ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดโปรตีนในเมล็ดพืชไร่ในการบ่งชี้ความบริสุทธิ์และพันธุ์ของพืชไร่โดยใช้เทคนิค Ultra-thin Layer Isoelectric Focusing

Appropriate Solvent for the Extraction of Seed Protein Indicating Purity and Variety of Certain Field Crop Using Ultra-thin Layer Isoelectric Focusing

ธัญมาศ นิยมญาติ[1], นงลักษณ์ เทียนเสรี[1] และ สนธิชัย จันทร์เปรม[1]*

Tanyamart Niyomyart[1], Nongluk Teinseree[1] and Sontichai Chanprame[1]*

ABSTRACT

The newly developed Ultra-thin Layer Isoelectric Focusing Technique has become popular for the analysis of seed protein specifically indicating purity and variety of field crops. However, the most appropriate solvent for the extraction of seed proteins is essential and needs to be identified. The objective of this research was to find out the most appropriate solvent for protein extraction ofrom the seeds of sunflower, groundnut and sesame varieties. Three different solvents, water, 4 M urea and 3.8 mM phosphate buffer, were tested. The extracted seed storage protein was separated in polyacrylamide gel with a pH-gradient of the matrix ranges from 2-9 at 8°C with 2500 v. The results indicated that water was the most suitable solvent for seed storage protein extraction and identification in sunflower. In groundnut, all three tested solvents did not show any differences in protein extraction from the seeds of 6 varieties tested. In sesame, water was the most suitable solvent for seed storage protein extraction. For hybrid seed purity testing, water was the most suitable solvent for seed storage protein extraction and identification in sunflower and sesame. It was also found that at least 6 seeds of sesame were needed for protein extraction and varietal identification.

Key words: seed storage protein, seed purity test, isoelectric point, variety test, solvent

บทคัดย่อ

ได้ทดลองแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน 4 พันธุ์ ถั่วลิสง 6 พันธุ์ และงา 2 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์และชนิดของเมล็ดพันธุ์ พืชไร่เศรษฐกิจบางชนิด ใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ แล้วนำมาแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ พบว่าในเมล็ด

[1*] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

*Corresponding auther : Tel.0-3435-1887, Fax. 0-3428-1266, E-mail address: agrstc@ku.ac.th

ทานตะวัน น้ำเป็นตัวทำละลายที่ เหมาะสมที่สุดสำหรับนำ ไปใช้ในการสกัด และแยก โปรตีน ในเมล็ดถั่วลิสง นั้น พบว่าตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ได้ ในเมล็ดงาพบว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการสกัด โปรตีนและแยกสายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์ พบว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความ เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดโปรตีนแล ะตรวจสอบในเมล็ดทานตะวัน และเมล็ดงา และเมื่อทดสอบจำนวนเมล็ดงา ที่ต้องใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ พบว่าต้องใช้เมล็ดงาอย่างน้อยที่สุด 6 เมล็ด จึงจะเพียงพอสำหรับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์

คำสำคัญ: โปรตีนสะสมในเมล็ด การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ด isoelectric การตรวจสอบพันธุ์ ตัวทำละลาย

คำนำ

เมล็ดพันธุ์เป็นปัจจัยการผลิตที่มีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และมีส่วนในการสร้างมูลค่าให้กับเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการใช้เมล็ดพันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์มีความสำคัญทางการเกษตรมากทั้งในด้านการค้าและการปลูกโดยจะให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตที่ดี การตรวจสอบความบริสุทธิ์และตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์มีหลายวิธี เช่น การตรวจส อบทางสัณฐาน วิทยา เป็นการจำแนกตามรูปร่าง ขนาดของเมล็ดพั นธุ์ และ ต้นกล้า ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยผู้มีความชำนาญสูงในการสังเกต เนื่องจากมีผลมาจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง และต้องใช้เวลานาน เสียค่าใช้จ่ายและแรงงานในการดำเนินงานสูง (Arus, 1983; McDonald, 1998) การตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุล เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบได้เร็วกว่าวิธีแรก และถูกต้องแม่นยำสูงมาก ใช้แรงงานน้อย เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบได้ในทุกส่วนของพืชและทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช แต่มีข้อจำกัดคือมีค่าใช้จ่ายในการตรวจแต่ละครั้ง ค่อนข้างสูงและวิธีการสกัดดีเอ็นเอซับซ้อนและยุ่งยาก (Coolbear and Hill, 1988) ส่วนการตรวจสอบทางชีวเคมีเป็นวิธีการตรวจสอบในระดับโปรตีนหรือเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้นเป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอ็นไซม์ โดยอาศัยความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละกลุ่มกับสารตั้งต้นที่เหมาะสม (Payne, 1987) แต่มีข้อจำกัด คือในการเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ค่อนข้างจะยุ่งยาก และในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของพืชจะผลิตเอนไซม์ที่มีความแตกต่างกัน (วันชัย, 2542)

ปัจจุบันได้ มีการใช้เทคนิคใหม่ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์เรียกว่า ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF) วิธีนี้เป็น การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ด ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า (ISTA, 1999) และเป็นวิธีการมาตรฐานวิธีหนึ่งของ International Seed Testing Association (ISTA) หลักการของวิธีแยกโปรตีนโดยวิธี isoelectric focusing คือ การแยกสาร (โปรตีน) ชนิดต่างๆ ที่ปะปนกันอยู่และละลายได้ในน้ำหรือตัวทำละลายอื่นออกจากกันตามคุณสมบัติของค่า isoelectric ของโปรตีนแต่ละชนิด โปรตีนแ ต่ละชนิดที่แยกได้จะถูกป้องกันไม่ ให้กลับเข้ามาผสมรวมกันใหม่อีกโดยการผสมตัวกลางหรือตัวพา (carrier) บางชนิดเข้าไปก่ อนการแยก เช่น agar, polyacrylamine gel เป็นต้น จากนั้นจึงให้กระแสไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิด pH-gradient ขึ้นระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสอง โปรตีนผสมทั้งหลายจะเคลื่อนที่ผ่าน pH-gradient จนกระทั่งถึงจุดที่มีค่าเท่ากับ isoelectric point ของโปรตีนชนิดนั้น ๆ ก็จะหยุดเคลื่อนที่ทำให้เกิดการแยกของโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกันได้ (Leist *et al*., 2003) วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชบาง

ชนิดได้ เช่น ข้าว (Wang *et al*., 2001) และข้าวโพด (Leist *et al*., 2003) และเพื่อให้สามารถใช้วิธีการดังกล่าวในการตรวจสอบและจำแนกพันธุ์พืชเศรษฐกิจได้หลากหลายชนิดมากขึ้น จึงศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีน ในเมล็ด เพื่อใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์และชนิดของเมล็ดพันธุ์พืชน้ำมัน บางชนิด รวมทั้งการหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่ต้องการ สำหรับการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธี UTLIEF โดยเฉพาะเมล็ดพืชที่มีขนาดเล็ก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพืชที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 คู่ผสม คือ Pacific 55 × 323281 ต้นหมายเลข 2, และหมายเลข 4, Pacific 55 × 380874 และ Pacific 55 × 402586 โดยสายพันธุ์แม่คือ Pacific 55 สายพันธุ์พ่อคือ 323281, 380874 และ 402586

เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง 6 พันธุ์ คือ กาฬสินธุ์ 2 ขอนแก่น 60-1 ขอนแก่น 60-2 ขอนแก่น 4 ขอนแก่น 5 ขอนแก่น 6 และเมล็ดลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามทั้ง 6 พันธุ์

เมล็ดพันธุ์งา 2 พันธุ์ คือ งาดำ พันธุ์นครสวรรค์ และ งาขาว พันธุ์ มก. 19 และเมล็ด พันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามทั้งสองพันธุ์

2. ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการ แยกสกัดโปรตีนจากเมล็ดและแยกความแตกต่างของสายพันธุ์

ชนิดของ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ด 3 ชนิด คือ น้ำ (H_2O), ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ (PO^{-}_{4}) และ ยูเรีย(urea) ความเข้มข้น 4 โมลาร์

นำตัวอย่างเมล็ด 50 เมล็ด มาบดรวมกัน จากนั้นผสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด ในอัตราส่วนตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมต่อตัวทำละลาย 500 ไมโครลิตร ใช้เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (vortex ทุกๆ 20 นาที) เมื่อครบตามเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่ใสใส่หลอดใหม่เพื่อเตรียมนำไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF ค่า pH ของเจลจะใช้ช่วงค่า pH ที่อยู่ในช่วง 2-9 โดยการผสมระหว่างสาร ampholyte (SINUS, Germany) ที่มีค่า pH 4 ช่วง คือ 2-4, 4-5, 5-8 และ 8-9

การเตรียมสารละลายเจล (สำหรับเตรียมเจล 10 แผ่น) ใช้ยูเรีย 16 กรัม เติมสารละลายส่วนผสม acrylamide 50 ไมโครลิตร [acrylamide 33.14 กรัม + bis-acrylamide 0.86 กรัม ปรับปริมาตร ให้ครบ 500 มิลลิลิตร, ampholyte 4.4 มิลลิลิตร, N N N N’ N’-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 50 ไมโครลิตร และ ammonium peroxydisulphate (APS) ความเข้มข้น 20% 350 ไมโครลิตร] นำสารละลายเจลที่ได้มาเกลี่ยลงบน polyester support films (Gel-Fix, Serva) ใช้เทปกาวพันสายไฟฟ้าปิดทับไปบนกระจกที่ใช้สำหรับปิดเจลแล้วปิดกระจกนี้ทับลงบนแผ่นฟิล์มที่มีสารละลายเจลอยู่ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมงจึงลอกเอาเฉพาะแผ่น ฟิล์มที่มีเจลบาง ๆ อยู่ด้านบนนำไปใช้ในการทำ electrophoresis

หลังจากเตรียมเจลเสร็จแล้วนำเจลมาทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค isoelectric focusing โดยนำแผ่น เจลวางบนเครื่อง Desaga Horizontal Electrophoresis Unit (Desaphor HF210) ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่องทำความเย็นตั้ง อุณหภูมิที่ 8 องศาเซลเซียส จากนั้นวาง anode และ cathode strip และ application strip (52 wells) ลงบนแผ่นเจลและหยดสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ลงไปบน application strip ช่องละ 22 ไมโครลิตร การทำ electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าความต่ างศักย์ 2500 โวลย์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลมา fix ด้วย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 12% เป็นเวลา 20 นาที นำไปย้อมด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue (Coomassie R250 0.15 กรัม, Coomassie G250 0.45 กรัม, acetic acid 99% 110 มิลลิลิตร, ethanol 95% 180 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร) นาน 15 นาที และนำไปล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย destain (ethanol 95% 300 มิลลิลิตร, acetic acid 99% 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร) นาน 10 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำอีก 5 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ปิดทับเจลด้วยสติกเกอร์ใส เพื่อเก็บรักษาเจลและนำไปวิเคราะห์ผล

3. การตรวจสอบชนิดของเมล็ดพันธุ์

สกัดโปรตีนจากเมล็ดของ สายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ของพืชทั้ง 3 ชนิดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จากนั้น นำ มาแยกความแตกต่างของพันธุ์โดยวิธี UTLIEF

4. การตรวจสอบความเป็นลูกผสม

นำปัจจัยที่ได้จากการศึกษาใน ข้อ 2 มาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ด พันธุ์โดย สกัดโปรตีนจาก เมล็ดลูกผสมแล้วเปรียบเทียบแถบ โปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธีการในการตรวจสอบ

5. การหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่เพียงพอต่อการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดงา

นำปัจจัยที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2 มาทดสอบหาจำนวนเมล็ดงาที่น้อยที่สุดที่เพียงพอต่อการตรวจ สอบความบริสุทธิ์ โดยใช้ งาขาวพันธุ์ มก 19 จำนวน 1 ถึง 10 เมล็ด เปรียบเทียบแถบโปรตีน ที่ได้จากเมล็ดงาจำนวนต่างๆ

ผลการทดลอง

การทดสอบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ด

ทานตะวัน : เมื่อนำโปรตีนที่ สกัดได้จากทานตะวัน 4 พันธุ์ ได้แก่ Pacific 55, 323281, 380874 และ 402586 โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรีย ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF พบแถบโปรตีนที่มีลักษณะแตกต่างกัน การแยกแถบโปรตีนโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายพบความแตกต่าง ระหว่างพันธุ์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 2 ตำแหน่ง และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลายพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 3 ตำแหน่ง (Figure 1)

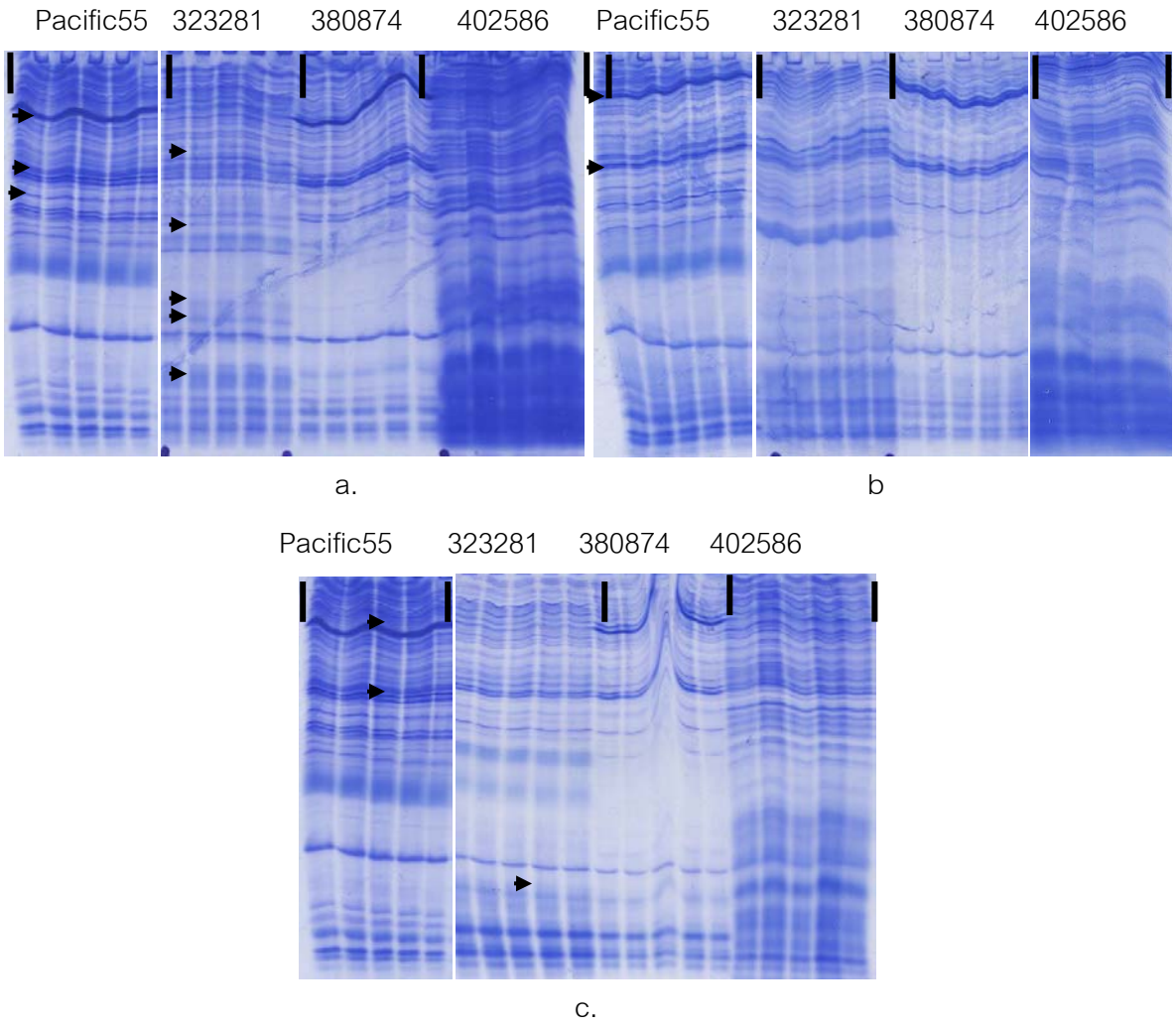

Figure 1 Seed storage protein bands of 4 sunflower varieties, Pacific 55, 323281, 380874 and 402586 using water (a.) 3.8 mM phosphate buffer (b.) and 4M urea (c.) as solvents. Electrophoresis with 2,500 V at 8°C. The pH of the gel ranged from 2-9. The unique bands are indicated by arrows.

ถั่วลิสง: เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วลิสง 6 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ ไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF ไม่สามารถแยกแถบโปรตีนที่ มีลักษณะแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ได้

งา: จากการใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดสกัดโปรตีนจากเมล็ดงา 2 พันธุ์ นำไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF พบแถบโปรตีนที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดย เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลายพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 1 ตำแหน่ง และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลายพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 1 ตำแหน่ง (Figure 2)

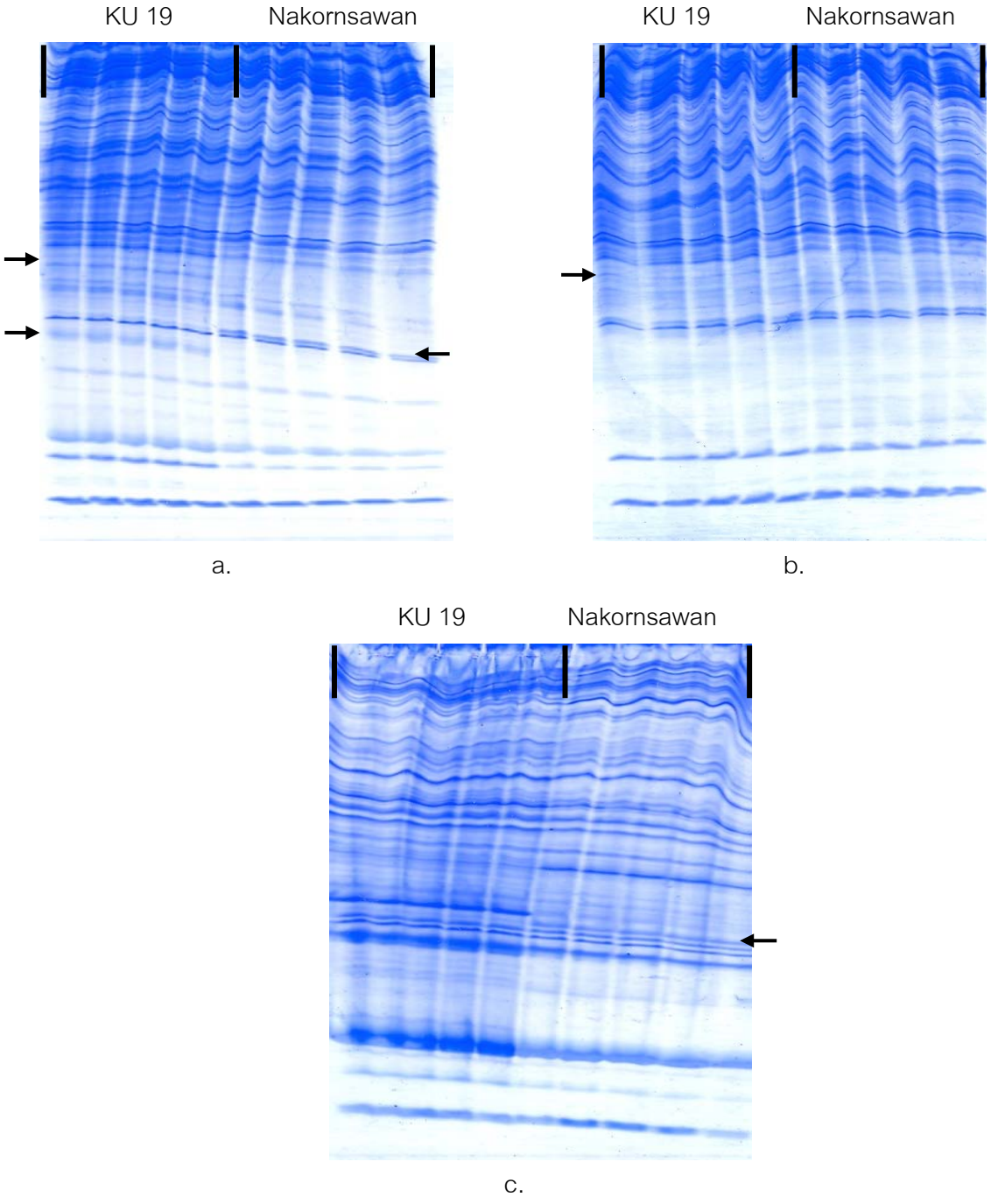

Figure 2 Seed storage protein bands of 2 sesame varieties, KU 19 and Nakornsawan using water (a.) 3.8 mM phosphate buffer (b.) and 4M urea (c.) as solvent. Electrophoresis with 2,500 V at 8°C. The pH of the gel ranged from 2-9. The unique bands are indicated by arrows.

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของเมล็ดพันธุ์

ทานตะวัน: การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง พันธุ์ Pacific 55 × 323281 ต้นหมายเลข 2 และหมายเลขที่ 4 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ 3 ตำแหน่ง (Figure 3a) ลูกผสมระหว่าง พันธุ์ Pacific 55 × 380874 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แ ถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน (Figure 3b) และลูกผสมระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × 402586 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ 1 ตำแหน่ง (Figure 3c)

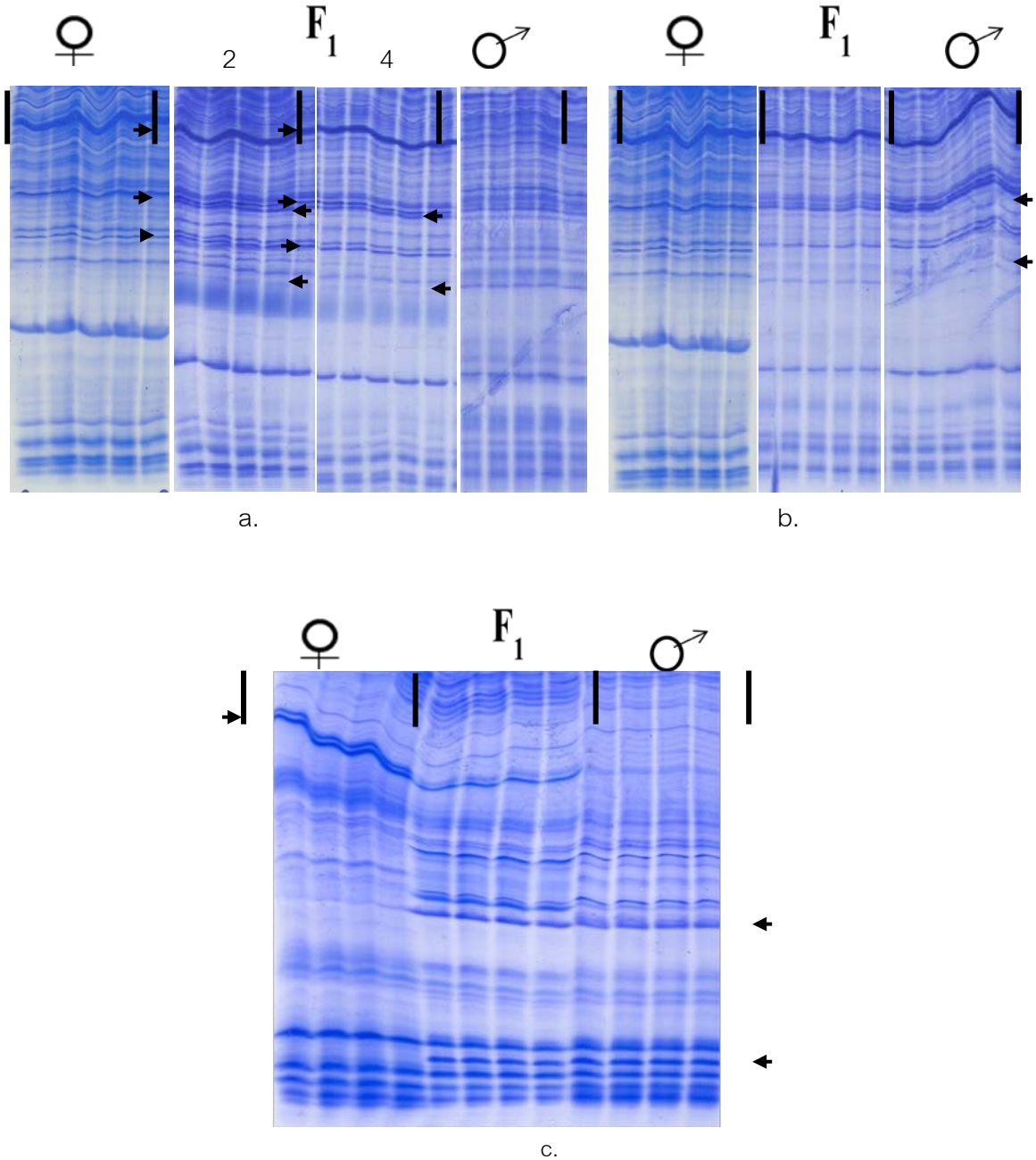

Figure 3 Seed storage protein bands of sunflower F_1 hybrids using water (a.) 3.8 mM phosphate buffer

(b.) and 4M urea (c.) as solvent. Electrophoresis with 2,500 V at 8°C. The pH of the gel ranged from 2-9. The unique bands are indicated by arrows.

a. F_1 hybrids of Pacific 55 × 323281, plant no.2 and 4

b. F_1 hybrids of Pacific 55 × 380874

c. F_1 hybrids of Pacific 55 × 402586

ถั่วลิสง: เนื่องจากตัวทำละลายโปรตีนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ถั่วลิสงทั้ง 6 พันธุ์ได้ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์ได้

งา : การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อสายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 1 ตำแหน่ง แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ 2 ตำแหน่ง (Figure 4)

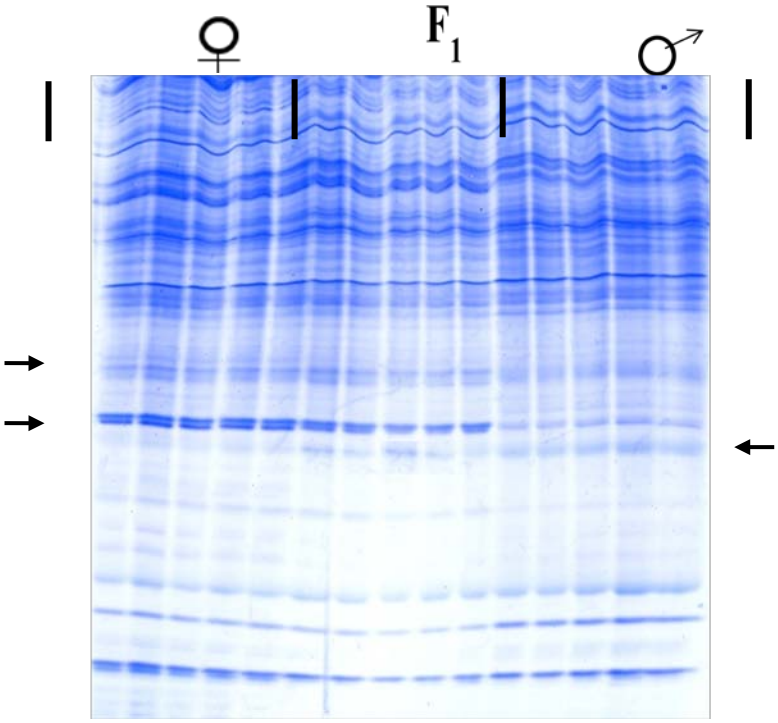

Figure 4 Seed storage protein bands of sesame F_1 hybrids (KU 19 × Nakornsawan) using water solvent. Electrophoresis with 2,500 V at 8°C. The pH of the gel ranged from 2-9. The unique bands are indicated by arrows.

การตรวจสอบ ความบริสุทธ์ ของเมล็ดพันธุ์งา โดยใช้จำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุด

การตรวจสอบจำนวนเมล็ดงา ขาวพันธุ์ มก . 19 ในการสกัดโปรตีนโดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของแต่ละจำนวนเมล็ด พบแถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดงาจำนวน 6 เมล็ดขึ้นไปที่สามารถนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ได้ (Figure 5)

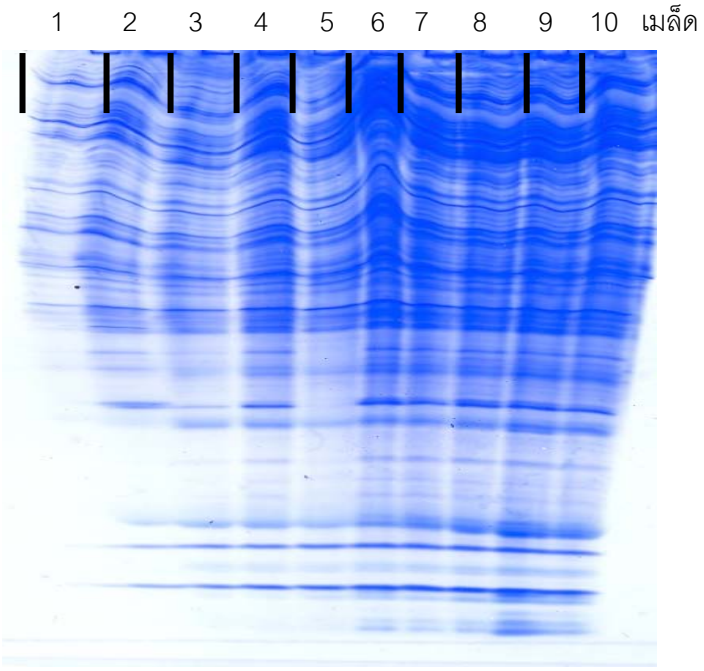

Figure 5 Seed storage protein bands of sesame variety KU 19 using water solvent. The number on the top of the gel indicate the number of extracted seeds. Electrophoresis with 2,500 V at 8°C. The pH of the gel ranged from 2-9.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยกแถบโปรตีนในเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ ถั่วลิสง 6 พันธุ์ และงา 2 พันธุ์ ด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ พบว่าได้แถบโปรตีนจำนวนมาก และในแต่ละพันธุ์นั้นมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งบอกความเป็นไปได้ว่ามีการละลายของโปรตีนหลายชนิดที่มีประจุและปริมาณที่ต่างกันออกไป ซึ่งสอดคล้องกับหลักการการละลายของโปรตีน โปรตีนส่วนใหญ่ละลายได้ดีในน้ำหรือสารละลายเกลือเจือจาง โดยสารละลายเกลือที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ ถึงแม้ว่าตัวทำละลายทั้ง สองชนิด มีคุณสมบัติที่เหมือนกันแต่ก็อาจทำละลายโปรตีนได้ต่างกัน ทำให้แถบโปรตีนที่ได้แตกต่างกันและสามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้

โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายนั้นให้จำนวนแถบโปรตีนที่พบให้ความแตกต่างมากกว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในเมล็ดทานตะวันมี globulin และ albumins เป็นโปรตีนสะสมซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ (Jacques *et al.*, 1996) ดังนั้นในเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ มีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันจึงสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ ส่วนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารละลายเกลือ พบจำนวนแถบโปรตีนที่ให้ความแตกต่างน้อยกว่า เนื่องจากเมล็ดทานตะ วัน 4 พันธุ์มีโปรตีนชนิดอื่นที่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ อยู่ในปริมาณ

น้อย แต่เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลาย กลับ ให้ความเข้มข้นของแถบโปรตีนมากกว่า อาจ เนื่อง จากในแต่ละแถบของโปรตีน มีโปรตีนชนิดเดียว หรือหลายชนิดก็ได้ และมีขนาดที่แตกต่างกันได้ด้วย เนื่องจากโปรตีนต่างชนิดกันอาจมีค่า pI (isoelectric point) ที่เท่ากัน จึงทำให้เคลื่อนที่ไปสะสมอยู่ในจุดเดียวกัน (อาภัสสรา, 2537; John and Switzer, 1997)

โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วลิสง 6 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ อาจเนื่อง จากในถั่วลิสง แต่ละพันธุ์มีกรดอะมิโนที่พบ คือ เมทไธโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (theonine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนมี หมู่ฟังก์ชั่นมีขั้ว ไม่มีประจุ และชอบน้ำ (hydrophilic) ละลายในน้ำได้แต่มีปริมาณที่ต่ำ จึงเป็นสาเหตุที่ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ และนอกจากนั้นยังพบกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ปริมาณที่ต่ำ เช่นกัน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ ฟังก์ชั่นเป็นประจุบวกโดยจะแตกตัวที่ให้ประจุบวกที่ pH 7 ดังนั้นน่าจะเป็นอีกสาเหตุที่ไม่สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ได้เนื่องจากค่า pH ของเจลใช้ช่วงค่า pH 2-9 จึงมีการกระจายตัวของแถบโปรตีนได้ในช่วงที่แคบและไม่ชัดเจน (Jacques *et* al., 1996)

โปรตีนที่สกัดจากเมล็ด งา 2 พันธุ์ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้จำนวนแถบโปรตีนที่พบให้ความแตกต่างมากกว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในเมล็ดงามี 7S vicilin ซึ่งเป็นโปรตีนสะสมในเมล็ดที่อยู่ในกลุ่ม globulin และ albumins เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ นอกจากนั้น ในเมล็ดงายัง มีกรดอะมิโน เมทไธโอนีน (methionine) ซึ่งเป็น กรดอะมิโนชนิด ไม่มีประจุและชอบน้ำ (hydrophilic) จึงละลายในน้ำได้ดี (Beyer *et al*., 2002)

โปรตีนที่สกัดจาก เมล็ดงาขาวพันธุ์ มก . 19 จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ด เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้เมื่อใช้เมล็ดงาจำนวนต่างกัน พบว่า เมื่อใช้เมล็ดงาเพียงเมล็ดเดียวก็เกิดแถบโปรตีนแต่ไม่ปรากฏทุกแถบเนื่องจาก เมล็ดงามีขนาดเล็กจึงมีปริมาณโปรตีนที่สะสม แต่ละชนิด ในเมล็ดต่อน้ำหนักเมล็ดต่ำ จึงต้องใช้จำนวนเมล็ดที่มากขึ้น จำนวนของเมล็ด ที่ต้องการนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และความสมบูรณ์ของเมล็ดพันธุ์พืชชนิดนั้นด้วย จากการทดสอบต้องใช้จำนวนเมล็ดงา 6 เมล็ดขึ้นไปจึงจะปรากฏแถบโปรตีนครบทุกแถบและสามารถนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ได้

สรุปผลการทดลอง

การใช้เทคนิค ultrathin-layer isoelectric focusing เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์พืชนั้นสามารถทำได้ในพืชบางชนิด โดย น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดทานตะวัน และเมล็ดงาเพื่อ ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และตรวจสอบความ เป็นลูกผสมของพันธุ์ ได้ เนื่องจาก มีจำนวนแถบโปรตีนที่ แสดง ความแตกต่างกันหลา ย ตำแหน่ง ในกรณีของถั่วลิสงนั้น จำเป็นต้องปรับเทคนิคที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของสารละลาย หรือ ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้สกัดโปรตีนสะสมในเมล็ด เพื่อสกัดโปรตีนออกให้ได้มากที่สุด แม้ ว่าจะเป็นโปรตีนชนิดที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดก็ตาม เ พราะโปรตีนเหล่านี้อาจสามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ และการหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่ต้องการ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเ มล็ดพันธุ์งา ใช้เพียง 6 เมล็ด ก็สามารถนำมาตรวจส อบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ นับเป็นจุดเด่นของการตรวจสอบเมล็ดซึ่งใช้เมล็ดจำนวนน้อยก็สามารถตรวจสอบได้อย่างแม่นยำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 276 หน้า.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส. พิมพ์ครั้งที่1. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ. 85 น.

Arus, P. 1983. Genetic purity of commercial seed lots, pp. 415-423. *In* S.D. Tanksley and T.J Orton eds. Isozymes in Plant Genetics and Breeding (Part A), Elsevier. Amsterdam.

Beyer. K, L. Bardina, G. Grishin and H. A. Sampson. 2002. Identification of sesame seed allergens by 2- dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. J. Allergy Clin. Immunol. 110 (1):154-9.

Coolbear, P. and M. J. Hill. 1988. Seed quality control. pp. 331-342. *In* "Rice Seed Health", International Rice Germplasm Center, IRRI, Manila, Philippines.

International Seed Testing Association (ISTA). 1999. International Rules for Seed Testing. Seed Sci Technol. 27. (*Helianthus annuus* L.). J. Agric . Food Chem. 44:1184-1189. Supplement. 333 p-

Jacques, G., Y., I. N. Anisimova, R. J. Fido, P. R. Shewry and A. S. Tatham. 1996. Functionality of the 2S albumin seed storage proteins from sunflower

John, M. C., Jr. and R. L. Switzer. 1997. Experimental Biochemistry. W. H. Freeman and Company. U.S.A. 355 p.

Leist, N., E. Noli, R. Knoblauch and T. Thongket. 2003. ISTA/FAO Workshop on Electrophoretic and PCR-based Methods for Varietal Verification and GMO Detection. 25-29 Nov. 2003. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus.

McDonald, M. B. 1998. Seed quality assessment. Seed Sci. Res. 8:265-275.

Payne, R. C. 1987. Seed and cultivar Identification. Seed Sci. Technol. 15: 641-644.

Wang, X. F., R. Knoblaunch and N. Leist. 2001. Identification of varieties and testing of hybrid purity of rice by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. IRRN. 26:18-19.

Received 27 May 2009

Accepted 30 December 2009