

การโคลนยีนและผลิตโปรตีนเคอร์ซินจากใบสบู่ดำ

Cloning and Expression of Curcin from
the Leaf of *Jatropha curcas*นวลฉวี เวชประสิทธิ์^{1*} และ สิทธิรักษ์ รอยตระกูล²
Nuanchawee Wetprasit^{1*} and Sittiruk Roytrakul²

บทคัดย่อ

เคอร์ซินเป็น Ribosome-inactivating protein ซึ่งเป็นโปรตีนพิษจากพืช พบว่าเกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวของพืชและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดแยก RNA จากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 และเปลี่ยนให้เป็น cDNA ของยีนเคอร์ซินด้วยวิธี RT-PCR นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และสอดใส่เข้าในเวกเตอร์ pTZ57R/T โดย cDNA ที่โคลนได้มีขนาดประมาณ 882 bp ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนเคอร์ซินอื่นๆ จากสบู่ดำถึง 95.2% โปรตีนเคอร์ซินที่สังเคราะห์นี้อยู่ในรูป pro-protein มีความยาว 293 กรดอะมิโน โดย 28 กรดอะมิโนแรกเป็น leader signal ซึ่งจะถูกตัดออกในกระบวนการนำส่งโมเลกุล และโปรตีนขนาด 265 กรดอะมิโนที่เหลือเป็น mature protein ของเคอร์ซิน ยีนเคอร์ซินที่เป็นส่วนของ mature protein ได้ถูกโคลนเข้าในพลาสมิด pET-17b และเหนี่ยวนำให้แสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21(DE3) ด้วย 1 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 28.98 กิโลดาลตัน เมื่อนำโปรตีนนี้มาตัดย่อยด้วยทริปซินและวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนเคอร์ซินของพืชอื่น รีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซินที่ได้นี้จะนำไปศึกษาคุณสมบัติ และทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อไป

คำสำคัญ: เคอร์ซิน สบู่ดำ รีคอมบิแนนท์โปรตีน

Received: 28 January 2020; Accepted: 17 May 2020

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Huamark, Bangkok, Bangkok 10240

² กลุ่มวิจัยส่วนผสมฟังก์ชันและนวัตกรรมอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ คลองหลวง ปทุมธานี 12120

² Functional Ingredients and Food Innovation Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Khlong Luang, Pathumthani 12120

* Corresponding author: nuanwee@yahoo.com

Abstract

Curcin, a ribosome-inactivating protein, is a toxic protein from plants. It was found to involve in plant defense system and bioactive compounds. In this study, total RNA was isolated from the leaves of *Jatropha curcas* KUBP 78 and used as template to synthesize the cDNA encoding curcin by RT-PCR. The PCR products were digested their termini with *Bam*HI restriction enzyme and inserted into a cloning vector, pTZ57R/T. A cDNA of approximately 882 base pairs was obtained. The deduced amino acids sequence shared homology of 95.2% to those of curcin proteins from *Jatropha curcas*. The curcin was synthesized as a pro-protein consisting of 293 amino acids, the first 28 of which acts as a leader was cleaved and yielded the mature protein consists of 265 amino acids. The segment encoding the mature protein curcin gene was cloned into pET-17b plasmid and overexpressed as insoluble protein in *Escherichia coli* BL21(DE3) upon induction with 1 mM IPTG at 37°C. The insoluble recombinant protein was an apparent relative molecular mass approximately 28.98 kDa as determined by MALDI-TOF MS. Expressed protein bands were excised, tryptic digested and analyzed by LC-MS/MS. The results showed that the amino acid sequence of recombinant protein was similar to amino acid sequence of curcin in other green plants. The recombinant protein of curcin is further studied on characterization and anticancer activity.

Keywords: Curcin, *Jatropha curcas*, Recombinant protein

บทนำ

สบู่ดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* จัดอยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE เป็นพืชพื้นเมืองที่สามารถปลูกได้ในทุกสภาพพื้นที่ของประเทศไทย สบู่ดำถือว่าเป็นพืชที่มีศักยภาพสูง เป็นพืชน้ำมันที่สามารถทดแทนไบโอดีเซลได้ 100% ส่วนต่างๆ ของต้นสบู่ดำยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคได้หลายชนิด เช่น ใช้รักษาโรคปากนกกระจอก ใช้ห้ามเลือด รักษาอาการคันเป็นผื่นขาวหรือปากเปื่อย แก้เหงือกบวมอักเสบ สมานแผล แก้โรคกระเพาะอาหาร ท้องผูก แก้ปวดฟัน แผลในปาก แก้ท้องเสีย ลดไข้ แก้ไอ รักษาแผลเรื้อรัง ฝี ลดการอักเสบ บวมตามผิวหนัง เนื้อออก เป็นต้น เมล็ดสบู่ดำมีสารพิษรุนแรง เรียกว่า เคอร์ซิน (curcin) เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ และยังมีสารกลุ่มฟอรับอลเอสเทอร์ (phorbol esters) ที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร และระบบหายใจ (Amaugo and Emosairue, 2003) สารสกัดจากสบู่ดำยังมีฤทธิ์ลดอาการอักเสบ (Mujumdar and Misar,

2004) เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย (Songjang and Wimolwattanasarn, 2004) ไวรัส (Dahake et al., 2013; Chavan et al., 2015) และเชื้อรา (Ingel et al., 2017; Abdelgader et al., 2019)

เคอร์ซิน เป็นโปรตีนในกลุ่ม Ribosome-inactivating proteins (RIPs) type I ถือเป็นสารพิษจากพืช มีสมบัติพิเศษคือสามารถยับยั้งการทำงานของไรโบโซมของเซลล์ชนิดต่างๆ อย่างจำเพาะ (Endo et al., 1987) Felke (1994) เป็นผู้ค้นพบและตั้งชื่อโปรตีนจากเมล็ดสบู่ดำว่าเคอร์ซิน เคอร์ซินจะถูกกระตุ้นให้มีการผลิตเมื่อต้นสบู่ดำได้รับความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความเค็ม หรือติดเชื้อไวรัส เชื้อรา หรือได้รับกรดจัสโมนิก (jasmonic acid) และกรดแอบซิสซิก (abscisic acid) (Logemann et al., 1992; Desvoyes et al., 1997; Rippmann et al., 1997; Song et al., 2000; Qin et al., 2010) จากการศึกษาพบว่านอกจากมีฤทธิ์ยับยั้งการแปลรหัสของโปรตีนเหนือกว่าโปรตีนในกลุ่ม RIPs อื่นๆ แล้ว (Lin et al., 2003b) เคอร์ซินยังมี

ความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า ricin (Lord et al., 2003) เคอร์ซินสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด SGC-7901, Sp2/0 และ human hepatoma แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็งชนิด Ehrlich ascites และ Hela (Stirpe et al., 1976; Lin et al., 2003b) ซึ่งแสดงว่าเคอร์ซินมีความจำเพาะต่อชนิดของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นเคอร์ซินจึงเป็นโปรตีนที่เหมาะสมต่อการเป็นองค์ประกอบหนึ่งของ immunotoxin เพื่อรักษาโรคมะเร็ง โรค autoimmune หรือโรคที่เกิดจากปรสิตได้อย่างจำเพาะ (Frankel et al., 1986) นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยพบว่า เคอร์ซินสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด osteosarcoma cell line U2OS ได้ดีกว่ายา Paclitaxel ที่เป็นยารักษามะเร็ง (Zhang et al., 2017) และมีการนำเคอร์ซินไปเชื่อมต่อกับโมโนโคลนแอนติบอดี (monoclonal antibody) เป็น immunotoxin เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด breast cancer cell lines SK-BR-3 ที่มี Her2 receptor (Jaramillo-Quintero et al., 2015) รวมทั้งมีการใช้เคอร์ซินเชื่อมกับ biogenic gold nanoparticles เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษามะเร็งสมอง (Mohamed et al., 2014)

เคอร์ซินส่วนใหญ่พบในเมล็ดมากกว่าในใบ มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนเคอร์ซินบริสุทธิ์ที่สกัดจากเมล็ดสบู่ดำ (Stripe et al., 1976; Lin et al., 2002) และมีการโคลนยีนเคอร์ซินจากเมล็ด (Lin et al., 2003a; Lin et al. 2003b) เนื่องจากการสกัดโปรตีนเคอร์ซินจากเมล็ดสบู่ดำ และการทำให้บริสุทธิ์นั้น มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน ต้นทุนสูง และได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์ไม่เท่ากันในแต่ละรอบการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการโคลนยีนเคอร์ซินจากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของประเทศไทย และให้ผลผลิตน้ำมันสบู่ดำในปริมาณมาก แล้วนำมาผลิตโปรตีนเคอร์ซินในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อให้ได้โปรตีนเคอร์ซินที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนเดิมในปริมาณมาก ทำบริสุทธิ์ได้ง่าย สามารถนำมาศึกษาคุณสมบัติของเคอร์ซิน หรือนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้อย่างรวดเร็ว

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบสดจากต้นสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำมันสบู่ดำในปริมาณมาก ได้รับมาจากสถานีทดลองวิจัยพืชไร่สุวรรณวจากกสิกิจ

สถาบันอินทรีจันทรสถิตย์เพื่อการค้นคว้าและพัฒนาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัด mRNA จากใบสบู่ดำ

ทำการสกัด mRNA จากใบสบู่ดำโดยตัดแปลงมาจากวิธี Chang และคณะ (1993) เริ่มจากการบดใบสบู่ดำน้ำหนัก 700-800 มิลลิกรัม ให้ละเอียดโดยใช้ครก กระเบื้องที่แช่เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย CTAB (ประกอบด้วย 2% hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% polyvinylpyrrolidone, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA และ 2 mM NaCl) เขย่าผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย CHISAM (ประกอบด้วย chloroform และ isoamyl alcohol, 24:1) ลงไป ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เขย่าผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใส (supernatant) และเติมสารละลาย 10 M LiCl ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย SSTE (ประกอบด้วย 1 M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย CHISAM เขย่าผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งตะกอนและนำส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol และปั่นตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสทิ้งไป จากนั้นทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียม cDNA ของยีน curcun precursor จากใบสบู่ดำ โดยวิธี Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำการสังเคราะห์ cDNA ของยีน curcin precursor ด้วยชุดน้ำยา RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Inc., Canada) โดยใช้ mRNA ที่สกัดจากสปูดำเป็นแม่แบบ แล้วเพิ่มจำนวน cDNA ของยีน curcin precursor ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจาก cDNA ของเคอร์ซินในฐานข้อมูล (Accession number AY069946, AF469003 and AY435214) forward primer: 5'-ATGAAAGGTGGCAAGATGAACC-3' และ reverse primer: 5'-T(GC)AGACTTTGTA(AT)TTGACTGCATT C-3' ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ขนาดประมาณ 882 base pairs (bp) ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย cDNA ที่เตรียมได้จากสปูดำปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม, 200 μ M ของแต่ละ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP, 1 unit Taq DNA polymerase (Promega, USA), 20 pmole ของแต่ละ primers, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂ และ 0.1% Triton x-100 เริ่มทำปฏิกิริยา PCR โดยแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกัน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มจำนวนยีน curcin precursor โดยทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โดยปฏิกิริยา รอบสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การโคลนยีน curcin precursor จาก cDNA เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α

ทำการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 882 bp กับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T โดยใช้เอนไซม์ Ligase (InsTAclone™ PCR Cloning Kit, Fermentas) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชื่อ pTZPC แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock ทำการคัดเลือกทรานส์ฟอร์มแมนส์ หรือโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTZPC บนอาหารชนิดแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่มียาแอมพิซิลลิน (ampicillin) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ทรานส์ฟอร์มแมนส์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดพลาสมิด โดยชุดน้ำยา GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Inc., USA) นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีขนาดดีเอ็นเอขนาด 882 bp ไปหาลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นจัดเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน curcin precursor จากไบตันสปูดำสายพันธุ์ KUBP 78 ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (accession number FJ357424)

การโคลนยีน mature curcin และสังเคราะห์โปรตีนเคอร์ซินในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)

ทำการเพิ่มปริมาณยีนเคอร์ซินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTZPC ที่มียีน curcin precursor โดยออกแบบไพรเมอร์ forward primer: 5'-CGGAATTCTAAGTAGGAGGCATTAATACATATGAGG GAAATAGTTTGTCCATTC-3' ให้มีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI (ขีดเส้นใต้) ตรงกับ start codon และ reverse primer: 5'-TAATTCTAGAAGCTTGAGCTCGGTACCGGATCCTCA GACTTTGTATTTGACTGGATTTC-3' ให้มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII (ขีดเส้นใต้) ใกล้กับ stop codon ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 864 bp ในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ pTZPC ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม, 200 μ M ของแต่ละ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP, 1 unit Taq DNA polymerase (Promega, USA), 20 pmole ของแต่ละ primers, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂ และ 0.1% Triton x-100 หลังจากแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มจำนวนยีน mature curcin โดยการทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และเวกเตอร์ pET-17b ที่ตัดด้วยเอนไซม์ NdeI และ HindIII มาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันโดยใช้เอนไซม์ Ligase (InsTAclone™ PCR Cloning Kit, Fermentas) ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETFCM ที่มียีน mature curcin แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat shock ทำการคัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารชนิดแข็ง LB agar ที่มียาแอมพิซิลลิน เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ทรานส์ฟอร์มแมนส์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดโดยชุดน้ำยา GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Inc., USA) แล้วย่อยพลาสมิดที่สกัดได้ นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

NdeI และ *HindIII* หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETFCM จากโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mature curcin ถูกต้อง แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) ด้วยวิธี heat shock หลังจากนั้นคัดเลือกโคลนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาแอมพิซิลลิน เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ A_{600} ที่ 0.6-0.8 แล้วชักนำให้เซลล์แบคทีเรียผลิตโปรตีนด้วย 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) เก็บเซลล์ที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 18 ชั่วโมง นำตัวอย่างโปรตีนจากเซลล์มาวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's Method (Lowry et al., 1951) และหาระดับการสารถออกของโปรตีนเคอร์ซิน และน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 โดยเปรียบเทียบขนาดกับโปรตีนมาตรฐาน

การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซินให้บริสุทธิ์ด้วยเมมเบรนคัดกรองโมเลกุล (membrane with molecular weight cut off)

นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pETFCM มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้นี้ไปเจือจาง 1:100 ในอาหารเหลว LB ที่มียาแอมพิซิลลิน เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ A_{600} ที่ 0.6-0.8 แล้วชักนำด้วย 1 mM IPTG นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทั้งหมดนำไปปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์ที่ได้มา 3 กรัม แล้วเติม 6 มิลลิลิตร ของ Buffer A (20 mM Potassium Phosphate Buffer pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT, 20% glycerol, 200 mM KCl และเอนไซม์ lysozyme 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำเซลล์ไปปั่นเก็บส่วนใส ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านลงในเมมเบรนคัดกรองโมเลกุลขนาด 50 กิโลดาลตัน (GE Healthcare, Bio-Science, USA) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนสารละลายที่ผ่านเมมเบรนคัดกรองมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's Method และนำไปตรวจสอบหาน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนเคอร์ซินด้วยวิธี SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 โดยเปรียบเทียบขนาดกับโปรตีนมาตรฐาน

การตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรตีนเคอร์ซินด้วยเทคนิค Mass spectrometry

การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF mass spectrometry) ทำโดยการผสมสารละลาย matrix (10 มิลลิกรัม ของ sinapinic acid ละลายในสารละลาย 0.1% trifluoroacetic acid/50% acetonitrile) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซินที่ทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบน MTP 384 ground steel plate (Bruker Daltonik GmbH Bremen, Germany) ที่งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์มวลของโปรตีนเคอร์ซินด้วยเครื่อง Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH Bremen, Germany) โดยใช้เปปไทด์และโปรตีนมาตรฐาน (ProteoMass™ Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit, Sigma, USA)

การตรวจสอบและวิเคราะห์โปรตีนเคอร์ซินด้วยเทคนิค In gel digestion และ Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)

นำแถบโปรตีนเคอร์ซินจาก 12% SDS-PAGE มาเติม 100% acetonitrile (ACN) ที่ส่วนใส แล้วเติม 10 mM DTT ใน 10 mM ammonium bicarbonate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 100 mM iodoacetamide (IAA) ใน 10 mM ammonium bicarbonate วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกำจัด DTT และ IAA ออกจากก้อนเจลด้วยการเติม 100% acetonitrile เมื่อดูดสารละลายนอกก้อนเจลทิ้ง แล้วย่อยโปรตีนภายในก้อนเจลด้วยสารละลายทริปซิน (10 ng/ μ l trypsin ใน 50% ACN/10 mM ammonium bicarbonate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำเปปไทด์มา

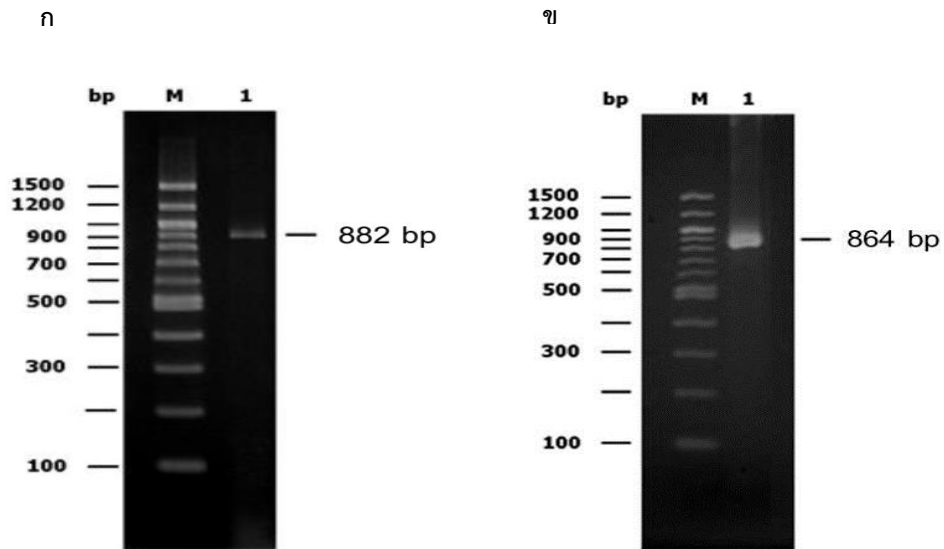
วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS (HCT Ultra PTM Discovery System, Bruker Daltonik, Germany) แล้วระบุชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรม Mascot (Matrix Science, London, UK; (<http://www.matrixscience.com>))

ผลการวิจัยและวิจารณ์

สบูดำเป็นพืชที่มีแหล่งแพร่กระจายในแถบเขตร้อนหรือในป่าดิบชื้นหรือในพื้นที่แนวศูนย์สูตร อเมริกาใต้ อินเดีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย ปัจจุบันมีการปลูกสบูดำในทุกภาคของประเทศไทย ต้นสบูดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง พืชของสบูดำอยู่ในเมล็ดซึ่งพบว่ามีโปรตีนที่เป็นพิษคือ เคอร์ซิน (Felke, 1914) จากการศึกษาพบว่า เคอร์ซินเป็นพิษต่อสัตว์และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระบบเซลล์อิสระ (cell-free system) แต่มีฤทธิ์น้อยกว่า ricin และ abrin ประมาณ 1,000 เท่า (Stirpe et al., 1976) เคอร์ซินจัดอยู่ในกลุ่มของ RIP type I ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีขนาดมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 28-35 กิโลดาลตัน และมีค่า pI อยู่ระหว่าง 8-10 โดยมีคุณสมบัติเป็น rRNA N-glycosidase ที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Barbieri et al., 1993) จากฐานข้อมูล GenBank พบว่ามียีนเคอร์ซินมากกว่า 10 ยีน ที่ได้มาจากส่วนต่างๆ ของสบูดำ และมีลำดับกรดอะมิโนที่อนุมานเป็นโปรตีนเคอร์ซิน จากข้อมูลนี้สามารถแบ่งกลุ่มเคอร์ซินเป็น 2 ชนิด คือ curcin type I มี precursor protein เป็น 293 กรดอะมิโน และมี mature protein ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน แยกได้จากเมล็ดสบูดำ (He et al., 2011; King et al., 2011) ส่วน curcin type II (หรือ curcin L) มี precursor protein เป็น 309 กรดอะมิโน และมี mature protein ขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งส่วนใหญ่จะพบได้ในใบและมีการกระตุ้นในสภาวะเครียด (Qin et al., 2005; Qin et al., 2010) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาวิจัยของ Zhang และคณะ (2017) พบ curcin C ซึ่งเป็นโปรตีน RIP type I ตัวใหม่ สกัดได้จากใบเลี้ยงหลังการงอก (post-germinating cotyledon) ของสบูดำ มีน้ำหนักโมเลกุล 31.398 กิโลดาลตัน ค่า pI 7.12 และยังไม่แน่นอนว่า curcin C นี้ จะเหมือนกับเคอร์ซินที่เป็นโปรตีนตัวอื่นๆ ที่อยู่ในกลุ่ม RIP type I จากเอนโดสเปิร์ม (endospERM) อาจจะต้องมีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติต่างๆ เพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัด mRNA จากใบสบูดำสายพันธุ์ KUBP 78 แล้วนำไปเตรียม cDNA ด้วยวิธี RT-PCR หลังจากนั้นทำการโคลนยีน curcin precursor ขนาด 882 bp (ภาพที่ 1ก) โดยเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pTZ57R/T แล้วหาลำดับกรดนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนนี้ พบว่ากรดอะมิโนที่อนุมาน (deduced amino acids) ได้ 293 กรดอะมิโน ซึ่งมี 28 กรดอะมิโน เป็น leader peptide ที่ปลาย N-terminal และ 265 กรดอะมิโน เป็นส่วนของ mature protein ของเคอร์ซิน (ภาพที่ 2) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ curcin precursor นี้ได้ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank (Accession Number FJ357424) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเคอร์ซินในฐานข้อมูล GenBank ของยีนเคอร์ซิน (Accession Number AAR08395, ABZ04128, ABW17545, AEA72440 และ AJW31110) พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนเคอร์ซินจากสบูดำสายพันธุ์อื่นถึง 95.2% (ภาพที่ 3) ที่น่าสังเกตคือ โปรตีน curcin precursor จากใบสบูดำสายพันธุ์ KUBP 78 ไม่มีลำดับกรดอะมิโน SMEEIIIFNDQKWLPLWL ที่ปลาย C-terminal (ภาพที่ 3) ทำให้มีขนาดเล็กกว่าโปรตีนเคอร์ซินอื่นประมาณ 2049.37 ดาลตัน ประจุมรวมของโปรตีนเปลี่ยนไป และมีผลต่อการขดม้วนตัวของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งอาจจะทำให้มีหรือไม่มีผลกระทบต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ ต้องนำโปรตีนเคอร์ซินที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ต่อไป

ดังนั้นเพื่อเป็นการผลิตโปรตีนเคอร์ซินให้เพียงพอในปริมาณมาก สำหรับใช้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อกำจัดส่วน leading peptide ที่ปลาย N-terminal ของโปรตีน curcin precursor และเพื่อความสะดวกในการโคลนยีน จึงมีการเพิ่มตำแหน่ง ribosome binding site (RBS), *NdeI* restriction site, *HindIII* restriction site, start codon และ stop codon ด้วย หลังจากทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชิ้นยีน curcin precursor ในพลาสมิด pTZPC เป็นสายดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาพที่ 4) ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 864 bp (ภาพที่ 1ข) แล้วนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pET-17b ได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pETFCM และนำเข้าสู่เซลล์เพื่อสังเคราะห์โปรตีน mature curcin ใน *E. coli* BL21(DE3) พบว่าหลังจากเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 37 องศา



ภาพที่ 1 (ก) RT-PCR product (882 bp) ของขี้ยืน curcin precursor จากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 (ข) PCR product (864 bp) ของขี้ยืน mature curcin ซึ่งประกอบด้วย Ribosome Binding Site (RBS) และตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *HindIII* เพื่อโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้แสดงออก แถว M: 100 bp DNA ladder marker

ATGAAAGGTGGCAAGATGAACCTCTCTATTATGGTGGCTGCATGGTTTGGCOGGAGTTGTATTATATTC
 M K G G K M N L S I M V A A W F C R S C I I F
GGATGGGCATCGGCTAGGGAAATAGTTTGTCCATTCTCATCAAACCAAACTACAAAGCTGGTTCCACT
 G W A S A R E I V C P F S S N Q N Y K A G S T
 CCAACTTTAGCCATTACTTATGACGCTACTACTGATAAGAAAACTACGCCAGTTCATTGAAGATCTA
 P T L A I T Y D A T T D K K N Y A Q F I E D L
 AGAGAAGCATTGACTTCAGTTATTTAAGCCATAAAATACCAGTCTTACGGGCCACGGTTGCTGCAAT
 R E A F D F S Y L S H K I P V L R A T V A A N
 CAGAAATTTATTGTAGCCAAAGTCATAAATCTGGGGACATAGAAGTATCAGTAGGATTAACGTCATT
 Q K F I V A K V I N S G D I E V S V G L N V I
 AATGCATATCTAGTGGCTTATAAGGTAGGAAGTAATTCCTATTTCTTAAACGATTCCGGAATCTTTGGCT
 N A Y L V A Y K V G S N S Y F F N D S E S L A
 GATGCAAAAAAAAAATCTTTTCACAGACCAAACCAACAACACTAGCATTACTGGTAGCTATGCAGAT
 D A K K N L F T D T N Q Q T L A F T G S Y A D
 TTTGAATCTAGGGCAAAGTTACATAGAGAGGAAGTGGATTTAGGAGTGGTGGCATTGGATAATTACGTA
 F E S R A K L H R E E V D L G V V A L D N Y V
 TATACACTTGAAAAAGTTCTCAGCCAGCAGACATGCTAAACCTCTAGTTGGTTTTATCGAAATGGTT
 Y T L E K S S Q P A D I A K P L V G F I E M V
 CCAGAGGCAGCAAGATTCAAATATATTGAGAAAAAATATCAACTCAAATTAGCAAAACCTTTAGGCCG
 P E A A R F K Y I E K K I S T Q I S K T F R P
 CGTGGTGACATAATTAGCCTTGAGAACAACCTGGGGAGACCTCTCTTATCAAATACAGAAATCTGTTGAT
 R G D I I S L E N N W G D L S Y Q I Q K S V D
 GATGTATTTCTGAAGCCAGTTCAATTGCAACGTGAAAACCTATACCAATATCCTAGTGAGCAATGTCACC
 D V F L K P V Q L Q R E N Y T N I L V S N V T
 CAAGTAAAAGGTCTCACGGGAGTCTTGTGAATCCAGTCAAATACAAAGTCTGA
 Q V R G L T G V L L N P V K Y R V *

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซึ้นยีน curcin precursor จากใบสับุดำสายพันธุ์ KUBP 78 (GenBank no. FJ357424) และ ลำดับกรดอะมิโนที่อนุมานได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย 28 กรดอะมิโนแรกที่ปลาย N-terminal (ตัวหนาและขีดเส้นใต้) เป็น leader peptide และอีก 265 กรดอะมิโนที่เหลือเป็นส่วนของ mature curcin สำหรับเครื่องหมาย * แสดงตำแหน่ง stop codon

FJ357424	MKGGKMNLSIMVAAWFCRSCIIIFGWASAREIVCFSSNQNYKAGSTPTLAITYDATTDKK	60
AAR08395	MKGGKMNLSIMVAAWFCWSSIIIFGWASAREIVCFSSNQNYKAGSTPTLVITYDATTDKK	60
ABZ04128	MKGGKMNLSIMVAAWFCWSSIIIFGWASAREIVCFSSNQNYKAGSTPTLAITYDATTDKK	60
ABW17545	MKGGKMNLSIMVAAWFCWSSIIIFGWASAREIVCFSSNQNYKAGSTPTLVITYDATTDKK	60
AEA72440	MKGGKMNLSIMVAAWFCWSSIIIFGWASAREIVCFSSNQNYKAGSTPTLTITYDATTDKK	60
AJW31110	MKGGKMNLSIMVAAWFCWSSIIIFGWASAREIVCFSSNQNYKAGSTPTLTITYDAAADKK ***** * .***** .***** .***** .:***:***	60
FJ357424	NYAQFIEDLREAFDFSYLSHKIPVLRATVAANQKFIVAKVINSGDIEVSVGLNVINAYLV	120
AAR08395	NYAQFIEDLREAFDFSYLSHKIPVLRATVAANQKFIVAKVINSGDIEVSVGLNVINAYLV	120
ABZ04128	NYAQFIEDLREAFDFSYLSHKIPVLRATVAANQKFIVAKVINSGDIEVSVGLNVINAYLV	120
ABW17545	NYAQFIEDLREAFDFSYLSHKIPVLRATVAANQKFIVAKVINSGDIEVSVGLNVINAYLV	120
AEA72440	NYAQFIKDLREAFGFSYSSEIIPVLRATVAANQKFIVAKVINVANLEVSLGLNVVNAVYLV	120
AJW31110	NYANFIRDLREAFGFSYSSEIIPVLRATVAANQKFIVAKVINVANLEVSLGLNVVNAVYLV ***.*.*****.*** **.******.***.***.***.***.***.***	120
FJ357424	AYKVGNSYFFNDESESLADAKKNLFTDTNQQTLAFTGSYADSFESRAKLRHREVDLGVVAL	180
AAR08395	AYKVGNSYFFNDESESLADAKKNLFTDTNQQTLAFTGSYADSFESRAKLRHREVDLGVVAL	180
ABZ04128	AYKVGNSYFFNDESESLADAKKNLFTDTNQQTLAFTGSYADSFESRAKLRHREVDLGVVAL	180
ABW17545	AYKVGNSYFFNDESESLADAKKNLFTDTNQQTLAFTGSYADSFESRAKLRHREVDLGVVAL	180
AEA72440	AYKVGGSYFFNDESESLADAKKYLFTDTKQQTLSFTGSYADFLSRANVHREDVDLGVVAL	180
AJW31110	AYKAGGTSYFFNDESESLADAKKYLFTDTKQQTLSFTGSYADFLSRANVHREDVDLGVVAL ***.*.*****.*****.*****.*****.*****.***.***.***.***.***	180
FJ357424	DNYVYTLEKSSQPADIAPLVGFIEMVPEAARFKYIEKKISTQISKTFRPRGDIISLENN	240
AAR08395	DNYVYTLEKSSQPADIAPLVGFIEMVPEAARFKYIEKKISTQISKTFRPRGDIISLENN	240
ABZ04128	DNYVYTLEKSSQPADIAPLVGFIEMVPEAARFKYIEKKISTQISKTFRPRGDIISLENN	240
ABW17545	DNYVYTLEKSSQPADIAPLVGFIEMVPEAARFKYIEKKISTQISKTFRPRGDIISLENN	240
AEA72440	DNYIYTLEKSSQPADIAPLVGFIEMVPEAARFKYIEKKVLTQISKTFRPRGDIISLENN	240
AJW31110	DNYIYILHKSSQPADIAPLVGFIEMVPEAARFKYIEKKVLTQISKTFRPRGDIISLENN ***.*.*****.*****.*****.*****.*****.***.***.***.***.***	240
FJ357424	WGDLSYQIQKSVDDVFLKPVQLQRENYTNILVNNVTQVKGLTGVLNPNVYKVV-----	293
AAR08395	WGDLSYQIQKSVDDVFLKPVQLQRENYTNILVNNVTQVKGLMGVLLNAVNYKVSMEEIIIF	300
ABZ04128	WGDLSYQIQKSVDDVFLKPVQLQRENYTNILVNNVTQVKGLMGVLLNAVNYKVSMEEIIIF	300
ABW17545	WGDLSYQIQKSVDDVFLKPVQLQRENYTNILVNNVTQVKGLMGVLLNAVNYKVSMEEIIIF	300
AEA72440	WGDLSYQIQKSVNGVFLKPVQLQRENYTNILVNNVTQVTGLMGVLLNAVNYKVSMEEIIIF	300
AJW31110	WGDLSYQIQKSVNGIFLKPVQLQRENYTNILVNNVTQVTGLMGVLLNAVNYKVSMEEIIIF *****.***.*****.***.*****.***.*****.***.***.***.***	300
FJ357424	-----	293
AAR08395	NDQKWLPL	309
ABZ04128	NDQKWLPL	309
ABW17545	NDQKWLPL	309
AEA72440	NYQKWLPL	309
AJW31110	NYQKWLPL	309

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน curcin precursor จากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 (FJ357424) กับโปรตีน curcin precursor จากสบู่ดำสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ AAR08395, ABZ04128, ABW17545, AEA72440 และ AJW31110 (เครื่องหมาย * แสดงกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกัน ส่วนเครื่องหมาย . และ : แสดงกรดอะมิโนที่มีความคล้ายกัน)

RBS *Nde* I site

CGGAATTCTAAGTAGGAGCATTAATCATATGAGGGAAATAGTTTGCCATTCTCATCAAACCAAAC
M R E I V C P F S S N Q N

TACAAAGCTGGTTCCACTCCAACCTTTAGCCATTACTTATGACGCTACTACTGATAAGAAAACTACGCC
Y K A G S T P T L A I T Y D A T T D K K N Y A

CAGTTCATTGAAGATCTAAGAGAAGCATTGACTTCAGTTATTTAAGCCATAAAAATACCAGTCTTACGG
Q F I E D L R E A F D F S Y L S H K I P V L R

GCCACGGTTGCTGCAAATCAGAAATTTATTGTAGCCAAAGTCATAAATCTGGGGACATAGAAGTATCA
A T V A A N Q K F I V A K V I N S G D I E V S

GTAGGATTAACCGTCATTAATGCATATCTAGTGGCTTATAAGGTAGGAAGTAATTCCTATTTCTTTAAC
V G L N V I N A Y L V A Y K V G S N S Y F F N

GATTCGGAATCTTTGGCTGATGCAAAAAAATCTTTTCACAGACACAAACCAACAAACTAGCATT
D S E S L A D A K K N L F T D T N Q Q T L A F

ACTGGTAGCTATGCAGATTTTGAATCTAGGGCAAAGTTACATAGAGAGGAAGTGGATTTAGGAGTGGTG
T G S Y A D F E S R A K L H R E E V D L G V V

GCATTGGATAATTACGTATATACACTTGAAAAAGTTCTCAGCCAGCAGACATTGCTAAACCTCTAGTT
A L D N Y V Y T L E K S S Q P A D I A K P L V

GGTTTTATCGAAATGGTTCCAGAGGCAGCAAGATTCAAATATATTGAGAAAAAATATCAACTCAAAT
G F I E M V P E A A R F K Y I E K K I S T Q I

AGCAAAACCTTTAGGCCGCGTGGTGACATAATTAGCCTTGAGAACAACCTGGGGAGACCTCTCTTATCAA
S K T F R P R G D I I S L E N N W G D L S Y Q

ATACAGAAATCTGTTGATGATGTATTCTGAAGCCAGTTCAATTGCAACGTGAAAACATACCAATATC
I Q K S V D D V F L K P V Q L Q R E N Y T N I

CTAGTGAGCAATGTCACCCAAGTAAAAGGTCTCACGGGAGTCTTGTGAATCCAGTCAAATACAAAGTC
L V S N V T Q V K G L T G V L L N P V K Y K V

TGAGGATCCGGTACCGAGCTCAAGCTTCTAGAATTA
*

Hind III site

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนยีน mature curcin จากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 ซึ่งประกอบด้วย Ribosome Binding Site (RBS) รวมถึงตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Hind* III เพื่อโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้แสดงออก อีกทั้งยังแสดงลำดับกรดอะมิโนที่อนุมานได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเครื่องหมาย * แสดงตำแหน่ง stop codon

เซลล์เซียส ด้วย 1 mM IPTG ได้โปรตีนเคอร์ซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน และมีการสร้างโปรตีนในระดับปริมาณมากที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากการชักนำด้วย 1 mM IPTG (ภาพที่ 5) ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่เป็น inclusion bodies (ภาพที่ 6)

เนื่องจากการหามวลโมเลกุลของเคอร์ซินด้วยวิธี SDS-PAGE เป็นการหา subunit molecular weight โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ค่าที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำน้อยกว่าการหามวลโมเลกุลของเคอร์ซินโดยวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งเป็นการหามวลโมเลกุลที่พบจริงในธรรมชาติ (native molecular mass) อีกทั้งมวลโมเลกุลที่คำนวณได้จาก SDS-PAGE เป็นการทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วยสาร sodium dodecyl sulfate มีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป และประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นลบเหมือนกันหมด ดังนั้นหลังจากทำบริสุทธิ์โปรตีนเคอร์ซินด้วยการผ่านเมมเบรนคัดกรองโมเลกุล และแยกโปรตีนตามขนาดด้วย 12% SDS-PAGE (ภาพที่ 7) แล้ว จึงจะโปรตีนจากแผ่นเจลเพื่อนำไปหามวลโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง (Hillenkamp et al., 1991) พบว่ามี 2 peaks โดย peak ที่เป็นโปรตีนเคอร์ซินมีมวลโมเลกุลที่เท่ากับ 28978.145 ดาลตัน หรือประมาณ 28.98 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 8) เป็นค่ามวลโมเลกุลใกล้เคียงกับผลที่ได้จาก 12% SDS-PAGE คือประมาณ 30 กิโลดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจากลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool ก็มีค่าประมาณ 29.8 กิโลดาลตันเช่นกัน

นอกจากนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าโปรตีนเคอร์ซินที่ได้จากการเหนี่ยวนำ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วย 1 mM IPTG เป็นโปรตีนเคอร์ซิน และอยู่ในรูป inclusion bodies จึงได้วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของแถบโปรตีนดังกล่าวด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นการย่อยแถบของโปรตีนเคอร์ซินที่แยกได้จาก 12% SDS-PAGE ด้วยเอนไซม์ทริปซิน เพื่อให้ได้เป็นสายเปปไทด์สายสั้นๆ หลังจากนั้นจึงนำสายเปปไทด์ไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน โดยเทคนิค LC-MS/MS และใช้โปรแกรม MASCOT ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูลพืช (Green

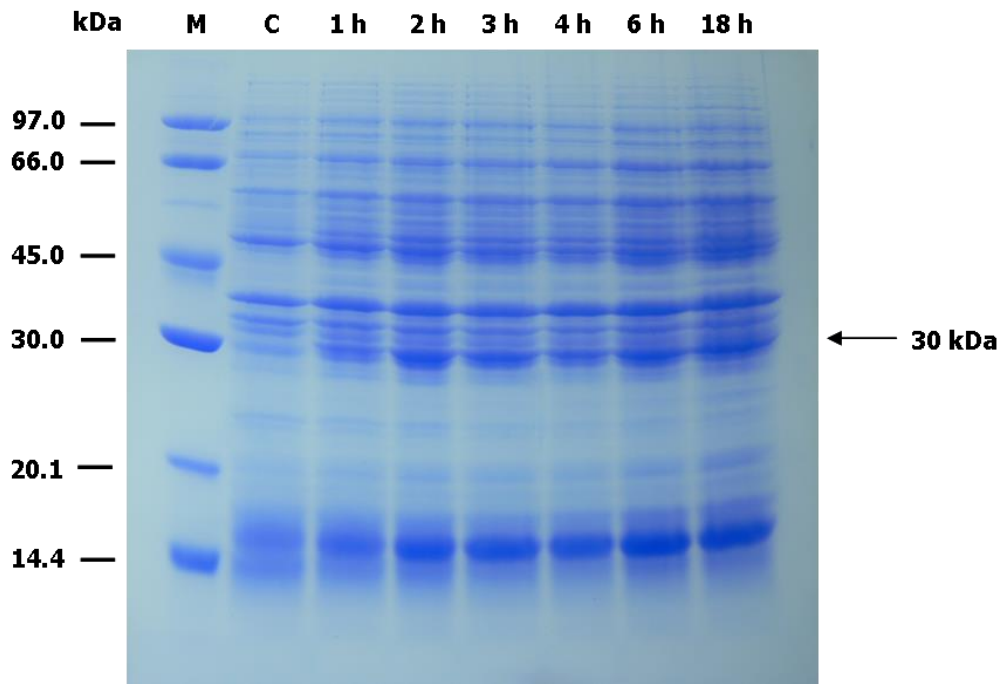
plant database) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของสายเปปไทด์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซิน มีลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกันกับลำดับกรดอะมิโนของเคอร์ซิน (ภาพที่ 9) เคอร์ซินเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านเซลล์มะเร็ง และรักษาโรคได้หลายชนิด การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนเคอร์ซิน ทำให้ได้โปรตีนเคอร์ซินที่มีความแตกต่างกันที่ลำดับกรดอะมิโน ซึ่งอาจทำให้ได้โปรตีนเคอร์ซินที่มีสมบัติหลากหลายมากขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยในด้านต่างๆ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีน และผลิตโปรตีนเคอร์ซินจากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของประเทศไทย และให้ผลผลิตน้ำมันสบู่ดำในปริมาณมาก เพื่อที่จะได้นำโปรตีนเคอร์ซินนี้มาศึกษาคุณสมบัติและนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

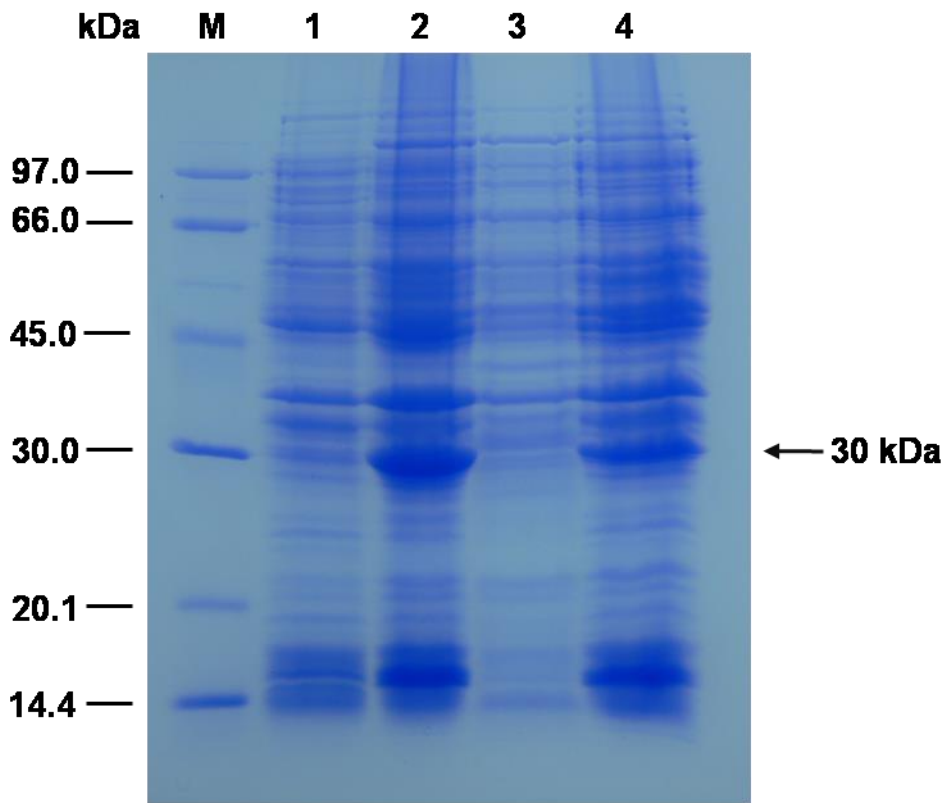
เคอร์ซินเป็นสารพิษที่พบในสบู่ดำ การวิจัยครั้งนี้สามารถโคลนยีน mature curcin จากใบสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78 และทำให้มีการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) หลังจากชักนำด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้โปรตีนเคอร์ซินที่ประกอบด้วย 265 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 28.98 กิโลดาลตัน โดยวิเคราะห์จาก MALDI-TOF MS โปรตีนที่แสดงออกมาส่วนใหญ่เป็น inclusion bodies ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบว่าเป็นโปรตีนเคอร์ซินที่สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

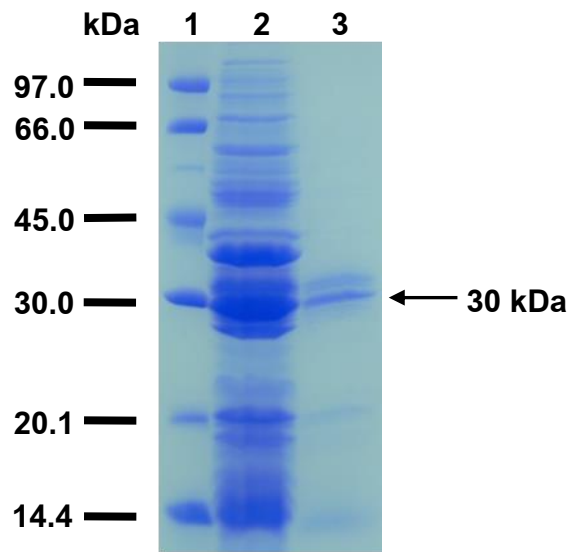
ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรามคำแหงและสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ นายพงศ์พัฒน์ บุญสัตย์ นางสาววิลาสินี มูลโคตร และนางจันทิมา จเรสิทธิกุลชัย ที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัย ขอขอบคุณนางสุนันทา รัตนาโก และนางสาวอมรรัตน์ พรหมบุญ ที่ให้การสนับสนุนและคำแนะนำในการวิจัย



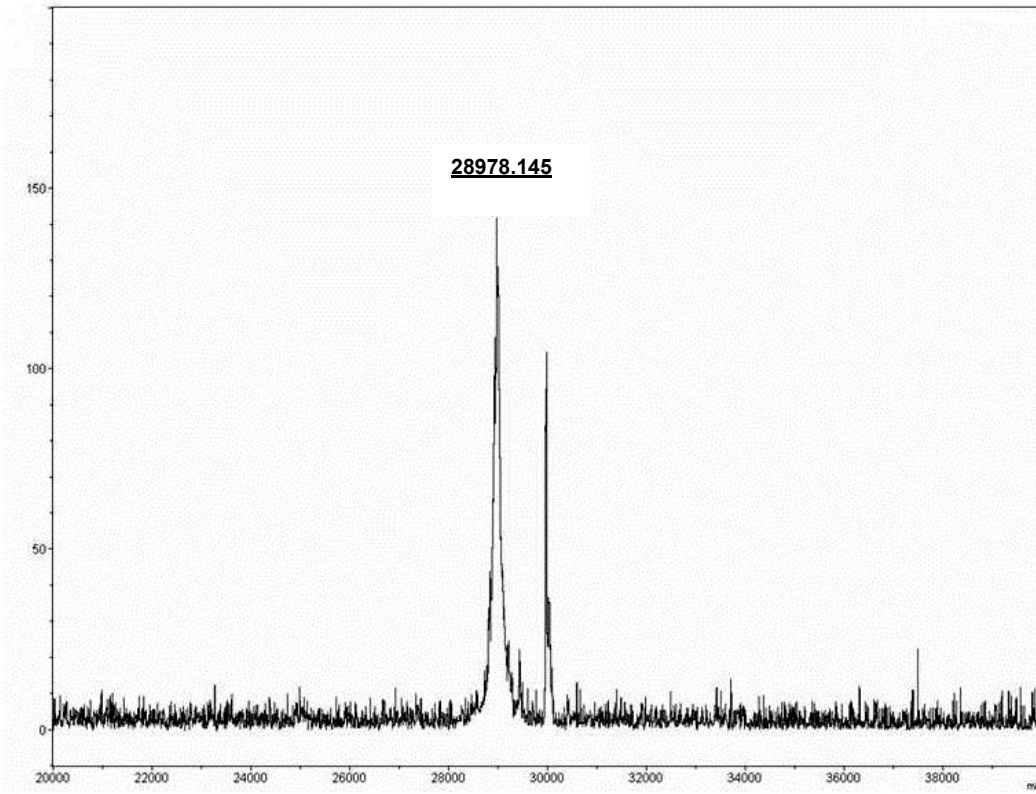
ภาพที่ 5 12% SDS-PAGE ของโปรตีน mature curcin ที่แสดงออก (pETFCM) ใน *E. coli* BL21(DE3) เก็บตัวอย่างก่อนชักนำด้วย 1 mM IPTG (แถว C: Control) และหลังชักนำที่ 1, 2, 3, 4, 6 และ 18 ชั่วโมง น้ำหนักโมเลกุลมีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน (kDa) (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (แถว M)



ภาพที่ 6 12% SDS-PAGE ของโปรตีน mature curcin ที่แสดงออกจากโคลน pETF_{CM} แถว M: ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน แถว 1: ตะกอนของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETF_{CM} (ก่อนชักนำด้วย 1 mM IPTG) แถว 2: ตะกอนเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETF_{CM} (หลังชักนำด้วย 1 mM IPTG) แถว 3: ส่วนใสของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETF_{CM} (หลังชักนำด้วย 1 mM IPTG) แถว 4: Inclusion bodies ของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pETF_{CM} (หลังชักนำด้วย 1 mM IPTG)



ภาพที่ 7 12% SDS-PAGE ของสารละลายส่วนใสรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซิน เหนียวนำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยการชักนำด้วย 1 mM IPTG นำมาแยกผ่านเมมเบรนคัดกรองโมเลกุลขนาด 50 กิโลดาลตัน และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue แถว 1: ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน แถว 2: สารละลายส่วนใสรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซิน แถว 3: รีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซินที่แยกผ่านเมมเบรนคัดกรองโมเลกุล



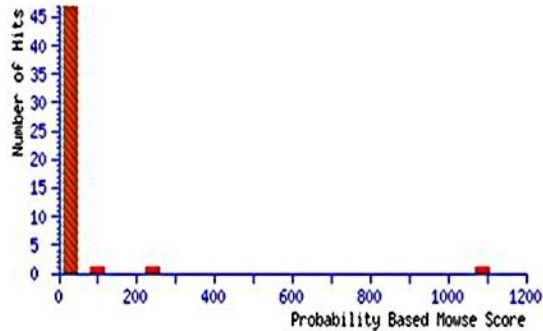
ภาพที่ 8 แสดงมวลโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซินที่มีขนาด 28978.145 ดาลตัน โดยวิธี MALDI-TOF MS

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores > 46 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Protein hits : [gi|166947688](#) curcin [Jatropha curcas]
[gi|19338708](#) curcin precursor [Jatropha curcas]
[gi|18091793](#) curcin precursor [Jatropha curcas]
[gi|147781494](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
[gi|15240246](#) unknown protein [Arabidopsis thaliana]
[gi|167997998](#) predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
[gi|19310568](#) putative DNA-binding protein [Arabidopsis thaliana]
[gi|187763149](#) hypothetical chloroplast Rf1 [Welwitschia mirabilis]
[gi|147860272](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
[gi|147794041](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
[gi|22797818](#) maturase [Valeriana hirtella]
[gi|116781077](#) unknown [Picea sitchensis]
[gi|171768841](#) maturase K [Rhododendron lanigerum]
[gi|147767270](#) hypothetical protein [Vitis vinifera]
[gi|168060524](#) predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
[gi|38567788](#) B1340F09.12 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
[gi|168062617](#) predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
[gi|224096155](#) predicted protein [Populus trichocarpa]
[gi|145340829](#) predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]
[gi|255614689](#) conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
[gi|156598263](#) hypothetical protein RF2 [Ginkgo biloba]
[gi|168036742](#) predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens]
[gi|224088786](#) predicted protein [Populus trichocarpa]

ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเคอร์ซินจาก inclusion bodies โดยใช้ LC-MS/MS และโปรแกรม MASCOT อำนวยผลโดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนอื่นในฐานข้อมูลพืช (Green plant) ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI)

เอกสารอ้างอิง

- Abdelgader, M.G.M., E.A. Suleiman, and S.I. Ali. 2019. Study of *Jatropha curcas* as antifungal agent. *International Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research*. 5(5), 4202-4210.
- Amaugo, G.O., and S.O. Emosairue. 2003. The efficacy of some indigenous medical plant extracts for the control of upland rice stem borers in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2(3), 121-127.
- Barbieri, L., M.G. Battelli, and F. Stirpe. 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. 1154(3-4), 237-282.
- Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11(2), 113-116.
- Chavan, R., P. Chaturvedi, and A. Chowdhary. 2015. Anti-influenza potential of alkaloidal molecules of *Jatropha curcas* leaves. *International Journal Pharmaceutical Sciences Research*. 6(11), 4705-4711.
- Dahake, R., S. Roy, D. Patil, S. Rajopadhye, A. Chowdhary, and R.A. Deshmukh. 2013. Potential anti-HIV activity of *Jatropha curcas* Linn. leaf extracts. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals*. 5(7), 160-165.
- Desvoyes, B., J.L. Poyet, J.L. Schlick, P. Adami, M. Jouvenot, and P. Dulieu. 1997. Identification of a biological inactive complex form of pokeweed antiviral protein. *FEBS Letters*. 410(2-3), 303-308.
- Endo, Y., K. Mitsui, M. Motizuki, and K. Tsurugi. 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosome. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *Journal of Biological Chemistry*. 262(12), 5908-5912.
- Felke, J. 1914. The poisonous principles of the seeds of *Jatropha curcas* Linn. *Landw Versuchsw*. 82(42), 7-30.
- Frankel, A.E., L.L. Houston, B.F. Issell, and G. Fathman. 1986. Prospects for immunotoxin therapy in cancer. *Annual Review of Medicine*. 37(1), 125-142.
- He, W., A.J. King, M.A. Khan, J.A. Cuevas, D. Ramiaramanana, and I.A. Graham. 2011. Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49(10), 1183-1190.
- Hillenkamp, F., M. Karas, R.C. Beavis, and B.T. Chait. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry*. 63(24), 1193A-1203A.
- Ingle, K.P., A.G. Deshmukh, D.A. Padole, M.S. Dudhare, M. Pradip, V.C.K. Moharil, and D. Raghunathrao. 2017. Bioassay guided fractionation of antifungal activity of *Jatropha curcas*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(6), 2147-2154.
- Jaramillo-Quintero, L.P., A. Contis Montes de Oca, A. Romero Rojas, S. Rojas-Hernández, R. Campos-Rodríguez, and A.L. Martínez-Ayala. 2015. Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against Her2 receptor on tumor cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 79(6), 896-906.
- King, A.J., Y. Li, and I.A. Graham. 2011. Profiling the developing *Jatropha curcas* L. seed

- transcriptome by pyrosequencing. *BioEnergy Research*. 4(3), 211-221.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Lin, J., Y. Chen, Y. Xu, F. Yan, L. Tang, and F. Chen. 2003a. Cloning and expression of curcin, a ribosome-inactivating protein from the seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Botanica Sinica*. 45(7), 858-863.
- Lin, J., F. Yan, L. Tang, and F. Chen. 2002. Isolation, purification and functional investigation on the N-glycosidase activity of curcin from the seeds of *Jatropha curcas*. *High Technology Letters*. 12(11), 36-40.
- Lin, J., F. Yan, L. Tang, and F. Chen. 2003b. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 24(3), 241-246.
- Logemann, J., G. Jach, H. Tommerup, J. Mundy, and J. Schell. 1992. Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/technology*. 10(3), 305-308.
- Lord, M.J., N.A. Jolliffe, C.J. Marsden, C.S. Pateman, D.C. Smith, R.A. Spooner, P.D. Watson, and L.M. Roberts. 2003. Ricin. Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicological Reviews*. 22(1), 53-64.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1), 265-275.
- Mohamed, M.S., S. Veerananarayan, A.C. Poulouse, Y. Nagaoka, H. Minegishi, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D.S. Kumar. 2014. Type I ribotoxin-curcin conjugated biogenic gold nanoparticles for a multimodel therapeutic approach towards brain cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840(6), 1657-1669.
- Mujumdar, A.M., and A.V. Misar. 2004. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 90(1), 11-15.
- Qin, W., H. Ming-Xing, X. Ying, Z. Xin-Shen, and C. Fang. 2005. Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. *Journal of Biosciences*. 30(3), 351-357.
- Qin, X., C. Shao, P. Hou, J. Gao, N. Lei, L. Jiang, S. Ye, C. Gou, S. Luo, X. Zheng, X. Gu, X. Zhu, Y. Xu, and F. Chen. 2010. Different functions and expression profiles of curcin and curcin-L in *Jatropha curcas* L.. *Zeitschrift fur Naturforschung-Section C Journal of Biosciences*. 65(5-6), 355-362.
- Rippmann, J.F., C.B. Michalowski, D.E. Nelson, and H.J. Bohnert. 1997. Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Molecular Biology*. 35(6), 701-709.
- Song, S.K., Y.H. Choi, Y.H. Moon, S.G. Kim, Y.D. Choi, and J.S. Lee. 2000. Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid, and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*. 43(4), 439-450.
- Songjang, K., and P. Wimolwattanasarn. 2004. Antibacteria activity from the latex of *Jatropha curcas*. *Chiang Mai Journal of Science*. 31(3), 309-312.
- 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 properties and inhibition of protein synthesis in vitro. *Biochemical Journal*. 156(1), 1-6.
- Zhang, Y., Q. Yang, C. Li, M. Ding, X. Lv, C. Tao, H. Yu, F. Chen, and Y. Xu. 2017. Curcin C, a

novel type I ribosome-inactivating
protein from the post-germinating

cotyledons of *Jatropha curcas*. Amino
Acids. 49(9), 1619-1631.