



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

ปริญญา

ชีวเคมี

ชีวเคมี

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การทำเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสับดูทำให้บริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเซลล์มะเร็ง

Purification of Curcin from Seed Kernel of Physic Nut and Its Antibacterial and Anticancer Activity

นามผู้วิจัย นางสาวศันสนีย์พร กิตติขจร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนาโก, ป.ดร.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เกียรติวิ ชวงศ์โกมล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การทำเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสับดูคำให้บริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเซลล์มะเร็ง

Purification of Curcun from Seed Kernel of Physic Nut and Its Antibacterial and
Anticancer Activity

โดย

นางสาวสันสนีย์พร กิตติขจร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2553

ศันสนีย์พร กิตติขจร 2553: การทำเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำให้บริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเซลล์มะเร็ง ปริญาวิทยาสตราคมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) ภาควิชาชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุนันทา รัตนาโก, ปร.ด. 138 หน้า

เคอร์ซินเป็นโปรตีนพิษที่ทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีอย่างง่ายจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ *Jatropha curcas* Linn. (KUBP 33) การเตรียมสารสกัดหยาบของเคอร์ซินทำโดยการกวนเนื้อเมล็ดสบู่ดำที่บดละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH 7.5 นาน 24 ชม. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่ 4°C แล้วตัดไขมันที่ลอยอยู่บนบนออก ก่อนนำไปไลโซในสารละลายบัฟเฟอร์ sodium-acetate, pH 4.5 และปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนทิ้งไปเมื่อนำส่วนใสไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และเทคนิค MALDI-TOF Mass spectrophotometry พบว่าโปรตีนที่บริสุทธิ์นี้ประกอบด้วย 1 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตัน และเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 28.4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โปรตีนที่ทำบริสุทธิ์มีความเป็นพิษต่อการสังเคราะห์โปรตีน เนื่องจากพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ซึ่งออกฤทธิ์ในการตัดไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอใน reticulocyte lysate ของกระต่าย จากผลการทดลองวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS สรุปได้ว่าโปรตีนที่แยกได้เป็นเคอร์ซิน ในการศึกษานี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของเคอร์ซินบริสุทธิ์ที่แยกได้ในการต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในคน โดยเทคนิค agar dilution พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 17 ชนิด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 78.1 ไมโครกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร จากการทดสอบฤทธิ์ของเคอร์ซินบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB, ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7, ATCC HTB-22) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187, ATCC CRL-5804) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW 620, ATCC CCL-28) พบว่าไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทุกชนิด จากการตรวจหาปริมาณเคอร์ซินในเมล็ดสบู่ดำจำนวน 157 แหล่งปลูกที่รวบรวมจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ใน 38 จังหวัดทั่วประเทศไทย โดยเทคนิค Immuno-Western Blot และระบุปริมาณของเคอร์ซินด้วยพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเคอร์ซินและคำนวณความเข้มของแถบที่ปรากฏโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซินบริสุทธิ์ สามารถจัดหมวดหมู่ของสบู่ดำที่รวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ เป็น 4 กลุ่มตามปริมาณเปอร์เซ็นต์ของเคอร์ซินต่อน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง พบว่าเมล็ดสบู่ดำจาก 3 แหล่งปลูกไม่มีเคอร์ซินได้แก่ KUBP 19, KUBP 169 และ KUBP 187 เมล็ดสบู่ดำ KUBP 75 มีปริมาณเคอร์ซินสูงที่สุดเท่ากับ 9.09% (โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง)

Sansaneeayorn Kittikajhon 2010: Purification of Curcin from Seed Kernel of Physic Nut and Its Antibacterial and Anticancer Activity. Master of Science (Biochemistry), Major Field: Biochemistry, Department of Biochemistry. Thesis Advisor: Associate Professor Sunanta Ratanapo, Ph.D. 138 pages.

A toxin, curcin was simply purified from seed kernel of *Jatropha curcas* L. (KUBP 33). The crude curcin extract was prepared by stirring the grounded seed kernel in Tris buffer, pH 7.5 for 24 h. The fat in the upper layer was removed after standing at 4 °C and the extract was dialyzed against sodium acetate buffer, pH 4.5, followed by centrifugation to remove the pellet. The soluble purified curcin showed a major band of relative molecular weight of 29 kDa by SDS-PAGE. The purified curcin is a single polypeptide chain of molecular mass 28.4 kDa by MALDI-TOF MS. The toxicity on protein synthesis of the purified protein was shown by its rRNA *N*-glycosidase activity towards RNA from rabbit reticulocyte lysate. The LC-MS/MS analysis result revealed that the isolated protein was curcin. In this study the antimicrobial effect of the purified curcin was investigated by agar dilution technique. The result demonstrated inhibitory effect of curcin against 17 strains of the human-pathogenic bacteria with most potent to *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 and *Bacillus subtilis* ATCC6633 with MIC value at 78.1 µg/ml. The cytotoxic effects of the purified curcin to cell lines of oral cavity cancer (KB, ATCC CCL-17), breast cancer (MCF7, ATCC HTB-22), small cell lung cancer (NCI-H187, ATCC CRL-5804) and human colon cancer (SW620, ATCC CCL-28) were evaluated. The result showed that the purified curcin was not toxic to any cancer cell lines. Curcin in seed kernel of *J. curcas* of the total 157 accessions from various regions (38 provinces) of Thailand were evaluated by Western blotting probed with polyclonal antibody to curcin. The curcin content of each accession was calculated from its intensity by using the calibration curve of the purified curcin. The *J. curcas* accessions from various regions were classified into four groups based on the percentage of curcin content. The seed kernel of the three accessions including KUBP 19, 169 and 187 did not have any curcin. The highest curcin content of 9.09% (of kernel dry weight) was found in KUBP 75.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุนันทา รัตนาโก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก เป็นอย่างสูงที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้ และให้คำปรึกษาในด้านการทดลองตลอดจนการเรียบเรียงและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำในด้านการทดลองและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลฉวี เวชประสิทธิ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำในด้านการทดลองและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ดร. โชติกา หยกทองวัฒนา ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อ. สุขสันต์ สุทธิผลไพบุลย์ วุฒิสภากรมส่งเสริมการเกษตร, อ.แอนนา สายมณีรัตน์ และ ดร. วันวิสา สุคปนะเสริฐ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. วัชระ กษิณฤกษ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี และที่สำคัญขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และคำปรึกษาให้สำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ที่ให้การอบรม สั่งสอน ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษแก่ลูกทุกคน ถึงแม้จะทำงานหนักก็เพียงเพื่อให้ลูกทุกคนได้รับการศึกษาอย่างเต็มความสามารถ และให้กำลังใจลูกเสมอ ขอขอบคุณน้องสาวที่ให้กำลังใจเสมอมา เช่นเดียวกัน ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครูอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าทั้งหมดก็เพื่อให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จ

ศันสนีย์พร กิตติขจร

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

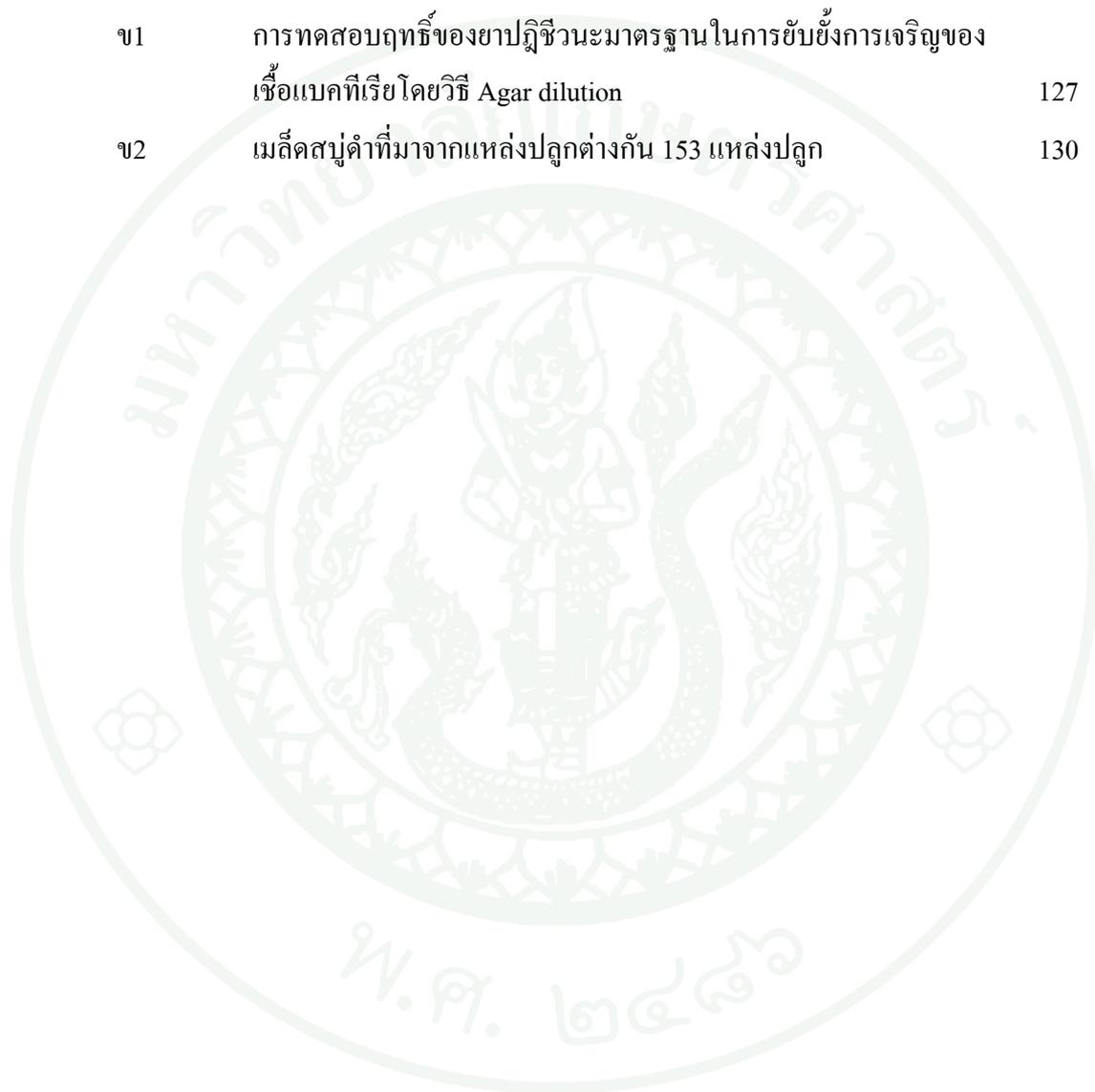
	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	40
ผลและวิจารณ์	59
ผล	59
วิจารณ์	87
สรุปและข้อเสนอแนะ	94
สรุป	94
ข้อเสนอแนะ	96
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	107
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลาย	108
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน, ภาพบนแผ่นฟิล์มจากเทคนิค Immuno-Western Blot และตาราง	115
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	138

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสบูดำที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค	14
2	สารสกัดพืชจากสบูดำป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช	15
3	ตัวอย่าง RIP Type I ที่พบในพืชบางชนิด	21
4	ตัวอย่าง RIP Type II ที่พบในพืชบางชนิด	24
5	ตัวอย่าง RIP Type II ที่พบในแบคทีเรียบางชนิด	24
6	ตัวอย่าง RIP Type III ที่พบในพืชบางชนิด	26
7	คุณสมบัติของ Ribosome-inactivating proteins (RIPs) ทั้ง 3 กลุ่ม	27
8	ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและอัตราส่วนของการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานบน SDS-PAGE	69
9	ปริมาณโปรตีนทั้งหมดต่อน้ำหนักเมล็ดแห้งที่แยกได้หลังจากการผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel, CM-Cellulose และ การปรับ pH	70
10	ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบจากเนื้อเมล็ดสบูดำ	76
11	ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบูดำ	76
12	ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบูดำในการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็ง	77
13	ปริมาณเคอร์ซินและโปรตีน (% ต่อน้ำหนักเมล็ดแห้ง) ในเนื้อเมล็ดสบูดำจากแหล่งปลูกต่างๆ	81
14	ปริมาณเคอร์ซินและโปรตีน (% ต่อน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ในเนื้อเมล็ดสบูดำจากสายพันธุ์ non-toxic สุขสันต์ 1, non-toxic สุขสันต์ 2 และเปลือกผลสบูดำจากสายพันธุ์ non-toxic, toxic	86

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	การทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar dilution	127
ข2	เมล็ดสับปะรดที่มาจากแหล่งปลูกต่างกัน 153 แหล่งปลูก	130



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำ	8
2	<i>J. curcas</i> L. (สบู่ดำ)	9
3	<i>J. gossypifolia</i> L. (สบู่แดง)	9
4	<i>J. podagrica</i> L. (หนุมานนั่งแท่น)	10
5	<i>J. integerrima</i> Jacq. (ปีตตาเวีย)	10
6	<i>J. multifida</i> L. (มะละกอฝรั่ง, ฝิ่นต้น)	11
7	แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของ RIPs	18
8	กลไกการออกฤทธิ์ของ RIP Type I	20
9	กลไกการออกฤทธิ์ของ RIP Type II	23
10	ชนิดของ Ribosome-inactivating protein	26
11	โครงสร้างสามมิติของเคอร์ซิน	30
12	ลำดับกรดอะมิโนของเคอร์ซิน (CUR) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน ของของ ricin (RTA) และ thicosanthin (TCS)	32
13	ลักษณะของเนื้อเมล็ด (kernel) ของสบู่ดำ	60
14	โครมาโตแกรมของการแยกเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	62
15	15% SDS-PAGE ของสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ (KUBP 33) ที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	63
16	โครมาโตแกรมของการแยกเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำโดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose	65

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	15% SDS-PAGE ของสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ (KUBP 33) ที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel นำส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (unbound) ไปแยกต่อโดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose	66
18	15% SDS-PAGE ของเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำที่ทำให้บริสุทธิ์โดยไคอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Sodium-Acetate, pH 4.5	68
19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและอัตราส่วนของการเคลื่อนที่ของโปรตีนบน SDS-PAGE	69
20	การศึกษามวลโมเลกุลของเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำโดย MALDI-TOF MS	71
21	การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำโดยเทคนิค In gel digestion และ LC-MS/MS ด้วยโปรแกรม MASCOT	72
22	Urea PAGE (6% gel/ 7 M urea) ของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ในเคอร์ซินบริสุทธิ์	74
23	การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระดาษต่อเคอร์ซิน	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ข1	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับสารสกัด หยาบจากเนื้อเม็ล็ดสบูดำ	116
ข2	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับสารละลาย เคอร์ซินที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	117
ข3	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับสารละลาย เคอร์ซินที่แยกโดยคอลัมน์ CM-cellulose	118
ข4	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับเคอร์ซินปริ สุทธิจากเนื้อเม็ล็ดสบูดำที่แยกโดยการปรับ pH	119
ข5	กราฟมาตรฐานของ RNA มาตรฐาน สำหรับการหาขนาดคู่เบสของชิ้น RNA ที่ถูกตัดจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ rRNA <i>N</i> -glycosidase	120
ข6	ความเข้มข้นของเคอร์ซินจากเนื้อเม็ล็ดสบูดำ KUBP33 ต่าง ๆ จากการทำให้ Immuno-Western Blot ที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม	121
ข7	กราฟมาตรฐานของเคอร์ซินที่หาได้จากการทำให้ Immuno-Western Blot	121
ข8	วิเคราะห์ปริมาณเคอร์ซินที่อยู่ในเม็ล็ดสบูดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ด้วย เทคนิค Immuno-Western Blot ที่แสดงบนแผ่นฟิล์ม	122
ข9	ตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ rRNA <i>N</i> -glycosidase และ aniline	126

การทำเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำให้บริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเซลล์มะเร็ง

Purification of Curcin from Seed Kernel of Physic Nut and Its Antibacterial and Anticancer Activity

คำนำ

สบู่ดำ (Physic nut) เป็นพืชที่เมล็ดประกอบด้วยน้ำมันปริมาณสูง โดยปัจจุบันน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดสบู่ดำหลังจากการทำ transesterification ได้รับการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล นอกจากนี้ยังนำไปใช้ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมสบู่ เครื่องสำอาง กากที่เหลือหลังการสกัดน้ำมันพบว่า มีโปรตีนสูงประมาณ 29-40% จึงได้รับความสนใจในการใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ อย่างไรก็ตามกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันดังกล่าวประกอบด้วยสารพิษซึ่งจำเป็นต้องกำจัดออกหรือทำลายพิษก่อนนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ จากการศึกษาที่มีมาก่อนพบว่าสารพิษตัวหนึ่งที่พบในกากเนื้อเมล็ดเป็นโปรตีนพิษชื่อ เคอร์ซิน (curcin) ซึ่งเคอร์ซินนี้จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไรโบโซมประเภทที่ 1 (Ribosome-inactivating protein Type I) เนื่องจากมีคุณสมบัติของเอนไซม์ *N*-glycosidase จึงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ยูคาริโอตได้ โดยเอนไซม์จะไปตัดพันธะ *N*-glycosidic ที่เชื่อมต่อกับ adenine (A) ที่ตำแหน่ง 4324 ของอาร์เอ็นเอไรโบโซมขนาด 28s (28s rRNA) ส่งผลให้ 28s rRNA อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนและทำให้เซลล์บริเวณนั้นตาย จากความเป็นพิษของเคอร์ซินนี้เองในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์นำเคอร์ซิน จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำมาใช้ทางการแพทย์เพื่อผลิตเป็นตัวยับยั้งการเกิดเนื้องอกของเซลล์ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา และไวรัส เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีผู้ทำการทดลองปลูกและพัฒนาปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำหลายสายพันธุ์ในประเทศไทย เพื่อคัดกรองหาสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงและไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงความแตกต่างของปริมาณ โปรตีนพิษเคอร์ซินในเมล็ดสบู่ดำ

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการแยกเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมีอย่างง่ายที่ไม่ซับซ้อน ศึกษาความแตกต่างของปริมาณเคอร์ซีนในเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ต่าง ๆ บางสายพันธุ์ และศึกษาสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์บางชนิด



วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเคอร์ซีนให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสนุ่นดำและศึกษาสมบัติทางโมเลกุล
2. เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเคอร์ซีนในเมล็ดสนุ่นดำบางสายพันธุ์
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของเคอร์ซีนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนและเซลล์มะเร็งบางชนิด

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ

1.1 ประวัติและแหล่งแพร่กระจาย

สบู่ดำ (Physic nut, Purging nut, Curcas bean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. อยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับ ขางพารา พญาไร้ใบ ปัตตาเวีย ฟีนตัน หรือมะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม ผักหวานบ้าน คริสต์มาส หน้อย่าง ส้มเช้า ฯลฯ คำว่า *Jatropha* มีรากศัพท์มาจากการแพทย์ของภาษากรีก 2 คำ คือ *iatros* แปลว่า หมอ และ *trophe* แปลว่า อาหาร ส่วนคำว่า *curcas* เป็นชื่อเรียกของสบู่ดำ บริเวณเมือง Malabar ในประเทศอินเดีย (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

นอกจากนี้สบู่ดำยังมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละประเทศอีกด้วย เช่น purging nut (อังกฤษ) pourghere, pignon d'Inde (ฝรั่งเศส) purgeernoot (เนเธอร์แลนด์) purgueira (โปรตุเกส) fagiola d'India (อิตาลี) kadam (เนปาล) yu-lu-tzu (จีน) tubang-bakod (ฟิลิปปินส์) jarak budeg (อินโดนีเซีย) bagani (ไอเวอรี่โคสต์) butuje (ไนจีเรีย) pinoncillo (เม็กซิโก) tempate (คอสตาริกา) mundubi-assu (บราซิล) pinol (เปรู) และ pinon (กัวเตมาลา) จึงเป็นที่น่าสังเกตได้ว่า ต้นสบู่ดำสามารถเจริญเติบโตได้เกือบทั่วโลก ทำให้มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป อย่างไม่รู้จบตามพืชชนิดนี้มีแหล่งแพร่กระจายในป่าดิบชื้นหรือพืชรกที่ปลูกก็ได้ ในพื้นที่แนวศูนย์สูตร อเมริกาใต้ อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย สบู่ดำเป็นพืชที่มีถิ่นฐานมาจากบราซิล นำเข้ามาในประเทศไทยนานกว่า 300 ปีแล้ว นักพฤกษศาสตร์เริ่มระบุถิ่นกำเนิดครั้งแรกว่าน่าจะมาจากรัฐ Ceara ในประเทศบราซิล ต่อมาก็สันนิษฐานว่าเป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกากลางจากแนวป่าชายฝั่งทะเลประเทศเม็กซิโก แต่ก็หาพันธุ์ป่าในเม็กซิโกไม่ได้ โดยมาพบเป็นพืชปลูกเป็นแนวรั้วกันสัตว์เข้ามาทำลายพืชผลมาแต่โบราณ แม้ว่าจะไม่มีส่วนไหนของสบู่ดำทำเป็นอาหารสัตว์ได้ แต่การที่สามารถปลูกเป็นรั้วกันสัตว์มาทำลายพืชผล จึงยังคงมีการปลูกกันอยู่ทั่วไปในประเทศเขตร้อน แม้แต่ “แพะ” ซึ่งเป็นสัตว์ที่กินทุกอย่างที่ออกจากคินก็ยังไม่จะต้องสบู่ดำ (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

ตัวอย่างสบู่ดำที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างพืชก็ได้จากข้างทางหรือจากพีชริมรั้ว แสดงเขตที่ดิน สันนิษฐานว่าชาวเรือโปรตุเกสที่มีอาณาบริเวณอยู่แถบทะเลแคริบเบียนได้นำพีชนี้มา ผ่านหมู่เกาะเคบเวิร์ด (แอฟริกาตะวันตก) ผ่านประเทศแถบชายฝั่งของแอฟริกาเข้าสู่เอเชียทางช่องแคบมะละกา การขนส่งค้าขายมาในรูปแบบพีชน้ำมัน เมื่อขายผ่านมาเลเซียในสมัยอาณานิคมของดัตช์ น้ำมันนี้จึงถูกเรียกในภาษามลายูว่า “น้ำมันละหุ่งดัตช์” ชาวเกาะชวาในอินโดนีเซียรู้จักในนาม “น้ำมันละหุ่งจีน” น้ำมันสบู่ดำจัดอยู่ใน “น้ำมันละหุ่ง” ชนิดหนึ่ง ซึ่งอธิบายได้ว่าสบู่ดำถูกนำพันธุ์ มาปลูก ก็เพื่อผลิตเป็นน้ำมันมาตั้งแต่เริ่มแรก และชื่อที่ถูกเรียกทั่วไปว่าเป็น “ต้นน้ำมันละหุ่งรั้ว” คำว่า “รั้ว” แสดงว่าการเข้ามาในฐานะพืชปลูกไม่ใช่พืชป่า ยางในต้นและเมล็ดเป็นพองตามธรรมชาติ อันเป็นคุณสมบัติพิเศษเฉพาะตัว ชาวโปรตุเกสใช้น้ำมันผลิตเป็นสบู่และนำเข้ามาในประเทศไทย กว่า 300 ปีมาแล้วในช่วงปลายสมัยกรุงศรีอยุธยา คำว่า “สบู่” ก็เป็นคำที่ยืมมาใช้จากภาษาโปรตุเกส และเป็นที่มาของชื่อนี้ (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

ปัจจุบันสบู่ดำมีปลูกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศไทยและมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป สาเหตุที่เรียกว่าต้นสบู่ดำ หรือต้นสบู่ เพราะมีน้ำยางสีขาวคล้ายสบู่ที่บริเวณลำต้นและกิ่ง ทางภาคกลางเรียก “สบู่ หรือ สบู่ดำ” เพราะเปลือกเมล็ดเป็นสีดำ “สบู่ขาว” เพราะเมล็ดในสีขาว “สบู่หัวเทศ สลอลดำ สลอลป่า สลอลใหญ่” ภาคเหนือเรียก “มะหุ่งฮั่ว ละหุ่งฮั่ว มะหั่ว มะโห่ง” เนื่องจากคล้าย ละหุ่งและปลูกเป็นรั้วป้องกันสัตว์เข้ามากินพืชผลเพราะกลิ่นเหม็นเขียวหรือพิษที่เป็นยาถ่ายของใบ ชาวเขาเรียกว่า “ไทยู่ เกงยู่” ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียก “มะเยา หมากเยา บักเยา” ชาวโคราชเรียก “สีหลอด” เพราะเป็นยาถ่ายคล้ายสลอล ภาคใต้เรียก “มะหงเทศ หงเทศ” มาจากละหุ่งที่นำเข้ามาจาก ต่างประเทศ (ละหุ่งเทศ) ในภาษายาวีเรียก “ยาเกาะ ยามะ” (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

การเจริญเติบโต ลำต้นสูงขึ้นเรื่อย ๆ ไม่ค่อยแตกกิ่งก้านจึงควรตัดกิ่งบ่อย ๆ เพื่อให้ต้นแตกกิ่งก้าน ระยะปลูก 2x2.5 ตารางเมตร ฤดูปลูกที่เหมาะสมเป็นช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม พื้นที่ปลูกควรเลือกพื้นที่ดอน น้ำไม่ท่วมขัง อยู่กลางแจ้ง แสงแดดจัด เช่น คันทนา นาดอนจัด หัวไร่ปลายนา ริมรั้วบ้าน (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

การขยายพันธุ์สบู่ดำมี 2 แบบด้วยกันคือ ใช้เมล็ดที่ไม่มีระยะพักตัว ควรเก็บฝักขณะมีสีเหลืองแก่แก่เมล็ดน้ำตาล แล้วรีบแกะเมล็ดเพาะทันทีความงอกเกิน 90% จะให้ผลผลิตประมาณ 8 เดือนขึ้นไปหลังปลูก และใช้ท่อนพันธุ์ที่มีสีน้ำตาลปนเขียวเล็กน้อยยาว 45-50 เซนติเมตร เริ่มออก

ดอกให้ผลผลิต 4-6 เดือนหลังปลูก การเตรียมดินจะไถหรือไม่ไถก็ได้ ขุดหลุมกว้าง 20 ซม. ลึก 20 เซนติเมตร รองก้นหลุมด้วยปุ๋ยหมักปุ๋ยคอกถ้ามีดินเลวปลูกถึดินดีปลูกห่าง ระยะปลูก 2.5 ± 2 เมตร กับ 3 ± 3 เมตร ถ้ามีต้นสบู่ดำอยู่แล้วก็ตัดยาว 45-50 เซนติเมตร มาปลูกขณะที่ดินมีความชื้น ให้ท่อนพันธุ์ฝังอยู่ในดินลึก 20 ซม. หรือจะซื้อต้นพันธุ์เพาะชำหรือเพาะจากเมล็ดในถุงดำมาปลูกก็ได้ ก่อนปลูกรดน้ำให้ดินในถุงชุ่ม ใช้มือกดถุงดำโดยรอบให้ดินติดยึดรากสบู่ดำแน่น แล้วถ่ายต้นสบู่ดำออกจากถุงได้ง่ายลงในหลุม เก็บถุงดำไว้ใช้ต่อได้อีก ถ้าอยู่กลางทุ่งใช้ไม้ปักผูกด้วยเชือกฟางพลาสติก ป้องกันลมแรงพัดโยกคลอน หลังจากนั้นจะปลูกพืชแซมอาทิถั่วต่าง ๆ พริก มะเขือ อื่น ๆ ยกเว้นข้าวโพด ต้นสบู่ดำทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี เมื่อปลูกได้ราว 1 เดือนสังเกตต้นจากการเพาะเมล็ดบางสายพันธุ์ สูงชะลูดไม่แตกกิ่งก้านสาขา ขอให้เด็ดยอดยาวสัก 7-10 เซนติเมตร ออกเพื่อให้ตาข้างล่างแทงยอดเป็นพุ่ม ซึ่งจะได้ผลผลิตมากกว่าไม่เด็ดยอด เมื่อหมดฤดูฝนดินเริ่มแห้งมากขึ้นตามลำดับ ต้นสบู่ดำจะทิ้งใบเหลืองแต่ลำต้น ในช่วงฤดูร้อนหากมีฝนตกก็จะแตกใบอ่อนออกดอกติดฝัก ถ้าไม่มีฝนช่วยอีกเมล็ดจะลีบฝ่อ พอเข้าฤดูฝนต้นสบู่ดำจะทยอยออกดอกติดฝักตลอดฤดู ถ้ามีรดน้ำต่อหลังหมดฝน ใบจะไม่ร่วงเขียวขจีให้ผลผลิตตลอดปี แมลงศัตรูที่ควรระวังดูแลพิเศษได้แก่ เพลี้ยหอย เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง ไรขาว ไรแดง ส่วนโรคเกิดจากเชื้อรา ประสบ้างแต่ทำความเสียหายไม่มากนัก (สุขสันต์ สุทธิผลไพบุลย์, 2550)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยา

ต้นสบู่ดำเป็นพืชที่มีจำนวน โครโมโซมแบบดิพลอยด์ ($2n = 22$) เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ 2-7 เมตร มีอายุไม่น้อยกว่า 20 ปี ลำต้นและยอดเกลี้ยงเกลาไม่มีขน อวบน้ำ เป็นไม้เนื้ออ่อน เนื้อไม้ไม่มีแก่น ระบบรากเป็นแบบรากแก้ว (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว แผ่นใบเป็นแบบ palmately compound, orbicular-cardate (broadly-ovate) คล้าย ๆ ใบพุดตาลหรือใบฝ้าย แต่หนากว่าเพราะมีพวกไขเคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบมีรอยหยักตื้น ๆ ตั้งแต่ 3-7 หยัก กว้างและยาวประมาณ 6-15 เซนติเมตร (ขึ้นกับพันธุ์และความสมบูรณ์ของต้น) ฐานใบเป็นแบบ cordate ปลายเป็นแบบ mucronate ยกเว้นปลายใบตรงตำแหน่งหยักตรงกลางเป็นแบบ acute การจัดเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบ palmately netted แผ่นใบมีสีเขียว ใบไม้ ขนาดของแผ่นใบเฉลี่ยมีความยาวประมาณ 19.78 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 16.67 เซนติเมตร ใบสบู่ดำมีส่วนของก้านใบเชื่อมติดกับส่วนของลำต้น ก้านใบสีเขียว ความยาว

ก้านใบประมาณ 2.5-7.5 เซนติเมตร ตำแหน่งของการเกิดใบจะเกิดสลับกัน สบู่ดำมักจะทิ้งใบในฤดูแล้งและเมื่อแล้งจัดก็จะทิ้งใบหมดทั้งต้น

ดอก ออกบริเวณปลายกิ่ง ลักษณะเป็นช่อดอกแบบ compound dichasia เป็นดอกไม้สมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่แยกกัน (monoecious) แต่อยู่ภายในช่อดอกเดียวกัน โดยออกเป็นช่อบริเวณซอกใบส่วนปลายของยอด ช่อดอกยาวประมาณ 6-10 เซนติเมตร ลักษณะดอกเป็นรูปถ้วย ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกจำนวน 5 กลีบ เท่า ๆ กัน กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อนอมเหลือง กลีบดอกมีสีเหลืองอมขาว มีต่อมน้ำหวานติดอยู่ที่โคนด้านในของกลีบดอก ดอกตัวผู้มีจำนวนเกสรตัวผู้จำนวน 10 อัน เรียงเป็นวงละ 5 อัน 2 ชั้น ดอกตัวเมียประกอบด้วยรังไข่และยอดเกสรตัวเมียเป็นรูปสามง่าม ส่วนของรังไข่แบ่งออกเป็น 3 พู (carpel) อัตราส่วนของตัวผู้ : ดอกตัวเมีย ประมาณ 7:1 สบู่ดำเป็นพืชผสมข้าม ดอกตัวผู้ในช่อเดียวกันบานก่อนที่ดอกตัวเมียพร้อมที่จะรับการผสม (receptive) จึงต้องมีแมลงช่วยในการผสมพันธุ์ เช่น ผีเสื้อกลางคืน และผึ้ง โดยดอกตัวผู้และตัวเมียจะมีความพร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ในช่วงกลางคืน ดอกสมบูรณ์เพศหรือดอกกะเทยที่สามารถผสมตัวเองได้ จะพบในปริมาณน้อย ปริมาณดอกย่อยประมาณ 70-120 ดอกต่อ 1 ช่อ แต่จะติดผลเพียง 6-15 ผลเท่านั้น

ผล มีรูปร่างค่อนข้างกลมและป้อม บางทีก็มีเหลี่ยม มี 3 พู ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.04 เซนติเมตร ผลที่เกิดจากช่อดอกเดียวกันจะสุกไม่พร้อมกัน ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองสดและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนคล้ายลูกจันทร์ เปลือกกลายเป็นช่อช่อพวงมีหลายผล รูปผลมีลักษณะทรงกลมรีเล็กน้อย ผลมีขนาดปานกลาง กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร เปลือกหนาปานกลาง ผลหนึ่งส่วนมากมี 3 พู ๆ ละ 1 เมล็ด โดยแต่ละพูทำหน้าที่ห่อหุ้มเมล็ดไว้ เมื่อสุกแก่ผลจะปริแตก ผลสด 1 กิโลกรัม มีจำนวน 85-90 ผล และผลสด 1 ผล มีน้ำหนักประมาณ 15.06 กรัม ผลแห้งน้ำหนักจะลดลงเหลือเพียง 2.60 กรัม อายุของผลสบู่ดำตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ประมาณ 60-90 วัน

เมล็ด รูปร่างเมล็ดของสบู่ดำเป็นแบบรี มีเปลือกหุ้มสีดำ โดยมีเนื้อเยื่ออยู่ภายในเป็นที่สะสมพวกน้ำมันและสารพวกเคอร์ซิน เมล็ดประกอบด้วยเนื้อเมล็ดสีขาว (albumen หรือ kernel) ประมาณ 32% น้ำมัน 30-38% และเปลือก 30-38% ของน้ำหนักเมล็ด ซึ่งในปริมาณน้ำหนัก 100 เมล็ดจะหนักประมาณ 69.8 กรัม หรือประมาณ 1,000-2,000 เมล็ด/กิโลกรัม ส่วนของเนื้อเมล็ดและเปลือกมีน้ำมันประมาณ 51.99-62% และ 0.98% ของน้ำหนักเมล็ดตามลำดับ ขนาดของเมล็ดมีความ

ยาวเฉลี่ยประมาณ 1.94 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.16 เซนติเมตร เมล็ดแต่ละเมล็ดมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 0.64 กรัม เมล็ดสบู่ดำไม่มีการพักตัว

น้ำยาง มีลักษณะใส ไม่มีสี พบมากในส่วนของลำต้นอ่อนและก้านใบ ลำต้นแก่พบเฉพาะที่เปลือกเท่านั้น (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)



ภาพที่ 1 ส่วนต่าง ๆ ของต้นสบู่ดำ

ที่มา: สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่ (2548)

1.3 ชนิดพันธุ์ของสบู่ดำ (ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

1.3.1 พืชสกุลของสบู่ดำที่พบในประเทศไทย มี 5 ชนิด คือ *J. curcas* L. (สบู่

ดำ), *J. gossypifolia* L. (สบู่แดง), *J. podagrica* L. (หนุมานนั่งแท่น), *J. integerrima* Jacq. (ปีตตาเวีย) และ *J. multifida* L. (มะละกอฝรั่ง, ฟีนตัน) ดังภาพที่ 2 – 6



ภาพที่ 2 *J. curcas* L. (สบู่ดำ)



ภาพที่ 3 *J. gossypifolia* L. (สบู่แดง)



ภาพที่ 4 *J. podagrica* L. (หนุมนั่งแท่น)



ภาพที่ 5 *J. integerrima* Jacq. (ปีตตาเวีย)



ภาพที่ 6 *J. multifida* L. (มะละกอฝรั่ง, ฟินตัน)

1.3.2 พันธุ์ของสบู่ดำที่พบในประเทศไทย มี 3 พันธุ์ คือ

1.3.2.1 พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม ขนาดของผลปานกลาง มีเปลือกหนาปานกลาง ปลูกกันทั่วไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

1.3.2.2 พันธุ์สบู่ดำที่มีผลทรงกลม หรือรูปทรงของผลยาวกว่าพวกแรกเล็กน้อย ส่วนผลนั้นมีขนาดเท่ากัน แต่มีเปลือกหนากว่า ปลูกมากในภาคเหนือ

1.3.2.3 พันธุ์สบู่ดำที่มีผลกลม แต่มีขนาดเล็กกว่า 2 พวกแรก ปลูกในภาคเหนือ และภาคใต้ โดยพันธุ์เป็นพันธุ์พื้นบ้านใช้เรียกชื่อตามแหล่งปลูก เช่น พันธุ์สุลุมุคอาหาร น่าน เป็นต้น

1.3.3 พันธุ์ของสบู่ดำจากต่างประเทศ กรมวิชาการเกษตร ได้รับพันธุ์จากต่างประเทศ 3 พันธุ์ คือ

1.3.3.1 พันธุ์จากประเทศฟิลิปปินส์

1.3.3.2 พันธุ์จากประเทศศรีลังกา

1.3.3.3 พันธุ์จากประเทศมาเลเซีย

1.4 ความเป็นพิษของสบู่ดำ

พิษของสบู่ดำที่พบในสัตว์ทดลอง เช่น หนู จะมีพิษต่อระบบประสาท จากงานวิจัยที่ผ่านมามีค่า LD_{50} เมื่อให้น้ำมันจากเมล็ดสบู่ดำทางปากของหนู มีค่าเท่ากับ 6 มล./กก. น้ำหนักหนูขาว (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2549)

นอกจากนี้ยังพบพิษต่อสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น ม้า ฤทธิ์ของเมล็ดจะทำให้เกิดการขาดน้ำ ผลจากการถ่ายท้อง พิษของเมล็ดต่อมนุษย์หากได้รับสารพิษนี้ เช่น รับประทานเมล็ดพืช 1-20 เมล็ด จะปรากฏอาการพิษภายหลังกินประมาณครึ่งชั่วโมง ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน คล้ายอาหารเป็นพิษ ปวดท้อง ท้องเสีย ถ่ายเหลว รายที่มีอาการรุนแรง อาจมีอาการเกร็งของกล้ามเนื้อที่มือและเท้า หายใจเร็ว หอบ ความดันเลือดต่ำ คลื่นหัวใจไฟฟ้าผิดปกติ บางรายอาจถึงตายได้

1.5 การใช้ประโยชน์ของสบู่ดำ

1.5.1 การปลูกต้นสบู่ดำเพื่อนำไปใช้ประโยชน์

1.5.1.1 เป็นรั้วล้อมรอบพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจหลัก ๆ เพื่อป้องกันวัชควายเข้ามาทำความเสียหายต่อพืชชนิดนั้น เนื่องจากวัชควาย จะไม่กินใบหรือยอดอ่อนของสบู่ดำ (Diallo, 1994) นอกจากนี้อินเดียปลูกเป็นรั้วป้องกันลมร้อนในฤดูร้อนที่ทำให้มีการระเหยของน้ำอย่างรวดเร็ว

1.5.1.2 ปลูกสบู่ดำป้องกันการชะล้างของดิน (soil erosion) ในฤดูฝนของเขตพื้นที่แห้งแล้ง พบที่ Cape Verde เป็นพืชสบู่ดำ 14.6 % ของพื้นที่ทั้งหมด 4,462 เฮกเตอร์ (Spaak, 1990)

1.5.1.3 ในประเทศมาดากัสการ์ ปลูกสบู่ดำสำหรับเป็นเสาข้างของพืชวนิลา

1.5.1.4 ในบางพื้นที่ของประเทศอินเดียปลูกพืชสมุนไพร ได้แก่ *Asgandh* (*Withania somnifera*) แคมในระหว่างต้นสบู่ดำ สารเคมีจากต้นสบู่ดำจะถูกปลดปล่อยออกมาจับได้แมลงศัตรูของพืชสมุนไพร

1.5.2 การใช้เป็นอาหารของคน

1.5.2.1 Duke (1985) กล่าวว่าส่วนของใบอ่อนหรือยอดอ่อนเมื่อนำไปนึ่งด้วยไอน้ำร้อนแล้วสามารถนำมารับประทานได้อย่างปลอดภัย

1.5.2.2 เมล็ดสบู่ดำจากบางพื้นที่ของประเทศเม็กซิโกเมื่อนำมาต้มและคั่วด้วยความร้อนสามารถนำไปรับประทานได้ (Apone, 1978)

1.5.3 การใช้เป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากกากสบู่ดำ (press cake) มีคุณค่าทางอาหารสูง แต่ประกอบด้วยสารพิษมากมาย ได้แก่ เคอร์ซีน, phorbol esters, saponin, protease inhibitors และ phytates การนำกากสบู่ดำไปใช้เลี้ยงสัตว์จึงต้องนำกากสบู่ดำมาผ่านกระบวนการกำจัดสารพิษก่อนโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมีหรือการหมักกากสบู่ดำด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* (Gübitz *et al.*, 1997)

Gübitz *et al.* (1997) รายงานว่าการใช้ใบของพันธุ์สบู่ดำจากประเทศเม็กซิโกเลี้ยงไหมป่า (eri silkworm) ทำให้ไหมป่ามีชีวิตรอดเพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นและน้ำหนักเปลือกไหมต่ำกว่าไหมป่าที่เลี้ยงด้วยใบละหุ่ง แต่ในอียิปต์ใช้ใบสบู่ดำเลี้ยงไหมป่า tusser

1.5.4 การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำโดยภูมิปัญญาพื้นบ้านนำมาใช้เป็นยารักษาโรคของคนได้ Duke (1985) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค

ส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำ	สรรพคุณทางเภสัช
ต้น	ยาถ่าย
เปลือก	ยาถ่าย ขับพยาธิ แก้ปวดท้อง
ใบและเนื้อไม้	แก้พิษตานซาง ถอนพิษที่ทำให้ตัวร้อน แก้ปาก
เมล็ด	และลื่นเปื่อยพุพอง แก้ลื่นเป็นฝ้าละออง
ยาง	แก้ปวดตามข้อ แก้โรคผิวหนัง เป็นยาระบาย ยาถ่ายอย่างแรง แก้ปากเปื่อย พุพอง และแก้ลื่นเป็นฝ้า

1.5.5 การใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์

ส่วนต่าง ๆ ของสบู่ดำจากต้นสด ๆ สามารถนำมาเป็นปุ๋ยพืชสดได้ (Oudhia, 2003)

Sherchan *et al.* (1989) รายงานว่าการใช้สบู่ดำเป็นปุ๋ยพืชสดจะทำให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้น 11 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ Vohringer (1987) รายงานว่า กากน้ำมันสบู่ดำมีสารประกอบไนโตรเจนสูงเช่นเดียวกับกากน้ำมันละหุ่งและมูลไก่ โดยมีไนโตรเจน 3.2-3.8 เปอร์เซ็นต์ โครงการ GTZ ในประเทศมาลีได้ใช้กากน้ำมันสบู่ดำ 5 ตันต่อเฮกแตร์ สามารถเพิ่มผลผลิตของ pearl millet ได้ (แปลงควบคุม 630 กิโลกรัม/เฮกแตร์ แปลงที่ใช้กากสบู่ดำ 1,366 กิโลกรัม/เฮกแตร์) Moreira (1970) ใช้กากสบู่ดำในอัตราต่าง ๆ ใส่แปลงปลูกพืชหลายชนิดพบว่า การใช้ในอัตรา 5 ตันต่อเฮกแตร์จะให้การงอกของเมล็ดพืชลดลง (แสดงความเป็นพิษต่อพืช)

1.5.6 การใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสีธรรมชาติสำหรับย้อมเส้นใยธรรมชาติ จากเอกสารทางอิเล็กทรอนิกส์ที่รายงานว่าส่วนเปลือกของลำต้นและรากของสบู่ดำสามารถเป็นวัตถุดิบในการผลิตสีธรรมชาติได้ โดยส่วนเปลือกจะให้สีน้ำเงินเข้ม ส่วนรากจะให้สีเหลือง

1.5.7 การใช้เป็นพลังงาน นอกจากการใช้น้ำมันสบู่ดำแปรรูปเป็น methyl หรือ ethyl esters สำหรับผสมน้ำมันดีเซลเป็นไบโอดีเซลแล้วและส่วนอื่น ๆ ของสบู่ดำสามารถใช้เป็นพลังงานได้ด้วยเหมือนกัน ดังนี้ ใน Cape Verde ใช้ส่วนลำต้นและกิ่งใหญ่ใช้เป็นฟืนสำหรับให้ความร้อนแต่เป็นแหล่งที่ให้พลังงานต่ำ Gübitz *et al.* (1997) รายงานว่าการหมักเปลือกผลสบู่ดำและกากน้ำมันสบู่ดำในสภาพไร้อากาศจะได้ก๊าซชีวภาพ ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์เป็นก๊าซมีเทน

1.5.8 เมล็ดสบู่ดำบดเป็นผงสำหรับใช้เคลือบเครื่องหนังเป็นสีน้ำตาล (tanning)

1.6 การประยุกต์ความเป็นพิษของสบู่ดำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

1.6.1. สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช (insecticides) มีรายงานการใช้สารสกัดพืชจากสบู่ดำป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารสกัดพืชจากสบู่ดำป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช

Insect	Pest of	Preparation	Reference
<i>Helicoverpa armigera</i>	Cotton	Acetone extract of seeds; aqueous extract from oil; seed oil	Solsoloy <i>et al.</i> (1987), Solsoloy (1993; 1995)
<i>Aphis gossypii</i>	Cotton	Aqueous extract from oil; seed oil	Solsoloy (1993; 1995)
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Cotton	Aqueous extract from seed oil	Solsoloy (1993)
<i>Empoasea biguttula</i>	Cotton	Seed oil	Solsoloy (1995)
<i>Phthorimaca operculella</i>	Potato	Seed oil	Shelke <i>et al.</i> (1985)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Insect	Pest of	Preparation	Reference
<i>Callosobruchus maculatus</i>	Pulse	Seed oil	Jadhav (1984)
<i>Callosobruchus chinensis</i>	Mungbean	Seed oil	Solsoloy (1995)
<i>Sitophilus zoamays</i>	Corn	Seed oil	Solsoloy (1995)

1.6.2 สารกำจัดหอย (molluscicides)

Agaceta *et al.* (1981) รายงานว่าในประเทศฟิลิปปินส์ใช้สารสกัดจากสบู่ดำกำจัดหอยที่เป็นพาหนะของพยาธิใบไม้ในตับ (liver fluke)

Vassiliades (1984) พบว่าในประเทศเซเนกัล สารสกัดพืชจากสบู่ดำสามารถกำจัดหอยที่เป็นพาหนะของพยาธิ *Fasciola gigantica* และ *Schistosomia*

Liu *et al.* (1996) กล่าวว่าสารสกัด phorbol esters จากเมล็ดสบู่ดำสามารถกำจัดหอยพาหะของพยาธิ *Schistosomia*

1.6.3 สารกำจัดเชื้อรา (fungicides)

รังษีและคณะ (2548) รายงานว่าน้ำสกัดจากเปลือกผลสบู่ดำสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนและเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงได้ 100% เท่ากับสารเคมีเมทราแลกซิลและโปรคลอราซตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดสบู่ดำสามารถยับยั้งการสร้าง sporangia zoospore และการงอก zoospore ของ *P. palmivora* ได้ 91.67, 95.83 และ 100% ตามลำดับ รวมทั้งสามารถยับยั้งการสร้างยับยั้งการสร้างและการงอก conidia ของ *C. gloeosporioides* ได้ 100%

Garcia and Lawas (1990) รายงานว่าน้ำสกัดจากใบสนุ่นดำสามารถควบคุมโรคพืชของ *Azolla* ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium* sp. Thangavelu *et al.* (2004) รายงานว่าการใช้สารสกัดสนุ่นดำที่ความเข้มข้น 25 และ 50% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยได้ 100%

Wei *et al.* (2005) รายงานว่าสาร β 1, 3-glucanase จากเมล็ดสนุ่นดำสามารถฆ่าเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Gibberella zeae* ได้ และสรุปว่าสารชนิดนี้มีศักยภาพเป็นสารชีวภาพที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (biological fungicide)

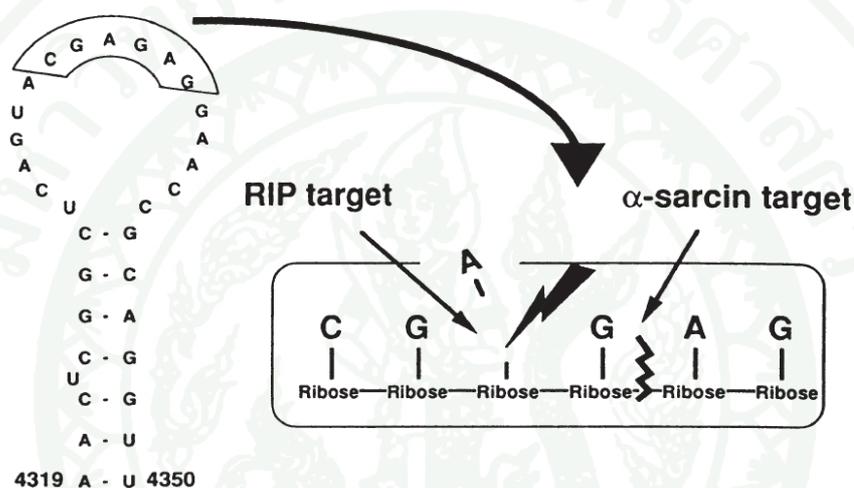
2. โปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไรโบโซม (Ribosome-inactivating proteins, RIPs)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพืชโดยส่วนใหญ่จะมีการสะสมโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไรโบโซมหรือ RIPs อยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก ใบ ต้น เปลือก ดอก ผล และเมล็ด แต่พืชบางชนิดพบเฉพาะบางเนื้อเยื่อเท่านั้น สำหรับปริมาณของ RIPs ในเนื้อเยื่อพืชก็จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของพืชนั้น ๆ ซึ่ง RIPs พบครั้งแรกในพืชดอก (Angiospermae) ทั้งที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ นอกจากนี้ยังพบ RIPs ในเห็ดและสาหร่ายบางชนิดด้วย (Barbieri *et al.*, 1993)

ตัวอย่างฤทธิ์ทางชีววิทยาของโปรตีนเหล่านี้ คือความเป็นพิษของเมล็ดกะหล่ำ (*Ricinus communis*) และเมล็ดมะกั่วตาหนู (*Abrus precatorius*) อีกทั้งฤทธิ์ที่ทำให้เกิดการแท้งของพืชตระกูลมะระจีน (*Trichosanthes kirilowii*) และมะระจีนก (*Momordica charantia*) ล้วนเป็นผลมาจากโปรตีนในกลุ่ม RIPs ทั้งสิ้น แต่ก็ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด

Stillmark (1888) พบว่า ricin เป็นโปรตีนพิษที่พบในเมล็ดกะหล่ำ โดยเป็นโปรตีนจากพืชชนิดแรกที่สามารถระบุฤทธิ์ทางชีวภาพที่ชัดเจนคือสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระบบที่ปราศจากเซลล์ (cell-free system) ricin สามารถทำให้ไรโบโซมอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (He and Liu, 2003) โดยคุณสมบัติที่เป็นเอนไซม์ rRNA N-glycosidase (EC 3.2.2.22) ซึ่งจะไปตัดพันธะ N-glycosidic ระหว่าง adenine ที่ตำแหน่ง A4324 บน 28s rRNA จากตับหนู (ภาพที่ 7) ตำแหน่งของ adenine ดังกล่าวอยู่ใกล้กับตำแหน่งการตัดของแอลฟา-ซาร์ซิน (α -sarcin) ที่เรียกว่า Sarin/Ricin domain ซึ่งเป็นส่วนที่อนุรักษ์มากในไรโบโซม และเป็นส่วนที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์

ได้ง่ายตรงพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่าง G4325 และ A4326 บน 28s rRNA (Liu *et al.*, 2003; Maro *et al.*, 1993) ตำแหน่ง Sarcin/Ricin domain เป็นตำแหน่งจดจำและจำเพาะสำหรับ elongation factor 1 (eEF-1 / EF-Tu) และ elongation factor 2 (eEF-2/EF-G) complexes ของทั้งโพรแคริโอต และยูแคริโอต (Moazed *et al.*, 1998) จะเข้ามาทำปฏิกิริยา ดังนั้นเมื่อ 28s rRNA ถูกตัดที่ตำแหน่งดังกล่าวจึงทำให้ไรโบโซมอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้เป็นผลให้ไรโบโซมนั้นไม่สามารถจับกับ EF ได้ จึงทำให้กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหยุดลง (Xu and Liu, 2000; He and Liu, 2003)



ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของ RIPs

ที่มา: Stirpe (2004), Stirpe and Battelli (2006)

2.1 การจำแนกชนิดของ RIPs

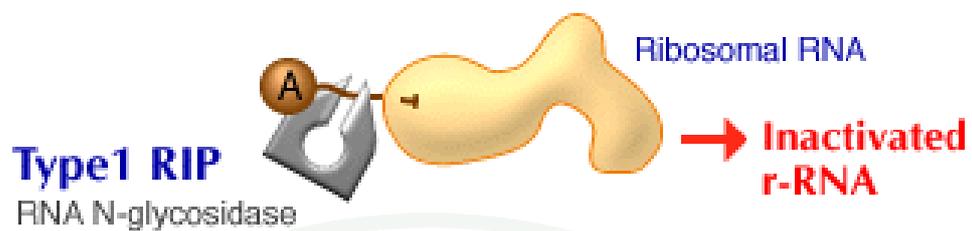
ในปัจจุบันนี้โปรตีน RIPs สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ RIP Type I, RIP Type II และ RIP Type III ซึ่งจำแนกโดยอาศัยโครงสร้างโมเลกุล และลักษณะทางชีวเคมี

2.1.1 Ribosome-inactivating protein Type I (RIP Type I)

สาร RIP ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Type I RIPs อย่างเช่น saporin, trichosanthin และ pokeweed antiviral protein (PAP) ซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 1 สาย ที่มีขนาดประมาณ 25-30 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติเป็น rRNA N-glycosidase มีฤทธิ์ต้านไวรัสได้ แต่ว่า RIP Type I ในพืชบางชนิด ได้แก่ *Iris* จากพืช *Iris hollandica* ซึ่งประกอบด้วย 2 สายโพลีเปปไทด์สายสั้นที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแบบ non-covalent (Van Damme *et al.*, 1997) RIP Type I มีความเป็นเบสสูงคือมีค่า pH อยู่ในช่วง 7-10 และโดยส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง 8.3-9.5 ตารางที่ 3 และมีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์น้อยกว่า RIP Type II เนื่องจาก RIP Type I ไม่มีส่วนที่สามารถจะจับกับผิวเซลล์ได้ จึงทำให้เข้าไปยังไซโทพลาซึมได้ค่อนข้างยาก เป็นผลให้ RIP Type I มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า (Stirpe and Barbier, 1986)

กลไกการออกฤทธิ์ของ RIP Type I ขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ N-glycosidase ที่สามารถตัดพันธะ N-glycosidic ระหว่าง adenine (A4324) กับน้ำตาลไรโบสใน 28s rRNA ได้ จึงทำให้ adenine หลุดออกไปเป็นอิสระ rRNA จึงอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานต่อไปได้ ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนหยุดชะงักลง เซลล์บริเวณนั้นจึงตาย (ภาพที่ 8)

RIP Type I จะมีความเป็นพิษสูงหากมีการเชื่อมต่อกับโมเลกุลที่สามารถนำโปรตีนเข้าสู่เซลล์ได้ เช่น Gelonin จากเมล็ดของ *Gelonium multiflorum* ที่เชื่อมต่อกับ Concanavalin A มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า Gelonin อิสระ (Stirpe *et al.*, 1980) RIP Type I พบมีการกระจายในพืชมากกว่า RIP Type II และมักพบในพืชที่อยู่ในตระกูลของ Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Eupobiaceae และอื่น ๆ (Stirpe *et al.*, 2004) ตัวอย่าง RIP Type I แสดงในตารางที่



ภาพที่ 8 กลไกการออกฤทธิ์ของ RIP Type I

ที่มา: Lord, J. M. *et al.* (1994)

ตารางที่ 3 ตัวอย่าง RIP Type I ที่พบในพืชบางชนิด

Species	Name of RIPs	Organ	MW (kDa)	pI	IC ₅₀ (nM)	Ref
<i>Phytolacca americana</i> (pokeweed)	PAP	spring leaf	29	}	1.10	Hartley and Lord (2004); Bonness <i>et al.</i> (1994)
	PAP II	summer	30		3.90	
	PAP-S	leaf	31		6.70	
<i>Phytolacca heterotepala</i>	heterotepalin 4	leaf	29.3	}	0.82	Maro <i>al.</i> (2007)
	heterotepalin 5b	leaf	30.5		0.52	
<i>Phytolacca dioica</i>	dioicin 1	leaf	30.1	8.74	0.66	Parente <i>et al.</i> (2008)
	dioicin 2	leaf	29.9	9.37	0.23	
<i>Dianthus caryophyllus</i> (carnation)	dianthin 30	leaf	29.5		9.15	Hartley and Lord (2004); Stirpe <i>et al.</i> (1980)
	dianthin 32	leaf	31.7		3.60	
<i>Saponaria officinalis</i> (soapwort)	saporins	seed	29.5		0.05	Hartley and Lord (2004); Lin <i>et al.</i> (2003)
<i>Momordica cochinchinensis</i>	cochinin B	seed	28		0.36	Chuethong <i>et al.</i> , (2007)

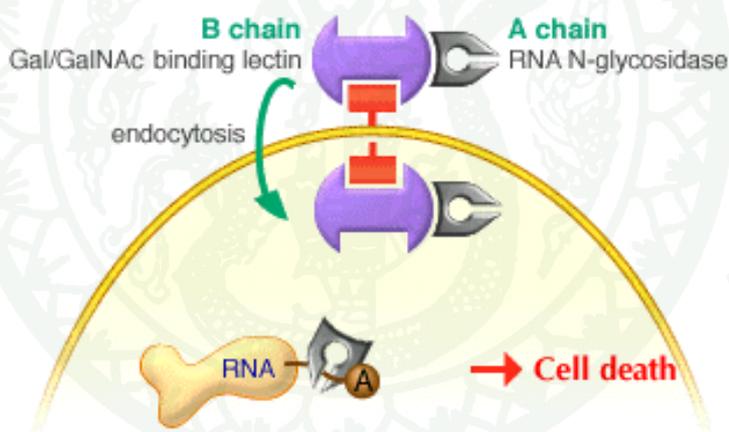
ตารางที่ 3 (ต่อ)

Species	Name of RIPs	Organ	MW (kDa)	pI	IC ₅₀ (nM)	Ref
<i>Mirabilis jalapa</i> (four O'clock)	MAP MAP-4	root seed	27.8 29.3	}	0.54 1.53	Bolognesi <i>et al.</i> (2002)
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (Chinese cucumber)	trichosanthin	root	25		9.4	0.32
<i>Sambucus ebulus</i> (dwarf elder)	Ebulitins α , Ebulitins β Ebulitins γ	leaf leaf leaf	32 29 29			De Benito <i>et al.</i> (1995); Hartley and Lord (2004)
<i>Jatropha curcas</i> Linn. (Physic nut)	Curcin	kernel	28.2	8.54	0.19	Lin <i>et al.</i> (2003)
<i>Phytolacca dodecandra</i>	dodecandrin	leaf	29		1.30	Bonness <i>et al.</i> (1994)
<i>Iris hollandica</i>	Iris RIP	bulb	29		0.16	Van Damme <i>et al.</i> (1997)
<i>Luffa cylindrical</i>	luffin	seed	26		0.002	Gao <i>et al.</i> (1994)

หมายเหตุ PAP คือ pokeweed antiviral protein; MAP คือ *Mirabilis* antiviral protein.

2.1.2 Ribosome-inactivating protein Type II (RIP Type II)

RIP Type II เป็นโปรตีนพิษต่อเซลล์ (cytotoxic protein) ที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทั้งพวกยูแคริโอตและโพรแคริโอต RIP Type II นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกันจำนวน 1, 2 หรือ 4 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 2 สาย คือ สาย A และสาย B ซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่ต่างกัน สาย B ทำหน้าที่เป็นเลคตินเข้าไปจับกับโมเลกุลของน้ำตาลของไกลโคคอนจูเกตตัวรับ (glycoconjugate receptor) บนผิวเซลล์อย่างจำเพาะ (ภาพที่ 9) การจับนี้จะเหนี่ยวนำให้สาย A ผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วสาย A ซึ่งมีกิจกรรมของ rRNA N-glycosidase จะเร่งการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ยูแคริโอต (Barbieri *et al.*, 1993) ตัวอย่าง RIP Type II แสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 9 กลไกการออกฤทธิ์ของ RIP Type II

ที่มา: Lord, J. M. *et al.* (1994)

ตารางที่ 4 ตัวอย่าง RIP Type II ที่พบในพืชบางชนิด

Species	Name of RIPs	Organ	Sugar specificity
<i>Ricinus communis</i> (castor oil plant)	Ricin	seed	Gal/GalNAc
<i>Abrus precatorius</i>	Abrin	seed	Gal/GalNAc
<i>Adenia volkensii</i>	Volkensin	root	Gale
<i>Momordica charantia</i>	Momordin	seed	Gal>GalNAc
<i>Viscum album</i> (mistletoe)	Viscumin	leaf	Gal/GalNAc
<i>Sambucus ebulus</i> (dwarf elder)	ebulin b	bark	NANA
<i>Sambucus nigra</i> (elderberry)	SNAI	bark	NANA
	SNAV (nigrin b)	bark	GalNAc>Gal
	SNAIf	fruit	NANA

ตารางที่ 5 ตัวอย่าง RIP Type II ที่พบในแบคทีเรียบางชนิด

Species	Name of RIPs	Organ	Sugar specificity
<i>Shigella dysenteriae</i>	shiga toxin	secreted	globotriaosyl
			ceramide (GB ₃)
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	shiga-like toxin	secreted	globotriaosyl
			ceramide (GB ₃)

หมายเหตุ Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; NANA, N-acetylneuramic acid.

ที่มา: Hartley and Lord (2004)

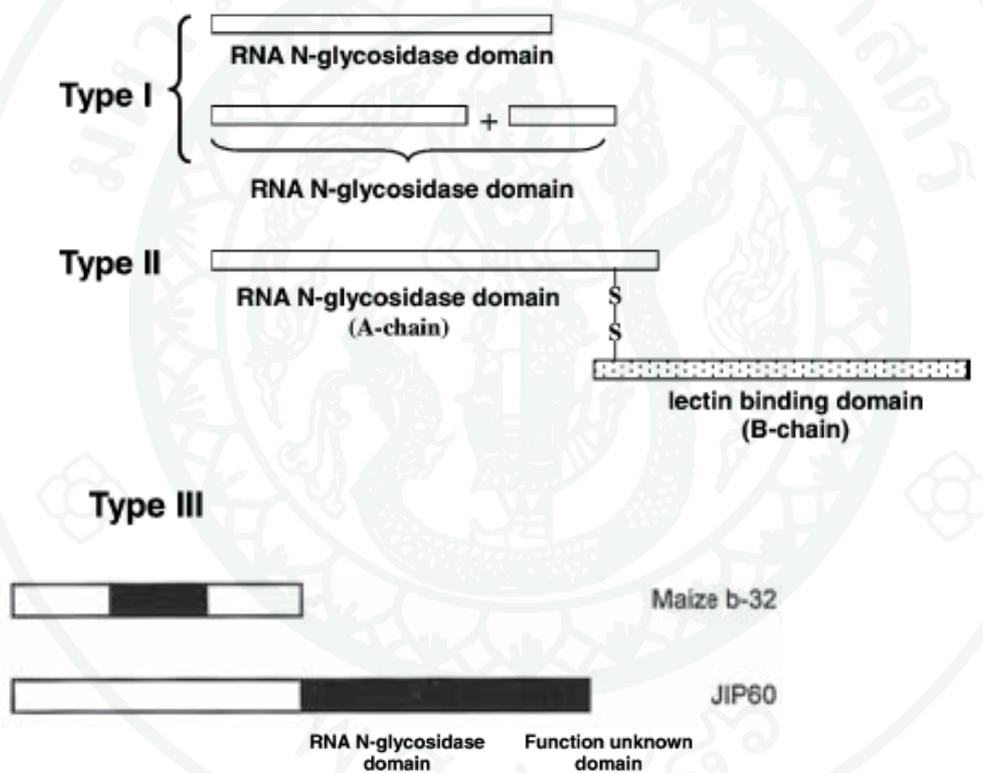
2.1.3 Ribosome-inactivating protein Type III (RIP Type III)

RIP Type III มีโครงสร้างเป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ rRNA *N*-glycosidase เหมือนกับ RIP Type I แต่จะมีด้าน C-terminal domain เพิ่มขึ้นมา (ภาพที่ 10) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัดของส่วนที่เพิ่มขึ้นมานี้ โดยด้าน C-terminal domain จะเชื่อมกับด้าน N-terminal domain ด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Reinbothe *et al.*, 1994; He and Liu, 2004) RIP Type III จะถูกสังเคราะห์ในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ต้องอาศัยการตัดสายเปปไทด์บางส่วนออกก่อนจึงจะสามารถทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ rRNA *N*-glycosidase ได้ ปัจจุบันสามารถพบ RIP Type III ในข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์เท่านั้น สาร RIP จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) จะถูกผลิตมาจากเอนโดสเปิร์มและมักสะสมอยู่ในเมล็ด มีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน แต่ยังอยู่ในรูปไม่สามารถทำงานได้ (proRIP) ซึ่งจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ทำงานได้เมื่อถูกตัดกรดอะมิโนที่ N-terminal domain ออกไป 16 ตัว และกรดอะมิโนอีกหลายตัวที่ C-terminal domain นอกจากนี้ยังถูกตัดกรดอะมิโนตรงส่วนกลางสายพอลิเปปไทด์ออกไปอีก 25 ตัว จึงทำให้ได้สายพอลิเปปไทด์ที่แยกออกเป็นสองสายแต่ยังเชื่อมกันด้วยพันธะ non-covalent (Hey *et al.*, 1995) ซึ่งเป็นรูปที่พร้อมทำงานได้ ที่เรียกว่า “ $\alpha\beta$ RIP” หรือ “b-32” (Hey *et al.*, 1995) ส่วน RIP จากข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) พบว่ามีขนาดประมาณ 66 กิโลดาลตัน เรียกว่า jasmonate-induced proteins (JIP60) (Dunaeva *et al.*, 1999) ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์เพียงสายเดียว มักถูกสะสมอยู่ในส่วนของใบ การสังเคราะห์โปรตีน JIP60 นี้ถูกกระตุ้นด้วย jasmonic acid (JA) และ methyl ester (MJ) เมื่อ JIP60 ถูกตัดกรดอะมิโนทั้งส่วนของ N-terminal domain และ C-terminal domain ออกไปจะทำให้ JIP60 อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (Chaudhry *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 2001) คือมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ *N*-glycosidase (Nielsen *et al.*, 2001) แต่ว่ากลไกการทำงานของ JIP60 ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด

ตารางที่ 6 ตัวอย่าง RIP Type III ที่พบในพืชบางชนิด

Species	Name of RIP	Organ
<i>Hordeum vulgare</i>	JIP60	leaves
<i>Zea may L.</i>	b-32	seeds

ที่มา: Hartley and Lord (2004)



ภาพที่ 10 ชนิดของ Ribosome-inactivating protein

ที่มา: Stirpe and Battelli (2006)

ตารางที่ 7 คุณสมบัติของ Ribosome-inactivating proteins (RIPs) ทั้ง 3 กลุ่ม

RIPs	Structure	Molecular mass (kDa)	Inhibition of protein synthesis (IC ₅₀ , nM)		Toxicity to mice (LD ₅₀ , mg/kg)
			Cell-free ^a	Cells ^b	
Type I	one chain	26-32	<0.01-4.0	170->3300	0.95-44
Type II	two chains	60-65	43-88	0.0003-1.7	0.0017-0.008
Type III					
-maize RIP (b-32)	two chains	16.5 and 8.5	0.07	-	-
-barley RIP (JIP60)	one chain	66	-	-	-

หมายเหตุ IC₅₀ คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระบบที่ไม่มีเซลล์ของ rabbit reticulocyte lysate 50%

^a วิเคราะห์จาก rabbit reticulocyte lysate

^b วิเคราะห์จาก HeLa cells

ที่มา: รวบรวมและคัดแปลงจาก Stirpe (2004), Dunaeva *et al.* (1999), Hey *et al.* (1995); Chaudhry *et al.* (1994)

2.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของ RIPs

2.2.1 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer activity)

RIP จาก *Viscum album* และ *Ximenia americana* ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านมะเร็ง โดยสาร RIPs เหล่านี้มีผลในการทำลายเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ เพราะเซลล์มะเร็งมีอัตราการสร้างโปรตีนสูงในระหว่างการแบ่งตัวมากกว่าเซลล์ปกติ (Stirpe and Buttelli, 2006) เคอร์ชินซึ่งจัดเป็น RIP Type I ถูกทำให้บริสุทธิ์ครั้งแรกจากเมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcus* Linn.) (Barbieri *et al.*, 1993) พบว่ามีผลด้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง SGC-7901, Sp 2/0 และเซลล์ตับ

ของคน ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase (Lin *et al.*, 2003) นอกจากนี้โปรตีนเคอร์ซินที่ถูกสร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญโตของเซลล์มะเร็งหลอดเลือด (NCL-H446), เซลล์มะเร็งตับ (SGC-7901) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (S180) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Luo *et al.*, 2006) ส่วน Riproximin ซึ่งเป็น RIP Type II จาก *Ximenia americana* พบว่ามีความสามารถในการต้านมะเร็งในหนู (metastasis model) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.6 พิโคโมล (Voss *et al.*, 2006)

2.2.2 ฤทธิ์เหนี่ยวนำให้แท้ง (Abortifacient activity)

ในตำรายาพื้นบ้านของจีน มีตำราที่เตรียมเหง้าของต้นมะระจีน (*Trichosanthes kirilowii*) มีสรรพคุณในการเหนี่ยวนำให้แท้งได้ พบว่าสารออกฤทธิ์ทำให้แท้ง คือ โปรตีน trichosanthin ซึ่งเป็น RIP Type I ในปัจจุบันประเทศจีนได้นำ trichosanthin มาใช้เหนี่ยวนำทำให้เกิดการแท้งของการตั้งครรภ์ในระยะ 2 เดือนแรกและ 4 เดือน ซึ่งมีโอกาสสำเร็จสูงมากกว่า 95% โดยมีอาการข้างเคียงต่ำ (Leung *et al.*, 1986)

2.2.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสและต้านเชื้อรา (Antiviral and antifungal activity)

โดยส่วนใหญ่ RIP Type I จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสในพืชและสัตว์ (Picard *et al.*, 2005) สารสกัดโปรตีนพิษ PAP (Pokeweed antiviral protein) จากใบ pokeweed เป็นสารตัวแรกที่ได้ถูกค้นพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเหมือนกับ A-chain ของ ricin จัดเป็น RIP Type I ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสได้ทั้งไวรัสพืชและสัตว์ และยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและมีฤทธิ์ฆ่าแมลงอีกด้วย (Nielsen *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบ RIP Type I ตัวอื่นที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น saporin-S6 ที่สกัดได้จากเมล็ดของ *Saponaria officinalis* L. และ ME ที่สกัดได้จากรากของ *Mirabilis expansa* (Vivanco *et al.*, 1999) จากฤทธิ์ในการต้านไวรัสพืชได้นี้เองจึงได้ทำการถ่ายยีน trichosanthin เข้าไปในข้าว (*Oryza stiva* L.) เพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อการติดเชื้อรา *Pyricularia oryzae* (Yuan *et al.*, 2002) ส่วนฤทธิ์ต้านไวรัสในสัตว์นั้น ทำให้เกิดงานวิจัยขึ้นมากมายที่ศึกษาผลของ RIPs โดยเฉพาะ PAP และ trichosanthin นั้นสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อ Human Immunodeficiency Virus -1 (HIV-1) ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อทั้งใน Acutely

infected T-lymphoblastoid cells และ Chronically infected macrophages (Stebbing *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005) โดยที่ RIPs บางชนิดอาจจะถูกนำไปผลิตเป็นยาที่เข้าไปยับยั้งในช่วงการจำลองตัวของไวรัส HIV เมื่อเข้าสู่เซลล์ ได้แก่ MAP 30 และ TAP 29 (Lee-Huang *et al.*, 1990)

กลไกที่ RIPs ออกฤทธิ์ต้านไวรัสยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งอาจเป็นไปได้ 3 เหตุผล เหตุผลแรกคือ สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้โดยตรงกับอนุภาคหรือกรดนิวคลีอิกของไวรัส เหตุผลที่สองคือ จะเข้าสู่ไซโทซอล (cytosol) ของเซลล์ที่ติดเชื้อและทำลายกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ไวรัสไม่สามารถจำลองตัวเองได้ ทำให้ไม่สามารถแพร่เชื้อต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง และเหตุผลสุดท้ายคือ เข้าไปทำปฏิกิริยากับระบบป้องกันตัวเองของพืช ที่เรียกว่า suicide model ซึ่งระบบนี้มีการทำงานคล้ายกับ hypersensitive response (HR) นั่นก็คือ ระบบนี้จะมีกลไกการป้องกันบริเวณที่ได้ถูกรุกรานหรือติดเชื้อ โดย HR จะเป็นตัวส่งสัญญาณ ไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อไปยังเซลล์บริเวณอื่น จึงทำให้เซลล์บริเวณนั้นตายทันที (Stirpe *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบสาร Hispin เป็น Type I RIPs ตัวใหม่ที่ได้จากเมล็ดของ hairy melon (*Benincasa hispida* var.) ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Coprinus comatus*, *Fusarium oxysporum*, *Physalospora piricola*, and *Mycosphaerella arachidicola* (Ng and Parkash, 2002)

3. โปรตีนเคอร์ซิน (Curcin)

เคอร์ซินเป็นโปรตีนพิษที่พบในเนื้อเมล็ดสับดูดำ มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า toxalbumin (Osoniyi and Onijobi, 2003) ค้นพบครั้งแรกโดย Felk (1914) โครงสร้างสามมิติของเคอร์ซินแสดงดังภาพที่ 11 เคอร์ซินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์เพียงสายเดียว ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 28.2 กิโลดาลตัน (Barbieri, 1993) มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ เนื่องจากเคอร์ซินจะตัดพันธะ N-glycosidic ระหว่าง adenine ที่ตำแหน่ง A4324 บน 28s rRNA ทำให้ยับยั้งการทำงานของไรโบโซม (Stripe *et al.*, 1976, Endo and Tsurugi, 1987) จากการออกฤทธิ์ดังกล่าวทำให้เคอร์ซินจัดเป็นโปรตีน RIP Type I นอกจาก RIPs จะออกฤทธิ์ต่อไรโบโซมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแล้ว ยังมีผลต่อไรโบโซมของแมลง พืชและแบคทีเรีย (Park *et al.*, 2004)

พิษของเคอร์ซินคือ ทำให้เกิดการระคายเคืองในกระเพาะอาหารและลำไส้



ภาพที่ 11 โครงสร้างสามมิติของเคอร์ซิน

Lin *et al.* (2003) รายงานว่า การทำเคอร์ซินให้บริสุทธิ์สามารถทำได้โดยนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยความอิ่มตัวเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 60% จากนั้นนำโปรตีนที่ตกตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ และแยกต่อโดย cation-exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ CM-52 และนำมาแยกอีกครั้งโดย gel-filtration ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าสามารถแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุล (native molecular weight) เท่ากับ 28.2 กิโลดาลตัน

จากนั้นได้มีการนำเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ได้มาหาลำดับของกรดอะมิโน เปรียบเทียบ RIP ชนิดอื่น ๆ เช่น ricin และ trichosanthin เพื่อเป็นการยืนยันว่าเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์นั้น เป็นเคอร์ซินที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ *N*-glycosidase หรือไม่ ซึ่งพบว่าลำดับกรดอะมิโนของเคอร์ซินจากเมล็ดสบู่ดำมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนบริเวณ active site ของ ricin และ trichosanthin เท่ากับ 54 % และ 57 % ตามลำดับ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนนั้น ได้แก่ Asn-78, Tyr-80, Tyr-123, Arg-134, Gln-173, Glu-177, Arg-180, Glu-208, Asn-209, Trp-211 และ Tyr-14, Phe-17, Arg-22, Tyr-70, Tyr-111, Gly-128, Ala-148, Gln-156, Glu-160, Arg-163, Glu-189, Tro-192, Leu-241 ซึ่งเป็นบริเวณ active site ของ ricin และ trichosanthin ตามลำดับ แสดงว่าเคอร์ซินมีกิจกรรมของเอนไซม์ *N*-glycosidase (ดังภาพที่ 12)

จากนั้น ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของเคอร์ซินต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เนื่องจากเคอร์ซินมีกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ซึ่งออกฤทธิ์ต่อ rRNA ใน rabbit reticulocyte lysate ของกระต่าย และพบว่าเคอร์ซินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ดี ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 นาโน โมล/ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเคอร์ซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง Sp2/0 (mouse myeloma cell line), SGC-7901 (gastric cancer cell line) และ human hepatoma (liver cancer cell line) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.66, 0.23 และ 3.19 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งถือได้ว่าพิษของเคอร์ซินมีประสิทธิภาพในการนำไปผลิตเป็นยารักษาโรคมะเร็งชนิดนั้น ๆ ได้

Lin *et al.* (2003) ได้ศึกษาการโคลนยีนของเคอร์ซิน โดยการเพิ่มความยาวตลอดสายยีนเคอร์ซินด้วยเทคนิค RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends-Polymerase Chain Reaction) พบว่ายีนเคอร์ซินมีความยาวตลอดสายที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนได้ 293 กรดอะมิโน แต่สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาดเพียง 251 กรดอะมิโน และลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความเหมือนกับ RIP Type I และ A chain ของ RIP Type II มีค่าเท่ากับ 33 % และ 57 % ตามลำดับ จากนั้นนำยีนที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pQE-30 และทรานสเฟอ์เข้าสู่ *E. coli* เพื่อการแสดงการของยีน พบว่ารีคอมบิแนนท์เคอร์ซินมีความสามารถในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนใน rabbit reticulocyte lysate ของกระต่าย

```

CUR ..AGSTLTLYDAADKKNYAQFKDREIFGFSYSS..IPY..GATVAP..NOKIV 55
RTA IFPKQYDIINFTAGAT..VQSYTNFIRAVRGRLTTGADVRE..IPY..PNRYGLPI..GREFL 59
TCS .....DVSFRLSGAT..SSSYGVFI..SNRKL..PNERKL..YDITL..SSSLPG..SCRYAL 49
      * * *
      * *
CUR AKVINVANIEVSEGENWVAYLGYKVGGSYFF..IPESLADAKIYEFIDTK..QQTES 113
RTA VELSNHAEESYTEALDVTIAYVVGTRAGNSAYFHHPENQLEDAEAI..HLFF..VQNRYSFA 119
TCS IHLTNYAETISVAIDVTIYIMGYRAGDSYFFN..EASATEAAKIVFKDAMRKVILPY 107
      *
      * * * * *
CUR TCSYADFLSRANVHREDVDLG...VQALDNYIYILEKSSKPADIAKPEVGFIEVPEAA 169
RTA GENDRLEQLAGNLRNIELGNPLEEASALYYSTGGTQLPTLARSFIIQIMISEAA 179
TCS SEMERLQTAACKIRENIFLGLPALDSAITTLGYNAN....SAAASAMVI..QSTSEAA 162
      * * * * *
      * * * *
CUR RKYIEKKVLSQESKTLR..PGGD..ISLENNVGDLSYDICKQVNV..GVFLKPYGLRENY 225
RTA RQYIEGLMRTIRRYNRRSADPSYITLENSVIRLSTAIQCSNQ..GAFASPIQLRRNG 237
TCS RYKFIQQIGKRVDKIFL..PSLAF..ISLENSVLSALSQI..QIASTNNGQFEIPVY..INAQN 220
      * * * *
CUR INILIN..NVIQVAGVMGVLENVAVYKY..... 251
RTA SKFSY..DVSILIPIALMVYRCAPPPSQF.. 267
TCS QRVMITNVDAGVITSNIAI..ENRNMA..... 247
      *

```

ภาพที่ 12 ลำดับกรดอะมิโนของเคอร์ซิน (CUR) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ ricin (RTA) และ thicosanthin (TCS)

ที่มา: Lin (2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างทางชีวภาพ

เมล็ดสบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) สายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งปลูก 153 แหล่ง (ภาคผนวก ข. ข้อ 6) ได้แก่ สายพันธุ์ KUBP 1-9, KUBP 11-16, KUBP 18-21, KUBP 23-25, KUBP 27-38, KUBP 43-47, KUBP 49-52, KUBP 56-58, KUBP 62-67, KUBP 69, KUBP 71-81, KUBP 83-89, KUBP 91, KUBP 95-96, KUBP 108-112, KUBP 114-126, KUBP 128-136, KUBP 138-143, KUBP 148-149, KUBP 153, KUBP 155-156, KUBP 158-159, KUBP 161, KUBP 163-164, KUBP 169-170, KUBP 172, KUBP 175-181, KUBP 184-201, KUBP 204-206, KUBP 208-212 จากไร่สุวรรณวาทกสิกิจโดยโครงการเคยูไบโอดีเซล (KU-BIODIESEL PROJECT) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สายพันธุ์ non-toxic สุขสันต์ 1, non-toxic สุขสันต์ 2, เปลือกผลสบู่ดำที่ toxic และ non-toxic จาก ดร.วันวิสา สุกปนะเสริฐ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และอ.สุขสันต์ สุทธิผลไพบุลย์ วุฒิสถาภรณ์ส่งเสริมการเกษตร

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนจำนวน 30 ชนิดและยีสต์จำนวน 1 ชนิด จาก รศ.ดร.นวลฉวี เวชประสิทธิ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

เลือดกระต่าย จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

เซลล์เพาะเลี้ยง epidermoid carcinoma of oral cavity (KB cell line, ATCC CCL-17), breast adenocarcinoma cell line (MCF-7 cell line, ATCC HTB-22) และ small cell lung carcinoma (NCI-H187 cell line, ATCC CRL-5804) จากห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

เซลล์เพาะเลี้ยง human colon adenocarcinoma (SW 620 cell line, ATCC CCL-228) จาก
 รศ. ดร. นวฉวี เวชประสิทธิ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
 รามคำแหง

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์

- เครื่อง Autoclave: Model HA-300M
- เครื่อง Electro-eluter (ATTO, Japan)
- เครื่อง LC-ESI-MS/MS model LTQ (HCT Ultra Bruker, Germany)
- เครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer: Reflex IV (BRUKER, Germany)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสงสำหรับ 96 well Microplate reader (Dy nex Technologies, Inc., USA)
- เครื่อง omniPAGE, Vertical Electrophoresis System รุ่น VS20D (Clever Scientific Ltd., UK)
- เครื่อง Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- เครื่อง Nanodrop spectrometer: Model ND-1000 (Nanodrop, USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง SpectraMak M5 multidetection microplate reader (Molecular Device, USA)
- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Fisher scientific Mode, Fisher stirrer, USA)
- เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Sartorius BP 410, Sartorius BP 110 S, USA)
- เครื่องผสมสาร (Vortex Genie 2, USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV/Vis (Jenway Model 6405, UK)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Denver instrument Model 215, UK)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเร็ว (Harrier, Germany)
- ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- ตู้อบ oven: Model 838F (Fisher Scientific, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- Petri dish (90 mm in diameter)

แท่งกวนแม่เหล็ก

โกร่ง

ไมโครเวฟ

กระดาษกรอง (Whatman No.1)

ขวด flask

ขวดปรับปริมาตร

คิวเวตต์

คิวเวตต์ ควอทซ์

ถุงไคอะไลซิส

บีกเกอร์

ผ้าขาวบาง

หลอดทดลอง

ออร์โต้ปิเปต: Pipette (Gilson, France)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.2 สารเคมีสำหรับการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางชีวโมเลกุล

2-mercaptoethanol (Sigma, USA)

Absolute ethanol (Merck, Germany)

Acetic acid glacial (BDH, UK)

Acetonitrile (Merck, Germany)

Acrylamide (Biobasic, Canada)

Ammonium acetate (Merck, Germany)

Ammonium persulphate (Sigma, USA)

Aqua sorb (BML, Thailand)

Bovine serum albumin (Sigma, USA)

Bromophenol blue (Merck, Germany)

CM-Cellulose Fast flow (Sigma, USA)

Comassie brilliant blue G-250 (Sigma, USA)

Comassie blue R-250 (Biobasic, Canada)

DEAE-Sephacel (GE Healthcare Life sciences, USA)

DTT (Merck, Germany)

Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dihydrate (EDTA) (Merck, Germany)

Folin-Ciocalteu's reagent (Carlo Erba, Italy)

Formaldehyde (BDH, Germany)

Iodoacetamide (Pharmacia, USA)

Glycerol (BDH, UK)

Hydrochloric acid (Merck, Germany)

Hydrogen peroxide (Univar, Australia)

Methanol (Merck, Germany)

N, N'-Methylene-bis-acrylamide (Biobasic, Canada)

Potassium chloride (Sigma, USA)

Potassium chloride (Univar, Australia)

Potassium sodium tartrate (Carlo Erba, Italy)

Protein markers: Low Molecular Weight Markers (GE Healthcare, USA)

Silver nitrate (Biobasic, Canada)

Sodium acetate (Merck, Germany)

Sodium carbonate (BDH, UK)

Sodium chloride (Merck, Germany)

Sodium dodecyl sulphate (Biobasic, Canada)

Sodium hydroxide (BDH, UK)

TEMED (Fluka, Belgium)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Biobasic, Canada)

Trypsin (Promega, USA)

β -mercaptoethanol (Sigma, USA)

2.3 สารเคมีสำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ rRNA *N*-glycosidase

Absolute ethanol (Merck, Germany)
Acetic acid, Glacial (Mallinckrodt, USA)
Agarose (Research Organics, USA)
Aniline (Univar, USA)
Chloroform (Merck, Germany)
DEPC (Biobasic, Canada)
Ethidium bromide (EtBr) (Sigma, USA)
Formamide (BDH, UK)
Magnesium chloride (Univar, USA)
Phenol (Sigma, USA)
Potassium chloride (Univar, USA)
Rabbit reticulocyte lysate (Promega, USA)
RNA marker (Fermentus, Canada)
Sodium acetate (Biobasic, Canada)
Sodium dodecyl sulphate (Biobasic, Canada)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Research Organics, USA)
Urea (Research Organics, USA)

2.4 สารเคมีสำหรับการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

Amphotericin B (Sigma, USA)
Ampicilin (Biobasic, Canada)
Chloramphenicol (Sigma, USA)
Luria-Bertani (LB) Broth (Difco, USA)
Muller-Hinton Agar (Difco, USA)
Muller-Hinton Broth (Difco, USA)
Sodium chloride (Univar, USA)

2.5 สารเคมีสำหรับการศึกษาฤทธิ์การเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT (Sigma, USA)

Doxorubicine (Pfizer, Australia)

Eagle's minimal essential medium, MEM (Invitrogen, USA)

Ellipticine (Sigma, USA)

Fetal Bovine serum, FBS (PAA Laboratories GmbH, Austria)

Mitomycin C (Sigma, USA)

Penicillin (Sigma, USA)

Potassium chloride (Univar, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (Biobasic, Canada)

Resazurin (Sigma, USA)

RPMI-1640 Medium (GIBCO, Invitrogen, USA)

Sodium chloride (Univar, USA)

Sodium phosphate (Biobasic, Canada)

Streptomycin (Sigma, USA)

2.6 สารเคมีสำหรับการทำ Immuno Blot

0.45 μ m Nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

Bovine serum albumin (Sigma, USA)

Bromophenyl blue (Labchem, USA)

Coomassie brilliant blue R-250 (Research Organics, USA)

Disodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Biobasic, Canada)

ECL plus western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, USA)

Glycerol (Univar, USA)

Glycine (Research Organics, USA)

Hydrochloric acid (Merck, Germany)

HyperfilmTM ECL (GE Healthcare Life Sciences, USA)

Methanol (Merck, Germany)

Protein markers: Low Molecular Weight Markers (GE Healthcare, USA)

Ricin A chain from Ricinus Comunis (Sigma, USA)

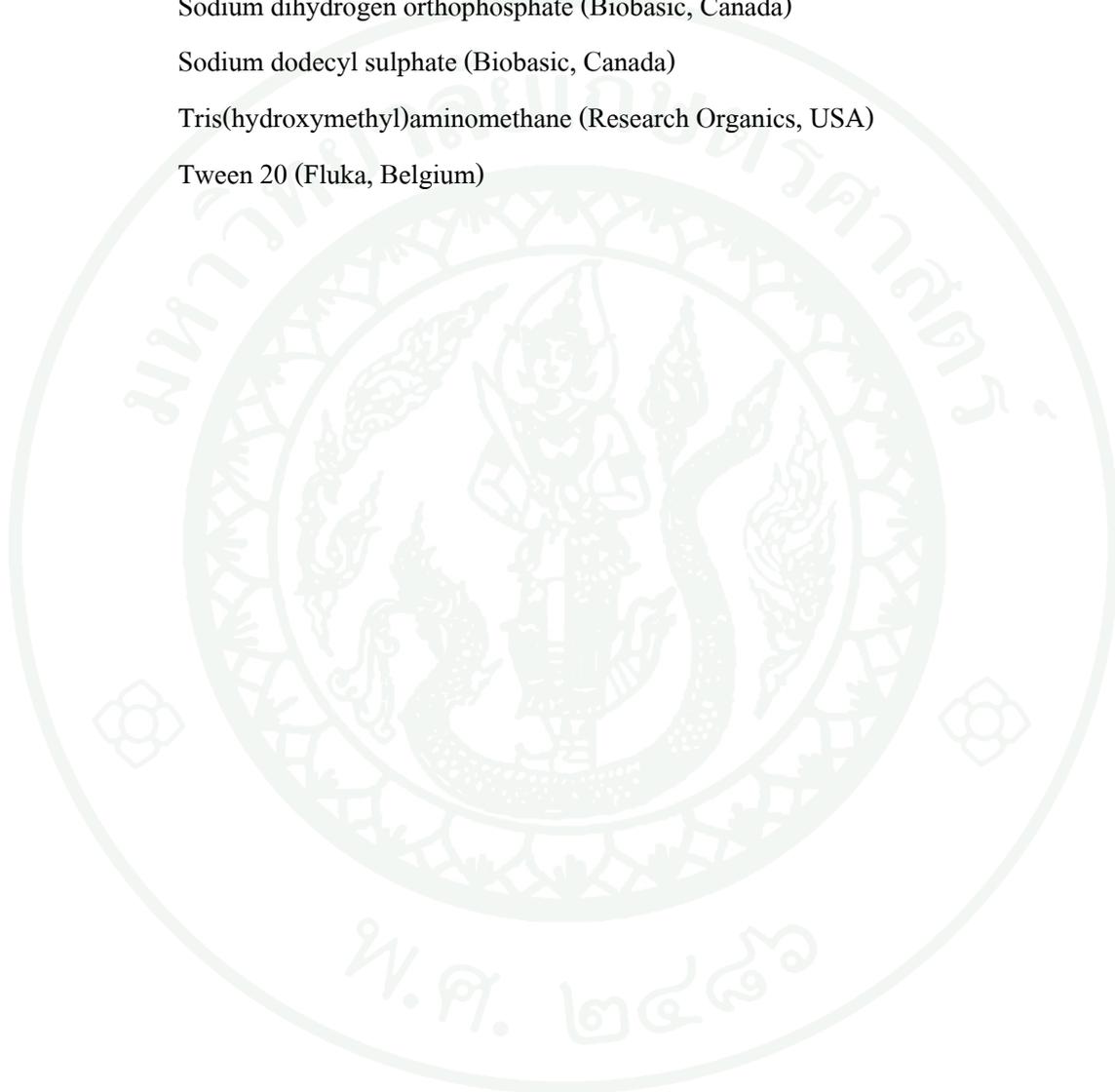
Sodium chloride (Univar, USA)

Sodium dihydrogen orthophosphate (Biobasic, Canada)

Sodium dodecyl sulphate (Biobasic, Canada)

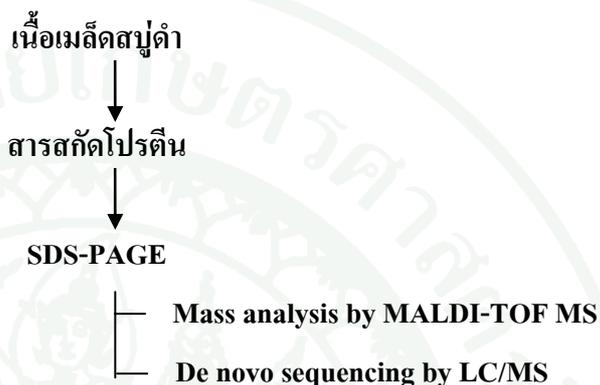
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Research Organics, USA)

Tween 20 (Fluka, Belgium)



วิธีการ

1. การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสับดูดำและศึกษาสมบัติทางชีวโมเลกุล



1.1 การเตรียมสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสับดูดำ

นำเนื้อเมล็ดสับดูดำชั่งน้ำหนัก 100 กรัมบดด้วยโกร่ง โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่มีการเติม 0.15 M NaCl (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 2) ในอัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กวนต่อเนื่องนานประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกเอาไขมันที่อยู่ด้านบนออกแล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ข้ามคืนในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 2) และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2. การแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์

1.2.1 การแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารต่าง ๆ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิก โดยอาศัยความแตกต่างกันของประจุบนโมเลกุล ประกอบด้วยส่วนเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารละลายหรือบัฟเฟอร์ กับ ส่วนคงที่ซึ่งเป็นของแข็งที่มีประจุเรียกว่าตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger) การแยกสาร โดยวิธีนี้เกิดขึ้นสองขั้นตอน คือ ขั้นแรกเกิดการจับกันระหว่างสารตัวอย่างกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งมีประจุตรงข้ามกัน ส่วนสารที่ประจุตรงกับตัวแลกเปลี่ยนประจุก็จะถูกชะออกไปด้วยบัฟเฟอร์ ขั้นที่สองสารที่จับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุจะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยมีอัตราในการหลุดชะออกที่แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับความแรงยึดเหนี่ยวของสารแต่ละชนิดกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ หรือ ความจำเพาะทางไฟฟ้า เนื่องจากการมีประจุสุทธิบนโมเลกุลที่แตกต่างกันของโปรตีน ความจำเพาะดังกล่าวนี้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนค่าพีเอชหรือค่า ionic strength ของสารละลายในระบบ จึงสามารถแยกโปรตีนชนิดที่ต้องการ ออกจากสารละลายโปรตีนผสมได้ แม้มีค่าความแตกต่างที่ลำดับของกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียว

ตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchanger) มี 2 ชนิดคือ anion exchanger (DEAE-Sephacel) ซึ่งมีหมู่ที่มีประจุบวก จะจับกับไอออนที่มีประจุลบ และ cation exchanger (CM-Cellulose) ซึ่งมีหมู่ที่มีประจุลบ จะจับกับไอออนที่มีประจุบวก

นำสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสนูปู่ดำผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร อัตราการไหลคงที่ เท่ากับ 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง และมีขนาดของ fraction ที่เก็บหลอดละ 2 มิลลิลิตร ทำการชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 และชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 2.0 M

ตามลำดับ ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 เก็บส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน แล้วนำสารละลายมาวัดปริมาณ โปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 280 นาโนเมตร (โดยในแต่ละครั้งที่จะเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะจนเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0) และพบว่าเคอร์ซินไม่จับคอลัมน์ ดังนั้นจึงนำสารละลายโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (unbound) มา รวมกัน แล้วไดอะไลซ์ในสารละลาย 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 3) ผ่านลงในคอลัมน์ CM-cellulose Fast flow (ขนาด 1.5 x 5 เซนติเมตร) ทำการชะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 และชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.2 0.4 และ 0.6 M ตามลำดับ ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 โดยอัตราการไหลคงที่ 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แยกเก็บส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน แล้วนำสารละลายมาตรวจวัดปริมาณ โปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 280 นาโนเมตร

การวัดปริมาณโปรตีนใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ทางกายภาพ อาศัยสมบัติการดูดกลืนแสงของสาร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ซึ่งอาศัยเซลล์ไฟฟ้า (photocell) ในการเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานไฟฟ้า ทำให้สามารถวัดและเปรียบเทียบความเข้มข้นของแสงก่อนและหลังผ่านสารละลายได้ ค่าความแตกต่างที่ได้จะถูกเปลี่ยนโดยส่วนประกอบทางอิเล็กทรอนิกส์อีกต่อหนึ่ง แล้วจึงแสดงออกมาบนหน้าปัดของเครื่องมือ เป็นการดูดกลืนแสงหรือเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (percent transmittance; %T)

1.2.2 การแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์ด้วยการปรับพีเอช (pH)

นำสารละลายที่สกัดได้มาไดอะไลซ์ อีกครั้งในสารละลายโซเดียม-อะซิเตตบัฟเฟอร์ (0.1 M Sodium-Acetate, pH 4.5) (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 3) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ข้ามคืนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (80 mM disodium hydrogen orthophosphate anhydrous, 20 mM sodium dihydrogen orthophosphate, 100 mM sodium chloride, pH 7.5) (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 26) และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

1.3. การหาปริมาณโปรตีนโดย Lowry's Method

วัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดโดยวิธีการของ Lowry *et al.* 1951 ซึ่งวิธีนี้ใช้วัดปริมาณโปรตีนในช่วง 1-20 ไมโครกรัม หลักการคือโปรตีนทำปฏิกิริยากับสารเคมี ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินขึ้น โดยเกิดปฏิกิริยาเป็นสองขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 พันธะเปปไทด์ในโปรตีนทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) ในด่างเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนต (coordination) กับอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของไนโตรเจนในพันธะเปปไทด์ 4 คู่ และของออกซิเจนในน้ำอีก 2 คู่ ขั้นที่ 2 สารเชิงซ้อนที่ได้และหมู่อัลคิล (alkyl) ของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) และไทโรซีน (tyrosine) ที่อยู่ในโปรตีนเกิดการรีดิวซ์สารละลาย Folin ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น phosphomolybdic acid ($24 \text{ MoO}_3 \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ผสมกับ phosphotungstic acid ($24 \text{ WO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 48 \text{ H}_2\text{O}$) ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

การหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง ทำได้โดยนำสาร 100 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลาย potassium sodium tartrate-copper sulphate sodium carbonate ใน 0.1 M Sodium hydroxide 250 มิลลิลิตร (เตรียมตามภาคผนวก) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม Folin Ciocalteu's reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ที่ผสมสารละลายเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบเป็นสารละลายเปล่า (blank) กำหนดความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA)

กราฟมาตรฐานของ BSA เตรียมได้โดยการเจือจาง BSA ให้มีค่าความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในช่วง 40-200 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยนำสารละลายโปรตีน BSA แต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็นไมโครกรัมโปรตีน ส่วนแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

1.4. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน

อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีประจุบนโมเลกุลออกจากกัน โดยการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า (electrode) ซึ่งการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดมีอัตราเร็วไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับประจุ ขนาด และรูปร่างของสารนั้น ๆ เทคนิคนี้สามารถใช้แยกสารชีวโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่น โปรตีน ซึ่งเป็นสารที่มีประจุบนโมเลกุล เนื่องจากกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนมีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) หมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) และสายข้าง (side chain) ซึ่งสามารถแตกตัวได้ ในสารละลายพีเอชค่าหนึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะแตกตัวให้ประจุที่แตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาโปรตีนตัวใดตัวนั้นคือการพิจารณาสมบัติโดยรวมของกรดอะมิโนทั้งหมดที่ประกอบขึ้นเป็นโปรตีนนั้น ๆ จึงได้ใช้ความแตกต่างของประจุสุทธิ และขนาดของโปรตีนนี้เป็นหลักในการแยกโปรตีนออกจากกันโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

1.4.1 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดโปรตีนเสียสภาพ (Denaturing discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

SDS-PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้ในการแยกโปรตีนบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มีการทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยการเติมสารบางอย่างเข้าไปภายในเจล ซึ่งมีผลทำให้การเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าของโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาดเพียงอย่างเดียว โดยการเติม sodium dodecyl sulphate (SDS) ซึ่งมีความเป็นประจุลบสูงมาก ทำหน้าที่ไปจับประจุบวกภายในโมเลกุลโปรตีน มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายออกมาเป็นเส้นตรง และประจุสุทธิของโปรตีนเป็นลบเหมือนกันหมด นอกจากนั้นสารรีดิวซ์ คือ β -mercaptoethanol จะเข้าทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ที่จับอยู่ระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน ดังนั้นโปรตีนที่แยกได้จึงเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน ซึ่งข้อดีสำหรับ SDS-PAGE สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยโปรตีนได้ โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐาน

1.4.2 การเตรียมแผ่นเจลพอลิอะคริลาไมด์ชนิดโปรตีนเสียสภาพ

เตรียม 15% separating gel โดยใส่แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เป็นอันดับสุดท้าย(เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 9) หลังจากเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตลงไปแล้วจึงเท separating gel ลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกคู่โดยทันที (ในการทดลองใช้ชุดทำเจลพอลิอะคริลาไมด์ รุ่น Mini-Protean II, Bio-Rad) จนมีความสูง 5.5 เซนติเมตร จากนั้นค่อย ๆ หยคน้ำกลั่นตามลงไปบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนแล้ว จึงเทน้ำกลั่นออกจากเจล เตรียม stacking gel (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 8) หลังจากเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตลงไปแล้ว เติม stacking gel บน separating gel เสียบหัว (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยอดสารตัวอย่าง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที จากนั้นค่อยดึงหัวออก

1.4.3 การเตรียมโปรตีนตัวอย่างสำหรับตรวจสอบบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ชนิดโปรตีนเสียสภาพ

นำโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสนูปค้าหลังจากการนำส่วนใสที่ได้มา ไคอะไลซ์อีกครั้งในน้ำกลั่นก่อนที่จะผสมกับ 4X sample buffer (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 7) ในอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.4.4 การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใส่แผ่นเจล SDS-PAGE ลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลาย Tris-glycine, pH 8.3 ซึ่งมี 10% SDS (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 10) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จนท่วมแผ่นเจลทั้งปลายด้านบนและด้านล่าง หยอดสารละลายตัวอย่างซึ่งผสมกับ 4x sample buffer ที่เตรียมไว้แล้วลงไปบนหลุมเจล หลังจากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ขนาด 35 มิลลิแอมแปร์/แผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน รอจนกระทั่งแถบสีของ sample buffer เคลื่อนไปจนถึงระยะ 0.5 เซนติเมตร จากปลายด้านล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

1.4.5 การย้อมสีโปรตีนในเจลพอลิอะคริลาไมด์

แกะแผ่นเจล SDS-PAGE ออกจากแผ่นกระจก แล้วทำการย้อมแผ่นเจลแบบ silver stain ซึ่งมีความไวในการตรวจจับโปรตีนเท่ากับ 1-5 นาโนกรัม/จุด การย้อมสีโปรตีนด้วย silver stain ประกอบไปด้วย 8 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 การ fixing นำแผ่นเจลที่ได้ไปใส่ลงใน fixing solution (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 13) เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนที่ 2 การ washing ล้างเจลด้วย washing solution เขย่าเป็นเวลา 20 นาที จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนที่ 3 sensitizing นำแผ่นเจล ใส่ลงใน sensitizing solution (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 14) เขย่าเป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นที่ 4 washing ด้วยน้ำกลั่น เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ขั้นตอนที่ 5 การ staining เป็นการย้อมเจลด้วย silver nitrate solution (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 15) เขย่าเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนที่ 6 ล้างเจลอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เขย่าประมาณ 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนที่ 7 การ developing แช่แผ่นเจลใน developing solution (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 16) พร้อมเขย่าเบา ๆ จนเห็นสีของ silver ปรากฏ ขั้นตอนที่ 8 การ stopping ด้วย stopping solution (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 17) เขย่าเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ขั้นตอนที่ 9 ล้างแผ่นเจลอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง

1.5 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเทคนิค mass spectrometry

วิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค Matrix Assisted Laser

Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF mass spectrometry) โดย Hillenkamp *et al.* (1991) เทคนิค MALDI-TOF MS คือเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้เพื่อตรวจหาน้ำหนักต่อประจุของ ไอออนสารตัวอย่างในสถานะที่เป็นไอออนไนซ์ หลักการทำงานของเครื่อง mass spectrometer โดยทั่วไปมีส่วนสำคัญอยู่ 3 ส่วน คือแหล่งที่ทำให้เกิดไอออนไนเซชัน (ionization source) ส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์มวล (mass analyzer) และส่วนที่ใช้ในการตรวจวัดไอออน (detector) โดยสารตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ส่วนที่ทำให้เกิดไอออนไนเซชัน ซึ่งสารตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนให้มาอยู่ในรูปไอออนไนซ์ หลังจากนั้นสารที่มีประจุเหล่านี้จะถูกนำส่งบริเวณที่จะใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสารที่มีประจุเหล่านี้จะถูกแยกโดย mass to charge ratios (m/z) หลังจากนั้นสารที่มีประจุจะถูกตรวจวัดและระบบก็จะทำการประมวลผลให้เป็นโครมาโตแกรมของค่าความเข้มข้นของแต่ละมวลที่วัดได้กับ mass to charge ratios (m/z)

วิธีการที่จะทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้เกิดไอออนในเซชันมีหลายวิธี ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธี Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) หลักการคือ การทำโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้เกิดไอออนในเซชัน โดยการให้แสงเลเซอร์ผ่านไปที่โปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้ โดยที่โปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้มีการผสมอยู่กับแมทริกซ์ (matrix) ที่มีสมบัติในการดูดกลืนแสงเลเซอร์ได้ดี ซึ่งมีการผสมโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้ในความเข้มข้นที่ต่ำเมื่อเทียบกับแมทริกซ์ โดยที่สารแมทริกซ์จะส่งผ่านพลังงานของแสงเลเซอร์ที่ดูดกลืนไว้ไปให้กับโปรตีนบริสุทธิ์ จึงทำให้เกิด excitation energy ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้เกิดเป็นกลุ่มของไอออนของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้และของสารแมทริกซ์ที่อยู่ในรูปไอออนบวก โดยทั่วไปเครื่องนี้จะมีแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร

โปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้และสารแมทริกซ์จะถูกทำให้แห้งก่อนที่จะใส่เข้าเครื่องเพื่อทำให้เกิดไอออนในเซชันของสารตัวอย่างได้ดี โดยที่เครื่องตรวจวัดมวลเป็น time of flight จะแยกไอออนโดยอาศัย mass/charge ratio ทำให้สามารถทราบขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนโดยการวัดเวลาของแต่ละไอออนที่วิ่งผ่านสนามไฟฟ้าที่ให้ความเร่งคงที่ โดยไอออนที่มีขนาดเล็กกว่าจะวิ่งผ่าน drift tube ไปยัง mass ion detector ได้เร็วกว่าไอออนที่มีขนาดใหญ่

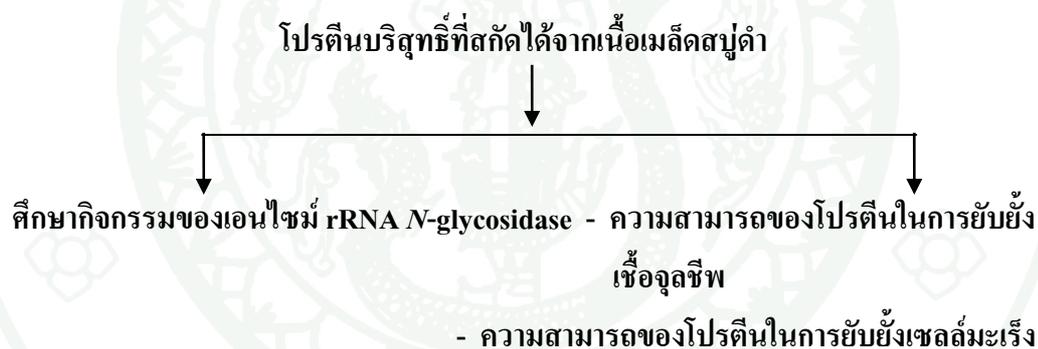
โปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดของสบู่ดำนำมาละลายใน 0.5% TFA จากนั้นแบ่งมาปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมกับสารแมทริกซ์ (10 mg/ml sinapinic acid และ 2, 5-dihydroxybenzoic acid ใน acetonitrile /0.1% TFA ด้วยอัตราส่วน 50:50 v/v) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร หรือในอัตราส่วน 1:5 บน multi-well stainless steel MALDI plate และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer: Reflex IV

1.6 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค In gel digestion และ LC-MS/MS

เทคนิค In gel digestion เป็นเทคนิคการย่อยโปรตีนในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสหรือเจลพอลิอะคริลามิด โดยใช้ trypsin solution เพื่อให้ได้มาเป็นสายเปปไทด์ แล้วนำส่วนของเปปไทด์ที่ได้มาศึกษาต่อโดยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งโดยทั่วไปเทคนิคนี้จะเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล วิธีการนี้จะทำให้ทราบข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีน

ตัดแถบโปรตีนที่ได้จากการแยกขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แล้วล้างจุดโปรตีนในเจลด้วย 3% hydrogenperoxide ตามด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เติม acetonitrile ที่ 5 นาที คูลสารละลายทิ้ง แล้วรีดิวซ์ด้วยสารละลาย 10 mM DTT ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ตามด้วยปฏิกิริยา alkylation โดยแช่ในสารละลาย 10 mM iodoacetamide ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างเจลด้วย acetonitrile แล้วย่อยด้วย 100 นาโนกรัม trypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง สกัดเปปไทด์จากเจลด้วย 50% acetonitrile/0.1% TFA 2 ครั้ง ทำให้เปปไทด์แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย nano LC-ESI MS/MS แล้ววิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม MASCOT โดยใช้ฐานข้อมูลพืช (Green plant) ใน NCBI และใช้ Parameter ได้แก่ Fixed modification, Variable modification, Mass value, Protein mass, Peptide mass tolerance, Fragment mass tolerance, Max missed cleavage

2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ



2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase

สารสกัดโปรตีนที่บริสุทธิ์ถูกนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase โดยทดสอบกับ reticulocyte lysate จากกระต่าย (Lin *et al.*, 2003; Maro *et al.*, 2007) นำโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อของเมล็ดสบู่ดำที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 ไมโครกรัมโปรตีนผสมกับ reticulocyte lysate จากกระต่าย ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl and 5 mM MgCl₂) โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ 10% SDS ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% จากนั้นนำสารผสมที่ทดสอบมาสกัด total rRNA ด้วย phenol (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 24) ปริมาตร 1 volume ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ และสกัด total rRNA อีกครั้งด้วย isoamyl/chloroform (1:1) ปริมาตร 1 volume ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ นำมาตกตะกอน RNA โดยใช้ ethanol เริ่มจากเติม 3 M sodium-acetate pH 5.5 (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 19) ปริมาตร 0.1 volume หลังจากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 volume ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดส่วนใสทิ้งไปเหลือไว้แต่ตะกอน ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการละลายตะกอนด้วย DEPC.H₂O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นแบ่งมาปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ นำมาทำปฏิกิริยากับ 1 M aniline/0.8 M acetic acid ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ด้วย autopipette บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเจล 6% PAGE/7 M urea (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 20) ย้อมเจลด้วย ethidium bromide (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 23) จากนั้นจึงนำไปตรวจ RNA ที่ถูกตัดด้วยการมองภายใต้แสงยูวี

2.2 การศึกษาความสามารถของโปรตีนในการยับยั้งเชื้อจุลินชีพ

2.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินชีพ

นำเชื้อจุลินชีพที่ก่อโรคในคนจำนวน คือ *Acinetobacter anitratus*

DMST4183, *Acinetobacter baumannii* ATCC19066, *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC23055, *Acinetobacter lwoffii* ATCC15309, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Burkholderia cepacia* ATCC25416, *Candida albican* ATCC10231, *Enterococcus faecalis* ATCC29212n, *Escherichia coli* ATCC25922, *Escherichia coli* O157:H7 DMST12743, *Klebsiella oxytoca* DMST16071, *Klebsiella pneumoniae* ATCC27736, *Listeria monocytogenes* DMST17303 26, *Proteus mirabilis* DMST8212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Pseudomonas fluorescens* DMST6034 11, *Salmonella enteritidis* ATCC17368, *Salmonella typhi* DMST5784, *Serratia marcescens* ATCC8100, *Shigella boydii* DMST7776, *Shigella dysenteriae* DMST15111, *Shigella flexneri* DMST4423, *Shigella sonnei* (group D) DMST2982 30, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* DMST20654 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Streptococcus agalactiae* DMST17129, *Streptococcus pyogenes* DMST17020, *Vibrio cholerae* nonO1, nonO139 DMST2873 และ *Vibrio cholerae* O139

ATCC51394 ที่เป็นสายพันธุ์มาตรฐานจาก American Type Culture Collection (ATCC) และศูนย์รวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMST Culture Collection) ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Mueller-Hinton agar โดยเชื้อเชื้อ 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton broth ปริมาตร 4 ml แล้วนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 (ปริมาณเซลล์ประมาณ 5×10^8 CFU/ml) ปรับความขุ่นให้ใกล้เคียงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton broth และนำไปเจือจางอีก 1:40 เพื่อที่จะนำไปเพาะเลี้ยงและทดสอบกับ โปรตีนเคอร์ซิน

2.2.2 การเตรียมสารละลายเจือจางของเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ในการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar dilution

นำสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนและเคอร์ซินทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำมาเตรียมเป็น stock solution ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเจือจางสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนและเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ให้ได้ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Mueller-Hinton broth นำแต่ละความเข้มข้นของสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนและเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ที่เจือจางนี้มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Mueller-Hinton agar 18 มิลลิลิตร (ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส, 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ที่ถังไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) เททิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนและเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ที่ได้คือ 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032, 0.016, 0.008 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารละลายสกัดหยาบของโปรตีนและเคอร์ซินทำบริสุทธิ์เป็นตัวควบคุม และใช้ ampicillin, chloramphenicol และ amphotericin B ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวควบคุมบวก (positive control)

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียของเคอร์ซินทำบริสุทธิ์โดยวิธี Agar dilution

นำเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางแล้ว 1:40 มาปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และที่ไม่มีสารสกัด แล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนงาน

อาหารเลี้ยงเชื้อ อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโปรตีนเคอร์ซินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration; MIC) และอ่านค่า MIC ของตัวควบคุมบวกที่ทำ การทดลองเช่นเดียวกัน

2.3 การศึกษาความสามารถของเคอร์ซินในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

2.3.1 MTT assay

ทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ โดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Mossmann, 1983) เป็นการติดตามการมีชีวิตของเซลล์โดยการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ mitochondrial reductase ซึ่งจะไปทำการ reduce เกิด tetrazolium ที่มีสีเหลือง ไปเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีม่วง วิเคราะห์ผลด้วยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำเซลล์ SW620 cell line (human colon cancer, ATCC CCL-228) มาเพาะเลี้ยงใน Eagle's minimal essential medium ที่ประกอบด้วย 1.2 กรัม/ลิตร NaHCO_3 , 100 หน่วย/มิลลิลิตร penicillin, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin และ 10% หรือ 4% fetal bovine sera ใน growth medium และ maintenance medium ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 เป็นเวลา 3-7 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงใน 96 well microplate โดยทำการเจือจางเซลล์ให้ได้ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งเซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นผิวของเพลท ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ออก เดิมสารละลายเคอร์ซิน ทำบริสุทธิ์และเจือจางใน maintenance medium ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยหยอดลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate ทำซ้ำ 3 ครั้งทุกความเข้มข้น เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 เป็นเวลา 1 วัน ทำการเจือจางปริมาณ MTT ใน phosphate buffer saline ที่ความเข้มข้น 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมนลงในแต่ละหลุมของ microplate เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นจากการละลายตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร MTT กับเซลล์ที่มีชีวิต โดยเทสาร MTT ออก จากนั้นเติมสาร DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง MTT กับเอนไซม์ของเซลล์ที่มีชีวิต ตั้งทิ้งไว้

ประมาณ 5 นาที วัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร หาความสัมพันธ์ของปริมาณของโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กับปริมาณของเซลล์ที่ถูกฆ่าที่ median lethal concentration (LC₅₀) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน Mitomycin C เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งหรือฆ่าเซลล์มะเร็ง

2.3.2 Resazurin microtiter assay (REMA)

ทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งโดยใช้วิธี REMA (O'Brien *et al.*, 2000) เป็นการติดตามการมีชีวิตของเซลล์ สาร resazurin เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ซึ่งเป็นสีฟ้าที่ไม่เรืองแสง เมื่อสาร resazurin ถูกรีดิวซ์ด้วย เอนไซม์ oxidoreductase จะเกิดผลิตภัณฑ์ resorufin ที่มีสีชมพูที่เรืองแสงได้ และวิเคราะห์ผลด้วยการวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรมิเตอร์

ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก KB (ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 (ATCC CRL-5804) ใช้วิธี Resazurin microplate assay โดย Brien และคณะ (2000) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน RPMI-1640 medium ที่ประกอบด้วย 1.2 กรัม/ลิตร NaHCO₃, 100 หน่วย/มิลลิลิตร penicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin และ 10% fetal bovine sera ใน growth medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ สำหรับเซลล์ เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก KB และ เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เป็นเวลา 5 วัน ส่วนเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 บ่มนาน 5 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงใน 384 well microplate โดยทำการเจือจางเซลล์ให้ได้ 7x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร, 9x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร และ 9x10⁴ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ คูณสารละลายเซลล์ ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และ 5 ไมโครลิตร ของสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250, 125 และ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (สารละลายโปรตีนเจือจางใน growth medium ที่ประกอบด้วย 5% DMSO) หยดใส่ลงในหลุม ทำซ้ำ 3 ครั้งทุกความเข้มข้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นเติม 12.5 ไมโครลิตร ของสารละลาย resazurin ที่มีความเข้มข้น 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมลงในแต่ละหลุมของ microplate เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณสีฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นด้วย SpectraMax M5 multi-detection microplate reader ที่ความยาวคลื่นของ excitation และ emission

ที่ 530 และ 590 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยใช้สมการ ดังนี้คือ $\% \text{ inhibition} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100$ ซึ่ง FU_T และ FU_C เป็นค่าเฉลี่ยของหน่วยสีฟลูออเรสเซนซ์จากเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารละลายโปรตีนและจากเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารละลายโปรตีนลงไปทดสอบ ตามลำดับ หากความสัมพันธ์ของปริมาณของโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ กับปริมาณของเซลล์ที่ถูกฆ่าที่ 50% inhibitory concentration (IC_{50}) เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของยามาตรฐาน Ellipticine เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้งหรือฆ่าเซลล์มะเร็ง โดยการใช้โปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA)

3. การนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสับด้ามาประยุกต์ใช้

3.1 การเตรียมแอนติเจนเพื่อผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อเคอร์ซีน

3.1.1 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดโปรตีนไม่เสียสภาพ (Non denaturing discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis, ND-PAGE)

ND-PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้แยกโปรตีนบนเจลพอลิอะครีลาไมด์ที่ไม่มีการทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นลบมากจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นลบน้อยกว่า ส่วนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าก็จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับประจุ ขนาดและรูปร่างของโปรตีน ซึ่งข้อดีสำหรับ ND-PAGE คือ สามารถนำโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ซึ่งแยกได้บนเจลไปตรวจสอบกิจกรรมได้

3.1.1.1 การเตรียมแผ่นเจลพอลิอะครีลาไมด์ชนิดโปรตีนไม่เสียสภาพ

เตรียม 15% separating gel โดยใส่แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เป็นอันดับสุดท้าย หลังจากเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตลงไปแล้วจึงเท separating gel ลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกคู่โดยทันที (ในการทดลองใช้ชุดทำเจลพอลิอะครีลาไมด์ omniPAGE, Vertical Electrophoresis System รุ่น VS20D) จนมีความสูง 17.5 เซนติเมตร จากนั้นค่อยๆหยดน้ำกลั่นตามลงไปบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนแล้ว จึงเทน้ำกลั่นออกจากเจล เตรียม stacking gel หลังจากเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตลง

ไปแล้ว เติม stacking gel บน separating gel เสียบหวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยอดสารตัวอย่าง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที จากนั้นค่อยดึงหวีออก

3.1.1.2 การเตรียมโปรตีนตัวอย่างสำหรับตรวจสอบบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ชนิดโปรตีนไม่เสียดสภาพ

นำโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำหลังจากการนำส่วนไซที่ได้มาไดอะไลซ์อีกครั้งในน้ำกลั่น ผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.1.1.3 การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใส่แผ่นเจล ND-PAGE ลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลาย Tris-glycine, pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จนท่วมแผ่นเจลทั้งปลายด้านบนและด้านล่าง หยอดสารละลายตัวอย่างซึ่งผสมกับ sample buffer ที่เตรียมไว้แล้วลงไปบนหลุมเจล หลังจากนั้นผ่านความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ขนาด 100 โวลต์/แผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน รอจนกระทั่งแถบสีของ sample buffer เคลื่อนไปจนถึงระยะ 0.5 เซนติเมตร จากปลายด้านล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง (หล่อเย็นด้วยน้ำแข็งตลอดเวลา)

3.1.1.4 การย้อมสีโปรตีนในเจลพอลิอะคริลาไมด์

แกะแผ่นเจล ND-PAGE ออกจากแผ่นกระจก ตัดเจลให้มีความกว้างประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปแช่เจลในน้ำย้อมสีโปรตีน (เตรียมตามภาคผนวก ก. ข้อ 11) ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง และล้างสีที่ไม่จับโปรตีนออกด้วยน้ำยาล้างสีโปรตีน (ภาคผนวก ก. ข้อ 12) จนกระทั่งเจลใสและได้แถบโปรตีนปรากฏอย่างชัด ตัดแถบโปรตีนที่มีขนาด 29 กิโลดาลตัน แล้วทำการชะโปรตีนออกในสารละลาย 0.1% SDS โดยเครื่อง protein eluter ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ขนาด 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ไดอะไลซ์โปรตีนที่ถูกชะออกมาด้วยน้ำกลั่น นาน 48 ชั่วโมง เพื่อกำจัด SDS ออก เนื่องจาก SDS จะเป็นพิษต่อกระต่าย

3.2 การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ต่อเคอร์ซินในกระต่าย

3.2.1 เตรียมแอนติเจนเพื่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน นำสารละลายเคอร์ซิน 200 ไมโครกรัม ผสมกับ Complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 และทำการโฮโมจิไนท์ให้เข้ากัน ใช้ Complete Freund's adjuvant ในการกระตุ้นครั้งต่อไปใช้ Incomplete Freund's adjuvant

3.2.2 การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ โดยเลือกกระต่ายอายุประมาณ 2 ปี หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย 2 ตัวโดยใช้แอนติเจน 200 ไมโครกรัมต่อตัว ฉีดเข้าบริเวณใต้ผิวหนังด้านหลังประมาณ 2-3 จุด ฉีดกระตุ้นซ้ำทุกสองอาทิตย์ จำนวน 4 ครั้ง โดยทุกครั้งจะมีการเจาะเลือดบริเวณใบหู นำไปเช็คไตเตอร์ของแอนติเจนแต่ละชนิดด้วย RIA (Radioimmunoassay)

3.3 การตรวจวัดไตเตอร์ต่อแอนติเจน

นำซีรัมของกระต่ายที่ได้มา 50 ไมโครลิตร เติม 10% bovine serum albumin 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายเคอร์ซินทำบริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตร เขย่าประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าที่ 15 นาทีอีกครั้ง เติม 750 ไมโครลิตร 90% saturated ammonium sulphate เขย่าประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 750 ไมโครลิตร 50% saturated ammonium sulphate นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทส่วนใสทิ้งไป หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร แล้วเติม Scintillator 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่ากัมมันตรังสีด้วยเครื่อง Beta-counter

3.4 การตรวจสอบโปรตีนเคอร์ซินด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot

Immuno-Western Blot เป็นเทคนิคที่ใช้ติดตามโปรตีนที่สนใจ โปรตีนในการทดลองคือ เคอร์ซิน ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ การทำเทคนิคนี้เพื่อต้องการทราบว่าในเนื้อเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ต่าง ๆ มีปริมาณของเคอร์ซินมากน้อยเท่าไร เพื่อพัฒนาปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำหลายสายพันธุ์ในประเทศไทยที่มีปริมาณของน้ำมันมากและไม่เป็นพิษกับสัตว์

3.4.1 การเตรียมโปรตีนตัวอย่าง

นำเนื้อเมล็ดสบู่ดำแต่ละแหล่งปลูกต่าง ๆ 153 แหล่งปลูกมา 6 เมล็ดคบด้วย โกร่ง โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ที่เติมเกลือ 0.15 M NaCl ในอัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กวนต่อเนื่องนานประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกเอาไขมันที่อยู่ด้านบนออกแล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดส่วนใสที่ได้ไปโคอะไลซ์ ข้ามคืนในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเตรียมโปรตีนตัวอย่างสำหรับตรวจสอบบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ชนิดโปรตีนเสียสภาพ

นำโปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำหลังจากการนำส่วนใสที่ได้มาโคอะไลซ์อีกครั้งในน้ำกลั่น ผสมกับ 4x sample buffer ในอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.4.3 การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ใส่แผ่นเจล SDS-PAGE ลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-glycine, pH 8.3) ซึ่งมี 10% SDS ลงในอ่างบัฟเฟอร์ จนท่วมแผ่นเจลทั้งปลายด้านบนและด้านล่าง หยอดสารละลายตัวอย่างซึ่งผสมกับ 4x sample buffer ที่เตรียมไว้แล้วลงไปบนหลุมเจล หลังจากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ขนาด 35 มิลลิแอมแปร์/แผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน รอจนกระทั่งแถบสีของ sample buffer เคลื่อนไปจนถึงระยะ 0.5 เซนติเมตร จากปลายด้านล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3.4.4 การย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรน (Western blot)

เป็นการย้ายโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสู่เมมเบรนที่มีประจุบวก เช่น ไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือ โพลีไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (PVDF) วิธีการย้ายโปรตีนสามารถทำได้ 3 แบบ คือ วิธีที่ 1 wet tank transfer วิธีที่ 2 semi-dry transfer และวิธีสุดท้ายเป็นการย้ายแบบ dry bufferless transfer ในการทดลองใช้การย้ายโปรตีนแบบ wet tank transfer เป็นการแช่เจลลงในบัฟเฟอร์ 1x transfer buffer นำเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจล SDS-PAGE แช่ลงใน transfer buffer เป็นเวลา 15 นาที เตรียมแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล และเตรียมกระดาษกรองให้มีขนาดกว้างกว่าเมมเบรน 1 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น จากนั้นแช่เมมเบรนใน 100% (v/v) methanol เป็นเวลา 5 วินาที แล้วแช่ต่อใน transfer buffer เป็นเวลา 10 นาที สำหรับกระดาษกรองจะแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนโดยใช้เครื่อง Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA) และใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย phosphate buffer saline, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.5 (PBST) (ภาคผนวก ก. ข้อ 26) จำนวน 3 ครั้ง

3.4.5 การป้องกันการเกิด non-specific binding (Blocking)

Blocking เป็นวิธีการป้องกันการเกิด non-specific binding ที่เกิดจากโปรตีนอื่น ๆ เข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน หลังจากการย้ายโปรตีนจากเจลสู่แผ่นเมมเบรนแล้ว โปรตีนจะจับอยู่กับเมมเบรน แต่ยังมีพื้นที่ของแผ่นเมมเบรนเหลืออยู่ในการทดลองจึงต้องทำการ blocking ด้วย 1% (w/v) BSA ที่อยู่ใน PBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง

3.4.6 การติดตามผล

ขั้นตอนการติดตามผลนั้นจะมีการโพรบเมมเบรนเพื่อหาโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นจะทำให้ได้เกิดการเปล่งแสงออกมา สามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นแรก นำแผ่นเมมเบรนนั้นมาบ่มกับพอลิโคลนอล แอนติบอดีของ
กระต่ายที่จำเพาะต่อเคอร์ซิน (แอนติบอดีชนิดที่ 1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วย
PBST 3 ครั้ง

ขั้นที่สอง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาบ่มต่อด้วย โพลีโคลนอล แอนติบอดี
ของแพะที่ติดลากด้วยเอนไซม์ฮอร์ชเรดิซเปอร์ออกซิเดสซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีของกระต่าย
(แอนติบอดีชนิดที่ 2) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วย PBST 3 ครั้ง

3.4.7 การวิเคราะห์ผล

จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนมาจับให้หมด ๆ แล้วบ่มกับ ECL plus western
blotting detection reagent เป็นเวลา 2 นาที นำแผ่นเมมเบรนที่ได้ประกบกับแผ่นฟิล์มในห้องมืด
เป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นนำแผ่นฟิล์มมาแช่ลงใน developer, fixing และน้ำกลั่น ตามลำดับ

3.4.8 การแปลผล

นำแถบโปรตีนที่ได้จากการทำ Immuno-Western Blot มาอ่านค่าความเข้ม
ของแถบด้วยโปรแกรม Infinity-Capt version 12.9 ที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้ peak (volume)

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองนี้มุ่งศึกษาหาวิธีการแยกเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบูดำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมีอย่างง่ายที่ไม่ซับซ้อนและประหยัดเวลา เพื่อที่จะนำเคอร์ซินทำบริสุทธิ์นี้ไปศึกษาสมบัติทางชีวโมเลกุล เนื่องจากเคอร์ซินเป็นโปรตีนพิษ หรือเรียกว่า toxalbumin ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของยูแคริโอตได้ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไรโบโซม ชนิดที่ 1 หรือ RIP Type I ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ *N*-glycosidase การทำงานของเอนไซม์นี้ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนหยุดลง จึงทำให้เซลล์บริเวณนั้นตาย ด้วยคุณสมบัตินี้จึงได้มีการนำความเป็นพิษของเคอร์ซินมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์เพื่อผลิตเป็นตัวยับยั้งการเกิดเนื้องอกของเซลล์ (Lin *et al.*, 2003) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา และ ไวรัส ดังนั้นหลังจากทำเคอร์ซินบริสุทธิ์แล้ว ผู้ทดลองจึงได้ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA *N*-glycosidase ที่อยู่ในเคอร์ซิน เพื่อให้ทราบว่าวิธีการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมีอย่างง่ายนั้น มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์นี้หรือไม่ จากนั้นทำการศึกษาสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของคนบางชนิด และนอกจากนี้ยังศึกษาถึงความแตกต่างของปริมาณเคอร์ซินในเมล็ดสบูดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย เพราะหลังจากที่มีการหีบเอาน้ำมันออกจากส่วนของเมล็ดแล้ว พบว่ากากที่เหลือหลังจากการหีบน้ำมันออกนั้น มีปริมาณโปรตีนสูง เกษตรกรจึงได้นำไปเลี้ยงสัตว์ แต่ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงสัตว์นั้นต้องมีการกำจัดสารพิษออกเสียก่อน ดังนั้นเพื่อประหยัดทั้งต้นทุนและเวลา จึงได้มีการคัดกรองหาเมล็ดสบูดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ที่มีโปรตีนสูง แต่ปริมาณเคอร์ซินที่เป็นพิษต่ำ

1. การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบูดำและการศึกษาสมบัติทางชีวโมเลกุล

1.1 การเตรียมสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบูดำ

ในการทดลองนี้เมล็ดสบูดำ (KUBP33) ที่นำมา จะเก็บในช่วงที่ต้นสบูดำอายุได้ประมาณ 38 เดือน ผลที่เก็บจะสุกแก่ เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีน้ำตาลดำเข้ม ค่อนข้างแข็ง ทำการแกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก แล้วกระเทาะเอาส่วนเปลือกที่หุ้มเนื้อเมล็ด (seed coat) ออกไป ให้ได้แต่เนื้อเมล็ด (kernel) สีขาวนวล (ภาพที่ 13) จากนั้นนำส่วนเนื้อเมล็ดมาสกัดโปรตีนด้วยสารละลายทริส

บัพเฟอร์ ดังวิธีการทดลองในข้อ 1.1 เนื่องจากในเนื้อเมล็ดสนูปมีน้ำมันค่อนข้างสูง ดังนั้นก่อนที่จะนำสารละลายมาใช้ จึงนำไปแช่เย็นและทำการตัดไขมันนั้นออกไปก่อน แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้ได้สารละลายสกัดหยาบของโปรตีน จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบโปรตีนจากส่วนเนื้อเมล็ด ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ดังวิธีการทดลองในข้อ 1.3 ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ข ข้อ 1) พบว่าจากส่วนเนื้อเมล็ด 100 กรัม ได้โปรตีนในสารสกัดหยาบเท่ากับ 6,930 มิลลิกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนเท่ากับ 69.30 มิลลิกรัม/กรัมของเนื้อเมล็ด หรือเท่ากับ 6.93 เปอร์เซ็นต์



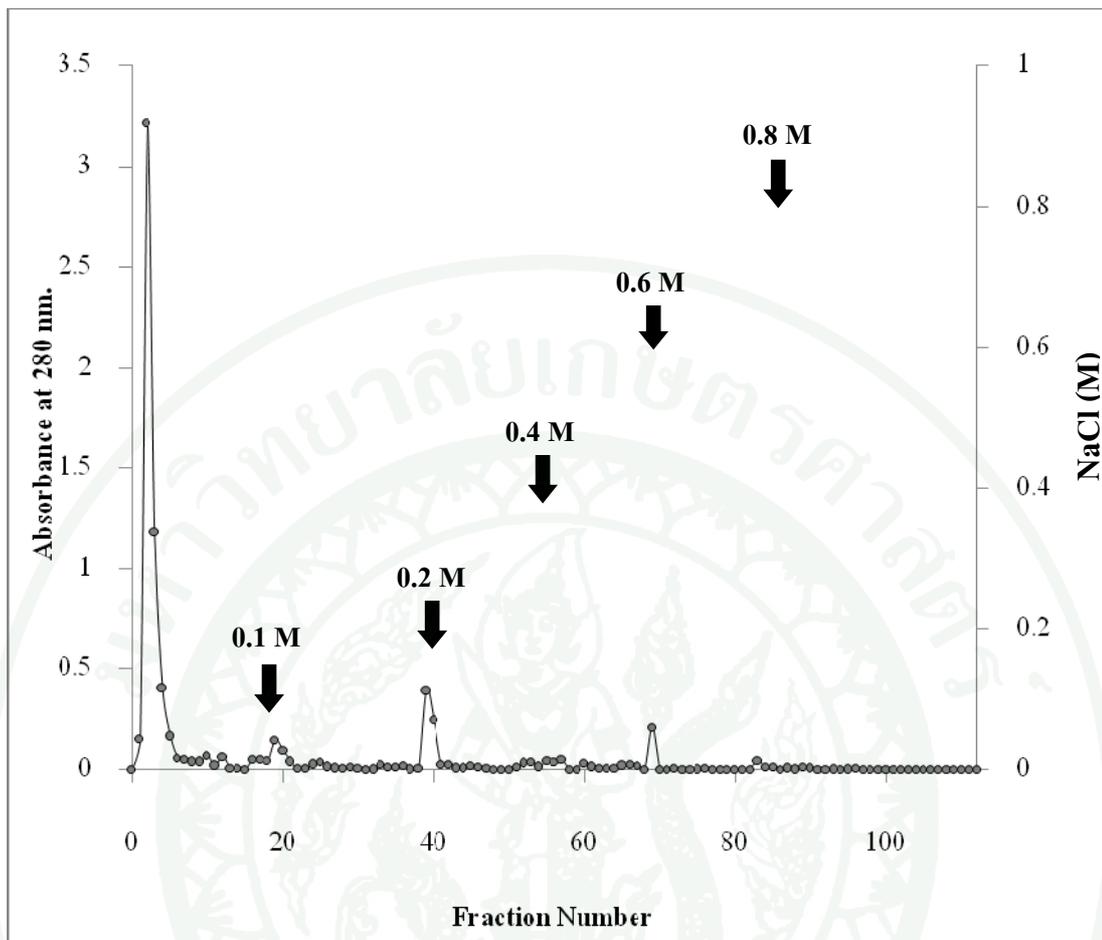
ภาพที่ 13 ลักษณะของเนื้อเมล็ด (kernel) ของสนูปดำ

1.2 การแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์

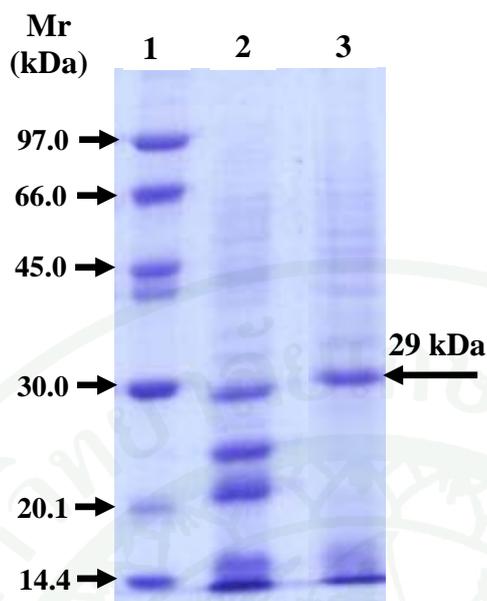
1.2.1 การแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

เมื่อนำสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสับดูมาแยกบริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะโปรตีนส่วนที่ไม่จับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 และชะส่วนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 2.0 ตามลำดับ ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 โดยใช้อัตราการไหลคงที่ 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แยกเก็บส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยแยกได้วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 นาโนเมตร นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่แยกได้โดย SDS-PAGE (15% separating gel) หลังจากไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกเกลือออก โดยได้ผลการแยกดังแสดงไว้ในภาพที่ 14 เห็นได้ว่าเคอร์ซินไม่จับกับคอลัมน์และถูกชะออกมาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 รวมหลอดที่เป็นโปรตีนส่วนที่ไม่จับคอลัมน์เข้าด้วยกันคือหลอดที่ 5-11 วัดปริมาณสารละลายโปรตีน นำไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ได้ค่าโปรตีนทั้งหมด 15.27 มิลลิกรัม และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซินด้วย 15% SDS-PAGE

ผลจากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซิน ปรากฏแถบหลักโปรตีนเคอร์ซินที่น้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตันและโปรตีนอื่น ๆ บน SDS-PAGE (ภาพที่ 15) เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสกัดหยาบของโปรตีน เห็นได้ว่าการแยกโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้บางส่วน แสดงว่าการแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ยังไม่ดีพอ



ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของการแยกเอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสนุ่นดำโดยคอลัมน์ DEAE-Sepharose: สารสกัดหยาบโปรตีน (20 mg protein) ที่แยกได้จาก DEAE-sephacel column (1.5 x 5 เซนติเมตร) โปรตีนที่ไม่จับคอลัมน์ถูกชะด้วย 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่จับคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 2.0 M แบบลำดับขั้น โดยใช้อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แยกเก็บส่วนสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำแต่ละ peak ไปทดสอบกิจกรรมของ เอนไซม์ *N*-glycosidase พบว่าโปรตีนส่วนที่ไม่จับคอลัมน์แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นรวมสารละลายหลอดที่ 5-11



ภาพที่ 15 15% SDS-PAGE ของสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ (KUBP 33) ที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ย้อมสีด้วย comassie brilliant blue

Lane 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5.75 มิลลิกรัมโปรตีน

Phosphorylase b น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 97 กิโลดาลตัน

Albumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 กิโลดาลตัน

Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 กิโลดาลตัน

Carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน

Trypsin inhibitor น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20.1 กิโลดาลตัน

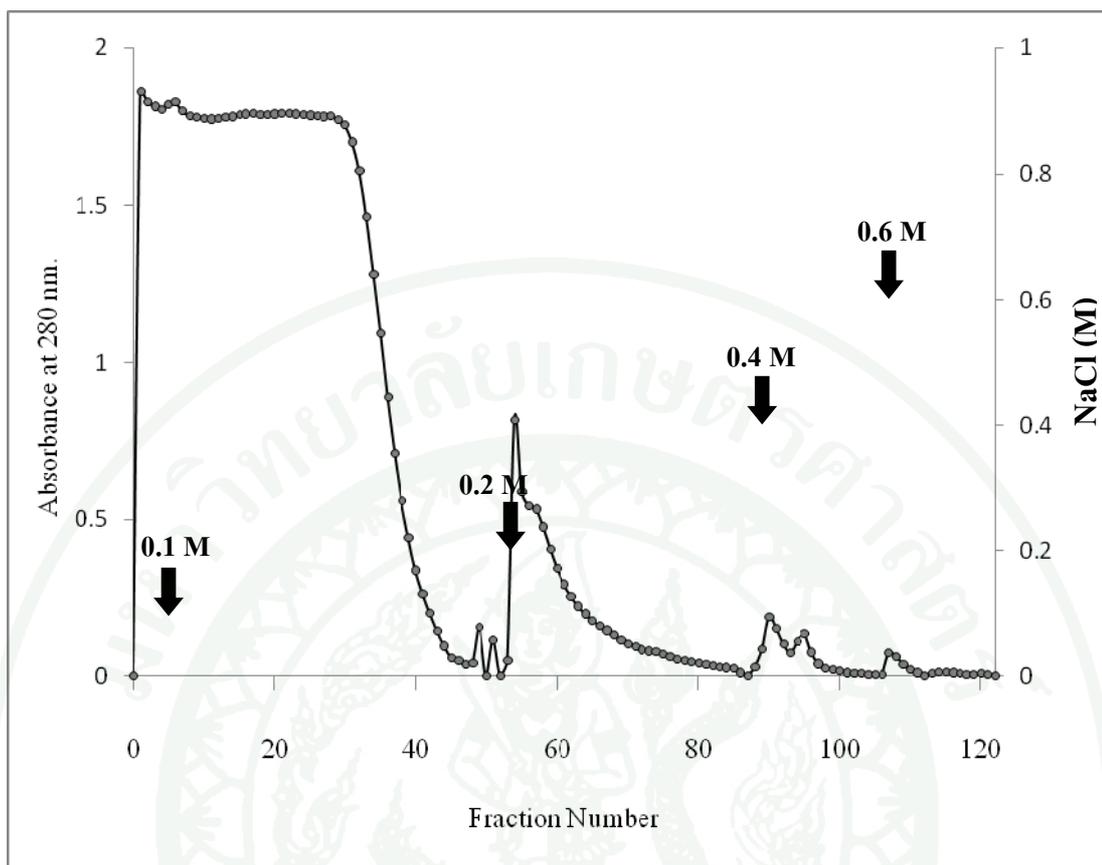
□-Lactalbumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14.4 กิโลดาลตัน

Lane 2 คือ สารสกัดหยาบ มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 17.87 มิลลิกรัมโปรตีน

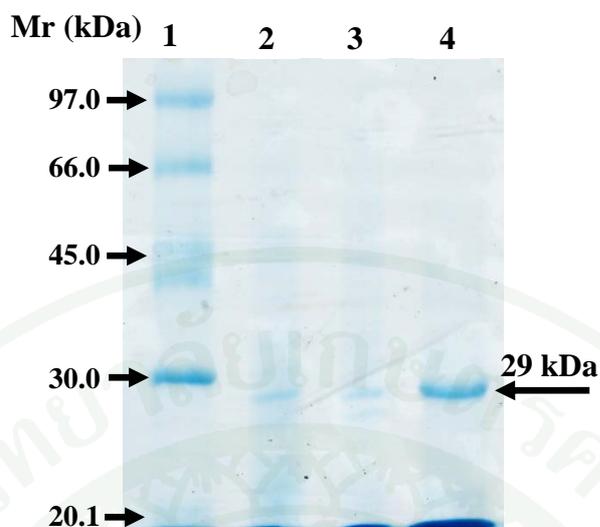
Lane 3 คือ ส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (pooled unbound fractions) มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 18.20 มิลลิกรัม โปรตีน

รวมสารละลายโปรตีนส่วนที่ไม่จับคอลัมน์ DEAE-Sephacel และนำไปไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 จากนั้นมาแยกให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose (ภาพที่ 16) จะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 และจะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยเกลือ NaCl โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแบบลำดับขั้น (stepwise elution) คือ 0.1 0.2 0.4 และ 0.6 M ตามลำดับ โดยใช้อัตราการไหลคงที่ 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แยกเก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE (15% separating gel) จากภาพที่ 16 เห็นได้ว่าเคอร์ซินถูกชะออกมาด้วยเกลือ NaCl เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 0.2 M นำสารละลายเคอร์ซินที่ได้ไปไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 M phosphate, pH 7.5 เพื่อแยกเอาเกลือ NaCl ออก วัดปริมาณสารละลายโปรตีนหลังไดอะไลซ์ นำไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ข ข้อ 3) และนำไปไดอะไลซ์อีกครั้งในน้ำกลั่น ก่อนนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซิน โดยได้โปรตีนทั้งหมด 1.63 มิลลิกรัม ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย aqua sorb ซึ่งเป็นการดึงน้ำออก พบว่าได้โปรตีนทั้งหมดเป็น 3.26 มิลลิกรัม จึงนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซินโดย SDS-PAGE

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซิน จะเห็นว่า lane 4 นั้น ปรากฏแถบโปรตีนหลักเพียงแถบเดียวบน SDS-PAGE (ภาพที่ 17) เปรียบเทียบกับสารละลายสกัดหยาบของโปรตีนและสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่แสดงดัง lane 2 และ lane 3 ตามลำดับ เห็นได้ว่าการแยกโปรตีนอื่น ๆ ออกไปเป็นจนหมด แสดงว่าโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำที่แยกด้วยคอลัมน์ CM-Cellulose มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลจาก SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานดังผลการทดลองที่ 1.2.2 พบว่าแถบของโปรตีนหลักนี้มีน้ำหนักโมเลกุล (relative molecular weight) เท่ากับ 29 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมของการแยกเอนไซม์จากเนื้อเมล็ดสนุ่นดำโดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose : รวมสารละลายโปรตีนส่วนที่ไม่จับคอลัมน์ DEAE-Sephacel (25 มิลลิกรัมโปรตีน) มาแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose (1.5 x 5 เซนติเมตร) จะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 และจะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.6 M แบบลำดับขั้น โดยใช้อัตราเร็ว 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แยกเก็บส่วนสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำแต่ละ peak ไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ *N*-glycosidase



ภาพที่ 17 15% SDS-PAGE ของสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ (KUBP 33) ที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel นำส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (unbound) ไปแยกต่อโดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose ย้อมด้วย comassie brilliant blue

Lane 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5.75 มิลลิกรัมโปรตีน

Phosphorylase b น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 97 กิโลดาลตัน

Albumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 กิโลดาลตัน

Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 กิโลดาลตัน

Carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน

Trypsin inhibitor น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20.1 กิโลดาลตัน

Lane 2 คือ สารสกัดหยาบ มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 10 มิลลิกรัมโปรตีน

Lane 3 คือ โปรตีนที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10 มิลลิกรัมโปรตีน

Lane 4 คือ โปรตีนแยกโดยคอลัมน์ CM-Cellulose มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 17.30 มิลลิกรัมโปรตีน

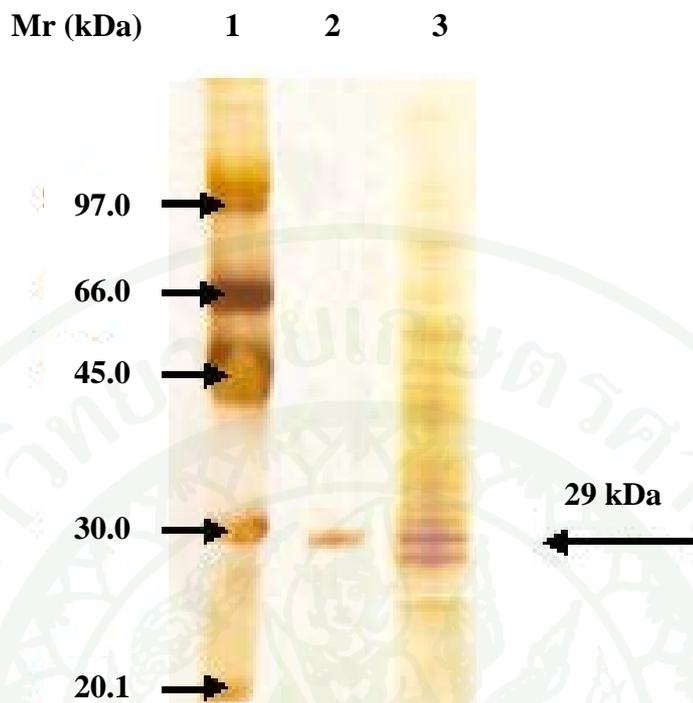
1.2.2 การแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์โดยการปรับพีเอช

ในการทดลองนี้ได้ทำการแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบของโปรตีน โดยการปรับ pH ของสารสกัดหยาบของโปรตีนให้ต่ำกว่าค่า pI ของเคอร์ซิน มีรายงานว่าเคอร์ซินมีค่า pI เท่ากับ 5.5 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงปรับ pH ของสารสกัดหยาบให้เท่ากับ 4.5 โดยการไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดังวิธีการทดลองในข้อ 1.2 โปรตีนชนิดอื่นจะถูกตกตะกอนออกไป ดังนั้นโปรตีนที่สนใจจะละลายอยู่ในส่วนใส และไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 M phosphate, pH 7.5 เพื่อคงสภาพของโปรตีนนั้นไว้ ทำการไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งแล้ว ทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบโปรตีนหลังจากการทำบริสุทธิ์ ตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) แสดงดังภาคผนวก ข ข้อ 4 พบว่าสารสกัดหยาบโปรตีนหลังจากทำบริสุทธิ์ มีโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 40 มิลลิกรัม (ตารางที่ 8) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซินโดย 15% SDS-PAGE แสดงดังภาพที่ 18

พบว่า Lane 2 นั้น ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว แสดงว่าโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสับดำที่ทำบริสุทธิ์โดยการไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium-acetate, pH 4.5 มีความบริสุทธิ์สูงและประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียงชนิดเดียว เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานดังแสดงในภาพที่ 19 พบว่าแถบของโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุล (relative molecular weight) เท่ากับ 29 กิโลดาลตัน

เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์กับโปรตีนมาตรฐานซึ่งได้แก่ phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor และ α -lactalbumin บนแผ่น SDS-PAGE (ภาพที่ 19) โดยคำนวณค่าระยะทางสัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 8 นำค่าระยะทางสัมพัทธ์และน้ำหนักโมเลกุลไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ค่าระยะทางสัมพัทธ์ของเคอร์ซินเท่ากับ 0.510 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 19) ได้น้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยเคอร์ซินเท่ากับ 29 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 18 15% SDS-PAGE ของเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำที่ทำให้บริสุทธิ์โดยไลอะไลต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Sodium-Acetate, pH 4.5 ข้อมด้วย silver stain

Lane 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 5.75 มิลลิกรัม โปรตีน

Phosphorylase b น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 97 กิโลดาลตัน

Albumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 กิโลดาลตัน

Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 กิโลดาลตัน

Carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 กิโลดาลตัน

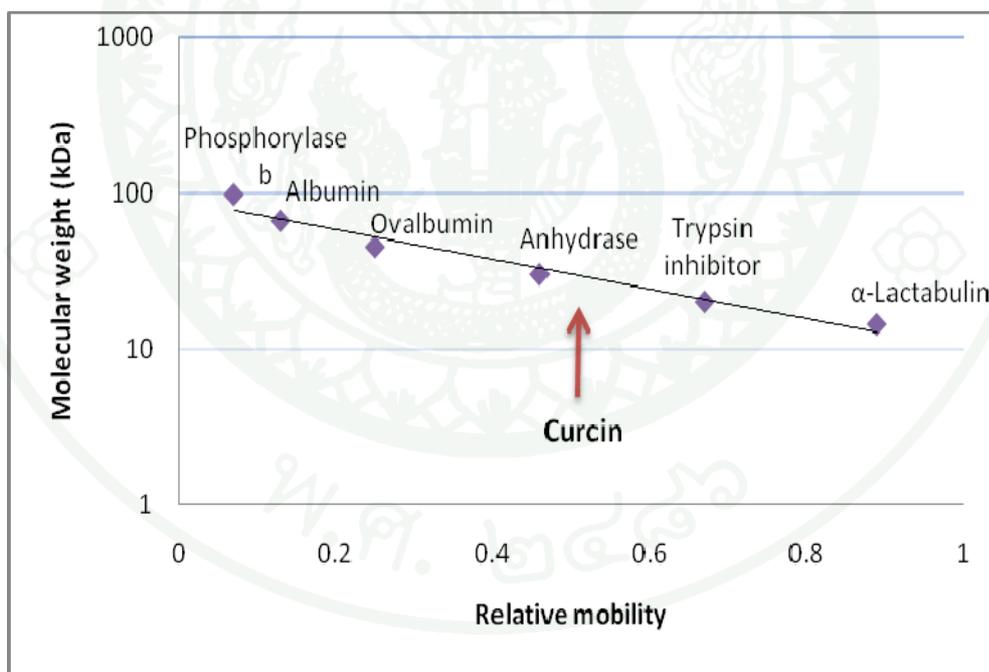
Trypsin inhibitor น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20.1 กิโลดาลตัน

Lane 2 คือ โปรตีนที่ทําบริสุทธิ์โดยไลอะไลต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 12 มิลลิกรัม โปรตีน

Lane 3 คือ สารสกัดหยาบ มีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 12 มิลลิกรัม โปรตีน

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและอัตราส่วนของการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานบน SDS-PAGE

โปรตีนมาตรฐาน	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	Relative mobility
Phosphorylase b	97	0.07
Albumin	66	0.13
Ovalbumin	45	0.25
Carbonic anhydrase	30	0.46
Trypsin inhibitor	20.1	0.67
α -lactalbumin	14.4	0.89



ภาพที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและอัตราส่วนของการเคลื่อนที่ของโปรตีนบน SDS-PAGE

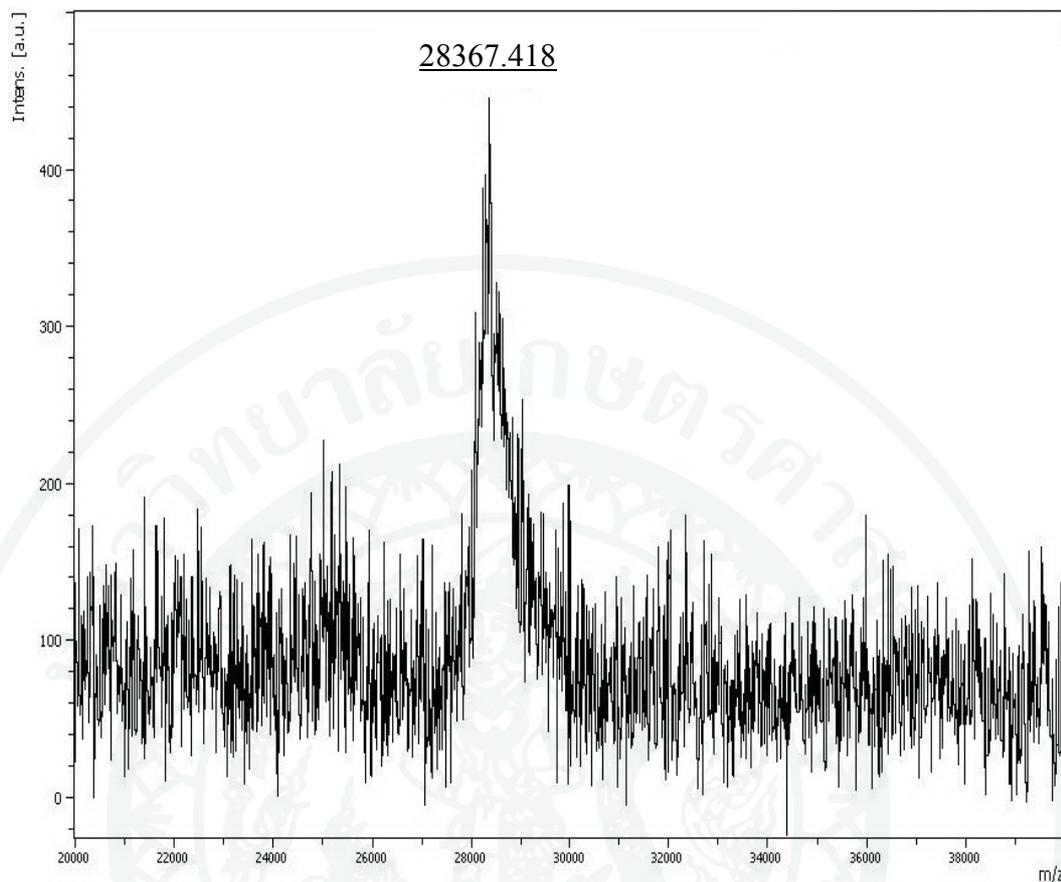
ตารางที่ 9 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดต่อน้ำหนักเมล็ดแห้งที่แยกได้หลังจากการผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel, CM-Cellulose และ การปรับ pH

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมโปรตีน/น้ำหนักเมล็ดแห้ง)
DEAE-Sephacel	15.27
CM-Cellulose	3.26
การปรับ pH	40.0

- หมายเหตุ 1. น้ำหนักของเนื้อเมล็ดเริ่มต้นเท่ากับ 433 มิลลิกรัม
 2. ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 30 มิลลิกรัมโปรตีน
 3. ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 45 มิลลิกรัมโปรตีน

1.3 การศึกษามวลโมเลกุลของเคอร์ซิน โดย MALDI-TOF Mass Spectrophotometry

เพื่อให้ทราบมวลโมเลกุลที่แน่นอนของเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสดบดที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ จึงได้ทำการตัดแถบโปรตีนจาก 15% SDS-PAGE ไปหามวลโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF MS ด้วยวิธีการทดลองในข้อ 1.5 ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ผลแสดงดังภาพที่ 20 ซึ่งพบว่า peak ที่ปรากฏมีเพียง peak เดียวเท่านั้น มีมวลโมเลกุลที่เท่ากับ 28,367 ดาลตัน หรือ ประมาณ 28.4 กิโลดาลตัน ซึ่งต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้จาก SDS-PAGE



ภาพที่ 20 การศึกษามวลโมเลกุลของเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำโดย MALDI-TOF MS

1.4 การศึกษาชนิดของเคอร์ซินด้วยเทคนิค In gel digestion และ LC-MS/MS

เพื่อเป็นการยืนยันว่าโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ นั้นเป็นเคอร์ซินจริง งานวิจัยนี้จึงได้วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน แยกได้ด้วยเทคนิค In gel digestion ซึ่งเป็นการย่อยแถบของโปรตีนที่แยกได้จาก 15% SDS-PAGE ด้วยเอนไซม์ trypsin เพื่อให้ได้เป็นสายเปปไทด์สายสั้น ๆ หลังจากนั้นจึงได้นำสายเปปไทด์ ไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC-MS/MS อีกครั้ง และใช้โปรแกรม MASCOT ทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลพืช (Green plant) ใน NCBI และได้ใช้ Parameter ในการวิเคราะห์ดังนี้ คือ Fixed modification, Variable modification, Mass value, Protein mass, Peptide mass tolerance, Fragment mass tolerance และ Max missed cleavage ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 21 จะเห็นว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้มีความเหมือนกับสารตั้งต้นของเคอร์ซิน

(curcin precursor) และ โปรตีน RIP ของสมุนไพร เท่ากับ 78% และ 15% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า โปรตีนที่ทำปฏิกิริยาได้ น่าจะเป็นเคอร์ซิน

Mascot Search Results

MS data file : E:\081114_G1_DDA.pkl
 Database : NCBI nr 20070216 (4626804 sequences; 1596079197 residues)
 Taxonomy : Viridiplantae (Green Plants) (322324 sequences)
 Timestamp : 3 Dec 2008 at 03:20:49 GMT
 Enzyme : Trypsin
 Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 1.2 Da
 Fragment Mass Tolerance : ± 0.6 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : ESI-QUAD-TOF
 Number of queries : 1047
 Protein hits :

gi 18091793	curcin precursor [Jatropha curcas]
gi 19338708	curcin precursor [Jatropha curcas]
gi 38018699	RIP [Jatropha curcas]
gi 12231174	aspartic proteinase 2 [Nepenthes alata]
gi 48773765	triosephosphate isomerase [Glycine max]
gi 21616053	aspartic proteinase [Theobroma cacao]
gi 40641523	putative vacuolar aspartic proteinase [Phycomitrella patens]
gi 218157	cytoplasmic aldolase [Oryza sativa]
gi 1351274	Triosephosphate isomerase, cytosolic (TIM) (Triose-phosphate isomerase)
gi 18415308	carboxylic ester hydrolase [Arabidopsis thaliana]
gi 169977	malate dehydrogenase
gi 1808684	hypothetical protein [Sporobolus stapfianus]
gi 48375044	putative mitochondrial malate dehydrogenase [Nicotiana tabacum]
gi 123588	Heat shock 70 kDa protein
gi 125543318	hypothetical protein OsI_010690 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
gi 18391062	pepsin A [Arabidopsis thaliana]
gi 33347411	aspartic protease [Pyrus pyrifolia]

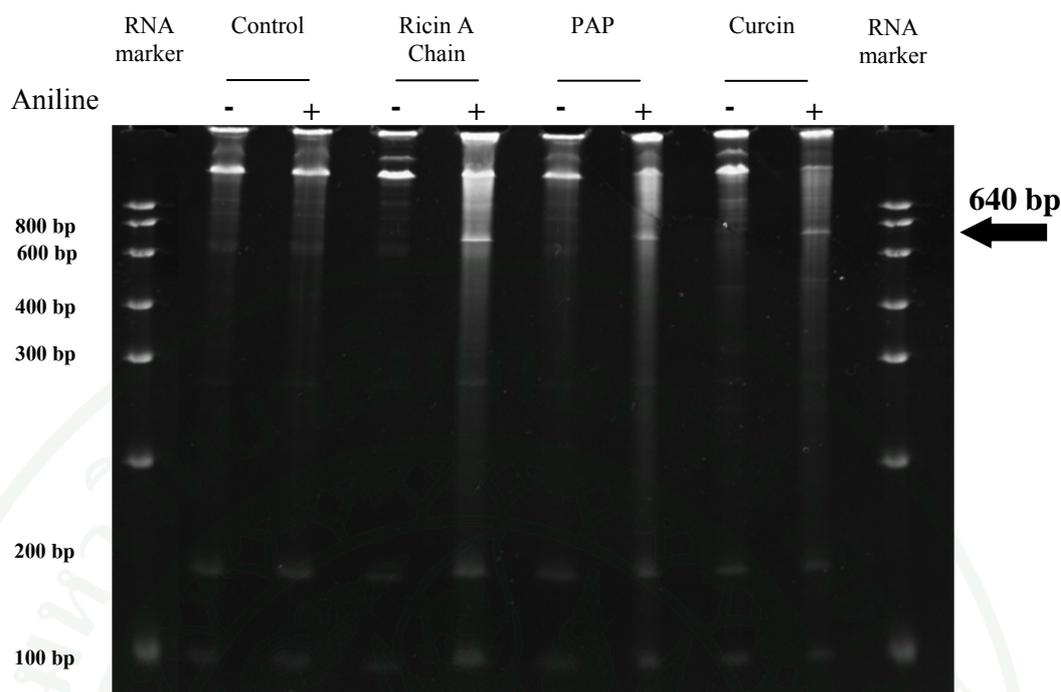
ภาพที่ 21 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาจากเนื้อเมล็ดสมุนไพรโดยเทคนิค In gel digestion และ LC-MS/MS ด้วยโปรแกรม MASCOT อ่านผลโดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลพืช (Green plant) ใน NCBI และใช้ Parameter ได้แก่ Fixed modification, Variable modification, Mass value, Protein mass, Peptide mass tolerance, Fragment mass tolerance, Max missed cleavage

2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ

2.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase

เนื่องจากมีรายงานว่าเคอร์ซินมีคุณสมบัติเป็น RIP Type I (Lin *et al*, 2003) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ของโปรตีนบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ โดยใช้ rabbit reticulocyte lysate เป็นสับสเตรต นำมาบ่มกับเคอร์ซินที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 33 และ RIP ตัวอื่น ๆ ที่นำมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ได้แก่ ricin A chain จากเมล็ดคละหุ้ง (*Ricinus communis*) และ PAP (pokeweed antiviral protein) สกัดได้จากเมล็ด pokeweed (*Phytolacca americana*) ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ RIP Type I เช่นเดียวกับเคอร์ซิน ดังวิธีการทดลองในข้อ 2.1 ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase บนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (6% PAGE) ที่มีการเติม 7 M urea ลงไป ซึ่งเอนไซม์ จะตัดพันธะ N-glycosidic ที่เชื่อมอยู่ระหว่างเบส Adenine ตำแหน่ง 4324 กับ sugar - phosphate backbone เมื่อใส่ aniline (1M aniline/0.8 M acetic acid, pH 4.5) จะปรากฏชิ้น RNA (α -fragment) ที่มีขนาดประมาณ 640 คู่เบส บนเจล

จากภาพที่ 22 จะเห็นว่าโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำมีกิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase เนื่องจากปรากฏแถบของชิ้น RNA ขนาดประมาณ 640 คู่เบส (lane 9) เช่นเดียวกับโปรตีน RIP อีก 2 ชนิด คือ Ricin (lane 5) และ PAP (lane 7) ซึ่งเมื่อเทียบกับ lane 4, lane 6 และ lane 8 ที่ไม่ใส่ aniline พบว่าไม่ปรากฏแถบชิ้น RNA ขนาดประมาณ 640 คู่เบส



ภาพที่ 22 Urea PAGE (6% gel/7 M urea) ของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ rRNA *N*-glycosidase ในเคอร์ซินบิริสุทซ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ โดยใช้ rabbit reticulocyte lysate เป็นสับสเตรต

Lane 1 คือ RNA marker

Lane 2 คือ control ที่เป็นสับสเตรต (reticulocyte lysate)

Lane 3 คือ control ที่เป็นสับสเตรต (reticulocyte lysate) ที่ใส่ aniline

Lane 4 คือ Ricin A chain มีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม

Lane 5 คือ Ricin A chain มีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม ที่ใส่ aniline

Lane 6 คือ PAP มีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม

Lane 7 คือ PAP มีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม ที่ใส่ aniline

Lane 8 คือ เคอร์ซินบิริสุทซ์ มีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม

Lane 9 คือ เคอร์ซินบิริสุทซ์ มีปริมาณ โปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม ที่ใส่ aniline

2.2 การศึกษาความสามารถของเคอร์ซินในการยับยั้งจุลชีพ

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบการยับยั้งจุลชีพ (เชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในคนจำนวน 31 ชนิด) ของสารสกัดหยาบของโปรตีนและเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ โดยใช้วิธี agar dilution assay ดังวิธีการทดลอง 2.2 ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารมาตรฐาน คือ Ampicillin Chloramphenicol และ Amphotericin B เป็น positive control (ภาคผนวก ข ข้อ 9) ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 10 และตารางที่ 11

จากตารางที่ 9 พบว่าสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 6 ชนิด จากเชื้อจุลชีพทั้งหมด 31 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 (DMST 5040), *Salmonella enteritidis* ATCC 17368, *Staphylococcus aureus* DMST 20654 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (DMST 15505), *Serratia marcescens* ATCC 8100 และ *Shigella boydii* DMST 7776 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (DMST) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ เกิดหนองฝีและแผลพุพอง ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ส่วนผลการทดสอบการยับยั้งจุลชีพของเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ (ตารางที่ 10) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 11 ชนิด จากเชื้อจุลชีพทั้งหมด 31 ชนิด ได้แก่ *Acinetobacter lwoffii* ATCC 15309 (DMST 4229), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (DMST 5040), *Salmonella typhi* DMST 5784, *Shigella dysenteriae* DMST 15111, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (DMST 15505), *Vibrio cholera* nonO1, nonO139 DMST 2873, *Vibrio cholera* O139 ATCC 51394, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* O157.H7 DMST 12743, *Serratia marcescens* ATCC 8100 และ *Shigella flexneri* DMST 4423 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (DMST) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ เกิดหนองฝีและแผลพุพอง และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ ทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 78.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 10 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ

เชื้อแบคทีเรีย	MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (DMST 5040)	250
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 17368	125
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	150
<i>Shigella boydii</i> DMST 7776	500
<i>Staphylococcus aureus</i> DMST 20654 (MRSA)	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (DMST 15505)	62.5

ตารางที่ 11 ค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ

เชื้อแบคทีเรีย	MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309 (DMST 4229)	312.5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (DMST 5040)	625
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	78.1
<i>Escherichia coli</i> O157.H7 DMST 12743	625
<i>Salmonella typhi</i> DMST 5784	312.5
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	312.5
<i>Shigella dysenteriae</i> DMST 15111	625
<i>Shigella flexneri</i> DMST 4423	156.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (DMST 15505)	78.1
<i>Vibrio cholera</i> nonO1, nonO139 DMST 2873	625
<i>Vibrio cholera</i> O139 ATCC 51394	312.5

2.3 การศึกษาความสามารถของเคอร์ซินในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาความสามารถของสารสกัดหยาบและเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (ATCC CCL-227) โดยวิธี MTT assay (วิธีการทดลองในข้อ 2.3.1) ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะ คือ mytomyacin C เป็น positive control พบว่าสารสกัดหยาบและเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก KB (ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 (ATCC CRL-5804) โดยวิธี REMA (วิธีการทดลองในข้อ 2.3.2) ใช้ยาปฏิชีวนะ คือ Ellipticine และ Doxorubicin เป็น positive control พบว่าสารสกัดหยาบและเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้ที่ความเข้มข้น 5 และ 2.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบและเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำในการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็ง	ความเข้มข้นของโปรตีนที่เป็นพิษต่อ		วิธีที่ทดลอง
	สารสกัดหยาบ	เคอร์ซินบริสุทธิ์	
เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (ATCC CCL-227)	1.0 (ไม่มีฤทธิ์)	1.0 (ไม่มีฤทธิ์)	MTT assay
เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก KB (ATCC CCL-17)	5.0 (ไม่มีฤทธิ์)	2.7 (ไม่มีฤทธิ์)	REMA
เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC HTB-22)	5.0 (ไม่มีฤทธิ์)	2.7 (ไม่มีฤทธิ์)	REMA
เซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 (ATCC CRL-5804)	5.0 (ไม่มีฤทธิ์)	2.7 (ไม่มีฤทธิ์)	REMA

- หมายเหตุ**
1. ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นของสารสกัดหยาบจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ เท่ากับ 17.66 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
 2. ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นของเคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำที่ใช้ เท่ากับ 20.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

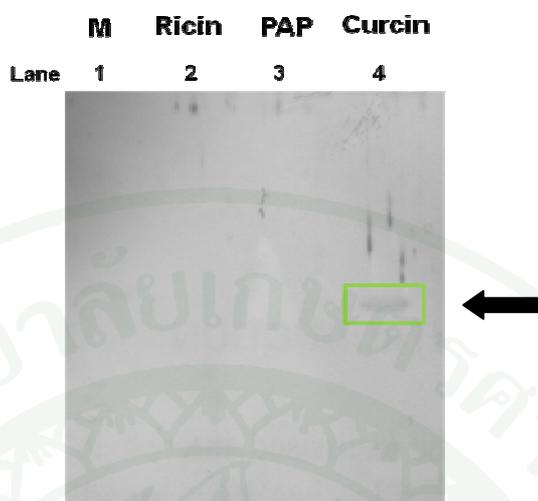
3. การนำโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำมาประยุกต์ใช้

3.1 การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซิน

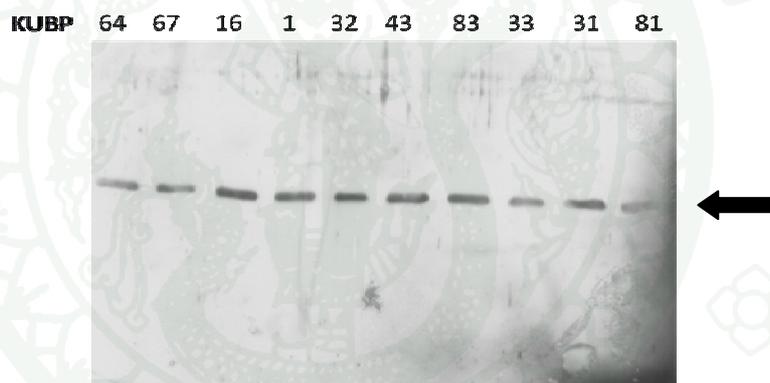
เคอร์ซินที่ทำบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 33 ได้นำมาผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซิน (วิธีการทดลองในข้อ 3.2) และตรวจสอบคุณลักษณะว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เฉพาะกับเคอร์ซินเพียงเท่านั้น หรือสามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับโปรตีน RIP ชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย ซึ่งโปรตีน RIP ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ricin จากเมล็ดกะทือ และ PAP จากเมล็ด pokeweed โดยเทคนิค Immuno-Western Blot และใช้โดยใช้พอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซินเป็นแอนติบอดีชนิดที่ 1 และพอลิโคลนอลแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่ออิมมูโนโกลบูลินของกระต่ายซึ่งเชื่อมต่อกับเอนไซม์ฮอร์ซเรดิชเพอร์ออกซิเดสเป็นแอนติบอดีชนิดที่ 2 เป็นผลที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม ดังภาพที่ 23 พบว่า ไม่ปรากฏแถบของสารเชิงซ้อนระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีกับ ricin และ PAP (lane 1 และ lane 2 ตามลำดับ) แต่พบแถบของสารเชิงซ้อนระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีกับเคอร์ซินบริสุทธิ์ที่แยกได้ จึงสรุปได้ว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซินที่ผลิตได้นั้นมีความจำเพาะกับเคอร์ซินเพียงชนิดเดียว

จากคุณลักษณะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าว ทำให้สามารถนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซินที่ผลิตได้นั้นไปใช้ตรวจหาปริมาณเคอร์ซินในเนื้อเมล็ดสบู่ดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ และสายพันธุ์ที่เป็น non-toxic และ toxic จากเนื้อเมล็ดและเปลือกสบู่ดำ

(ก)



(ข)



ภาพที่ 23 การตรวจสอบความจำเพาะของพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซิน

- (ก) Lane 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน ปริมาณเท่ากับ 5.75 มิลลิกรัม โปรตีน
 Lane 2 คือ Ricin ปริมาณเท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมโปรตีน
 Lane 3 คือ PAP ปริมาณเท่ากับ 5.0 มิลลิกรัม โปรตีน
 Lane 4 คือ Curcin ปริมาณเท่ากับ 5.0 มิลลิกรัมโปรตีน
- (ข) สารสกัดหยาบจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ 10 แหล่ง (ปริมาณโปรตีน แหล่งปลูกละ 20 มิลลิกรัมโปรตีน)
 เครื่องหมายลูกศร แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่มีขนาด 29 กิโลดาลตัน

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซินในเนื้อเมล็ดสับดูจากแหล่งปลูกต่าง ๆ

จากภาพที่ 23 แสดงว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเคอร์ซิน จากเนื้อเมล็ดสับดู ในการทดลองนี้จึงได้วิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซินในเนื้อเมล็ดสับดูจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ทั้งหมด 153 แหล่ง (ภาคผนวก ข ข้อ 6) ด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซิน เป็นแอนติบอดีชนิดที่ 1 (วิธีการทดลองในข้อ 3.3) การหาปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสับดู KUBP 33 ด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot ที่มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันไปตั้งแต่ 5 – 50 ไมโครกรัม แสดงผลบนแผ่นฟิล์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 5) แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเคอร์ซิน (ไมโครกรัม) (แกน x) กับปริมาณของเคอร์ซิน (แกน y) ที่ได้จากการอ่านค่าความเข้มของแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มด้วยโปรแกรม Infinity-Capt version 12.9 แปลผลเป็นรูปกราฟซึ่งคำนวณได้จากค่าของพื้นที่ใต้กราฟพบว่า ได้กราฟที่เป็นเส้นตรงมีค่า $R^2 = 0.9906$ (ภาคผนวก ข ข้อ 6) หลังจากนั้นจึงคำนวณหาปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสับดูจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ทั้งหมด 153 แหล่งปลูก จากพื้นที่ใต้กราฟ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซินจากปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสับดูจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งหมด 153 แหล่งปลูกนั้นมีปริมาณเคอร์ซินตั้งแต่ 0-9.09 % โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง สามารถจัดกลุ่มเมล็ดสับดูตามปริมาณของเคอร์ซิน (% โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ได้เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 13) คือ กลุ่ม A จำนวน 117 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 0-2.99 %, กลุ่ม B จำนวน 28 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 3.00-5.99 % , กลุ่ม C จำนวน 7 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 6.00-8.99 % และ กลุ่ม D จำนวน 1 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 9.00-11.99 %

จากการจัดกลุ่มตามปริมาณเคอร์ซินพบว่า มีเมล็ดสับดูจากแหล่งปลูก 3 แหล่งปลูกที่ไม่มีเคอร์ซินอยู่เลย ได้แก่ KUBP 169 จากจังหวัดนครพนม, KUBP 187 จากจังหวัดอำนาจเจริญ และ KUBP 19 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และพบว่าเมล็ดสับดูจาก 153 แหล่งปลูกมีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.32-16.07 % โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง โดยเมล็ดสับดู KUBP19 จากจังหวัดร้อยเอ็ด มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด คือ 16.07 % โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง ส่วนเมล็ดสับดูที่มีปริมาณเคอร์ซินสูงที่สุด ได้แก่ KUBP 75 คือ 9.09 % ต่อน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง

ตารางที่ 13 ปริมาณเคอร์ซีนและโปรตีน (% ต่อน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ในเนื้อเมล็ดสับจากแหล่งปลูกต่าง ๆ

Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)	Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)
Group A			Group A		
KUBP169	0.00	1.71	KUBP163	0.90	2.73
KUBP187	0.00	1.48	KUBP6	0.92	14.61
KUBP19	0.00	16.07	KUBP74	1.00	7.16
KUBP15	0.00	0.97	KUBP130	1.01	1.83
KUBP34	0.09	0.32	KUBP112	1.02	3.6
KUBP143	0.09	0.39	KUBP84	1.05	3.79
KUBP164	0.15	0.87	KUBP159	1.06	3.39
KUBP179	0.16	0.41	KUBP138	1.08	2.34
KUBP4	0.16	11.17	KUBP81	1.10	3.85
KUBP156	0.21	0.48	KUBP21	1.10	2.54
KUBP153	0.27	1.32	KUBP204	1.11	3.09
KUBP175	0.28	0.60	KUBP65	1.13	2.31
KUBP177	0.31	0.79	KUBP126	1.15	1.83
KUBP178	0.33	0.65	KUBP110	1.18	3.27
KUBP23	0.40	4.71	KUBP134	1.18	2.55
KUBP50	0.51	1.71	KUBP28	1.20	4.49
KUBP132	0.67	2.55	KUBP51	1.24	2.47
KUBP140	0.70	3.06	KUBP108	1.24	2.73
KUBP133	0.77	3.06	KUBP206	1.25	4.59
KUBP72	0.87	4.97	KUBP114	1.25	4.2

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)	Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)
Group A			Group A		
KUBP195	1.30	3.51	KUBP188	1.68	4.2
KUBP139	1.34	2.91	KUBP211	1.71	5.4
KUBP95	1.34	4.03	KUBP91	1.71	4.33
KUBP189	1.37	3.09	KUBP5	1.74	2.9
KUBP123	1.37	4.11	KUBP56	1.75	5.81
KUBP109	1.41	3.09	KUBP89	1.77	5.83
KUBP131	1.42	2.49	KUBP67	1.77	3.8
KUBP181	1.44	2.72	KUBP3	1.80	5.36
KUBP185	1.44	8.49	KUBP11	1.80	3.86
KUBP30	1.49	4.28	KUBP64	1.83	4.03
KUBP193	1.54	4.37	KUBP46	1.87	3.73
KUBP142	1.55	2.4	KUBP79	1.90	4.03
KUBP194	1.55	4.2	KUBP121	1.91	3.06
KUBP176	1.56	3.79	KUBP148	1.94	6.54
KUBP66	1.57	4.58	KUBP128	1.95	2.91
KUBP141	1.60	3.24	KUBP63	1.95	3.21
KUBP186	1.60	1.89	KUBP208	1.97	7.5
KUBP125	1.61	2.61	KUBP135	1.98	6.78
KUBP36	1.64	4.25	KUBP209	2.01	4.71
KUBP210	1.66	4.41	KUBP18	2.05	6.24

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)	Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)
Group A			Group A		
KUBP124	2.08	3.42	KUBP9	2.53	10.2
KUBP24	2.09	4.25	KUBP119	2.59	3.42
KUBP31	2.14	4.15	KUBP120	2.62	3.87
KUBP43	2.15	4.28	KUBP49	2.64	7.1
KUBP62	2.20	4.32	KUBP122	2.68	4.53
KUBP78	2.23	3.94	KUBP196	2.68	5.74
KUBP115	2.25	5.64	KUBP88	2.70	5.7
KUBP1	2.25	4.37	KUBP16	2.71	3.53
KUBP38	2.27	5.21	KUBP118	2.72	5.97
KUBP170	2.27	4.17	KUBP80	2.76	6.22
KUBP129	2.29	4.11	KUBP83	2.80	4.35
KUBP197	2.30	5.36	KUBP205	2.89	6
KUBP111	2.35	7.44	KUBP29	2.89	3.83
KUBP161	2.39	5.1	KUBP37	2.90	4.88
KUBP190	2.41	4.8	KUBP27	2.90	5.62
KUBP136	2.42	9.12	KUBP73	2.94	8.3
KUBP25	2.44	4.78			
KUBP116	2.45	6.12			
KUBP2	2.51	5.4			
KUBP77	2.51	9.0			

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)	Accession number	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)
Group B			Group B		
KUBP149	3.05	5.88	KUBP86	4.55	14.78
KUBP184	3.09	7.29	KUBP212	4.88	10.67
KUBP87	3.13	9.12	KUBP76	4.91	13.98
KUBP69	3.14	9.29	KUBP96	4.92	11.53
KUBP52	3.23	4.37	KUBP199	5.00	7.97
KUBP180	3.30	6.65	KUBP44	5.12	12.43
KUBP155	3.31	7.8	KUBP158	5.32	9.72
KUBP85	3.47	11.45	KUBP8	5.46	14.53
KUBP117	3.70	8.34	KUBP32	5.89	11.68
KUBP201	3.75	9.9	KUBP86	4.55	14.78
KUBP33	3.80	7.15	KUBP212	4.88	10.67
KUBP198	3.85	6.26	KUBP76	4.91	13.98
KUBP192	3.88	10.24			
KUBP58	3.89	14.26	Group C		
KUBP14	3.89	6.1	KUBP13	6.21	12.39
KUBP172	4.01	9.99	KUBP45	6.48	13.07
KUBP191	4.16	11.66	KUBP47	6.56	9.75
KUBP200	4.19	6.56	KUBP71	6.79	12.43
KUBP12	4.42	10.89	KUBP7	6.88	13.41

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Accession	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)	Accession	Curcin (% dry wt.)	Protein (% dry wt.)
Group C			Group D		
KUBP35	7.59	4.08	KUBP75	9.09	1.57
KUBP20	7.85	14.7			

หมายเหตุ A = 0-2.99 %, B = 3.00-5.99 %, C = 6.00-8.99 % และ D = 9.00-11.99 % เคอร์ซีน

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดและเปลือกผลของสบู่ดำ สายพันธุ์ non-toxic และ toxic

จากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้น มีความจำเพาะต่อเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้วิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซีนในเนื้อเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ non-toxic สุขสันต์ 1 และ non-toxic สุขสันต์ 1 และในเปลือกผลสบู่ดำสายพันธุ์ non-toxic และ toxic ด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot (ภาคผนวก ข ข้อ 7) (วิธีการทดลองในข้อ 3.3) การหาปริมาณเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ KUBP 33 ด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot ที่มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันไปตั้งแต่ 5 – 50 ไมโครกรัม แสดงผลบนแผ่นฟิล์ม (ภาคผนวก ข ข้อ 5) จากพื้นที่ได้กราฟ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีน (ภาคผนวก ข ข้อ 6) พบว่าปริมาณเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ non-toxic สุขสันต์ 1 และ non-toxic สุขสันต์ 1 และจากเปลือกผลสบู่ดำสายพันธุ์ non-toxic และ toxic คือ 1.54%, 1.63%, 2.03% และ 1.05 % (โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ข้อ 7) (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ปริมาณเคอร์ซินและโปรตีน (% ต่อน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ในเนื้อเมล็ดสบู่ดำจากสายพันธุ์ non-toxic สุขสันต์ 1, non-toxic สุขสันต์ 2 และเปลือกผลสบู่ดำจากสายพันธุ์ non-toxic, toxic

Accession	Curcin (% dry wt.) ^a	Protein (% dry wt.)	Group
Non-toxic สุขสันต์ 1	1.54 ± 2	3.28	B
Non-toxic สุขสันต์ 2	1.63 ± 1	9.66	A
Non-toxic จากเปลือกผล	2.03 ± 1	2.71	A
Toxic จากเปลือกผล	1.05 ± 2	3.34	B
โปรตีนบริสุทธิ์จากเปลือกหุ้มเมล็ด (KUBP33) ^b	-	0.23	-

หมายเหตุ a: จำนวนซ้ำ

b: โปรตีนจากเปลือกหุ้มเมล็ด (KUBP33) ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose

วิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการแยกเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ (KUBP33) ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการอย่างง่ายและไม่ต้องใช้วิธีโครมาโตกราฟี เนื่องจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันสูง 47.08-58.12 % (Ginwal, 2004) ดังนั้นก่อนจะทำการแยกโปรตีนจึงจำเป็นต้องสกัดเอาน้ำมันออกจากสารสกัดหยาบของเนื้อเมล็ด โดยทั่วไปการสกัดน้ำมันจากเนื้อเมล็ดพืชมักเป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ เป็นต้น ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองและอาจมีผลต่อสภาพธรรมชาติของโปรตีน ในการทดลองนี้จึงทำการลดอุณหภูมิของสารสกัดหยาบจากเนื้อเมล็ด โดยนำไปแช่ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ไขมันในสารสกัดหยาบแข็งตัวเป็นแผ่นไขมันลอยขึ้นมาอยู่บนผิวหน้า ซึ่งสามารถตักทิ้งออกได้โดยง่าย สารสกัดหยาบโปรตีนภายหลังจากเอาน้ำมันออกไปแล้วนั้น ได้ทำการทดลองนำไปแยกเคอร์ซินให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าต้องใช้การแยกถึง 2 ขั้นตอนจึงจะได้เคอร์ซินบริสุทธิ์ที่ได้แก่การแยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ CM-Cellulose และปริมาณโปรตีนที่ได้เท่ากับ 15.27 และ 3.26 มิลลิกรัม โปรตีนต่อเนื้อเมล็ดแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

Barbieri *et al.* (1993) รายงานว่าเคอร์ซินบริสุทธิ์จากเมล็ดสบู่ดำเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่จัดอยู่ในกลุ่มของ RIP Type 1 ที่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase มีขนาดมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 28-35 กิโลดาลตัน และมีค่า pI อยู่ระหว่าง 8-10

รายงานการแยกเคอร์ซินก่อนหน้านี้ โดย Lin *et al.* (2003) ทำบริสุทธิ์เคอร์ซินจากเมล็ดสบู่ดำด้วยการผ่านคอลัมน์ CM-52 ซึ่งเป็น cation-exchanger แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งเป็น Gel-filtration อีกครั้ง ในการทดลองนี้จึงได้การปรับ pH ของสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำให้เป็นกรดเท่ากับ 4.5 ซึ่งต่ำกว่าค่า pI ของเคอร์ซิน (Lin *et al.*, 2010) ดังนั้นเคอร์ซินจะละลายอยู่ในสารละลาย ขณะที่โปรตีนอื่นส่วนใหญ่จะเสียสภาพและตกตะกอนแยกออกไป เมื่อนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย SDS-PAGE เทียบกับสารสกัดโปรตีนหยาบ พบว่า ปรากฏแถบของเคอร์ซินเพียงแถบเดียว แสดงว่าเคอร์ซินที่แยกได้ประกอบด้วย 1 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน การทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนี้จะทำให้ได้เคอร์ซินที่มีความบริสุทธิ์สูง ปริมาณของโปรตีนสูงเท่ากับ 40 มิลลิกรัม โปรตีนต่อน้ำหนักเมล็ดแห้ง ซึ่งสูงกว่าโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี (ตารางที่ 9) และเป็นเทคนิคที่ใช้ไม่ยุ่งยากและซับซ้อน เนื่องจากใช้เวลาในการทำบริสุทธิ์สั้นกว่าเทคนิคการทำบริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

จากการศึกษาการหามวลโมเลกุลที่แน่นอนของเคอร์ซินบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ โดยวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง (Hillenkamp *et al.*, 1991) จากการทดลองพบว่า peak ที่ปรากฏเกิดขึ้นมีเพียง peak เดียว ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 28,367 ดาลตัน หรือประมาณ 28.4 กิโลดาลตัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่าการหาน้ำหนักโมเลกุลจาก SDS-PAGE ซึ่งได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน เนื่องจากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเคอร์ซินด้วยวิธี SDS-PAGE เป็นการหา subunit molecular weight โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ค่าที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำน้อยกว่าการหามวลโมเลกุลของเคอร์ซินโดยวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งเป็นการหามวลโมเลกุลที่พบจริงในธรรมชาติ (native molecular mass) เนื่องจากรน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้จาก SDS-PAGE เป็นการทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยการเติมสาร SDS ซึ่งเป็นผลทำให้การเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าของโปรตีนขึ้นอยู่กับขนาดเพียงอย่างเดียว มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป และประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นลบเหมือนกันหมด การที่ปรากฏเพียง peak เดียวนั้นเป็นยืนยันว่าเคอร์ซินที่ทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่เป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ที่มีเพียง 1 หน่วยย่อย ซึ่งสอดคล้องกับ Lin *et al.* (2003) ที่รายงานว่ เคอร์ซินเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 28.2 กิโลดาลตัน (โดย gel filtration)

จากการหาลำดับกรดอะมิโนของเคอร์ซินที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค LC/MS และทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในฐานข้อมูลที่มีอยู่โดยใช้โปรแกรม Mascot พบว่าลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์เคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ค่านั้น มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของ curcin precursor และ RIP (ribosome-inactivating protein) จาก *Jatropha curcas* ซึ่งเป็นการยืนยันว่าโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ค่านั้นเป็นเคอร์ซินจริง

เคอร์ซินจัดอยู่ในกลุ่มของ Type I RIP โดยมีคุณสมบัติเป็น rRNA N-glycosidase ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ทั้งของยูแคริโอตและโพรแคริโอต เนื่องจากเคอร์ซินจะตัดพันธะ N-glycosidic ที่เชื่อมอยู่ระหว่างอะดีนีนที่ตำแหน่ง A4324 กับ phosphate backbone บน 28s rRNA ของยูแคริโอต (Endo and Tsurugi, 1987) หรือ บน 23s rRNA ของโพรแคริโอต (Hartley and Lord, 2004) ดังนั้นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase โดยใช้ rabbit reticulocyte lysate เป็นสับสเตรต (Fong *et al.*, 1996) วิเคราะห์ผลด้วย 6% PAGE/7M urea ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบว่าเคอร์ซินบริสุทธิ์จากเนื้อเมล็ดสบู่ค่างที่เตรียมได้ เป็นเคอร์ซินและยังคงมีความสามารถของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase

เมื่อป่มสลับสเตรท (28s rRNA จาก reticulocyte lysate) กับเคอร์ซิน พบว่า ไม่ปรากฏแถบของจีน RNA ขนาดประมาณ 640 คู่เบส แม้ว่าเคอร์ซินจะสามารถตัดพันธะ N-glycosidic ที่เชื่อมอยู่ระหว่างอะดีนีนที่ตำแหน่ง A4324 กับ sugar-phosphate backbone แต่ว่าจีน RNA ยังไม่ขาดออกหลังจากเติม aniline เข้าไปทำปฏิกิริยาด้วยแล้ว พบว่า ปรากฏแถบของจีน RNA ที่ถูกตัด เนื่องจาก aniline เป็นตัวเร่งการตัดพันธะ phosphodiester ทำให้ได้จีน RNA ขนาด 640 bp (ภาคผนวก ข ข้อ 9) เช่นเดียวกับ RIP ชนิดอื่นที่นำมาเป็นตัวเปรียบเทียบ ได้แก่ ricin และ PAP ดังนั้นการทำริสโทรีเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบูดำด้วยการปรับ pH ให้เป็นกรด ทำให้ได้โปรตีนที่เป็นเคอร์ซินจริง เพราะมีคุณสมบัติของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ขนาดของจีน RNA ที่ได้มีขนาด 640 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าจีน RNA ที่รายงานโดย Bass (2004) ที่จีน RNA ที่ได้จากการตัด 28 s RNA ด้วยโปรตีน RIP type III จากข้าวโพด จะให้จีน RNA ขนาด 425 คู่เบส

จากการศึกษาฤทธิ์ของเคอร์ซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase ซึ่งเป็นเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในคนจำนวน 31 ชนิด โดยใช้วิธี agar dilution assay พบว่าเคอร์ซินบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเนื้อเมล็ดสบู KUBP 33 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนได้ 11 ชนิด เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบของโปรตีนจากเนื้อเมล็ดสบูดำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนได้ 6 ชนิด การที่เคอร์ซินบริสุทธิ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าสารสกัดหยาบ อาจเนื่องมาจากในสารสกัดหยาบมีโปรตีนตัวอื่นปะปนที่ไปบดบังการทำงานของ เอนไซม์ rRNA N-glycosidase ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์นั้นลดลง แต่ในทางกลับกันสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (DMST 15505) และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 (DMST 5040) ได้ดีกว่า เพราะค่า MIC มีค่าต่ำกว่า ยิ่งค่า MIC ต่ำมากเท่าไรชี้ให้เห็นว่าสารนั้นมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นเท่านั้น (MIC \leq 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (Jennifer, 2001) ซึ่งอาจเนื่องมาจากโปรตีนชนิดอื่นในสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์นี้ จากการศึกษาของ Park *et al.* (2002) รายงานว่า การที่ RIPs สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้นั้นเป็นการทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ chitinase, α -1,3-glucanase และ protease เพื่อที่จะให้ RIPs สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลชีพได้โดยตรง

ดังนั้นฤทธิ์ของเคอร์ซินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียซึ่งไม่มีประสิทธิภาพดีพอที่จะนำไปประยุกต์เป็นตัวยา เนื่องจากค่า MIC มีค่าค่อนข้างสูงเกินกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และการวิจัยนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ของเคอร์ซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคนเป็นครั้งแรกเพราะยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามก็มีรายงานของ RIP Type I ตัวอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช คือ ME1 และ ME2 ซึ่งเป็น RIP Type I จากรากของ *Mirabilis expansa* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* และ *Agrobacterium radiobacter* (Vivanco *et al.*, 1999)

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ *N*-glycosidase ใน RIP Type I ที่มาจากพืชต่างชนิดกัน อาจแตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์จะมีความจำเพาะกับลักษณะไรโบโซมของเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบภายในเซลล์แบคทีเรีย (Krawet and Boston, 2000; Hartley and Lord, 2004)

เนื่องจากมี RIP Type I บางชนิด ตัวอย่างเช่น Cochinin B เป็น Type I RIP ตัวใหม่ที่สกัดได้จากเมล็ดของผักขำ *Momordica cochinchinensis* ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa เซลล์มะเร็งไต (HEK293) และเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.9, 114 และ 574 นาโนโมล ซึ่งถือได้ว่า Cochinin B มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูง เหมาะที่จะนำไปผลิตเป็นยาในการบำบัดโรคมะเร็งดังกล่าว (Chuethong *et al.*, 2007)

จากรายงานของ Lin *et al.* (2003) พบว่าเคอร์ซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer cell line, SGC-7901) เซลล์มะเร็งตับของหนู (mouse myeloma cell line, Sp2/0) และเซลล์มะเร็งตับของคน (human hepatoma) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 มิลลิกรัม/ลิตร, 0.66 มิลลิกรัม/ลิตร และ 3.16 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ การตายของเซลล์เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ rRNA *N*-glycosidase เนื่องจากเอนไซม์ *N*-glycosidase จะตัดพันธะ *N*-glycosidic ระหว่าง adenine ที่ตำแหน่ง A4324 บน 28s rRNA ส่งผลให้ไรโบโซมไม่สามารถจับกับ elongation factor 1 หรือ 2 ได้ เซลล์บริเวณนั้นจึงตาย (Endo and Tsurugi, 1987) แต่เมื่อเทียบกับเคอร์ซินบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ KUBP33 จากงานวิจัยนี้ พบว่าเคอร์ซินไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (ATCC

CCL-227) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก KB (ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 (ATCC CRL-5804) อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของ เคอร์ซินไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดนี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของเคอร์ซินต้องมีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่ง ๆ ไม่ใช่เซลล์มะเร็งทุกชนิด ซึ่งกลไกการทำงานยังไม่ทราบแน่ชัด แต่การที่เคอร์ซินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ทำการทดสอบในงานวิจัยนี้ อาจเนื่องมาจากเคอร์ซินเป็น RIP Type I ไม่มีส่วนที่สามารถจะจับกับผิวเซลล์ได้ จึงทำให้เข้าไปยังไซโทพลาสซึมได้ค่อนข้างยากเป็นผลให้เคอร์ซินไม่สามารถออกฤทธิ์กับเซลล์ได้โดยตรง

ในการทดลองนี้ได้ผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีของกระต่ายต่อเคอร์ซินบริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ตรวจหาปริมาณเคอร์ซินในเมล็ดสบู่ดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทยที่รวบรวมไว้ที่ไรสุพรรณวาจากกลีงและเมล็ดที่มีผู้ทดสอบแล้วว่าไม่เป็นพิษกับสัตว์ พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนเคอร์ซินเพียงชนิดเดียว โดยไม่เกิดปฏิกิริยา (cross reaction) กับ ricin และ PAP จึงมีคุณภาพเหมาะที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำที่มาจากแหล่งปลูกต่าง ๆ กัน (153 แหล่งปลูก) ด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ทำการศึกษาหาความแตกต่างของปริมาณโปรตีนพิษเคอร์ซินรวมถึงความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในเนื้อเมล็ดสบู่ดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย

Ginwal (2004) รายงานว่าในเนื้อเมล็ดสบู่ดำมีปริมาณน้ำมันสูง (47.08-58.12%) จึงนำมาผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล หลังจากที่มีการหีบเอาน้ำมันออกไปแล้ว พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูง (29-40%) เกษตรกรจึงนิยมนำไปเลี้ยงสัตว์ แต่ต้องมีการกำจัดสารพิษออกไปก่อน เนื่องจากสารพิษมีฤทธิ์ทำให้เกิดอาการท้องร่วง ซึ่งอาการพิษดังกล่าวอาจเกิดจากโปรตีนพิษเคอร์ซิน ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาความแตกต่างของปริมาณโปรตีนพิษเคอร์ซินในเนื้อเมล็ดสบู่ดำซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่อาจใช้เพื่อคัดกรองหาสายพันธุ์เมล็ดสบู่ดำจากแหล่งปลูกที่มีปริมาณโปรตีนสูงแต่มีโปรตีนพิษเคอร์ซินต่ำ เนื้อเมล็ดสบู่ดำจากแหล่งปลูกที่ไม่มีโปรตีนพิษเคอร์ซินอยู่เลย ได้แก่ KUBP 169 จากจังหวัดนครพนม KUBP 187 จากจังหวัดอำนาจเจริญ และ KUBP 19 จากจังหวัดร้อยเอ็ด โดยเมล็ดสบู่ดำ KUBP 19 จากจังหวัดร้อยเอ็ดมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (16.07% ต่อน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ปริมาณโปรตีนที่หาได้จากเนื้อเมล็ดโดยเฉลี่ย (0.32-16.07 %) ไม่สอดคล้องรายงานที่ผ่านมา (29-40 %) คือมีปริมาณโปรตีนที่ได้ค่อนข้างต่ำมาก เหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความแตกต่างของสายพันธุ์และแหล่งปลูก และวิธีการที่ใช้หาปริมาณโปรตีน

ซึ่งอาจหาได้จากค่าไนโตรเจนแล้วคำนวณเป็นค่าโปรตีน ซึ่งอาศัยหลักการคือ สารอินทรีย์จะถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น พร้อมกับมีการใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) สารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบจะเปลี่ยนไปเป็น $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ เมื่อเติม NaOH เข้มข้นลงไป สารละลายที่มี $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ แล้วกลั่นเอาก๊าซแอมโมเนียออกมาโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ซึ่งจะถูกรับไว้โดยสารละลายกรดบอริก จากนั้นนำเอาสารละลายที่ได้ไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน HCl เปอร์เซนต์ ของไนโตรเจนที่คำนวณได้มาจากก๊าซแอมโมเนียที่ออกมา ซึ่งเปอร์เซนต์ ของไนโตรเจนนี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นเปอร์เซนต์ โปรตีนได้โดยการคูณด้วย 6.25 (Kjeldahl, 1883) แต่ในการวิจัยนี้ได้หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry *et al.*, 1951 หลักการคือโปรตีนทำปฏิกิริยากับสารเคมี ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินขึ้น โดยเกิดปฏิกิริยาเป็นสองขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 พันธะเปปไทด์ในโปรตีนทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) ในด่างเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) ที่เกิดพันธะโคออร์ดิเนต (coordination) กับอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของไนโตรเจนในพันธะเปปไทด์ 4 คู่ และของออกซิเจนในน้ำอีก 2 คู่ ขั้นที่ 2 สารเชิงซ้อนที่ได้และหมู่อัลคิล (alkyl) ของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) และไทโรซีน (tyrosine) ที่อยู่ในโปรตีนเกิดการรีดิวซ์สารละลาย Folin ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น phosphomolybdic acid ($24 \text{MoO}_3 \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ผสมกับ phosphotungstic acid ($24\text{WO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$) ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นอกจากนี้ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ แสงแดด น้ำ ความชื้น ก๊าซในบรรยากาศ ความเป็นกรด-เบส และปริมาณเกลือแร่ในดิน ก็มีผลต่อปริมาณของโปรตีนและปริมาณเคอร์ซีนด้วย

เนื่องจากจำนวนตัวอย่างของเมล็ดสับดูคาที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเคอร์ซีนโดยเทคนิค Immuno-Western Blot มีจำนวนไม่เพียงพอ (6 เมล็ดต่อ 1 แหล่งปลูกและ 1 ไร่) ที่จะนำผลมาคำนวณค่าทางสถิติดังนั้นค่าปริมาณเคอร์ซีนและปริมาณโปรตีนที่ได้จึงอาจคลาดเคลื่อนในการที่จะบอกปริมาณเคอร์ซีนและปริมาณโปรตีนของเมล็ดสับดูคาได้ถูกต้องควรจะต้องเพิ่มการวิเคราะห์ตัวอย่างของเมล็ดสับดูคาของแต่ละแหล่งปลูก 3-10 ไร่ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและความเบี่ยงเบนตามหลักสถิติ จึงจะสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันในเมล็ดสับดูคาของแต่ละแหล่งปลูก ซึ่งควรจะทำการศึกษาต่อไป เพราะความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำมัน ปริมาณเคอร์ซีน และปริมาณโปรตีนจากแต่ละแหล่งปลูกจะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการส่งเสริมเกษตรกรกรมของการปลูกสับดูคา และการนำผลผลิตไปใช้ประโยชน์ต่อไปในทางอาหารสัตว์และทางการแพทย์

จากการหาปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสับดูดำสายพันธุ์ non-toxic และ toxic นั้นยังพบว่า มีโปรตีนพิษเคอร์ซินอยู่ ดังนั้นการเรียกชื่อสายพันธุ์ว่า non-toxic และ toxic อาจจะถูกเรียกหรือจัดกลุ่มมาจากสารพิษชนิดอื่น เช่น phorbol ester



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ พัฒนาวิธีการแยกเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางชีวเคมีอย่างง่ายที่ไม่ซับซ้อน ศึกษาสมบัติทางชีวโมเลกุล ศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคนและเซลล์มะเร็งบางชนิด และตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเคอร์ซินในเนื้อเมล็ดสบู่จากแหล่งปลูกต่าง ๆ

1. เคอร์ซินที่สกัดจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำ KUBP 33 สามารถทำบริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนเอาโปรตีนชนิดอื่นออก ด้วยการใส่อะซิเตตโซเดียมบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด (0.1 M sodium-acetate, pH 4.5) ซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีอย่างง่าย เพียงขั้นตอนเดียว ไม่ซับซ้อน และประหยัดเวลา นอกจากนี้ยังได้โปรตีนในปริมาณสูงประมาณ 40 มิลลิกรัมโปรตีน จากเนื้อเมล็ดแห้ง 10 กรัม
2. เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเคอร์ซินที่แยกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเคอร์ซินมีความบริสุทธิ์และประกอบด้วยหน่วยย่อยเดียว ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน
3. เคอร์ซินเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 28.4 กิโลดาลตัน จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrophotometry
4. เคอร์ซินที่สกัดได้จากเนื้อเมล็ดสบู่ดำเป็นเคอร์ซินจริง จากการยืนยันด้วยการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS เพราะลำดับกรดอะมิโนของเคอร์ซินที่สกัดได้มีลำดับอะมิโนที่เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของ curcin precursor และ RIP (ribosome-inactivating protein) จาก *Jatropha curcas* ที่พบอยู่ในฐานข้อมูล
5. เคอร์ซินบริสุทธิ์ที่แยกได้จัดเป็น RIP Type I ที่มีคุณสมบัติของ rRNA N-glycosidase เนื่องจากเคอร์ซินสามารถตัดพันธะ N-glycosidic ระหว่างอะดีนีน ตำแหน่ง A4324 บน 28s rRNA และเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับ aniline แล้วพบว่า ชิ้น RNA จะถูกตัด ปรากฏแถบของชิ้น RNA ขนาดประมาณ 640 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ด้วย 6% PAGE/7 M urea

6. คุณสมบัติของเคอร์ซินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน พบว่าเคอร์ซินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (DMST) ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ เกิดหนอง ฝีและแผลพุพอง และเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ATCC 8100 ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ ทำให้กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 78.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคนทั้งหมด 31 ชนิด

7. เคอร์ซินบริสุทธิ์ที่แยกได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ SW620 (ATCC CCL-227) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก KB (ATCC CCL-17) เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 (ATCC CRL-5804) โดยพิษของเคอร์ซิน ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง SW620 ที่ความเข้มข้น 8.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มะเร็ง KB, เซลล์มะเร็ง MCF-7 และเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ที่ความเข้มข้น 2.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

8. นำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเคอร์ซินที่ผลิตได้มาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจและวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซินในเนื้อเม็ล็ดที่มาจากแหล่งปลูกต่างกัน 153 แหล่งปลูก จากพันธุ์ที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษอีก 4 ชนิด

9. จากการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเม็ล็ดสับคั่วจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งหมด 153 แหล่งปลูกนั้น สามารถจัดกลุ่มตามปริมาณของเคอร์ซิน (% ของน้ำหนักเนื้อเม็ล็ด) ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม A จำนวน 117 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 0-2.99%, กลุ่ม B จำนวน 28 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 3.00-5.99% , กลุ่ม C จำนวน 7 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 6.00-8.99% และ กลุ่ม D จำนวน 1 แหล่งปลูก มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 9.00-11.99%

10. เม็ล็ดสับคั่วที่มีปริมาณเคอร์ซินน้อยที่สุด พบว่ามีอยู่ 3 แหล่งปลูกที่ไม่มีเคอร์ซินอยู่เลย ได้แก่ KUBP 169 จากจังหวัดนครพนม, KUBP 187 จากจังหวัดอำนาจเจริญ และ KUBP 19 จากจังหวัดร้อยเอ็ด และสายพันธุ์ที่มีปริมาณเคอร์ซินสูงที่สุด พบว่ามีอยู่ 1 แหล่งปลูก คือ KUBP 75 จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี มีปริมาณเคอร์ซินเท่ากับ 9.09% (ต่อน้ำหนักเนื้อเม็ล็ดแห้ง)

11. ปริมาณเคอร์ซินจากเนื้อเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ non-toxic สุขสันต์ 1 และ non-toxic สันต์ 1 และจากเปลือกผลสบู่ดำสายพันธุ์ non-toxic และ toxic คือ 1.54%, 1.63%, 2.03% !! % (โดยน้ำหนักเนื้อเมล็ดแห้ง) ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เรียกชื่อ โรคในพืชและเชื้อ ไวรัส เพิ่มเติม เช่น *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) เป็นต้น เพื่อให้ทราบว่าเคอร์ซินมีฤทธิ์ต้านเชื้อใดบ้าง แล้วนำไปศึกษากลไกการทำงานต่อไป
2. ควรศึกษาสมบัติในการต้านมะเร็งชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม เนื่องจากเซลล์มะเร็งที่ได้นำมาทำวิจัยนี้ เคอร์ซินไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต เพื่อหาว่าเคอร์ซินมีความจำเพาะในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาในการผลิตยาสำหรับการบำบัดรักษาโรคมะเร็งนั้น ๆ
3. จากการคัดกรองหาสายพันธุ์สบู่ดำหรือแหล่งปลูกที่เมล็ดมีปริมาณ โปรตีนพิษเคอร์ซินต่ำเป็นการทดลองแบบคร่าว ๆ ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวยังไม่ค่อยน่าเชื่อถือ ควรมีการทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างในการวิเคราะห์ให้มากขึ้น ข้อมูลที่ได้จึงจะสมบูรณ์และเชื่อถือได้
4. นอกจากนี้ควรมีการศึกษาสายพันธุ์สบู่ดำหรือแหล่งปลูกที่เมล็ดให้ปริมาณน้ำมันสูงเพิ่มเติมขึ้นด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรหรือผู้ทำการปลูก ในการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำ ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการนำไปผลิตน้ำมันไบโอดีเซล

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. 2549. พิษของสบู่ดำ. การวิจัยทางคลินิก. แหล่งที่มา http://www.bcca.go.th/nrct/50/XFY50/data/02_03.xml ,12 พฤศจิกายน 2551

รังมี เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ กิติใจเดียว. 2548. การวิจัยและพัฒนาสารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมโรคพืช. น. 608. รายงานความก้าวหน้างานวิจัยและพัฒนาในด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตรปี 2548 ไตรมาสที่ 2 (มกราคม-มีนาคม 2548) เล่ม 2 (2548). ณ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.

สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่. 2549. สบู่ดำ. พืชพลังงานทดแทน. แหล่งที่มา <http://www.agric-prod.mju.ac.th/web-veg/article/new056.htm>, 6 กุมภาพันธ์ 2552.

สุขสันต์ สุทธิผลไพบุลย์. 2551. ประวัติสบู่ดำพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซลและเบนซิน. ธนาคารสมอง ธนาคารแห่งภูมิปัญญา. แหล่งที่มา <http://brainbank.nesdb.go.th>, 20 มกราคม 2553

ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. สบู่ดำ (ตอนที่ 1). **The Thai Envirument**. แหล่งที่มา <http://www.thaienv.com/th/index.php?option=com.htm> , 20 มกราคม 2553.

Agaceta, L.M., P.U. Dumag, J.A. Atolos and F.C. Bandiola. 1981. Studies on the control of snail vector of fascioliasis. Molluscicidal activity of some Indigenous plants. National Science Development Board (NSDB). **Technol J. (Philippines)**. 6(2): 30-34

Aponte, C.H. 1978. Estudio de *Jatropha curcas* L. como recurso biotico. **Diploma thesis**. University Veracruz, Yalapa-Insiquez, Veracruz, Mexico.

Barbieri, L., M. Battelli and F. Stirpe. 1993. Ribosome-inactivating protein from plants. **Biochim. Biophys. Acta**. 1154: 237-282.

- Barry, A.L. 1976. The antimicrobial susceptibility tests: Principle and practices. In: Lorian V.: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3rd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland 21202, USA; pp.1-16, 53-105, 599-664, 795.
- Bass, H.W., J.E. Krawetz, G.R. Obrian, C. Zinselmeier, J.E. Habben and R.S. Boston. 2004. Maize ribosome-inactivating proteins (RIPs) with distinct expression patterns have similar requirements for proenzyme activation. **J. Exp. Bot.** 55(406): 2219-2233.
- Bolognesi, A., P. Letizia, L. Chiara, B. Luigi and P. Augusto. 2002. Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activities in *Mirabilis jalapa* L. tissues. **J. Biol. Chem.** 227(16): 13709-13716.
- Bonness, M.S., M.P. Ready, J.D.Irvin and T.J. Mabry. 1994. Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes; implications for the antiviral mechanism. **The Plant Journal** 5(2): 173-183.
- Chaudhry B, U.F. Muuler, M.V. Cameron, S. Gough, D. Simpson, K. Skriver and J. Mundy. 1994. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. **The Plant Journal** 6: 815–824
- Chuethong, J., K. Oda, H. Saiki. and W. Leelamanit. 2007. Cochinin B, a novel ribosome-inactivating protein from the seeds of *Momordica cochinchinensis*. **Biol. Pharm. Bull.** 30(3): 428-432.
- De Benito, F.M., L. Citores, R. Iglesias, J.M. Ferreras, F. Soriano, J. Arias, E. Mendez and T. Girbes. 1995. Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidase) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. **FEBS.** 360: 299-302.

- Diallo, N. 1994. Trees and hedges in the agricultural systems in Faranah prefecture. **Flamboyant** 31: 24-29
- Duke, J.A. 1985. **CRC Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Dunaeve, M., C. Goebel, C. Wasternack, B. Parthier and E. Goerschen. 1999. The jasmonate-induced 60 kDa protein of barley exhibits N-glycosidase activity in vivo. **FEBS Lett.** 452(3): 263-266.
- Endo, Y. and K. Tsurugi. 1987. RNA N-glycosidase of ricin A chain, mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **J. Biol. Chem.** 262: 8128-8130.
- Felk, J. 1914. The poisonous principles of the seed of *Jatropha curcas* Linn. **Landw. Versuchsw.** 82: 427-430.
- Fong, W.P., Y.T. Poon, T.M. Wong, J.W.Y. Mock, T.B. Ng, R.N.S. Wong, Q.Z. Yao and H.W. Yeung. A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins a- and b-momorcharins from *Momordica charanti* seeds, N-terminal sequence comparison and establishment of their N-glycosidase activity. **Life Sciences.** 59: 901-9.
- Gao W., J. Ling, X. Zhong, W. Liu, R. Zhang and H. Yang. 1994. Luffin-S a small novel ribosome-inactivating protein from *Luffa cylindrica*. Characterization and mechanism studies. **FEBS Lett.** 347(2/3): 257-260.
- Garcia, R.P. and P. Lawas. 1990. Potential plant extracts for the control of *Azolla* fungal pathogens. **Philipp. Agric.** 73 (3/4): 343-348.
- Ginwal, H.S., P.S. Rawat and R.L. Srivastava. 2004. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* L. in central India. **Silvae Genet.** 53:186-192.

Gübitz, G.M., M. Mittelbach and M. Trabi. 1997. Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*. **Developed from the Symposium Jatropha 97” Managua, Nicaragua February 23-27, 1997**. Sponsored by the Austrian Ministry of Foreign Affairs and by Sucher & Holzer Graz.

Hartley, M.R. and J.M. Lord. 2004. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta** 1701: 1-14

He, W.J. and W.Y. Liu. 2004. Both N- and C-terminal regions are essential for cinnamomin A-chain to deadenylate ribosomal RNA and supercoiled double-stranded DNA. **Biochem J.** 377: 17–23.

Hey, D.T., M. Hartley and T.A. Walsh. 1995. Maize Ribosome-Inactivating Protein (b-32). **Plant Physiol.** 107: 1323-1332.

Hillenkamp F., M. Karas, R.C. Beavis and Chait B.T. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Anal. Chem.** 63 (24): 1193–1203.

Jadhav, K.B. and L.D. Jadhav. 1984. Use of some vegetable oils, plant extracts and synthetic products as protectants from pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* Fabr. In stored gram. **J. Sci. Technol.** 21: 110-113.

Kjeldahl, J. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. **Zeitschreft fur Analytische Chemie.** 22: 366.

Krawet, J.E. and R.S. Boston. 2000. Substrate specificity of a maize ribosome-inactivating protein differs across diverse taxa. **Eur J. Biochem.** 267: 1966-1974.

Lee-Huang, S., P.L. Huang, P.L. Nara, H.C. Chen, H.F. Kung, P. Huang and H.I. Huang. 1990.

MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. **FEBS Lett.** 272: 12-18.

Lin, J., F. Yan, L. Tang and F. Chen. 2003. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacol. Sin.** 24 (3): 241-246.

_____, Y. Chen, Y. Xu, F. Yan, L. Tang and F. Chen, 2003. Cloning and Expression of curcin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Botanica Sinica** 45(7): 858-863.

_____, X. Zhou, J. Wang, P. Jiang and K. Tang. 2010. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Prep Biochem Biotechno.** 40(2): 107-118.

Liu, S.Y., F. Sporer, M. Wink, J. Jourdane, R. Henning, Y.L. Li and A. Ruppel. 1996.

Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* and phorbol esters in *Jatropha curcas* with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania* *Biomphalaria* and *Bulinus*. **Trop. Med Paras.**

Lord, J. M., L.M. Roberts and J.D. Robertus. 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **FASEB J.** 8: 201-208.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Fan and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Luo, M. J., X. Y. Yang, Y. X. Liu, Y. Xu, P. Huang, F. Yan and F. Chen. 2006. Expression, purification and anti-tumor activity of curcin. **Biochim. Biophys. Acta.** 38(9): 663-668.

- Maraganore, J.M., M. Joseph. and M.C. Bailey. 1987. Purification and characterization of trichosanthin. Homology to the ricin A chain and implications as to mechanism of abortifacient activity. **J. Biol. Chem.** 262(24): 11628-11633.
- Maro, D.A., A. Chambery, A. Daniele, P. Casoria and A. Parente. 2007. Isolation and characterization of heterotepalins, type 1 ribosome-inactivating protein from *Phytolacca heterotepala* leaves. **J. Phytochem.** 68 (6): 767-776.
- Moazed, D., J.M. Robertson and H.F. Noller. 1988. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. **Nature.** 334: 362-364.
- Morcira, I. 1970. Bagacos. De purgueira e de ricino Ensaís sobre a sua fitotoxicidade e valor fertilizante An. Inst. Super. Agron (Portugal) 31:191-222.
- Mossmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Meth.** 65: 55-63.
- Ng, T.B. and A. Parkash. 2002. Hispin, a novel ribosome inactivating protein with antifungal activity from hairy melon seeds. **Protein Expression and Purification** 26: 211-217.
- Nielsen, K. and R.S. Boston. 2001. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.** 52: 785-816
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton and F. Pognan. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.** 267:5421-5426.
- Osoniyi, O. and F. Onajobi. 2003. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **J. Ethnopharmacology** 89(1): 101-105.

- Oudhia, P. 2003. แหล่งที่มา <http://www.botanical.com/site/column-poudhia/44-jatropha.html>, 4 มกราคม 2553.
- Park, S.W., C.B. Lawrence, J.C. Linden, and J.M. Vivanco. 2002. Characterization of a novel ethylene-inducible ribosome-inactivating protein exuded from root cultures of *Phytolacca Americana*. **Plant Physiol.** 130(1): 164-178.
- Park, S.W., R. Vepachedu, N. Sharma, and J.M. Vivanco. 2004. Ribosome-inactivating proteins In plant biology. **Planta** 219: 1093-1096.
- Parente, A., B. Conforto, A.D. Maro., A. Chambery, P.D. Luca, A. Bolognesi, M. Iriti and F. Faoro. 2008. Type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. leaves: differential seasonal and age expression, and cellular localization. **Planta.** 228: 963-975.
- Picard, D., C.C. Kao and K.A. Hudak. 2005. Pokeweed antiviral protein inhibits brome mosaic virus replication in plant cells. **J. Biol. Chem.** 280: 20069-20075.
- Reinbothe, S., C. Reinbothe, J. Lehmann, I.N. Becker, K. Apel and B. Parthier. 1994. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. **Proc Natl Acad Sci USA.** 91: 7012-7016.
- Sauerwein, M., F. Sporer and M. Wink. 1993. Insect-toxicity of phorbol esters from *Jatropha curcas* seed oil. **Planta Med.** 59(7): 686-690.
- Shelke, S.S., L.D. Jadhav and G.N. Salunkhe. 1985. Ovipositional and adult repellent action of some vegetable oils/extracts against potato tuber moth. **J. Maharashtra Agric. Univ.** 10(3): 284-286.

- Sherchan, D.P., Y.B. Thapa, R.J. Khadka, and T.P. Tiwari. 1989. Effect of green manure on rice production. **PAC Occasional Paper**. No. 2, p. 12. Pakhribas Agricultural Center. Dhankuta, Koshi Zone, Nepal.
- Solsoloy, A.D., N.A. Dumlao, and T.S. Solsoloy. 1987. Insecticidal activity of indigenous plant extracts against bollworm (*Helicoverpa armigera* Hubn.). **Technical report CY (Calendar year) 1985-1986: 175-784**. Cotton Research and Development Inst. Batac, Ilocos Norte, Philippines.
- _____. 1993. Insecticidal activity of formulated product and aqueous extract from physic nut, *Jatropha curcas* L. seed kernel oil on cotton insect pests. **Cotton Res. J.** 6(1/2): 28-34.
- _____. 1995. Pesticidal efficacy of the formulated physic nut, *Jatropha curcas* L. oil on pests of selected field crops. **Philipp. J. Sci.** 124(1): 59-74.
- Spaak, J.D. 1990. Boiser les Iles du Cap-Vert-pourquoi, comment, pour qui. **Bois For Trop.** 225: 47-54.
- Stebbing, J., S. Patterson and F. Gotch. 2003. New insights into the immunology and evolution of HIV. **Cell Res.** 13: 1-7.
- Stillmark, H. 1888. Über Ricin, eines gifiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und anderen Euphorbiacen. **Inaugural Dissertation**. University of Dorpat. Eustonia.
- Stirpe F., A. Pession-Brizzi, E. Lorenzoni, P. Strocchi, L. Montanaro and S. Sperti. 1976. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Toxic and properties and inhibition of protein synthesis in vitro. **Biochem. J.** 156: 1-6.
- _____, S. Olsnes and A. Pihl. 1980. Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin. **J. Biol. Chem.** 255: 6947-6953.

- _____ and L. Barbier. 1986. Ribosome-inactivating proteins up to date. **FEBS**. 195: 1-8.
- _____. 2004. Ribosome-inactivating proteins. **Toxicon**. 44: 371-383.
- _____ and M.G. Battelli. 2006. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cell Mol. Life Sci**. 63: 1850-1866.
- Thangavelu, R., P. Sundararayu, and S. Sathiamoorthy. 2004. Management of anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. **Horticultu Sci Biotechnol**. 79(4): 664-668.
- Van Damme, E.J.M., A. Barre, L. Barbieri, P. Valbonesi, P. Rouge', F. Van Leuven, F. Stirpe and W.J. Peumans. 1997. Type I ribosome-inactivating proteins are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var. Professor Blaauw) bulbs: characterization and molecular cloning. **Biochem J**. 324: 963-970.
- Vassiliades, G. 1981. Notes sus les proprietes molluscicides de deux Euphorbiacees *Euphorbia tirucalli* et *Jatropha cureas*. Essais en laboraloire. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop**. 37 (1): 32-34.
- Vivanco, J.M., B.J. Savary, and H.E. Flores. 1999. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. **Plant Physiol**. 119: 1447-1456.
- Vöhringer. 1987. Untersuchungszeugnis für Futter-mittel. Land wirtschaftliche Untersuchung-and Forschungsanstalt, Bonn.
- Voss, C., E. Eyol, M. Frank, C.W. von der Lieth and M.R. Berger. 2006. Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia americana*. **FASEB**. 20: 1194-1196.

- Wang, J.H., H.L. Nie, H. Huang, S.C. Tam and Y.T. Zheng. 2005. Independency of anti-HIV-1 activity from ribosome-inactivating activity of trichosanthin. **Biochem Biophys Res Commun.** 302: 89–94.
- Wei, Q., Y. Liao, Y. Chen, S.H. Wang, Y. Xu, L. Tang and F. Chen. 2005. Isolation, Characterisation and antifungal activity of β -1, 3-glucanase from seeds of *Jatropha curcas*. **South Afri Bot.** 71(1): 95-55.
- Xu, Y.Z. and W.Y. Liu, 2000. Effects of the active aldehyde group generated by RNA N-glycosidase in the Sarcin/Ricin domain of rat 28S ribosomal RNA on peptide elongation. **Biological Chemistry** 381(2): 113–119.
- Yuan, H., X. Ming, L. Wang, P. Hu, C. An and Z. Chen. 2002. Expression of a gene encoding trichosanthin in transgenic rice plants enhances resistance to fungus blast disease. **Plant Cell Reports.** 20: 992–998.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก.

1. การเตรียมสารละลาย potassium sodium tartrate - copper sulphate - sodium carbonate

สารละลาย A : ละลาย sodium carbonate 20 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร แล้ว
เติม 3

M sodium hydroxide 35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

สารละลาย B : ละลาย copper sulphate pentahydrate 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100
มิลลิลิตร

สารละลาย C : ละลาย potassium sodium tartrate 2 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
ผสมสารละลาย A , B และ C ในอัตราส่วน 100 : 1 : 1 (โดยปริมาตร) โดยผสมสารละลาย
B กับ C ก่อนแล้วเติมสารละลาย A ลงไป ผสมให้เข้ากันและใช้ทันที

2. การเตรียมสารละลาย 50 mM Tris – HCl, pH 7.5

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 1 M
HCl ให้ได้ pH 7.5 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย 0.1 M acetate , pH 4.5

ละลาย sodium acetate 6.80 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ด้วย glacial acetic acid, glacial
ให้ได้ pH 4.5 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลาย 30 % acrylamide + 0.8 % bis – acrylamide

ละลาย acrylamide 75 กรัม กับ bis – acrylamide 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้
ได้ 250 มิลลิลิตร ทำการกรอง และเก็บไว้ในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลาย 1.5 M Tris – HCl , pH 8.8

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 45.41 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 8.8 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลาย 0.5 M Tris – HCl , pH 6.8

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 15.14 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 6.8 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

7. การเตรียมสารละลาย 4x sample buffer สำหรับ SDS – PAGE

ผสม 0.5 M Tris – HCl , pH 6.8 5 มิลลิลิตร SDS 2 กรัม 2-mercaptoethanol 2 มิลลิลิตร Glycerol 2 มิลลิลิตร bromophenol blue 0.03 กรัม

8. การเตรียม stacking gel สำหรับ SDS – PAGE

สารละลาย 30 % acrylamide + 0.8 % bis – acrylamide	0.32	มิลลิลิตร
สารละลาย 0.5 M Tris – HCl , pH 6.8	0.63	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.52	มิลลิลิตร
10 % SDS	25	ไมโครลิตร
10 % ammonium persulphate	12.5	ไมโครลิตร
TEMED	3	ไมโครลิตร

โดยเติมสารละลายเรียงตามลำดับ แต่จะเติม ammonium persulphate เป็นอันดับสุดท้าย

9. การเตรียม 15 % separating gel สำหรับ SDS – PAGE

สารละลาย 30 % acrylamide + 0.8 % bis – acrylamide	2.50	มิลลิลิตร
สารละลาย 1.5 M Tris – HCl , pH 8.8	1.26	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.14	มิลลิลิตร
10 % SDS	50	ไมโครลิตร
10 % ammonium persulphate	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

โดยเติมสารละลายเรียงตามลำดับ แต่จะเติม ammonium persulphate เป็นอันดับสุดท้าย

10. การเตรียม 4x electrophoresis buffer สำหรับ SDS – PAGE

ผสม Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.0 กรัม glycine 57.6 กรัม 10% SDS 10 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

11. การเตรียมน้ำย้อมสีโปรตีน

ละลาย Coomassie brilliant blue R 250 (w/v) 1 กรัม ใน 95% methanol 450 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร กรองและเก็บในขวดชาซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

12. การเตรียมน้ำยาล้างสีโปรตีน

นำ 95% methanol 100 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

13. การเตรียม fixing solution สำหรับ silver stain

ผสม ethanol 100 มิลลิลิตร acetic acid glacial 25 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 มิลลิลิตร

14. การเตรียม sensitizing solution สำหรับ silver stain

ชั่ง sodium thiosulphate 0.04 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร

15. การเตรียม staining solution สำหรับ silver stain

ชั่ง silver nitrate 0.4 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร

16. การเตรียม developing solution สำหรับ silver stain

ผสม sodium carbonate 12 กรัม 0.02 % sodium thiosulphate 4 มิลลิลิตร 37 % formaldehyde 100 ไมโครลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร

17. การเตรียม stopping solution สำหรับ silver stain

ชั่ง EDTA 1.46 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

18. การเตรียม Wash solution สำหรับ in gel digestion

ผสม methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, acetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 มิลลิลิตร

19. การเตรียมสารละลาย 3 M acetate, pH 5.5 สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

ละลาย sodium acetate 20.41 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ด้วย acetic acid, glacial ให้ได้ pH 5.5 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

20. การเตรียม 7 M urea / 6% polyacrylamide gel สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

สารละลาย TBE (10x)	0.75	มิลลิลิตร
Urea	3.15	กรัม
สารละลาย acrylamide/bis-acrylamide	1.50	มิลลิลิตร
DEPC.H ₂ O	3.0	มิลลิลิตร
10 % ammonium persulphate	100	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

21. การเตรียมสารละลาย acrylamide/bis-acrylamide

ละลาย acrylamide 14.6 กรัม bis-acrylamide 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

22. การเตรียมสารละลาย 10x TBE สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 108 กรัม boric acid 55 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

23. การเตรียม ethidium bromide สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

ละลาย ethidium bromide 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในกล่องที่ทึบแสง

24. การเตรียมสารละลาย phenol: chloroform (1:1, v/v) สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

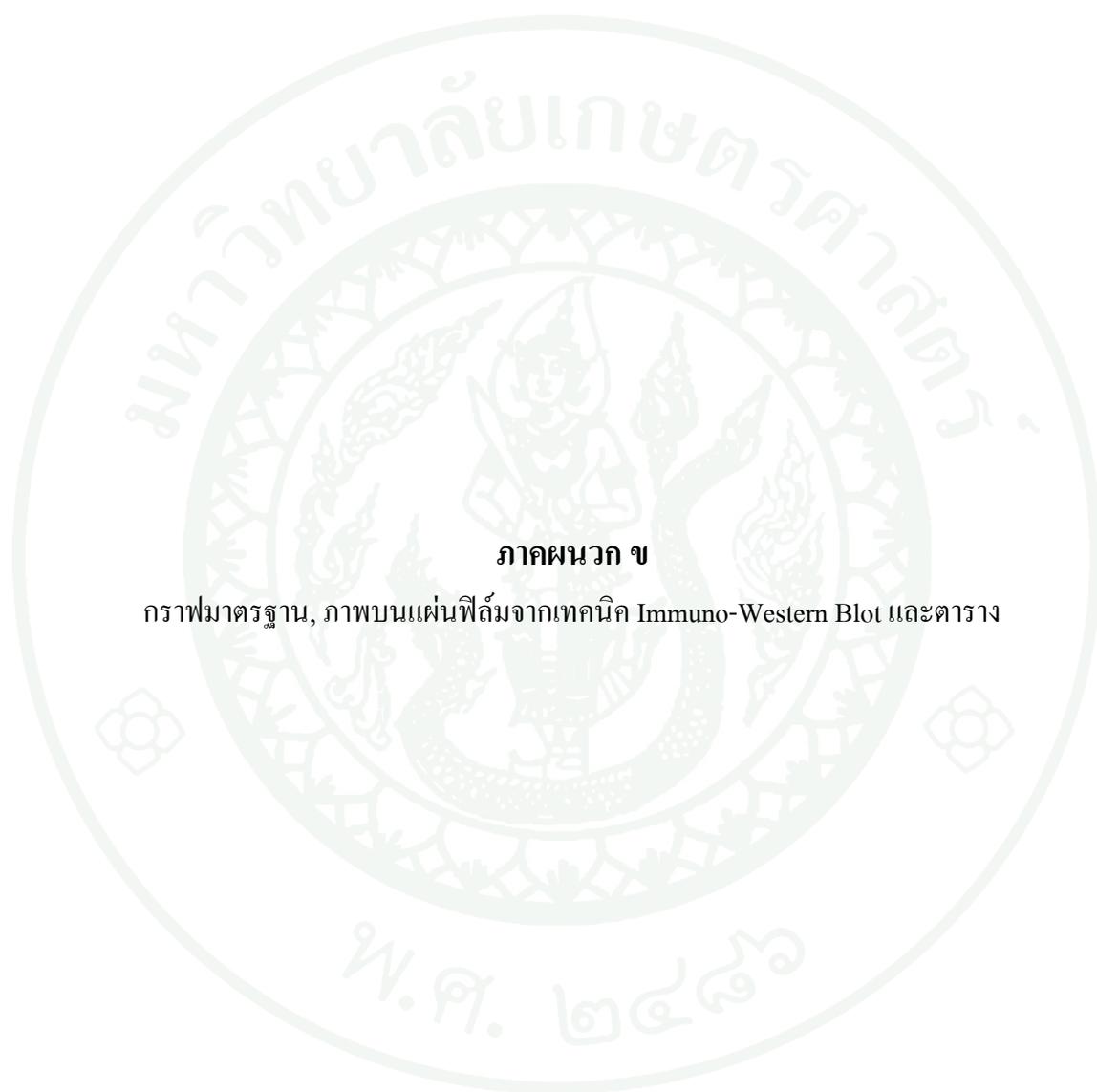
ผสม phenol 20.0 มิลลิลิตร กับ chloroform 20.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

25. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 20x transfer สำหรับเทคนิค Immuno-Western Blot

ละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.11 กรัม glycine 75.07 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

26. การเตรียมสารละลาย phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5 สำหรับเทคนิค Immuno-Western Blot

ละลาย disodium hydrogen orthophosphate anhydrous 11.5 กรัม sodium dihydrogen orthophosphate 2.98 กรัม sodium chloride 5.84 กรัม ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 7.5 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

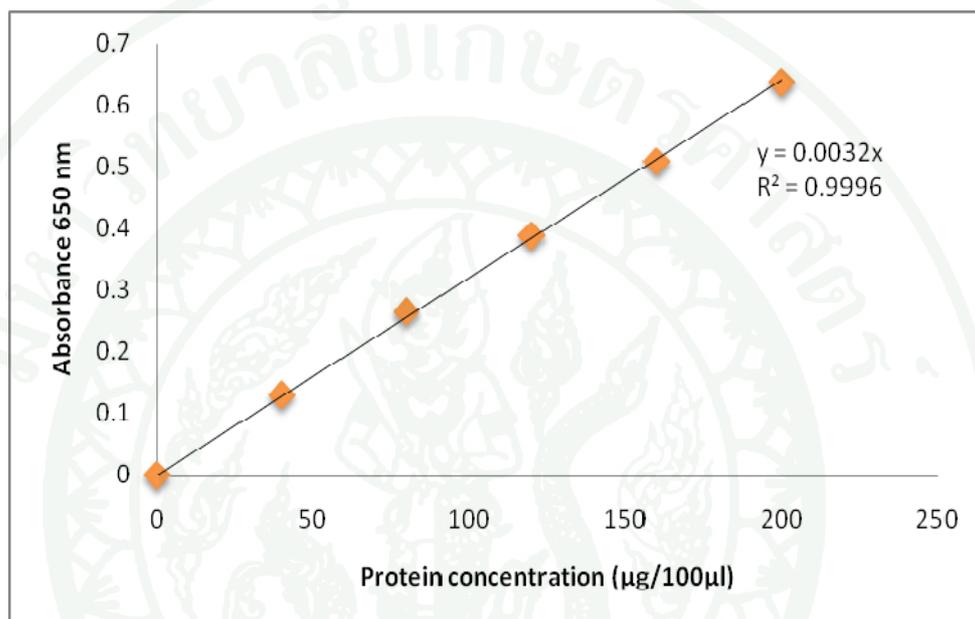


ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐาน, ภาพบนแผ่นฟิล์มจากเทคนิค Immuno-Western Blot และตาราง

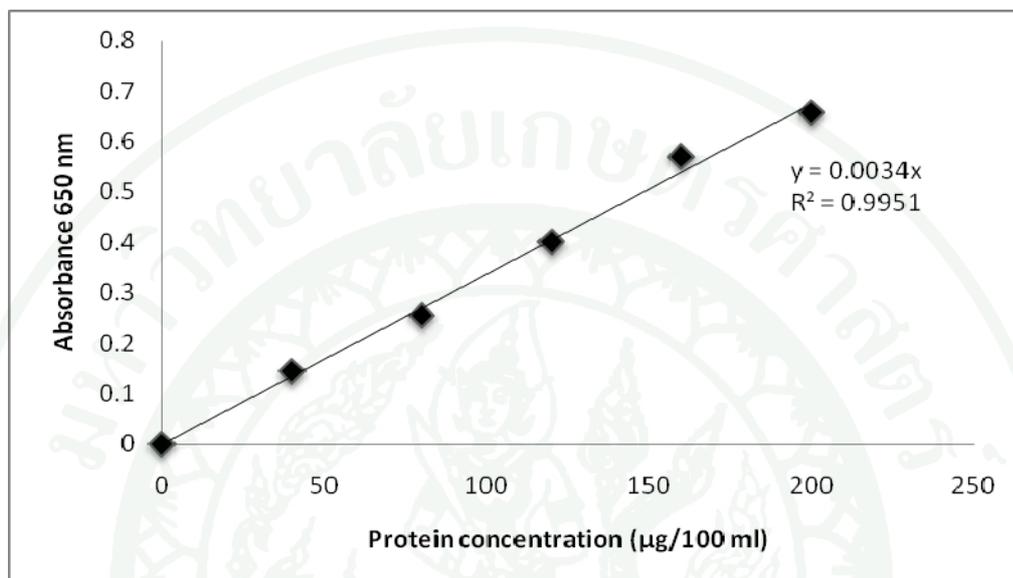
ภาคผนวก ข.

1. กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ตามวิธีการ Lowry et al. (1951) สำหรับการหาโปรตีนในสารสกัดหยาบของเนื้อเมลิคสบู่ดำ ความเข้มข้น BSA ที่ใช้คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร



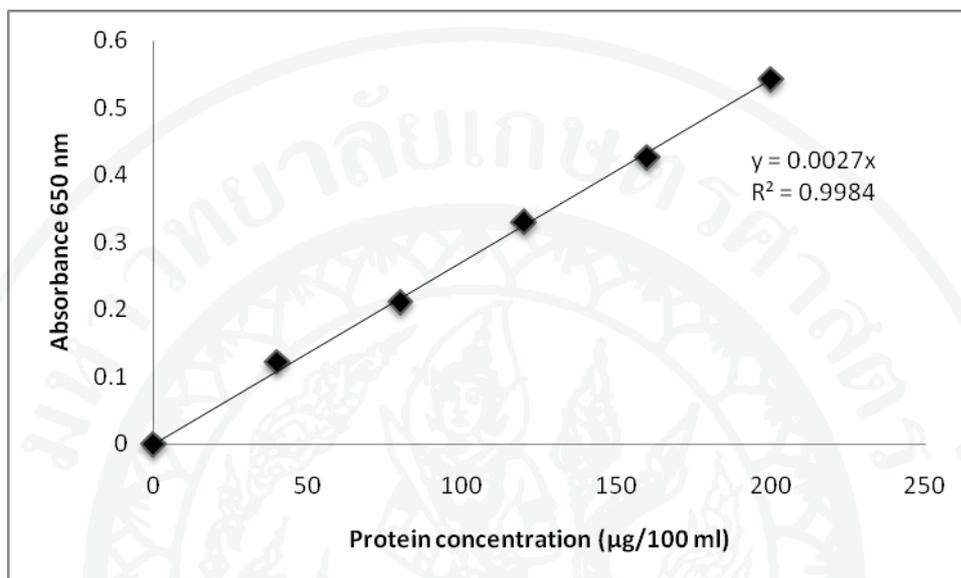
ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร สำหรับการหาโปรตีนในสารสกัดหยาบของเนื้อเมลิคสบู่ดำ

2. กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ตามวิธีการ Lowry et al. (1951) สำหรับการหาโปรตีนในสารละลายเคอร์ซินที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ความเข้มข้น BSA ที่ใช้คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร



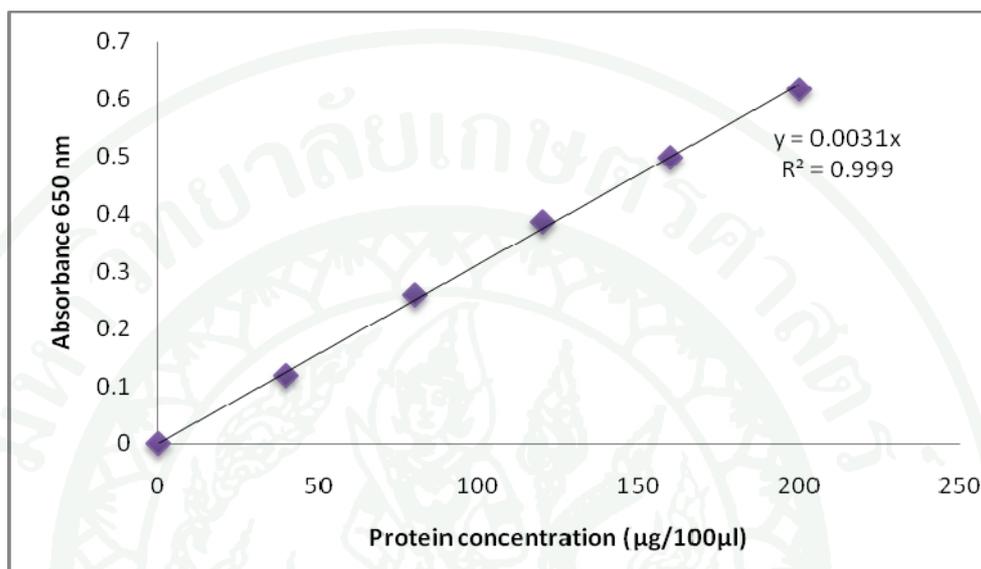
ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร สำหรับการหาโปรตีนในสารละลายเคอร์ซินที่แยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

3. กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ตามวิธีการ Lowry et al. (1951) สำหรับการหาโปรตีนในสารละลายเคอร์ซีนที่แยกโดยคอลัมน์ CM-Cellulose ความเข้มข้น BSA ที่ใช้คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร



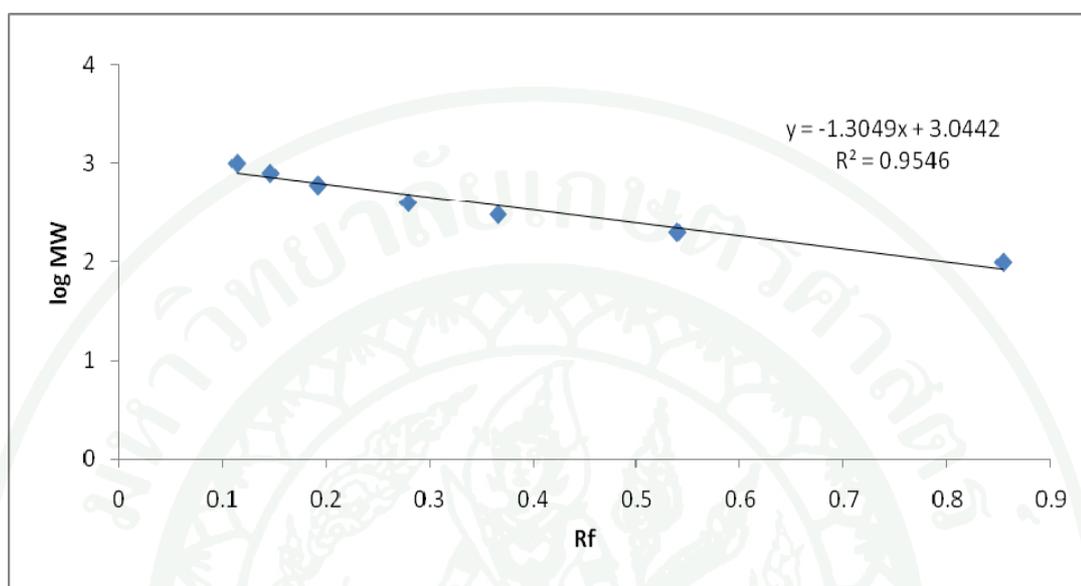
ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร สำหรับการหาโปรตีนในสารละลายเคอร์ซีนที่แยกโดยคอลัมน์ CM-Cellulose

4. กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ตามวิธีการ Lowry et al. (1951) สำหรับการหาโปรตีนเคอร์ซินบริสุทธิที่แยกโดยการปรับ pH ความเข้มข้น BSA ที่ใช้คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร



ภาพผนวกที่ ๔4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร สำหรับการหาโปรตีนเคอร์ซินบริสุทธิที่แยกโดยการปรับ pH

5. กราฟมาตรฐานของ RNA มาตรฐาน สำหรับการหาขนาดคู่เบสของชิ้น RNA ที่ถูกตัดจาก การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase



ภาพผนวกที่ ข5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ (Rf) ของ RNA มาตรฐานกับส่วนกลับมวล โมเลกุล (log MW) ของ RNA มาตรฐาน ซึ่งมีขนาด 100, 200, 300, 400, 600, 800 และ 1,000 คู่เบส

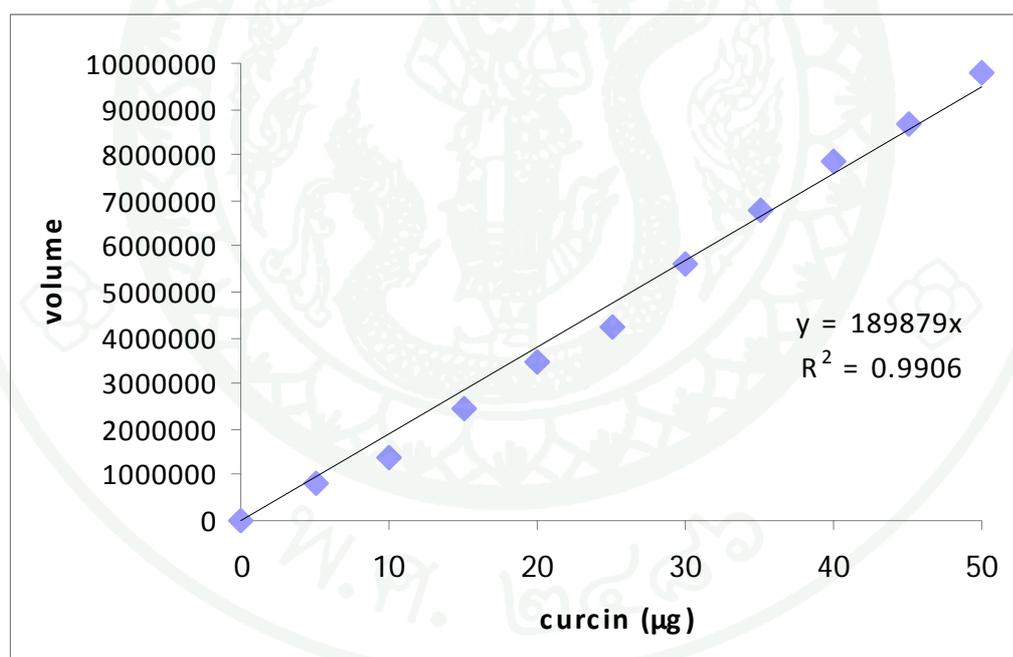
6. ความเข้มข้นของเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดสับดูดำ KUBP33 ต่าง ๆ ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 ไมโครกรัม จากการทำให้ Immuno-Western Blot ที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม



Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Curcin (µg)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50

ภาพผนวกที่ ข6 การหาปริมาณเคอร์ซีนจากเนื้อเมล็ดสับดูดำ KUBP33 ด้วยเทคนิค Immuno-Western Blot ที่แสดงบนแผ่นฟิล์ม

7. กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีนจากการทำให้ Immuno-Western Blot (วิธีการทดลองที่ 3.3)



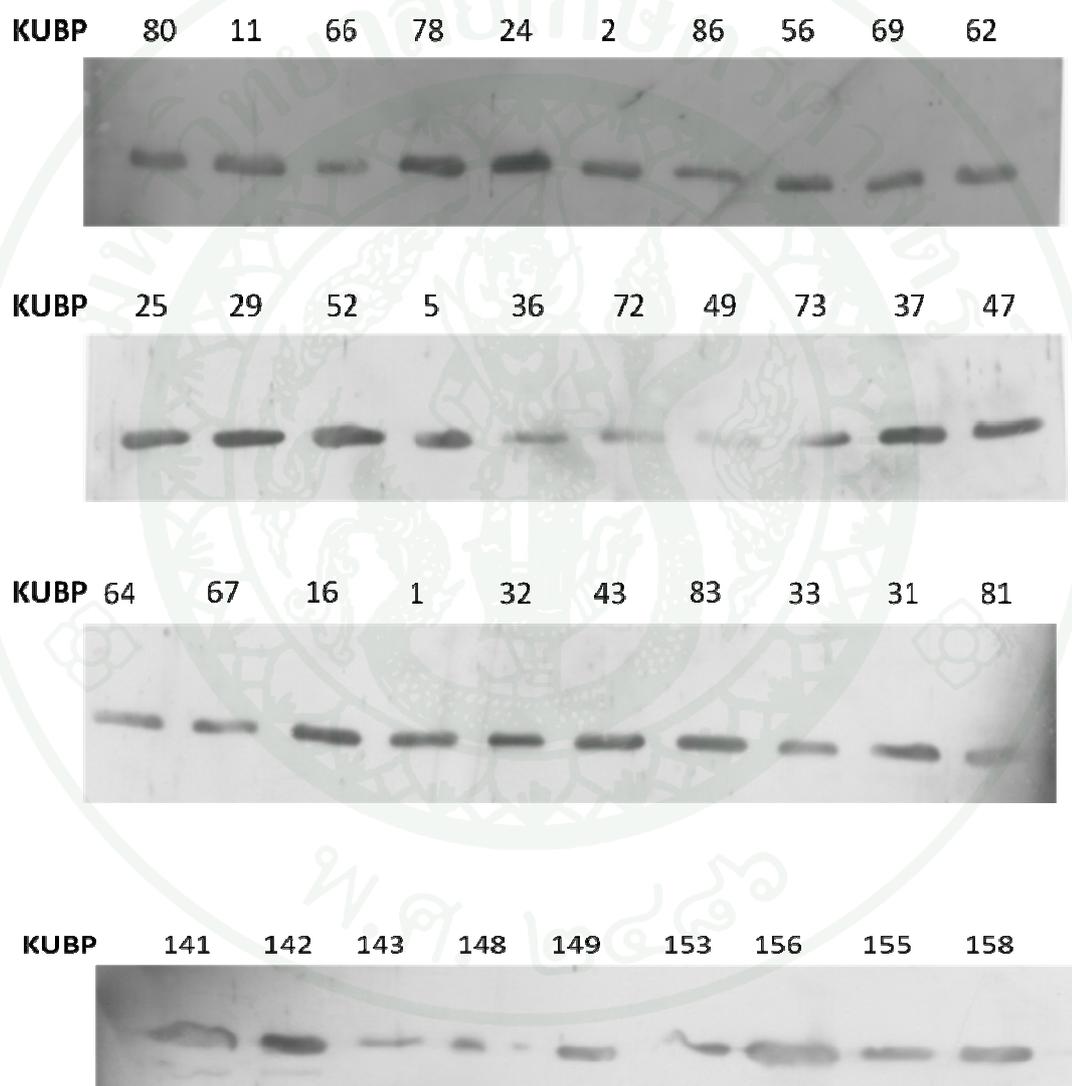
ภาพผนวกที่ ข7 กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีนแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเคอร์ซีน (ไมโครกรัม) กับความเข้มที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม (volume)

8. การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์ซินในเนื้อเมล็ดสบูดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ด้วยด้วยเทคนิค

Immuno-Western Blot

ภาพผนวกที่ ข8 วิเคราะห์ปริมาณเคอร์ซินที่อยู่ในเมล็ดสบูดำจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ด้วยเทคนิค

Immuno-Western Blot ที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม



ภาพผนวกที่ ๗๘ (ต่อ)

KUBP 169 161 170 163 164 159



KUBP 175 176 177 178 179 180 181 185 186 187



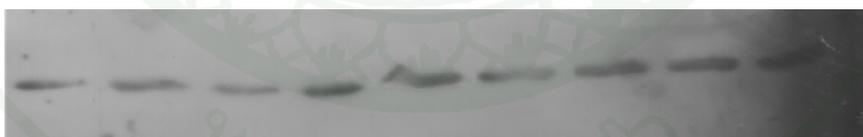
KUBP 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197



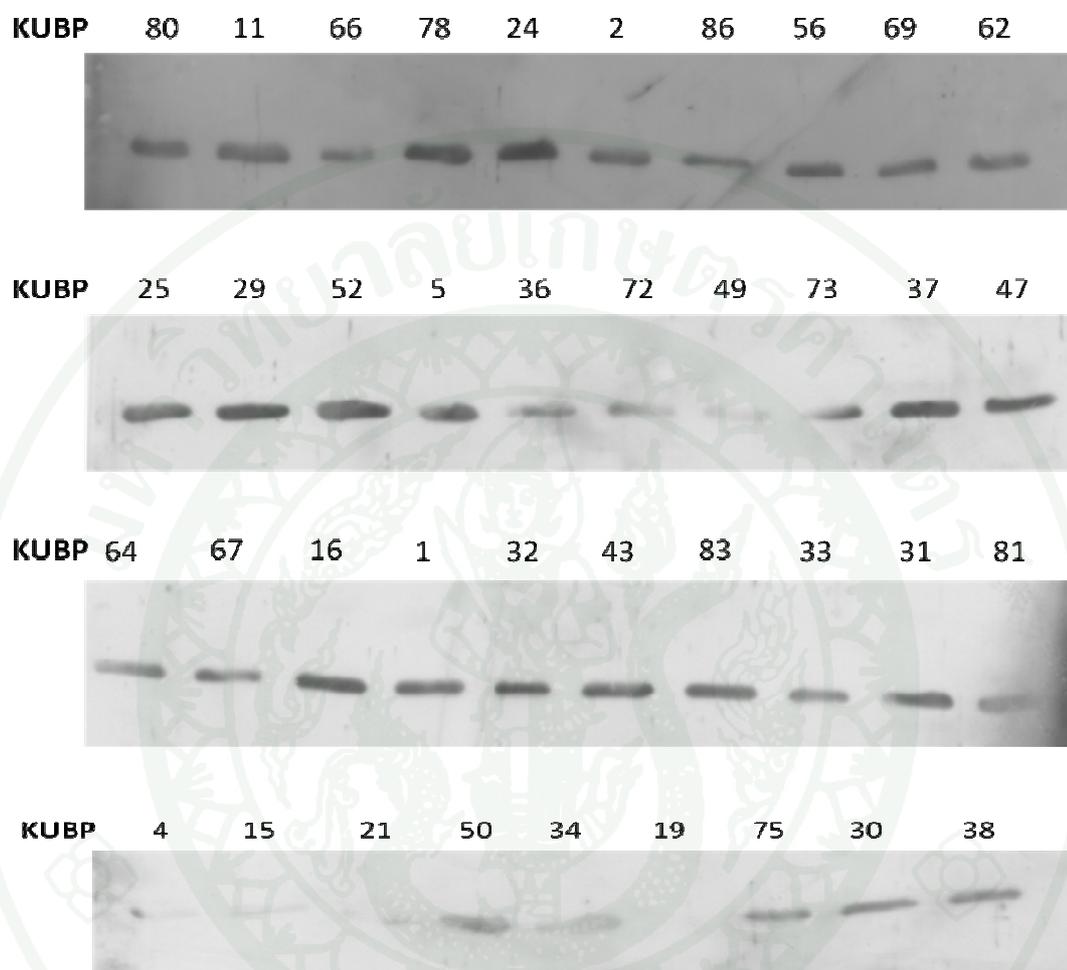
KUBP 198 199 200 201 172 184 204 205 206 208



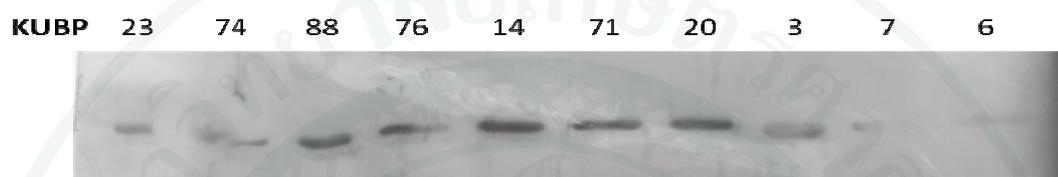
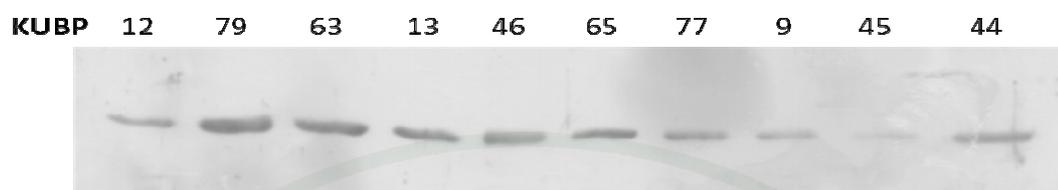
KUBP 85 84 58 51 87 35 18 27 28



ภาพผนวกที่ ๗8 (ต่อ)



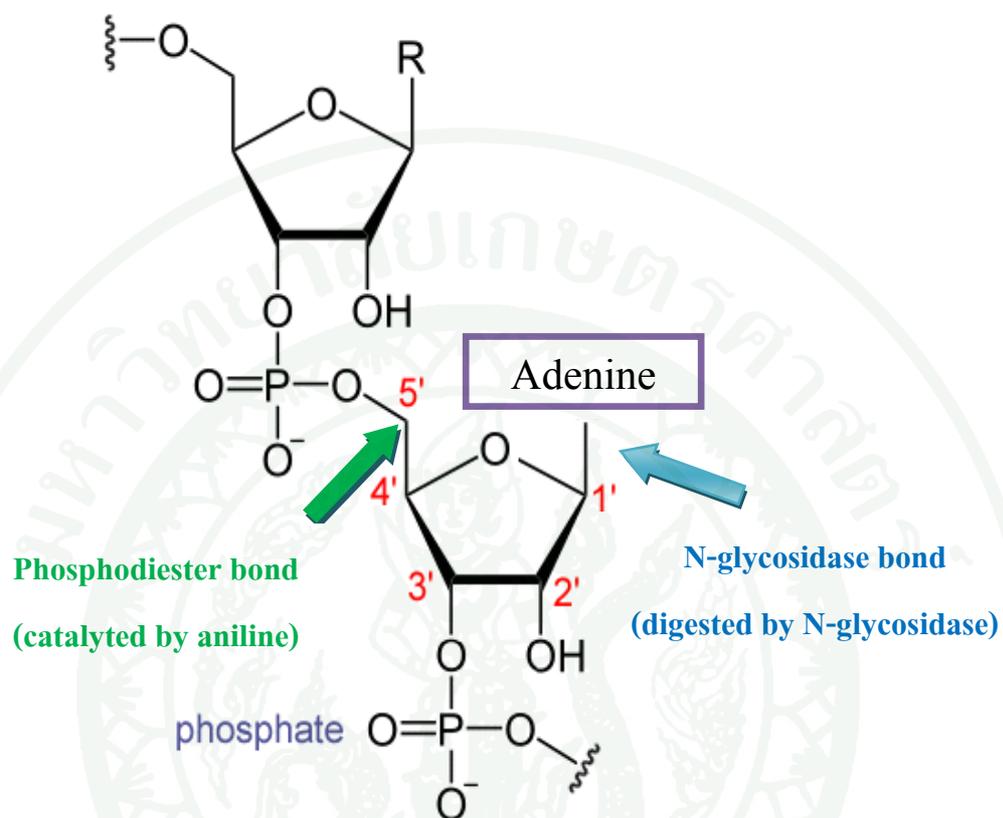
ภาพผนวกที่ ๗8 (ต่อ)



Non-toxic Non-toxic Toxic Non-toxic
 ดุษฎีบัณฑิต 1 ดุษฎีบัณฑิต 2 เปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ด



9. ตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase และ aniline



ภาพผนวกที่ ๗๑ การทำงานของเอนไซม์ rRNA N-glycosidase และ aniline

10. การทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar dilution

ตารางผนวกที่ ข1 การทดสอบฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar dilution

เชื้อแบคทีเรีย	Minimum Inhibitory Concentration (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	Ampicillin	Chloramphenicol	Amphotericin B
1. <i>Acinetobacter anitratus</i> DMST 4183	10	100	NA
2. <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19066 (DMST 10437)	1000	100	NA
3. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055 (DMST 10436)	NI	2000	NA
4. <i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309 (DMST 4229)	5	50	NA
5. <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (DMST 5040)	5	5	NA
6. <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 (DMST 4205)	NI	5	NA
7. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (DMST 4736)	1	5	NA
8. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (DMST 4212)	5	5	NA
9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (DMST 4739)	50	5	NA
10. <i>Pseudomonas fluorescens</i> DMST 6034	1000	1000	NA
11. <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 17368	1000	5	NA
12. <i>Salmonella typhi</i> DMST 5784	0.5	5	NA
13. <i>Shigella dysenteriae</i> DMST 15111	1	1000	NA

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	Minimum Inhibitory Concentration (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	Ampicillin	Chloramphenicol	Amphotericin B
14. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (DMST 8840)	0.25	5	NA
15. <i>Staphylococcus aureus</i> DMST 20654 (MRSA)	50	5	NA
16. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (DMST 15505)	1	5	NA
17. <i>Streptococcus agalactiae</i> DMST 17129	0.25	5	NA
18. <i>Streptococcus pyogenes</i> DMST 17020	0.03125	5	NA
19. <i>Vibrio cholerae</i> nonO1, nonO139 DMST 2873	1	0.5	NA
20. <i>Vibrio cholerae</i> O139 ATCC 51394	5	5	NA
21. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	50	5	NA
22. <i>Klebsiella oxytoca</i> DMST 16071	NI	100	NA
23. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	5	NA
24. <i>Escherichia coli</i> O157.H7 DMST 12743	1	10	NA
25. <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303	1	5	NA
26. <i>Proteus mirabilis</i> DMST 8212	1	50	NA
27. <i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	1000	50	NA
28. <i>Shigella flexneri</i> DMST 4423	1000	5	NA

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรีย	Minimum Inhibitory Concentration (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	Ampicillin	Chloramphenicol	Amphotericin B
29. <i>Shigella sonnei</i> (group D) DMST 2982	1	5	NA
30. <i>Shigella boydii</i> DMST 7776	NI	1000	NA
31. <i>Candida albican</i> ATCC 10231	NA	NA	0.061

- หมายเหตุ 1. Ampicillin และ Chloramphenicol ความเข้มข้นเริ่มต้น เท่ากับ 2000 µg/ml ความเข้มข้นต่างๆที่เจือจางเท่ากับ 1000, 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, µg/ml
2. NI = No inhibition at 2000 µg/ml
3. NA = Not determined

11. สบู่ดำจากแหล่งปลูก 153 แหล่งปลูก ซึ่งนำมาปลูกไว้ที่ไร่สุวรรณจากสถิติ และเก็บเมล็ดแก่จากต้นอายุประมาณ 38 เดือน

ตารางผนวกที่ ข2 เมล็ดสบู่ดำที่มาจากแหล่งปลูกต่างกัน 153 แหล่งปลูก

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 1	โคกกระทาด	โป่งแดง	ขามทะเลสอ	นครราชสีมา
KUBP 2	บ้านหนองกระจง 1	ระเริง	วังน้ำเขียว	นครราชสีมา
KUBP 3	บ้านหนองกระจง 2	ระเริง	วังน้ำเขียว	นครราชสีมา
KUBP 4	บ้านหนองกระจง 3	ระเริง	วังน้ำเขียว	นครราชสีมา
KUBP 5		ชนงพระ	ปากช่อง	นครราชสีมา
KUBP 6	บ้านใหม่สำโรง 1		สีคิ้ว	นครราชสีมา
KUBP 7	บ้านใหม่สำโรง 2		สีคิ้ว	นครราชสีมา
KUBP 8	บ้านใหม่ศรีอุดม	บ้านใหม่	หนองบุญมาก	นครราชสีมา
KUBP 9	บ้านโคกโจด	กุดโบสถ์	เสิงสาง	นครราชสีมา
KUBP 11	บ้านส่องใต้	ตลาด	เมือง	มหาสารคาม
KUBP 12	บ้านสระนคร	คันธารราษฎร์	กันทรวิชัย	มหาสารคาม
KUBP 13			บรบือ	มหาสารคาม
KUBP 14	บ้านหนองลุมพุก	ห้วยแก้ว	ยางตลาด	กาฬสินธุ์
KUBP 15	บ้านด่านใต้		ร่องคำ	กาฬสินธุ์
KUBP 16	บ้านดอนปอแดง	ยางตลาด	ยางตลาด	กาฬสินธุ์
KUBP 18	บ้านหนองม่วง		โพนทอง	ร้อยเอ็ด
KUBP 19	บ้านหนองแ้ (แดง)	บึงงาม	หนองพอก	ร้อยเอ็ด

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 20	บ้านโนนก่อ	หนองแขวง	นิคมคำสร้อย	มุกดาหาร
KUBP 21	บ้านโพธิ์ไทร (ขาว)		ดอนตาล	มุกดาหาร
KUBP 23	บ้านกุดชุม	กุดชุม	กุดชุม	ยโสธร
KUBP 24	บ้านโลกยาว	ทรายมูล	ทรายมูล	ยโสธร
KUBP 25	บ้านกุดแห่	กุดแห่	เลิงนกทา	ยโสธร
KUBP 27	บ้านหนองคูณ	เขมราษฎร์	เขมราษฎร์	อุบลราชธานี
KUBP 28	บ้านหนองกวาง	ศรีสุข	เขื่องใน	อุบลราชธานี
KUBP 29	บ้านยางโยภาพ	ยางโยภาพ	ม่วงสามสิบ	อุบลราชธานี
KUBP 30	บ้านโพธิ์ไทร	ละเวีย	ประโคนชัย	บุรีรัมย์
KUBP 31	บ้านโลกสะอาด	หนองตระครอง	ละหานทราย	บุรีรัมย์
KUBP 32	บ้านหนองทนาง	บ้านไทร	ปราสาท	สุรินทร์
KUBP 33	บ้านดาด	ดาด	สังขละ	สุรินทร์
KUBP 34	บ้านไก่อ้า	ไก่อ้า	เมือง	อำนาจเจริญ
KUBP 35	บ้านศรีสมบูรณ	ชานุมาน	ชานุมาน	อำนาจเจริญ
KUBP 36	บ้านผักขะ	ลิ้นฟ้า	ยางชุมน้อย	ศรีสะเกษ
KUBP 37	บ้านหนองคู	หนองครก	เมือง	ศรีสะเกษ
KUBP 38	บ้านศาลาเหนือ	ตำโรงตาเจ็น	ขุขันธ์	ศรีสะเกษ
KUBP 43	บ้านปอแดง	บากเรือ	มหาชนะชัย	ยโสธร
KUBP 44	บ้านเนินมะกอก	หนองไผ่	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
KUBP 45	บ้านตำพาด	หนองไผ่	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
KUBP 46	บ้านดงเจริญ	วังศาล	วังโป่ง	เพชรบูรณ์

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 47	บ้านวังชะนาง	ท้ายดง	วังโป่ง	เพชรบูรณ์
KUBP 49	บ้านโนนไทร	บ่อทอง	ทองแสนขัน	อุดรดิตถ์
KUBP 50	บ้านวังปรากฏ	ป่าคา	ทองแสนขัน	อุดรดิตถ์
KUBP 51	บ้านทุ่งศรี	ทุ่งศรี	ร้องกวาง	แพร่
KUBP 52	บ้านปางมอญ	อายนาลัย	เวียงสา	น่าน
KUBP 56	บ้านน้ำโมง	ผาตอ	ท่าวังผา	น่าน
KUBP 58	บ้านห้วยเฟื่อง	ผาช้างน้อย	ปง	พะเยา
KUBP 62	บ้านน้ำจ้ำ	หลวงใต้	งาว	ลำปาง
KUBP 63	บ้านท่าสี่	บ้านดง	แม่เมาะ	ลำปาง
KUBP 64	บ้านต้นมื่น	วังพร้าว	เกาะคา	ลำปาง
KUBP 65	บ้านสันบุญเรือง	แม่กัวะ	สบปราบ	ลำปาง
KUBP 66	บ้านแม่วะเด่นชัย	แม่วะ	เถิน	ลำปาง
KUBP 67	บ้านตาก	ตากออก	บ้านตาก	ตาก
KUBP 69	ม.3	บ้านหม้อ	เมือง	เพชรบุรี
KUBP 71	บ้านป่า	ตำหูล	บ้านลาด	เพชรบุรี
KUBP 72	ห้วยจิก	ชะอำ	ชะอำ	เพชรบุรี
KUBP 73	ม.7 บ้านบ่อนอก	บ่อนอก	เมือง	ประจวบคีรีขันธ์
KUBP 74	ม.2 บ้านบางน้ำจืด	บางน้ำจืด	หลังสวน	ชุมพร
KUBP 75	ม.2 สี่แยกบ้านนาเดิม	บ้านนา	บ้านนาเดิม	สุราษฎร์ธานี
KUBP 76	บ้านนายาง	นาสาร	บ้านนาสาร	สุราษฎร์ธานี
KUBP 77	ม.7 บ้านไร่เหนือ	ที่วัง	ทุ่งสง	นครศรีธรรมราช

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 78	ม.1	บ้านตุล	ชะอวด	นครศรีธรรมราช
KUBP 79	บ้านปิงยา (วัดเขาแดง)	ปรางหมู	เมือง	พัทลุง
KUBP 80	ม.6 บ้านประคู้	เขาเจ็ยก	เมือง	พัทลุง
KUBP 81	ม.2 สถานีอนามัยบ้านป่า บาก	ทุ่งนารี	ป่าบอน	พัทลุง
KUBP 83	เขตเทศบาล	จะบังคิกอ	เมือง	ปัตตานี
KUBP 84	ม.4 บ้านควนลังงา	ทรายขาว	โคกโพธิ์	ปัตตานี
KUBP 85	ม.11	เขาพระ	รัตภูมิ	สงขลา
KUBP 86	ม.21	เขาวิเศษ	วังวิเศษ	ตรัง
KUBP 87	ม.2	ทรายขาว	คลองท่อม	กระบี่
KUBP 88	ถ.ศรีพังงา(ปากทางแยก ไปพังงา)	กระบี่ใหญ่	เมือง	กระบี่
KUBP 89			กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
KUBP 91			ชนแดน	เพชรบูรณ์
KUBP 95				USA
KUBP 96				สตูล
KUBP 108	บ้านหนองลุมพุก	หนองบัวโคก	จัตุรัส	ชัยภูมิ
KUBP 109	บ้านหนองบัวใหญ่	บ้านหนองบัวใหญ่	จัตุรัส	ชัยภูมิ
KUBP 110	บ้านท่าโป่ง	หนองตะเฒ่า	หนองบัวระเหว	ชัยภูมิ
KUBP 111	บ้านราษฎร์บูรณะ	เจาทอง	กักคี่ชุมพล	ชัยภูมิ
KUBP 112	บ้านห้วยโกเตี้ย	ท่าใหญ่	หนองบัวแดง	ชัยภูมิ
KUBP 114	บ้านร่องแสนคำ	บ้านเป่า	เกษตรสมบูรณ์	ชัยภูมิ

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 115	บ้านคลองเตยใน	ห้วยยาง	คอนสาร	ชัยภูมิ
KUBP 116	บ้านตะกุดจั่น	ท่าข้าม	ชนแดน	เพชรบูรณ์
KUBP 117	บ้านตะกุดจั่น	ท่าข้าม	ชนแดน	เพชรบูรณ์
KUBP 118	บ้านบึงกลาง	ฝายนาแซง	หล่มสัก	เพชรบูรณ์
KUBP 119	บ้านหนองสว่าง	หนองสว่าง	หล่มสัก	เพชรบูรณ์
KUBP 120	บ้านกกกระบาก	โป่ง	ด่านซ้าย	เลย
KUBP 121	บ้านโป่ง	โป่ง	ด่านซ้าย	เลย
KUBP 122	บ้านหางนา	โพนสูง	ด่านซ้าย	เลย
KUBP 123	บ้านกอไร่ใหญ่	เสี้ยว	เมือง	เลย
KUBP 124	รร.ภูหลวงไฮเต็ล	กุดป่อง	เมือง	เลย
KUBP 125		เชียงคาน	เชียงคาน	เลย
KUBP 126		เชียงคาน	เชียงคาน	เลย
KUBP 128	บ้านคกไผ่	ปากชม	ปากชม	เลย
KUBP 129	บ้านปากชม	ปากชม	ปากชม	เลย
KUBP 130	บ้านวินัย	ปากชม	ปากชม	เลย
KUBP 131		เชียงกลม	ปากชม	เลย
KUBP 132		ชมเจริญ	ปากชม	เลย
KUBP 133		นาดินดำ	เมือง	เลย
KUBP 134	บ้านหนองดอกบัว	น้ำสวย	เมือง	เลย
KUBP 135	บ้านหนองตุม	ภูกระดึง	ภูกระดึง	เลย
KUBP 136	หมู่บ้านสัมพันธ์	ข้าวเรียง	ชุมแพ	ขอนแก่น

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 138	บ้านนางาม	นาดี	หนองแสง	อุดรธานี
KUBP 139	บ้านคำหว่าทอง	ทับกุง	หนองแสง	อุดรธานี
KUBP 140	บ้านผาสิงห์	หมากหญ้า	หนองวัวซอ	อุดรธานี
KUBP 141	บ้านหัวขบง	โพธิ์ไทร	เมือง	หนองบัวลำภู
KUBP 142	บ้านกุดกระสูไต้	เก่ากลอย	นากลาง	หนองบัวลำภู
KUBP 143	บ้านภูดิน	บ้านฝ้อ	บ้านฝ้อ	อุดรธานี
KUBP 148	บ้านเลาใหญ่	แซแล	กุมภวาปี	อุดรธานี
KUBP 149	บ้านเหล่าหมากบัว	แซแล	กุมภวาปี	อุดรธานี
KUBP 153	บ้านโนนเขวา	ดงบัง	นาคูน	มหาสารคาม
KUBP 155	บ้านหัวหนอง	ดอนหว่าน	เมือง	มหาสารคาม
KUBP 156	บ้านถิ่นพัฒนา	ภูดิน	เมือง	กาฬสินธุ์
KUBP 158	บ้านภูวง	คำบ่อ	วาริชภูมิ	สกลนคร
KUBP 159	บ้านโนนแบ่น	เชียงเครือ	เมือง	สกลนคร
KUBP 161	บ้านโคกสะอาด	บ้านเสียว	นาหว้า	นครพนม
KUBP 163	บ้านนกกทา	หนองสนม	วานรนิวาส	สกลนคร
KUBP 164	บ้านคำปะกั๋ง	บ้านโพธิ์	โพนพิสัย	หนองคาย
KUBP 169	บ้านดอนกลาง	หนองแวง	บ้านแพง	นครพนม
KUBP 170	บ้านม่วงเหล่าหลวง	ไทรบุรี	ท่าอุเทน	นครพนม
KUBP 172	บ้านเหล่าภูมิ	หนองญาติ	เมือง	นครพนม
KUBP 175	บ้านโคกหินแฮ่	โคกหินแฮ่	เรณูนคร	นครพนม
KUBP 176	บ้านนาเหนือ	พระซอง	นาแก	นครพนม

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 177	บ้านดงน้อย	พิमान	นาแก	นครพนม
KUBP 178	บ้านนาवल	ดงหลวง	ดงหลวง	มุกดาหาร
KUBP 179	บ้านหนองปง	หนองเอี่ยน	คำชะอี	มุกดาหาร
KUBP 180	บ้านโนนยาง	โนนยาง	หนองสูง	มุกดาหาร
KUBP 181	บ้านจั่ว	โนนชัยศรี	โพนทอง	ร้อยเอ็ด
KUBP 184	บ้านบาก	ตำราญ	เมือง	ยโสธร
KUBP 185	บ้านสองคอน	โนนโพธิ์	เมือง	อำนาจเจริญ
KUBP 186	บ้านโคกศรีบุญเรือง	ไก่อ่า	เมือง	อำนาจเจริญ
KUBP 187	บ้านเหล่ามันแกว	โคกกลาง	ลืออำนาจ	อำนาจเจริญ
KUBP 188	บ้านกุงชัย	ดงบัง	ลืออำนาจ	อำนาจเจริญ
KUBP 189	บ้านพนานต์	พระเหลา	พนา	อำนาจเจริญ
KUBP 190	บ้านดอนจัว	ไหล่ทุ่ง	ตระการพืชผล	อุบลราชธานี
KUBP 191	บ้านลาดสมดี	กุศกร	ตระการพืชผล	อุบลราชธานี
KUBP 192	บ้านดอนใหญ่	ดอนใหญ่	ศรีเชียงใหม่	อุบลราชธานี
KUBP 193	บ้านดอนตุม	คำไหล	ศรีเชียงใหม่	อุบลราชธานี
KUBP 194	บ้านห้วยสระคาม	โจงเจียม	โจงเจียม	อุบลราชธานี
KUBP 195	บ้านผ้าแพร	โจงเจียม	โจงเจียม	อุบลราชธานี
KUBP 196	บ้านนาโพธิ์	นาโพธิ์	บุญทรirk	อุบลราชธานี
KUBP 197	บ้านหัวเข้	บัวงาม	บุญทรirk	อุบลราชธานี
KUBP 198	บ้านนาจะหลวย	นาจะหลวย	นาจะหลวย	อุบลราชธานี
KUBP 199	บ้านแปดอ้อม	โคมประดิษฐ์	น้ำขุ่น	อุบลราชธานี

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

Accession Number	แหล่งที่มา			
	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
KUBP 200	บ้านภูผามอก	ภูผามอก	กันทรลักษ์	ศรีสะเกษ
KUBP 201	บ้านจอก	สะพุง	ศรีรัตนะ	ศรีสะเกษ
KUBP 204	บ้านพม่า	จารพัต	ศีขรภูมิ	สุรินทร์
KUBP 205	บ้านกันจรรย์	เมืองที	เมือง	สุรินทร์
KUBP 206	บ้านตะเคียน	คอโค	เมือง	สุรินทร์
KUBP 208	บ้านพลวง	สวายจิก	เมือง	บุรีรัมย์
KUBP 209	บ้านสี่แยก	กงรถ	ห้วยแถลง	นครราชสีมา
KUBP 210	บ้านหินดาด	หินดาด	ห้วยแถลง	นครราชสีมา
KUBP 211	บ้านหนองตระครอง	หินโคน	จักราช	นครราชสีมา
KUBP 212	บ้านตูม	ทองหลาง	จักราช	นครราชสีมา

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นางสาวศันสนีย์พร กิตติขจร
Miss Sansaneeyaporn Kittikajhon
วัน เดือน ปี ที่เกิด 5 ธันวาคม พ.ศ. 2524
สถานที่เกิด จังหวัดกำแพงเพชร
ประวัติการศึกษา วท.บ. (เคมี)
มหาวิทยาลัยนเรศวร 2547

ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน -
สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ -
ทุนการศึกษาที่ได้รับ -

ผลงานทางวิชาการ

Sansaneeyaporn Kittikajhon, Sittiruk Roytrakul, Nuanchawee Wetprasit and Sunanta Ratanapo.

2009. Purification of Curcin from Physic nut (*Jatropha curcas* Linn.) and Identification of its antimicrobial effect. *In Proceedings of the 2nd Biochemistry and Molecular biology Conference*. May 7-8, 2009. Khonkaen University, Khonkaen, Thailand.

Sansaneeyaporn Kittikajhon, Sittiruk Roytrakul, Nuanchawee Wetprasit and Sunanta Ratanapo.

2010. *In vitro* screening of various *Jatropha curcas* seeds for high protein and low toxic curcin. *In Proceedings of the 48th Kasetsart University Annual Conference*. February 3-6. Kasetsart University, Bangkok.