

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



247315



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การบ่งชี้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบ
แอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ

Identification of proteins associated with anthocyanin synthesis
in purple glutinous rice

ผู้วิจัย

อ.ดร. กัลยา กองเงิน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ISBN

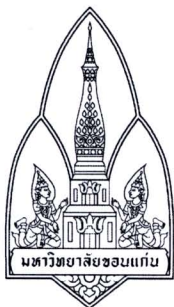
600851763

247315

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



247315



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การบ่งชี้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบ
แอนโทไซยานินในข้าวเหนียวดำ

Identification of proteins associated with anthocyanin synthesis
in purple glutinous rice

ผู้วิจัย

อ.ดร. กัลยา กองเงิน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ISBN

บทคัดย่อ

247315

ข้าวเหนียวดำ เป็นข้าวพันธุ์ที่มีการสะสมสารแอนโทไซยานิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีประโยชน์ต่อสุขภาพ จากการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำที่ปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ใน พ.ศ. 2551-2552 รวบรวมได้ 90 สายพันธุ์ เมื่อวัดปริมาณสารแอนโทไซยานินในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวเหนียวดำ 30 สายพันธุ์ พบว่า ข้าวเหนียวดำมีการสะสมสารแอนโทไซยานินอยู่ในช่วงร้อยละ 2-34 จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบ แบบแผนโปรตีนในใบข้าว 2 สายพันธุ์คือ ข้าวเหนียวขาว กข 6 และข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 (มีใบสีม่วงและมี ปริมาณสารแอนโทไซยานิน 30.66 เปอร์เซ็นต์) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสแบบสองทิศทาง (2D-PAGE) โดย ปลูกต้นกล้าข้าวอายุ 35 วัน ในสารละลายธาตุอาหารพืช จากนั้นแยกโปรตีนในใบข้าว 2 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค 2D-PAGE และย้อมจุดโปรตีนด้วยสีย้อมซิลเวอร์ในเตรท วิเคราะห์และแสดงผลโปรตีนที่พบบน 2D-PAGE gel โดยใช้ 2-dimensional software (Image master 2D platinum version 5) ผลจากการศึกษาวิจัยพบจุดโปรตีน มากกว่า 100 ชนิดที่แยกได้ และพบแบบแผนโปรตีนในใบข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบ แบบแผนโปรตีนในใบข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะในข้าวเหนียวดำอย่างน้อย 7 ชนิด ที่ไม่พบในข้าวเหนียวขาว นอกจากนี้พบโปรตีน 7 ชนิดในข้าวเหนียวดำที่มีการสร้างในปริมาณที่มากกว่า ในข้าวเหนียวขาว และโปรตีน 5 ชนิดในข้าวเหนียวดำที่มีการสร้างในปริมาณที่น้อยกว่าในข้าวเหนียวขาว ในการ นำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จะพบได้ว่า สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่ใช้บ่งชี้ ชนิดของโปรตีนที่จำเพาะในใบข้าวเหนียวดำใบม่วงได้

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวดำ อิเล็กโตรโฟริซิสแบบสองทิศทาง แอนโทไซยานิน

ABSTRACT

247315

Black glutinous rice contains remarkable amounts of anthocyanin that has anti-free radicals; beneficial for health. Ninety black glutinous rice cultivars in NE Thailand were collected in 2008-2009. The accumulation of anthocyanin content in aleulone layer of 30 black glutinous rice cultivars were determined and the result revealed that the accumulated anthocyanin content in these rice cultivars ranging from 2 to 34%. Then black glutinous rice no.19 (purple leaves, anthocyanin 30.66%) was selected and used to study the leaf protein pattern compared with white glutinous rice RD 6 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). Thirty-five-day-old rice seedlings were grown in hydroponic solution. After that proteins from leaves of two rice cultivars were separated using 2D-PAGE and stained with silver stain, leave proteins on the 2D-PAGE gel were analyzed and monitored using 2-dimensional software (Image master 2D platinum version 5). The results showed that more than reproducible 100 protein spots were detected and protein profiles of these two rice cultivars were more different. When compared the 2D-patterns of these two rice cultivars, we found that at least seven protein spots were expressed only in rice no.19. In addition, seven protein spots in No.19 were synthesized at higher levels than in RD 6, and five protein spots in no.19 were accumulate at lower levels than in RD 6. It was found that proteomic approach in this study is a power tool to identify the proteins that specific only in purple leaf of black glutinous rice.

Keywords: anthocyanin, black glutinous rice, 2D-PAGE

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยในครั้งนี้ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ชีรกุลพิสุทธิ และ รองศาสตราจารย์ ดร. มานิตย์ โหมยิตตระกุล เป็นอย่างสูง อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนเป็นอย่างดีและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัยแก่ผู้เขียนตลอดมา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงได้ดีเนื่องจากได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากหน่วยงานราชการที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวเหนียวดำ เพื่อมาทำการศึกษาวิจัย เช่น ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และ ดร. จิรวรรณ สนิทชน หมวดยพิชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากเกษตรกรในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการสนับสนุนของภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้สถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย จากการช่วยเหลือของนักศึกษาผู้ช่วยวิจัยในโครงการ นางสาววิภาดา พลศักดิ์หาญ และจากเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องของภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา และคณาจารย์ที่อบรมสั่งสอนในสิ่งที่ดีเสมอมา ตลอดจนบุคคลในครอบครัวของผู้เขียนที่เป็นกำลังใจตลอดมา

กัลยา กองเงิน

มิถุนายน 2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย	2
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับข้าว	3
2.2 ข้าวเหนียว	5
2.3 โปรตีน	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	17
3.1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำ	17
3.2 การศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินในส่วนของเปลือกเมล็ด	18
3.3 การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบโดยใช้เทคนิค 2D-PAGE	18
3.4 การย้อมสีแถบโปรตีนด้วยสีซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining)	19
3.5 การวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
4.1 การเก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวเหนียวดำ	20
4.2 การศึกษาปริมาณสารแอนโทไซยานินในส่วนของเปลือกเมล็ด	20
4.3 การศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนในใบโดยใช้เทคนิค 2D-PAGE	21
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. การเตรียมสาร	30
ภาคผนวก ข. ข้อมูลดิบ	35
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ข้อมูล	53

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	การเตรียมสารละลายธาตุอาหารพืช 31
ตารางที่ 2	การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน 32
ตารางที่ 3	ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม Separating gel 10 % 32
ตารางที่ 4	รายละเอียดของพันธุ์ข้าวเหนียวดำที่รวบรวมได้ 90 สายพันธุ์ 36
ตารางที่ 5	ข้อมูลของปริมาณสารแอนโทไซยานิน (%) ในข้าวเหนียวดำ 30 สายพันธุ์ 42
ตารางที่ 6	ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของจุดโปรตีนที่พบเฉพาะในข้าวเหนียวดำ (A) โปรตีนที่พบในข้าวเหนียวดำมากกว่าข้าวเหนียวขาว (B) และโปรตีนที่พบในข้าวเหนียวดำน้อยกว่าข้าวเหนียวขาว (C) หมายเลขโปรตีน (Spot no.) ค่ามวลโมเลกุล (MW) ค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ร้อยละปริมาตรของข้าวเหนียวขาว (% volume, %S) ร้อยละของปริมาตรของข้าวเหนียวดำ (% volume, %C) อัตราส่วนระหว่าง %S และ %C (%S :%C) 47
ตารางที่ 7	ชนิดของโปรตีนที่พบเฉพาะในใบข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 [หมายเลขโปรตีน (Spot no.) ค่ามวลโมเลกุล (MW) ค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ชื่อโปรตีน (Protein Ident) แหล่งที่พบ (From) ค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนในฐานข้อมูล (MW Ident) ค่าไอโซอิเล็กทริก ของโปรตีนในฐานข้อมูล (pI Ident) หน้าที่ของโปรตีน (Function)] 48
ตารางที่ 8	ชนิดของโปรตีนที่พบในใบข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 มากกว่าข้าวเหนียวขาว [หมายเลขโปรตีน (Spot no.) ค่ามวลโมเลกุล (MW) ค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ชื่อโปรตีน (Protein Ident) แหล่งที่พบ (From) ค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนในฐานข้อมูล (MW Ident) ค่าไอโซอิเล็กทริก ของโปรตีนในฐานข้อมูล (pI Ident) หน้าที่ของโปรตีน (Function)] 49
ตารางที่ 9	ชนิดของโปรตีนที่พบในใบข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 น้อยกว่าข้าวเหนียว [หมายเลขโปรตีน (Spot no.) ค่ามวลโมเลกุล (MW) ค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ชื่อโปรตีน (Protein Ident) แหล่งที่พบ (From) ค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนในฐานข้อมูล (MW Ident) ค่าไอโซอิเล็กทริก ของโปรตีนในฐานข้อมูล (pI Ident) หน้าที่ของโปรตีน (Function)], 50

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	ส่วนต่างๆ ของต้นข้าว 4
ภาพที่ 2	ส่วนประกอบบริเวณข้อและปล้องของข้าว 5
ภาพที่ 3	โครงสร้างของเกลียวเฟลวี่เลียม 8
ภาพที่ 4	โครงสร้างโดยทั่วไปของสารประกอบแอนโทไซยานิน 8
ภาพที่ 5	ขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสองทิศทาง 13
ภาพที่ 6	แผนภาพสรุปขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 17
ภาพที่ 7	แสดงปริมาณสารแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวเหนียวดำ 30 สายพันธุ์ 21
ภาพที่ 8	แบบแผนโปรตีนของใบข้าวเหนียว 2 สายพันธุ์ ที่แยกโดยเทคนิค 2D-PAGE 23
ภาพที่ 9	ข้าวเปลือกของข้าวเหนียวดำ 90 สายพันธุ์ 39
ภาพที่ 10	ข้าวเปลือกและข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำ 90 สายพันธุ์ 39
ภาพที่ 11	การปลูกทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกและสีของใบข้าวเหนียวดำ 90 สายพันธุ์ 41
ภาพที่ 12	เมล็ดข้าวกล้องของข้าวเหนียวดำ 30 สายพันธุ์ ที่นำมาวัดปริมาณแอนโทไซยานินในส่วนของการเปลือกเมล็ด 41
ภาพที่ 13	ข้าวเหนียวขาว ใบสีเขียว สายพันธุ์ กข 6 (A) และข้าวเหนียวดำ ใบสีม่วง หมายเลข 19 (B) ที่ปลูกใน สารละลายธาตุอาหารเพาะเลี้ยงข้าว 43
ภาพที่ 14	โปรตีนที่ไม่พบในใบข้าวเหนียว สายพันธุ์ กข 6 (A) และพบเฉพาะในใบข้าวเหนียวดำหมายเลข 19 (B) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5 (S และหมายเลข คือ สัญลักษณ์แทนจุดโปรตีนแต่ละชนิดที่พบเฉพาะ) 44
ภาพที่ 15	โปรตีนพบมากกว่าในใบข้าวเหนียวขาว (A) และข้าวเหนียวดำ (B) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5 (M และหมายเลข คือ สัญลักษณ์แทนจุดโปรตีนแต่ละชนิดที่พบมากกว่า) 45
ภาพที่ 16	โปรตีนที่น้อยกว่าในข้าวเหนียวขาว (A) และข้าวเหนียวดำ (B) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5 (L และหมายเลข คือ สัญลักษณ์แทนจุดโปรตีนแต่ละชนิดที่น้อยกว่า) 46
ภาพที่ 17	โปรตีนที่พบในใบข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 มากกว่า ข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5 46
ภาพที่ 18	โปรตีนที่พบในใบข้าวเหนียวดำ หมายเลข 19 น้อยกว่า ข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข 6 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum version 5 47