โปรทีโอมิกส์จากเมล็ดมะขามเทศ *Pithecellobium dulce*

นางสาวนฤมล สวัสดิพฤกษา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

PROTEOMICS OF MANILA TAMARIND SEEDS *Pithecellobium dulce*

Miss Narumon Sawasdipuksa

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Thesis Title	PROTEOMICS OF MANILA TAMARIND SEEDS *Pithecellobium dulce*
By	Miss Narumon Sawasdipuksa
Field of Study	Chemistry
Advisor	Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

S. Hannongbua
..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

Sirirat Kokpol
..... Chairman
(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D.)

Polkit Sangvanich
..... Advisor
(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

..... Examiner
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

Thumnoon Nhujak
..... Examiner
(Associate Professor Thumnoon Nhujak, Ph.D.)

Chantragan Phiphobmongkol
..... External Examiner
(Chantragan Phiphobmongkol, Ph.D.)

นฤมล สวัสดิพฤกษา : โปรทิโอมิกส์จากเมล็ดมะขามเทศ *Pithecellobium dulce*.

(PROTEOMICS OF MANILA TAMARIND SEEDS *Pithecellobium dulce*)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช, 114 หน้า.

มะขามเทศ (*Pithecellobium dulce*) จัดเป็นพืชในวงศ์เดียวกับพืชตระกูลถั่วซึ่งเป็นไม้ผลพื้นเมืองอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการโดยเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดมะขามเทศ ด้วยวิธีทางโปรทิโอมิกส์ โดยใช้เทคนิคทางเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบ 2 มิติ และหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนด้วยเทคนิคทางแมสสเปคโทรเมทรี จากแผ่นเจลพบว่าสามารถแยกจุดโปรตีนได้ทั้งหมด 317 จุด โดยโปรตีนจากเมล็ดมะขามเทศส่วนใหญ่ที่มีความเข้มและปริมาณโปรตีนมาก จะแสดงจุดอยู่บริเวณที่เป็นกรดเล็กน้อย และอยู่ในช่วงมวลโมเลกุล 55-97 กิโลดาลตัน บนแผ่นเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบ 2 มิติ ซึ่งจุดของโปรตีนจำนวน 96 จุด ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนาโนลิควิดโครมาโทกราฟีแทนเดมแมสสเปคโทรเมทรี (LC/MS/MS) พบว่า สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ 27 ชนิด และโปรตีนอีก 4 ชนิดจากกลุ่มของโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีนมาก โดยได้จากการนำข้อมูลทางแมสสเปคโทรเมทรีของโปรตีนเหล่านี้ไปสืบค้นกับฐานข้อมูลโปรตีน MASCOT และเปรียบเทียบความเหมือน หรือ ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนบนสายโปรตีนในฐานข้อมูล (MS-BLAST) ตามลำดับ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังสนใจที่จะศึกษาโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจากเมล็ดมะขามเทศ พบว่าสามารถแยกโปรตีนบริสุทธิ์จากเมล็ดมะขามเทศที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 14.4 กิโลดาลตัน ได้จากการสกัดด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น แล้วจึงนำไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคแอนไอออนเอ็กเชนจ์ และเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนบริสุทธ์ ด้วยเทคนิคแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรี และสืบค้นกับฐานข้อมูลโปรตีน MASCOT พบว่าโปรตีนนี้มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน พบว่า มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนคล้ายคลึงกับโปรตีนไลโซไซม์ (lysozyme) จากไข่ขาวของไข่ไก่

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต นฤมล สวัสดิพฤกษา

สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก Wanee แสงวณิช

ปีการศึกษา 2551

4773819523 : MAJOR CHEMISTRY
KEYWORDS : *Pithecellobium dulce*/ SEED PROTEINS/ ANTIFUNGAL PROTEIN/ TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS/ TANDEM MASS SPECTROMETRY

NARUMON SAWASDIPUKSA : PROTEOMICS OF MANILA TAMARIND SEEDS *Pithecellobium dulce*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF POLKIT SANGVANICH, Ph.D., 114 pp.

Pithecellobium dulce Benth. belongs to the Leguminosae family, which contains important components of human diets owing to their high protein content. The present study aimed to identify seed proteins from *Pithecellobium dulce* using a proteome approach by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and tandem mass spectrometry. The 2-DE protein map revealed a total of 317 distinct protein spots, including a cluster proteins located in the acidic region with molecular masses of 55–97 kDa. Ninety-six of the most abundant protein spots were analysed using nano liquid chromatography/tandem mass spectrometry (nano-LC/MS/MS), from which 27 proteins and further four proteins from the highly abundant protein cluster were successfully identified through the query of acquired tandem mass spectral data used in Mascot and MS-driven BLAST homology searches, respectively. Moreover, the biological activity of *Pithecellobium dulce* seed proteins was identified in this research. An antifungal activity protein toward *Macrophomina phaseolina* with a molecular mass of 14.4 kDa was purified using a procedure that involved Tris buffer extraction, ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography, and gel filtration chromatography. The result acquired from tandem mass spectrometry with Mascot database searching shows that this protein has partial amino acid sequences similar to chicken egg white lysozyme.

Department : Chemistry Student's Signature Narumon Sawasdipuksa
Field of Study : Chemistry Advisor's Signature Polkit Sangvanich
Academic Year : 2008

ACKNOWLEDGEMENTS

I am especially grateful to my advisor, Associate Professor Dr. Polkit Sangvanich for his valuable guidance and assistance throughout my studies and research at Chulalongkorn University. I also deeply appreciate to my graduate committee members, Associate Professor Dr. Sirirat Kokpol, Associate Professor Dr. Amorn Petsom, Associate Professor Dr. Thumnoon Nhujak and Dr. Chantragan Phiphobmongkol (Chulabhorn Research Institute) for their advices and comments.

I would like to acknowledge Associate Professor Dr. Lloyd W. Sumner, Plant Biology Division, The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA, for his kindness in giving me opportunity to conduct a part of my research at his laboratory, his invaluable suggestion and assistance during my one-year living in USA. I also deeply appreciate to Dr. Zhentian Lei, The Samuel Roberts Noble Foundation, USA, for kindly training to protein extraction techniques, two-dimensional gel electrophoresis technique and tandem mass spectrometry analysis (LC/MS/MS). I wish to thank three peoples from The Samuel Roberts Noble Foundation, USA, Dr. Srinivasa Rao Uppalapati for providing fungi and his suggestion about antifungal activity assay, Dr. Ajith Anand for his technical advice, Dr. Luis L. Escamilla-Trevino for his technical assistance and Associate Professor Dr. Xiaoqiang Wang for laboratory facilities.

I wish to thank the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, the Thailand Research Fund for supporting scholarship throughout my studies and research. Moreover, I also thank Research Center for Bioorganic Chemistry Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University for the laboratory facilities. I thank Miss Apaporn Boonmee and Dr. Aphichart Karnchanatat for their friendship and helps during my graduate studies. Finally, I wish to express my deepest gratitude to my parents and my brothers for their great support and encouragement throughout my education.

CONTENTS

Page

CHAPTER Page

CHAPTER Page

CHAPTER Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

Table **Page**

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS

2-DE	Two-dimensional electrophoresis
µg	microgram
µl	microliter
AC	Affinity chromatography
ACN	Acetonitrile
APS	Ammonium persulfate
Bis	*N,N'*-methylenebisacrylamide
BSA	Bovine serum albumin
°C	degree Celsius
C	Crosslinking factor [%]
cal	Calculation
CCA	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CE	Capillary electrophoresis
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulfonate
CID	Collision-induced dissociation
cm	centimeters
CM	Carboxymethyl
Da	Dalton
DC	Direct current
DEAE	Diethylaminoethyl
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
2-DE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
exp.	Experimental
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
e.g.	for example
ESI	Electrospray ionization
ESI-Q/TOF	Electrospray ionization Quadrupole time-of-flight
EtOH	Ethanol
Fmol	femtomole

g	gram
GE	gel electrophoresis
GF	Gel filtration
h	hour
HIC	Hydrophobic interaction chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
HU	Hemagglutinating unit
IAA	iodoacetamide
IDA	Information-dependent acquisition
IEF	Isoelectric focusing
IEX	Ion-exchange chromatography
IPG	Immobilized pH gradients
kDa	kilo Dalton
kVh	kilo volt-hour
kg	kilogram
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry
mA	milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mbar	milllibar
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
MOWSE	Molecular weight search score
mm	millimeter
mM	millimolar
MS	Mass spectrometry
MS-BLAST	Mass spectrometry-driven BLAST
MS/MS	Tandem Mass spectrometry
MW	Molecular weight
m/z	mass per charge ratio

Native PAGE	Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NL	Non-Linear
No	Number
nm	nanometer
nM	Nanomolar
OD	Optical density
p*I*	Isoelectric point
PMF	Peptide mass fingerprint
PNPG	*p*-nitrophenyl -α-D-glucopyranoside
ppm	part per million
Q	Quaternary ammonium
Q/TOF	Quadrupole Time of flight
RF	Radio frequency
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloro acetic acid
TEMED	*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoro acetic acid
theor.	Theoretical
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethy)-aminoethane
U	Unit
UV	Ultraviolet spectroscopy
V	Volt
v/v	volume by volume