สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติของยีนโปรตีนทนร้อน ของข้าวไทยในแบคทีเรีย

สิริลักษณ์ อินทรศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติของยีนโปรตีนทนร้อน
ของข้าวไทยในแบคทีเรีย

สิริลักษณ์ อินทรศรี

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....แสงทอง.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่ 28 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2559

กรรมการที่ปรึกษา .....ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์)
วันที่ 23 เดือน ก.พ. พ.ศ. 2559

กรรมการที่ปรึกษา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.วศิน เจริญตัณธนกุล)
วันที่ 23 เดือน ก.พ. พ.ศ. 2559

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร .....ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์)
วันที่ 23 เดือน ก.พ. พ.ศ. 2559

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว .....จตุรภัทร.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุรภัทร วาฤทธิ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 23 เดือน ก.พ. พ.ศ. 2559

ชื่อเรื่อง การโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติของยีนโปรตีนทนร้อนของข้าวไทยในแบคทีเรีย

ชื่อผู้เขียน นางสาวสิริลักษณ์ อินทรศรี

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาพันธุศาสตร์

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต

บทคัดย่อ

โปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (small heat shock protein; *sHsps*) เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีขนาดประมาณ 15-30 กิโลดาลตัน และมีบทบาทในการป้องกันเซลล์จากสภาวะความเครียด จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *sHsps* ในพืชที่สภาวะอุณหภูมิสูงพบว่ายีน *sHsps* มีการแสดงออกมากขึ้น โดยในต้นข้าวจะมีการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็กกลุ่ม 1 (class I) เพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้โคลนยีนโปรตีนทนร้อน กลุ่ม 1 ที่มีขนาด 18 กิโลดาลตัน class I (*OsHsp18*) จากข้าวไทย จำนวน 3 พันธุ์ แล้วนำไปชักนำการแสดงออกเป็นโปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการทนความร้อนของแบคทีเรียที่มียีนที่โคลนได้ พบว่าลำดับเบสของยีนเหล่านี้มีความเหมือน 93 ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ และผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่าสาร isopropyl-B-D thiogalactopyanoside (IPTG) มีผลกระทบกับการเจริญเติบโตของเซลล์ และโปรตีน OsHSP18 น่าจะเป็นพิษต่อเซลล์ *E. coli* ที่ส่งผลกระทบกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากการศึกษาการรอดชีวิตที่อุณหภูมิสูงของเซลล์ที่สร้างโปรตีน OsHSP18 พบว่าเซลล์แบคทีเรียรอดชีวิตที่ 52 องศาเซลเซียส มากกว่าที่ 55 องศาเซลเซียส และไม่มีเซลล์แบคทีเรียรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และโปรตีน OsHSP18 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52 และ 55 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีโปรตีน OsHSP18 แสดงว่าโปรตีน OsHSP18 ของข้าวไทยทั้ง 3 พันธุ์ ไม่สามารถทำให้แบคทีเรียมีความสามารถในการทนร้อน ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากโปรตีน OsHSP18 ไม่มีโดเมนท์ PATSDND จึงมีผลทำให้เซลล์ที่มีโปรตีน OsHSP18 มีการรอดชีวิตไม่แตกต่างจากเซลล์เจ้าบ้าน

คำสำคัญ: ยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก, การแสดงออกของยีน, แบคทีเรีย, การรอดชีวิตที่อุณหภูมิสูง

Title	Cloning and Characterization of a Thai Rice Heat Shock Protein Gene in Bacteria
Author	Mis Siriluck Intharasri
Degree of	Master of Science in Genetics
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Saengtong Pongjaroenkit

ABSTRACT

Small heat shock proteins (sHSPs) which can be found in all living organisms, range in size from 15-30 kDa and play an important role in protecting cells from stress. The study of plant *sHsp* genes in higher temperature condition, indicated that *sHsp* genes showed increased gene expression as shown by small *sHsp* class I genes in rice plants at high temperature. In this study, small *Hsp* class I genes (*OsHsp18*) were isolated from 3 Thai rice varieties and were then induced to express their protein in bacteria (*E. coli)* in order to study the heat resistant property of transformed bacteria.It was found that nucleotide sequence of isolated genes had 93-98% homology and results of the study on cell growth revealed that isopropyl-B-D thiogalactopyranoside (IPTG) had an effect towards cell growth and OsHSP18 protein that could be toxic to *E. coli* Cells. Thermo-tolerance study showed survival of bacteria at 52°C was higher than at 55°C. Moreover, no bacteria was found to survive at 60°C and OsHSP18 protein was not able to increase the survival of bacteria at 52°C and 55°C in comparison with cells having no OsHSP18. This showed that OsHsp18 in 3 Thai rice varieties was not able to prevent bacteria from heat stress which might be due to OsHSP18 having no PATSDND domain, which might have affected cells with OsHSP18 protein to show similar thermo-tolerance with the host cell.

Keywords: small heat shock protein gene, gene expression, bacteria, thermo-tolerance

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยได้ทุ่มเทความตั้งใจ สติปัญญา กำลังกายและกำลังใจจนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นสพ.ดร. วศิน เจริญตัณธนกุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งสละเวลาอันมีค่า ให้ความรู้ คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในการปฏิบัติงานวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้อำนวยการอดิสรณ์ พวงทอง ผู้อำนวยการศูนย์การศึกษาพิเศษ เขตการศึกษา 8 จ.เชียงใหม่ ผู้อำนวยการ สุมนต์ มอนไข่ ผู้อำนวยการโรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ที่กรุณาอนุญาตให้ลาศึกษาต่อ ขอบคุณพี่น้องในห้องปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์โมเลกุลสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพระครูธรรมวารีนุรักษ์ (คำหล้า) วรสุวณฺโณ ที่ให้การอบรมเลี้ยงดู ส่งเสริมการศึกษา เป็นกำลังใจที่ดีให้การสนับสนุนทั้งในด้านการเรียนและการดำเนินชีวิต ให้คำปรึกษารวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัย

สิริลักษณ์ อินทรศรี

กุมภาพันธ์ 2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญรูปภาพ	(9)
สารบัญตารางผนวก	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร	3
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับข้าว	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว	6
ชนิดของข้าว	8
ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวที่ใช้ในการศึกษา	10
ผลกระทบของการขาดน้ำที่มีต่อพืช	12
ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่มีต่อเกษตรกรไทย	14
โปรตีนทนร้อน	14
การแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อน	15
การศึกษาโปรตีนทนร้อนในแบคทีเรีย	17
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	20
ตัวอย่างพืช	20
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	20
วิธีการทดลอง	22
สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง	34

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 35
การโคลนยีนโปรตีนทนร้อน 35
การสร้างชุดของยีนเพื่อแสดงออกเป็นโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย 42
การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มียีน *Hsp* 44
การชักนำการแสดงออกของโปรตีน OsHSP18 45
การทดสอบการรอดชีวิตต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น 46
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 50
บรรณานุกรม 51
ภาคผนวก 55
ภาคผนวก ก ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายผสม 57
ภาคผนวก ข ประวัติผู้วิจัย 76

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของ Separating Gel และ Stacking Gel	33
2	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Hsps* ที่ได้จากการโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy กับฐานข้อมูล GenBank ของข้าวจำนวน 4 พันธุ์	39
3	การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *hsp* ที่ได้ จากข้าวพันธุ์พลายงาม ปราจีนบุรี กู้เมืองหลวง ปทุมธานี 1 และน้ำรู	40
4	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของยีน *Hsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง ปทุมธานี 1 และน้ำรู	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลำต้นข้าว	6
2	รวงข้าว	7
3	ดอกข้าว	7
4	เมล็ดข้าว	8
5	ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1	10
6	ข้าวพันธุ์น้ำรู	11
7	ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง	11
8	ข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรี	12
9	ผลการทำ 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซีส	35
10	ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอริซีส	36
11	ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอริซีส ของการคัดเลือกโคลนด้วยขนาด	37
12	ผลการทำ1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟริซิส ของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I	38
13	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Hsp* ของข้าว 4 พันธุ์ด้วยโปรแกรม ClustalX	40
14	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalX	41
15	ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอริซิส ของดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *Hsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กู้เมืองหลวง พลายงามปราจีนบุรี และน้ำรู ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I	42

ภาพที่		หน้า
16	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS (BL21) แบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS ที่มีพลาสมิด pET3a (pET3a) แบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *sp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a_BL21_PT1) ยีน sHsp จากข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a_BL21_NR) ยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a_BL21_GML) ที่มีการชักนำให้แสดงออกเป็นโปรตีน (+ IPTG)	45
17	การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากเซลล์ *E. coli* BL21 pLysS (BL21) เซลล์แบคทีเรียที่มีชุดยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a+KU) ยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a+NU) ยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a+PT1) ที่ไม่มีการชักนำ (-) และการชักนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG (+IPTG) โดยที่ * คือแถบของโปรตีนที่คาดว่าเป็น OsHsp18	46
18	กราฟการรอดชีวิตของเซลล์ที่อุณหภูมิ 52 และ 55 องศาเซลเซียส	47
19	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHsp18; OsHSP18 จากฐานข้อมูล GenBank (EU846992) กับ OsHSP18 จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (OsHsp18-GML) OsHSP18 จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (OsHsp18-PT1) และ OsHSP18 จากข้าวพันธุ์น้ำรู (OsHsp18-NR)	48

สารบัญตารางผนวก

ตารางที่		หน้า
1	วัดค่า OD_{600} ครั้งที่ 1	59
2	วัดค่า OD_{600} ครั้งที่ 2	61
3	วัดค่า OD_{600} ครั้งที่ 3	63
4	ค่าเฉลี่ยการวัด OD_{600}	65
5	ทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 52°C ครั้งที่ 1	67
6	ทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 52°C ครั้งที่ 2	67
7	ทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 52°C ครั้งที่ 3	68
8	ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 52°C	68
9	ทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 55°C ครั้งที่ 1	69
10	ทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 55°C ครั้งที่ 2	69
11	ทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 55°C ครั้งที่ 3	70
12	ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตที่ 55°C	70

บทที่ 1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา

สภาพอากาศในปัจจุบันมีความแปรปรวนเกิดจากผลกระทบของสภาวะโลกร้อน (global warming) ซึ่งอุณหภูมิของโลกที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปีส่งผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพ คือ สิ่งมีชีวิตหลายชนิดจะสูญพันธุ์ (รัตนศิริ, 2557) และส่งผลให้ผลผลิตในภาคเกษตรลดน้อยลง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2550) เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการออกดอกของพืชหลายชนิด เช่น กระเจี๊ยบเขียว สลัด เบญจมาศ สตรอเบอรี่ และข้าว เป็นต้น โดยเฉพาะข้าวที่เป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลกนั้น อากาศร้อนสามารถทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะการติดเมล็ด (Wei et al., 2012) ซึ่งผลผลิตของข้าวจะหายไป 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในกลางคืน 1 องศาเซลเซียส (Peng et al., 2004) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลทำให้ช่อดอกเป็นหมัน มีละอองเกสรที่ผิดปกติ ความมีชีวิตและความงอกของละอองเกสรลดลง ส่งผลให้การติดเมล็ดน้อยลงไปด้วย (อภิชาติ, 2558) โดยสิ่งมีชีวิตตอบสนองต่อความร้อนที่สูงขึ้นโดยการสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่าโปรตีนทนร้อน(heat shock protein; HSPs) (Younget al., 1999) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีน chaperone ที่คงอยู่ในสายวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต (Dali et al., 2008) พืชที่อยู่บนบกโดยทั่วไปมีวิวัฒนาการในการปรับตัวให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่างๆ ได้แก่ การขาดน้ำ (water stress) สารเคมีที่เป็นพิษ (chemical toxicity) (Liuet al., 2005) ความร้อน (heat stress) ความเย็น (coldstress) (Mahroof et al., 2005) พืชสามารถตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้โดยมีโปรตีนheat shock transcription factors (HSFs) มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองสภาพความร้อนซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อน (Guo et al., 2008) ในยูคาริโอตต่างๆ พบการตอบสนองต่อความร้อนได้และคล้ายคลึงกัน โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อน (Liu et al., 2005) ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งในแบคทีเรีย พืช และสัตว์ มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวป้องกันเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะความเครียด (Sorensen et al., 2003) และยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันไม่ให้โปรตีนเสียสภาพ ป้องกันการตายของเซลล์ รวมทั้งป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์ (Sreedhar et al., 2004)

โดยจากการศึกษาลำดับเบสของยีนโปรตีนทนร้อนในข้าวไทยข้าวพันธุ์น้ำรูและข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีนโปรตีนทนร้อนในฐานข้อมูล GenBank ถึง 91-98 เปอร์เซ็นต์ (สมหญิง, 2553) แสดงให้เห็นว่าในข้าวไทยมียีนโปรตีนทนร้อนเช่นเดียวกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการโคลนยีนโปรตีนทนร้อนจากข้าวไทยที่มีลำดับเบสแตกต่างกันแล้วนำยีนโปรตีนทนร้อนไปแสดงออกในแบคทีเรีย จากนั้นนำไปศึกษาความสามารถในการทนร้อนของ

แบคทีเรียที่ได้รับยีนโปรตีนทนร้อนที่แตกต่างกัน ที่อาจจะแสดงความสามารถในการทนร้อนที่แตกต่างกันไปด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนโปรตีนทนร้อนจากข้าวไทย
2. เพื่อแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนที่โคลนได้ในแบคทีเรีย
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นของแบคทีเรียที่ได้รับยีนโปรตีนทนร้อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถโคลนยีนโปรตีนทนร้อนจากข้าวไทยได้
2. สามารถสร้างแบคทีเรียที่ได้รับยีนโปรตีนทนร้อนจากข้าวไทยได้
3. ได้ข้อมูลความสามารถในการทนร้อนของแบคทีเรียที่ได้รับยีนโปรตีนทนร้อนที่แตกต่างกัน

บทที่ 2
ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับข้าว

ข้าวเป็นธัญญาหารหลักของมนุษย์ เป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และมีความทนทานสูงต่อสภาพภูมิประเทศแบบต่างๆ จึงสามารถทำการเพาะปลูกได้ง่ายในแทบทุกพื้นที่ทั่วโลก ได้แก่ พื้นที่แห้งแล้ง ที่ราบลุ่ม ตลอดจนพื้นที่ภูเขาสูงที่มีสภาพอากาศหนาวเย็น มีการค้นพบหลักฐานยืนยันว่ามนุษย์เริ่มนำข้าวป่ามาปลูกเป็นครั้งแรกที่ประเทศจีน จากการศึกษาสถานที่ทางประวัติศาสตร์ของประเทศจีนแผ่นดินใหญ่ของนาย Richard S Macheish นักโบราณคดีชาวอเมริกัน ในปี พ.ศ. 2536 โดยพิจารณาจากหลักฐานข้าวไหม้ที่ติดอยู่กับเศษภาชนะ และเศษต้นข้าวสมัยโบราณที่ขุดได้จากถ้ำ 2 แห่งในหุบเขาทางตะวันตกเฉียงใต้ของจีน ซึ่งการเพาะปลูกข้าวในยุคเริ่มแรกนั้นคล้ายกับการทำไร่เลื่อยลอย จากนั้นจึงมีการพัฒนามาเป็นการทำนาหว่าน และการทำนาแบบปักดำ (กรมการข้าว)

ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า (annual grass) จัดอยู่ในสกุล Oryza ของวงศ์ Gramineae ข้าวที่ขึ้นอยู่ในท้องที่ต่างๆ ของโลกแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

1. *Oryza sativa* ซึ่งมีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชียและมีการปลูกกันทั่วไปในเอเชียและแหล่งอื่นๆ ของโลก แบ่งเป็น 3 ชนิดคือ

1.1 อินดิกา (Indica) เป็นข้าวเมล็ดยาวเรียวเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณเขตร้อน (Tropical zone) เช่น ศรีลังกา จีนตอนใต้และตอนกลาง อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ ไทย ฟิลิปปินส์ จากการสันนิษฐานเชื่อกันว่าข้าวอินดิกาได้มีการปลูกครั้งแรกในบริเวณตอนกลางของลุ่มน้ำแยงซีเกียง เมื่อก่อน ค.ศ. 200 ก่อนที่จะแพร่กระจายไปสู่ตอนใต้ของอินเดีย ศรีลังกา หมู่เกาะมลายู ภาคกลางและภาคใต้ของจีน

1.2 จาโปนิคา (Japonica) เป็นข้าวเมล็ดสั้นป้อม มีเปอร์เซ็นต์อะไมโลสต่ำ เจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น สันนิษฐานว่าแหล่งกำเนิดของจาโปนิคานี้น่าจะอยู่ในบริเวณลุ่มน้ำเหลืองของจีนและตอนล่างของลุ่มแม่น้ำแยงซีเกียง ทั้งนี้โดยการนำพันธุ์ข้าวจากบริเวณเนปาล-อัสสัม พม่า-ยูนาน และอินโดจีนเข้ามาปลูกในบริเวณดังกล่าวจนพันธุ์ข้าวได้มีการปรับตัวเจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น

1.3 จาวานิคา (Javanica) เป็นข้าวต้นสูง เมล็ดใหญ่ป้อม สันนิษฐานว่า เกิดจากการคัดเลือกพันธุ์มาจากอินดิกา และได้นำเข้ามาปลูกในประเทศอินโดนีเซียครั้งแรกในระยะเวลามากกว่า 1,800 ปี ก่อนคริสตกาล และในปัจจุบันจะปลูกในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น (บุญหงส์, 2547)

2. *Oryza glaberrima* มีแหล่งกำเนิดและปลูกเฉพาะในแอฟริกา

3. ข้าวป่า (Wild rice) ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศต่างๆ ของทุกทวีปที่ปลูกข้าว เช่น *Oryza perennis*, *Oryza officinalis*, *Oryza spontanea* และ *Oryza nivara* เป็นต้น

1. ประวัติศาสตร์ของการปลูกข้าวในประเทศไทย

ในประเทศไทยได้ปรากฏร่องรอยหลักฐานว่าข้าวเป็นอาหารประจำชาติมาไม่น้อยกว่า 5,500 ปี จากแกลบข้าวที่ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของดินเพื่อทำเครื่องปั้นดินเผาที่แหล่งโบราณคดี ต.บ้านเชียง อ.หนองหาน จ.อุดรธานี และบ้านโนนกกทา ต.บ้านนาดี อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าเป็นเมล็ดข้าวที่เก่าแก่ที่สุดของไทย นอกจากนี้ยังพบหลักฐานการปลูกข้าวเหนียวเมล็ดใหญ่ในพื้นที่สูงที่ถ้ำปุงฮุง จังหวัดแม่ฮ่องสอน

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเรื่องข้าวไทยโดยพิจารณาจากแกลบของแผ่นอิฐโบราณจากโบราณสถาน 108 แห่งใน 39 จังหวัดทุกภาคของประเทศไทย โดยความร่วมมือของกระทรวงเกษตรและกรมป่าไม้ของไทยกับนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นแห่งมหาวิทยาลัย Tottri ทำให้ได้ข้อสันนิษฐานว่าประเทศไทยมีการปลูกข้าวมาตั้งแต่พุทธศตวรรษที่ 6 โดยเริ่มจากการปลูกข้าวเหนียวนาสวนเมล็ดป้อมและข้าวเหนียวไร่เมล็ดใหญ่ หลังจากที่ได้รับอิทธิพลทางด้านกสิกรรมและการค้าจากจีนซึ่งเชื่อมเส้นทางเศรษฐกิจมาตามแนวลำน้ำโขงในช่วง พ.ศ. 540-570 จากนั้นจึงมีการปลูกข้าวนาสวนเมล็ดเรียวเพิ่มขึ้น

ผลจากการวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า ในช่วงพุทธศตวรรษที่ 11-20 พื้นที่ในการเพาะปลูกและความนิยมในการบริโภคข้าวของคนไทยมีความแตกต่างกันไปในแต่ละยุคสมัย กล่าวคือ สมัยก่อนทวารวดี (พุทธศตวรรษที่ 11-16) มีการปลูกข้าวเหนียวเมล็ดใหญ่ในพื้นที่สูงและปลูกข้าวเหนียวเมล็ดป้อมในที่ลุ่ม ส่วนในสมัยศรีวิชัย (พุทธศตวรรษที่ 13-18) นิยมปลูกข้าวเจ้าเมล็ดเรียวซึ่งสันนิษฐานว่านำมาจากอาณาจักรขอม ซึ่งใช้การบริโภคข้าวเป็นการแบ่งชั้นชั้นปกครองด้วย คือ ชาวขอมซึ่งเป็นชนชั้นปกครองจะหุงต้มและบริโภคข้าวเมล็ดยาว จึงเรียกว่า “ข้าวเจ้า” และเรียกข้าวเหนียวที่ชาวพื้นเมืองบริโภคว่า “ข้าวไพร่ ข้าวบ่าว หรือข้าวนึ่ง”

ต่อมาในสมัยสุโขทัย พ.ศ.1740-2040 เริ่มมีการปลูกข้าวเจ้าเมล็ดยาวเรียวเพิ่มมากขึ้นแต่ประชากรส่วนใหญ่ยังคงนิยมปลูกข้าวเหนียวเมล็ดป้อมและข้าวเหนียวเมล็ดยาว เมื่อเริ่มมีการถือครองที่ดินทำกินเพื่อประกอบอาชีพกสิกรรม ก่อให้เกิดการปกครอง เศรษฐกิจ และสังคมขึ้น จึงน่าจะเป็นยุคเริ่มต้นของระบบศักดินา ซึ่งเป็นการแบ่งชนชั้นตามจำนวนของพื้นที่นา

ในสมัยกรุงศรีอยุธยาตอนต้น เริ่มมีระบบการปกครองแบบจตุสดมภ์ มีการตั้ง “กรมนา” ขึ้นมาดูแลส่งเสริมและสนับสนุนการทำนาอย่างจริงจัง เพื่อให้มีข้าวไว้บริโภคอย่างบริบูรณ์ในยามปกติ และเก็บเป็นเสบียงสำรองในภาวะสงคราม โดยยังคงนิยมปลูกข้าวเหนียวเมล็ดป้อม ข้าวเหนียวเมล็ดยาว และมีการเพิ่มพื้นที่การปลูกข้าวเจ้าเมล็ดเรียวยาวมากขึ้น

สมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลายถึงต้นรัชสมัยรัชกาลที่ 3 แห่งกรุงรัตนโกสินทร์ตอนต้น ทางราชการได้แนะนำพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณภาพให้กับราษฎร โดยภาคเหนือตอนบนนิยมปลูกข้าวเหนียว ในขณะที่ภาคเหนือตอนล่างแล้วภาคใต้นิยมปลูกข้าวเจ้า อีกทั้งยังมีการจัดเก็บอากรข้าวขึ้นด้วย ซึ่งในช่วงนั้นมีการออกล่าอาณานิคมของประเทศตะวันตกเป็นที่มาของเปิดเสรีทางการค้ากับต่างประเทศมากขึ้น ส่งผลให้ข้าวกลายเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ จึงมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตข้าวในเขตพื้นที่ราบลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาซึ่งถือว่าเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์มากที่สุด

ปัจจุบันพบการปลูกข้าวเมล็ดป้อมมากในเขตพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่การปลูกข้าวเมล็ดยาวพบมากในบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์มากทางภาคกลางและภาคใต้ ซึ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกข้าวมากที่สุดของประเทศคิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่ปลูกข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณภาพดีที่สุดในโลก ชาวนาจึงมักปลูกไว้เพื่อจำหน่าย ในขณะที่ภาคกลางและภาคเหนือมีพื้นที่ปลูกข้าวแห่งละ 25 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันถือได้ว่าประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกข้าวที่มีผลผลิตออกสู่ตลาดโลกมากและเป็นศูนย์กลางของการวิจัยพันธุ์ข้าว ซึ่งแสดงถึงบทบาทของการเป็นผู้นำเรื่องธัญญาหาร (กรมการข้าว, 2558)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

1. ราก เป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน ใช้ยึดลำต้นกับดินเพื่อไม่ให้ต้นล้ม ต้นข้าวไม่มีรากแก้ว แต่มีรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ใต้ผิวดิน

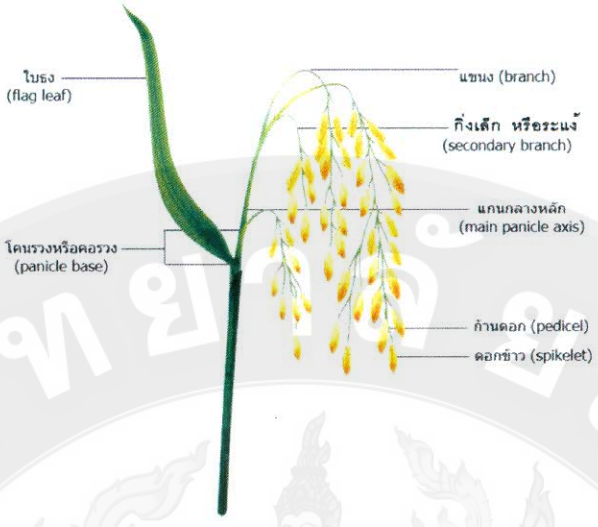
2. ลำต้น มีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งออกเป็นปล้องๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมีประมาณ 20-25 ปล้อง (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ลำต้นข้าว

ที่มา: บริษัท. สนุก ออนไลน์ จำกัด (2558)

3. ใบ ต้นข้าวมีใบไว้สำหรับสังเคราะห์ด้วยแสง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและ สร้างเมล็ดข้าว ใบประกอบด้วย กาบใบและแผ่นใบ

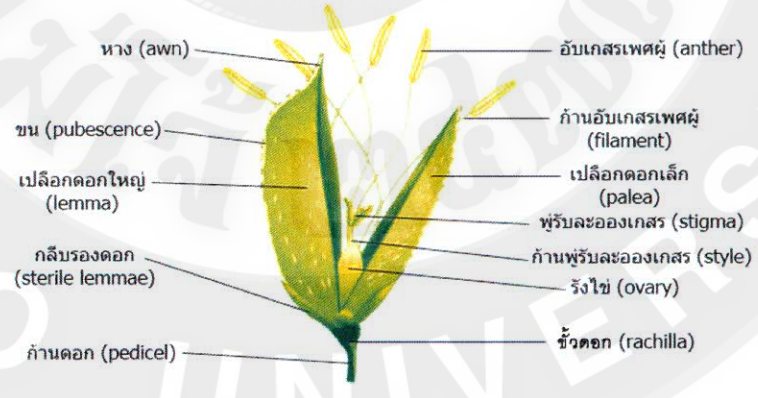
4. รวงข้าว (panicle) คือ ช่อดอกของข้าว (inflorescence) เกิดขึ้นที่ข้อของปล้องอันสุดท้ายของต้นข้าว ระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องอันสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง เรียกว่า คอรวง ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 รวงข้าว

ที่มา: รักบ้านเกิด (2559)

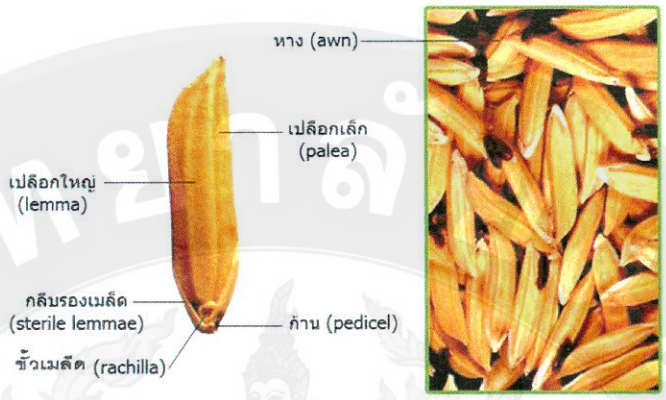
5. ดอกข้าว คือ ส่วนที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียสำหรับผสมพันธุ์ ดอกข้าวประกอบด้วยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่นประสานกัน เพื่อห่อหุ้มส่วนที่อยู่ภายในไว้ เปลือกนอกใหญ่แผ่นนอก เรียกว่า เลมมา (lemma) ส่วนเปลือกนอกใหญ่แผ่นใน เรียกว่า พาเลีย (palea) ทั้งสองเปลือกนี้ ดังภาพที่ 3 ภายนอกของมันอาจมีขนหรือไม่มีขนก็ได้



ภาพที่ 3 ดอกข้าว

ที่มา: รักบ้านเกิด (2559)

6. เมล็ดข้าว คือ ส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm)และส่วนที่เป็นคัพภะ ซึ่งห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่น ดังภาพที่ 4 (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ, 2554)



ภาพที่ 4 เมล็ดข้าว

ที่มา: รักบ้านเกิด (2559)

ชนิดของข้าว

การแบ่งชนิดของข้าวทำได้หลายแบบ ขึ้นอยู่กับวิธี หรือมาตรการที่ใช้ในการแบ่ง ได้แก่

1. การแบ่งตามประเภทของเนื้อแข็งในเมล็ดข้าวสาร

แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งต้นข้าวจะมีลักษณะอย่างอื่นเหมือนกันทุกอย่าง แต่แตกต่างกันที่ประเภทของเนื้อแข็งในเมล็ด เมล็ดข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้งอะไมโลส (amylose) ประมาณร้อยละ 15-30 ส่วนเมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยแป้งอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นส่วนใหญ่และมีแป้งอะไมโลสเพียงเล็กน้อยประมาณร้อยละ 5-7

2. การแบ่งตามสภาพพื้นที่เพาะปลูก

2.1 ข้าวไร่ (Upland rice) เป็นข้าวที่ปลูกได้ทั้งบนที่ราบและที่ลาดชันไม่ต้องทำคันนาเก็บกักน้ำ นิยมปลูกกันมากในบริเวณที่ราบสูง คิดเป็นเนื้อที่เพาะปลูกประมาณร้อยละ 10 ของเนื้อที่เพาะปลูกทั่วประเทศ

2.2 ข้าวนาสวนหรือนาดำ (Lowland rice) เป็นข้าวที่ปลูกในที่ลุ่มทั่ว ๆ ไปในสภาพที่มีน้ำหล่อเลี้ยงต้นข้าวตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งก่อนเก็บเกี่ยว คิดเป็นเนื้อที่เพาะปลูก ประมาณร้อยละ 80 ของเนื้อที่เพาะปลูกทั่วประเทศ

2.3 ข้าวขึ้นน้ำหรือข้าวนาเมือง (Floating rice) เป็นข้าวที่ปลูกในแหล่งที่ไม่สามารถรักษาระดับน้ำได้ บางครั้งระดับน้ำในบริเวณที่ปลูกอาจสูงกว่า 1 เมตร ต้องใช้ข้าวพันธุ์พิเศษที่เรียกว่า ข้าวลอย หรือ ข้าวฟ่างลอย ส่วนมากปลูกแถบจังหวัดพระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี พิจิตร อ่างทอง ชัยนาทและสิงห์บุรี คิดเป็นเนื้อที่เพาะปลูกประมาณร้อยละ 10 ของเนื้อที่เพาะปลูกทั่วประเทศ

3. การแบ่งตามอายุการเก็บเกี่ยว

ข้าวเบา ข้าวกลางและข้าวหนัก ซึ่งข้าวเบามีอายุการเก็บเกี่ยว 90-100 วัน ข้าวกลางมีอายุการเก็บเกี่ยว 100-120 วัน และข้าวหนักมีอายุการเก็บเกี่ยว 120 วันขึ้นไป อายุการเก็บเกี่ยวนับแต่วันเพาะกล้าหรือหว่านข้าวในนาจนเก็บเกี่ยว

4. การแบ่งตามลักษณะความไวต่อช่วงแสง

ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงจะมีอายุการเก็บเกี่ยวที่ไม่แน่นอน คือไม่เป็นไปตามอายุของต้นข้าว เพราะจะออกดอกในช่วงเดือนที่มีความยาวของกลางวันสั้นกว่ากลางคืน ในประเทศไทยช่วงดังกล่าวเริ่มเดือนตุลาคม ฉะนั้นข้าวพวกนี้ต้องปลูกในฤดูนาปี (ฤดูฝน) เท่านั้น ส่วนข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงสามารถปลูกได้ทุกฤดูกาล ข้าวขาวมะลิ 105 เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง ในขณะที่ข้าวปทุมธานี เป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง

5. การแบ่งตามรูปร่างของเมล็ดข้าวสาร สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด คือ

5.1 ข้าวเมล็ดสั้น (Short grain) ความยาวของเมล็ดไม่เกิน 5.50 มิลลิเมตร

5.2 ข้าวเมล็ดยาวปานกลาง (Medium grain) ความยาวของเมล็ดตั้งแต่ 5.5-6.60 มิลลิเมตร

5.3 ข้าวเมล็ดยาว (Long grain) ความยาวของเมล็ดตั้งแต่ 6.61-7.50 มิลลิเมตร

5.4 ข้าวเมล็ดยาวมาก (Extra-long grain) ความยาวของเมล็ดตั้งแต่ 7.51 มิลลิเมตรขึ้นไป

6. การแบ่งตามฤดูปลูก สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

ข้าวนาปีหรือข้าวนาน้ำฝน คือ ข้าวที่ปลูกในฤดูการทำนาปกติ เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคมและเก็บเกี่ยวเสร็จสิ้นล่าสุดไม่เกินเดือนกุมภาพันธ์

ข้าวนาปรัง คือ ข้าวที่ปลูกนอกฤดูการทำนาปกติ เริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม ในบางท้องที่จะเก็บเกี่ยวอย่างช้าที่สุดไม่เกินเดือนเมษายน นิยมปลูกในท้องที่ที่มีการชลประทานดี เช่น ในภาคกลาง (มูลนิธิข้าวไทย, 2554)

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวที่ใช้ในการศึกษา

1. ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1

ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นข้าวเจ้า เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ BKNA6-18-3-2 กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ในปี พ.ศ. 2533 และได้รับรองพันธุ์ในปี พ.ศ. 2543 เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 104-133 เซนติเมตร เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงเมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง มีขน ดังภาพที่ 5 มีหางเล็กน้อยคุณภาพข้าวสุก นุ่มเหนียว มีกลิ่นหอมอ่อนผลผลิตประมาณ 650-774 กิโลกรัมต่อไร่ มีลักษณะเด่นคือ ผลผลิตสูงคุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาวรวมทั้งต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง (กรมการข้าว, 2558)

ภาพที่ 5 ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1

ที่มา: กรมการข้าว (2558)

2. ข้าวพันธุ์น้ำรู

ข้าวไร่น้ำรูเป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสง ได้มาจากชาวไทยภูเขาเผ่าลีซอ บ้านน้ำรู ดอยสามหมื่น อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2518 โดยนายวิฑูรย์ ขันติกุล สถานีทดลองข้าวไร่และธัญพืชเมืองหนาวสะเมิง ได้ทำการปลูกศึกษาพันธุ์ และได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรในปี 2530 ลักษณะประจำพันธุ์มีความสูงประมาณ 140 เซนติเมตร ลำต้นตรงค่อนข้างแข็ง ไม่ล้มง่าย (ภาพที่ 6) นุ่มปานกลางลักษณะเด่นของพันธุ์ คือ เจริญเติบโตได้ดีที่มีอากาศหนาวและบนที่สูง การชูรวงดีและระแง้ถี่ ต้านทานโรคเมล็ดด่างดี ในสภาพธรรมชาติพันธุ์ข้าวนี้ตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยสูง (กรมการข้าว, 2558)

ภาพที่ 6 ข้าวพันธุ์น้ำรู

ที่มา: กรมการข้าว (2558)

3. กู้เมืองหลวง

ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงเป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมือง ที่ปลูกเป็นข้าวไร่บางท้องที่ในภาคใต้ ปลูกศึกษาพันธุ์และเปรียบเทียบพันธุ์ที่สถานีทดลองยางในภาคใต้สูงประมาณ 155 เซนติเมตร (ภาพที่ 7) เป็นข้าวไวต่อช่วงแสงคุณภาพข้าวสุก ร่วน แข็ง ท้องไข่มาก มีลักษณะเด่น คือทนแล้งได้ดี เหมาะสำหรับปลูกเป็นข้าวไร่ในภาคใต้และปลูกเป็นพืชแซมยาง (กรมการข้าว, 2558)

ภาพที่ 7 ข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง

ที่มา: กรมการข้าว (2558)

4. ข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรี

พลายงามปราจีนบุรีเป็นข้าวเจ้าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้จากการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ โดยนายเพิ่มศักดิ์ สุภาพรเหมินทร์ นักวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี จากตำบลประจันตคาม อำเภอประจันตคาม จังหวัดปราจีนบุรี มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ เป็นข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมือง สูงประมาณ 240 เซนติเมตร (ขึ้นอยู่กับระดับน้ำ) ไวต่อช่วงแสง มีคุณภาพข้าวสุก ร่วน แข็ง ดังภาพที่ 8 มีลักษณะเด่น คือ ขึ้นน้ำได้ดี ในระดับน้ำลึกตั้งแต่ 1-5 เมตร และท่วมขังนานกว่า 1 เดือน และสามารถทนแล้งได้ดี อีกทั้งยังต้านทานโรคไหม้ ในระยะกล้าดี นิยมใช้ในการแปรรูปเป็นเส้นก๋วยเตี๋ยว คุณภาพดี มีความนุ่มเหนียว (กรมการข้าว, 2558)

ภาพที่ 8 ข้าวพันธุ์พลายงามบุรี

ที่มา: กรมการข้าว (2558)

ผลกระทบของการขาดน้ำที่มีต่อพืช

ปัญหาหลักอย่างหนึ่งของการปลูกพืชเศรษฐกิจคือปัญหาการขาดน้ำในระหว่างการเจริญเติบโตพืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำได้ต่างกัน ดังนั้น การมีข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติในการทนทานต่อสภาพขาดน้ำของพืช จึงมีประโยชน์ในการใช้คัดเลือกพันธุ์พืชให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ที่ทำการเพาะปลูก (ศานิต และ กิตติภูมิ, 2555) จากการศึกษาความสามารถทนทานต่อการขาดน้ำของถั่วลิสง โดย Dhopateet al. (1992) พบว่า ถั่วลิสงมีผลผลิตลดลงร้อยละ 32.1-46.7 เมื่อปลูกในสภาพที่ขาดน้ำ นอกจากนี้การทดลองปลูกข้าว (พีระยศ และ อนันต์, 2539) และ

การทดลองปลูกข้าวสาลี (Wopereis et al., 1996) ในสภาพขาดน้ำพบว่า มีการเจริญเติบโตและมีผลผลิตลดลงเมื่อเทียบกับการปลูกในสภาพที่ให้น้ำปกติ

การขาดน้ำมีผลกระทบต่อพืชดังนี้ (เฉลิมพล, 2542)

1. การเจริญเติบโตของพืช การขาดน้ำในดินมีผลต่อขนาดของต้นพืชเนื่องจากการขาดน้ำมีผลโดยตรงต่อปริมาณของน้ำภายในเซลล์และลดความเต่งของเซลล์ลง ความเต่งของเซลล์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านกายภาพ สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี การขาดน้ำจึงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากปากใบของพืชปิดทำให้หยุดการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างพืชกับอากาศ ทำให้การเจริญเติบโตลดลงเนื่องจากประสิทธิภาพการเคลื่อนย้ายอาหารลดลง การขาดน้ำนอกจากจะทำให้ลดการเจริญเติบโตของพืชลงแล้วยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของต้นพืชด้วย เช่น ขนาดของเซลล์ ปริมาณช่องว่างระหว่างเซลล์ ปริมาณสารเคลือบผิวใบ (cutin) ความหนาแน่นของเส้นใบ พื้นที่ใบ และความถี่ในการปิดเปิดปากใบ เป็นต้น

2. ผลผลิตของพืช ปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อผลผลิตของพืชคือช่วงเวลาการขาดน้ำ นักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่าพืชที่ขาดน้ำในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันจะมีการเจริญเติบโตพืชและให้ผลผลิตแตกต่างกันถึงแม้จะใช้น้ำเท่ากันก็ตาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากพืชขาดน้ำในระยะออกดอกจะส่งผลให้ผลผลิตของพืชลดลงมากที่สุด

สภาวะขาดน้ำ (water deficit) คือสภาวะที่เกิดขึ้นเนื่องจากอัตราการคายน้ำมากกว่าอัตราการดูดน้ำของพืช ทำให้ปริมาณน้ำในพืชลดลงและมีผลต่อสรีรวิทยาของพืช ซึ่งการตอบสนองที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงและช่วงเวลาของการขาดน้ำ (สายัณห์, 2537) ในสภาพที่อุณหภูมิของอากาศไม่สูงเกินไปปริมาณน้ำที่พืชดูดขึ้นมาและถูกปล่อยออกจากใบโดยกระบวนการหายใจและการคายน้ำจะมีความสมดุลแต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะเกิดการการสูญเสียน้ำทางปากใบเพิ่มขึ้น โดยอัตราการหายใจจะสูงขึ้นจนทำให้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงผิดปกติไป ผลจากการขาดน้ำและอุณหภูมิอากาศที่สูงจนเกินไปส่งผลให้น้ำที่พืชดูดขึ้นมาจากดินไม่เพียงพอสำหรับใช้ในกระบวนการต่างๆ ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยว (wilt) สร้างอาหารได้ไม่เต็มที่ ซึ่งมีผลต่อเนื่องทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก และหากประสบสภาพปัญหาเช่นนี้เป็นเวลานานพืชก็จะแห้งตายได้ในที่สุด (นพพร, 2543)

ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่มีต่อเกษตรไทย

นักวิทยาศาสตร์พบว่าปรากฏการณ์เรือนกระจก (green house effect) และปรากฏการณ์แอลนิโน (EL NINO) มีผลกระทบอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของโลก ส่งผลให้สภาวะอากาศแปรปรวน โดยอากาศร้อนขึ้นเรื่อยๆ รวมถึงมีการเกิดภาวะภัยแล้ง อุทกภัยที่เกิดขึ้นบ่อย และทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น

ภัยแล้งเป็นภัยธรรมชาติที่ส่งผลกระทบอย่างชัดเจนต่อประเทศไทยทั้งทางด้านเศรษฐกิจและคุณภาพชีวิตของประชากร มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและพืชผลทางการเกษตร ในปัจจุบันนอกจากประเทศไทยจะได้รับผลกระทบจากอุทกภัยที่รุนแรงแล้ว ยังพบปัญหาการขาดแคลนน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภคในพื้นที่มากกว่า 46 จังหวัดทั่วประเทศ และคาดการณ์ว่าปัญหาภัยแล้งนี้จะยิ่งทวีความรุนแรงมากขึ้น ซึ่งจะทำให้พื้นที่ทางการเกษตรได้รับความเสียหายเนื่องจากพืชชะงักการเจริญเติบโต (นันทยา, 2550)

โปรตีนทนร้อน

โปรตีนทนร้อน (heat shock protein) เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะพบมากเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Sanmiya et al., 2004) โดยจัดเป็นโปรตีนตอบสนองต่อความเครียด (stress protein) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตจะมีการสังเคราะห์โปรตีนทนร้อนเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่มีอนุมูลอิสระ การขาดอาหาร รังสี สารเคมี หรือไวรัส เป็นต้น (Mehta et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนโปรตีนทนร้อนจะมีการแสดงออกมากในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ อีก เช่น อุณหภูมิที่สูงขึ้นหรืออุณหภูมิที่ลดลง เป็นต้น ซึ่งสภาวะที่ไม่เหมาะสมเหล่านี้จะไปมีผลต่อการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนในสิ่งมีชีวิต (Mahroof et al., 2005)

โปรตีนทนร้อน เป็นโปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้งในแบคทีเรีย พืช และสัตว์ มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียด (Sorensen et al., 2003) เมื่อต้องอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอตจะมีการสังเคราะห์โปรตีนทนร้อนออกมาเป็นจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่ที่พบคือโปรตีนทนร้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน เช่น HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 ซึ่งเป็นโปรตีนมีขนาด 60, 70, 90 และ 100 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับและ โปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (small heat shock protein; sHSPs) ที่มีขนาดประมาณ 15-30 กิโลดาลตัน ในพืชชั้นสูงมักพบ โปรตีน sHSPs เป็นจำนวนมากเมื่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งโปรตีน sHSPs ส่วนมากที่พบนี้จะเป็นกลุ่มของโปรตีนทนร้อนขนาดประมาณ 20 กิโล

ดาลตัน (HSP20) (Lee et al., 2000) โดยจะพบได้ทั่วไปในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น พบในไซโทพลาสซึม นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย คลอโรพลาสต์ และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม, (Sanmiya et al., 2004) นอกจากโปรตีนทนร้อนจะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมแล้ว ยังทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน ป้องกันการตายของเซลล์ ตลอดจนป้องกันการทำลายเมมเบรนของเซลล์ (Sreedhar et al., 2004)

1. การแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนในพืช

การศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนในพืช (heat shock protein) นักวิจัยส่วนใหญ่จะให้ความสำคัญในการศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนในพืชที่ปลูกในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น สภาวะ heat stress หรือสภาวะ oxidative stress มีการศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*sHsps*) ของข้าวในสภาวะ heat stress ที่อุณหภูมิ 25, 39, 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีน *sHsps* ด้วยเทคนิค Northern blot พบการแสดงออกของยีน *sHsps* เฉพาะที่อุณหภูมิ 39, 42 และ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *sHsps* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีการแสดงออกของยีน *sHsps* มากที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *sHsps* โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างกันคือ 0, 5, 10, 20, 30, 60,120 และ 180 นาที พบว่ายีน *sHsps* เริ่มมีการแสดงออกเมื่อเวลา 20 นาที การแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยยีน *sHsps* มีการแสดงออกสูงที่สุดที่เวลา 120 นาที และลดลงในเวลา 180 นาที จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *sHsps* ในใบ ลำต้น และรากของข้าวในสภาวะ heat stress ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *sHsp* มากในใบและรากตามลำดับแต่มีการแสดงออกน้อยในลำต้น (Lee et al., 2000)

การแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนมีความสัมพันธ์ทั้งกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาในการได้รับสภาวะเครียด ซึ่งจากการศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อน 3 ชนิดคือ *Hsp70*, *Hsp26.6* และ *Hsp17* ในข้าวสาลี ที่อุณหภูมิ 23, 30, 33, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่ายีน *Hsp70* มีการแสดงออกในทุกอุณหภูมิ โดยที่การแสดงออกของยีนจะแปรผันตามการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป ในขณะที่ยีน *Hsp26.6* จะแสดงออกที่อุณหภูมิ 33-40 องศาเซลเซียส โดยการแสดงออกของยีน *Hsp26.6* จะแปรผันตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และยีน *Hsp17* แสดงออกที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งการแสดงออกของยีน *Hsp17* แปรผันตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (Treglia et al., 1999) เมื่อพืชได้รับอุณหภูมิสูงหรืออยู่ในสภาวะ heat stress เป็นระยะเวลานานจะมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ได้มีศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนในหญ้า (*Dichanthelium lanuginosum*) โดยทำการทดลอง 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ทำการทดลอง short-term

heat treatment ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชุดที่ 2 ทำการทดลอง long-term heat treatment เป็นเวลา 0, 3, 4, 6, 8, 13 และ 17 วัน โดยที่ 3 วันแรกใช้อุณหภูมิ 42±1 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 22±3 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลองในชุดที่ 1 ทำเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนจำนวน 3 ชนิดคือ small cytoplasmic class I HSPs (*sHsp*), *Hsp70* และ *Hsp101* ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อน *sHsp* และ *Hsp101* มีการแสดงออกมากกว่ายีน *Hsp70* ส่วนการทดลองในชุดที่ 2 เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อน 2 ชนิด คือ small cytoplasmic class I HSPs (*sHsp*) และ *Hsp101* พบว่ายีน *sHsp* และ *Hsp101* มีการแสดงออกมากในช่วง 5-7 วัน และยังคงมีการแสดงออกของยีน *Hsp101* มากในช่วง 8-10 วัน แล้วค่อยๆ ลดลงในช่วง 13-17 วันส่วนการแสดงออกของยีน *sHsp* จะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ในช่วง 8-17 วัน (Thamir and Richard, 2002)

การศึกษายีน *OsHsp 16.9* ซึ่งเป็นยีนโปรตีนทนร้อนที่มีขนาดเล็ก class I ในข้าว (Young et al., 1999) โดยศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของบริเวณปลายอะมิโนซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic N-terminal region) ของโปรตีน OsHsp16.9 ด้วยการสร้างยีนที่ส่วนปลายอะมิโนขาดหายไป และใส่เข้าไปใน *E. coli* สร้างเป็นโปรตีน N-turncated OsHsp16.9 พบว่าสามารถสร้าง complex ได้เช่นเดียวกับโคลนที่มียีน *OsHsp16.9* ปกติ (OsHsp16.9) แต่ไม่สามารถรักษาสภาพของโปรตีนจากความร้อนเมื่อได้รับความร้อนสูง และพบการจับกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific interaction) ของโปรตีนในเซลล์ *E. coli* จะเกิดขึ้นกับ OsHsp16.9 ปกติเท่านั้น ไม่พบการจับกับ N-turncated OsHsp16.9 ที่ขาดปลายอะมิโน การขาดปลายอะมิโนของโปรตีนนี้จึงมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการเป็นโปรตีน chaperone โดยที่บริเวณปลายอะมิโนมีลำดับกรดอะมิโนเป็น VFDPF ซึ่งกรดอะมิโน phenylalanine กระจุกอยู่ ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็นโปรตีน chaperone ซึ่งจะเสียไปถ้าขาดปลายอะมิโนนี้ (Young et al., 1999)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *OsHsp90* ของข้าวในเซลล์แบคทีเรียเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 42, 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าโปรตีน OsHsp90 สามารถป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนของแบคทีเรียได้เมื่อให้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส และสามารถป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนได้เพียงบางส่วนเมื่อให้ความร้อนที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส โดยทำหน้าที่เป็นโปรตีน chaperone โดยไปจับกับโปรตีนต่างๆ และช่วยให้เซลล์ *E. coli* สามารถเจริญต่อไปได้ในที่อุณหภูมิสูง (Lui et.al., 2008)

นอกจากนี้นักวิจัยได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนในยาสูบ พบว่ามีการแสดงออกของยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็กของไมโทคอนเดรียในชุดทดลองที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่ไม่แสดงออกในชุดควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Sanmiya et al., 2004)

2. การศึกษาโปรตีนทนร้อนขนาดเล็กของพืชในแบคทีเรีย

เนื่องมาจากการสกัดและการแยกบริสุทธิ์ (purified) โปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (low-molecular-mass heat shock proteins; LMM HSPs) ทำได้ยาก จึงมีการสร้างโปรตีนทนร้อน (HSP) ด้วยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี โดยทำการนำ cDNA ของ HSP class I ขนาด 16.9 กิโลดาลตัน ที่เรียกว่า *pTS1* ของข้าวมารวมกันกับยีน *glutathione S-transferase* (*gst*) ของ *Schistosoma japonicum* ทำให้ได้ยีนโปรตีนลูกผสม (fusion gene) สำหรับสร้างโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แล้วทำการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์ *E. coli* เพื่อสร้างโปรตีนลูกผสม หลังจากตัดโปรตีนทนร้อนขนาด 16.9 กิโลดาลตันออกจากโปรตีน GST พบว่าโปรตีนทนร้อนขนาด 16.9 กิโลดาลตัน สามารถจับกันเป็นโปรตีนขนาดประมาณ 310 กิโลดาลตัน เมื่อนำไปทดสอบให้ความร้อนในหลอดทดลองพบว่าโปรตีนที่สร้างได้นี้ (recombinant HSP) สามารถป้องกันการเสียสภาพจากความร้อนของโปรตีนได้ดี (Yeh et al., 1995)

การแสดงออกของยีนที่มีรหัสของ *Oshsp16.9* ในพลาสมิด pGEX-2T ที่มียีน *gst* โดยการนำดีเอ็นเอสายผสมของ *Oshsp16.9* class I (low-molecular-mass; LMM HSP) จากข้าวถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* เพื่อศึกษาการทำหน้าที่ของ LMM HSP นี้ในสภาวะ heat stress เนื่องจากปกติแล้วเซลล์ *E. coli* จะไม่สามารถสร้าง class I LMM HSPs ได้ จึงทำการเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเซลล์ *E. coli* ที่สร้างโปรตีนลูกผสม Oshsp16.9 (pGST-FL cell) กับตัวควบคุมคือเซลล์ *E. coli* ที่ถ่ายฝากพลาสมิด pGEX-2T (pGST cells) ที่ชักนำให้แสดงออกเป็นโปรตีนด้วยสาร isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) จากการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ *E. coli* แต่ละกลุ่มภายใต้สภาวะ heat-shock (HS) พบว่าเซลล์ pGST-FL ที่มีโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ของ Oshsp16.9 kDa แสดงให้เห็นถึงการทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 47.5 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ pGST ไม่ทนต่ออุณหภูมินี้ จากนั้นนำเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มไปทำให้เซลล์แตกแล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ pGST-FL มีการเสียสภาพน้อยกว่าโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ pGST ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับ pGST-FL ในเซลล์ pGST-N78 ที่เป็นเซลล์ที่สร้างโปรตีนลูกผสมที่มีเพียง 78 กรดอะมิโนที่บริเวณส่วนปลาย N ของโปรตีน OsHsp16.9 แต่ไม่ให้ผลต่อเซลล์ pGST-C108 ที่เป็นเซลล์ที่ผลิตโปรตีนลูกผสมที่มีบริเวณปลาย C ของโปรตีน OsHsp16.9 จำนวน 108 กรดอะมิโน ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงของเซลล์ pGST-FL พบว่าเซลล์ *E. coli* มีการสร้าง HSPs 3 กลุ่ม คือ โปรตีนที่มีขนาด 76, 73 และ 64 กิโลดาลตัน ที่ทำให้โปรตีนทนต่ออุณหภูมิสูงได้ที่ 47.5 องศาเซลเซียส ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อถ่ายฝาก

class I LMM HSP ของพืชเข้าไปในเซลล์โปรคาริโอตที่พบว่า class I LMM HSP ส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการทำให้โปรคาริโอตทนต่ออุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้น (Yeh et al., 1997)

การศึกษาโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (small heat-shock protein) (sHSP) ที่ทำหน้าที่เป็น molecular chaperone ของเกาลัด (*Castanea sativa*) ที่ให้ชื่อเป็น CsHSP17.5 จัดอยู่ใน cytosolic class I เมื่อโปรตีนสายผสม CsHSP17.5 จะถูกแสดงออกใน *E. coli* เพื่อศึกษาการทำหน้าที่ภายใต้สภาวะเครียด (stress conditions) พบว่าเมื่อเซลล์ *E. coli* ได้รับความร้อน 37-50 องศาเซลเซียส เซลล์ที่มี CsHSP17.5 จะมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม (*E. coli*) จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าการป้องกันผลกระทบจากความร้อนเกิดจากความสามารถของโปรตีน sHSP เพื่อรักษาสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ (soluble cytosolic proteins) ให้อยู่ในรูปของ native conformation เมื่อทำการตรวจสอบสมมติฐานว่า sHSPs อาจมีส่วนในการป้องกันเซลล์จากสภาวะ cold stress โดยศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์ที่มีโปรตีน CsHSP17.5 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่อุณหภูมินี้อย่างมีนัยยะสำคัญ ดังนั้น CsHSP17.5 จึงเป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันเซลล์จากความร้อนและหนาว ซึ่งสอดคล้องกับการชักนำการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อพืชจากต้นเกาลัดในสภาวะ thermal stress (Soto et al., 1999)

การศึกษาโปรตีน small HSP class I ขนาด 16.9 กิโลดาลตัน (OsHSP16.9) ของข้าวที่แสดงออกใน *E. coli* พบว่าแบคทีเรียที่มีโปรตีน OsHSP16.9 สามารถทนต่ออุณหภูมิ 47.5 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 ชั่วโมง และพบบริเวณสำคัญของโปรตีนทางด้านปลายอะมิโน (กรดอะมิโนที่ 1-78) เป็นบริเวณที่จำเป็นในการทนต่ออุณหภูมิสูง (Young et al., 1999) ซึ่งต่อมาได้สร้างโปรตีนสายผสมที่มีการขาดหายไปของโปรตีน OsHSP16.9 บริเวณต่างๆ ซึ่งพบว่าการขาดหายไปของกรดอะมิโนที่ 30-36 (PATSDND) และกรดอะมิโนที่ 73-78 (EEGNVL) ทำให้การรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 47.5 องศาเซลเซียสของ *E. coli* ลดลง จึงได้รายงานบริเวณภายในโปรตีนด้านอะมิโนที่ทำให้เซลล์ทนต่ออุณหภูมิสูงจำนวน 2 โดเมนท์ (domain) คือ โดเมนท์ PATSDND (กรดอะมิโนที่ 30-36) และโดเมนท์ EEGNVL (กรดอะมิโนที่ 73-78) ที่สามารถทำให้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ นอกจากนี้จากการกลายพันธุ์พบว่ากรดอะมิโนที่ 73 และ 74 เป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่จับกับโปรตีนเกิดการ oligomerization (Yeh et al., 2002)

การศึกษาโปรตีนทนร้อนขนาดเล็กจากแครอท (DcHSP17.7) ที่มีการแสดงออกใน *E. coli* เพื่อตรวจสอบกลไกการทำงานภายใต้สภาวะ heat stress ซึ่งเมื่อเซลล์ที่มีการแสดงออกของ DcHSP17.7 ได้รับความร้อน 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงพบว่ามีจำนวนเซลล์มากกว่าชุดควบคุม (*E. coli*) เป็น 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ (soluble proteins) พบว่า เซลล์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน *DcHSP17.7* มีการแสดงออกของโปรตีนที่ละลายน้ำมากกว่าชุด

ควบคุมเกิน 2 เท่า ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าโปรตีน DcHSP17.7 ทำหน้าที่เป็น molecular chaperone สำหรับป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนเนื่องมาจากความร้อน จากผลการทำ Native-PAGE แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์ได้รับ IPTG แล้ว DcHSP17.7 จะอยู่ในรูปของ oligomeric complex ขนาด 300 กิโลดาลตัน ในเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนอย่างไรก็ตาม complex นี้หายไปหลังจากเซลล์ของแบคทีเรียอยู่ในภาวะ heat stress ซึ่งในแครอทพบว่ามีโปรตีน DcHSP17.7 ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ oligomeric complex ขนาด 300 กิโลดาลตัน ที่พบในเซลล์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน แต่จะพบเฉพาะที่อุณหภูมิ 40.8 องศาเซลเซียส เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การจัดระเบียบโครงสร้างเพื่อทำหน้าที่ของโปรตีน DcHSP17.7 ในเซลล์ *E. coli* อาจมีความแตกต่างจากการจัดระเบียบโครงสร้างของโปรตีน DcHSP17.7 ในแครอท (Kim et al., 2009)

การศึกษาบริเวณรหัสของยีน *sHSP* 18.0 kDa class II (Oshsp18.0-CII) ซึ่งแยกได้จากข้าว เพื่อศึกษาการทำงานของ *sHSP* class II ของข้าวด้วยการถ่ายฝาก *(Oshsp18.0*-CII) เข้าสู่เซลล์ *E. coli* พบว่าโปรตีนลูกผสม Oshsp18.0-CII ทำให้เซลล์ *E. coli* มีการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สูงกว่าชุดควบคุม (*E. coli*) เกือบ 1,000 เท่า นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของโปรตีนลูกผสม Oshsp18.0-CII ใน *E. coli* ทำให้เซลล์ *E. coli* ทนต่อรังสี ultraviolet (UV) ซึ่งหลังจากได้รับรังสี UV 1700 ไมโครจูล (μJ) แล้วพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่มีโปรตีนลูกผสม Oshsp18.0-CII มากกว่าเซลล์ควบคุม 7.29 เท่า (Chang et al., 2012)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างพืช

ใบอ่อนของข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 น้ำรู กู้เมืองหลวง และพลายงามปราจีนบุรี

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (Merck)
2. ชุดสำเร็จรูป pGEM-T Easy kit (Promega, USA)
3. ชุดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA)
4. สีย้อมดีเอ็นเอ SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)
5. อะกาโรส (agarose)
6. แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และ BL21 pLysS
7. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I
8. อาหารเลี้ยงแบคทีเรียเหลว LB และอาหารแข็ง LB
9. บัฟเฟอร์ 1X TBE
10. คลอโรฟอร์ม
11. เอทานอลบริสุทธิ์
12. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
13. สารละลาย lysis buffer (5 mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.25% w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05 w/v bromophenol blue)
14. เอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
15. กรดอะซิตริก
16. Cetyltrimethylammoniumbromind (CTAB) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
17. สารละลาย 3 M sodium acetate pH 5.2
18. สารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
19. สารละลาย 1.2 M NaCl

20. สาร X-gal (Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

21. สาร IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

22. สารละลาย acrylamide/bis

23. น้ำกลั่น

24. สารละลาย 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

25. สารละลาย 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

26. สารละลาย 10% (w/v) SDS

27. สารละลาย 10% ammonium persulfate

28. Tetramethylethyledoamine (TEMED)

29. เมทานอล

30. สี coomassie brilliant blue

31. หลอดขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

32. หลอดพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร

33. ไมโครปิเปตและทิป

34. จานแก้วเพาะเชื้อ

35. ขวดรูปชมพู่ขนาดต่างๆ

36. เครื่อง Thermal Cycler ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T100

37. เครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสแนวนอนและแนวตั้ง

38. เครื่องปั่นเหวี่ยง

39. ตู้เลี้ยงเชื้อ

40. อ่างน้ำร้อนแบบควบคุมอุณหภูมิ

41. เครื่อง vortex

42. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

43. ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

44. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

วิธีการทดลอง

1. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำใบข้าวใส่ไนโกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลว จากนั้นบดใบข้าวให้ละเอียด

2. เติมสารละลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือปรับปริมาตรตามความเหมาะสมของปริมาณใบที่บดได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที

4. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

5. ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนมา จากนั้นเติมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อยเป็นเวลา 30 นาที

6. เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB แล้วทำการ vortex เล็กน้อย

7. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

8. ย้ายชั้นน้ำด้านบนใส่ในหลอดใหม่ (ทำซ้ำในข้อที่ 6-7 จนกระทั่งชั้นของโปรตีนเหลือน้อยที่สุด) ซึ่งการทำซ้ำที่ 2 ปริมาตรของคลอโรฟอร์มที่ใช้จะเท่ากับปริมาตรของชั้นน้ำด้านบนที่ย้ายใส่หลอด

9. เติม 3 โมล่าร์ sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติมเอทานอลบริสุทธิ์เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน

10. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

11. เทเอทานอลทิ้ง แล้วเติมเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน จำนวน 2 ครั้ง)

12. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา2นาที

13. ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอกลับด้วย 10 มิลลิโมล่าร์ Tris-HCl, pH8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติม 10 มิลลิโมล่าร์ Tris-HCl เพิ่มเป็น 50-100 ไมโครลิตร)

14. วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการทำ 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 90 นาที

2. การโคลนยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก

2.1 การเพิ่มปริมาณยีน *sHsp* ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ คือ Hsp1F (5′- TACCATATGTCGCTGATCCGCCGC-3′) และHsp1R (5′-CCTCATATGCTAGCCGGTAACCTGGATG-3′) ที่จำเพาะกับยีน *Hsp* โดยออกแบบจากลำดับเบสของยีน *Hsp* ของข้าวกลุ่มอินดิกา พันธุ์ Pei′ai ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (accession number FJ383169) และเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ไว้ที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ คือ 5′-CATATG-3′ (สมหญิง, 2553) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

การเตรียมปฏิกิริยา PCR

- ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2.00	ไมโครลิตร
- บัฟเฟอร์สำเร็จรูป GeNei™ Red Dye PCR Master Mix	12.50	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ HspF ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1.25	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ HspR ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	1.25	ไมโครลิตร
- น้ำกลั่น	8.00	ไมโครลิตร
รวม	25.00	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง Thermal Cycler โดยใช้เวลาและอุณหภูมิ ดังนี้

ขั้นที่ 1 95 องศาเซลเซียส 5.00 นาที

ขั้นที่ 2 95 องศาเซลเซียส 0.45 นาที (สำหรับ denature)

54 องศาเซลเซียส 0.45นาที (สำหรับ annealing)

72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที (สำหรับ primer extension)

ทำซ้ำ 35 รอบ

ขั้นที่ 3 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

จากนั้นนำผลของ PCR มาวิเคราะห์ด้วยการทำ 1% อะกาโรส เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ที่มีการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBr® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)

2.2 การแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอจากเจล

นำผลจากข้อ 2.1 มาตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจล PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

2.2.1 ชั่งน้ำหนักเจลที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเติมสารละลาย L3 ลงไป 3 เท่าของปริมาตรน้ำหนักเจล โดยเจล100 มิลลิกรัมเทียบเป็น 100 ไมโครลิตร

2.2.2 นำหลอดไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดไปมา ทุก 5 นาที จนเจลละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่คอลัมน์ ปั่นเหวี่ยง 1 นาที ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีแล้วเทส่วนใสทิ้ง

2.2.3 เติม Wash buffer (W1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรปั่นเหวี่ยง 1 นาที ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เท W1 ทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงคอลัมน์อีก 3 นาที

2.2.4 เมื่อคอลัมน์แห้งแล้วให้ย้ายลงหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution buffer (E5) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ปั่นเหวี่ยง 1 นาที ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที

2.2.5 นำดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิสที่มีการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBr® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การสร้างดีเอ็นเอสายผสม

การสร้างดีเอ็นเอสายผสม จะใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM-T Easy (Promega,USA) โดยเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

2X Rapid Ligation buffer	5.0	ไมโครลิตร
pGEM-T Easy Vector (50 นาโนกรัม)	0.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์	3.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ T4 DNA ligase	1.0	ไมโครลิตร
รวม	10.0	ไมโครลิตร

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.4 การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย *E.coli* DH5α

2.4.1 นำเชื้อ *E. coli* DH5α จากตู้ -80 องศาเซลเซียส มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยเทคนิค cross-streak บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

2.4.2 เตรียมเชื้อ starter โดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5α มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.4.3 จากนั้นนำเชื้อ starter ปริมาตร 1มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2-0.5

2.4.4 เทเชื้อทั้งหมดในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.4.5 เทอาหารออกให้หมด จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ (เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ อีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที

2.4.6 ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งทั้งหมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ (เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม 80% glycerol (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -80องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.5 การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21pLysS

2.5.1 นำเชื้อ *E. coli* BL21 pLysS จากตู้ -80 องศาเซลเซียส มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยเทคนิค cross-streak บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

2.5.2 เตรียมเชื้อ starter โดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21 pLysS มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.5.3 จากนั้นนำเชื้อ starter ปริมาตร 1มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2-0.5

2.5.4 เทเชื้อทั้งหมดในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตรปั่นเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

2.5.5 เทอาหารออกให้หมด จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ (เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง จากนั้นเติมสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ อีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นบ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที

2.5.6 ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งทั้งหมด ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย 50 mM $CaCl_2$ (เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม 80% glycerol (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมด้วยการปิเปต จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดละ 200 ไมโครลิตรเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2.6 การถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α

2.6.1 ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α โดยเติมดีเอ็นเอสายผสมที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีเซลล์ competent ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (บ่มไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที) นำอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ออกมาจากตู้เย็น เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง แล้ว spread ด้วยสาร X-gal และ IPTG ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

2.6.2 เมื่อบ่มหลอดบนน้ำแข็งจนครบเวลาแล้ว ย้ายหลอดไปบ่มในอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที

2.6.3 จากนั้นนำเซลล์มา spread บนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เห็นสีของโคโลนีชัดเจนมากขึ้น โดยโคโลนีสีขาวเป็นโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม

2.7 การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดของดีเอ็นเอ

ในการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม มีขั้นตอนดังนี้

2.7.1 นำโคโลนีสีฟ้า (ตัวควบคุม) และโคโลนีสีขาวที่ต้องการคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.7.2 ดูดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทอาหารทิ้ง

2.7.3 เติมสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5นาที

2.7.4 ดูดของเหลวด้านบน 20 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์ขนาดด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใส่โคโลนีสีฟ้าในช่องแรกและช่องสุดท้ายของเจล จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่าโคโลนีสีฟ้ามาสกัดพลาสมิดสายผสม เนื่องจากดีเอ็นเอสายผสมจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า

2.8 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธีการ CTAB mini plasmid preparation

การสกัดพลาสมิดมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.8.1 ดูดเชื้อที่ทำการการคัดเลือกจากข้อ 2.7 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทอาหารทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.8.2 เติมสารละลาย STET buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

2.8.3 นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเอาตะกอนออก แล้วเติมสารละลาย 5% CTAB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมให้เข้ากัน

2.8.4 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 1.2 M NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.8.5 เมื่อครบเวลาแล้ว เติมคลอโรฟอร์ม 1 ปริมาตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

2.8.6 จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดใหม่ ทิ้งหลอดเก่า เติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 2 ปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.8.7 นำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด เติมเอทานอล ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไป

ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างตะกอนดีเอ็นเอ

2.8.8 วางหลอดทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส ที่มีการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBr® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA)

2.9 การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

การวิเคราะห์จะใช้การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ซึ่งมีการเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

น้ำกลั่น	14	ไมโครลิตร
10X NEB buffer No.4	2	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ	2	ไมโครลิตร
รวม	20	ไมโครลิตร

นำปฏิกิริยาทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้ววิเคราะห์ผลการตัดด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส แล้วคัดเลือกพลาสมิดที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ตัดแล้วให้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ที่แยกบริสุทธิ์ได้ คือมีขนาดประมาณ 500 คู่เบส

2.10 การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ส่งดีเอ็นเอสายผสมไปหาลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) นำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้มาตัดลำดับเบสที่เป็นของ pGEM-T Easy ออก แล้วบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .txt ด้วยโปรแกรม notepad จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไป blast กับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank นำลำดับเบสไปเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalX แล้วบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .msf แล้วนำไฟล์ไปเปิดดูผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม GenDoc

3. การสร้างชุดยีนเพื่อการแสดงออกเป็นโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

3.1 การเตรียมชิ้นยีน *Hsp* ที่ต้องการสร้างชุดของยีน

นำดีเอ็นเอของโคลนที่ตรวจสอบลำดับเบสจากการโคลนยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*sHsp*) ของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I (NEB Biolab) เพื่อให้ชิ้นยีนหลุดออกจาก pGEM-T easy เพื่อใช้เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pET3a โดยให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร โดยเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

น้ำกลั่น	6	ไมโครลิตร
10X NEB buffer No.4	2	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ	2	ไมโครลิตร
รวม	20	ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Nde*I แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส เพื่อตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอ และเมื่อพบแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส จึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอ แล้วนำมาแยกบริสุทธิ์เจล ตามขั้นตอนข้อ 2.2 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจของยีน *sHsp*

3.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ pET3a

3.2.1 นำ glycerol stock ของ pET3a มา streak บนอาหาร LB ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.2.2 นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร LB เหลว ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.2.3 นำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธีการ CTAB mini plasmid preparation ตามข้อ 2.8 จากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส

3.2.4 ตัดพลาสมิด pET3a ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I เพื่อนำไปใช้สำหรับเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอของยีน *sHsp* ที่ตัดมาจากดีเอ็นเอพาหะ pGEMT Easy โดยมีปฏิกิริยาการตัดดังนี้

น้ำกลั่น	140	ไมโครลิตร
10X NEB Buffer No.4	40	ไมโครลิตร
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I	20	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอ pET3a	200	ไมโครลิตร
รวม	400	ไมโครลิตร

3.2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจากนั้น ตรวจสอบการตัดพลาสมิด ด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส

3.2.6 ทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอพาหะ pET3 ที่ตัดได้ด้วย PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) ตามข้อ 2.2 ตรวจสอบความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส

3.3 การเชื่อมยีน *sHsp* กับดีเอ็นเอพาหะ pET3a

การสร้างดีเอ็นเอสายผสม เตรียมปฏิกิริยาดังนี้

10X Rapid Ligation buffer	1.0	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอพาหะ pET3a	3.0	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอของยีน *sHsp* ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์	5.5	ไมโครลิตร
เอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB Biolab)	0.5	ไมโครลิตร
รวม	10.0	ไมโครลิตร

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.4 การทำถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α

3.4.1 นำดีเอ็นเอสายผสมถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α ตามขั้นตอนในข้อ 2.6

3.4.2 สุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ข้ามคืน จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดของดีเอ็นเอ ตามข้อ 2.7

3.4.3 ทำการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ตามขั้นตอนในข้อ 2.8

3.5 การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

วิเคราะห์พลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* โดยใช้ปฏิกิริยาเดียวกันกับข้อ 1.9 คัดเลือกโคลนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วมีแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย

3.6 การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

นำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากบริษัท 1st BASE (Malaysia) มาตัดลำดับเบสที่เป็นของ pET3a ออก แล้วบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .txt ด้วยโปรแกรม notepad จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไป blast กับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank เพื่อตรวจสอบดูว่าลำดับเบสที่ได้เป็นยีน *sHsp* หรือไม่ นำลำดับเบสที่ blast เรียบร้อยแล้วมาแปลรหัสเป็นโปรตีนโดยใช้โปรแกรม BioEdit เปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalX แล้วบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .msf จากนั้นนำไฟล์ไปเปิดดูผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม GenDoc

3.7 การย้ายเซลล์เจ้าบ้าน

คัดเลือกโคลนที่ผ่านการวิเคราะห์จากข้อ 3.6 มาถ่ายฝากเข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS ตามขั้นตอนของข้อ 2.6 แต่เปลี่ยนจากอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมฟินิคอลความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมของดีเอ็นเอพาหะ pET3a

4. การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มียีน *sHsp*

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.7 มาศึกษาการเจริญเติบโต โดยการนำมาขีดเชื้อ (streak) บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 30 นาที เมื่อเชื้อมีความขุ่นเท่ากับ 0.6 แบ่งเซลล์เป็น 2 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 วัดความขุ่นต่อไปทุกๆ 30 นาที กลุ่มที่ 2 ให้เติมสาร IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ วัดความขุ่นต่อไปทุก 30 นาที จนครบเวลา 12 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ครั้ง

5. การชักนำการแสดงออกของโปรตีน sHsp ในแบคทีเรีย *E. coli*

นำเชื้อที่ได้จากข้อ 3.7 มาเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) ด้วยการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นใช้เชื้อเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร เลี้ยงให้อาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 เติมสาร IPTG เพื่อชักนำให้สร้างโปรตีน เลี้ยงต่อไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้ววัดความขุ่นของเชื้อที่ได้ จากนั้นเก็บเซลล์ที่ได้ในปริมาณ 1 OD ด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนอาหารทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์ เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

6. เทคนิค SDS-PAGE

เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบโปรตีน ด้วยการแยกตามขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้า มีขั้นตอนดังนี้

6.1 วิธีการเตรียมเจล

6.1.1 ประกอบกระจกเข้ากับชุดเตรียมเจล (casting frames)

6.1.2 เตรียม separating gel ที่มีส่วนประกอบดังตารางที่ 1 ลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ซึ่งแผ่นกระจกจะต้องเช็ดให้สะอาดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปรับผิวหน้าเจลให้เรียบด้วยน้ำกลั่น เมื่อ separating gel แข็งตัวให้เทน้ำกลั่นที่ผิวหน้าเจลทิ้ง จากนั้นเตรียม stacking gel ทับด้านบน พร้อมกับเสียบหวีเพื่อให้เกิดหลุม

6.1.3 เมื่อ stacking gel แข็งตัว ให้ดึงหวีออก แล้วใช้น้ำกลั่นฉีดไล่เศษเจลในหลุมที่ใส่ตัวอย่าง จากนั้นแกะแผ่นกระจกออกมาประกอบเข้ากับชุดทำ SDS-PAGE ที่ประกอบด้วย casting stand และ casting chamber

6.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างโปรตีน

เติม 5x sample buffer ลงไปในเซลล์ตัวอย่างด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยตะกอนเซลล์ 200 ไมโครลิตร จะใส่ 5X sample buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex นำตัวอย่างไปต้มเป็นเวลา 30 วินาทีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6.3 การให้กระแสไฟฟ้า

นำชุด SDS-PAGE มาใส่ glycine buffer ให้ท่วมเจล จากนั้นใส่ตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วลงในหลุม โดยใช้ส่วนใสที่ได้จากข้อ 6.2 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร และใช้โปรตีนมาตรฐานคือ unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาแล้วจึงแกะเจลออกจากแผ่นกระจก

6.4 วิธีการย้อมเจล

นำเจลไปย้อมในสีย้อม (staining solution) ประกอบด้วย coomassie brilliant blue จนกว่าจะมองเห็นแถบโปรตีนใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาล้างสีย้อมออกด้วย destaining solution (20 เปอร์เซ็นต์เมทานอล และ 10 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ล้างแผ่นเจลจนกว่าแผ่นเจลจะใสและเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จากนั้นนำแผ่นเจลไปตากให้แห้ง เพื่อทำการถ่ายภาพและบันทึกข้อมูล

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ Separating Gel และ Stacking Gel

สารเคมี	Separating Gel	Stacking Gel
Monomer Concentration	15 เปอร์เซ็นต์	4.0 เปอร์เซ็นต์
Acrylamide/bis	3.75 มิลลิลิตร	0.3 มิลลิลิตร
Distilled water	3.572 มิลลิลิตร	1.903 มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 มิลลิลิตร	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	742 ไมโครลิตร
10% (w/v) SDS	125 ไมโครลิตร	30 ไมโครลิตร
10% ammonium persulfate	50 ไมโครลิตร	23 ไมโครลิตร
TEMED	3.3 ไมโครลิตร	17 ไมโครลิตร
Total	10 มิลลิลิตร	5 มิลลิลิตร

7. การทดสอบการรอดชีวิตต่ออุณหภูมิสูง

นำเชื้อที่ชักนำให้แสดงออกและเพาะเลี้ยงครบ 2 ชั่วโมงหลังจากเติมสาร IPTG เช่นเดียวกับการชักนำการแสดงออกของโปรตีน sHsp ในแบคทีเรีย (ข้อ 5) มาเจือจางให้เป็น $1x10^{9}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และคลอแรมฟินิคอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร เท่ากับ 1 OD มีจำนวนเซลล์เป็น $7x10^{11}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งเซลล์ที่เจือจาง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร ไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 47,52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเซลล์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทุก 20 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อที่เก็บได้ไปเจือจางแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่ได้ซึ่งแสดงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ทำการทดลอง 3 ครั้ง

สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

1. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล อาคารจุฬาภรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

2. ระยะเวลาการทำวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ใช้ระยะเวลา 2 ปี โดยเริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง

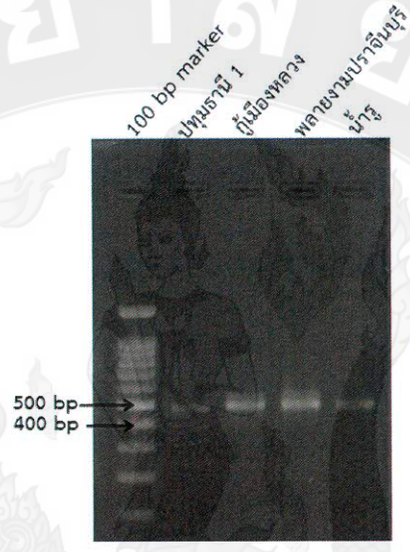
การโคลนยีน โปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก

1. การเพิ่มปริมาณยีน *sHSPs* ด้วยเทคนิค PCR

เนื่องจากยีน *sHsp* ของข้าวเป็นยีนที่ไม่มีอินทรอน (intronless gene) ในการทดลองนี้จึงใช้การเพิ่มจำนวนของยีน *sHsp* จากดีเอ็นเอในจีโนม (genomic DNA) ด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณรหัสของยีน *Hsp1* ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณยีน *sHsp* ด้วยเทคนิค PCR ของข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ น้ำรู กู้เมืองหลวง พลายงามปราจีนบุรี และปทุมธานี 1 พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่คาดหวัง (ภาพที่ 9) แสดงว่า ไพรเมอร์ Hsp1F และ Hsp1R ที่ออกแบบนั้นสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ที่คาดว่าจะเป็นยีน *sHsp* ได้

ภาพที่ 9 ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซีส ของผลผลิตจากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ Hsp1F และ Hsp1R โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA) และช่องที่ 1-4 คือ ผลผลิตที่ได้จากดีเอ็นเอในจีโนมของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กู้เมืองหลวง พลายงามปราจีนบุรี และน้ำรู ตามลำดับ

เมื่อนำแถบผลผลิตจากการทำ PCR มาแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) พบว่า สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากผลผลิตจากการทำ PCR ที่ได้จากดีเอ็นเอในจีโนมของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ (ดังภาพที่ 10) ซึ่งดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้จะใช้ในการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy เพื่อสร้างเป็นดีเอ็นเอสายผสม



ภาพที่ 10 ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอริซีสของดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กู้เมืองหลวง พลายงามปราจีนบุรี และน้ำรู

2. การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดของดีเอ็นเอ

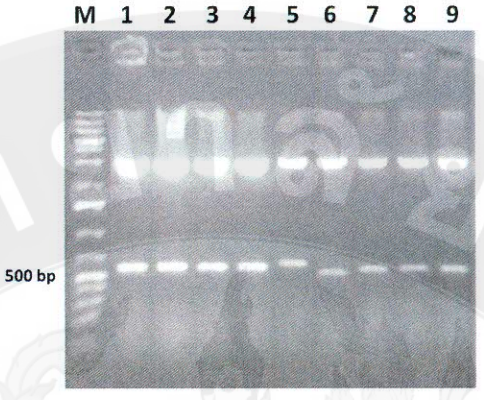
ผลการนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะของ pGEM-T Easy มาถ่ายฝากเข้าเซลล์ *E. coli* DH5α เพื่อคัดเลือกด้วยอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร IPTG และ X-gal พบว่าได้โคโลนีทั้งสีฟ้าและสีขาว คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ที่ได้มาคัดเลือกโคลนที่คาดว่าเป็นดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาดโดยใช้ lysis buffer แล้ววิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของโคโลนีสีฟ้าในช่องแรกและช่องสุดท้ายของเจลเป็นตัวควบคุม จากนั้นคัดเลือกดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของโคโลนีสีขาวที่มีดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้ากว่าโคโลนีสีฟ้ามาสกัดพลาสมิด เนื่องจากดีเอ็นเอสายผสมจะมีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอพาหะจึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า ตัวอย่างผลการคัดเลือกด้วยขนาดของโคโลนีสีขาวที่ได้จากดีเอ็นเอสายผสมของชิ้นดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงโคโลนีที่ 1-11 (ภาพที่

11) โดยดีเอ็นเอที่ได้จากโคโลนีที่ 6 และ 7 ที่เคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้าในเลนที่ 6 และ 7 จะถูกคัดทิ้งส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากโคโลนีที่ 2, 4 และ 10 เคลื่อนที่ได้เท่ากับดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า และดีเอ็นเอที่ได้จากโคโลนีที่ 1, 3, 5, 8, 9 และ 11 เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโคโลนีสีฟ้า แสดงว่าดีเอ็นเอของโคโลนีเหล่านี้เป็นดีเอ็นเอสายผสมเนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า

ภาพที่ 11 ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอริซีส ของการคัดเลือกโคลนด้วยขนาดจากโคโลนีสีขาวที่ได้จากดีเอ็นเอสายผสมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงโคโลนีที่ 1-11ตามลำดับ โดยมีดีเอ็นเอของโคโลนีสีฟ้า (B) เป็นตัวควบคุม

3. การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI*

จากผลการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด นำโคลนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บเซลล์นำมาสกัดพลาสมิดตามวิธีการ CTAB mini plasmid preparation แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* วิเคราะห์ผลการตัดด้วย 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซีส ตัวอย่างจากการตัดดีเอ็นเอสายผสมจากข้าวพันธุ์น้ำรูโคลนที่ 1-4 และพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีโคลนที่ 1-5 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* พบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส ดังภาพที่ 12 แสดงว่า โคโลนีที่ได้นั้นเป็นดีเอ็นเอสายผสมเช่นเดียวกันกับโคโลนีที่ได้จากการคัดเลือกด้วยขนาดจากดีเอ็นเอสายผสมจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และกู้เมืองหลวงพบว่าสามารถคัดเลือกด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* ด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 12 ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟริซิส ของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ของดีเอ็นเอสายผสมจากข้าวพันธุ์น้ำรูโคลนที่ 1-4 (ช่องที่ 1-4) และข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรี โคลนที่ 1-5 (ช่องที่ 5-9) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (ช่อง M) เป็น 1kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ของโคลนจากดีเอ็นเอสายผสมจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, น้ำรู และกู้เมืองหลวง พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ขนาดไม่แตกต่างกัน จึงเลือกโคลนที่ส่งไปหาลำดับเบสตัวอย่างพันธุ์ละ 2 โคลน ส่วนดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรี ผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ขนาด (ดังภาพที่ 12 ช่องที่ 5-7) ในโคลนที่ 1-3 จึงส่งดีเอ็นเอของโคลนที่ 1-3 ของข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีไปหาลำดับเบส

4. การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 น้ำรูและกู้เมืองหลวงที่ส่งไปหาลำดับเบสอย่างละ 2 โคลนพบว่า ทั้ง 2 โคลน มีลำดับเบสเหมือนกันและเมื่อนำผลการอ่านลำดับเบสมาทำการ blast กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 มีลำดับเบสเหมือนลำดับเบสของ mRNA ของ heat shock protein ในข้าวกลุ่มอินดิกาพันธุ์ Pai'ai (accession number; FJ383169) 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู เหมือนลำดับเบสของ mRNA ของ heat shock protein ในข้าวกลุ่มจาโปนิกา (accession number; GU120341) 100 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงเหมือนลำดับเบสของ mRNA ของ heat shock protein ในข้าวกลุ่มจาโปนิกา (accession number; EU846992)

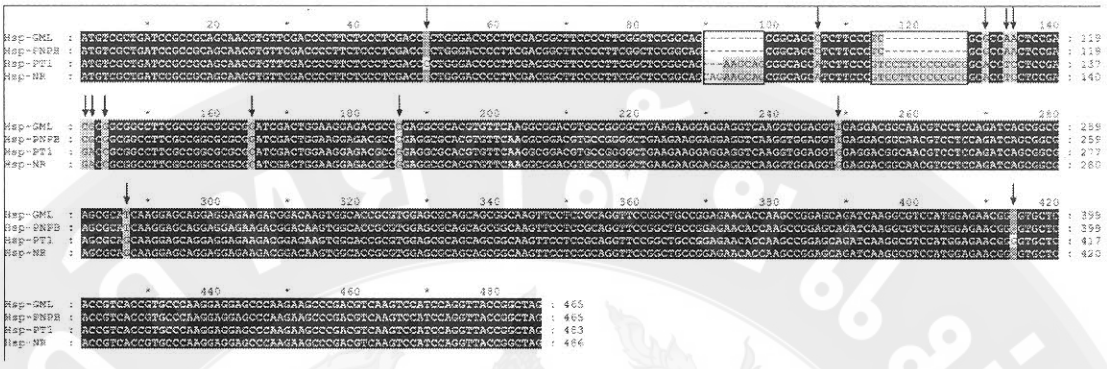
99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับเบสของดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีโคลนที่ 1 พบว่ามีขนาด 545 คู่เบสและมีลำดับเบสเหมือนกับโครโมโซมแท่งที่ 4 ของข้าว แต่ไม่เหมือนกับยีน *Hsp* อื่น ๆ โคลนที่ 2 พบว่ามีขนาด 440 คู่เบสและมีลำดับเบสเหมือนกับโครโมโซมแท่งที่ 2 ของข้าว แต่ไม่เหมือนกับยีน *Hsp* อื่น ๆ ส่วนโคลนที่ 3 พบว่ามีขนาด 484 คู่เบส และมีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของ mRNA ของ heat shock protein ในข้าวกลุ่มจาโปนิกา (accession;EU 846992) ซึ่งผลการ blast ของลำดับเบสที่ได้จากโคลนต่างๆ ของข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Hsps* ที่ได้จากการโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T Easy กับฐานข้อมูล GenBank ของข้าวจำนวน 4 พันธุ์

ชื่อพันธุ์ข้าว	Accession number **ของลำดับเบสจาก ฐานข้อมูล**	**เปอร์เซ็นต์ความเหมือน**
ปทุมธานี 1	FJ383169	100
พลายงามปราจีนบุรี	EU846992	99
น้ำรู	GU120341	100
กู้เมืองหลวง	EU846992	99

จากนั้นนำลำดับเบสที่เหมือนกับยีน *sHsp* ในฐานข้อมูล GenBank มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม clustalX พบว่ายีน *sHsp* จากข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 (HSP_PT1) พลายงามปราจีนบุรี (HSP_PNPB3) น้ำรู (HSP_NR) และกู้เมืองหลวง (HSP_GML) มีความยาวของลำดับเบสคือ 483, 465, 486 และ 465 คู่เบสตามลำดับ มีบริเวณลำดับเบสแทรก (insertion) และขาดหาย (deletion) (InDel) ที่ตำแหน่ง 93, 116 และ 121 นอกจากนี้มีลำดับเบสที่แตกต่างกัน 13 ตำแหน่ง โดยลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีและกู้เมืองหลวงมีลำดับเบสเหมือนกันและมีขนาดเท่ากัน ดังตารางที่ 3 โดยที่ลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีและกู้เมืองหลวงมีขนาดสั้นที่สุด คือ 456 คู่เบส ส่วนยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู มีขนาดยาวที่สุด คือ 486 คู่เบส ตามด้วยยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่มีขนาด 483 คู่เบส หากใช้ลำดับเบสของยีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงที่มีขนาดสั้นที่สุดเป็นหลักจะพบว่ายีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และน้ำรู มีลำดับเบสแทรก (insertion) ที่ตำแหน่ง 93 จำนวน 6 คู่เบส (AAGCAG) และ 9 คู่เบส

(CAGAAGCAG) ตามลำดับ และที่ตำแหน่ง 116 จำนวน 12 คู่เบส คือ CCTTCCCCCGCG (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *sHsp* ของข้าว 4 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalX โดยที่ HSP_PNPB3, HSP_GML, HSPPT1 และ HSP_NR เป็นลำดับเบสของยีน *Hsp* ที่ได้จากข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีโคลนที่ 3, พันธุ์กู้เมืองหลวง, พันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์น้ำรูตามลำดับโดยที่ □ แสดงตำแหน่ง InDel และ ↓ แสดงตำแหน่งที่มีลำดับเบสแตกต่างกัน

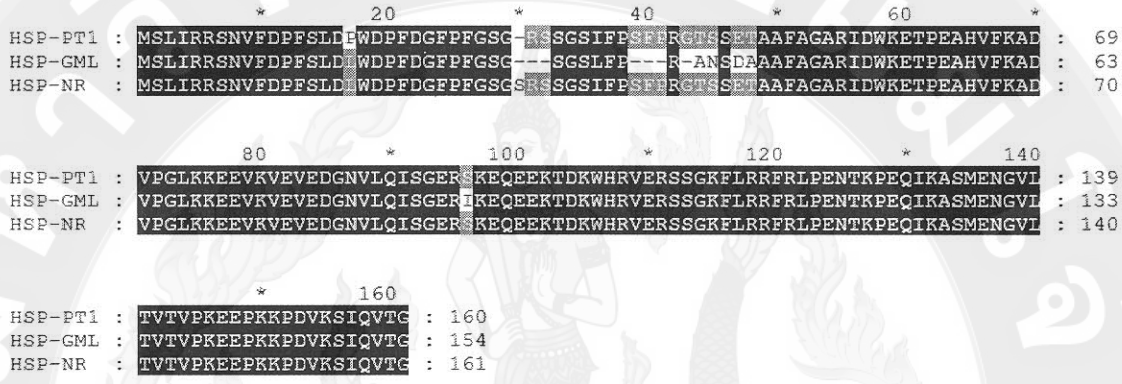
ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *sHsp* ที่ได้ จากข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรีกู้เมืองหลวงปทุมธานี 1 และน้ำรู

พันธุ์ข้าว	กู้เมืองหลวง	ปทุมธานี 1	น้ำรู	พลายงามปราจีนบุรี
กู้เมืองหลวง	100	-	-	-
ปทุมธานี 1	93	100	-	-
น้ำรู	93	98	100	-
พลายงามปราจีนบุรี	100	93	93	100

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่าลำดับเบสของยีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงเหมือนกับข้าวพันธุ์พลายงามปราจีนบุรี 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 น้ำรู เป็น 93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู เหมือนกับยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานีเป็น 98 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู กู้เมืองหลวง และปทุมธานี 1 ไปแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนแล้วนำลำดับกรดอะมิโนเหล่านั้นไปเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalX พบว่า

ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีความเหมือนและความความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนโปรตีน sHSP จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และน้ำรู ถึง 91 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน sHSP จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีความเหมือนและความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน sHSP จากข้าวพันธุ์น้ำรู ถึง 98 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 14 และตารางที่ 4



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน sHSP จากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalX

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของยีน *Hsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง, ปทุมธานี 1 และน้ำรู โดยตัวเลขบรรทัดบนแสดงความเหมือน (identity) ตัวเลขในบรรทัดล่างแสดงความคล้าย (similarity)

พันธุ์	กู้เมืองหลวง	ปทุมธานี 1	น้ำรู
กู้เมืองหลวง	100	-	-
ปทุมธานี1	91	100	-
	93		
น้ำรู	91	98	100
	93	98	

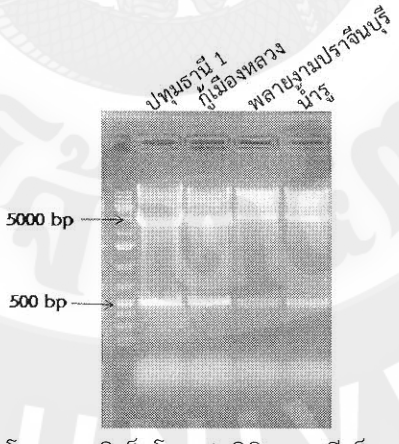
ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ายีน *Hsp* ที่โคลนได้เป็นยีนในกลุ่มโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (small heat shock protein) กลุ่มที่ 1 และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับเบสของยีน *sHsp* ที่แยกได้ไปคำนวณน้ำหนักโมเลกุลพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 18 กิโลดาลตัน

(kDa) จึงให้ชื่อยีน *sHsp* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ปทุมธานีเป็น *Orysa sativa* small heat shock protein 18 กิโลดาลตัน จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี (*OsHsp18*_PT1) ส่วนยีน *Hsp* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง และน้ำรู เป็น *OsHsp18*_GML และ *OsHsp18*_NR ตามลำดับ โดยที่ลำดับเบสของยีน *sHsp* ทั้ง 3 ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ได้ accession number เป็น KT304314-KT304316 ตามลำดับ

การสร้างชุดของยีนเพื่อแสดงออกเป็นโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

1. การเตรียมชิ้นยีน *Hsp* ที่ต้องการสร้างชุดของยีน

นำดีเอ็นเอของของยีน *sHsp* ข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM-T Easy มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I (NEB Biolab, USA) เพื่อให้ชิ้นยีนหลุดออกจาก pGEM-T Easy พบว่าดีเอ็นเอสายผสมจากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส (ภาพที่15) จากนั้นแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาด 500 คู่เบสไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET3a ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I เช่นกัน ได้เป็นดีเอ็นเอสายผสม 4 ชนิด ที่ให้ชื่อว่า pET3a_*Hsp*_PT1, pET3a_*Hsp*_GML, pET3a_*Hsp*_PNPB และ pET3a_*Hsp*_NR หมายถึงยีน *Hsp* ของยีนปทุมธานี 1 กู้เมืองหลวง พลายงามปราจีนบุรี และน้ำรู ในดีเอ็นเอพาหะ pET3a ตามลำดับ



ภาพที่ 15 ผลการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอริซิสของดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 กู้เมืองหลวง พลายงามปราจีนบุรี และน้ำรู ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I โดยดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้คือ 1kb Plus DNA ladder (Thermo Sciencetific, USA)

2. การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I

จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมทั้ง 4 ชนิด เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α โคโลนีที่ปรากฏขึ้นมีสีขาวทุกโคโลนี ไม่มีโคโลนีสีฟ้า เนื่องจากดีเอ็นเอพาหะ pET3a ไม่มีบริเวณ *lacZ* จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากขนาดโดยใช้ lysis buffer แล้ววิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใส่ดีเอ็นเอพาหะ pET3a ในช่องแรกและช่องสุดท้ายของเจลเป็นตัวควบคุม จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้ากว่าโคโลนีของดีเอ็นเอพาหะ pET3a มาสกัดพลาสมิด ด้วยวิธีการ CTAB mini plasmid preparation จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นด้วยการทำ 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I วิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจล อิเล็กโทรฟอรีซิส พบมีแถบดีเอ็นเอของยีน *sHsp* จากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ มีขนาด 500 คู่เบส จึงส่งโคลนที่ได้เหล่านี้ไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) เพื่อตรวจสอบลำดับเบสและทิศทางการเชื่อมต่อ

3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

การหาลำดับเบสของยีน *sHsp* ที่อยู่ในพลาสมิด pET3a เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของการสร้างชุดของยีนและยังสามารถตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีนเข้าเชื่อมในทิศทางที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนได้ คือหากบริเวณ start codon จะอยู่ด้านเดียวกับบริเวณโปรโมเตอร์ของพลาสมิด pET3a เรียกว่า sense หาก start codon อยู่ด้านเดียวกับเทอร์มิเนเตอร์เรียกว่า antisense ซึ่งจากการหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสของ *sHsp* ที่อยู่ใน pET3a จากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ยังคงเหมือนกับลำดับเบสของยีน *sHsp* ที่อยู่ในพลาสมิด pGEM-T Easy ซึ่งจากการวิเคราะห์ทิศทางของการเชื่อมต่อ พบว่าโคลนที่ได้จากการสร้างชุดยีน *OsHsp18*_PT1, *OsHsp18*_GML, และ *OsHsp18*_NR มีทิศทางที่ต้องการคือ sense ส่วนโคลนที่ได้จากการสร้างชุดของยีน *OsHsp18*_PNPB ในทิศทางที่ไม่ต้องการ คือ antisense (ไม่แสดงข้อมูล) และเนื่องจากลำดับเบสของยีน *OsHsp18*_PNPB เหมือนกับยีน *OsHsp18*_GML ในการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มียีน *Hsp* การชักนำการแสดงออกเป็นโปรตีน และการทดสอบการรอดชีวิตต่ออุณหภูมิสูง จึงใช้โคลนที่ได้จากการสร้างชุดของยีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง ปทุมธานี 1 และน้ำรู (*OsHsp18*_GML, *OsHsp18_PT1*, และ *OsHsp18_NR*) ตามลำดับ

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มียีน *Hsp*

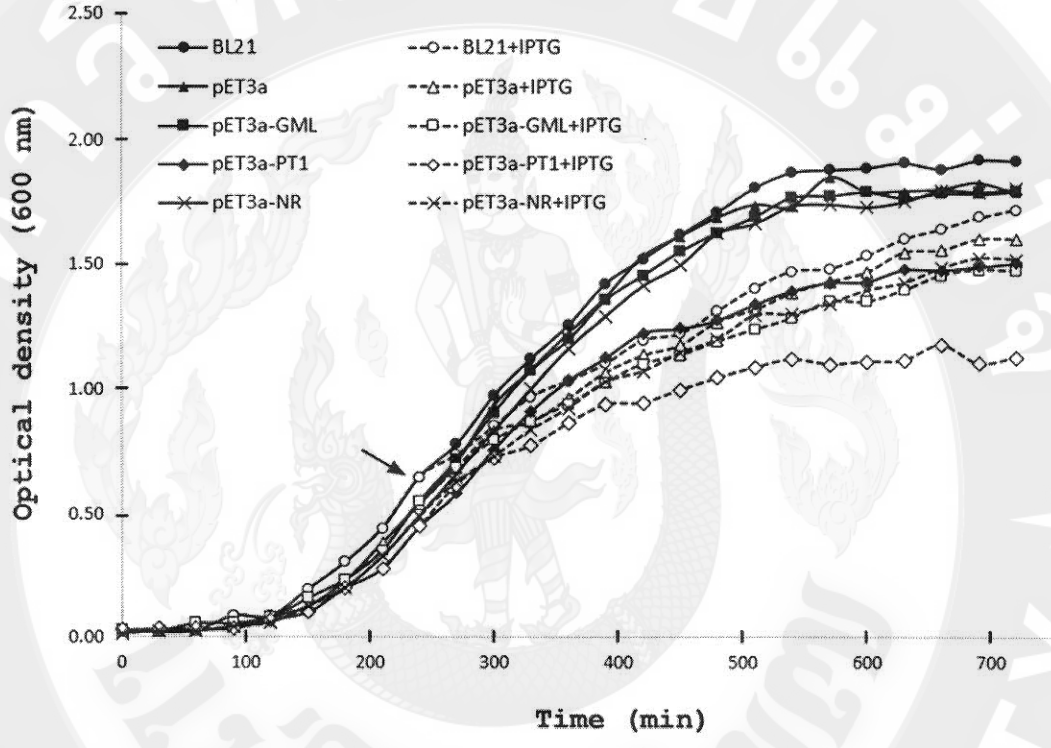
นำโคลนที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.3 มาศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้โคลนจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 น้ำรู และกู้เมืองหลวง ดังนั้นในการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS มีเชื้อทั้งหมด 10 ชนิด ได้แก่

1. *E. coli* BL21 pLysS (BL21)
2. *E. coli* BL21 pLysS ที่เติม IPTG (BL21+IPTG)
3. *E. coli* BL21 pLysS ที่มี pET3a (pET3a)
4. *E. coli* BL21 pLysS ที่มี pET3a เติม IPTG (pET3a+IPTG)
5. *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1)
6. *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3-NR)
7. *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a-GML)
8. *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1ที่เติม IPTG (pET3a-PT1+IPTG)
9. *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp1 8* จากข้าวพันธุ์น้ำรูที่เติม IPTG (pET3a-NR+IPTG)
10. *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงที่เติม IPTG (pET3a-GML+IPTG)

โดยที่แบคทีเรีย 1 และ 2 จะศึกษาการเจริญเติบโตในอาหาร LB ที่มียาคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่วนแบคทีเรีย 3 และ 4 จะศึกษาการเจริญเติบโตในอาหาร LB ที่มียาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ในขณะที่แบคทีเรีย 5-10 จะศึกษาการเจริญเติบโตในอาหาร LB ที่มียาคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมต่อลิตร และยาแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในสภาวะไม่มีการชักนำการแสดงออกของยีน (ไม่เติมสาร IPTG) และมีการชักนำการแสดงออกของยีน (เติมสาร IPTG) นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงจากการทดลอง 3 ครั้ง มาสร้างกราฟการเจริญเติบโต ดังภาพที่ 16 พบว่าการเจริญเติบโตของ BL21 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด และการเจริญเติบโตจะลดลงเมื่อเติมสาร IPTG ในขณะที่การเจริญเติบโตของ BL21 ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a+GML) ปทุมธานี 1 (pET3a+PT1) น้ำรู (pET3a+NR) ที่การชักนำให้สร้างโปรตีน OsHSP18 เจริญเติบโตช้ากว่า BL21 แต่เมื่อเติมสาร IPTG ทำให้เซลล์เจริญเติบโตช้าลงกว่าที่ไม่ได้เติม แสดงว่าสาร IPTG มีผลกระทบกับการเจริญของเซลล์เจ้าบ้าน (*E. coli* BL21 pLysS) และโปรตีน OsHSP18

ของข้าวที่แบคทีเรียสร้างนั้นน่าจะเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย จนทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตช้าลง ซึ่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตที่ได้นี้เหมือนกับที่รายงานในการแสดงออกของยีน *OsHSP16.9* จากข้าว หรือยีน *DcHSP17.7* จากแครอทในแบคทีเรีย *E. coli* (Yeh et al., 1997, Kim and Ahn, 2009)

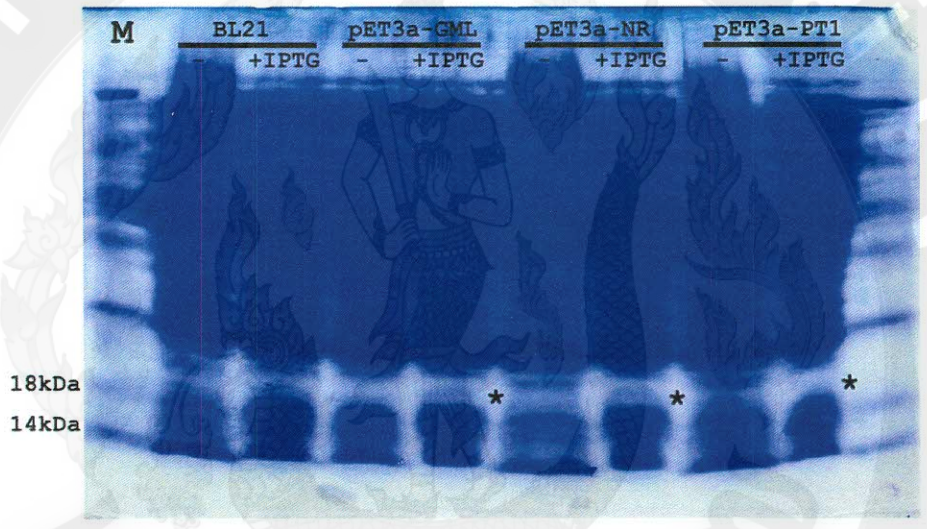


ภาพที่ 16 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS (BL21) แบคทีเรีย *E. Coli* BL21 pLysS ที่มีพลาสมิด pET3a (pET3a) แบคทีเรีย *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *Hsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) ยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a-NR) ยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a-GML) ที่มีการชักนำให้แสดงออกเป็นโปรตีน (+ IPTG)

การชักนำการแสดงออกโปรตีน OsHSP18

การชักนำการแสดงออกโปรตีน *OsHSP18* ในเซลล์แบคทีเรีย ทำการศึกษายีนที่ได้จากข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 กู้เมืองหลวง และน้ำรู และใช้แบคทีเรีย BL21 สายพันธุ์ pLysS ดังนี้ *E. coli* BL21 pLysS (BL21), *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a-

GML), *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a-NR) และ *E. coli* BL21 pLysS ที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) เมื่อชักนำการแสดงออกด้วยสาร IPTG ให้สร้างโปรตีน OsHSP18 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังภาพที่ 17 พบโปรตีนขนาดประมาณ 18 กิโลดาลตัน (แสดงด้วย *) ในเซลล์ pET3a-GML, pET3a-NR และ pET3a-PT1 ที่มีการชักนำให้แสดงออก (+IPTG) ซึ่งจะไม่พบในเซลล์ที่ไม่มีการชักนำให้มีการแสดงออกของยีน (-IPTG) ซึ่งเซลล์ที่ชักนำการแสดงออกของโปรตีนจะใช้ในการทดสอบการรอดชีวิตที่อุณหภูมิสูงต่อไป



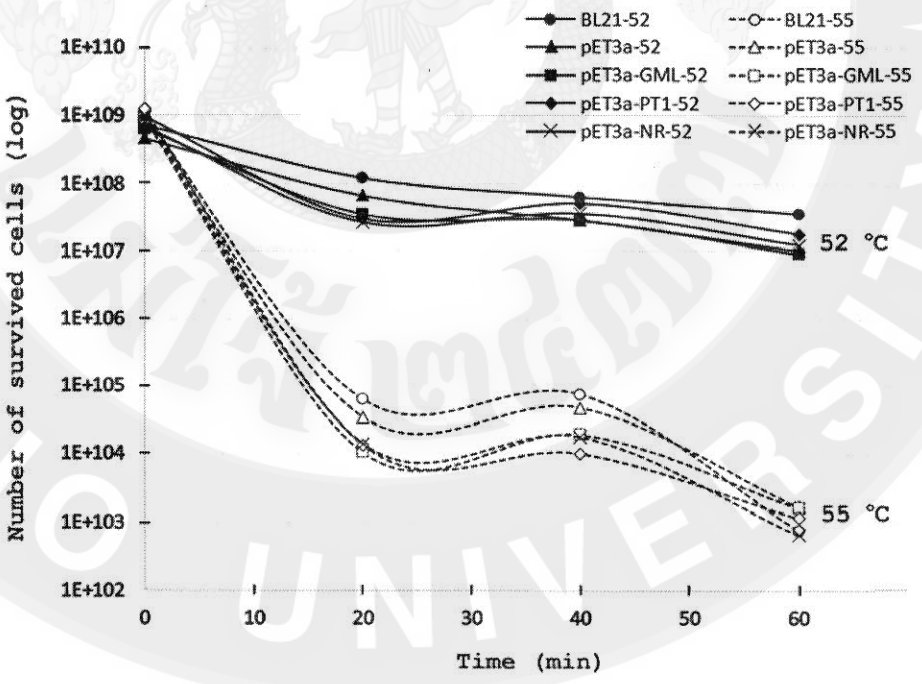
ภาพที่ 17 การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากเซลล์ *E. coli* BL21 pLysS (BL21) เซลล์แบคทีเรียที่มีชุดยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a-GML) ยีน *sHsp* จากข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a-NR) *sHsp* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) ที่ไม่มีการชักนำ (-) และการชักนำให้สร้างโปรตีนด้วย IPTG (+IPTG) โดยที่ * คือแถบของโปรตีนที่คาดว่าเป็นโปรตีน OsHsp18

การทดสอบการรอดชีวิตต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น

การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ที่ชักนำให้ยีน *sHsp* แสดงออก ที่ได้จากข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) กู้เมืองหลวง (pET3a-GML) และน้ำรู (pET3a-NR) โดยใช้เซลล์ที่ชักนำการแสดงออกด้วยสาร IPTG และเพาะเลี้ยงต่อจนครบ 2 ชั่วโมง แล้วนำไปเจือจางให้มีเซลล์เป็น $1x10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 47,

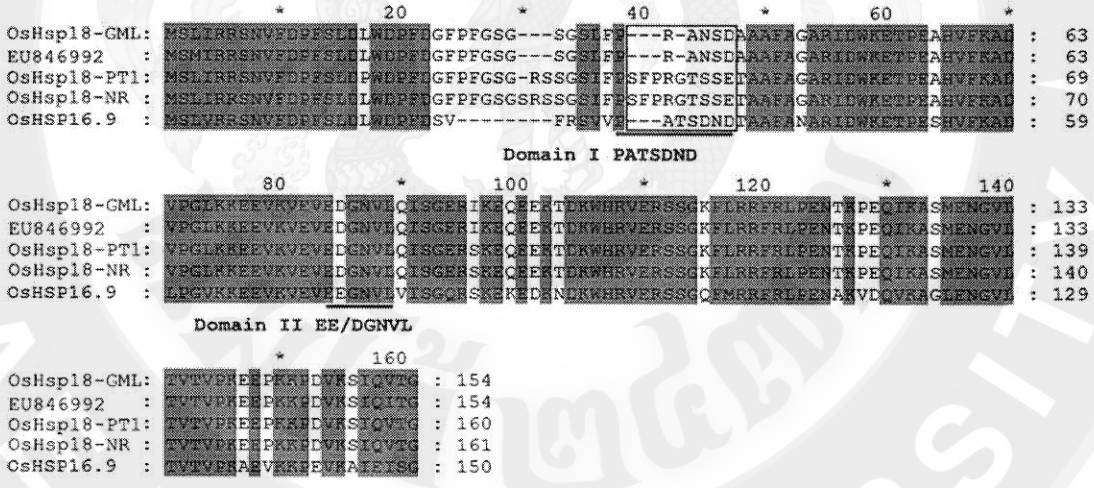
52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เก็บเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทุก 20 นาที นาน 1 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้ไปเจือจางแล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะที่เหมาะสม นำค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตจากการทดลอง 3 ครั้ง มาสร้างกราฟจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตพบว่าที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ไม่พบการตายของเซลล์ (ไม่แสดงข้อมูล) จึงเพิ่มระดับของอุณหภูมิในการทดลองเป็น 52 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์แบคทีเรีย BL21 (BL21) มีการรอดชีวิตสูงที่สุด รองลงมา คือ แบคทีเรียที่ยีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a-NR) ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) กู้เมืองหลวง (pET3a-GML) และดีเอ็นเอพาหะ pET3a (pET3a) ตามลำดับ (ภาพที่ 18)

และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 55 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์แบคทีเรียของดีเอ็นเอพาหะ pET3a (pET3a) มีการรอดชีวิตสูงที่สุด รองลงมา คือ เซลล์แบคทีเรียที่ยีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (pET3a-GML) เซลล์แบคทีเรีย BL21 (BL21) เซลล์แบคทีเรียที่มียีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) และน้ำรู (pET3a-NR) ตามลำดับ (ภาพที่ 18) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์แบคทีเรียไม่มีการรอดชีวิต (ไม่แสดงข้อมูล)



ภาพที่ 18 กราฟการรอดชีวิตของเซลล์ที่อุณหภูมิ 52 และ 55 องศาเซลเซียส ของเซลล์แบคทีเรีย BL21 (BL21) แบคทีเรียที่มียีน *sHsp* ของข้าวพันธุ์น้ำรู (pET3a-NR) ปทุมธานี 1 (pET3a-PT1) กู้เมืองหลวง (pET3a-GML) และดีเอ็นเอพาหะ pET3a (pET3a)

จากกราฟการรอดชีวิตพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีการรอดชีวิตที่ 52 องศาเซลเซียส มากกว่าที่ 55 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ทั้ง 5 ชนิด มีการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน แสดงว่าโปรตีน OsHSP18 ไม่สามารถทำให้เซลล์ *E. coli* BL21 pLysS รอดชีวิตในอุณหภูมิ 52 และ 55 องศาเซลเซียส ได้ ดังที่มีรายงานในการแสดงออกของยีน *OsHSP16.9* ในแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้ การแสดงออกของยีน *OsHsp16.9* นั้นอยู่ในรูปโปรตีนลูกผสม (fusion protein) เชื่อมกับโปรตีน GST ของแบคทีเรีย ทำให้เซลล์โปรตีนที่ได้อาจไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Yeh et al., 1997) หรือสาร IPTG มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และอีกปัจจัยอาจเกิดจากการทนต่ออุณหภูมิสูงของโปรตีน OsHSP16.9 ในแบคทีเรียมีบริเวณสำคัญ 2 โดเมนท์ได้แก่ โดเมนท์ PATSDND (กรดอะมิโนที่ 30-36) และโดเมนท์ EEGNVL (กรดอะมิโนที่ 73-78) ทำให้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Yeh et al., 2002, Chen and Lin 2002) ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *sHsp* จากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OsHsp16.9* พบว่าในโปรตีน OsHSP18 ไม่พบโดเมนท์ PATSDND (ดังภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน OsHsp18; OsHSP18 จากฐานข้อมูล GenBank (EU846992) และโปรตีน OsHSP16.9 กับ OsHSP18 จากข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (OsHsp18-GML), OsHSP18 จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (OsHsp18-PT1) และ OsHSP18 จากข้าวพันธุ์น้ำรู (OsHsp18-NR)

ซึ่งการไม่มีโดเมนท์นี้อาจทำให้เซลล์ที่มีโปรตีน OsHSP18 มีการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52 หรือ 55 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างจากเซลล์ *E. coli* BL21 pLysS และเซลล์ *E. coli* BL21 pLysS ที่มี pET3a

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การแยกยีนโปรตีนทนร้อนขนาดเล็ก (*OsHsp18*) ได้จากข้าวไทยจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 น้ำรู และกู้เมืองหลวง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsHsp18* ที่แยกได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank มี accession number เป็น KT304314–KT304316 และมีความเหมือน 92-99 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเจ้าบ้านและแบคทีเรียที่สร้างโปรตีน OsHSP18 พบว่าสาร IPTG กระทบกับการเจริญของเซลล์เจ้าบ้าน (*E. colil* BL21 pLysS) และโปรตีน OsHSP18 ของข้าวที่แบคทีเรียสร้างนั้นน่าจะเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งผลกระทบต่อการเจริญนี้เหมือนที่รายงานในการแสดงออกของยีน *OsHSP16.9* จากข้าว หรือยีน *DcHSP17.7* จากแครอทในแบคทีเรีย *E. coli*

การชักนำการแสดงออกของโปรตีน OsHSP18 ในเซลล์แบคทีเรียที่มียีน *OsHsp18* จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 กู้เมืองหลวง และน้ำรู พบว่าเมื่อชักนำการแสดงออกด้วยสาร IPTG ให้สร้างโปรตีน OsHSP18 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 18 กิโลดาลตัน ในเซลล์ที่มีการชักนำให้มีการแสดงออก (+IPTG) ซึ่งจะไม่พบในเซลล์ที่ไม่มีการชักนำให้มีการแสดงออกของยีน (-IPTG)

การทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ที่สร้างโปรตีน OsHSP18 มีการรอดชีวิตที่ 52 องศาเซลเซียส มากกว่าที่ 55 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ทั้ง 5 ชนิดมีการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน แสดงว่าโปรตีน OsHSP18 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์รอดชีวิตในอุณหภูมิดังกล่าวได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้ การแสดงออกของยีน *OsHSP16.9* ที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้อยู่ในรูปโปรตีนลูกผสม (Fusion protein) ทำให้เซลล์โปรตีนที่ได้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Yeh et al., 1997) สาร IPTG มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และอีกปัจจัยอาจเกิดจากการทนต่ออุณหภูมิสูงของ OsHSP16.9 ในแบคทีเรียมีบริเวณสำคัญ 2 โดเมนท์ ได้แก่ โดเมนท์ PATSDND และโดเมนท์ EEGNVL ทำให้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Yeh et al., 2002, Chen and Lin 2002) แต่โปรตีน OsHSP18 ไม่พบโดเมนท์ PATSDND ซึ่งการไม่มีโดเมนท์นี้อาจทำให้เซลล์ที่มีโปรตีน OsHSP18 มีการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52 หรือ 55 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างจากเซลล์เจ้าบ้าน

บรรณานุกรม

กองวิจัยและพัฒนาข้าว. 2558. **ความสำคัญของข้าวเรื่องของข้าวปลูก**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/main/index.php?option=com_content&view=article&id=688:rice&catid=61:rice-knowledge&Itemid=77 (11 มกราคม 2558).

กรมการข้าว. 2557. **องค์ความรู้เรื่องข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=6.htm (14 กันยายน 2557).

กรมการข้าว. 2558. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php.htm (26 ธันวาคม 2558).

กรมพัฒนาที่ดิน. 2550. **แผนบรรเทาภาวะโลกร้อนด้านการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.oae.go.th/download/climate_change/climate_full. pdf (4 กันยายน 2558).

เฉลิมพล แซมเพชร. 2542. **สรีรวิทยาการผลิตพืชไร่**. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

บุญหงส์ จงคิด. 2547. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

นันทยา กัลป์ยาศิริ. 2550. พืชเทคโนโลยีชีวภาพกับปัญหาภัยแล้ง. **คลังข้อมูล สพท**. 3(14): 1-2.

พีระยศ แข็งขัน และ อนันต์ พลธานี. 2539. ผลของการขาดน้ำในระยะการเติบโตต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวขาวดอกมะลิ 105. **วารสารเกษตร**. 12: 256-262.

ภาวะโลกร้อน. 2558. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://baanjomyut.com/libary/global_warming/ (8 กันยายน 2558).

บริษัท. สนุก ออนไลน์ จำกัด. 2558. **ลำต้นข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://p4.s1sf.com/ gu/0/ui/0/484/1042B3P9C.JPG (27 มกราคม 2558).

มูลนิธิข้าวไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. 2558. **จุดกำเนิดและประวัติข้าวไทย**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm (15 ธันวาคม 2558).

รักบ้านเกิด. 2559ก. **ดอกข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rakbankerd.com/kaset/Rice/5220_3.jpg (3 มกราคม 2559).

รักบ้านเกิด. 2559ข. **เมล็ดข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rakbankerd.com/kaset /Rice/5220_5.jpg (3 มกราคม 2559).

รักบ้านเกิด. 2559ค. **รวงข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.rakbankerd.com/kaset/Rice/5220_2.jpg (3 มกราคม 2559).

รัตนศิริ กิตติก้องนภางค์. 2557. **หมีขั้วโลกและลูกนกเพนกวินหนึ่งในสัตว์ผู้ได้รับผลกระทบจากสภาวะโลกร้อน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.greenpeace.org/seasia/th/news/blog1/br/blog/48116/ (1 กันยายน 2557).

วนิดา สุขสุวรรณ. 2558. **แผนบรรเทาภาวะโลกร้อนด้านการเกษตร**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.tmd.go.th/info/globalwarming_climatechange.pdf (10 กันยายน 2558).

วรวรรณ คำสงฆ์. 2549. **ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน Heat-shock-protein และระยะเวลาในการไหลของน้ำยางในยางพาราสายพันธุ์ RRIM600**. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ศานิต สวัสดิ์กาญจน์ และ กิตติภูมิ งามสมทบ. 2555. การคัดเลือกพันธุ์ทนน้ำท่วมในข้าว 15 พันธุ์ **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา. 43(2): 581-584.

ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวขอนแก่น. 2557. **ความรู้เกี่ยวกับข้าว-ชาวนา**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://kkn-rsc.ricethailand.go.th/rice/variety/03/Plai_Ngahm_Prachin_Buri.html (14 กันยายน 2557).

สมหญิง โยธา. 2553. **การแยกยีนโปรตีนทนร้อนจากข้าวไทย**. การเรียนรู้อิสระปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สายัณห์สดุดี. 2537. **สภาวะขาดน้ำในการผลิตพืช**. สงขลา: คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. 2554. ลักษณะที่สำคัญของข้าวใน. **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ**. เล่ม 3. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book /book.php?page=main&book=3. (26 ธันวาคม 2558).

แสงทอง พงษ์เจริญกิต, นลินี รุ่งเรืองศรี, ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และวริศรา สุวรรณ. 2556. **การตอบสนองของยีนโปรตีนทนร้อนในพืชพลังงานที่ทนร้อน**. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อภิชาต วรรณจิตร. 2558. **เทคโนโลยีชีวโมเลกุลกับการพัฒนาพันธุ์พืชภายใต้การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลก**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.plantbreedingkku.com/ images/column_1292164760/Dr_apichat.pdf (30 มกราคม 2559).

Chang P.F., Huang W.K., Lin Y.H., Chen Y.S., and Chang T.H. 2012.Protective function of the recombinant Oshsp18.0-CII protein, a class II small heat shock protein of rice, in *Escherichia coli*. **Botanical Studies**. 53(3): 291-299.

Chen, X., S. Lin, Q. Liu, J. Huang, W. Zhang, J. Lin, Y. Wang, Y. Ke and H. He. 2014. Expression and interaction of small heat shock proteins (sHsps) in rice in response to heat stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. 1844(4): 818-828.

Fritz SchÖffl, Ralf Pra¨ndl, and Andreas Reindl. 1998. Regulation of the Heat-Shock Response. **Plant Physiol.** 117: 1135-1141.

Kazutsuka S, Katsumi S, Yoshinobu E and Mariko S. 2004. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. **FEBS Letters**. 557: 265-268.

Kim, H. and Y.-J.Ahn. 2009. Expression of a gene encoding the carrot HSP17.7 in *Escherichia coli* enhances cell viability and protein solubility under heat stress. **HortScience.** 44: 866-869.

K. S. Wei , W. L. Yang, G. Jilani , W. J. Zhou, G. K. Liu, A. N. Chaudhry, Z. Z. Cao and F. M. Cheng, 2012. Effect of high temperature on the enzymatic activities and transcriptional expression of strach debranching enzyme (DBE) multiple isoform in developing rice endosperms. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, 22(1): 97-107.

Lee, B.H., S.H. Won, H.S. Lee, M. Miyao, W.I. Chung, I.J. Kim. and J. Jo. 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice, **Gene**. 245: 283-290.

Liu. J,G., Yao Q.H., Zhang Z., Peng R.I., Xiong A-S.,XuPhang,and Zhu Hong. 2005. Isolation and Characterization of a cDNA Encoding Two Novel Heat-shock Factor OsHSF6 and OsHSF12 in *Oryza Sativa* L. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 38(5): 602-608

Lui Dali,. Lu Zhenqiang,.and Mao Zjum. 2008. Enhanced Thermotolerance of *E. coli* by Expressed OsHsp90 from Rice (*Oryza sativa* L.). **Springer Science+business Media, LLC**. 58(2): 129-133.

Mahroof, R., K. Yan Zbu, N. Lisa, S. Bhadriraju. and B. Jianfa. 2005. Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red

flour beetle Triboliumcastaneum (Coleoptera:Tenebrionidae), **Comparative Biochemistry and Physiology**. 1: 1-10.

Metta,. T.A., J. Greeenman,. C. Ettelaie,. A. Venkatasubramaniam, I.C. Chetter. And P.T. McCollum. 2005. Heat shock protein in vascular disease, **Eur J Vasc Endovasc .Surg.** 29: 395-402.

Milioni D., Franz G., Sung R. and Hatzopoulos P. 2001. Gene expression during heat-shock in embryogenic carrot cell lines. **Plant cell tissue and Organ Culture.** 65: 221-228.

Peng, S., Huang, J., Sheehy, J.E., Laza, R.C., Visperas, R.M., Zhong, X., Centeno, G.S., Khush, G.S. &Cassman, K.G. 2004. **Rice yield decline with higher night temperature from global warming**. pp. 46-56 In E.D. Redona, A.P. Castro & G.P. Llanto, eds. Rice Integrated Crop Management: Towards a RiceCheck system in the Philippines. [Online] Available: http://www.fao.org/forestry/ 15526-03ecb62366f 779d1ed45287e698a44d2e.pdf. (9 Febuary 2016).

Sorensen, J.G., T.N. Kristensen. And V Loeschecke. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins, **Ecology letters**. 6: 1-13.

Soto A., Allona I., Collada C., Guevara M.A., Casado R., Emilio R.C., Aragonicllo C., and Gomez L.1999. Heterologous Expression of a Plant Small Heat-Shock Protein Enhances *Escherichia coli* Viability under Heat and cold stress. **Plant Physiol.** 120: 521–528.

Sreedhar, A.S., S. Csaba. and C.. Peter. 2004. Inhibition of Hsp90 a new strategy for inhibiting protein kinase **Biochimica et Biophysica Acta.** 1697: 233-242.

Thamir and Richard, 2002. Heat-shock protein expression in a perennial grass commonly associated with active geothermal areas in western North America. **Journal of Thermal Biology**. 27: 547–553.

Wei, H., J. Liu, Y. Wang, N. Huang, X. Zhang, L. Wang, J. Zhang, J. Tuand X. Zhong. 2013. A Dominant Major Locus in Chromosome 9 of Rice (*Oryza sativa* L.) Confers Tolerance to 48°□C High Temperature at Seedling Stage. **Journal of Heredity**. 104(2): 287-294.

Yeh C.H., Yeh K.W., Wu S.H., Chang P.F.L, Chen Y.M., Lin C.Y.1995. A recombinant rice 16.9-kDa heat shock protein can provide thermoprotection *in vitro*. **Plant Cell Physiol**. 36(7): 1341–1348.

Yeh C.H., Chang P.L., Yeh K.W., Lin W.C., Chen Y.M., Lin C.Y. 1997. Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 10967–10972.

Yeh C.H., Chen Y.M., and Lin C.Y. 2002. Functional Regions of Rice Heat Shock Protein, Oshsp16.9, Required for Conferring Thermotolerance in *Escherichia coli*. **Plant Physiol**. 128(2): 661–668.

Young L.S., Yeh C.H., Chen Y.M., Lin C.Y. 1999. Molecular characterization of *Oryza sativa* 16.9 kDa heat shock protein.**Biochem** J. 344: 31–38.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายผสม
ข้อมูลผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600})
และข้อมูลผลการทดสอบการรอดชีวิต

ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายผสม

>OsHsp18_NR

TACCATATGTCGCTGATCCGCCGCAGCAACGTGTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACC
CCTTCGACGGCTTCCCCTTCGGCTCCGGCAGCAGAAGCAGCGGCAGCATCTTCCCGTCCTTCCC
CCGCGGCACCTCCTCCGAGACCGCGGCCTTCGCCGGCGCGCGCATCGACTGGAAGGAGACGCC
GGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGT
GGAGGACGGCAACGTCCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCAGCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGA
CAAGTGGCACCGCGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGCAGGTTCCGGCTGCCGGAGAA
CACCAAGCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGCGTGCTCACCGTCACCGTGCCCAA
GGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAGCATATGAGG

>OsHsp18_PT1

CATATGTCGCTGATCCGCCGCAGCAACGTGTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCCCTGGGACCCCT
TCGACGGCTTCCCCTTCGGCTCCGGCAGAAGCAGCGGCAGCATCTTCCCGTCCTTCCCCCGCGG
CACCTCCTCCGAGACCGCGGCCTTCGCCGGCGCGCGCATCGACTGGAAGGAGACGCCGGAGGC
GCACGTGTTCAAGGCGGACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGTGGAGGA
CGGCAACGTCCTCCAGATCAGCGGCGAGCGCAGCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTG
GCACCGCGTGGAGCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTCCGCAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAA
GCCGGAGCAGATCAAGGCGTCCATGGAGAACGGGGTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGA
GCCCAAGAAGCCCGACGTCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAGCATATG

>OsHsp_GML

CATATGTCGCTGATCCGCCGCAGCAACGTGTTCGACCCCTTCTCCCTCGACCTCTGGGACCCCT
TCGACGGCTTCCCCTTCGGCTCCGGCAGCGGCAGCCTCTTCCCTCGCGCCAACTCCGACGCGG
CGGCCTTCGCCGGCGCGCGGATCGACTGGAAGGAGACGCCCGAGGCGCACGTGTTCAAGGCGG
ACGTGCCGGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGGAGGTTGAGGACGGCAACGTCCTCCAGA
TCAGCGGCGAGCGCATCAAGGAGCAGGAGGAGAAGACGGACAAGTGGCACCGCGTGGAGCGCA
GCAGCGGCAAGTTCCTCCGCAGGTTCCGGCTGCCGGAGAACACCAAGCCGGAGCAGATCAAGG
CGTCCATGGAGAACGGCGTGCTCACCGTCACCGTGCCCAAGGAGGAGCCCAAGAAGCCCGACG
TCAAGTCCATCCAGGTTACCGGCTAGCATAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGA
CCATATG

>OsHsp_PNPB

CATATGCTAGCCGGTAACCTGGATGGACTTGACGTCGGGCTTCTTGGGCTCCTCCTTGGGCACG
GTGACGGTGAGCACGCCGTTCTCCATGGACGCCTTGATCTGCTCCGGCTTGGTGTTCTCCGGCA
GCCGGAACCTGCGGAGGAACTTGCCGCTGCTGCGCTCCACGCGGTGCCACTTGTCCGTCTTCTC
CTCCTGCTCCTTGATGCGCTCGCCGCTGATCTGGAGGACGTTGCCGTCCTCAACCTCCACCTTG
ACCTCCTCCTTCTTCAGCCCCGGCACGTCCGCCTTGAACACGTGCGCCTCGGGCGTCTCCTTCC
AGTCGATCCGCGCGCCGGCGAAGGCCGCCGCGTCGGAGTTGGCGCGAGGGAAGAGGCTGCCGC
TGCCGGAGCCGAAGGGGAAGCCGTCGAAGGGGTCCCAGAGGTCGAGGGAGAAGGGGTCGAACA
CGTTGCTGCGGCGGATCAGCGACATATG

ตารางผนวกที่ 1 วัดค่า OD_{600} ครั้งที่ 1

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3a Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
0	0.009	0.009	0.022	0.022	0.040	0.040	0.013	0.013	0.009	0.009	0.000
30	0.007	0.007	0.025	0.025	0.019	0.019	0.052	0.052	0.017	0.017	0.000
60	0.016	0.016	0.022	0.022	0.058	0.058	0.016	0.016	0.022	0.022	0.000
90	0.102	0.102	0.036	0.036	0.074	0.074	0.035	0.035	0.026	0.026	0.000
120	0.068	0.068	0.080	0.080	0.064	0.064	0.044	0.044	0.032	0.032	0.000
150	0.166	0.166	0.158	0.158	0.140	0.140	0.098	0.098	0.140	0.140	0.000
180	0.308	0.308	0.266	0.266	0.264	0.264	0.206	0.206	0.244	0.244	0.000
210	0.470	0.470	0.508	0.508	0.444	0.444	0.354	0.354	0.434	0.434	0.000
240	0.726	0.726	0.748	0.748	0.700	0.700	0.548	0.548	0.694	0.694	0.000
270	0.886	0.778	0.932	0.902	0.942	0.874	0.698	0.846	0.904	0.854	0.000
300	1.130	0.900	1.222	0.970	1.152	0.974	0.912	0.844	1.108	0.902	0.000
330	1.280	1.030	1.312	0.996	1.356	0.996	1.022	0.906	1.244	0.948	0.000

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3q Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
360	1.388	1.050	1.388	1.100	1.410	1.056	1.178.	1.010	1.372	1.048	0.000
390	1.498	1.132	1.498	1.136	1.512	1.116	1.190	1.032	1.496	1.112	0.000
420	1.614	1.238	1.666	1.252	1.666	1.188	1.274	1.068	1.574	1.198	0.000
450	1.726	1.288	1.690	1,336	1.622	1.266	1.286	1.098	1.634	1.222	0.000
480	1.780	1.322	1.778	1.380	1.732	1.302	1.348	1.166	1.754	1.264	0.000
510	1.878	1.416	1.844	1.408	1.796	1.346	1.380	1.148	1.756	1.364	0.000
540	1.950	1.558	1.742	1.446	1.812	1.370	1.390	1.194	1.812	1.336	0.000
570	1.956	1.538	1.882	1.464	1.840	1.430	1.432	1.130	1.802	1.358	0.000
600	1.946	1.580	1.884	1.602	1.906	1.440	1.446	1.166	1.758	1.400	0.000
630	1.942	1,624	1.938	1.682	1.872	1.478	1.520	1.164	1.788	1.444	0.000
660	2.002	1.670	1.908	1.644	1.898	1.582	1.532	1.258	1.846	1.532	0.000
690	2.014	1.726	1.910	1.656	1.884	1.548	1.544	1.124	1.824	1.498	0.000

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3q Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
720	1.938	1.770	1.868	1.646	1.854	1.512	1.538	1.108	1.824	1.544	0.000

ตารางผนวกที่ 2 วัดค่า OD_{600} ครั้งที่ 2

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3a Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
0	0.022	0.022	0.036	0.036	0.014	0.014	0.034	0.034	0.015	0.015	0.000
30	0.027	0.027	0.017	0.017	0.023	0.023	0.019	0.019	0.025	0.025	0.000
60	0.029	0.029	0.023	0.023	0.057	0.057	0.040	0.040	0.024	0.024	0.000
90	0.090	0.090	0.048	0.048	0.034	0.034	0.035	0.035	0.035	0.035	0.000
120	0.076	0.076	0.059	0.059	0.053	0.053	0.069	0.069	0.040	0.040	0.000
150	0.160	0.160	0.107	0.107	0.086	0.086	0.078	0.078	0.070	0.070	0.000
180	0.252	0.252	0.196	0.196	0.188	0.188	0.224	0.224	0.138	0.138	0.000
210	0.386	0.386	0.314	0.314	0.216	0.216	0.234	0.234	0.190	0.190	0.000
240	0.534	0.534	0.420	0.420	0.384	0.384	0.370	0.370	0.258	0.258	0.000
270	0.644	0.644	0.548	0.548	0.482	0.482	0.498	0.498	0.358	0.358	0.000
300	0.776	0.776	0.752	0.752	0.618	0.618	0.648	0.648	0.500	0.500	0.000
330	0.936	0.934	0.836	0.806	0.742	0.738	0.778	0.726	0.676	0.672	0.000

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3q Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
360	1.034	1.012	1.004	0.876	0.914	0.812	0.902	0.780	0.842	0.754	0.000
390	1.316	1.070	1.188	1.040	1.178	0.920	1.072	0.924	0.972	0.920	0.000
420	1.426	1.124	1.402	1.052	1.222	0.996	1.176	0.852	1.146	0.952	0.000
450	1.520	1.080	1.486	1.068	1.404	1.042	1.210	0.924	1.278	1.096	0.000
480	1.648	1.262	1.612	1.214	1.508	1.070	1.278	0.984	1.484	1.136	0.000
510	1.706	1.336	1.624	1.306	1.610	1.170	1.324	1.088	1.552	1.222	0.000
540	1.858	1.402	1.702	1.338	1.760	1.224	1.408	1.094	1.640	1.250	0.000
570	1.840	1.444	1.780	1.370	1.772	1.250	1.472	1.136	1.738	1.330	0.000
600	1.856	1.472	1.726	1.402	1.752	1.280	1.418	1.062	1.696	1.390	0.000
630	1.866	1.530	1.744	1.466	1.736	1.358	1.512	1.106	1.786	1.414	0.000
660	1.832	1.590	1.730	1.494	1.722	1.388	1.484	1.118	1.828	1.468	0.000
690	1.852	1.650	1.776	1.572	1.754	1.436	1.478	1.114	1.810	1.486	0.000

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3a Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
720	1.866	1.696	1.740	1.600	1.758	1.488	1.544	1.168	1.814	1.538	0.000

ตารางผนวกที่ 3 วัดค่า OD_{600} ครั้งที่ 3

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3a Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
0	0.041	0.041	0.017	0.017	0.041	0.041	0.042	0.042	0.019	0.019	0.000
30	0.026	0.026	0.032	0.032	0.037	0.037	0.031	0.031	0.026	0.026	0.000
60	0.034	0.034	0.042	0.042	0.054	0.054	0.045	0.045	0.024	0.024	0.000
90	0.066	0.066	0.056	0.056	0.062	0.062	0.040	0.040	0.068	0.068	0.000
120	0.112	0.112	0.116	0.116	0.130	0.130	0.104	0.104	0.102	0.102	0.000
150	0.254	0.254	0.118	0.118	0.248	0.248	0.134	0.134	0.164	0.164	0.000
180	0.354	0.354	0.228	0.228	0.250	0.250	0.166	0.166	0.218	0.218	0.000
210	0.476	0.476	0.332	0.332	0.394	0.394	0.252	0.252	0.356	0.356	0.000
240	0.696	0.696	0.464	0.464	0.582	0.582	0.432	0.432	0.528	0.528	0.000
270	0.818	0.800	0.650	0.620	0.740	0.706	0.560	0.522	0.734	0.684	0.000
300	1.022	0.890	0.840	0.792	0.962	0.808	0.728	0.688	0.902	0.796	0.000
330	1.152	0.952	1.086	0.818	1.132	0.890	0.946	0.698	1.086	0.904	0.000

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3q Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
360	1.344	1.042	1.282	0.922	1.272	0.960	1.030	0.814	1.272	0.980	0.000
390	1.452	1.106	1.414	1.030	1.384	1.044	1.116	0.868	1.410	1.060	0.000
420	1.524	1.228	1.530	1.106	1.478	1.122	1.228	0.928	1.520	1.066	0.000
450	1.618	1.300	1.668	1.126	1.638	1.098	1.236	0.974	1.580	1.122	0.000
480	1.710	1.360	1.686	1.220	1.654	1.202	1.208	0.990	1.648	1.204	0.000
510	1.856	1.466	1.764	1.246	1.682	1.204	1.318	1.030	1.696	1.308	0.000
540	1.818	1.462	1.768	1.374	1.754	1.262	1.388	1.074	1.766	1.320	0.000
570	1.862	1.474	1.906	1.462	1.734	1.374	1.382	1.040	1.700	1.346	0.000
600	1.880	1.562	1.782	1.408	1.732	1.332	1.434	1.108	1.752	1.400	0.000
630	1.934	1.664	1.718	1.508	1.710	1.352	1.410	1.080	1.696	1.422	0.000
660	1.838	1.678	1.782	1.544	1.754	1.398	1.422	1.156	1.736	1.460	0.000
690	1.908	1.706	1.816	1.592	1.732	1.454	1.458	1.076	1.762	1.602	0.000

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21	BL21 +IPTG	pET3q	pET3a +IPTG	pET3a -GML	pET3a -GML +IPTG	pET3a -PT1	pET3a -PT1 +IPTG	pET3a -NR	pET3a -NR +IPTG	
	Growth	Induced	Growth	Induced	Growth	Induced	Growth	Induced	Growth	Induced	Blank
720	1.960	1.716	1.778	1.576	1.792	1.428	1.446	1.112	1.800	1.492	0.000

ตารางผนวกที่ 4 ค่าเฉลี่ยการวัดค่า OD_{600} 3 ครั้ง

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3a Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
0	0.024	0.024	0.025	0.025	0.032	0.032	0.025	0.025	0.014	0.014	0.000
30	0.020	0.020	0.025	0.025	0.026	0.026	0.025	0.025	0.023	0.023	0.000
60	0.026	0.026	0.029	0.029	0.056	0.056	0.029	0.029	0.023	0.023	0.000
90	0.086	0.086	0.047	0.047	0.057	0.057	0.047	0.047	0.043	0.043	0.000
120	0.085	0.085	0.085	0.085	0.082	0.082	0.085	0.085	0.058	0.058	0.000
150	0.193	0.193	0.128	0.128	0.158	0.158	0.128	0.128	0.125	0.125	0.000
180	0.305	0.305	0.230	0.230	0.234	0.234	0.230	0.230	0.200	0.200	0.000
210	0.444	0.444	0.385	0.385	0.351	0.351	0.385	0.385	0.327	0.327	0.000
240	0.652	0.652	0.544	0.544	0.555	0.555	0.544	0.544	0.493	0.493	0.000
270	0.783	0.741	0.710	0.690	0.721	0.687	0.710	0.690	0.665	0.632	0.000
300	0.976	0.855	0.938	0.838	0.911	0.800	0.938	0.838	0.837	0.733	0.000
330	1.123	0.972	1.078	0.873	1.077	0.875	1.078	0.873	1.002	0.842	0.000

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3q Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
360	1.255	1.035	1.225	0.966	1.199	0.943	1.225	0.966	1.162	0.927	0.000
390	1.422	1.103	1.367	1.069	1.358	1.027	1.367	1.069	1.293	1.031	0.000
420	1.521	1.197	1.533	1.137	1.455	1.102	1.533	1.137	1.413	1.072	0.000
450	1.621	1.223	1.615	1.177	1.555	1.135	1.615	1.177	1.497	1.147	0.000
480	1.713	1.315	1.692	1.271	1.631	1.191	1.692	1.271	1.629	1.201	0.000
510	1.813	1.406	1.744	1.320	1.696	1.240	1.744	1.320	1.668	1.298	0.000
540	1.875	1.474	1.737	1.386	1.775	1.285	1.737	1.386	1.739	1.302	0.000
570	1.886	1.485	1.856	1.432	1.782	1.351	1.856	1.432	1.747	1.345	0.000
600	1.894	1.538	1.797	1.471	1.797	1.351	1.797	1.471	1.735	1.397	0.000
630	1.914	1.606	1.800	1.552	1.773	1.396	1.800	1.552	1.757	1.427	0.000
660	1.891	1.646	1.807	1.561	1.791	1.456	1.807	1.561	1.803	1.487	0.000
690	1.925	1.694	1.834	1.607	1.790	1.479	1.834	1.607	1.799	1.529	0.000

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

Optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm											
Time (mins)	BL21 Growth	BL21 +IPTG Induced	pET3q Growth	pET3a +IPTG Induced	pET3a -GML Growth	pET3a -GML +IPTG Induced	pET3a -PT1 Growth	pET3a -PT1 +IPTG Induced	pET3a -NR Growth	pET3a -NR +IPTG Induced	Blank
720	1.921	1.727	1.795	1.607	1.801	1.476	1.795	1.607	1.813	1.525	0.000

ตารางผนวกที่ 5 ทดสอบอัตราการรอดชีวิต ครั้งที่ 1

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	1.15×10^{9}	6×10^{8}	1.25×10^{9}	1.9×10^{9}	1.35×10^{9}
20	1.080×10^{8}	7.5×10^{6}	3.85×10^{7}	3.25×10^{7}	3.30×10^{7}
40	3.250×10^{7}	1.5×10^{6}	7.75×10^{6}	8.6×10^{6}	$5.45xx\ 10^{6}$
60	4.8×10^{7}	1.3×10^{5}	1.1×10^{6}	1.58×10^{6}	1.545×10^{6}

ตารางผนวกที่ 6 ทดสอบอัตราการรอดชีวิต ครั้งที่ 2

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	$.929 \times 10^{9}$	$.745 \times 10^{9}$	5.9×10^{8}	$.89 \times 10^{9}$	$.835 \times 10^{9}$
20	1.35×10^{8}	1.275×10^{8}	3.33×10^{7}	2.78×10^{7}	7.475×10^{7}
40	$.89 \times 10^{8}$	1.273×10^{7}	1.39×10^{7}	1.415×10^{7}	5.063×10^{7}
60	1.62×10^{7}	7.6×10^{6}	6.4×10^{6}	$.705 \times 10^{7}$	2×10^{7}

ตารางผนวกที่ 7 ทดสอบอัตราการรอดชีวิต ครั้งที่ 3

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	1.06×10^{8}	4.125×10^{7}	5.975×10^{7}	7.15×10^{7}	8.625×10^{7}
20					
40	$.68 \times 10^{8}$	5.15×10^{7}	4.75×10^{7}	$.925 \times 10^{8}$	4.55×10^{7}
60	3.975×10^{7}	1.678×10^{7}	1.47×10^{7}	3.17×10^{7}	3.163×10^{7}

ตารางผนวกที่ 8 ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิต 3 ครั้ง

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 52°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	1.15×10^{9}	6×10^{8}	1.25×10^{9}	1.9×10^{9}	1.35×10^{9}
20	1.080×10^{8}	7.5×10^{6}	3.85×10^{7}	3.25×10^{7}	3.30×10^{7}
40	3.250×10^{7}	1.5×10^{6}	7.75×10^{6}	8.6×10^{6}	$5.45xx\ 10^{6}$
60	4.8×10^{7}	1.3×10^{5}	1.1×10^{6}	1.58×10^{6}	1.545×10^{6}

ตารางผนวกที่ 9 ทดสอบอัตราการรอดชีวิต ครั้งที่ 1

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 55°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	1.15×10^{9}	1.6×10^{9}	1.65×10^{9}	2.15×10^{9}	1.6×10^{9}
20		1.35×10^{4}	9.5×10^{3}	1.15×10^{4}	1.15×10^{4}
40	1.68*10^5	1.3×10^{4}	1.4×10^{4}	1.2×10^{4}	2.1×10^{4}
60	1.23*10^3	2.8×10^{3}	3.4×10^{3}	2.1×10^{3}	1.05×10^{3}

ตารางผนวกที่ 10 ทดสอบอัตราการรอดชีวิต ครั้งที่ 2

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 55°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	1.51×10^{9}	$.91 \times 10^{9}$	$.755 \times 10^{9}$	1.12×10^{9}	3.25×10^{8}
20	2.1×10^{4}	8.65×10^{4}	1.81×10^{4}	2.04×10^{4}	2.775×10^{4}
40	4.57×10^{4}	1.28×10^{5}	4.2×10^{4}	1.8×10^{4}	2.96×10^{4}
60	9.62×10^{2}	1.175×10^{3}	1.18×10^{3}	1.375×10^{3}	$.9 \times 10^{3}$

ตารางผนวกที่ 11 ทดสอบอัตราการรอดชีวิต ครั้งที่ 3

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 55°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	3.95×10^{8}	3.7×10^{8}	29×10^{7}	46.5×10^{7}	89×10^{7}
20	1.008×10^{5}	21.25×10^{2}	27.5×10^{2}	80×10^{2}	23.75×10^{2}
40	4.425×10^{3}	2.5×10^{2}	2.5×10^{2}	0	17.5×10^{2}
60	7.5×10^{1}	105×10^{1}	22.5×10^{1}	5×10^{1}	2.5×10^{1}

ตารางผนวกที่ 12 ค่าเฉลี่ยการทดสอบอัตราการรอดชีวิต 3 ครั้ง

Time (mins.)	จำนวนโคโลนีที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิ 55°C				
	BL21	pET3a	pET3a-GML	pET3a-PT1	pET3a-NR
0	1.018×10^{9}	0.96×10^{9}	0.898×10^{9}	1.245×10^{9}	0.938×10^{9}
20	0.609×10^{5}	3.404×10^{4}	1.012×10^{4}	1.33×10^{4}	1.388×10^{4}
40	0.727×10^{5}	0.478×10^{5}	1.875×10^{4}	1.5×10^{4}	1.745×10^{4}
60	$.756 \times 10^{3}$	1.36×10^{3}	1.602×10^{3}	1.175×10^{3}	0.658×10^{3}

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวสิริลักษณ์ อินทรศรี	
เกิดเมื่อ	6 กันยายน 2512	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2519-2524	ป.6 โรงเรียนบ้านคำตากล้า จ.สกลนคร
	พ.ศ. 2525-2527	ม.3 โรงเรียนคำตากล้าราชประชาสงเคราะห์ จังหวัดสกลนคร
	พ.ศ. 2528-2530	ม.6 โรงเรียนเซนต์ยอแซฟ จังหวัดสกลนคร
	พ.ศ. 2532-2535	กศ.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2536-2539	บริษัทโรงแรมโชตนา จำกัด จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2539-2541	ครูปฏิบัติการโรงเรียนเวียงวงกตวิทยาคม จังหวัดขอนแก่น
	พ.ศ. 2541-ปัจจุบัน	ครูปฏิบัติการโรงเรียนศึกษาสงเคราะห์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่