1.4 กระจกสำหรับกดเมล็ดข้าว 2 แผ่น

1.5 เครื่องแบ่งตัวอย่าง

1.6 ตัวอย่างข้าวขาวหอมมะลิแท้

1.7 ตัวอย่างข้าวขาวพันธุ์ชัยนาท1

2. การทดสอบอุปกรณ์ เพื่อหาระยะเวลาต้มข้าวที่เหมาะสม

2.1 ผสมข้าวขาวหอมมะลิแท้ (1.6) และข้าวขาวพันธุ์ชัยนาท1 (1.7) ให้มีอัตราการปนของข้าวชัยนาท1 30% และคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างทั่วถึง

2.2 แบ่งตัวอย่างข้าวโดยใช้เครื่องแบ่งจนกระทั่งได้ตัวอย่างละประมาณ 150 เมล็ด แล้วจึงสุ่มนับให้ได้ 100 เมล็ด เตรียมไว้หลายๆ ตัวอย่าง

2.3 นำตัวอย่างจากข้อ 2.2 มา 1 ตัวอย่าง นำไปตรวจหาข้าวปนโดยการหาค่าการสลายเมล็ดในด่าง (ภาคผนวก ง)

2.4 นำหม้อต้มน้ำไฟฟ้า หรือหม้อหุงข้าวไฟฟ้า (ข้อ 1.1) มาเติมน้ำ ให้มีความลึกของน้ำประมาณ 2.5- 3.0 ซม. เปิดสวิทส์ต้มน้ำจนเดือดและต้มต่อไปอีก 1 นาที

2.5 นำตัวอย่างจากข้อ 2.2 มาอีก 1 ตัวอย่าง ใส่ในตะกร้าตะแกรงลวดปลอดสนิม (ข้อ 1.2) และต้มในน้ำเดือด (ข้อ 2.4) นาน 12 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ยกตะแกรงขึ้นแล้วรีบแช่ในน้ำเย็นทันทีเพื่อลดอุณหภูมิ ทำ 2 ซ้ำ

2.6 เทเมล็ดข้าวในตะกร้าลงบนกระจกเกลี่ยเมล็ดข้าวให้กระจาย นำกระจกอีกแผ่นมาวางทับเมล็ดข้าวและกดให้แบน เพื่อตรวจดูภายในของเมล็ดข้าวทั้ง 100 เมล็ด ถ้าปรากฏว่าข้าว เมล็ดใดยังเป็นไต โดยมีลักษณะเป็นจุดขุ่นขาวของแป้งดิบปรากฏภายในเมล็ด ให้ถือว่า เป็นข้าวที่ยังไม่สุกสมบูรณ์

2.7 ดำเนินการตามข้อ 2.4-2.6 โดยปรับระยะเวลาต้มข้าวเป็น 13, 14, 15, 16, 17, 18 นาที หรือจนกว่าจะถึงระยะเวลาต้มที่เมล็ดข้าวสุกทั้ง 100 เมล็ด

2.8 คัดเลือกเวลาต้มข้าวที่ได้ผลปริมาณข้าวปน (เมล็ดข้าวไม่สุก) ทำนองเดียวกับผลค่าการ

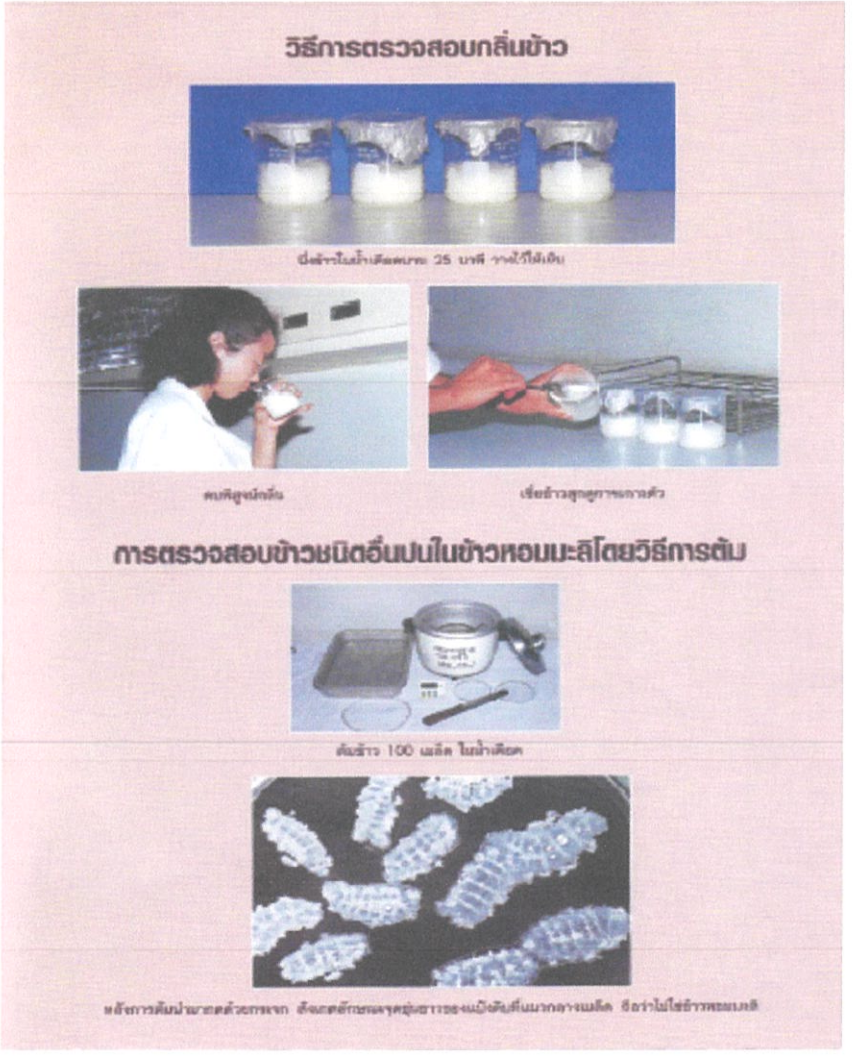
สลายเมล็ดในด่างตาม ข้อ 2.3 เป็นระยะเวลาต้มข้าว เพื่อทดสอบต่อไป

2.9 เตรียมตัวอย่างอีกชุด จำนวน 3-4 ตัวอย่าง 2 ซ้ำ

2.10 ดำเนินการตามข้อ 2.4-2.6 โดยใช้ระยะเวลาที่คัดเลือกได้ตามข้อ 2.8 เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดสอบค่าการสลายเมล็ดในด่าง เพื่อยืนยันความถูกต้อง แล้วจึงเลือกวิธีการดังกล่าวสำหรับตรวจสอบ ปริมาณข้าวปนเบื้องต้นต่อไป

3. การวินิจฉัย

เมล็ดข้าวที่ยังไม่สุกสมบูรณ์ ให้ถือว่าเป็นข้าวที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิไทย



ภาคผนวก ฉ

วิธีการตรวจสอบกลิ่นข้าว

1. อุปกรณ์

1.1 บีกเกอร์แก้วขนาด 200 มิลลิลิตร

1.2 อ่างน้ำสแตนเลส พร้อมเตาแก๊สหรือหม้อต้มน้ำหรือหม้อนึ่งไฟฟ้า

1.3 อลูมินัมฟอยล์

1.4 เครื่องชั่งอ่านได้ละเอียดเป็นกรัม

2. วิธีตรวจสอบ

2.1 ชั่งบีกเกอร์เพื่อทราบน้ำหนัก

2.2 ใส่ข้าวขาวในบีกเกอร์ และชั่งให้ได้น้ำหนักข้าว 30 กรัม

2.3 ล้างข้าวด้วยน้ำ 1 ครั้ง แล้วเติมน้ำให้ได้น้ำหนักข้าวและน้ำ 80 กรัม ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมินัมฟอยล์

2.4 ต้มในหม้อน้ำเดือดหรือนึ่งนาน 15 นาที

2.5 ทิ้งไว้ให้เย็นและดมพิสูจน์กลิ่นเหม็นบูด หรือกลิ่นหอม

แนวทางการตรวจสอบข้าวปนในระหว่างการซื้อขายข้าวเปลือก

1. วัดความชื้นข้าวเปลือก หากมีความชื้นไม่เกิน 15% ให้ดำเนินการตามข้อ 2 หากมีความชื้นเกิน 15% ให้ลดความชื้นก่อนโดยตากแดด

2. ขัดสีข้าวให้ได้ข้าวสาร แล้วดม ตรวจหากลิ่นแปลกปลอม

3. ตรวจสอบข้าวแข็งปน โดยวิธีการย้อมสี (ภาคผนวก ง)

4. หากมีห้องปฏิบัติการให้วิเคราะห์หาปริมาณอมิโลส (ภาคผนวก ก) แล้วตรวจสอบข้าวปน โดยวิธีการต้ม (ภาคผนวก จ) หรือย้อมสี

วิธีการตรวจความเป็นข้าวหอมมะลิ

การตรวจสอบที่สามารถยืนยันว่าเป็นข้าวหอมมะลิแท้หรือไม่นั้น ปัจจุบันมีเพียงวิธีเดียว คือ การตรวจสายพันธุกรรม(DNA) ซึ่งมีสถาบันที่สามารถตรวจสอบได้อยู่น้อยมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างสูง และต้องใช้เวลาในการตรวจสอบพอสมควร นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจสอบเบื้องต้น **เพื่อเป็นแนวทางในการบ่งชี้หาความเป็นข้าวหอมมะลิ คือ วิธีการตรวจทางกายภาพ**

วิธีการตรวจลักษณะเมล็ดข้าวเปลือกหอมทางกายภาพ

พิจารณาจาก ลักษณะสีของเปลือก ขนาดรูปทรงของเมล็ดข้าวเปลือก ลักษณะพิเศษที่มีเอกลักษณ์เฉพาะที่บ่งชี้ว่าเป็นข้าวหอมอะไร (ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ) เช่น

- ข้าวหอมมะลิ 105 มีจุกหางแยกออกชัดเจน
- ข้าวหอมมะลิ กข.15 ที่จุกหางมีลักษณะงอนขึ้นมากกว่า และเมล็ดจะกว้างกว่า
- ข้าวปทุมธานี 105 จะมีลักษณะคล้ายกับ หอมมะลิ 105 ต่างกันที่จุกหางจะแยกน้อยกว่า

วิธีการตรวจลักษณะเมล็ดข้าวสารหอมที่ผ่านการกะเทาะเอาเปลือกและรำออกแล้ว

- **การตรวจทางกายภาพ** (มีมาตรฐานกำหนด) พิจารณาจาก ลักษณะรูปทรงของเมล็ดข้าวขนาดความยาวของเมล็ดข้าวและความยาวเฉลี่ย ต่อความกว้างของเมล็ด ลักษณะพิเศษ ที่บ่งชี้ว่าเป็นข้าวหอมอะไร และวิธีตรวจสอบเมล็ดข้าวสุกที่ต้มในน้ำเดือด
- **การตรวจทางเคมี** คือ การทดสอบหาปริมาณอมิโลส การทดสอบหาปริมาณข้าวเจ้าอื่นที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิไทยปน โดยการหาค่าการสลายเมล็ดข้าวในด่าง หรือการย้อมสี และการทดสอบความสดของข้าว