ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจากดอกแคบ้าน *Sesbania grandiflora*

นางสาวอาภาพร บุญมี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ISBN 974-14-3912 -1

AMINO ACID SEQUENCES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROTEINS FROM *Sesbania grandiflora* FLOWERS

Miss Apaporn Boonmee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic year 2006

ISBN 974-14-3912 -1

Thesis Title	AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROTEINS FROM *Sesbania grandiflora* FLOWERS
By	Miss Apaporn Boonmee
Field of study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

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

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

..... Member
(Associate Professor Amon Petsom, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph.D.)

อาภาพร บุญมี : ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจากดอกแคบ้าน *Sesbania grandiflora.* (AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROTEINS FROM *Sesbania grandiflora* FLOWERS) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช, 116 หน้า. ISBN 974-14 -3912-1.

โปรตีนจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการแล้วโปรตีนบางชนิดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ในหลายด้าน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจากดอกแคบ้าน (*Sesbania grandiflora* (L.) Desv.) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนค่อนข้างน้อย โดยนำดอกแคบ้านมาสกัดและตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจากนั้นนำตะกอนโปรตีนไปแยกโดยใช้เทคนิคไอออนเอ็กเชนจ์และ เจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี โปรตีนที่ได้ คือ SGF60 และ SGF90 มวลโมเลกุลเท่ากับ 40 กิโลดาลตัน และ 63 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โปรตีนทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสและ มีฤทธิ์ทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายเกาะตัวกันได้จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนด้วยเทคนิคแทนเดมแมสสเปกโทรเมตรีแบบ ESI-Q-TOF พบว่าโปรตีน SGF60 มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน p27SJ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 ที่ได้จาก *Hypericum perforatum* ส่วนโปรตีนSGF90 มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนคล้ายคลึงกับโปรตีนbeta-glucosidase (At5g36890) และ beta-glucosidase F8K4.3 ที่ได้จาก *Arabidopsis thaliana* นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบสองมิติแยกโปรตีนจากดอกแคบ้านพบว่ามีโปรตีนอย่างน้อย 6 ชนิดเป็นองค์ประกอบ

ภาควิชา.....เคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....อาภาพร บุญมี.....

สาขาวิชา.....เคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....พ.ว.....

ปีการศึกษา.....2549.....

4772570023 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: *Sesbania grandiflora*/ LEGUME/ PROTEIN/ α-GLUCOSIDASE INHIBITORY/ HEMAGGLUTINATING ACTIVITY/ MASS SPECTROMETRY

APAPORN BOONMEE: AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITES OF PROTEINS FROM *Sesbania grandiflora* FLOWERS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF POLKIT SANGVANICH, Ph.D., 116 pp. ISBN 974-14-3912 -1.

Legume proteins present a lot of nutrition value for human consumption. Some of them are bioactive proteins which can be application to many works. Protein from *Sesbnia grandiflora* (L.) Desv., leguminous tree, has a few records in databases. Therefore, this research interested to study composition and biological activities of proteins from *Sesbnia grandiflora* flowers. Crude Proteins from *Sesbnia grandiflora* flowers were extracted and fractionation precipitated with ammonium sulfate. By using ion exchange and gel filtration chromatography, SGF60 and SGF90 were separated. Both purified proteins show α-glucosidase inhibitory activity and hemagglutinating activity with rabbit erythrocyte. Approximate molecular weight of SGF60 and SGF90 protein from gel electrophoresis are 40 and 63 kDa, respectively. When analyzed amino acid sequence of these proteins by using ESI-Q/TOF, the result shown that this SGF60 has partial of amino acid sequence similar to p27SJ, a novel protein inhibited HIV-1, from *Hypericum perforatum*. For SGF90, the amino acid sequences of this protein matched with beta-glucosidase (At5g36890) and beta-glucosidase F8K4.3 protein from *Arabidopsis thaliana*. Moreover, 2-D gel electrophoresis was used to separate crude protein precipitating with TCA/acetone solution. From this technique, there are at less six proteins in *Sesbnia grandiflora* flowers.

Department.....Chemistry.....Student's signature.....Apaporn Boonmee.....
Field of study.....Chemistry.....Advisor's signature.....Polkit Sangvanich.....
Academic year.....2006.....

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 member, Associate Professor Dr. Sirirat Kokphol, Associate Professor Dr. Amon Petsom, Associate Professor Dr. Chaiyo Chaichantipyuth and Associate Professor Nattaya Ngamrojnavanich for their valuable suggestions and comments.

I would like to thank DPST in The Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology for supporting Scholarship to studies and do research. I would like to acknowledge Arjarn Anuchai Niwetpathomwat, Instructor from Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for Rabbit blood cells. I would like to thank Miss Narumon Sawasdipuksa, Mr. Aphichart Karnchanatat, Miss Pornpimol Tipthara and my friend in Protein Unit at Research Center of Bioorganic Chemistry for their suggestion, helping me the experimental techniques. Lastly, I wish to express my deepest gratitude to my parents for all things that they have endured and sacrificed for my success.

CONTENTS

Page

Page

CHAPTER

Page

CHAPTER

Page

CHAPTER

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS

app	Approximate
ACN	Acetonitrile
AGI	Alpha glucosidase inhibition
APS	Ammonium persulfate
BSA	Bovine serum albumin
cal	Calculation
CCA	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
°C	degree Celsius
cm	centimeters
CP	Crude protein
CM	Carboxymethyl
CID	collision-induced dissociation
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
DC	Direct current
DEAE	Diethylaminoethyl
ESI	Electrospray ionization
EtOH	Etanol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
g	gram
h	hour
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	High performance liquid chromatography
HU	Hemagglutinating unit
IAA	iodoacetamide
IPG	Immobilized pH gradients
IEF	Isoelectric focusing

kDa	kilo Dalton
kVh	kilo volt-hour
kg	kilogram
µl	microliter
MW	Molecular weight
MS	Mass spectrometry
MS-MS	Tandem Mass spectrometry
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
mM	millimolar
mA	milliampere
ml	milliliter
mm	millimeter
mg	milligram
min	minute
m/z	mass per charge ratio
nm	nanometer
No	Number
NCBI	National Center of Biotechnology Information
Native PAGE	Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis
OD	Optical density
ob	observe
pI	Isoelectric point
ppm	part per million
PNPG	*p*-nitrophenyl -α-D-glucopyranoside
PMF	Peptide mass fingerprint
Q	Quaternary ammonium
RBC	Red blood cell
RF	Radio frequency
RPC	Reverse phase chromatography
RP-HPLC	Reverse phase High performance liquid chromatography
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine
TOF	Time of flight
TCA	Trichloro acetic acid
Tris	Tris(hydroxymethy)-aminoethane
TFA	Trifluoro acetic acid
U	Unit
V	Volt
v/v	volume by volume
ZMB	Zero moisture basis