

ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนจากเมล็ดสะตอ *Parkia speciosa*



นางสาวกนกวรรณ จันทร์คำจร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2290-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES
OF PROTEINS FROM *Parkia speciosa* SEEDS**



Miss Kanokwan Chankhamjion

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**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 2005

ISBN 974-14-2290-3

Thesis Title AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL
ACTIVITIES OF PROTEINS FROM *Parkia speciosa* SEEDS
By Ms. Kanokwan Chankhamjon
Field of Study Chemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.

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

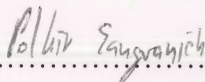


..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE



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



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



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



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

กนกวรรณ จันทร์คำจร : ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนเมล็ด
 สะตอ *Parkia speciosa* (AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL
 ACTIVITIES OF PROTEINS FROM *Parkia speciosa* SEEDS) อ.ที่ปรึกษา:
 ผศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช 91 หน้า ISBN 974-14-2290-3

สะตอพบมากในภาคเหนือของประเทศไทยและภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทยสะตอ
 เป็นพืชที่นิยมรับประทานมาก และถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศ เพราะว่า
 สะตอมีปริมาณสารอาหารสูงและมีคุณค่าทางด้านสมุนไพร เช่น สะตอช่วยลดความดันเลือดและยัง
 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้เมล็ดสะตอยังเป็นยาระบายและช่วยลด
 ระดับน้ำตาลในเลือด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการที่จะศึกษาองค์ประกอบของโปรตีน และหาฤทธิ์
 ทางชีวภาพของเมล็ดสะตอ โดยทำการสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และตกตะกอนโปรตีน
 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำโปรตีนผสมที่ตกตะกอนด้วย 60 %แอมโมเนียมซัลเฟต มาแยกโปรตีน
 ด้วย affinity column (Concanavalin A sepharose หรือ Con A) ซึ่ง lectin จะถูกชะออกมาด้วย
 Methyl- α -D-manopyranoside มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 13.484 มิลลิกรัม หลังจากนั้นหา
 องค์ประกอบของ lectin โดยใช้ 1D-denaturation gel electrophoresis พบว่ามี lectin 2 ตัวมีมวล
 โมเลกุลเท่ากับ 45 กิโลดาลตัน และ 23 กิโลดาลตัน ซึ่งก็คือ ตำแหน่ง C2a และ C2b ตามลำดับ โดย
 lectin ทั้ง 2 ตัวนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้เม็ดเลือดแดงของกระต่ายจับตัวกัน แต่จะไม่มีผลต่อเลือด
 และ นอกจากนั้นได้นำโปรตีนผสมที่ได้จากการตกตะกอนด้วย 25% แอมโมเนียมซัลเฟต มาทำการ
 แยกด้วย Affi-gel blue gel และ protein liquid chromatography ที่มี superdex 200 เป็นมีเดียซึ่ง
 โปรตีนที่แยกได้ คือ lectin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 21 กิโลดาลตัน (Gj) และตัวที่สองคือ 45 กิโล
 ดาลตัน (A1) ซึ่งได้จากการแยกอีกครั้งโดยใช้ HPLC ซึ่งโปรตีนตัวนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ ช่วยลด
 ปริมาณน้ำตาลในเลือดได้ หลังจากนั้นนำโปรตีนที่แยกได้ไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้เทคนิค
 peptide mass mapping พบว่าโปรตีน C2a และ C2b มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ โปรตีน
 Q69JW1_ORYSA ซึ่งได้แยกได้จาก *Oryza sativa* และ Q8VXY3_ARATH ที่แยกได้จาก
Arabidopsis thaliana ส่วนโปรตีน A1 และ Gj มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ โปรตีน
 Q9LDD9_ORYSA และ Q8LN52_ORYSA ที่แยกได้จาก *Oryza sativa*.

ภาควิชา.....เคมี.....
 สาขาวิชา.....เคมีอินทรีย์.....
 ปีการศึกษา.....2548.....

ลายมือนิติ.....
 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 พ.จ.ร. 11/๕๐๙

4772204323: MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: *PARKIA SPECIOSA*/ 1D-GEL ELECTROPHORESIS/ PROTEIN/ LECTIN/ α -GLUCOSIDASE/ MASS SPECTROMETRY

KANOKWAN CHANKHAMJON: AMINO ACID SEQUENCE AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROTEINS FROM *Parkia speciosa* SEEDS
 THESIS ADVISOR: ASSIST.PROF POLKIT SANGVANICH, Ph.D.
 THESIS

ISBN 974-14-2290-3

Parkia speciosa Hassk (sato) that found in the northern part of Malaysia as well as in the southern part of Thailand. Sato is a famous vegetable and economic plant of Thailand, because it has high nutrient and has many medicinal properties. For example, it uses for reducing blood pressure and anti-diabetic. The beans have a laxative effect and α -glucosidase inhibitor. The present study aimed to characterize proteins and study the bioactivities of *Parkia speciosa* seeds. The lectin was purified from a crude extract by 60% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation followed by specific adsorption on Concanavalin A Sepharose and used by Methyl- α -D-manopyranoside as eluent, gave total lectin 13.484 mg. The molecular weight of purified lectin determined by 1D-denaturation gel electrophoresis were 45 kDa (C2a) and 23 kDa (C2b). Furthermore, the lectin were separated from a crude extract by 25% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation by affinity chromatography on Affi-gel blue gel and gel filtration chromatography on Superdex 200 are 21 kDa (Gj) and the 45 kDa (A1) showed inhibiting property of α -glucosidase were purified by HPLC. The 45 kDa and 21 kDa were found the molecular weight by 1D-SDS PAGE and MALDI-TOF MS, respectively. From peptides mass mapping by MALDI-TOF MS. and amino acid sequence database searching, the amino acid sequence of protein spot C2a, C2b are shown eight, six-peptides sequence similar to partial amino acid residue of Q69JW1_ORYSA from *Oryza sativa* and Q8VXY3_ARATH from *Arabidopsis thaliana*, respectively. The amino acid sequence from peptides mass mapping database searching from A1 and Gj are similar to partial amino acid sequence of Q9LDD9_ORYSA and Q8LN52_ORYSA from *Oryza sativa*.

Department.....Chemistry..... Student's signature.....
 Field of study.....Organic Chemistry..... Advisor's signature.....*Polkit Sangvanich*.....
 Academic year.....2005.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my advisor, Assistance Professor Dr. Polkit Sangvanich for their invaluable suggestion and assistance throughout my studies and research at Chulalongkorn University. I wish to thank my graduate committee members, Associate Professor Dr. Sirirat Kokphol, Associate Professor Dr. Amorn Petsom and Associate Professor Dr. Chaiyo Chaichantipyuth for their valuable suggestions and comments.

I wish to thank Miss. Pornpimol Tiphara at UMIST Manchester, UK for support a MALDI-TOF MS analysis. I would like to thank Mr. Aphichart Karnchanatat and Miss Narumon Sawasdipuksa in Protein Unit at Research Center of Bioorganic Chemistry for their suggestion, helping and teaching me the experimental techniques throughout this work. I would like to thank the Faculty of Science, Graduate School, Chulalongkorn University for financial support. Moreover, I also thank Research Center for Bioorganic Chemistry Unit, Department of Chemistry, Chulalongkorn University for the laboratory facilities. I thank all of my friends for their friendship and helps during my graduate studies. Finally, I would like to appreciate my parents for their great support and encouragement throughout my education.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF TABLES.....	xii
LIST OF SCHEMES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
 CHAPTER	
1. INTRODUCTION.....	1
2. THEORETICAL.....	4
2.1 Separation Techniques.....	4
2.1.1 Affinity chromatography.....	4
2.1.1.1 Binding Mechanism	4
2.1.1.2 Methods of affinity chromatography.....	8
2.1.1.3 Application for lectins.....	9
2.1.2 Gel filtration.....	10
2.1.2.1 Separation Mechanism.....	11
2.1.3 Reversed-Phase Chromatography.....	12
2.1.4 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.....	13
2.1.4.1 Components of SDS-PAGE.....	13
2.1.4.2 One-dimensional gel electrophoresis.....	16
2.1.4.3 Two-dimensional gel electrophoresis.....	16
2.1.4.4 Protein detection.....	17

CHAPTER	Page
2.2 Protein Identification technique.....	17
2.2.1 Edman Reaction.....	17
2.2.2 Mass spectrometry.....	20
2.2.1.1 An overview of mass spectrometry	20
2.2.1.2 Ionization method	22
2.2.1.3 Mass analyzer.....	26
2.3 Protein identification by database searching.....	28
2.3.1 The Protein Sequence Databases.....	28
2.3.2 Protein Identification Using Peptide Mass Mapping.....	28
3. EXPERIMENTAL.....	29
3.1 Plant material.....	29
3.2 Chemicals and reagents.....	29
3.3 Solvents	29
3.4 Apparatus and Instrument.....	30
3.5 Procedures.....	31
3.5.1 Extraction and precipitation	31
3.5.2 Determination of protein concentration.....	31
3.5.3 Purification.....	31
3.5.3.1 Affinity column.....	31
3.5.3.2 Gel filtration.....	32
3.5.3.3 High Performance Liquid Chromatography....	32
3.5.3.4 SDS-PAGE.....	32
3.5.4 Assay for Hemagglutinating activity.....	35
3.5.5 Assay for alpha glucosidase inhibitor.....	35
3.5.6 Sample preparation for MALDI-TOF.....	35
3.5.7 Protein Sequencing.....	35

CHAPTER	Page
4. RESULT AND DISCUSSION.....	36
4.1 Determination of crude protein concentration.....	36
4.2 Hemagglutination activity and α -glucosidase inhibition of crude protein.....	36
4.3 Characterization 60% crude of protein.....	37
4.4 Characterization 25% crude of protein.....	47
5. CONCLUSION	60
REFERENCES.....	63
APPENDICES.....	66
VITA.....	91



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Sato (<i>Parkia speciosa</i> Hassk).....	1
2.1 Loading affinity column.....	5
2.2 Proteins sieve through matrix of affinity beads.....	6
2.3 Proteins interact with affinity ligand with some binding loosely and others tightly.....	6
2.4 Wash off proteins that do not bind.....	7
2.5 Wash off proteins that bind loosely.....	7
2.6 Elute proteins that bind tightly to ligand and collect purified protein of interest.....	8
2.7 Separation mechanism of gelfiltration.....	11
2.8 A block diagram of mass spectrometry.....	21
2.9 Schematic diagram of the mechanism of MALDI.....	24
2.10 Principle of the mass separation by a time-of-flight mass analyzer.....	27
4.1 Affinity chromatography of crude protein from <i>Parkia speciosa</i> on the Con A sepharose column (1.6x5cm), Flow rate 1.5 ml/min. The equilibration buffer was 20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing with 0.5 M NaCl, 1mM CaCl ₂ ×2H ₂ O, 1mM MnCl ₂ . The eluted lectin buffer was 20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing with 0.1- 0.5 M Methyl-μ-D-manopyranoside.....	38
4.2 1-D SDS-PAGE of C1 and C2 from affinity column.....	39
4.3 Gel filtration chromatography of crude proteins on the superdex 200 column (1.6 x 60cm) in double distilled water, flow rate 0.5ml/min.....	40
4.4 Rabbit red blood cell agglutinating.....	41
4.5 Blank of rabbit red cell.....	42
4.6 1-D SDS-PAGE of fraction G1, G2, G3, G4, G5 from gelfiltration chromatography.....	43
4.7 Affinity chromatogram of crude of <i>Parkia speciosa</i> on the Affi-gel blue gel column (1.6x10 cm) in binding buffer 1 mM Tris-HCl, pH 7.2. The dash line indicate using 0-100% linear gradient of 0.5 mM NaCl in binding buffer. Flow rate 1.5 ml/min.....	47

Figure	Page
4.8 Rabbit red cell agglutinating.....	48
4.9 Blank of rabbit red blood cell.....	49
4.10 1-D SDS-PAGE gel stained by coomassie blue of fraction A1, A2 from Affi-gel blue gel chromatography. (L1 is crude proteins and L2 is A1 + A2 fraction).....	50
4.11 Gel filtration chromatogram of A1, A2 fraction from affi gel blue gel chromatography on superdex 200 column (1.6 x 60cm) in Double distilled water, flow rate 0.5 ml/min.....	51
4.12 1D SDS-PAGE of fraction Gi from gel filtration chromatography.....	52
4.13 Superdex 75 gel filtration chromatogram of 25% A2 from affi gel blue gel chromatography, flow rate 0.5 ml/min.....	53
4.14 Chromatogram of Gi form HPLC mobile phase was ACN: water (20:80), flow rate 1.0 ml/min.....	54
4.15 1D SDS-PAGE of fraction A1 from HPLC.....	55
4.16 MALDI-TOF mass spectrum of Gj fraction from superdex 200 gel filtration.....	56



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLE

Table	Page
2.1 The matrices used in MALDI-MS.....	23
4.1 The amount of proteins from precipitate fraction.....	36
4.2 Activity of crude protein.....	37
4.3 The amount of proteins from Affinity chromatography.....	38
4.4 Hemagglutinating activity of fractions from gel filtration chromatography.....	41
4.5 The amount of proteins from gel filtration chromatography.....	42
4.6 The search results of protein C1a, C2a and C2b.....	44
4.7 The amount of proteins from Affi-Gel blue affinity chromatography.....	49
4.8 The search results of protein Aa and Ab.....	57
5.1 The conclusion of database search result.....	61


 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Schem	Page
2.1 The formation of a polyacrylamide gel from acrylamide and bis-acrylamide.....	14
2.2 Phenylisothiocyanate reacts with the N-terminus of the protein.....	18
2.3 Cyclic degradation of peptides based on the reaction of phenylisothiocyanate.....	18



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

1-D electrophoresis	One-dimensional electrophoresis
2-D electrophoresis	Two-dimensional electrophoresis
µg	microgram
µl	microliter
ACN	Acetonitrile
APS	Ammonium persulfate
Bis	<i>N,N'</i> -methylenebisacrylamide
°C	degree Celsius
<i>C</i>	Crosslinking factor [%]
CAD	Collision activated dissociation
CCA	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propane sulfonate
CID	Collision induced dissociation
Da	Dalton
DC	Direct current
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	Electrospray ionization
ESI-Q/Tof	Electrospray ionization Quadrupole time-of-flight
fmol	femtomole
g	gram
GF	Gel filtration chromatography
IEF	Isoelectric focusing
IPG	Immobilized pH gradients
kDa	Kilodalton
kVh	kilovolt-hour
LMW	Low molecular weight
nM	Nanomolar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MALDI/Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of flight

mg	Milligram
mg/ml	Milligram per milliliter
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem Mass spectrometry
<i>m z</i>	Mass per charge
PAGE	polyacrylamide-gel electrophoresis
pI	Isoelectric point
PMM	Peptide mass mapping
pmol	picomole
ppm	parts per million
PSD	Post source decay
Q/Tof	Quadrupole Time of flight
RF	Radiofrequency
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium-dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis
T	Total acrylamide concentration [%]
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic acid
Tof	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	Ultraviolet spectroscopy
V	Volt
W	Watt