

ชนิดและปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและกระชายดำที่ศึกษาด้วยเทคนิค
Label-free LC-MS/MS

นางสาวพิชญา ลักษณะวิลาศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDIES OF BOESENBERGIA ROTUNDAL (L.) MANSF.
AND KAEMPFERIA PARVIFLORA RHIZOMES USING
LABEL-FREE LC-MS/MS QUANTITATIVE PROTEOMICS

Miss Pichaya Luksanawilas



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชนิดและปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและ
	กระชายดำที่ศึกษาด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS
โดย	นางสาวพิชญา ลักษณะวิลาศ
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรธนะกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรภัค เรียมทอง)

พิกษา ลักษณะวิลาส : ชนิดและปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและกระชายดำที่ศึกษาด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS (QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDIES OF BOESENBERGIA ROTUNDAL (L.) MANSF. AND KAEMPFERIA PARVIFLORA RHIZOMES USING LABEL-FREE LC-MS/MS QUANTITATIVE PROTEOMICS) อ.ที่ปริภษาวิทยาลัยหลัก: อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม, อ.ที่ปริภษาวิทยาลัยร่วม: รศ. ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช, 141 หน้า.

โปรตีโอมิกส์ (Proteomics) เป็นการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์พืช เซลล์สัตว์ เซลล์เพาะเลี้ยง เป็นต้น โดยอาศัยเทคนิคหลัก คือ Two Dimensional-Gel Electrophoresis (2D-GE) และ Mass spectrometry (MS) แต่ 2D-GE มีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น เป็นเทคนิคที่มีความผันแปร (variation) สูงระหว่างเจลแต่ละเจล มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน จึงมีผู้พัฒนาเทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics มาใช้แทน 2D-GE ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงต้องการประยุกต์ใช้เทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative คือ GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ระบุชนิดและปริมาณโปรตีน สารสกัดจากเหง้ากระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) และเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) ซึ่งยังไม่มี การศึกษามาก่อน และยืนยันผลของการระบุชนิดโปรตีน ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) จากวิธี GeLC-MS/MS ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD-Staining Activity และศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวที่ต่างกันต่อปริมาณ SOD และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่สกัดได้จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay ผลการวิจัย พบว่า ในการระบุชนิด และปริมาณโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองด้วย GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบจำนวนโปรตีน 42 และ 36 ชนิด ตามลำดับ ด้วยวิธี GeLC-MS/MS พบโปรตีน 40% ทำหน้าที่ในการสร้างและสลายพลังงาน อีก 60% ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และบางชนิดยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS พบโปรตีน 36% ทำหน้าที่ในการสร้างและสลายพลังงาน และ 64% ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และบางชนิดยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน และพบว่าสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหง้าเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกันยายน มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ $100.87 \pm 6.13 \mu\text{g VCEAC/mg protein}$

ในการระบุชนิดและปริมาณโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายดำด้วย GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบจำนวนโปรตีน 52 และ 9 ชนิด ตามลำดับ ด้วยวิธี GeLC-MS/MS พบโปรตีน 46% ทำหน้าที่ในการสร้างและสลายพลังงาน และ 54% ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และบางชนิดยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS พบโปรตีน 22% ทำหน้าที่ในการสร้างและสลายพลังงาน และ 78% ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และบางชนิดยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน และพบว่าสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ $938.20 \pm 44.88 \mu\text{g VCEAC/mg protein}$ สำหรับผลการหาปริมาณ SOD ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD Activity Staining พบว่า กระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม มีปริมาณ SOD มากที่สุด ขณะที่กระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม มีปริมาณ SOD มากที่สุด จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่าเทคนิคการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดและปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน จะส่งผลต่อชนิดและปริมาณของโปรตีนที่ตรวจพบได้แตกต่างกันด้วย และช่วงเวลาเก็บเกี่ยวตัวอย่างพืชที่ต่างกัน จะส่งผลต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน

ภาควิชา เคมีคลินิก

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริภษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริภษาร่วม

5576659037 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: BOESENBERGIA ROTUNDA / KAEMPFERIA PARVIFLORA / ABTS ASSAY / LABEL-FREE LC-MS/MS / GELC MS/MS

PICHAYA LUKSANAWILAS: QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDIES OF BOESENBERGIA ROTUNDAL (L.) MANSF. AND KAEMPFERIA PARVIFLORA RHIZOMES USING LABEL- FREE LC- MS/ MS QUANTIITATIVE PROTEOMICS. ADVISOR: SIRIPORN SANGSUTHUM, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.POLKIT SANGVANICH, Ph.D., 141 pp.

Proteomics is the study of whole proteins both of qualitative and quantitative analysis in animal, plant and cell culture. Two Dimensional-Gel Electrophoresis (2D-GE) and Mass spectrometry (MS) are used in proteomics. However, 2D-GE is a complicated technique and has limitation such as high variation results. Thus, the new technique was developed, Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics which is GeLC-MS/MS or Label-free LC-MS/MS. These techniques use simply method for sample preparation, short time analysis and a low variation between samples. The aims of this study are using Label-free LC-MS/MS quantitative for qualitative and quantitative analysis of extracted proteins from *Boesenbergia rotunda* (*Krachai*) rhizomes and *Kaempferia parviflora* (*Krachai-Dum*) rhizomes, which are not study before. The superoxide dismutase (SOD) which detected by GeLC-MS/MS will be confirmed using Native-PAGE and SOD-Staining Activity techniques. Finally, the effects of different harvest of *Krachai* and *Krachai-Dum* rhizomes on the SOD amount and antioxidant activity by ABTS assay will be studied. The results showed using GeLC-MS/MS and Label-free LC-MS/MS techniques for qualitative analysis of the extracted proteins from *Krachai* rhizomes, 42 and 36 proteins were found, respectively. Function of proteins in *Krachai* extracted analysed by GeLC-MS/MS were classified as metabolism functions (40%), the other were protein synthesis, defence, cell structure, transportation and unidentified functions. Function of proteins in *Krachai* extracted analyse by Label-free LC-MS/MS technique were classified as metabolism functions (36%), the other were protein synthesis, defence, cell structure, transportation and unidentified functions. The highest antioxidant activity was value of 100.87 ± 6.13 μ g VCEAC/mg proteins was found in *Krachai* rhizomes that collected in September. For the qualitative analysis of extracted proteins from *Krachai-Dum* rhizomes using GeLC-MS/MS and Label-free LC-MS/MS, 52 and 9 proteins were found, respectively. Function of protein in *Krachai-Dum* extracted analysed by GeLC-MS/MS were classified as metabolism functions (46%) and the other were protein synthesis, defence, cell structure, transportation and unidentified functions. Function of protein in *Krachai-Dum* extracted analysed by Label-free LC-MS/MS technique were classified as metabolism functions (22%) and the other were protein synthesis, defence, cell structure, transportation and unidentified functions. The highest antioxidant activity was value of 938.20 ± 44.88 μ g VCEAC/mg protein was found in *Krachai-Dum* rhizomes that collected in December. For the quantitation of SOD the result showed *Krachai* in December and *Krachai-Dum* in January have the highest amount of SOD. In Conclusion, the different technique used for qualitative and quantitative proteomics in proteins extracted form *Krachai* and *Krachai-Dum* rhizomes affected different proteins type and proteins amount in same sample. Also, the different harvest of samples affected the different antioxidant activity.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.ศิริพร แสงสุธรรม ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ซึ่งรับหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยแนะนำแนวทางและแก้ปัญหาในระหว่างการทำวิจัยตลอดจนโอกาสดีๆทางการศึกษาที่ท่านอาจารย์คอยแนะนำและช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรภัค เรียมทอง ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เกิดขึ้นได้เพราะคณะผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ครั้งที่ 3/2557 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรภัค เรียมทอง อาจารย์ประจำภาควิชาชีวโมเลกุล และพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิจัยครั้งนี้

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ และคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วนในการดำเนินงานวิจัย

ขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษาสำหรับตัวข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว อาจารย์ และนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงกำลังใจ มิตรภาพและความช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัยตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ปัญหาทางวิจัย	3
1.3 สมมติฐานงานวิจัย	4
1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.5 ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
1.6 กรอบแนวความคิด.....	5
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2	7
ทบทวนวรรณกรรม	7
2.1 โพรตีโอมิกส์ (Proteomics).....	7
2.1.1 เทคนิค Two Dimensional-Gel Electrophoresis (2D-GE).....	7
2.1.1.1 Isoelectric Focusing (IEF)	7
2.1.1.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	9
2.1.2 เทคนิค Label-Free Quantitative Proteomics.....	11
2.1.2.1 Label-free LC-MS/MS.....	11
2.1.2.2 เทคนิค GeLC- MS/MS	12

2.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Trypsin (Trypsin Digestion)	14
2.3 ลิควิดโครมาโทกราฟี แชนเต็มแมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS).....	15
2.3.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	16
2.3.2 Mass spectrometry	18
2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) ด้วยโปรแกรม Mascot.....	22
2.5 กระจายเหลือง	24
2.6 กระจายดำ	26
2.7 โปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชวงศ์ขิง	28
2.8 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืชวงศ์ขิง.....	32
2.9 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ.....	33
2.9.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)	33
บทที่ 3	35
วิธีดำเนินการวิจัย	35
การระบุชนิดและปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำด้วยวิธี GeLC- MS/MS และ Label-free LC-MS/MS.....	35
การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase และการทดสอบความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำ.....	36
3.1 ตัวอย่างสมุนไพร.....	37
3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย	38
3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	38
3.2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรและการตกตะกอนโปรตีน.....	38
3.2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	38

3.2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนด้วยเทคนิค Mass Spectrometry	39
3.2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase.....	39
3.2.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay...	39
3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย	39
3.3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	40
3.3.1 การสกัดสมุนไพรวัยวิธีการปั่น (Homogenization).....	40
3.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	41
3.3.3 การหาปริมาณโปรตีนด้วย Bradford assay.....	42
3.3.4 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	45
3.3.4.1 การย่อยโปรตีนภายในเจล (In gel digestion).....	48
3.3.4.2 การย่อยโปรตีนในสารละลาย (In soluble digestion).....	49
3.3.5 การวิเคราะห์ด้วย Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).....	50
3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) ด้วยโปรแกรม Mascot	51
3.4 การหาปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining	52
3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay.....	53
3.5.1 การสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay.....	53
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนในกระชายเหลืองและกระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay.....	53
บทที่ 4	55

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	55
4.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS	55
4.1.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS	56
4.1.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS	58
4.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS	61
4.2.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS	61
4.2.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกันด้วยวิธี GeLC-MS/MS	67
4.3 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	74
4.3.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	74
4.3.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	78
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	81
4.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	82
4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	85

4.5 การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining	87
4.5.1 การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 12 เดือน ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining.....	87
4.5.2 การวัดปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 เดือน	89
4.5.3 การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ในกระชายดำที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือน ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining.....	90
4.5.4 การวัดปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 9 เดือน	92
4.6 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำด้วยวิธี ABTS assay	92
บทที่ 5	97
สรุปผลการวิจัย	97
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก.....	112
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง	113
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	141

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การเตรียม Resolving gel	45
ตารางที่ 2 การเตรียม Stacking gel	47
ตารางที่ 3 เวลาการชะล้างคอลัมน์	51
ตารางที่ 4 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัตถุประสงค์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay.....	54
ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลือง ด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS	56
ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS	58
ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS	61
ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS	67
ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label free LC-MS/MS	74
ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	78
ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองในเดือนกรกฎาคมและเดือนธันวาคม ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	83
ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคมและเดือนธันวาคม ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS	86
ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 เดือน	89
ตารางที่ 14 ปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 9 เดือน	92

ตารางที่ 15 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจาก กระชายเหลือง ทั้งหมด 12 เดือน ด้วยวิธี ABTS assay	94
ตารางที่ 16 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้า กระชายดำ ทั้งหมด 9 เดือน ด้วยวิธี ABTS assay.....	95
ตารางที่ 17 ปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวใน ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 12 เดือน.....	113
ตารางที่ 18 ปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่ แตกต่างกัน 9 เดือน	115
ตารางที่ 19 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอน โปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)	118
ตารางที่ 20 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอน โปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)	121
ตารางที่ 21 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 3 จากการตกตะกอน โปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)	123
ตารางที่ 22 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอน โปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)	125
ตารางที่ 23 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอน โปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)	127

ตารางที่ 24 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 3 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)	129
ตารางที่ 25 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON).....	131
ตารางที่ 26 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON).....	134
ตารางที่ 27 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON).....	137
ตารางที่ 28 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่จากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON).....	139

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 การเคลื่อนที่ของโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้า เมื่อค่า pH เท่ากับค่า pi โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์และหยุดเคลื่อนที่ เห็นเป็นแถบปรากฏอยู่บนเจล	8
ภาพที่ 2 เทคนิคการแยกโปรตีน Two Dimensional-Gel Electrophoresis	8
ภาพที่ 3 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน	10
ภาพที่ 4 เทคนิค Label-Free LC-MS/MS	12
ภาพที่ 5 หลักการของ GeLC-MS/MS ได้แก่ การย่อยแผ่นเจลเล็กๆที่ตัดแล้ว หรือ In gel digestion (IGD) และ การตัดและย่อยเจลทั้งแผ่น หรือ Whole gel (WG)	13
ภาพที่ 6 หลักการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Trypsin	15
ภาพที่ 7 เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเต็มแมสสเปกโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS).....	15
ภาพที่ 8 หลักการ Normal phase chromatography	17
ภาพที่ 9 หลักการ Reversed phase chromatography	17
ภาพที่ 10 หลักการ Mass spectrometry	19
ภาพที่ 11 หลักการของเครื่อง HPLC ที่ต่อกับ ESI-Q-TOF-MS	19
ภาพที่ 12 หลักการของ Electrospray Ionization	20
ภาพที่ 13 หลักการของ Quadrupole	21
ภาพที่ 14 หลักการของ Time of Flight (TOF)	21
ภาพที่ 15 Protein score จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mascot (ส่วนที่ไม่แรเงา หมายถึงมีความน่าจะเป็นสูงที่จะเป็นโปรตีนชนิดที่ระบุจากฐานข้อมูล)	22
ภาพที่ 16 จำนวนของเปปไทด์ พร้อมทั้งลำดับกรดอะมิโนที่พบในตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mascot	23
ภาพที่ 17 Protein sequence coverage (ตัวสีแดงคือเปปไทด์ที่พบในตัวอย่างที่ match กับ database ในโปรตีนที่พบในฐานข้อมูล).....	23
ภาพที่ 18 เหน้้ากระชายเหลือง	24
ภาพที่ 19 ต้นกระชายเหลือง	24

ภาพที่ 20	เหง้ากระชายดำ	26
ภาพที่ 21	ต้นและดอกกระชายดำ	27
ภาพที่ 22	กลไกการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Superoxide Dismutase	30
ภาพที่ 23	ขนาดมวลโมเลกุลของ SOD (ประมาณ 31 กิโลดาลตัน) ที่แยกด้วยเทคนิค Native-PAGE (ซ้าย) และแสดงแถบโปรตีน SOD ที่ใสไม่มีสี เมื่อย้อมด้วย SOD activity staining (ขวา) ..	31
ภาพที่ 24	การทำปฏิกิริยาของ Superoxide Dismutase กับ Superoxide anion	32
ภาพที่ 25	ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเอปี้ทีเอส	34
ภาพที่ 26	กระชายเหลือง	37
ภาพที่ 27	กระชายดำ	37
ภาพที่ 28	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) ที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน 1 ลิตร (ต่อ)	42
ภาพที่ 29	หลักการการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay	43
ภาพที่ 30	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน	44
ภาพที่ 31	การตัดของเอนไซม์ทริปซิน บริเวณกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน	48
ภาพที่ 32	หน้าเว็บไซต์ www.matrixscience.com	51
ภาพที่ 33	การเปรียบเทียบ Mass spectrum ด้วยฐานข้อมูล Mascot	52
ภาพที่ 34	ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ซ้าย) และแสดงการตัดเจลเพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ เพื่อจะนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค LC-MS/MS (ขวา)	55
ภาพที่ 35	การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายเหลืองด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS	66
ภาพที่ 36	การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายดำด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS	73
ภาพที่ 37	การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายเหลืองด้วยเทคนิค Label free LC-MS/MS	77
ภาพที่ 38	การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายดำด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS	79

ภาพที่ 39 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วง เดือนมกราคม เดือน กุมภาพันธ์ (ซ้าย) เดือนมีนาคม และเดือนเมษายน (ขวา).....	88
ภาพที่ 40 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม เดือน มิถุนายน (ซ้าย) เดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคม (ขวา).....	88
ภาพที่ 41 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกันยายน เดือน ตุลาคม (ซ้าย) เดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม (ขวา).....	88
ภาพที่ 42 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความ เข้มข้น 0-40% ที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือน ซ้ำที่ 1 (ซ้าย) และ ซ้ำที่ 2 (ขวา).....	90
ภาพที่ 43 การระบุชนิด Isoenzyme ของ Superoxide Dismutase ในพืช Cleome gynandra และ Cleome spinose	91
ภาพที่ 44 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความ เข้มข้น 40-80% ที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือน ซ้ำที่ 1 (ซ้าย) และ ซ้ำที่ 2 (ขวา).....	91
ภาพที่ 45 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคม เดือน กุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม และเดือนเมษายน ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	116
ภาพที่ 46 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคม ด้วยวิธี SDS-PAGE.....	117
ภาพที่ 47 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกันยายน เดือน ตุลาคมเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม ด้วยวิธี SDS-PAGE	117

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Proteomics เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในการระบุชนิด หาปริมาณของ โปรตีนในเซลล์พืช (1) เซลล์สัตว์ (2, 3) เซลล์เพาะเลี้ยง (4, 5) การหา Biomarker ต่างๆ (6) Proteomics ประกอบด้วยเทคนิคหลัก 2 เทคนิค คือ เทคนิค Two Dimensional-Gel Electrophoresis (2D-GE) โดยเทคนิค 2D-GE จะทำการแยกโปรตีนใน 2 มิติ คือ การแยกโปรตีนตามประจุ (pI) และตามขนาดของโมเลกุล โดยใช้ Isoelectric Focusing และ SDS-PAGE จากนั้น ตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการวิเคราะห์จาก 2D-GE จะถูกวิเคราะห์ต่อยด้วยเทคนิค Mass spectrometry (MS) เพื่อทำการระบุชนิดของโปรตีนโดยการสืบค้นเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ซึ่งเทคนิคเหล่านี้สามารถใช้เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนที่อยู่ในเงื่อนไขที่แตกต่างกัน (7) ซึ่งเทคนิค 2D-GE เป็นเทคนิคที่มี variation สูงระหว่างเจลแต่ละเจล แม้จะเป็นเจลที่วิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันก็ตาม อีกทั้งยังมีข้อจำกัดคือ วิเคราะห์ได้ในช่วง dynamic range ที่จำกัด และไม่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์โปรตีนที่มีความเป็น hydrophobic หรือโปรตีนที่มีค่า pI น้อยกว่า 3 หรือ มากกว่า 10 ได้ และปริมาณของโปรตีนที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับความไวของสีย้อมที่ใช้ อีกทั้งยังใช้เวลานานในการวิเคราะห์ นอกจากเทคนิค 2D-GE แล้ว ยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อหาปริมาณโปรตีน คือ การติดฉลากโปรตีนด้วยสารรังสี (Stable isotope labeling) และเทคนิคที่ไม่ต้องติดฉลากโปรตีนด้วยสารรังสี Label-free quantitative proteomics (8)

เทคนิคการติดฉลากโปรตีนด้วยสารรังสี (Stable isotope labeling) เช่น Isotope-Coded Affinity Tag (ICAT), Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC), $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ metabolic labeling, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ enzymatic labeling, Isotope-Coded Protein Labeling (ICPL), Tandem Mass Tags (TMT), Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ) และ Chemical labeling เป็นต้น (9) แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัด เช่น ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างยุ่งยากซับซ้อน น้ำยาที่ใช้มีราคาสูง การติดฉลากไม่สมบูรณ์ และอาจเกิดการ cross contamination ระหว่างสารรังสีและตัวอย่าง เมื่อนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วย MS ทำให้แปลผลผิดพลาด นอกจากนี้ สารรังสีบางชนิดยังเป็นสารก่อมะเร็ง เมื่อเทียบกับเทคนิคที่เรียกว่า Label-free quantitative proteomics ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องติดฉลากด้วยสารรังสี กับเทคนิค Isotope

Labeling พบว่า ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เร็วกว่า ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากสำหรับการเตรียมตัวอย่างง่ายต่อการวิเคราะห์ผล และไม่มีความเสี่ยงต่อสารรังสีสำหรับผู้ทำการวิเคราะห์ (10)

เทคนิคที่ไม่ต้องติดฉลากโปรตีนด้วยสารรังสี Label-free quantitative proteomics (8) คือ เทคนิค GeLC-MS/MS และเทคนิค Label-free LC-MS/MS ซึ่งเทคนิค Label-free quantitative proteomics อาศัยหลักการที่ว่าปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนไปส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ทาง Chromatography และ MS เปลี่ยนไปด้วย นั่นคือ Peak areas, Peak heights และ Ion intensity ที่เปลี่ยนไป โดยข้อดีของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ คือ ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากในการวิเคราะห์และไม่เสี่ยงต่อการสัมผัสสารรังสีหรือสารอันตรายอื่นๆ ซึ่งเป็นผลที่ดีต่อผู้วิจัยและสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้มีการนำเทคนิค Label-free quantitative proteomics ไปใช้ตรวจวิเคราะห์โปรตีนทั้งในเซลล์สัตว์ เซลล์พืช และเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น นำไปวิเคราะห์หา Biomarker ในเซลล์มะเร็งเต้านม (11) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้จาก *Escherichia coli* strains เพื่อใช้ในการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (12) เป็นต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเทคนิค Label-free quantitative proteomics มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโปรตีนในพืช โดยทดสอบกับตัวอย่างสมุนไพรไทย คือ กระชายเหลือง และกระชายดำ ซึ่งยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน

กระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) และ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชวงศ์ขิง (ZINGIBERACEAE) ใช้ในตำรับยาแผนโบราณ สำหรับบำรุงธาตุในร่างกาย นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าในกระชายเหลืองและกระชายดำมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) หลายชนิด เช่น สาร Boesenbergin A (BA) ในกระชายเหลือง มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็ง ชนิด human non-small cell lung cancer (A549) cells เกิดการ Apoptosis สาร panduratin A และ 4-hydroxypanduratin A สามารถยับยั้งเอนไซม์ dengue 2 virus NS3 protease ทำให้ dengue 2 virus ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (13) และสารฟลาโวนอยด์จากกระชายดำ ได้แก่ 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone และ 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Plasmodium falciparum* และ *Candida albicans* (14) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาถึงโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในเหง้ากระชายเหลือง และเหง้ากระชายดำ ซึ่งเป็นพืชตระกูลขิง แต่มีงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดโปรตีนจากพืชตระกูลขิงอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โปรตีน β -turmerin ในขมิ้น (*Curcuma longa*) และโปรตีนในขมิ้นชัน (*Curcuma comosa* Roxb.) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (15) โปรตีน Zingipain-1 ที่พบใน *Zingiber ottensii* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา (16) นอกจากนี้ ยังพบเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

(Superoxide dismutase, SOD) ในพืชวงศ์ขิงหลายชนิด เช่น ขมิ้นชัน (17) ว่านมหาเมฆ (18) ว่านชั้กมดลูก (15, 19) เป็นต้น

Superoxide dismutase หรือ SOD จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากเกินไปจนเกิดเป็นพิษ และเพื่อป้องกันการทำลายของเซลล์ (20) มีการนำ SOD มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น เป็นสารตัวกลางที่ช่วยต้านการอักเสบ จากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (21) เช่น โรคไขข้ออักเสบ โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และช่วยป้องกันผลข้างเคียงของยารักษา มะเร็ง (22)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำการศึกษาดังกล่าวถึงชนิดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่พบได้ (Proteomics) ในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ โดยเฉพาะการศึกษาด้วยเทคนิค Label-free proteomics ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยเทคนิค Label-free proteomics คือ GeLC - MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พร้อมทั้งวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณ SOD ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD staining activity พร้อมทั้งทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนในกระชายเหลืองและกระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay ซึ่งผลการทดลองที่ได้ อาจนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ การรักษา และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไปได้ในอนาคต

1.2 ปัญหาทางวิจัย

กระชายเหลืองและกระชายดำเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ขิง ที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น สารฟลาโวน (Flavone) สารชาโลโคน (Chalcone) น้ำมันระเหย (Essential oil) เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าน่าจะมีสารประเภทอื่นๆ ได้แก่ สารประเภทโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ ซึ่งเทคนิค 2D-GE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบัน แต่มีความยุ่งยาก ซับซ้อน ทำซ้ำได้ยาก ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกเทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics มาทดลองใช้ระบุชนิดและวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีน โดยใช้ 2 วิธี คือ GeLC - MS/MS และ Label-free LC-MS/MS เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีที่ใช้ ต่อการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ พร้อมทั้งเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่ต่างกัน โดยใช้วิธีวิเคราะห์วิธีเดียวกัน

ทำการยืนยันผลของการระบุชนิดโปรตีน SOD จากวิธี GeLC-MS/MS ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD-Staining Activity จากตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ และทำการหาปริมาณโปรตีน SOD ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากวิธีดังกล่าว โดยทำการศึกษา

ในตัวอย่างที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน รวมถึงศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนที่สกัดได้จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ เนื่องจากมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจาก Bioactive compounds ในพืชมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

ในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ มีโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางยาต่อไปในอนาคตได้ และเทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics ได้แก่ GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่พบในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำได้

ในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำน่าจะมีโปรตีน SOD เช่นเดียวกับพืชตระกูลขิงชนิดอื่น จึงน่าจะตรวจพบโปรตีน SOD จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD-Staining Activity ได้

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจาก Bioactive compounds ในพืชมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน ดังนั้น โปรตีนที่สกัดได้จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่ต่างกันน่าจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันด้วย

1.4 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนที่สกัดได้จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ที่ศึกษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน คือ GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พร้อมทั้งระบุหน้าที่ของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS
3. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ SOD จากโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD staining activity
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน โดยวิธี ABTS assay

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ โดยเก็บตัวอย่างเหง้ากระชายเหลืองจากแหล่งเพาะปลูกเดี่ยว คือ อ.เมือง จังหวัดนครปฐม และเก็บตัวอย่างเหง้ากระชายดำจากแหล่งเพาะปลูกเดี่ยว คือ อ.เขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ทำการสกัดโปรตีนด้วยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำการเปรียบเทียบชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน คือเทคนิค GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS เพื่อศึกษาผลของการใช้เทคนิคที่แตกต่างกันในการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนจากตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวในเวลาต่างกัน โดยใช้เทคนิค Label-free LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ ทำการยืนยันการตรวจพบโปรตีน Superoxide Dismutase (SOD) ที่พบจากการระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธี GelC-MS/MS ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD staining activity และทำการวิเคราะห์ปริมาณ SOD และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่ต่างกัน

1.6 กรอบแนวความคิด

เทคนิค Two Dimensional-Gel Electrophoresis (2D-GE) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณของโปรตีนในเซลล์พืช เซลล์สัตว์ เซลล์เพาะเลี้ยง และงานวิจัยทางคลินิก แต่เทคนิค 2D-GE เป็นเทคนิคที่มี variation สูงระหว่างเจลแต่ละเจล วิเคราะห์ได้ในช่วง dynamic range ที่จำกัด ไม่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์โปรตีนที่มีความเป็น hydrophobic หรือโปรตีนที่มีค่า pI น้อยกว่า 3 หรือ มากกว่า 10 ได้ และปริมาณของโปรตีนที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับความไวของสีย้อมที่ใช้ อีกทั้งยังใช้เวลานานในการวิเคราะห์

เทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics ได้แก่ GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS เป็นเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาและนำมาใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณของโปรตีน เพื่อใช้แทนเทคนิค 2D-GE มีการนำไปใช้ทั้งในการศึกษาวิจัยทางคลินิก เซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่สกัดด้วยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งยังไม่มีผู้ศึกษาวิจัยมาก่อน โดยทำการเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน คือ GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พร้อมทั้งใช้เทคนิค Label-free LC-MS/MS ในการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนจากตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่ต่างกัน และทำการยืนยันประสิทธิภาพในการระบุชนิดโปรตีนที่ได้

จากวิธี GelC- MS/MS โดยทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase (SOD) ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD staining activity

จากการศึกษาวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจาก Bioactive compounds ในพืชมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ ปริมาณ SOD และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้า กระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่ต่างกันด้วย

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเทคนิค GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS มาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดโปรตีนในตัวอย่างพืช คือ เหง้ากระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำ

2. สามารถนำเทคนิค Label-free LC-MS/MS มาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างพืช คือ เหง้ากระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำ ได้

3. ทราบความแตกต่างของการใช้เทคนิค GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS ในการระบุชนิดของโปรตีนในตัวอย่างพืช คือ เหง้ากระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำ

4. ทำให้ทราบว่าช่วงระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเหง้ากระจายเหลืองและเหง้ากระจายดำที่ต่างกัน จะส่งผลต่อชนิด ปริมาณโปรตีน และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันด้วย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 โพรตีโอมิกส์ (Proteomics)

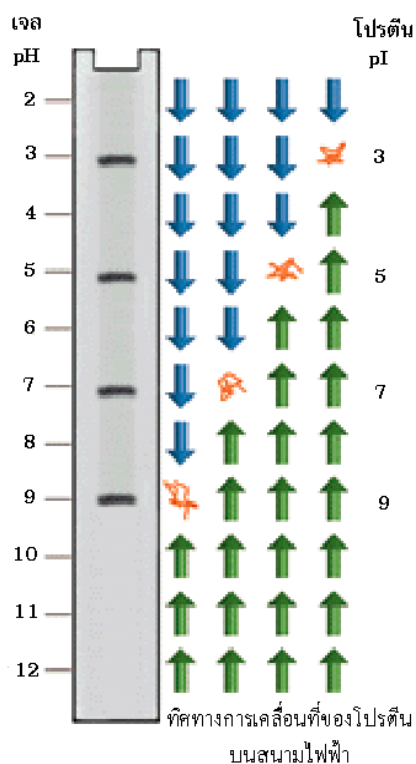
Proteomics คือการศึกษาวิจัยโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ ทั้งการระบุชนิดและหาปริมาณของโปรตีน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น การหา Biomarkers ของโรค การอธิบายถึงกลไกการเกิดโรค เป็นต้น โดยใช้เทคนิค Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2D-GE) ร่วมกับ Mass spectrometry (23) หรือการใช้เทคนิค Mass spectrometry เพียงอย่างเดียว ซึ่งแบ่งเป็น Isotope Labeling Technique และ Label-free Technique

2.1.1 เทคนิค Two Dimensional-Gel Electrophoresis (2D-GE)

เทคนิค 2D-GE เป็นการแยกโปรตีนที่อาศัย 2 มิติในการแยกโปรตีน มิติที่ 1 ได้แก่ Isoelectric Focusing (IEF) เป็นการแยกโปรตีนตามค่า pI ของโปรตีนแต่ละชนิด มิติที่ 2 ได้แก่ แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลพอลิอะคริลามิเดที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นการแยกตามขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีน

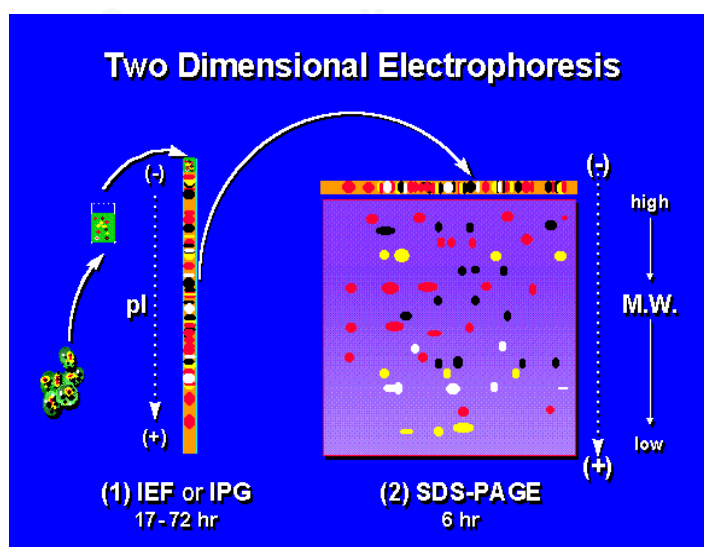
2.1.1.1 Isoelectric Focusing (IEF)

เทคนิค Isoelectric Focusing (IEF) เป็นการแยกโดยเน้นประจุเป็นกลางในสนามไฟฟ้า (IEF) โดยทั่วไปเรียกว่า อิเล็กโทรโฟกัสซิง (Electrofocusing) เป็นการแยกโมเลกุลที่มีประจุแตกต่างกัน สำหรับการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้ โปรตีนผสมต้องอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยใช้ตัวค้ำจุนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย (Inert support) โดยการแปรผันความแตกต่างของค่า pH ทำให้บริเวณขั้วบวก (Anode) มีค่า pH ต่ำกว่าบริเวณขั้วลบ (Cathode) และช่วงค่าความเป็นกรด-เบสที่เลือกใช้ต้องรวมถึงค่า pH ที่โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (Isoelectric point, pI) ของโปรตีนที่สนใจ โดยโปรตีนที่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI จะมีประจุเป็นบวกและเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ เมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ไปจะทำให้ค่า pH ลดลงจนกระทั่งค่า pH เท่ากับค่า pI ทำให้มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ และโปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่ ในทางตรงกันข้ามเมื่อโปรตีนมีค่า pH สูงกว่าค่า pI โปรตีนจะมีประจุเป็นลบและเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ดังนั้น โปรตีนแต่ละชนิดจึงเคลื่อนเป็นแถบเข้าขั้วไฟฟ้า และไปหยุดที่ค่า pH เท่ากับค่า pI ซึ่งจะทำให้ประจุสุทธิเท่ากับศูนย์ (24)



ภาพที่ 1 การเคลื่อนที่ของโปรตีนภายใต้สนามไฟฟ้า เมื่อค่า pH เท่ากับค่า pI โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์และหยุดเคลื่อนที่ เห็นเป็นแถบปรากฏอยู่บนเจล (24)

สำหรับการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ (SDS-PAGE) จะอธิบายในหัวข้อถัดไป

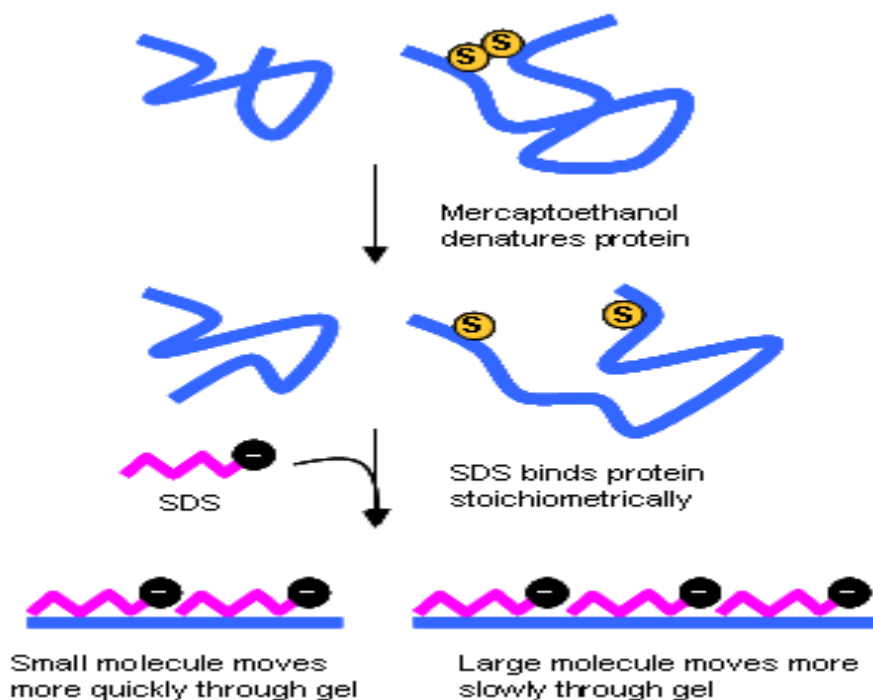


ภาพที่ 2 เทคนิคการแยกโปรตีน Two Dimensional-Gel Electrophoresis (25)

2.1.1.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE เป็นการวิเคราะห์โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบน Polyacrylamide gel ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ เพื่อใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด โดย SDS เป็น Detergent ที่มีประจุลบไปเกาะกับโปรตีนทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ นอกจากนี้ SDS ยังทำให้โปรตีนเสียสภาพ เปลี่ยนโครงสร้างจาก Tertiary structure ไปเป็น Primary structure โปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วยเกาะกันอยู่ ก็จะแยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย และ SDS จะจับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ตลอดทั้งเจล ดังนั้น การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนทุกตัว จึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว ไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้อง โดยจะเป็นการเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ซึ่งหมายความว่าความสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว โดย Polyacrylamide gel เกิดจากปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลเดี่ยว (Monomer) ของ Acrylamide จนได้เป็นสายโซ่ยาวและเชื่อมกันเป็นโครงข่ายด้วยพันธะโคเวเลนต์ มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Ammonium persulfate และ N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) โดย TEMED จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจาก Persulfate ทำให้เกิดการโพลิเมอร์ไลซชัน ปฏิกิริยาดังกล่าว ทำให้ได้โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูพรุน รูพรุนของ Polyacrylamide gel จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ Acrylamide ในส่วนผสมของเจล เช่น ถ้าความเข้มข้นของ Acrylamide ต่ำ ขนาดของรูพรุนจะใหญ่ ซึ่งเหมาะสำหรับแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ วิธีการทำ SDS-PAGE มีความแตกต่างกันบ้างในแต่ละวิธี เช่น วิธีของ Weber และ Osborne เป็นแบบ continuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ phosphate buffer ส่วนวิธีของ Laemmli เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากและใช้ในการวิจัยครั้งนี้ โดยทำในรูปของ Slab gel เป็นแบบ Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis ประกอบด้วย Stacking gel buffer, Resolving gel buffer และ Running buffer วิธี Discontinuous gel electrophoresis เป็นวิธีที่ Gel buffer และ Running buffer จะเกิดการรวมตัวกัน และช่วยในการทำให้ตัวอย่างที่เคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้ารวมตัวอัดแน่นและเข้มข้น นอกจากนี้ Stacking gel ที่ %T ต่ำจะช่วยในการรวมตัวอัดแน่นกันของตัวอย่าง ส่วน Resolving gel สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงค่า %T ได้ตามความต้องการขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการแยก สำหรับการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้น ตัวอย่างโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 2 - 5 นาที ในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอ และมีสารประเภทไทออล (Thiol) เป็นองค์ประกอบ เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ในโปรตีน ภายใต้ภาวะดังกล่าว โปรตีนส่วนใหญ่จะเกาะกับ SDS ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ ทำ

ให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ และเคลื่อนที่จากขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวก ในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก ก็จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า ในขณะที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เมื่อยอมด้วยสี เช่น สีคูแมซีบลู (Coomassie Blue) ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้น และสามารถนำโปรตีนบนเจลไปศึกษาต่อได้ (10)



ภาพที่ 3 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นเหยียดและมีประจุลบ

(26)

เทคนิค 2D-GE เป็นเทคนิคที่แยกชนิดของโปรตีนตามประจุและขนาดของโปรตีน ทำให้ 2D-GE ช่วยให้แยกโปรตีนได้ดีกว่าการแยกด้วยขนาดของโปรตีน หรือ SDS-PAGE เพียงอย่างเดียว (27) แต่ 2D-GE มีข้อจำกัด เช่น ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ยากต่อการทำซ้ำ (low reproducibility) ความไว (sensitivity) ขึ้นกับสีย้อมที่ใช้ การแปลผลค่อนข้างยุ่งยาก เมื่อนำมาใช้วิเคราะห์โปรตีนในเซลล์พืช จะให้ resolution ต่ำ นอกจากนี้เทคนิค 2D-GE ไม่สามารถใช้แยกโปรตีนที่มีค่า pI ไม่อยู่ในช่วงของ pH 3-10 ได้ และถ้าต้องการทราบชนิดของโปรตีนจะต้องทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass spectrometry ต่อไป

นอกจากเทคนิค 2D-GE แล้ว ยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาเพื่อหาปริมาณโปรตีน คือ การติดฉลากโปรตีนด้วยสารรังสี (Stable isotope labeling) และเทคนิคที่ไม่ต้องติดฉลากโปรตีนด้วยสารรังสี Label-free quantitative proteomics (8) เทคนิคการติดฉลากด้วยสารรังสี (Isotope

labeling) เช่น Isotope-Coded Affinity Tag (ICAT), Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC), $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ metabolic labeling, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ enzymatic labeling, Isotope-Coded Protein Labeling (ICPL), Tandem Mass Tags (TMT), Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ) และ Chemical labeling เป็นต้น (9) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัด เช่น ต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ การเตรียมตัวอย่างยุ่งยากซับซ้อน น้ำยาที่ใช้มีราคาสูง การติดฉลากไม่สมบูรณ์ และอาจเกิดการ cross contamination ระหว่างสารรังสีและตัวอย่าง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry ทำให้แปลผลผิดพลาด นอกจากนี้สารรังสีบางชนิดยังเป็นสารก่อมะเร็ง เมื่อเทียบกับเทคนิคที่เรียกว่า Label-free quantitative proteomics ซึ่งเป็นเทคนิค mass spectrometry ที่ไม่ต้องติดฉลากด้วยสารรังสี เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Isotope Labeling พบว่า ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เร็วกว่า ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากสำหรับการเตรียมตัวอย่าง ง่ายต่อการวิเคราะห์ผล และไม่มีความเสี่ยงต่อสารรังสีสำหรับผู้ทำการวิเคราะห์ (10)

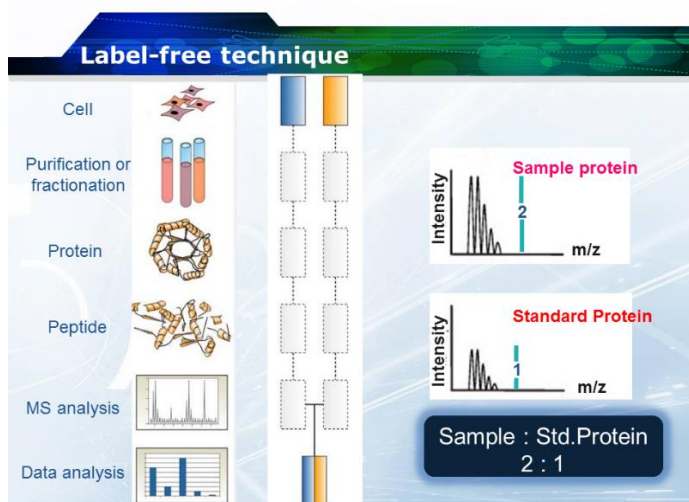
2.1.2 เทคนิค Label-Free Quantitative Proteomics

เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของโปรตีนที่พบในเซลล์ได้ โดยไม่ต้องทำการติดฉลาก (label) โปรตีนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วยสารรังสี หรือสารที่เสถียรอื่นๆ แต่สามารถนำโปรตีนที่สกัดได้มาตรวจวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) (28) ด้วยเทคนิค Mass Spectrometry ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของสารตัวอย่าง และสามารถระบุชนิดได้เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล เทคนิค Label-free quantitative proteomics ประกอบด้วย 2 เทคนิค คือ Label-free LC-MS/MS และ GeLC-MS/MS

2.1.2.1 Label-free LC-MS/MS

มีขั้นตอนในการศึกษา คือ เซลล์ที่ต้องการศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ (proteomics) จะถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการสกัดโปรตีน จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีต่างๆ เช่น BCA assay, Lowry assay, Bradford assay เป็นต้น จากนั้นทำการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้เป็นสายเปปไทด์สั้นๆ และทำการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (29) เพื่อทำการระบุชนิดของโปรตีนโดยทำการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลสำหรับการหาปริมาณโปรตีน ทำโดยการเปรียบเทียบตัวอย่างกับสารมาตรฐานโปรตีน โดยหลักการที่ว่าปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนไปก็จะส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ทาง Chromatography และ Mass Spectrometry เปลี่ยนไปด้วย นั่นคือ Peak areas, Peak heights และ Ion intensity ที่เปลี่ยนไปโดยใช้สารมาตรฐานโปรตีนเป็นตัว Normalize ผลการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่ยุ่งยาก ลดขั้นตอนในการทำ พร้อมทั้งสามารถแปลผลได้ง่าย เมื่อเทียบกับวิธีติดฉลากด้วยสารเคมี หรือทำการหาปริมาณ

โปรตีนโดยเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนระหว่างตัวอย่างเดียวกันในสถานะที่ต่างกัน เพื่อดูว่ามีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างไร ปัจจุบันมีงานวิจัยที่นำเทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics ไปใช้ตรวจวิเคราะห์โปรตีน ทั้งในเซลล์สัตว์ เซลล์พืช และเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเทคนิคนี้สามารถนำไปวิเคราะห์หา Biomarker ในเซลล์มะเร็งเต้านม (11) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ ในด้าน Cell culture มีการใช้เทคนิค Label-free LC-MS/MS เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของโปรตีน (neurotrophic factor) ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ Retinal Muller glial (RMG) cells ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคของจอตา (Retinal disease) ที่เพาะเลี้ยงในวันที่ 14 และวันที่ 21 ทำให้ทราบวาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณและชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย (28) และในด้าน Clinical มีการใช้เทคนิค Label-free LC-MS/MS สำหรับวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จาก *Escherichia coli* strains ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาต่อไปในอนาคต สำหรับการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย (12)



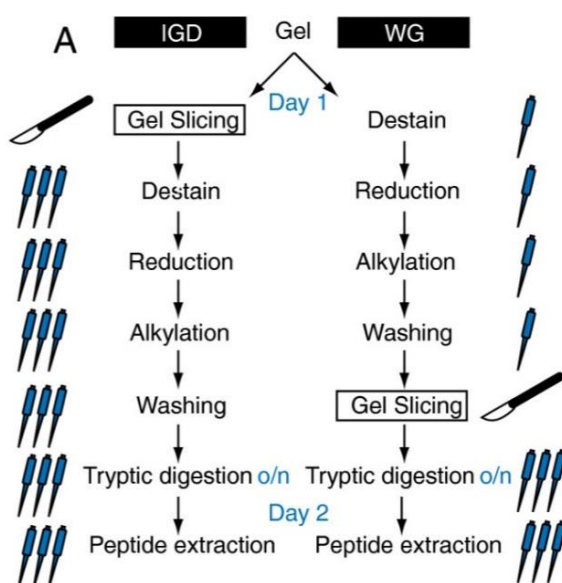
ภาพที่ 4 เทคนิค Label-Free LC-MS/MS (28)

2.1.2.2 เทคนิค GeLC- MS/MS

เทคนิค GeLC- MS/MS ไม่มีการติดฉลากสารรังสีหรือสารอื่นๆ เช่นเดียวกับวิธี Label-free LC-MS/MS แต่มีขั้นตอนเพิ่มเติม คือ ต้องมีการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และนำไปย้อมด้วยสี เช่น คูแมซีบลู (Coomassie Blue) จากนั้นตัดแผ่นเจลที่ได้เป็นชิ้นๆ ย่อยแผ่นเจลที่ตัดได้ทั้งหมดด้วยเอนไซม์ที่ต้องการ ก่อนจะนำไปเทดที่ย่อยได้เจลทั้งหมดไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อระบุชนิดของโปรตีนและปริมาณของโปรตีน โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล (30) วิธีนี้มีข้อดี คือไม่เสี่ยงต่อการสัมผัสกับสารรังสีหรือสารอันตรายอื่นๆ และมีขั้นตอนที่ยุงยากน้อยกว่าเทคนิค 2D-GE และใช้ระยะเวลาสั้นกว่า ประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า Reproducibility สูงกว่า สามารถทำซ้ำได้ แต่มีข้อเสีย คือประสิทธิภาพ

ในการแยกโปรตีนไม่ตีเท่า 2D-GE เพราะเป็นการแยกโปรตีนด้วยมิติเดียวเท่านั้น แต่ 2D-GE เป็นการแยกโปรตีนด้วย 2 มิติ สำหรับเทคนิค 2D-GE จะมี Reproducibility ต่ำ และเหมาะกับการวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่างที่มีปริมาณมากกว่า

หลักการของ GeLC-MS/MS คือ เทคนิคนี้จะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอนหลักๆ คือ SDS-PAGE และ LC-MS/MS โดยเริ่มจากสารสกัดโปรตีนจะถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า หรือ SDS-PAGE ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบน Polyacrylamide gel ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบ โดยแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด จากนั้นแต่ละโปรตีนในแต่ละ Lane ในเจล จะถูกตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ และทำการย่อยชิ้นเจลที่ตัดได้ทั้งหมด ด้วยวิธี In gel digestion และทำการวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยข้อมูลที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยรวมเอาข้อมูลของแผ่นเจลที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มารวมกันในแต่ละ Lane เพื่อระบุชนิดและปริมาณของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง โดยขั้นตอน In gel digestion จะประกอบไปด้วย Gel slicing, Destain, Reduction, Alkylation, Washing, Tryptic digestion และ Peptide extraction (31)



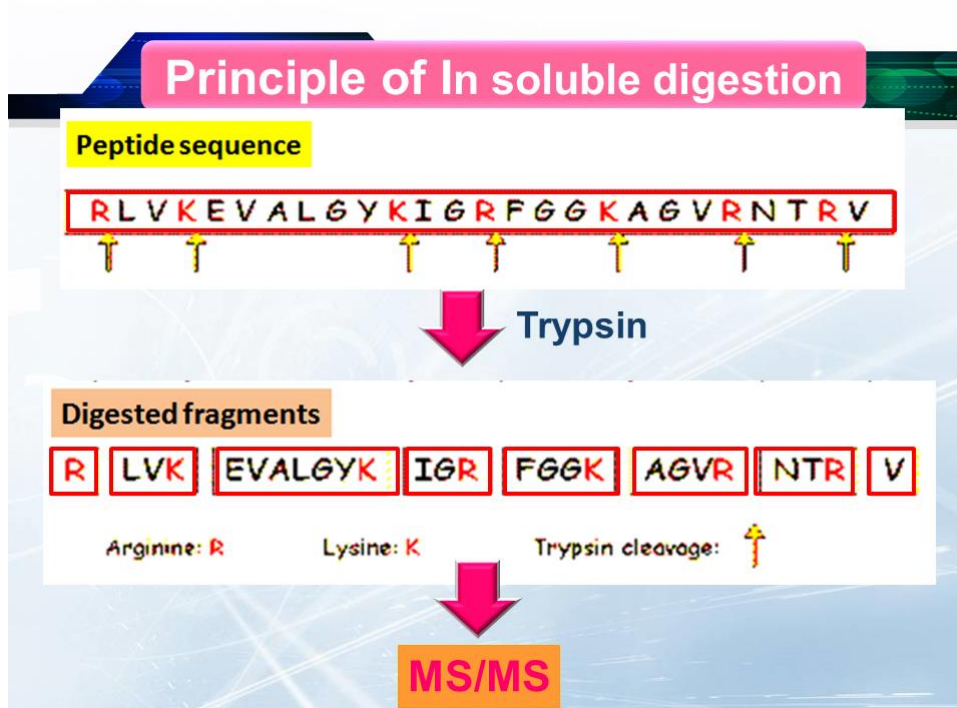
ภาพที่ 5 หลักการของ GeLC-MS/MS ได้แก่ การย่อยแผ่นเจลเล็กๆที่ตัดแล้ว หรือ In gel digestion (IGD) และ การตัดและย่อยเจลทั้งแผ่น หรือ Whole gel (WG) (31)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ของ Fatantoni S. และคณะในปี ค.ศ. 2010 พบว่า มีการนำ GeLC-MS/MS มาประยุกต์ใช้ในการหา Biomarkers ในน้ำไขสันหลัง หรือ Cerebrospinal fluid (CSF) ในคนปกติและคนที่เป็นโรคทางพันธุกรรม ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโรค Brain neoplatic และ Neurological disease โดยพบว่าในคนปกติ พบโปรตีนทั้งหมด 884 ชนิดในน้ำไขสันหลัง แต่

สำหรับในคนที่เป็นโรคที่เกี่ยวข้กับการบกพร่องทางพันธุกรรม ได้แก่ โรค IgY-based affinity depletion และ MARS-based affinity depletion พบว่า พบโปรตีน 703 และ 767 ชนิดตามลำดับ (32) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Paulo J.A. และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 โดยการใช้เทคนิค GelC-MS/MS เพื่อระบุชนิดและปริมาณของโปรตีนใน gastroduodenal fluid ที่เก็บจากการส่องกล้องในทางเดินอาหาร หรือ endoscopic pancreatic function test (ePFT) เพื่อศึกษาความผิดปกติของการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในโรคที่เกี่ยวข้กับกระเพาะอาหาร ได้แก่ peptic ulcer disease และ gastric cancer โดยพบว่ามโปรตีนทั้งหมด 134 ชนิด ที่เป็น unique proteins (33) และยังมี การศึกษาของ Paulo J.A. และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 โดยศึกษาชนิดและปริมาณของโปรตีนทางด้านคลินิก โดยเก็บตัวอย่างจากการส่องกล้อง ePFT-collected pancreatic fluid และเก็บตัวอย่างที่ เรียกว่า Pancreatic Fluid ในผู้ป่วยที่เป็น Chronic Pancreatitis โดยพบว่า ชนิดและปริมาณของ โปรตีนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เป็นโรคจะแตกต่างกัน พบว่ามีโปรตีน 257 และ 413 ชนิดตามลำดับ (34) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาชนิดและปริมาณของโปรตีนในการเก็บแบบ ePFT อีกมากมายในผู้ป่วย ที่เกี่ยวข้กับระบบทางเดินอาหาร (35, 36) รวมถึงมีการศึกษาของ Becher D. และคณะในปี ค.ศ. 2009 โดยทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนในเชื้อก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* โดยพบโปรตีนทั้งหมด มากกว่า 1,700 ชนิด โดยวิจัยครั้งนี้ พบว่า จะเป็น ประโยชน์สำหรับการรักษาเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะต่อไปในอนาคตได้ (37) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค GelC-MS/MS ศึกษาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโปรตีนในเชื้อก่อโรค ได้แก่ เชื้อ Wild-Type Serogroup B *Neisseria meningitides* เป็นต้น (38)

2.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Trypsin (Trypsin Digestion)

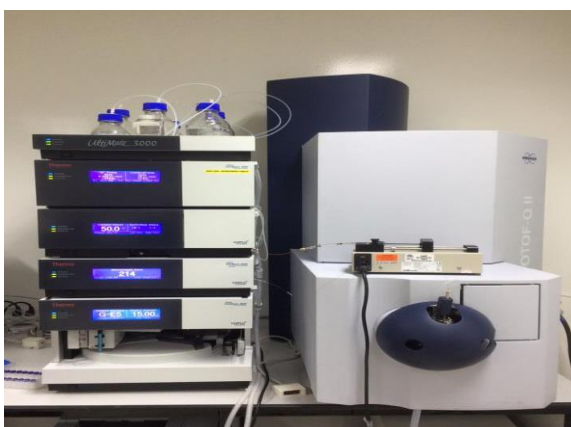
เอนไซม์ Trypsin จะทำการตัดพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) อย่างจำเพาะหลังหมู่ฟังก์ชัน คาร์บอกซิลชนิด Arginine และ Lysine เนื่องจากการกระจายทางชีวภาพของหมู่ Arginine และ Lysine ทำให้ตัดได้เปปไทด์ที่มีขนาดเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Mass Spectrometry อัตราการย่อยสลายเปปไทด์จะลดลง ถ้ากระอะมิโนตัวถัดไปเป็น Acidic amino acids และถ้ามีกรดอะมิโน Proline อยู่ที่ด้าน C-terminal ของ Trypsin จะไม่มีการตัดเกิดขึ้น (11)



ภาพที่ 6 หลักการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Trypsin (39)

2.3 ลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเต็มแมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS)

เครื่องมือ LC-MS/MS จะประกอบด้วย 2 ส่วนที่เชื่อมต่อกัน ได้แก่ เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นเครื่องที่ใช้แยกสารประกอบในตัวอย่าง จะเชื่อมต่อกับ Mass spectrometer ซึ่งก็คือ tandem MS หรือ MS/MS เป็นเครื่องที่เป็นตัวตรวจวิเคราะห์สารที่พบในตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างสาร ซึ่งส่วนของ Ionizer จะใช้เทคนิค Electrospray Ionization (ESI) ส่วนของ Mass Analyzer จะใช้เทคนิค Quadrupole ที่เชื่อมต่อกับ Time of Flight (TOF)



ภาพที่ 7 เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี แทนเต็มแมสสเปกโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS)

2.3.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

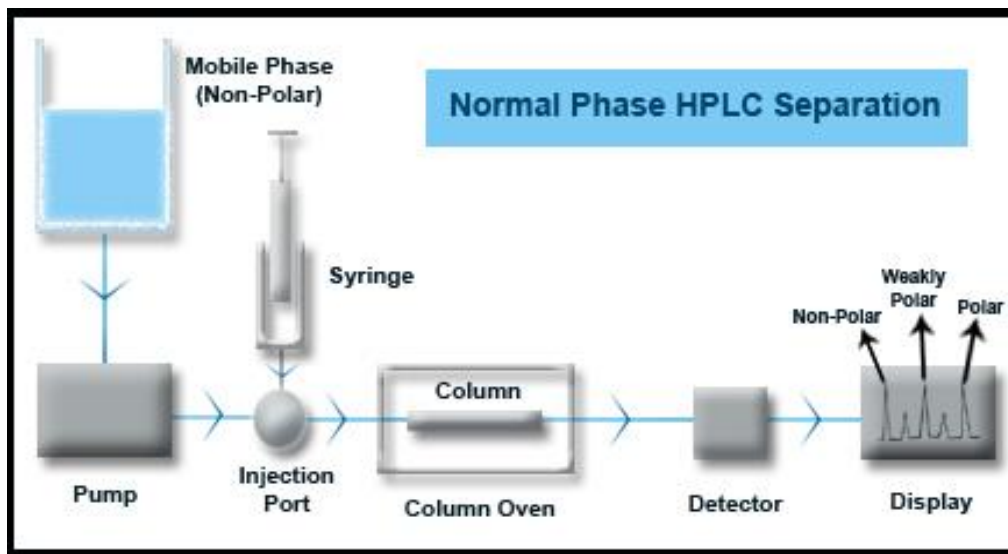
HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับแยกสารที่สนใจซึ่งละลายอยู่ในสารละลายผสม กระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส โดยอาศัยความดันสูงในการช่วยดันของเหลวผ่านตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ หรือ Stationary phase คือ สารที่บรรจุในคอลัมน์ (Column) กับเฟสเคลื่อนที่ หรือ Mobile phase ที่เป็นของเหลวตัวทำละลายอินทรีย์ (40) โดยตัวอย่างจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความสามารถในการเข้ากันได้ของสารนั้นกับ Mobile phase หรือ Stationary phase ซึ่งขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ (specificity) การดูดซับ (adsorption) การละลาย (solubility) ของตัวอย่าง (41) จึงทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน และเมื่อแยกสารตัวอย่างได้แล้ว สารนั้นจะเข้าสู่ส่วนของ Mass spectrometry เพื่อวิเคราะห์สารแต่ละชนิดที่แยกออกมาได้

ชนิดของ Liquid Chromatography แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

1. **Liquid-solid chromatography** หรือ Adsorption chromatography เป็นการแยกสารโดย Mobile phase เป็นของเหลว และ Stationary phase เป็นของแข็ง

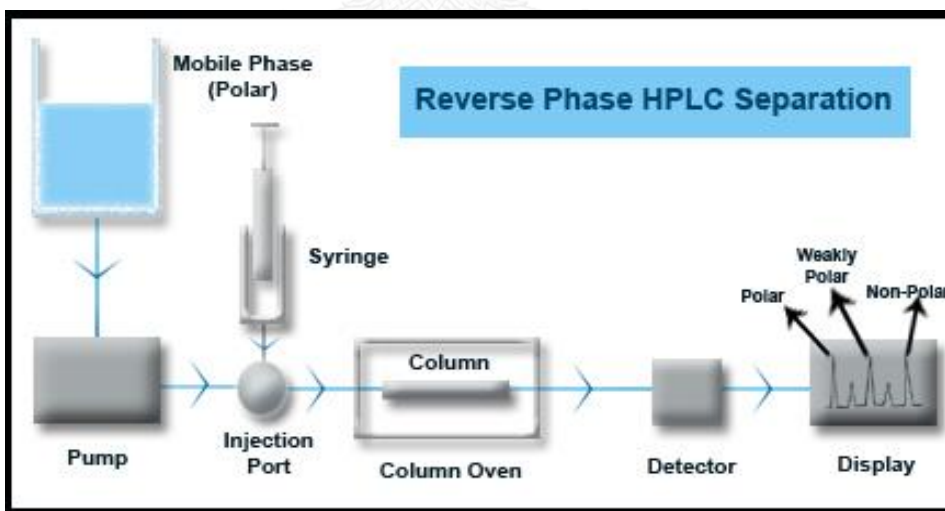
2. **Liquid-liquid chromatography** หรือ Partition chromatography เป็นการแยกสารโดย Mobile phase เป็นของเหลว และ Stationary phase เป็นของเหลว โดยอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างของการละลายของตัวอย่างระหว่าง Mobile phase และ Stationary phase ซึ่งนิยมใช้แยกสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันออกจากกัน เช่น การแยกกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ออกจากกัน ซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบ

2.1 **Normal phase chromatography** โดย Stationary phase จะมีสภาพที่เป็นขั้วสูง เพื่อแยกสารที่มีสภาพขั้วสูงออกจากกัน และใช้ Mobile phase ที่มีสภาพขั้วต่ำกว่า ดังนั้น สารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะถูกแยกออกมาก่อนเพื่อไล่สารต่างๆ ออกจากคอลัมน์ และสารที่มีสภาพขั้วสูงๆ จะถูกแยกออกมาทีหลัง (42)



ภาพที่ 8 หลักการ Normal phase chromatography (43)

2.2 Reversed phase chromatography โดย Stationary phase จะมีสภาพที่เป็นขั้วต่ำ เช่น สารอินทรีย์ประเภท n-alkyl ซึ่งมีคาร์บอน 8 หรือ 18 โมเลกุล เพื่อเป็นการแยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำออกจากกัน และใช้ Mobile phase ที่มีสภาพขั้วสูงกว่าไล้สารที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ ดังนั้น สารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะถูกแยกออกมาก่อนเพื่อไล้สารต่างๆออกจากคอลัมน์ โดยสารที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าจะออกมาช้ากว่า (42)



ภาพที่ 9 หลักการ Reversed phase chromatography (43)

องค์ประกอบของ HPLC

1. **Pump** มีหน้าที่สูบของเหลวซึ่งเป็น Mobile phase ให้ไหลเข้าไปในคอลัมน์ด้วย อัตราเร็ว 0.5-10 มล./นาที แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดไซริงก (syringe type) ชนิดแทนทีของเหลว (reciprocating piston type) และ ชนิดความดันคงที่ (constant pressure pump)

2. **Injector** เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5-10 ไมโครลิตร สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดไซริงก และ ชนิดโรตารี (rotary type)

3. **Column** อาจทำจากแก้ว พลาสติก หรือเหล็กกล้าไร้สนิม มีความยาวในการใช้งานตั้งแต่ 10-150 เซนติเมตร

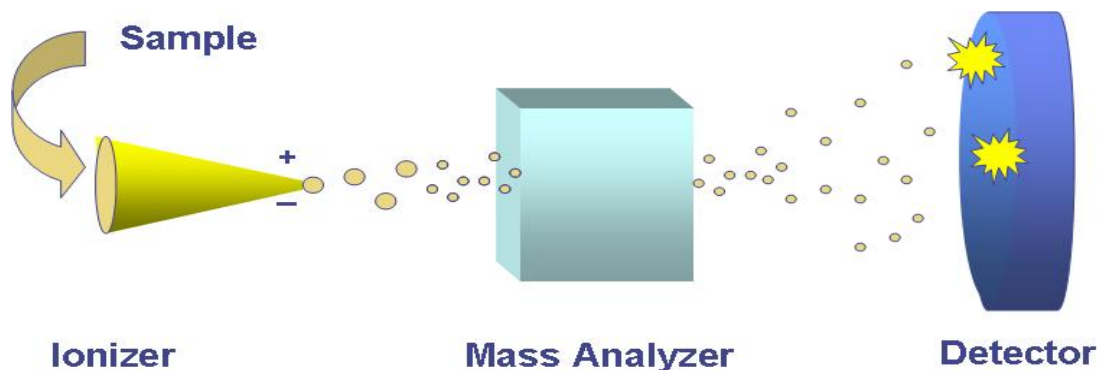
4. **Detector** มีหน้าที่วัดปริมาณของสาร มีหลายชนิด เช่น ตัวไวแสง (Photo detector) ใช้สำหรับการวัดสารที่มีสีหรือมีความขุ่น ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence detector) ใช้สำหรับวัดปริมาณสารที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ และ Mass spectrometer ใช้สำหรับวัดปริมาณขนาดของไอออนของสารที่อยู่ในสารตัวอย่าง

5. **Data processor** มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเครื่องมือ และประมวลผล

2.3.2 Mass spectrometry

Mass spectrometry เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (mass to charge, m/z) ของไอออนของตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์แตกตัวเป็นไอออนหรือเกิดกระบวนการ ionization เทคนิคนี้กำลังได้รับความสนใจ และนำไปใช้ในการศึกษาด้านต่างๆ เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ สิ่งแวดล้อม การผลิตโพลิเมอร์ การตรวจสอบด้านนิติวิทยาศาสตร์ การประยุกต์ใช้ด้านชีวเคมีคลินิก เป็นต้น (44)

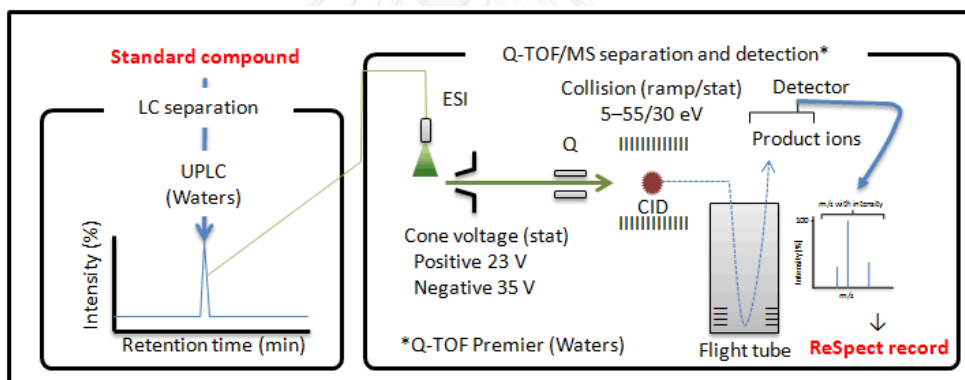
หลักการ Mass spectrometry เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณและระบุชนิดของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยเปลี่ยนสารตัวอย่างให้เป็นไอออน หรือเกิดกระบวนการ Ionization ในส่วนประกอบแรกของเครื่องมือที่เรียกว่า ส่วนผลิตไอออน (Ionizer) โดยมีวิธีการเปลี่ยนสารตัวอย่างหลายวิธี เช่น Electrospray (ESI) หรือ MALDI เป็นต้น เมื่อสารตัวอย่างเปลี่ยนไปเป็นไอออนแล้วจะผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyzer) ที่มีหลายประเภท เช่น Ion Trap (IT), Quadrupole (Q), Time of Flight (TOF) เป็นต้น และส่วนประกอบสุดท้าย คือ ส่วนตรวจวัด (Detector) ทำหน้าที่เป็นฉากรับเมื่อมีไอออนมาตกกระทบเพื่อส่งข้อมูลไปยังส่วนประมวลผล ได้แก่ ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม เพื่อจะแสดงผลออกมาในกราฟที่มีชื่อเรียกเฉพาะว่า แมสสเปกตรัม



ภาพที่ 10 หลักการ Mass spectrometry

Electrospray-Quadrupole-Time of Flight Mass spectrometry (ESI-Q-TOF-MS)

ESI-Q-TOF ประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนของ Ionizer ได้แก่ Electrospray ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็นไอออน และในส่วนของ Mass analyzer ได้แก่ Quadrupole และ Time of Flight (TOF) ซึ่งเป็นส่วนที่วิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลและโครงสร้างของสารตัวอย่าง และส่วนที่ 3 คือส่วนของ Detector เป็นส่วนที่แปลงสัญญาณ



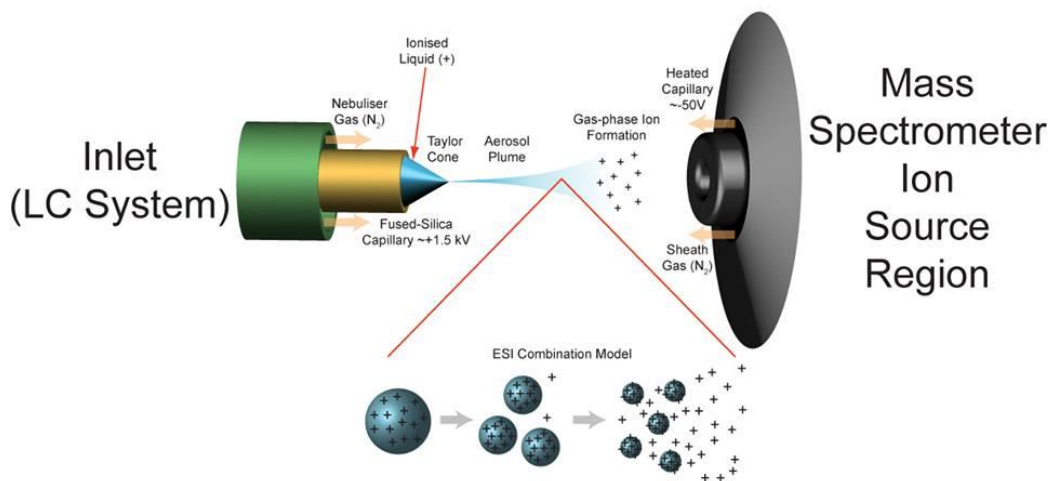
ภาพที่ 11 หลักการของเครื่อง HPLC ที่ต่อกับ ESI-Q-TOF-MS (45)

หลักการของ Electrospray ในส่วนของ Ionizer

เทคนิค Electrospray Ionization (ESI) จะใช้กับสารตัวอย่างที่อยู่ในรูปของสารละลาย เมื่อสารละลายผ่านออกจากระบบ HPLC จะเข้าสู่ Capillary tube ซึ่งจะมีการให้ค่าศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงประมาณ 4000 กิโลโวลต์ (ความต่างศักย์ 3-5 กิโลโวลต์) (46) ที่ปลาย Capillary tube ทำให้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าความแรงสูง เมื่อสารละลายผ่านออกจากปลาย Capillary tube จึงมีลักษณะเป็นหยดของเหลวที่มีประจุอยู่ที่ผิว และเมื่อเกิดการระเหยของหยดของเหลว (Solvent Evaporation) ทำให้หยดของเหลวมีขนาดเล็กลง ประจุจะเข้าใกล้กันมากขึ้น เกิดการแตกกระจายเป็นไอออน (Ion Evaporation) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการแตกตัวแบบ Soft ionization คือจะไม่เห็น pattern การ Fragment ของ Parent ion แต่จะเห็นโมเลกุลของ Parent ion ที่ชัดเจน เหมาะกับการวิเคราะห์

สารตัวอย่างพวกโปรตีน เปปไทด์ น้ำตาล หรือสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โพลีเมอร์ โดย ESI เป็น Interface ที่เหมาะกับสารที่มีขั้วหรือประจุ ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 100-150,000 ดาลตัน

Electrospray Ionisation (ESI) and Ion Source Overview

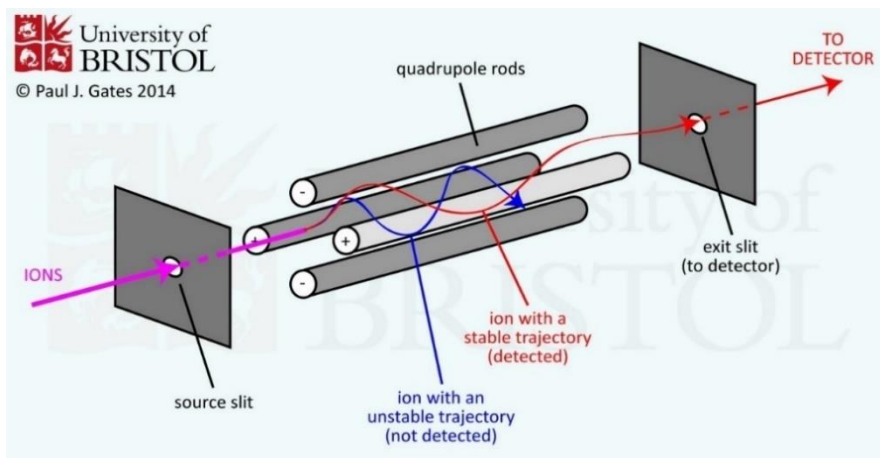


ภาพที่ 12 หลักการของ Electrospray Ionization (47)

หลักการของ Quadrupole ในส่วนของ Mass analyzer

Quadrupole เป็นส่วนของ mass analyzer ที่ใช้ค่าศักย์ไฟฟ้าและคลื่นความถี่วิทยุในการจำแนกมวลของไอออน เป็นการแยกไอออนเฉพาะไอออนที่สนใจ โดยจะวิเคราะห์มวลของประจุได้ในช่วงน้อยกว่า 2000 m/z แต่ถ้ามวลของประจุมากกว่า 2000 m/z จะไม่สามารถวิเคราะห์ด้วย Quadrupole ได้ โดยการวิเคราะห์สามารถเลือกโหมดเป็นแบบ Fix หรือ Scan โดยการเลือกโหมดวิเคราะห์แบบ Fix คือเลือกเฉพาะไอออนที่สนใจไอออนใดไอออนหนึ่งให้เข้าสู่ Quadrupole ส่วนการโหมดการวิเคราะห์แบบ Scan คือให้ไอออนทั้งหมดผ่านเข้ามา เช่น 0 - 2,000 m/z

หลักการ Quadrupole ประกอบไปด้วยแท่งโลหะทรงกระบอก 4 แท่ง โดยการให้ไฟฟ้าขั้วบวกและขั้วลบอยู่ในแท่งโลหะคู่ตรงกันข้าม รวมทั้งการให้ความถี่วิทยุความถี่สูงและความถี่ต่ำในอีกคู่ตรงกันข้ามกัน ซึ่งในระบบจะมีการเปลี่ยนแปลงของขั้วบวกและขั้วลบ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของความถี่วิทยุที่สูงและต่ำ เมื่อในระบบเป็นขั้วบวก ไอออนบวกที่ผ่านเข้ามาจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ส่วนของ TOF เนื่องจากเกิดแรงผลักกัน ในขณะที่ไอออนลบที่ผ่านเข้ามา จะจับกับขั้วบวกนั้นไว้และไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านไปได้ และเมื่อเปลี่ยนขั้วไฟฟ้าในระบบเป็นขั้วลบ ไอออนบวกจะจับกับขั้วลบนั้นไว้ และไอออนลบจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่ส่วนของ TOF ต่อไปเนื่องจากเกิดแรงผลักกัน (48)

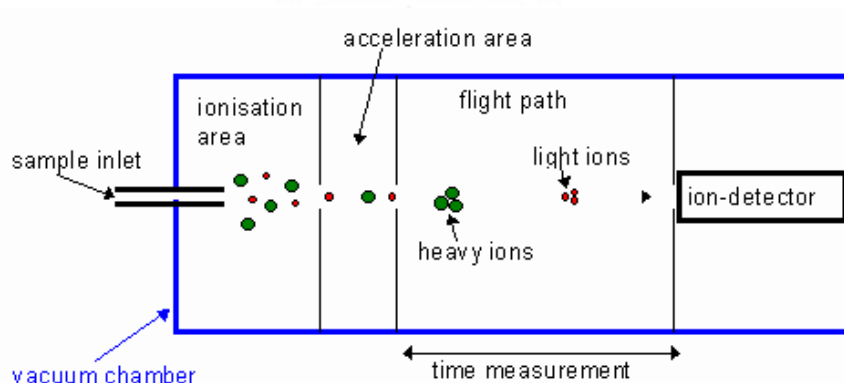


ภาพที่ 13 หลักการของ Quadrupole (49)

หลักการของ Time of Flight (TOF) ในส่วนของ Mass analyzer

TOF เป็นส่วนที่วิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลของไอออนที่ผ่านเข้ามาในส่วนของ ionizer โดยไอออนที่มีขนาดเล็กกว่าจะวิ่งถึงตัว detector ก่อนไอออนที่มีขนาดใหญ่กว่า และในส่วนนี้จะคิดเป็นเวลาของไอออนที่วิ่งถึง detector และคำนวณกลับออกมาเป็นขนาดมวลโมเลกุลของตัวอย่าง

หลักการ คือ เมื่อไอออนผ่านการเร่งด้วยความตาศักย์ไฟฟ้า ไอออนที่มีมวลมากจะใช้เวลาในการเดินทางผ่านท่อตรงยาวประมาณ 1 เมตร ในระบบสุญญากาศไปยัง Detector มากกว่าไอออนที่มีมวลน้อย TOF เหมาะกับการใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดไอออนแบบ MALDI หรือ ESI (LC/MALDI หรือ ESI-TOF/MS) (46)



ภาพที่ 14 หลักการของ Time of Flight (TOF) (50)

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) ด้วยโปรแกรม Mascot

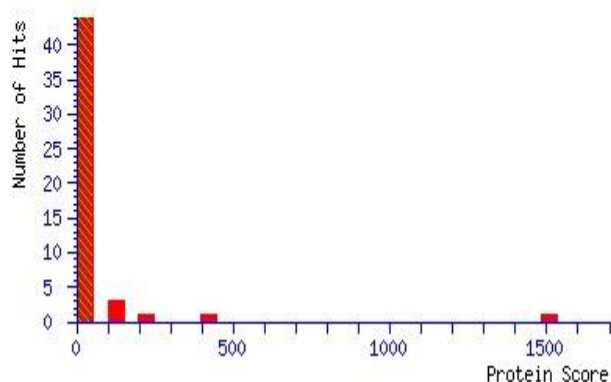
หลังจากการวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย LC-MS/MS จะต้องนำข้อมูลที่ได้ไปสืบค้นจากฐานข้อมูล เพื่อทำการระบุชนิดโปรตีน โดยใช้ MASCOT search engine หรือ MASCOT DAEMON ผ่าน www.matrixscience.com โดยโปรแกรมจะทำการสืบค้นข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เปรียบเทียบกับ ข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยผลการสืบค้นจะสามารถระบุ ชื่อ ชนิดของโปรตีน พร้อมทั้งสปีชีส์ที่อาจ ตรวจพบโปรตีน โดยการสืบค้นจะต้องมีการใส่ข้อมูล เช่น Enzyme (เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย) Database (ฐานข้อมูลที่ต้องการสืบค้น) Variable modification เป็นต้น ตัวอย่างของข้อมูลที่ได้จากการสืบค้น แสดงดังภาพที่ 23 และ 24

Mascot Score Histogram

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

Individual ions scores > 49 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

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



ภาพที่ 15 Protein score จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mascot (ส่วนที่ไม่แรเงา หมายถึงมีความ น่าจะเป็นสูงที่จะเป็นโปรตีนชนิดที่ระบุจากฐานข้อมูล) (ภาพจาก www.matrixscience.com)

1. ALBU_BOVIN Mass: 69248 Score: 1506 Matches: 43(11) Sequences: 30(11) emPAI: 2.88
 Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
✓ <u>4</u>	506.1500	1010.2854	1010.4127	-0.1273	0	28	5.9	1	U	K.QNCDQFEK.L
✓ <u>6</u>	506.1700	1010.3254	1010.4127	-0.0873	0	(24)	16	1	U	K.QNCDQFEK.L
✓ <u>8</u>	507.7700	1013.5254	1013.6121	-0.0866	0	29	4.7	1		K.QTALVELLK.H
✓ <u>14</u>	512.7300	1023.4454	1023.4477	-0.0023	0	41	0.28	1		K.CCTESLVNR.R
✓ <u>20</u>	526.7500	1051.4854	1051.4426	0.0428	0	27	7.2	1	U	R.CCTKPESER.M
✓ <u>44</u>	571.8400	1141.6654	1141.7070	-0.0416	1	54	0.02	1		K.KQTALVELLK.H
✓ <u>51</u>	582.2300	1162.4454	1162.6234	-0.1779	0	(28)	6.5	1	U	K.LVNLTEPAK.T
✓ <u>52</u>	582.2700	1162.5254	1162.6234	-0.0979	0	47	0.089	1	U	K.LVNLTEPAK.T
✓ <u>80</u>	625.3300	1248.6454	1248.6139	0.0316	1	(41)	0.45	1	U	R.FKDLGEEHFK.G
✓ <u>81</u>	625.7900	1249.5654	1248.6139	0.9516	1	47	0.085	1	U	R.FKDLGEEHFK.G
✓ <u>88</u>	642.3700	1282.7254	1282.7034	0.0221	0	46	0.15	1	U	R.HPEYAVSVLLR.L
✓ <u>91</u>	653.3300	1304.6454	1304.7088	-0.0634	0	(16)	1.4e+02	1	U	K.HLVDEPQNLK.Q
✓ <u>92</u>	653.3600	1304.7054	1304.7088	-0.0034	0	43	0.28	1	U	K.HLVDEPQNLK.Q
✓ <u>102</u>	675.3000	1348.5854	1348.5387	0.0467	0	47	0.16	1	U	K.TCVADSHAGCEK.S
✓ <u>107</u>	681.8300	1361.6454	1361.6649	-0.0195	0	(32)	2.6	1	U	K.SLHTLFGDELCK.V
✓ <u>108</u>	681.8300	1361.6454	1361.6649	-0.0195	0	42	0.25	1	U	K.SLHTLFGDELCK.V
✓ <u>110</u>	682.7300	1363.4454	1363.4730	-0.0276	0	47	0.082	1	U	R.ETYGMADCEK.Q
✓ <u>121</u>	693.7900	1385.5654	1385.6133	-0.0478	0	67	0.00099	1	U	K.YICDNQDTISSK.L
✓ <u>122</u>	694.7800	1387.5454	1387.5635	-0.0181	0	46	0.095	1	U	K.EYEATLECCAK.D

ภาพที่ 16 จำนวนเปปไทด์ของเปปไทด์ และลำดับกรดอะมิโนที่พบในตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Mascot (ภาพจาก www.matrixscience.com)

MS data file: BSA 4 ug.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 57%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVIKLVID LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAKDDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVIKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA

```

ภาพที่ 17 Protein sequence coverage (ตัวสีแดงคือเปปไทด์ที่พบในตัวอย่างที่ match กับ database ของโปรตีนที่พบในฐานข้อมูล) (ภาพจาก www.matrixscience.com)

2.5 กระชายเหลือง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

ชื่อสามัญ : กระชาย, กระชายเหลือง

วงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออื่น : หัวระแอน หัวละแอน ขิงทราย ขิงแดง



ภาพที่ 18 เหง้ากระชายเหลือง (51)



ภาพที่ 19 ต้นกระชายเหลือง (51)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

กระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda*(L.) Mansf.) เป็นสมุนไพรในตระกูล ZINGIBERACEAE (52) โดยกระชายเหลืองเป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าสั้น แตกหน่อได้ มีรากอวบ เป็นรูปทรงกระบอกหรือรูปทรงไข่ค่อนข้างยาว ปลายเรียว มีความยาวประมาณ 4-10 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร ออกเป็นกระจุก ผิวมีสีน้ำตาลอ่อน ส่วนเนื้อในมีสีเหลืองและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว โดยพบว่ามีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ ช่วยบำรุงธาตุในร่างกาย ช่วยแก้ลมวิงเวียน แน่นหน้าอก ช่วยบำรุงกำลัง เสริมสมรรถภาพทางเพศ ช่วยบำรุงหัวใจ ช่วยบำรุงกระดูก ช่วยทำให้กระดูกไม่เปราะบาง ช่วยปรับสมดุลของฮอร์โมนต่างๆ ในร่างกาย ช่วยบำรุงกำหนัด แก้อาการกามตายดำน ช่วยบำรุงสมอง ช่วยปรับสมดุลของความดันโลหิตในร่างกาย (53)

การศึกษาถึงสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากกระชายเหลือง (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) พบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid), ชาลโคเน (Chalcone) และ Essential oil โดยสารในกลุ่ม Flavonoid ที่สกัดได้ ได้แก่ Pinostrobin, Pinoembrin และ Alpinetin สารในกลุ่ม Chalcone ที่สกัดได้ ได้แก่ Cardamonin และ Boesenbergin A (54) และ 4-hydroxy panduratin A และ panduratin A จากการทดลองพบว่า สาร Pinostrobin มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด anti-ulcerogenic property (*in vivo*) และช่วยรักษา gastrointestinal disorders (55) สาร Boesenbergin A (BA) เป็นสารที่ช่วยรักษามะเร็งปอด จากการทดลองใน human non-small cell lung cancer (A549) cells พบว่า Boesenbergin A (BA) สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการ Apoptosis (56) สาร 4-hydroxy panduratin A และ panduratin A สามารถยับยั้งเอนไซม์ dengue 2 virus NS3 protease ทำให้ dengue 2 virus ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (13) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากกระชายเหลือง สามารถช่วยรักษาโรค Periodontal inflammation ได้ (57) และมีผลต่อการต่อต้านเชื้อรา *Candida albicans* (54)

นอกจากนี้ ยังพบคุณสมบัติของกระชายเหลืองที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยมีการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* โดยทดสอบกับสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลของกระชายเหลือง พบว่า สารสกัดของกระชายเหลืองมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* โดยทดสอบด้วยวิธี MIC ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.019 mg/mL - 2.5 mg/mL และ MBC มีค่าเท่ากับ 0.039 mg/mL - 5.0 µg/mL (58) สารสกัดจากกระชายเหลืองและทำการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Chromatography มีดังนี้ สารที่ค้นพบใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone และสารที่รู้จักอยู่แล้ว 4 ชนิด ได้แก่ fisetin, naringenin, 3'-hydroxydaidzein และ xenognosin B พบว่า สารเหล่านี้สามารถยับยั้ง เชื้อ *Streptomyces sp.* ด้วยวิธี minimum inhibitory concentrations (MIC) โดย

มีค่าเท่ากับ 32 to 256 µg/ml (59) สารสกัดจากกระชายเหลืองที่สำคัญ ได้แก่ Essential oil สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ใน กลุ่ม zoonotic enteropathogens ได้แก่ *Salmonella* spp. , *Escherichai coli* O157, *Campylobacter jejunii* และ *Clostridium perferingens* (60) และพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลจากกระชายเหลือง สามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในกลุ่ม *Candida* ได้แก่ *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* และ *C. tropicalis* ได้ (61) นอกจากนี้สารสกัด Essential oil ของกระชายเหลือง สามารถขับไล่แมลงสาบ 3 ชนิดที่พบในประเทศไทยได้ ได้แก่ *Neostylopyga rhombifolia*, *Periplaneta Americana* และ *Blattera germanica* (62) นอกจากนี้ยังพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากกระชายเหลือง ได้แก่ boesenbergin, cardamonin, pinostrobin, pinocembrin, panduratin A และ 4-hydroxypanduratin A สารเหล่านี้มีคุณสมบัติต่างๆ มากมาย เช่น anti-HIV protease, anti-dengue NS2B/ NS3 protease (63) ต่อด้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ต่อด้านเชื้อรา (antifungal) ต่อด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต่อด้านมะเร็ง (anticancer) และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

2.6 กระชายดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora*

ชื่อสามัญ : *Belamcanda chimensis*

วงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออื่น : กระชายดำ, ว่านกระชายดำ, กระชายม่วง, ว่านเพชรดำ



ภาพที่ 20 เหง้ากระชายดำ (64)



ภาพที่ 21 ต้นและดอกกระชายดำ (64)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชสมุนไพรในตระกูล ZINGIBERACEAE (52) เช่นเดียวกับกระชายเหลือง มีลำต้นอยู่ใต้ดิน (rhizome) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่าหัว ลักษณะคล้ายขิงหรือขมิ้น แต่มีขนาดเล็กกว่า (65) โดยพบว่ามีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ ได้แก่ ใช้บำรุงกำลัง แก้ปวดเมื่อย และอาการเหนื่อยล้า เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ขับลม เป็นยาอายุวัฒนะ แก้จุกเสียด แก้ปวดท้อง (66)

การศึกษาถึงสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระชายดำ พบสารประเภทฟลาโวนอยด์ (Flavonoid), ชาลโคเนน (Chalcone) และสารสกัดหยาบจากกระชายดำ (crude) พบว่าสารสกัดฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ได้แก่ 5,7,4'-trimethoxyflavone, 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone และ 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ ได้แก่ *Plasmodium falciparum* และ *Candida albicans* โดยวิธีการทดสอบแบบการตรวจวัด IC_{50} ระหว่างเชื้อก่อโรคและสารสกัด จะพบว่า 5,7,4' - trimethoxyflavone มีค่า $IC_{50} = 3.70 \mu\text{g/ml}$ และ 5,7,3',4' - tetramethoxyflavone มีค่า $IC_{50} = 4.06 \mu\text{g/ml}$ ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Plasmodium falciparum* และ 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone มีค่า $IC_{50} = 39.71 \mu\text{g/ml}$ ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Candida albicans* (14) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ค้นพบว่ากระชายดำถูกใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (several inflammatory-related diseases) ได้แก่ โรคเกาต์ (gout) ภูมิแพ้ (allergy) แผลร้อนใน (aphthous ulcer) และ แผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) ดังนั้นจึงมีศึกษาเกี่ยวกับสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ Prostaglandin E_2 (PGE_2)

และ Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) ด้วยวิธีการวัด IC₅₀ พบว่า 5-Hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone แสดงผลต่อการยับยั้งการผลิตสาร PGE₂ (IC₅₀ = 16.3 μ M) และมีผลอย่างรุนแรงใน TNF- α (IC₅₀ > 100 μ M) (67) นอกจากนี้ยังพบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่มีคุณสมบัติการต่อต้านเอนไซม์ของไวรัส (viral proteases) ได้แก่ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), hepatitis C virus (HCV) และ human cytomegalovirus (HCMV) ด้วยวิธีการวัด IC₅₀ (68) พบว่า สารสกัด 5-hydroxy-7-methoxyflavone และ 5,7-dimethoxyflavone ยับยั้ง HIV-1 protease (IC₅₀ = 19 μ M) และ 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone ยับยั้ง HCV protease (IC₅₀ = 190 μ M) และ HCMV protease (IC₅₀ = 250 μ M) (68) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่สนับสนุนว่าสารสกัดหายาจากกระชายดำที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ human promyelocytic leukemic (HL-60) โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการ Apoptosis (69) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในไวน์กระชายดำ โดยแบ่งเป็น 3 แบบ ได้แก่ กระชายดำแบบที่ไม่ปลอกเปลือก กระชายดำแบบที่ปลอกเปลือก และเปลือกของกระชายดำ โดยทั้งสามส่วนนี้จะถูกนำมาทำเป็นไวน์กระชายดำแต่ละชนิด และมีการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ค่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ในไวน์กระชายดำที่เตรียมในกระชายดำแบบที่ปลอกเปลือกและไม่ปลอกเปลือกจะมีค่าที่สูงกว่าไวน์กระชายดำที่เตรียมจากเปลือกกระชายดำ และมีการวัดปริมาณสารประเภทฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 107.00 \pm 9.27 ถึง 306.62 \pm 6.21 mgGAE/L (70) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH ในกระชายดำที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีค่าเท่ากับ 92.5 \pm 0.10 %TAA (71)

นอกจากสารที่ออกฤทธิ์ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยังพบสารประเภทโปรตีนที่มีความสำคัญมากมายในกระชายเหลืองและกระชายดำ รวมถึงสมุนไพรอื่นๆในพืชวงศ์ขิง ซึ่งจะยกตัวอย่างในหัวข้อถัดไป

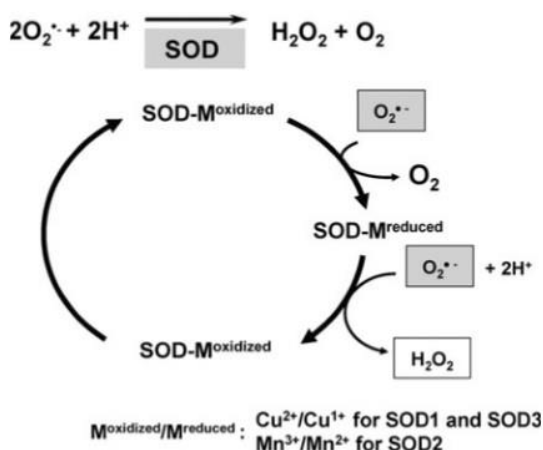
2.7 โปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชวงศ์ขิง

งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกระชายเหลืองและกระชายดำ พบว่าสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่จะเป็นสารประเภท ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid), ชาลโคน (Chalcone) และ Essential oils แต่มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่ามีพืชในวงศ์ขิงหลายชนิด มีโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือสามารถช่วยต่อต้านการอักเสบ หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory) ได้แก่ inflammatory bowel disease, pancreatitis, arthritis เช่น ขมิ้น (*Curcuma longa*) (72) พืชในวงศ์ขิง เช่น ขิง ข่า ขมิ้น กระชายดำ มีโปรตีนที่มี Hemagglutinating activity (73) นอกจากนี้ยังมีว่านนางคำ (*Curcuma aromatic*) ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยา Hemagglutinating activity และมีการระบุชนิดของ Lectins 6 ชนิดด้วยการใช้ MS-BLAST algorithms (74) โปรตีน Lectin ที่

สกัดได้จากขมิ้นขม (*Curcuma amarissima Roscoe*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (Antifungi) ได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Exserohilum turcicum*, และ *Colectrotrichum cassicola* (75) และ Lectin ที่สกัดได้จากขมิ้น (*Curcuma longa*) มีผลต่อการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, และ *Candida albicans* การต่อต้านเชื้อรา (Antifungal) ได้แก่ *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum*, และ *Colectrotrichum cassicola* และเป็นสารยับยั้ง α -glucosidase inhibitory activities (76) (Antidiabetic drugs) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน โปรตีน β -turmerin ที่พบในขมิ้น (*Curcuma longa*) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes (77) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนในขมิ้นชัน (*Curcuma comosa Roxb.*) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (19) และมีการค้นพบโปรตีน BGS-Haridrin ที่สกัดได้จากขมิ้น (*Curcuma longa*) พบว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (cell death) ในเซลล์ peripheral human lymphocytes (78) ยังมีโปรตีนอีกชนิดที่น่าสนใจ คือ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD)

Superoxide Dismutase หรือ SOD จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากเกินไป และเพื่อป้องกันการทำลายของเซลล์ โดยแบ่งเป็น isoenzyme หลายชนิด เช่น Cu/Zn - SOD จะป้องกันเซลล์ในไซโทพลาสซึม Mn - SOD จะป้องกันเซลล์ในไมโทคอนเดรีย ไม่ให้ถูกทำลายจากสารอนุมูลอิสระ (20) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังพบว่า SOD เกี่ยวข้องกับขบวนการ anti-aging treatment เนื่องจากเมื่อระดับ SOD ลดลง ระดับสารอนุมูลอิสระจะสูงขึ้น ในคนที่มีอายุมากขึ้น (79) จึงมีการนำ SOD มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น เป็นสารตัวกลางที่ช่วยต้านการอักเสบ จากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เช่น โรคไขข้ออักเสบ โรคกล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น และยังช่วยป้องกันผลข้างเคียงของยารักษามะเร็งได้อีกด้วย (22)

SOD ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากการทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่เปลี่ยน Superoxide anion (O_2^-) (สารอนุมูลอิสระ และเป็นพิษต่อร่างกาย) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และออกซิเจน จากนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Catalase ทำให้เกิดเป็น คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งเป็นสารที่ไม่อันตรายต่อร่างกายและจะถูกกำจัดออกโดยการหายใจออก ดังแสดงในภาพด้านล่าง (80)



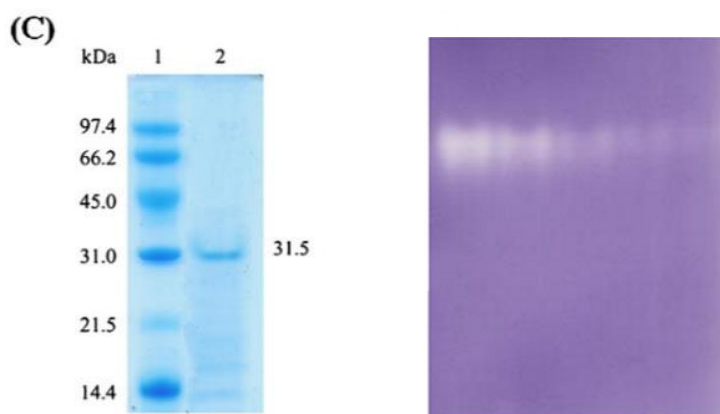
ภาพที่ 22 กลไกการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ Superoxide Dismutase (80)

Superoxide anion เป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular Diseases) โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) โรคหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis) เป็นต้น ดังนั้นร่างกายต้องกำจัดสารเหล่านี้ออกให้มากที่สุด และ SOD มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคเหล่านี้ โดยเป็นสารสำคัญที่ช่วยกำจัด Superoxide anion และเป็นส่วนสำคัญในกลไกการป้องกันการเกิดไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย และช่วยป้องกันไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย (80) โดย SOD ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะแบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Cytoplasmic Cu/ZnSOD (SOD1), Mitochondrial MnSOD (SOD2) และ Extracellular Cu/ZnSOD (SOD3) โดย SOD แต่ละชนิดจะมีหน้าที่แตกต่างกันไป (80)

มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการฉีด SOD สังเคราะห์เข้าไปในหนูทดลอง จะเข้าไปช่วยเพิ่มอัตราการไหลเวียนของเลือดในไต อัตราการกรองในไต และการจับออกของโซเดียม และยับยั้งการเกิด medial thickening ของหลอดเลือดด้วย (81) นอกจากนี้ ยังพบว่า SOD ช่วยลดการเกิดโรคความดันโลหิตสูง โดยการปรับขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) และ SOD ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจะไปช่วยลดความดันโลหิตหลังจากการฉีดเข้าไปทางเส้นเลือดดำและการฉีดเข้าไปในไต (kidney medulla) (82) SOD ที่พบภายในร่างกายมนุษย์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความดันโลหิต (83) นอกจากนี้ SOD จะเกี่ยวข้องกับโรคความดันโลหิตสูงแล้ว ยังมีความเกี่ยวข้องกับโรคหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis) ด้วย โดยพบว่า Superoxide anion (84) จะเข้าไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL oxidation (85) ซึ่งส่งผลทำให้หลอดเลือดแข็งตัว ซึ่งโปรตีน SOD จะมีกลไกที่ซับซ้อนที่เข้าไปยับยั้ง Superoxide anion ที่เป็นสารที่อันตรายให้กลายเป็น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจน และจะถูกกำจัดต่อไป (86)

หลักการในการวิเคราะห์โปรตีน SOD ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining

การวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase จะใช้เทคนิค 2 เทคนิคประกอบกัน ได้แก่ Native-PAGE และ SOD Activity Staining โดยมีขั้นตอน คือ การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า หรือ Native-PAGE ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าบน Polyacrylamide gel ที่ไม่มี SDS เป็นส่วนประกอบ สำหรับขั้นตอนการแยกโปรตีนจะเหมือนกับ SDS-PAGE ตามที่กล่าวไปข้างต้น แต่ที่แตกต่างกัน คือ ไม่มีส่วนประกอบของ SDS ในขั้นตอนการวิเคราะห์เลย เพื่อต้องการให้โปรตีน SOD ไม่เกิดการสูญเสียสภาพ เพราะสาร SDS จะทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพไป (87) หลังจากแยกโปรตีน SOD ด้วยเทคนิค Native-PAGE แล้ว จะทำการย้อมโปรตีน SOD ด้วยเทคนิค SOD activity staining โดยโปรตีน SOD ที่ได้จะเป็นแถบใสไม่มีสี และพื้นหลังจะเป็นสีม่วงเข้ม ดังภาพ



ภาพที่ 23 ขนาดมวลโมเลกุลของ SOD (ประมาณ 31 กิโลดาลตัน) ที่แยกด้วยเทคนิค Native-PAGE (ซ้าย) (18) และแสดงแถบโปรตีน SOD ที่ใสไม่มีสี เมื่อย้อมด้วย SOD activity staining (ขวา) (88)

สำหรับหลักการของ SOD activity staining เป็นเทคนิคที่ใช้ย้อมสีของโปรตีน SOD โดยจะย้อมด้วย สารละลาย NBT-riboflavin solution จากนั้นล้างสีออกด้วยสารละลาย TEMED และให้กระแสไฟฟ้า 25 วัตต์แอมป์ ซึ่งจะทำให้เห็นแถบของโปรตีน SOD ใสไม่มีสี และพื้นหลังเป็นสีม่วงเข้ม (18) โดยสารละลาย NBT-riboflavin solution มีหลักการคือ สาร Nitro blue tetrazolium จะถูกนำมาใช้ในการยับยั้ง Superoxide anion (O_2^-) ในการเกิดปฏิกิริยา enzymically หรือ photochemically โดยเกิดปฏิกิริยา Reduction ของ Superoxide anion (O_2^-) และจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในเทคนิคการวัดปริมาณของ Superoxide Dismutase (89) ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของ Superoxide Dismutase ที่ไปยับยั้งปฏิกิริยา Reduction ของ Nitro blue tetrazolium โดย SOD (90) เมื่อ SOD ไปยับยั้งปฏิกิริยารีดักชันของ Nitro blue tetrazolium กับ Riboflavin แล้ว จะเกิดปฏิกิริยา enzymically แต่ในส่วนของเจลที่ไม่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยารีดักชันของ Nitro blue tetrazolium หรือไม่มีโปรตีน SOD อยู่ ก็จะถูกล้างสีออกด้วย TEMED จากนั้นเมื่อให้กระแสไฟฟ้า

แก่เจล ในส่วนที่เกิดปฏิกิริยา enzymically ก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยา photo chemically และจะเห็นแถบของโปรตีน SOD ใสไม่มีสี ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เหตุผลส่วนหนึ่งที่ต้องแยกโปรตีน SOD ด้วยเทคนิค Native-PAGE เพื่อไม่ให้โปรตีน SOD สูญเสียสภาพ เนื่องจากโปรตีน SOD ที่ไม่สูญเสียสภาพจะต้องมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ซึ่งได้แก่ Nitro blue tetrazolium หรือเกิดปฏิกิริยา enzymically นั่นเอง (91)



ภาพที่ 24 การทำปฏิกิริยาของ Superoxide Dismutase กับ Superoxide anion (92)

2.8 สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืชวงศ์ขิง

งานวิจัยที่ทำการศึกษากุทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพืชวงศ์ขิง โดยมากจะศึกษาจากสารสกัดที่ใช้สารอินทรีย์ในการสกัด เช่น เมทานอล ไดคลอโรมีเทน เป็นต้น ตัวอย่างเช่น การศึกษากุทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay ในสารสกัดจากพืช *Zingiber officinalis* พบว่า มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 0.25 ± 0.94 และ 3.14 ± 0.44 %inhibition ตามลำดับ (93) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mei Lu *et al.* (2011) พบว่า มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 32.38 ± 1.42 % และ 75.66 ± 1.15 $\mu\text{mol TE/g DW}$ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาในสารสกัดของพืช *Alpinia galangal* วัตถุประสงค์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay พบว่า มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 88.30 ± 0.39 %inhibition และ 593.90 ± 15.51 $\mu\text{mol TE/g DW}$ ตามลำดับ ในพืช *Fructus amomi* วัตถุประสงค์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 35.06 ± 1.14 % และ 83.47 ± 2.08 $\mu\text{mol TE/g DW}$ ตามลำดับ (94) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH และ ABTS จากสารสกัด Curcumin ในพืช *Curcuma longa* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.02 ± 0.013 และ 2.24 ± 0.093 TEAC (mM) ตามลำดับ (95) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Aneta *et al.*, 2007 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 100 ± 2.56 และ 19.5 ± 0.45 $\mu\text{M trolox/100 g dw}$ ตามลำดับ (96) จะเห็นได้ว่าแม้จะเป็นสารชนิดเดียวกันที่ชนิดได้จากพืชชนิดเดียวกัน แต่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้นั้นมีค่าแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเก็บตัวอย่างคนละสถานที่และคนละช่วงเวลา นอกจากนี้ยังมีการศึกษากุทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารที่สกัดของพืช *Curcuma longa* L. ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประเภท Curcuminoid มีสาร 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin, และ bisdemethoxycurcumin พบว่าสามารถป้องกันอาการ pheochromocytoma ในหนู และต่อต้านเซลล์ HUVEC ในคน (97) นอกจากนี้สารที่สกัด

ด้วยเมทานอล ในพืช *Alpinia oxyphylla* Miquel จะมีสารที่สำคัญ ได้แก่ yakuchinone A, yakuchinone B และ phenolic diarylheptanoids ซึ่งพบว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านการอักเสบ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการ Apoptosis (98)

จะเห็นได้ว่าพืชสมุนไพรในตระกูลขิงมีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะศึกษาหาความรู้ใหม่ๆต่อไป เนื่องจากพืชตระกูลขิงนิยมนำมาใช้เป็นสมุนไพรที่ปรุงอาหาร และนิยมนำมาใช้บำบัดรักษาโรค ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนที่สกัดได้จากพืชตระกูลขิง 2 ชนิด ได้แก่ กระชายเหลือง และกระชายดำ ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการบริโภค และรักษาโรค และยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน

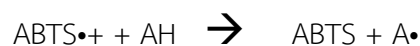
2.9 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

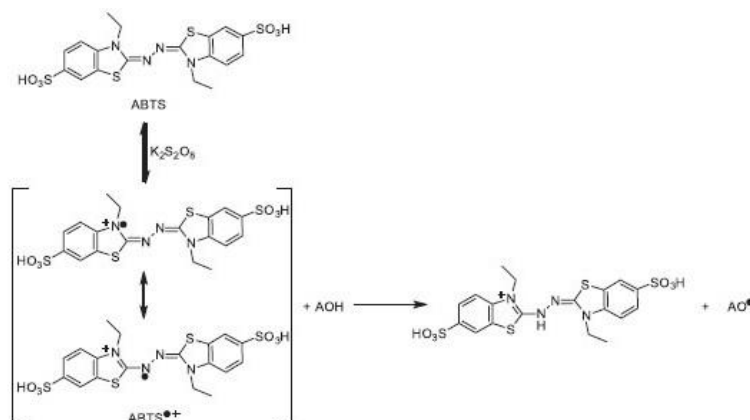
การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆที่ต้องการทดสอบ โดยปัจจุบันวิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS•+) วิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ในที่นี้จะขอกล่าวแค่วิธีแรกเท่านั้น

2.9.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

หลักการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS•+ หรือ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS•+ ปกติ จะมีความการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS•+ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS•+ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบซึ่งจะทำให้สีจางลง (99) ดังสมการต่อไปนี้





ภาพที่ 25 ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (100)

และเมื่อตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาวิธีในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง ได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งสามารถนำมาคำนวณและเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เช่น trolox, vitamin c เป็นต้น

วิธีการคำนวณ % Radical scavenging ตามสมการ ดังนี้

$$\text{ABTS radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

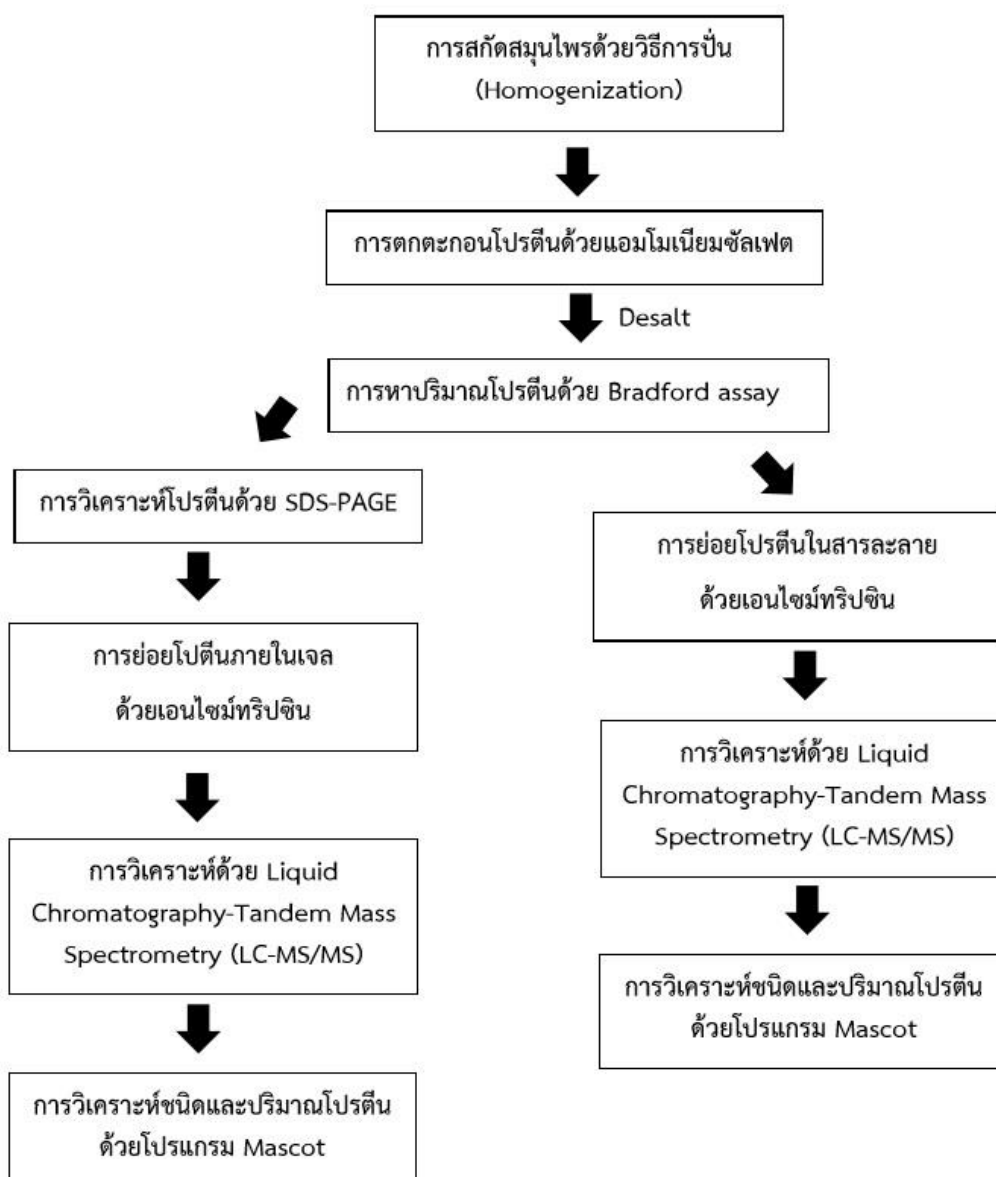
โดย A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น และ A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง (101) ส่วนข้อเสียคือ ABTS^{•+} ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ ตัวอย่างที่ได้มีการนำวิธีนี้มาใช้ ได้แก่ การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโหระพา (102) การตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระส่วนของเมล็ดมะม่วง (*Mangifera indica L.*) ที่มีฤทธิ์มากกว่าใบอ่อน ใบแก่ และเปลือกของผลมะม่วงดิบ และพบว่า ส่วนสกัดจากใบผักข้าเลือด (*Ceasalpinia mimosoides Lamk.*) มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าส่วนของยอดอ่อน ใบ ดอก และลำต้น (103)

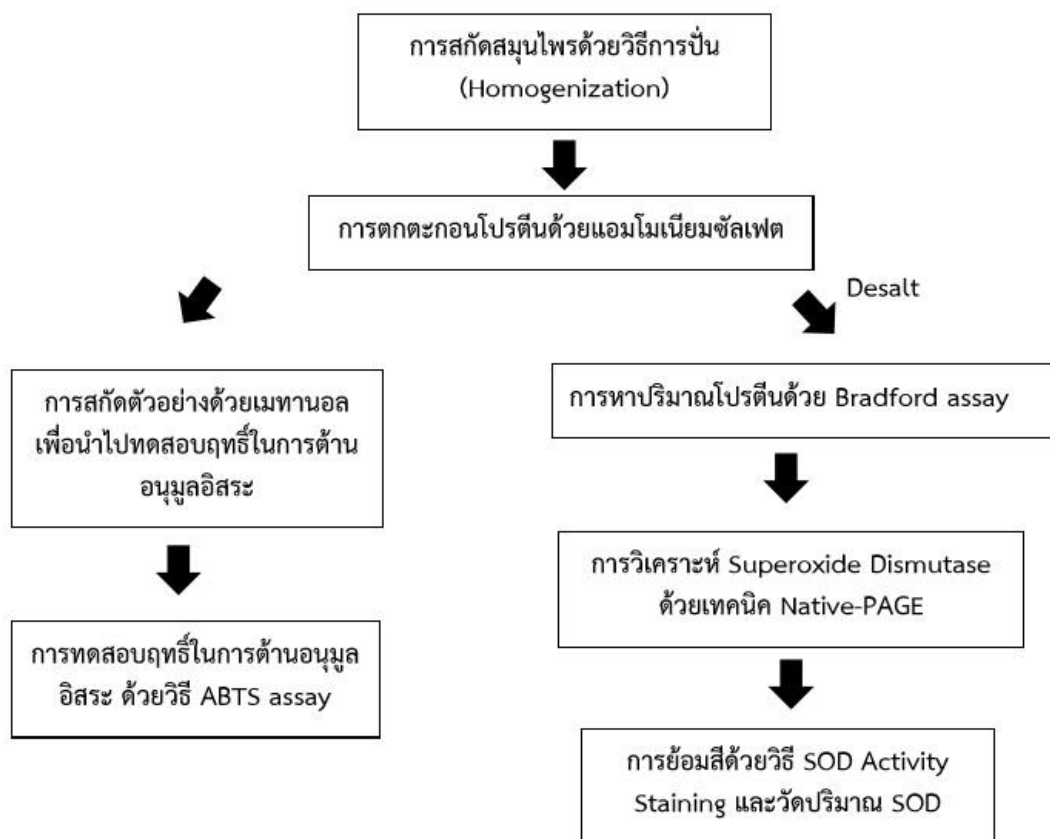
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การระบุชนิดและปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS



การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase และการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ



3.1 ตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ กระจายเหลือง ซื้อมาจากอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ เหง้า โดยผู้วิจัยซื้อมาทั้งหมด 12 เดือน (ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2556 ถึงเดือนเมษายน 2557) โดยมี Herbarium Number คือ 015581 (BCU)



ภาพที่ 26 กระจายเหลือง

กระจายดำ ซื้อมาจากอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยคือ เหง้า โดยผู้วิจัยซื้อมาทั้งหมด 9 เดือน (ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนสิงหาคม 2556 และเดือนธันวาคม 2556 ถึงเดือนเมษายน 2557) โดยมี Herbarium Number คือ 015582 (BCU)



ภาพที่ 27 กระจายดำ

กระจายดำและกระจายเหลือง ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และดำเนินการเก็บตัวอย่างสมุนไพรไทยในพิพิธภัณฑ์พืช (Herbarium) ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิณ สุวตะพันธุ์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย สามารถแบ่งได้เป็น 5 หมวด คือ

3.2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสุมุนไพรรและการตกตะกอนโปรตีน

- Methanol	B&J ACS, สหรัฐอเมริกา
- Ethanol	Merck, เยอรมนี
- Ammonium sulphate	Merck, เยอรมนี
- Di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, เยอรมนี
- Di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous (NaH_2PO_4)	Merck, เยอรมนี
- Sodium Chloride (NaCl)	Merck, เยอรมนี
- Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
- Bradford reagent	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
- Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck, เยอรมนี

3.2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

- 30 % Acrylamide	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	GE healthcare, อังกฤษ
- Sodium Lauryl Sulphate (SDS)	Vivantis, มาเลเซีย
- Ammonium persulphate	AppliChem, เยอรมนี
- Dithiothreitol (DTT)	usb, สหรัฐอเมริกา
- 85% Phosphoric acid	Merck, เยอรมนี
- Tris	Vivantis, มาเลเซีย
- Conc.HCL	Merck, เยอรมนี
- Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck, เยอรมนี
- Glycine	usb, สหรัฐอเมริกา
- Glycerol	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

- Iodoacetamide (IAM)	AppliChem, เยอรมนี
- Acetic acid gracial 100%	Merck, เยอรมนี
- Protein ladder	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
- Commassie Brilliant Blue G-250	AppliChem, เยอรมนี

3.2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโปรตีนด้วยเทคนิค Mass Spectrometry

- Trypsin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
- Formic acid	Merck, เยอรมนี
- Ammonium bicarbonate	Merck, เยอรมนี
- Acetonitrile, HPLC grade	B&J ACS, สหรัฐอเมริกา
- HPLC water	B&J ACS, สหรัฐอเมริกา

3.2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase

- Riboflavin	AppliChem, เยอรมนี
- Nitro-Blue Tetrazolium (NBT)	AppliChem, เยอรมนี

3.2.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay

- Ascorbic acid	Merck, เยอรมนี
- 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)	Merck, เยอรมนี
- Potassium persulphate	Merck, เยอรมนี

3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย

- Gel Electrophoresis Apparatus	GE Healthcare, อังกฤษ
- Electrophoresis power supply	GE Healthcare, อังกฤษ
- Vortex mixer	FinePCR, เกาหลีใต้
- Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้

- 96 well plate	Corning, สหรัฐอเมริกา
- Centrifuge tube (15, 50 มิลลิลิตร)	Corning, สหรัฐอเมริกา
- Microcentrifuge tube (1.5 มิลลิลิตร)	Eppendorf, เยอรมนี
- ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
- Serological pipette (1, 5, 10 มิลลิลิตร)	Corning, สหรัฐอเมริกา
- Auto pipette	GILSON, ฝรั่งเศส
- Evaporator รุ่น miVAC	Genevac, อังกฤษ
- Incubator	Memmert, เยอรมนี
- Gel Doc	Syngene, อังกฤษ
- Water Bath	Memmert, เยอรมนี
- -20°C Freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
- -80°C ULT Deep Freezer	IlShin Lab, เกาหลีใต้
- 4°C Refrigerator	TaylorWharto, สหรัฐอเมริกา
- Sonicator	Soniclean, สหรัฐอเมริกา
- Speed Vac	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา



3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการปั่น (Homogenization)

ซึ่งตัวอย่างแห้งกระชายเหลือง หรือแห้งกระชายดำที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว ปริมาณ 500 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ผสมกับ 0.05 M Phosphate Buffer, pH 7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จากนั้นคั้นน้ำกระชายเหลือง-กระชายดำ และกรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดกระชายเหลืองและกระชายดำที่ได้ ไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เก็บส่วนใส (Supernatant) และนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% จากนั้นแบ่งตัวอย่างส่วนหนึ่ง เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay

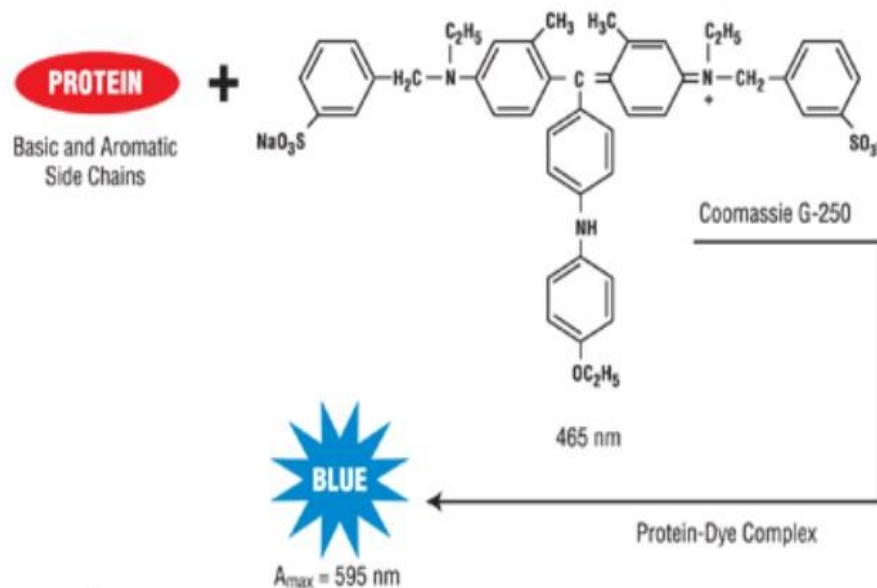
From S ₁ %	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
	55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
		60		33	67	103	140	179	219	261	305
			65		34	69	105	143	183	224	266
				70		34	70	107	146	186	228
					75		35	72	110	149	190
						80		36	73	112	152
							85		37	75	114
								90		37	76
									95		38

ภาพที่ 28 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) ที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน 1 ลิตร (ต่อ) (101)

จากนั้นนำสารสกัดที่ตกตะกอนได้มาวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay

3.3.3 การหาปริมาณโปรตีนด้วย Bradford assay

นำตัวอย่างโปรตีนกระชายเหลืองและกระชายดำ ที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.3.2 มาหาปริมาณโปรตีนด้วย Bradford assay ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำ ง่าย และมีความไว (Sensitivity) สูงกว่าวิธี Lowry Method วิธีการวัดโปรตีนด้วย Bradford assay เป็นการจับกันระหว่างสี Commassie Blue 250 กับโปรตีนที่ต้องการตรวจวัดในตัวอย่าง ซึ่งสีจะละลายอยู่ในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งสามารถวัดได้ที่ความยาวคลื่นที่สูงที่สุด 470 นาโนเมตร แต่เมื่อโครงสร้างประจุลบของสีจับกับโปรตีน จะสามารถวัดปริมาณได้ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 595 นาโนเมตร เพราะฉะนั้น ปริมาณของสี Commassie Blue G250 ที่จับกับโปรตีนจะสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (105)



ภาพที่ 29 หลักการการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (106)

วิธีการทดลอง

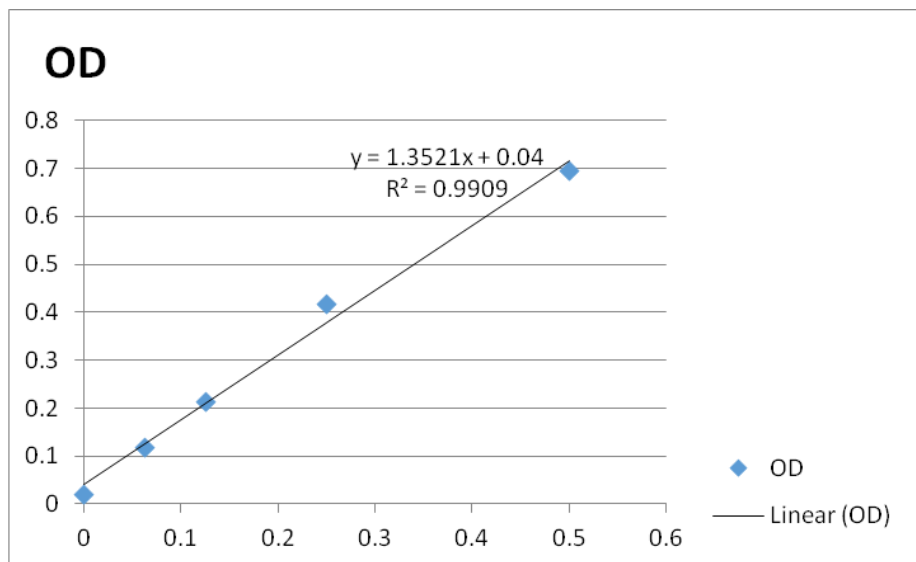
การเตรียมน้ำยา Bradford โดยใช้ น้ำยา Bradford จากบริษัท BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา โดยนำน้ำยา Bradford มา 1 ส่วน ผสมกับน้ำกลั่น 4 ส่วน และทำการกรองด้วยกระดาษกรอง WhatMan เบอร์ 1 นำมาใช้ได้ทันที หรือเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ในขวดทึบแสง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน คือ Bovine Serum Albumin หรือ BSA ความเข้มข้น 5 ระดับ ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06125, 0.030625 และ 0.0153125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย BSA ในน้ำกลั่นตามความเข้มข้นที่กล่าวมาข้างต้น อ่านค่าโปรตีนจากตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน และสมการเส้นตรง โดยกราฟมาตรฐานต้องมี $R^2 > 0.98$

เตรียมตัวอย่างสารสกัดโปรตีนกระชายเหลืองและกระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วในแต่ละเดือน ถ้าในการวัดปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ถ้าปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนเกินกราฟมาตรฐาน ให้ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย Phosphate Buffer โดยใช้ Phosphate Buffer เป็น Blank

เติมสารละลายมาตรฐาน BSA หรือตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปใน 96-well plate จากนั้นเติมน้ำยา Bradford ปริมาตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และ Incubate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน และสมการเส้นตรง

ที่ใช้ในการทำนายค่าตัวอย่าง โดยกราฟมาตรฐาน แกน y แทนค่าการดูดกลืนแสง และ แกน x แทนค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ได้กราฟดังตัวอย่างต่อไปนี้



ภาพที่ 30 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีน

ซึ่งจะเห็นได้ว่าจากกราฟมีค่า $R = 0.9909$ และสมการเส้นตรง $y = 1.3521x + 0.04$ โดยแทนค่า y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในตัวอย่าง เพื่อหาค่า x เมื่อแก้สมการออกมา ค่า x ที่ได้ก็คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่อยู่ในตัวอย่าง

3.3.4 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การเตรียม Resolving gel เพื่อให้มี %T ต่างๆ กัน สามารถเตรียมได้ตามตาราง

ตารางที่ 1 การเตรียม Resolving gel

6%	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Water	5.3	10.6	15.9	21.2	26.5
30% acrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.008	0.016	0.024	0.032	0.04
8%	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Water	4.6	9.3	13.9	18.6	23.2
30% acrylamide mix	2.7	5.3	8.0	10.7	13.4
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.006	0.012	0.018	0.024	0.03

10%	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Water	4.0	7.9	11.9	15.8	20.0
30% acrylamide mix	3.3	6.7	10.0	13.3	16.6
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.16	0.02
12%	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Water	3.3	6.6	9.9	13.2	16.4
30% acrylamide mix	4.0	8.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02
15%	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Water	2.3	4.6	6.9	9.2	11.4
30% acrylamide mix	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
10% APS	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02

ในการเตรียม Resolving gel 15%T ปริมาตร 10 มิลลิตร ต้องผสมน้ำ 2.3 มิลลิตร, 30% acrylamide 5.0 มิลลิตร, 1.5 M Tris pH 8.8 2.5 มิลลิตร และ 10% SDS 0.1 มิลลิตร ให้เข้ากัน ด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดฟอง จากนั้นเติม 10% APS 0.1 มิลลิตร และ TEMED 0.004 มิลลิตร เป็นลำดับสุดท้าย เนื่องจากสารทั้งสองชนิดนี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเอนไซม์ ผสมให้เข้ากัน นำไปเท ในชุดเตรียมเจลที่เตรียมไว้

ตารางที่ 2 การเตรียม Stacking gel

4%	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Water	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4
30% acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83
1.0 M Tris pH 6.8	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005

ทำการเตรียม Stacking gel 4%T ปริมาตร 4 มิลลิตร ตามอัตราส่วนดังแสดงในตารางที่ 2 และวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับ Resolving gel นำสารละลาย Stacking gel ไปเทบน Resolving gel ที่แข็งตัวแล้ว

การเตรียม 2X Laemmli buffer

ผสมทุกอย่างเข้าด้วยกัน ตามสัดส่วนดังนี้ 1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 มิลลิตร, 10% w/v SDS 4.0 มิลลิตร, Glycerol 2.0 มิลลิตร และ Bromophenol blue 20 μ L หลังจากนั้นแบ่งใส่ micro-centrifuge tube และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม 10X Running Buffer

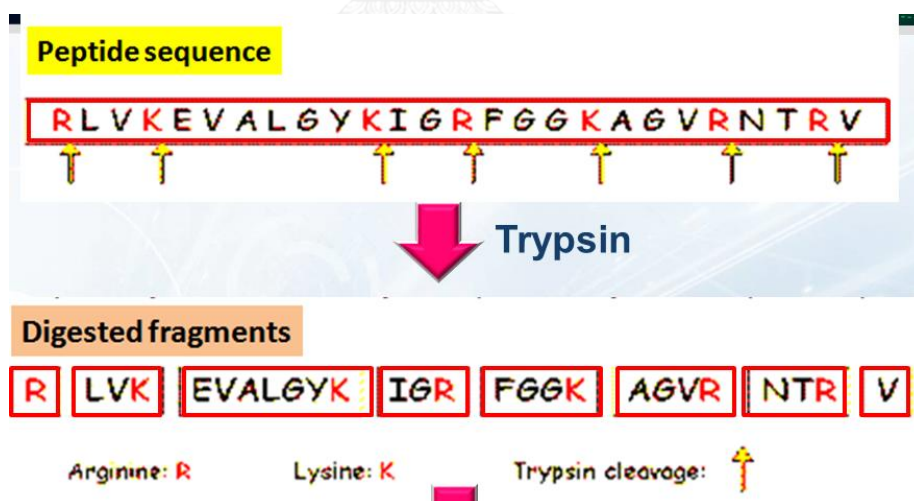
เตรียมตามอัตราส่วนดังนี้ Tris 30.3 g/L, SDS 10 g/L, Glycine 144.13 g/L และ น้ำ 1,000 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้ ให้ใช้ความเข้มข้นเป็น 1X โดยทำการเจือจางกับน้ำกลั่น 900 มิลลิตร ผสมกับ 10X Running Buffer 100 มิลลิตร โดย 1X Running Buffer ไม่ควรใช้เกิน 2 ครั้ง

การเตรียม Sample ผสมกับ 2X Laemmli Buffer เพื่อให้โปรตีนสลายพันธะ Disulphide โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1 µg/µL โดยนำมาเจือจางกับ 2X Laemmli Buffer จากนั้นนำไป Incubate ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 นาที เพื่อเร่งปฏิกิริยาในการสลายพันธะ

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย SDS-PAGE ใช้ค่ากระแสไฟฟ้าคงที่ Stacking gel ใช้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล Resolving gel ใช้กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล โดยใช้ Protein Marker จากบริษัท BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา จากนั้น ทำการ Fix เจล ด้วยน้ำยา Fixation โดยใช้เวลา 1 ชั่วโมง และย้อมสีโปรตีนด้วย Commassie Blue G-250 ใช้เวลา 16-18 ชั่วโมง หรือ Overnight โดยขณะย้อมต้องทำการเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบเวลาที่ Incubate ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำ Milli Q ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส 3 ครั้งโดยแต่ละครั้งจะใช้เวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินต่อไป

3.3.4.1 การย่อยโปรตีนภายในเจล (In gel digestion)

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งมีตำแหน่งตัดที่จำเพาะคือ หมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนไลซีน(K) และอาร์จินีน(R) โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีตำแหน่งตัดสำหรับเอนไซม์ทริปซินที่แตกต่างกัน ทำให้ได้ชิ้นส่วนของสายเปปไทด์ที่มีจำนวน และขนาดที่แตกต่างกันไป การตัดแถบโปรตีนไปย่อยจะทำทั้งแผ่นเจล โดยตัดทั้งที่เห็นแถบโปรตีนและที่ไม่เห็นแถบโปรตีน



ภาพที่ 31 การตัดของเอนไซม์ทริปซิน บริเวณกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน (39)

วิธีการทดลอง

ตัดเจลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ โดยตัดบริเวณที่มีแถบโปรตีน และไม่มีแถบโปรตีน โดยตัดทั้งแผ่นเจล จากนั้นทำการ Destain เพื่อย้ายสี Commassie Blue ออกจากเจล โดยใช้ 100 µL ของ 50 mM Ammonium bicarbonate (196 mg Ammonium Bicarbonate ผสมกับ Mili Q 50

มิลลิลิตร) เปลี่ยนน้ำยาไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเจลใสไม่มี จากนั้นเติม 100 μ L ของ 4 mM DTT/50 mM Ammonium Bicarbonate และ Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้สารละลายเย็นลง และเติม 7 μ L ของ 250 mM IAM และ Incubate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 3 μ L ของ 4 mM DTT/50 mM Ammonium Bicarbonate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูด Supernatant ทิ้งไป และเติม 100 μ L ของ Acetonitrile ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ดูดสารละลายออกและเติม Acetonitrile อีกรอบ โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นถ่าย Acetonitrile ออก และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเจลแห้ง เจลที่ได้จะต้องเป็นเจลที่แห้งสนิท สีขาวขุ่น จากนั้นเติม 10 μ L ของ 10 ng/ μ L Trypsin ผสมกับ 100 μ L ของ 50 mM Ammonium Bicarbonate (ถ้าไม่ท่วมเจล ให้เติม 50 mM Ammonium Bicarbonate เพิ่มอีก 100 μ L) และ Incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเติม Acetonitrile เพิ่มอีก $\frac{1}{2}$ ของปริมาตรที่ใส่ไอโซมัทริปซินลงไป และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการ Spin down และเก็บ Supernatant ทั้งหมดไว้ในหลอดใหม่ จากนั้นนำ Supernatant ไป SpeedVac เพื่อระเหย Acetonitrile ออก โดยใช้เวลา 6-8 ชั่วโมง หรือจนกว่าหลอดจะไม่มี Acetonitrile เหลืออยู่ จะได้ตะกอนสีขาวขุ่น ติดที่อยู่ก้นหลอด ซึ่งก็คือเปปไทด์ที่จะนำไปวิเคราะห์กับเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป หรือเก็บตัวอย่างที่ -80 องศาเซลเซียส

3.3.4.2 การย่อยโปรตีนในสารละลาย (In soluble digestion)

การย้ายเกล็ดแอมโมเนียมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายโปรตีนที่ต้องการย่อย

เติม 2 มิลลิลิตร ของ 50 mM Ammonium Bicarbonate ลงในหลอดที่มี Membrane แยกโปรตีน จากนั้น Centrifuge ที่ 3,900 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อล้าง Membrane จากนั้นเติมตัวอย่างโปรตีนลงไป และเติม 50 mM Ammonium Bicarbonate ลงไปจนให้มีปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ Centrifuge ที่ 3,900 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยเติม 50 mM Ammonium Bicarbonate จนกระทั่งมีปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ในทุกครั้งที่ปั่นในแต่ละรอบ โดยทำซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ เมื่อครบ 5 ครั้งแล้ว ให้เก็บตัวอย่างโปรตีนที่กรองได้ โดยการปั่นที่ 1,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้ ไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ตามข้อ 3.3.3 โดยหลังจากการ Desalt ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้น

การย่อยโปรตีนในสารละลายด้วยเอนไซม์ทริปซิน

เตรียมตัวอย่างโปรตีนให้มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ละลายใน 50 mM Ammonium Bicarbonate จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมา 50 μL เติม 2.1 μL ของ 100 mM DTT/50 mM Ammonium Bicarbonate และ Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเมื่ออุณหภูมิเย็นลง ให้เติม 3.48 μL ของ 250 mM IAM จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 45 นาที และเติม 2.2 μL ของ 100 mM DTT/50 mM Ammonium Bicarbonate จากนั้นเติม 10 μL ของ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trypsin (อัตราส่วนระหว่าง Enzyme : Protein = 1 : 50) และ Incubate อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วให้เก็บตัวอย่างที่ 20 องศาเซลเซียสเพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา และรอสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ต่อไป

3.3.5 การวิเคราะห์ด้วย Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ทำการละลายกลับตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านการ Speed Vac ด้วย 0.1% Formic acid โดยเติม 75 μL ของ 0.1% Formic acid ลงใน sample จากนั้นเตรียมใส่ใน Insert แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยฉีดเข้าเครื่อง 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ โดย repeat ทั้งหมด 3 ครั้ง (ถ้าไม่เห็นโปรตีนสามารถเพิ่มตั้งแต่ 5-15 μL)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วย LC-MS/MS

เปปไทด์ที่เตรียมได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย LC-MS/MS ชนิด nano-Electrospray-Quadrupole-Time of Flight (ESI-Q-ToF) (MicroToF Q II, Bruker, Germany) โดยการวิเคราะห์ด้วย nano-LC ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (Acclaim PepMap RSLC, Thermo Scientific) ขนาด 75 ไมโครเมตร \times 15 เซนติเมตร (Thermo Scientific, Waltham, MA) เปปไทด์จะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 300 นาโนลิตรต่อนาที และใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด ชนิดที่ 1 คือ กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และอะซิโตนไตรรล์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในน้ำ ชนิดที่ 2 คือ กรดฟอร์มิก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในอะซิโตนไตรรล์ โดยกำหนด condition ของ mobile phase ดังตารางที่ 5 ซึ่งปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการฉีดคือ 5 ไมโครลิตร โดยตั้งเวลาการชะดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3 เวลาการชะล้างคอลัมน์

เวลา (นาที)	เฟลเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 (เปอร์เซ็นต์)	เฟลเคลื่อนที่ชนิดที่ 2 (เปอร์เซ็นต์)
0 - 10	90	10
10 - 43	60	40
43-44	5	95
44-45	5	95

ในส่วนของ MS จะทำการวิเคราะห์ใน positive mode และตั้งโหมด MS/MS แบบอัตโนมัติ โดยเลือกเปปไทด์ที่มีประจุตั้งแต่ 2 ขึ้นไป ผลที่ได้จาก LC-MS/MS จะถูกนำไปประมวลผลโดยใช้โปรแกรม Bruker® Data Analysis และ Bruker® BioTool และนำผลที่ได้ไปทำการสืบค้นกับฐานข้อมูลผ่าน MASCOT (Matrix Science, USA) www.matrixscience.com เพื่อระบุชนิดของโปรตีน

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) ด้วยโปรแกรม Mascot

การวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของโปรตีนในตัวอย่างกระชายและกระชายดำ เพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (Database) โดยใช้ mascot search engine www.matrixscience.com โดยเลือก Database (พืชตระกูลขิง) เอนไซม์ (ทริปซิน) missed cleavages (1) Taxonomy (All entries) Variable modification (Carbamidomethyl, Oxidation) เป็นต้น จากนั้นเลือกไฟล์ที่เป็นนามสกุล mgf ผลที่ได้จะแสดงในภาพที่ 40

ภาพที่ 32 หน้าเว็บไซต์ www.matrixscience.com

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : natapong
 Email : n_kawjit@hotmail.com
 Search title : Annona Squamosa spot no.28
 MS data file : Annona squamosa Spot no.28.mgf

Database : SwissProt 2013_04 (539829 sequences; 191670831 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (20253 sequences)
 Timestamp : 27 Apr 2013 at 10:19:49 GMT
 Protein hits : **HSPB1_HUMAN** Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2
K2C1_HUMAN Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6

1. **HSPB1_HUMAN** Mass: 22768 **Score: 90** Matches: 5(3) Sequences: 5(3) emPAI: 0.86
 Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 11	459.2600	916.5054	916.4866	0.0189	0	31	0.32	1	U	K.DGVVEITGK.H
<input checked="" type="checkbox"/> 17	481.2300	960.4454	960.4454	0.0001	0	21	3.3	1	U	R.GPSWDPPR.D
<input checked="" type="checkbox"/> 35	538.3200	1074.6254	1074.5669	0.0585	0	58	0.00057	1	U	R.QLSSGVSEIR.H
<input checked="" type="checkbox"/> 54	573.8000	1145.5854	1145.6292	-0.0438	1	58	0.00047	1	U	K.TRDGVVEITGK.H
<input checked="" type="checkbox"/> 69	595.2900	1782.8482	1782.9152	-0.0670	0	39	0.048	1	U	R.VSLDVHHPDELTVK.T

2. **K2C1_HUMAN** Mass: 65999 **Score: 74** Matches: 1(1) Sequences: 1(1) emPAI: 0.06
 Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 95	651.8700	1301.7254	1301.7078	0.0176	0	74	1e-05	1	U	R.SLDLDSIIAEVK.A

ภาพที่ 33 การเปรียบเทียบ Mass spectrum ด้วยฐานข้อมูล Mascot

3.4 การหาปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining

วิธีการทดลอง

ตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2 จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Native-PAGE ด้วย Resolving gel 15% T และ Stacking gel 4% T โดยใช้ตัวอย่างโปรตีน 10 µg จากนั้นใส่ Native electrophoresis buffer ให้ท่วมเจล ตั้งกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 25 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล จากนั้นย้อมเจลด้วย 50 มิลลิลิตร ของ Riboflavin-NBT solution (5 mg Riboflavin, 12.5 mg NBT และ 50 มิลลิลิตร Phosphate Buffer pH 7.0) เป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด จากนั้นถ่าย Riboflavin-NBT solution ออก และล้างสีด้วย 0.1 %v/v TEMED 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด จากนั้นถ่าย 0.1 %v/v TEMED ออก และให้แสงไฟซึ่งมีกระแสไฟฟ้า 25 วัตต์แก่เจล เป็นเวลา 15 นาที แถบโปรตีน SOD ที่ได้จะเป็นแถบโปรตีนใส และพื้นหลังจะเป็นสีม่วงดำ จากนั้นคำนวณหาปริมาณ SOD ในแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay

3.5.1 การสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay

นำสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ Methanol 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (Supernatant) เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนในกระชายเหลืองและกระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay

เตรียมสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยชั่ง ABTS มา 144 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยชั่ง potassium persulfate มา 33.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำ ABTS และ potassium persulfate มาผสมกัน ด้วยอัตราส่วน 2:3 มิลลิลิตรแล้วเก็บในที่มืด 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ซึ่งสารที่ได้คือ ABTS++ จากนั้นนำไปเจือจางด้วย Ethanol โดยต้องปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.7 ± 0.02 จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ L- ascorbic acid ทั้งหมด 7 ค่า ความเข้มข้น ดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 และ 1.5625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรด แอสคอร์บิก 40 มิลลิกรัมละลายใน Methanol 40 มิลลิลิตร เพื่อเก็บเป็น Stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแบ่งใส่ micro-centrifuge tube เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้น จึงนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการตามที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นเตรียมสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหลืองและกระชายดำตามที่กล่าวมาในข้อ 3.5.1 แล้วนำไปทดสอบตามตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 4 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัตถุประสงค์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

Reagent	Control (μL)	Standard blank (μL)	Standard (μL)	Sample blank (μL)	Sample (μL)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
สารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid		20	20	-	-
สารละลาย ABTS	180	-	180	-	180
สารละลาย Methanol	20	180	-	-	-
สารละลาย Phosphate Buffer	-	-	-	180	-
ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm					

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคิดเป็น %Radical scavenging activity โดยคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = 100 \times (\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{sample blank}})) / \text{Abs}_{\text{control}}$$

จากนั้นนำค่า %Radical scavenging activity ที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) ไปสร้างกราฟมาตรฐาน และหาสมการเส้นตรงเพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณรวมของโปรตีน ดังนี้

$$\text{Antioxidant activity} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ } (\mu\text{g}/\text{ml})}{\text{ปริมาณรวมโปรตีน } (\text{mg}/\text{mL})}$$

หน่วยที่ได้ของ Antioxidant activity คือ $\mu\text{g VCEAC}/\text{mg proteins}$

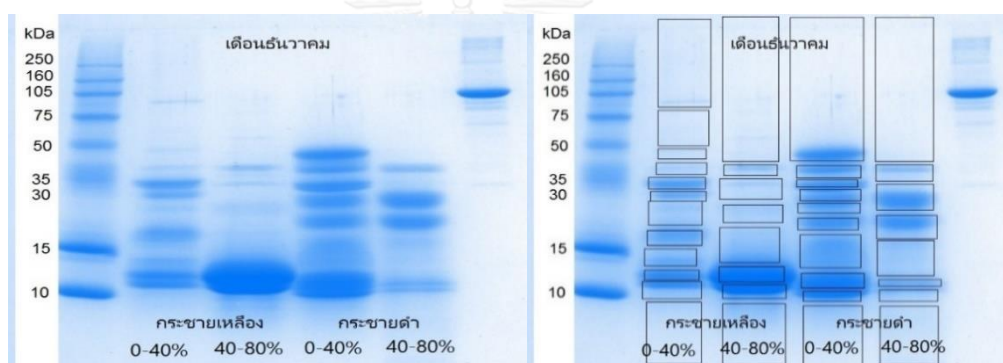
โดย VCEAC ย่อมาจาก Vitamin C equivalent antioxidant capacity

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS

การระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธี GeLC-MS/MS เริ่มจากการนำสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ มาวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นนำสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลือง และเหง้ากระชายดำ ไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เพื่อแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล ผลการทดสอบที่ได้ แสดงดังภาพที่ 34



ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ซ้าย) และแสดงการตัดเจลเพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ เพื่อจะนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค LC-MS/MS (ขวา)

หลังจากวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE จะทำการตัดเจลตามภาพด้านบน เพื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ ทริปซิน (In gel digestion) จากนั้นนำเปปไทด์ที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง LC-MS/MS และทำการระบุชนิดโปรตีนจากฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม MASCOT search engine โดยเลือกฐานข้อมูลของ Plant และ Zingiberaceae

สำหรับการระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Label-Free LC-MS/MS จะเริ่มจากนำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ มาทำการ Desalt และวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นทำการย่อยโปรตีนที่อยู่ในสารละลายด้วยเอนไซม์ทริปซิน (In solution digestion) จากนั้นนำเปปไทด์ที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง LC-MS/MS และทำการระบุชนิดโปรตีนจากฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม MASCOT search engine โดยเลือกฐานข้อมูลของ Plant และ Zingiberaceae เช่นเดียวกับวิธี GeLC-MS/MS

4.1.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลือง ด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS

No.	Accession	Protein	Gel-C MS/MS	Label-free LC-MS/MS
1	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	Yes	Yes
2	gi 18202415	Zingipain-2 or Cysteine proteinase GP-II	Yes	ND
3	gi 557637559	hypothetical chloroplast RF19 [Curcuma roscoeana]	Yes	ND
4	gi 674958646	BnaA05g06360D [Brassica napus]	Yes	ND
5	gi 657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1 [Malus domestica]	Yes	ND
6	gi 674954933	BnaA03g04250D [Brassica napus]	Yes	ND
7	gi 674959494	BnaA03g28480D [Brassica napus]	Yes	ND
8	gi 669034083	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [Hedychium coronarium]	Yes	ND
9	gi 674920607	BnaA02g13390D [Brassica napus]	Yes	ND
10	gi 674962838	BnaA03g09250D [Brassica napus]	Yes	ND
11	gi 674955780	BnaC07g19860D [Brassica napus]	Yes	ND
12	gi 674945666	BnaC02g32640D [Brassica napus]	Yes	ND
13	gi 674937488	BnaA07g25910D [Brassica napus]	Yes	ND

No.	Accession	Protein	Gel-C MS/MS	Label-free LC-MS/MS
14	gi 720068209	PREDICTED: heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26-like isoform X1 [Nelumbo nucifera]	Yes	ND
15	gi 508699516	Glutamate recertor 2 plant [Theobroma cacao]	Yes	ND
16	gi 674961641	BnaC08g28270D [Brassica napus]	ND	Yes
17	gi 674960227	BnaC05g27440D [Brassica napus]	ND	Yes
18	gi 674955158	BnaA03g06500D [Brassica napus]	ND	Yes
19	gi 674957342	BnaA04g03590D [Brassica napus]	ND	Yes
20	gi 674959098	BnaA03g32440D [Brassica napus]	ND	Yes
21	gi 380467954	cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [Zingiber officinale]	ND	Yes
22	gi 57118009	cysteine protease gp3a [Zingiber officinale]	ND	Yes
23	gi 674959032	BnaA04g07960D [Brassica napus]	ND	Yes
24	gi 674962037	BnaC04g16970D [Brassica napus]	ND	Yes
25	gi 674957328	BnaA04g03450D [Brassica napus]	ND	Yes
26	gi 674957341	BnaA04g03580D [Brassica napus]	ND	Yes
27	gi 674960435	BnaC06g33830D [Brassica napus]	ND	Yes
28	gi 674922258	BnaA03g46550D [Brassica napus]	ND	Yes
29	gi 674955792	BnaC07g19980D [Brassica napus]	ND	Yes

* ชื่อโปรตีน [ชื่อสปีชีส์พืช] เช่น โปรตีน BnaC07g19980D [Brassica napus] หมายถึง ชื่อโปรตีน คือ BnaC07g19980D และชื่อของสปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนี้ คือ พืช Brassica napus เป็นต้น

* Yes หมายถึง ตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

จากตารางผลการเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ระหว่าง GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบว่า มีโปรตีน 1 ชนิด ที่ตรวจพบได้ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 หรือ Cysteine proteinase GP-I ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จัดเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยโปรตีน หรือจัดเป็นซิสทีนโปรติเอส (Cysteine peotinase) (107) สำหรับโปรตีนที่ตรวจวิเคราะห์พบเฉพาะในวิธี GeLC- MS/MS จะพบทั้งหมด 15 ชนิด และมีโปรตีน 14 ชนิดที่ตรวจวิเคราะห์พบเฉพาะในวิธี Label-free LC-MS/MS

4.1.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS

No.	Accession	Protein	Gel-C MS/MS	Label-free LC-MS/MS
1	gij18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	Yes	Yes
2	gij674959110	BnaA03g32320D [Brassica napus]	Yes	ND
3	gij674959494	BnaA03g28480D [Brassica napus]	Yes	ND
4	gij657955665	BnaC07g18710D [Brassica napus]	Yes	ND
5	gij256002665	copper/zinc superoxide dismutase [Curcuma aromatica]	Yes	ND
6	gij449326850	hypothetical chloroplast RF19 [Alpinia zerumbet]	Yes	Yes
7	gij657959142	BnaA03g32000D [Brassica napus]	Yes	ND
8	gij57118011	cysteine protease gp3b [Zingiber officinale]	Yes	ND
9	gij657957357	BnaA04g03740D [Brassica napus]	Yes	ND

No.	Accession	Protein	Gel-C MS/MS	Label-free LC-MS/MS
10	gi 720068209	PREDICTED: heavy metal-associated isophenylated plant protein 26-like isoform X1 [Nelumbo nucifera]	Yes	ND
11	gi 657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1 [Malus domestica]	Yes	ND
12	gi 674955968	BnaA07g05890D [Brassica napus]	Yes	ND
13	gi 674882145	BnaC08g14760D [Brassica napus]	Yes	ND
14	gi 441428253	Cyclopropane fatty-acrl-phospholipid synthase, plant type [Photobacterium sp. AK15]	Yes	ND
15	gi 674962584	BnaC03g06710D [Brassica napus]	Yes	ND
16	gi 674965723	BnaA07g20060D [Brassica napus]	Yes	ND
17	gi 186478739	plant thionin family protein [Arabidopsis thaliana]	Yes	ND
18	gi 674959497	BnaA03g28450D [Brassica napus]	Yes	ND
19	gi 674964488	BnaC01g05030D [Brassica napus]	Yes	ND
20	gi 674959367	BnaA03g29750D [Brassica napus]	Yes	ND
21	gi 674959896	BnaC08g24230D [Brassica napus]	Yes	ND
22	gi 674876658	BnaA01g36520D [Brassica napus]	Yes	ND
23	gi 674961051	BnaC07g45330D [Brassica napus]	Yes	ND

No.	Accession	Protein	Gel-C MS/MS	Label-free LC-MS/MS
24	gij674958327	BnaC09g25790D [Brassica napus]	Yes	ND
25	gij355501173	receptor-like kinase plant [Medicago truncatula]	ND	Yes
26	gij508786811	Plant U-box 13 isoform 2 [Theobroma cacao]	ND	Yes
27	gij674930939	BnaA02g22990D [Brassica napus]	ND	Yes

* ชื่อโปรตีน [ชื่อสปีชีส์พืช] เช่น โปรตีน BnaC07g19980D [Brassica napus] หมายถึง ชื่อโปรตีนคือ BnaC07g19980D และชื่อของสปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนี้ คือ พืช Brassica napus เป็นต้น

* Yes หมายถึง ตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

จากตารางผลการเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบว่า มีโปรตีน 2 ชนิด ที่ตรวจพบได้ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 หรือ Cysteine proteinase GP-I จัดเป็นเอนไซม์ที่ไฮยอลิโปรตีน หรือจัดเป็นซิสทีอินโปรตีเอส (Cysteine peotinase) (107) และ โปรตีน hypothetical chloroplast RF19 [Alpinia zerumbet] โปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนในกระชายดำ โดยโปรตีนชนิดนี้จัดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการถอดรหัสของเซลล์พืช หรือ transcriptional machinery ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนในพืช (108) สำหรับโปรตีนที่ตรวจวิเคราะห์พบเฉพาะในวิธี GeLC-MS/MS จะพบทั้งหมด 22 ชนิด และมีโปรตีน 3 ชนิดที่ตรวจวิเคราะห์พบเฉพาะในวิธี Label-free LC-MS/MS

จากการระบุชนิดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ โดยใช้วิธีที่แตกต่างกันคือ วิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบว่าชนิดและจำนวนของโปรตีนที่ระบุได้จากทั้งสองวิธี มีความแตกต่างกัน และมีโปรตีนบางชนิดที่ระบุได้จากทั้งสองวิธี ทั้งนี้ ทั้งสองวิธีที่ใช้มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันไป เช่น วิธี GeLC-MS/MS เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง และมีขั้นตอนที่ซับซ้อนกว่า เนื่องจากเป็นการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (1D-GE) และวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง LC-MS/MS (109) ขณะที่วิธี Label-free LC-MS/MS เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่างน้อยกว่า และขั้นตอนไม่ซับซ้อน แต่มีข้อเสียที่เปปไทด์ทั้งหมดจะถูกแยกด้วยระบบ HPLC เพียงอย่างเดียว (110) ทำให้การแยกเปปไทด์จำนวนมากในเวลาเดียวกัน

เป็นไปได้ไม่ดี และส่งผลต่อจำนวนเปปไทด์ที่เข้าสู่เครื่อง Mass Spectrometer ในเวลาพร้อมๆกัน ทำให้เกิด Ion suppression ขึ้นในขั้นตอน Ionization ทำให้จำนวนเปปไทด์ที่ตรวจวัดได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น จึงควรเพิ่มขั้นตอนการแยกเปปไทด์ก่อน เช่น การใช้ระบบ Two Dimensional-Liquid Chromatography (2D-LC) นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดและปริมาณโปรตีนในพืช ความสามารถในการแตกตัวของเปปไทด์ การทำงานของเอนไซม์ทริปซิน เป็นต้น (111) นอกจากนี้ในขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (1D-GE) หรือเทคนิค GeLC-MS/MS ในขั้นตอนการสกัดเปปไทด์ออกจากชั้นเจล อาจทำให้เกิดการสูญเสียเปปไทด์ไป เพราะสกัดเปปไทด์ออกมาได้ไม่หมด แต่สำหรับวิธี Label-free LC-MS/MS เป็นการย่อยโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในสารละลาย จึงไม่ทำให้เกิดการสูญเสียเปปไทด์ (112) นอกจากนี้วิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS จะเหมาะกับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเซลล์พืช เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าในเซลล์สัตว์ สำหรับโปรตีนในเซลล์สัตว์ จะนิยมใช้เทคนิค 2D-GE

4.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS

เพื่อทดสอบวิธี GeLC-MS/MS ในการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ในตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงใช้ตัวอย่างกระชายเหลืองและกระชายดำ อย่างละ 3 ตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกันมาทำการวิเคราะห์

4.2.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
1	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	Yes	Yes	Yes
2	gi 18202415	Zingipain-2 or Cysteine proteinase GP-II	Yes	ND	Yes
3	gi 557637559	hypothetical chloroplast RF19 [Curcuma roscoeana]	Yes	Yes	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
4	gi 57118009	cysteine protease gp3a [Zingiber officinale]	Yes	Yes	ND
5	gi 6137410	Chain A, The 2.1 Angstrom Structure Of A Cysteine Protease With Proline Specificity From Ginger Rhizome, Zingiber Officinale	Yes	Yes	ND
6	gi 508699795	BnaC06g19550D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
7	gi 508699795	Plant U-box 49 isoform 4 [Theobroma cacao]	Yes	ND	ND
8	gi 674963275	BnaA10g18560D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
9	gi 674957320	BnaA04g03370D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
10	gi 674939826	BnaA06g05420D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
11	gi 674958685	BnaA05g06750D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
12	gi 674958646	BnaA05g06360D [Brassica napus]	Yes	Yes	Yes
13	gi 657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1 [Malus domestica]	Yes	ND	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
14	gi 674962225	BnaC07g05100D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
15	gi 674963889	BnaA10g24700D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
16	gi 256002665	copper/zinc superoxide dismutase [Curcuma aromatica]	Yes	Yes	ND
17	gi 674964704	BnaC01g02870D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
18	gi 674954933	BnaA03g04250D [Brassica napus]	Yes	Yes	Yes
19	gi 674959986	BnaC08g23330D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
20	gi 674962683	BnaC03g07700D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
21	gi 674964517	BnaC01g04740D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
22	gi 355333071	Chain A, Recombinant Human Serum Albumin from Transgenic plant	ND	Yes	ND
23	gi 674958770	BnaA05g07600D [Brassica napus]	ND	Yes	ND

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
24	gi 674876153	BnaCnng30180D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
25	gi 619492980	183 kDa replicase [Plant transient expression vector pGR2i-dCP: GFP]	ND	Yes	ND
26	gi 674866992	BnaAnng23210D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
27	gi 674959326	BnaA03g30160D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
28	gi 397725632	gluta-disulfide reductase, plant [Sphingobium sp. AP49]	ND	Yes	ND
29	gi 674964057	BnaA10g26380D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
30	gi 674953593	BnaA05g01320D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
31	gi 674955463	BnaA09g33860D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
32	gi 674956444	BnaC04g39490D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
33	gi 674959410	BnaA03g29320D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
34	gi 674959494	BnaA03g28480D [Brassica napus]	ND	ND	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
35	gi 669034083	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [Hedychium coronarium]	ND	ND	Yes
36	gi 674920607	BnaA02g13390D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
37	gi 674962838	BnaA03g09250D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
38	gi 674955780	BnaC07g19860D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
39	gi 674945666	BnaC02g32640D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
40	gi 674937488	BnaA07g25910D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
41	gi 720068209	PREDICTED: heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26-like isoform X1 [Nelumbo nucifera]	ND	ND	Yes
42	gi 508699516	Glutamate recertor 2 plant [Theobroma cacao]	ND	ND	Yes

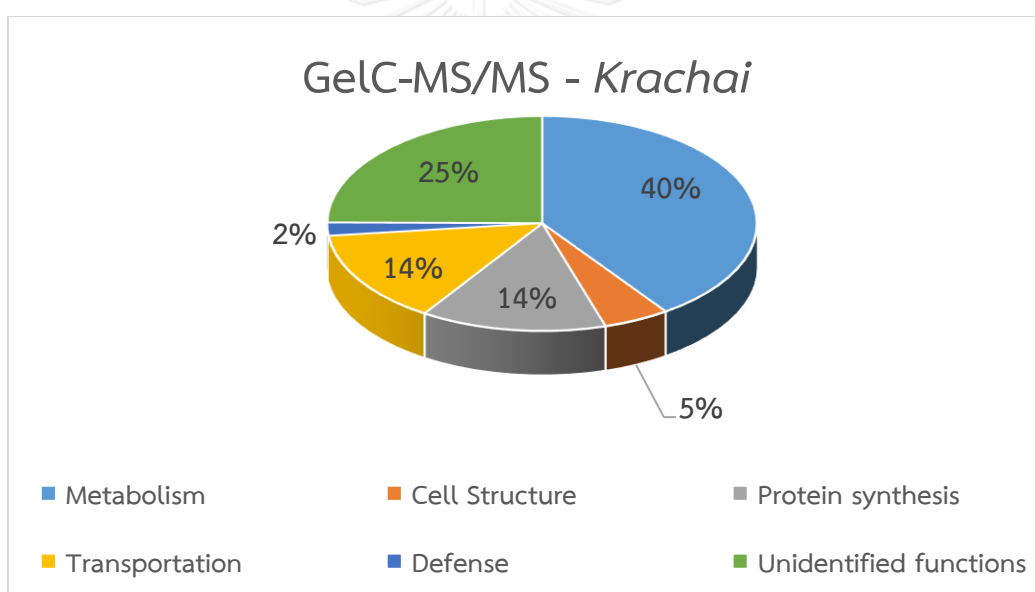
* ชื่อโปรตีน [ชื่อสปีชีส์พืช] เช่น โปรตีน BnaC07g19980D [Brassica napus] หมายถึง ชื่อโปรตีนคือ BnaC07g19980D และชื่อของสปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนี้ คือ พืช Brassica napus เป็นต้น

* Yes หมายถึง ตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

จากผลการระบุชนิดของโปรตีนในกระชายเหง้าเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี GeLC-MS/MS พบว่าชนิดและจำนวนของโปรตีนที่พบในแต่ละตัวอย่างกระชายเหลืองแตกต่างกัน แต่มีโปรตีน 3 ชนิดที่พบได้ในทุกๆเดือนที่เก็บตัวอย่างมา ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 จัดเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน หรือจัดเป็นซิสทีอินโปรติเอส (Cysteine peotainase) (107) โปรตีน hypothetical chloroplast RF19 [*Curcuma roscoeana*] โดยโปรตีนชนิดนี้จัดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการถอดรหัสของเซลล์พืช หรือ transcriptional machinery ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนในพืช (108) และ โปรตีน BnaA05g06360D [*Brassica napus*] ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับขบวนการ mRNA splicing, via spliceosome ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนในพืช (113) นอกนั้นชนิดของโปรตีนในแต่ละเดือนก็จะพบแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 7

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการระบุชนิดโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองทั้ง 3 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์หาหน้าที่ของโปรตีน แสดงผลดังภาพด้านล่างต่อไปนี้



ภาพที่ 35 การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายเหลืองด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS

สำหรับโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายเหลือง ด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS มีโปรตีนที่ทำหน้าที่ในขบวนการ Metabolism ทั้งหมด 40% และอีก 60% ที่เหลือ ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และมีโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

4.2.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่
แตกต่างกันด้วยวิธี GeLC-MS/MS

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน
ด้วยวิธี GeLC-MS/MS

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
1	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	Yes	Yes	Yes
2	gi 355333071	Chain A, Recombinant Human Serum Albumin From Transgenic plant	Yes	Yes	ND
3	gi 557637559	hypothetical chloroplast RF19 [Curcuma roscoeana]	Yes	ND	ND
4	gi 674959110	BnaA03g32320D [Brassica napus]	Yes	Yes	Yes
5	gi 413909848	Cu,Zn superoxide dismutase, partial [Curcuma aromatica]	Yes	ND	ND
6	gi 674963806	BnaA10g23870D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
7	gi 674957341	BnaA04g03580D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
8	gi 658023515	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform 1-like [Malus domestica]	Yes	ND	ND

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
9	gi 674956173	BnaC08g03250D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
10	gi 674955463	BnaA09g33860D [Brassica napus]	Yes	Yes	ND
11	gi 674958171	BnaA01g01390D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
12	gi 674963703	BnaA10g22840D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
13	gi 674954438	BnaA01g09780D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
14	gi 674965535	BnaA07g18180D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
15	gi 674954737	BnaA03g02290D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
16	gi 657392695	plant organelle RNA recognition domain protein [Medicago truncatula]	Yes	ND	ND
17	gi 674871558	BnaAnng18410D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
18	gi 674902173	BnaC05g21910D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
19	gi 674958646	BnaA05g06360D [Brassica napus]	Yes	ND	ND
20	gi 674959494	BnaA03g28480D [Brassica napus]	Yes	ND	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
21	gi 508773629	Plant intracellular Ras-Group-related LRR protein 9 [Theobroma cacao]	Yes	ND	ND
22	gi 77552200		Yes	ND	ND
23	gi 146145877	plant dual-specificity MAP kinase family domain protein [Tetrahymena thermophila]	Yes	ND	ND
24	gi 412990846	plant synaptotagmin [Bathycoccus presinos]	ND	Yes	ND
25	gi 657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1 [Malus domestica]	ND	Yes	ND
26	gi 674955383	BnaA09g33060D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
27	gi 657960835	BnaC07g43170D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
28	gi 657955665	BnaC07g18710D [Brassica napus]	ND	Yes	Yes
29	gi 657959328	BnaA03g30140D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
30	gi 731321786	PREDICTED: common plant regulatory factor	ND	Yes	ND

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
		1-like isoform X1 [Beta vulgaris subsp. vulgaris]			
31	gi 657961084	BnaC07g45660D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
32	gi 657965427	BnaA07g17100D [Brassica napus]	ND	Yes	ND
33	gi 256002665	copper/zinc superoxide dismutase [Curcuma aromatica]	ND	ND	Yes
34	gi 449326850	hypothetical chloroplast RF19 [Alpinia zerumbet]	ND	ND	Yes
35	gi 657959142	BnaA03g32000D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
36	gi 57118011	cysteine protease gp3b [Zingiber officinale]	ND	ND	Yes
37	gi 657957357	BnaA04g03740D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
38	gi 720068209	PREDICTED: heavy metal-associated isophenylated plant protein 26-like isoform X1 [Nelumbo nucifera]	ND	ND	Yes
39	gi 657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1	ND	ND	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
		isoform X1 [Malus domestica]			
40	gi 674955968	BnaA07g05890D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
41	gi 674882145	BnaC08g14760D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
42	gi 441428253	Cyclopropane fatty-acrl- phospholipid synthase, plant type [Photobacterium sp. AK15]	ND	ND	Yes
43	gi 674962584	BnaC03g06710D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
44	gi 674965723	BnaA07g20060D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
45	gi 186478739	plant thionin family protein [Arabidopsis thaliana]	ND	ND	Yes
46	gi 674959497	BnaA03g28450D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
47	gi 674964488	BnaC01g05030D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
48	gi 674959367	BnaA03g29750D [Brassica napus]	ND	ND	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2	Sample3
49	gi 674959896	BnaC08g24230D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
50	gi 674876658	BnaA01g36520D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
51	gi 674961051	BnaC07g45330D [Brassica napus]	ND	ND	Yes
52	gi 674958327	BnaC09g25790D [Brassica napus]	ND	ND	Yes

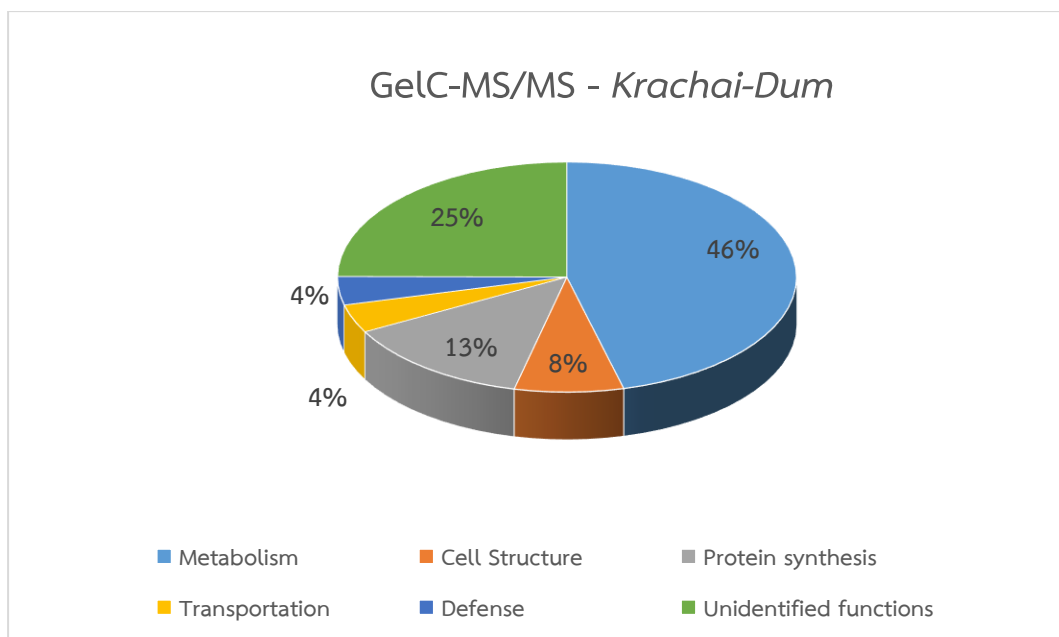
* ชื่อโปรตีน [ชื่อสปีชีส์พืช] เช่น โปรตีน BnaC07g19980D [Brassica napus] หมายถึง ชื่อโปรตีนคือ BnaC07g19980D และชื่อของสปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนี้ คือ พืช Brassica napus เป็นต้น

* Yes หมายถึง ตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

จากผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS ที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน พบว่าชนิดและจำนวนของโปรตีนที่พบในแต่ละเดือนในเหง้ากระชายดำแตกต่างกันด้วย แต่ก็มีโปรตีน 2 ชนิดที่พบได้ในทุกๆเดือนที่เก็บตัวอย่างมา ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 จัดเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน หรือจัดเป็นซิสทีอินโปรติเอส (Cysteine peoteinase) (107) โปรตีน BnaA03g32320D [Brassica napus] โปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการ ATP binding โดยจะเกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายพลังงานในพืช (114) นอกนั้นชนิดของโปรตีนในแต่ละเดือนก็จะพบแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 8

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการระบุชนิดโปรตีนในเหง้ากระชายดำทั้ง 3 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์หาหน้าที่ของโปรตีน แสดงผลดังภาพด้านล่างต่อไปนี้



ภาพที่ 36 การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายดำด้วยเทคนิค GelC-MS/MS สำหรับโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายดำ ด้วยเทคนิค GelC-MS/MS มีโปรตีนที่ทำหน้าที่ในขบวนการ Metabolism ทั้งหมด 46% และอีก 54% ที่เหลือ ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน

4.3 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

เพื่อทดสอบวิธี Label-free LC-MS/MS ในการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ในตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ผู้วิจัยจึงใช้ตัวอย่างกระชายเหลืองและกระชายดำ อย่างละ 2 ตัวอย่างที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกันมาทำการวิเคราะห์

4.3.1 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label free LC-MS/MS

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2
1	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	Yes	Yes
2	gi 674961641	BnaC08g28270D [Brassica napus]	Yes	Yes
3	gi 674960227	BnaC05g27440D [Brassica napus]	Yes	Yes
4	gi 674904442	BnaA06g19270D [Brassica napus]	Yes	ND
5	gi 674958811	BnaA05g08010D [Brassica napus]	Yes	ND
6	gi 674955562	BnaC03g53810D [Brassica napus]	Yes	ND
7	gi 6137410	Chain A, The 2.1 Angstrom Structure Of A Cysteine Protease With Proline Specificity From Ginger Rhizome, Zingiber Officinale	Yes	ND
8	gi 508699795	Plant U-box 49 isoform 4 [Theobroma cacao]	Yes	ND
9	gi 674962019	BnaC04g16790D [Brassica napus]	Yes	ND
10	gi 674958685	BnaA05g06750D [Brassica napus]	Yes	ND

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2
11	gi 743881172	PREDICTED: filament-like plant protein 4 [Elaeis guineensis]	Yes	ND
12	gi 729330099	PREDICTED: filament-like plant protein 4 [Tarenaya hassleriana]	Yes	ND
13	gi 657980584	PREDICTED: filament-like plant protein 7 [Malus domestica]	Yes	ND
14	gi 674963320	BnaA10g19010D [Brassica napus]	Yes	ND
15	gi 674871025	BnaC08g19200D [Brassica napus]	Yes	ND
16	gi 645277925	PREDICTED: filament-like plant protein 7 [Prunus mume]	Yes	ND
17	gi 674877011	BnaC05g50270D [Brassica napus]	Yes	ND
18	gi 122242586	Filament-like plant protein 4; Short=AtFPP4	Yes	ND
19	gi 674905370	BnaUnng00340D [Brassica napus]	Yes	ND
20	gi 674954758	BnaA03g02500D [Brassica napus]	Yes	ND
21	gi 674958117	BnaA01g01930D [Brassica napus]	Yes	ND
22	gi 674960776	BnaC07g42580D [Brassica napus]	Yes	ND
23	gi 674961953	BnaC04g16130D [Brassica napus]	Yes	ND
24	gi 674867697	BnaAnng22340D, partial [Brassica napus]	Yes	ND
25	gi 674955158	BnaA03g06500D [Brassica napus]	ND	Yes
26	gi 674957342	BnaA04g03590D [Brassica napus]	ND	Yes
27	gi 674959098	BnaA03g32440D [Brassica napus]	ND	Yes

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2
28	gi 380467954	cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [Zingiber officinale]	ND	Yes
29	gi 57118009	cysteine protease gp3a [Zingiber officinale]	ND	Yes
30	gi 674959032	BnaA04g07960D [Brassica napus]	ND	Yes
31	gi 674962037	BnaC04g16970D [Brassica napus]	ND	Yes
32	gi 674957328	BnaA04g03450D [Brassica napus]	ND	Yes
33	gi 674957341	BnaA04g03580D [Brassica napus]	ND	Yes
34	gi 674960435	BnaC06g33830D [Brassica napus]	ND	Yes
35	gi 674922258	BnaA03g46550D [Brassica napus]	ND	Yes
36	gi 674955792	BnaC07g19980D [Brassica napus]	ND	Yes

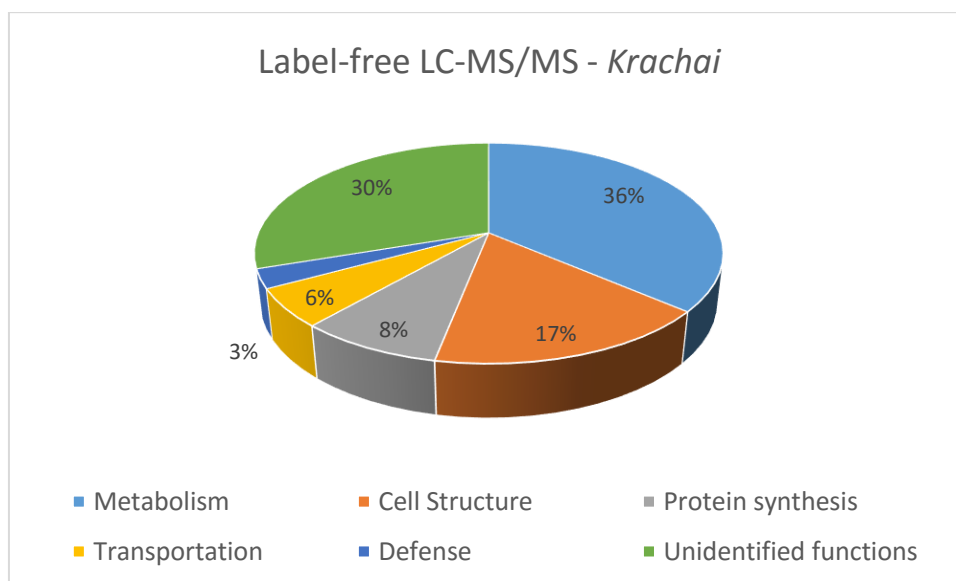
* ชื่อโปรตีน [ชื่อสปีชีส์พืช] เช่น โปรตีน BnaC07g19980D [Brassica napus] หมายถึง ชื่อโปรตีนคือ BnaC07g19980D และชื่อของสปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนี้ คือ พืช Brassica napus เป็นต้น

* Yes หมายถึง ตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

จากผลการระบุชนิดของโปรตีนในกระชายเหลืองด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS ที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่แตกต่างกัน พบว่าชนิดของโปรตีนที่พบในแต่ละเดือนในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวแตกต่างกันจะมีชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย แต่มีโปรตีน 3 ชนิดที่พบได้ในทุกๆเดือนที่เก็บตัวอย่างมา ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 จัดเป็นเอนไซม์ที่ไฮยอลิโปรตีน หรือจัดเป็นซิสทีอินโปรติเอส (Cysteine peoteinase) (107) โปรตีน BnaC08g28270D [Brassica napus] โดยโปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารมวลโมเลกุลขนาดใหญ่และขนาดเล็กภายในและภายนอกเซลล์ (115) และโปรตีน BnaC05g27440D [Brassica napus] ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (116) นอกนั้นชนิดของโปรตีนในแต่ละเดือนก็จะพบแตกต่างกันไป

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการระบุชนิดโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS ทั้ง 2 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์หาหน้าที่ของโปรตีน พบว่ามีโปรตีนที่ทำหน้าที่ในขบวนการ Metabolism ทั้งหมด 36% และอีก 64% ที่เหลือ ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่งแปลกปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และมีโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน



ภาพที่ 37 การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายเหลืองด้วยเทคนิค Label free LC-MS/MS

4.3.2 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ แตกต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน
ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

No	Accession	Protein	Sample1	Sample2
1	gi 674867298	BnaCnn52220D [Brassica napus]	Yes	ND
2	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	Yes	Yes
3	gi 355501173	receptor-like kinase plant [Medicago truncatula]	Yes	Yes
4	gi 674965264	BnaA07g15470D [Brassica napus]	Yes	ND
5	gi 508786811	Plant U-box 13 isoform 2 [Theobroma cacao]	Yes	Yes
6	gi 674956003	BnaA07g06240D [Brassica napus]	Yes	ND
7	gi 674956036	BnaA07g06570D [Brassica napus]	Yes	ND
8	gi 449326850	hypothetical chloroplast RF19 [Alpinia zerumbet]	ND	Yes
9	gi 674930939	BnaA02g22990D [Brassica napus]	ND	Yes

* ชื่อโปรตีน [ชื่อสปีชีส์พืช] เช่น โปรตีน BnaC07g19980D [Brassica napus] หมายถึง ชื่อโปรตีนคือ BnaC07g19980D และชื่อของสปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนี้ คือ พืช Brassica napus เป็นต้น

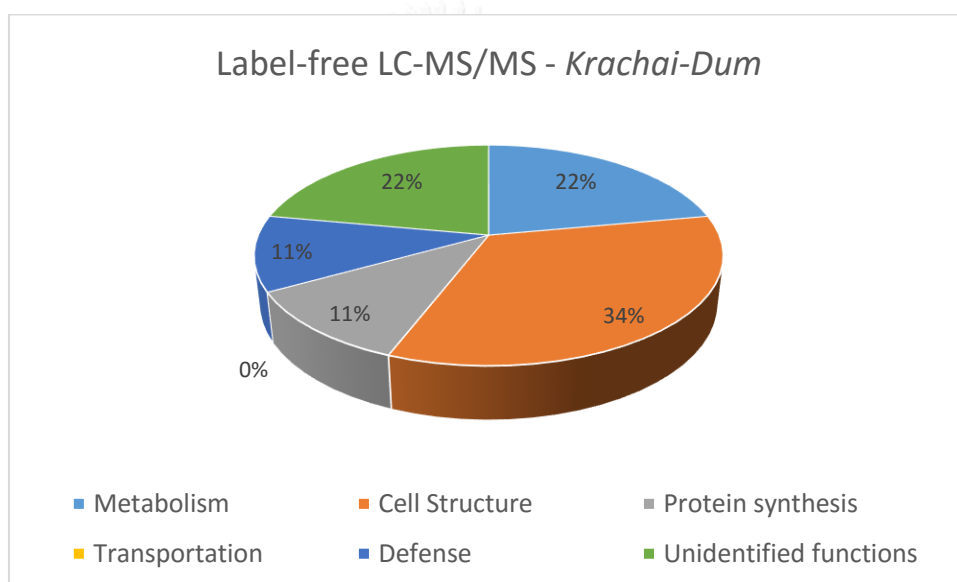
* Yes หมายถึง ตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

จากผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS พบว่าชนิดของโปรตีนที่พบในแต่ละเดือนในกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน จะมีชนิดและจำนวนของโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย แต่มีโปรตีน 3 ชนิดที่พบได้ในทุกๆเดือนที่เก็บตัวอย่างมา ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 จัดเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยโปรตีน หรือจัดเป็นซิสทีอินโปรตีน

เอส (Cysteine peptinase) (107) โปรตีน receptor-like kinase plant [Medicago truncatula] และ โปรตีน Plant U-box 13 isoform 2 [Theobroma cacao] ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ ขบวนการ ubiquitin-protein transferase activity โดยโปรตีนชนิดนี้จัดเป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดสาร โมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง (117)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการระบุชนิดโปรตีนในเหง้ากระชายดำด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS ทั้ง 2 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์หาหน้าที่ของโปรตีน พบว่ามีโปรตีนที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ Metabolism ทั้งหมด 22% และอีก 78% ที่เหลือ ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน การป้องกันสิ่ง แปรกลปลอม เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารในเซลล์ และมี โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน



ภาพที่ 38 การระบุหน้าที่ของโปรตีนที่ตรวจพบในเหง้ากระชายดำด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS

จากผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบโปรตีนทั้งหมด 42 และ 36 ชนิด ตามลำดับ และ ผลการระบุชนิดของ โปรตีนในเหง้ากระชายดำด้วยวิธี GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบโปรตีนทั้งหมด 52 และ 9 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งการใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน จะส่งผลต่อชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sander R และคณะ ในปี 2009 มีการศึกษาชนิดของโปรตีนใน Cell secretome ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งจัดเป็น Cancer Biomarker ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน 3 เทคนิค ได้แก่ 1D gel electrophoresis (1D-GE), peptide SCX chromatography และ tC2 protein reversed phase chromatography โดยเป็นการแยกเปปไทด์ด้วยมิติเดียว และวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง nanoLC-MS/MS ผลที่ได้พบว่า มีโปรตีน 1092, 979 และ 580 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งจาก

การศึกษาค้นคว้าพบว่า การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 1D-GE จะพบโปรตีนมากที่สุด และพบโปรตีนมากกว่าเทคนิคที่แยกโปรตีนด้วยหลักการ chromatography เพียงอย่างเดียว (118) เช่นเดียวกับผลการวิจัยของกระชายเหลืองและกระชายดำที่พบว่า การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GelC-MS/MS พบชนิดของโปรตีนมากกว่าที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Nina C. และคณะ ในปี ค.ศ. 2008 ซึ่งเป็นการวิจัยเพื่อระบุชนิดของโปรตีนในเชื้อก่อโรค ได้แก่ yeast strain YAL6B โดยการใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1D-GE หรือ GelC-MS/MS โดยเทคนิคนี้จะลดขั้นตอนที่ยุ่งยากลง แต่อีกเทคนิค ได้แก่ 2D-GE จะมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อนกว่า จากผลการวิจัยพบว่า มีโปรตีน 2,103 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ด้วย GelC-MS/MS และมีโปรตีน 2,891 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ด้วย 2D-GE และพบโปรตีนที่เหมือนกัน 1,997 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ด้วยทั้ง 2 วิธี (119) และจากการวิจัยครั้งนี้ก็พบว่า มีโปรตีนในกระชายเหลืองและกระชายดำ 1 และ 2 ชนิดที่เหมือนกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS

จากการใช้วิธี GelC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS ในการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลือง พบโปรตีนทั้งหมด 42 ชนิด และ 36 ชนิด ตามลำดับ แต่จากการศึกษาของ Eng Chong Tan และคณะ ในปี 2012 (120) ซึ่งเป็นการศึกษาถึงผลของการเติม phenylalanine ต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์กระชายเหลืองแบบเพาะเลี้ยง (Tissue culture) ด้วยวิธี 2D-GE และ MALDI-TOF/TOF พบว่ามีโปรตีน 76 ชนิดในกระชายเหลืองที่แสดงออกแตกต่างจากเซลล์ควบคุม และจากโปรตีนทั้ง 76 ชนิด พบว่ามีโปรตีน 11 ชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง phenylpropanoid biosynthesis pathway และมีโปรตีน 34 ชนิดที่สามารถแยกและระบุหน้าที่ได้ โดยแบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืช โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนและกรดอะมิโน การสร้างและสลายอาหาร (Metabolism) การสร้าง terpenoid (Terpenoid synthesis) cell division, cytoskeleton (cell organization), การสร้างพลังงาน (energy-related), signalling processes และโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (unknown functions) โดยจากงานวิจัยครั้งนี้และผลการวิจัยของ Eng Chong Tan และคณะ ไม่พบชนิดของโปรตีนที่เหมือนกันเลย เนื่องจากความแตกต่างกันของตัวอย่างที่นำมาวิจัย เทคนิควิเคราะห์ที่ต่างกัน รวมทั้งการวิจัยของ Eng Chong Tan และคณะ สนใจเฉพาะโปรตีนที่แสดงออกเปลี่ยนไปจากการเติม phenylalanine ลงไปในเซลล์กระชายเหลืองแบบเพาะเลี้ยง

ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าการใช้เทคนิควิเคราะห์ที่ต่างกันในการระบุชนิดของโปรตีน จะส่งผลต่อชนิดของโปรตีนที่ตรวจพบแตกต่างกันด้วย

จากผลการวิจัย แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการระบุชนิดของโปรตีนในตัวอย่างเดียวกันแต่เก็บเกี่ยวในเวลาที่แตกต่างกัน แต่ใช้วิธีเดียวกัน ไม่ว่าจะใช้วิธี GeLC-MS/MS หรือวิธี Label-free LC-MS/MS ก็ตาม ชนิดและจำนวนของโปรตีนที่ระบุได้จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำจะแตกต่างกัน ด้วย แสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวกระชายเหลืองและกระชายดำที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rong Li และคณะ ในปี ค.ศ. 1995 พบว่า พืชตระกูลถั่ว 4 ชนิด ได้แก่ Alfalfa, Red clover, Birdsfoot trefoil และ Biennial sweetclover มีความเข้มข้นของ soluble protein ที่แตกต่างกัน ในแต่ละเดือนที่เก็บเกี่ยวตัวอย่างแตกต่างกัน คือ soluble protein จะเพิ่มขึ้น 50 % ระหว่าง เดือนกันยายนและเดือนธันวาคม และจะลดลง ในช่วงเดือนมีนาคมและเดือนพฤษภาคม (121)

จากการระบุชนิดของโปรตีนด้วยวิธี GeLC-MS/MS พบโปรตีนที่น่าสนใจ คือ โปรตีน Superoxide Dismutase (SOD) ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากเกินไป และเพื่อป้องกันการทำลายของเซลล์ (20) ผู้วิจัยจึงทำการยืนยันผลของการระบุชนิดโปรตีน SOD จากวิธี GeLC-MS/MS ด้วยการวิเคราะห์โปรตีน SOD ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD-Staining Activity จากตัวอย่างโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี GeLC-MS/MS ผลการวิจัยที่ได้แสดงในหัวข้อ 4.5

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ผู้วิจัยได้เลือกตัวแทนของกระชายเหลืองและกระชายดำ จากผลของปริมาณโปรตีน SOD ที่มากที่สุดและน้อยที่สุด (แสดงในหัวข้อ 4.5.2 และ 4.5.4) มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Label-free LC-MS/MS

เหตุผลในการเลือกวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS เท่านั้น เนื่องจากในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GeLC-MS/MS ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เป็นระยะเวลานาน และเป็นภาระต่อเครื่องมากเกินไป เช่น 1 ตัวอย่าง จะต้องเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยเจลประมาณ 20 ชิ้นเจล และเมื่อทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จึงมีตัวอย่างที่ต้องวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ประมาณ 60 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับเทคนิค Label-free LC-MS/MS จะมีจำนวนตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง ที่ต้องนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

จากตารางผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายเหลือง ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม (ปริมาณ SOD น้อยที่สุด) และเดือนธันวาคม (ปริมาณ SOD มากที่สุด) ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS พบว่า มีโปรตีน 3 ชนิด ที่พบในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวทั้งในเดือนกรกฎาคม และเดือนธันวาคม ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 หรือ Cysteine proteinase GP-I โปรตีน BnaC08g28270D [Brassica napus] และโปรตีน BnaC05g27440D [Brassica napus] โดยจะพบว่าในเดือนกรกฎาคมมีปริมาณมากกว่าเดือนธันวาคม

Zingipain-1 หรือ Cysteine proteinase GP-I จัดเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยทำให้โปรตีนถูกย่อยกลายเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลง ทำให้เซลล์สามารถดูดซับโมเลกุลเล็กๆเหล่านั้นได้ เพื่อการเจริญเติบโตของพืช (107) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ คือบริเวณกรดอะมิโน Proline จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีน สามารถพบได้จากแหล่งต่างๆอีกมากมาย เช่น เอนไซม์จากสัตว์ ได้แก่ เรนิน จากกระเพาะลูกวัว (122) เอนไซม์จากพืช ได้แก่ ปาเปน (papain) จากมะละกอ (123) โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด (124) เป็นต้น โดยเอนไซม์เหล่านี้ จัดเป็นซิสทีอินโปรติเอส (Cysteine peoteinase) และจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Thomson, 1973 พบว่าซึ่งที่มีความอ่อนแก่ต่างกัน จะมีปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนแตกต่างกันด้วย โดยพบว่าซึ่งแก่จะมีปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนสูงกว่าซึ่งอ่อน (125) ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า กระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม มีความแก่กว่ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม พบว่ามีปริมาณในเดือนธันวาคมมากกว่าในเดือนกรกฎาคม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการปลูกกระชายเหลืองในจังหวัดนครปฐม ที่จะเริ่มลงเหง้าปลูกในเดือนมีนาคมของแต่ละปี และเริ่มเก็บตัวอย่างประมาณเดือนกันยายนเป็นต้นไป ดังนั้นกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคมจึงอ่อนกว่ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนสูงกว่า

โปรตีน BnaC08g28270D [Brassica napus] เกี่ยวข้องกับขบวนการขนส่งสารภายในและภายนอกของเซลล์ (Transport) ทั้งโมเลกุลขนาดใหญ่และโมเลกุลขนาดเล็ก รวมถึงไอออนด้วย และเป็นส่วนประกอบของเซลล์ (organelles) (126) สำหรับโปรตีน BnaC05g27440D [Brassica napus] ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (127)

โปรตีนจำนวน 21 ชนิด พบเฉพาะในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวเฉพาะในเดือนกรกฎาคมเท่านั้น และมีโปรตีน 12 ชนิด ที่พบเฉพาะในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวเฉพาะในเดือนธันวาคมเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีน หรือ Protein

Synthesis มี 3 ชนิด ได้แก่ โปรตีน BnaA10g19010D [Brassica napus] โปรตีน BnaUnng00340D [Brassica napus] และโปรตีน BnaA03g46550D [Brassica napus]

โปรตีน BnaA10g19010D [Brassica napus] มีหน้าที่ในขบวนการ rRNA processing ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการการแปลรหัส เพื่อสร้างโปรตีน (128)

โปรตีน BnaUnng00340D [Brassica napus] มีหน้าที่ในขบวนการ DNA helicase activity และ DNA repair ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการถอดรหัสจาก DNA ให้เป็น mRNA เพื่อทำการสร้างโปรตีนในขั้นตอนการแปลรหัสต่อไป (129)

โปรตีน BnaA03g46550D [Brassica napus] มีหน้าที่ในขบวนการ sequence-specific DNA binding และ transcription factor activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการถอดรหัสในการสร้างโปรตีน (130)

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองในเดือนกรกฎาคมและเดือนธันวาคม ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

No	Accession	Protein	July	December
1	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	0.36	0.15
2	gi 674961641	BnaC08g28270D [Brassica napus]	0.02	0.03
3	gi 674960227	BnaC05g27440D [Brassica napus]	0.11	0.23
4	gi 674904442	BnaA06g19270D [Brassica napus]	0.03	ND
5	gi 674958811	BnaA05g08010D [Brassica napus]	0.03	ND
6	gi 674955562	BnaC03g53810D [Brassica napus]	0.02	ND
7	gi 6137410	Chain A, The 2.1 Angstrom Structure Of A Cysteine Protease With Proline Specificity From Ginger Rhizome, Zingiber Officinale	0.05	ND
8	gi 508699795	Plant U-box 49 isoform 4 [Theobroma cacao]	0.02	ND
9	gi 674962019	BnaC04g16790D [Brassica napus]	0.08	ND

No	Accession	Protein	July	December
10	gi 674958685	BnaA05g06750D [Brassica napus]	0.09	ND
11	gi 743881172	PREDICTED: filament-like plant protein 4 [Elaeis guineensis]	0.01	ND
12	gi 729330099	PREDICTED: filament-like plant protein 4 [Tarenaya hassleriana]	0.01	ND
13	gi 657980584	PREDICTED: filament-like plant protein 7 [Malus domestica]	0.01	ND
14	gi 674963320	BnaA10g19010D [Brassica napus]	0.05	ND
15	gi 674871025	BnaC08g19200D [Brassica napus]	0.01	ND
16	gi 645277925	PREDICTED: filament-like plant protein 7 [Prunus mume]	0.01	ND
17	gi 674877011	BnaC05g50270D [Brassica napus]	0.01	ND
18	gi 122242586	Filament-like plant protein 4; Short=AtFPP4	0.01	ND
19	gi 674905370	BnaUnng00340D [Brassica napus]	0.01	ND
20	gi 674954758	BnaA03g02500D [Brassica napus]	0.05	ND
21	gi 674958117	BnaA01g01930D [Brassica napus]	0.05	ND
22	gi 674960776	BnaC07g42580D [Brassica napus]	0.02	ND
23	gi 674961953	BnaC04g16130D [Brassica napus]	0.02	ND
24	gi 674867697	BnaAnng22340D, partial [Brassica napus]	0.01	ND
25	gi 674955158	BnaA03g06500D [Brassica napus]	ND	0.13
26	gi 674957342	BnaA04g03590D [Brassica napus]	ND	0.04
27	gi 674959098	BnaA03g32440D [Brassica napus]	ND	0.05

No	Accession	Protein	July	December
28	gi 380467954	cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial [Zingiber officinale]	ND	0.22
29	gi 57118009	cysteine protease gp3a [Zingiber officinale]	ND	0.06
30	gi 674959032	BnaA04g07960D [Brassica napus]	ND	0.03
31	gi 674962037	BnaC04g16970D [Brassica napus]	ND	0.19
32	gi 674957328	BnaA04g03450D [Brassica napus]	ND	0.04
33	gi 674957341	BnaA04g03580D [Brassica napus]	ND	0.08
34	gi 674960435	BnaC06g33830D [Brassica napus]	ND	0.07
35	gi 674922258	BnaA03g46550D [Brassica napus]	ND	0.03
36	gi 674955792	BnaC07g19980D [Brassica napus]	ND	0.03

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

4.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนที่ต่างกัน ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

จากตารางผลการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม (ปริมาณ SOD มากที่สุด) และเดือนธันวาคม (ปริมาณ SOD น้อยที่สุด) ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS พบว่า มีโปรตีน 3 ชนิด ที่พบในกระชายดำที่เก็บเกี่ยวทั้งในเดือนกรกฎาคม และเดือนธันวาคม ได้แก่ โปรตีน Zingipain-1 หรือ Cysteine proteinase GP-I โปรตีน receptor-like kinase plant [Medicago truncatula] และโปรตีน Plant U-box 13 isoform 2 [Theobroma cacao]

Zingipain-1 พบปริมาณเท่ากันทั้งในเดือนมกราคมและเดือนธันวาคม โปรตีน receptor-like kinase plant [Medicago truncatula] จะพบในเดือนมกราคมมากกว่าในเดือนธันวาคม และโปรตีน Plant U-box 13 isoform 2 [Theobroma cacao] จะพบในเดือนธันวาคมมากกว่าในเดือน

มกราคม ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับขบวนการ ubiquitin-protein transferase activity โดยจัดเป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง (117)

โปรตีนที่พบเฉพาะในเดือนมกราคม มีทั้งหมด 3 ชนิด และโปรตีนที่พบเฉพาะในเดือนธันวาคม มีทั้งหมด 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 11 โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ ขบวนการสร้างโปรตีน หรือ Protein Synthesis มี 1 ชนิด ได้แก่ โปรตีน hypothetical chloroplast RF19 [*Alpinia zerumbet*] ซึ่งโปรตีนชนิดนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนในกระชายดำ โดยโปรตีนชนิดนี้จัดเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการถอดรหัสของเซลล์พืช หรือ transcriptional machinery ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีนในพืช (108) โดยจะพบโปรตีนชนิดนี้จะอยู่ใน Plastid genome ของพืช *Guillardia theta* ซึ่งอยู่ในไฟลัม *Cryptophyte Alga* และจากผลการวิจัยพบว่าในเดือนธันวาคมมีปริมาณโปรตีน SOD น้อยที่สุด แสดงว่าโปรตีนชนิดนี้อาจเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนตัวอื่นๆ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างโปรตีน SOD

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม และเดือนธันวาคม ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

No	Accession	Protein	January	December
1	gi 674867298	BnaCnng52220D [<i>Brassica napus</i>]	0.02	ND
2	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I	0.14	0.14
3	gi 355501173	Receptor-like kinase plant [<i>Medicago truncatula</i>]	0.04	0.02
4	gi 674965264	BnaA07g15470D [<i>Brassica napus</i>]	0.01	n/a
5	gi 508786811	Plant U-box 13 isoform 2 [<i>Theobroma cacao</i>]	0.01	0.04
6	gi 674956003	BnaA07g06240D [<i>Brassica napus</i>]	0.02	ND
7	gi 674956036	BnaA07g06570D [<i>Brassica napus</i>]	0.07	ND
8	gi 449326850	hypothetical chloroplast RF19 [<i>Alpinia zerumbet</i>]	ND	0.02
9	gi 674930939	BnaA02g22990D [<i>Brassica napus</i>]	ND	0.05

* ND (Not Detectable) หมายถึง ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้

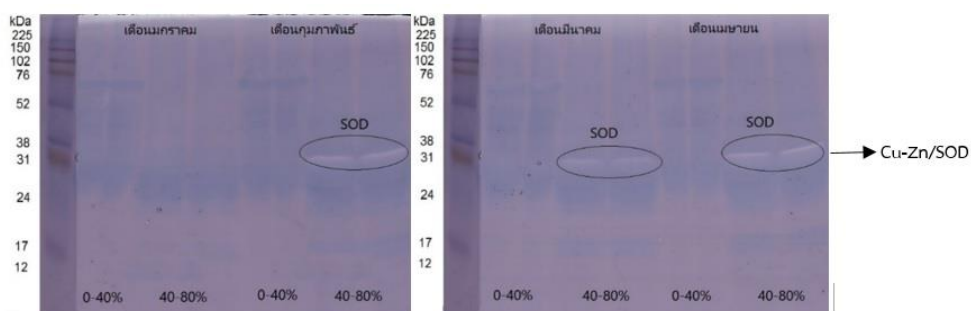
จากผลการวิจัย พบว่าทั้งชนิดและปริมาณของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละเดือนที่เก็บเกี่ยวกระชายเหลืองและกระชายดำ ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงนำกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 12 เดือน และกระชายดำที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือนมาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay ผลการวิจัยที่ได้แสดงในหัวข้อ 4.6

4.5 การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining

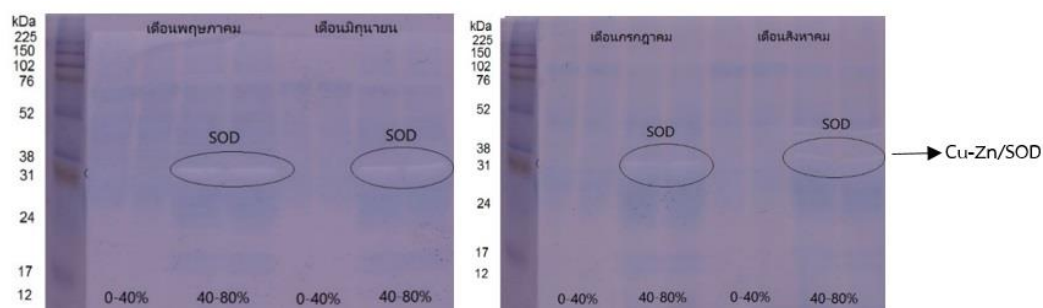
จากผลการตรวจวิเคราะห์ Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining เป็นการนำสารสกัดโปรตีนที่มีความเข้มข้น 10 µg จากกระชายเหลืองและกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในทุกเดือน มาแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ด้วยเทคนิค Native-PAGE จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยวิธี SOD Activity Staining เพื่อตรวจยืนยันโปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยการให้กระแสไฟฟ้าที่ 25 วัตต์ในที่มีด

4.5.1 การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 12 เดือน ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining

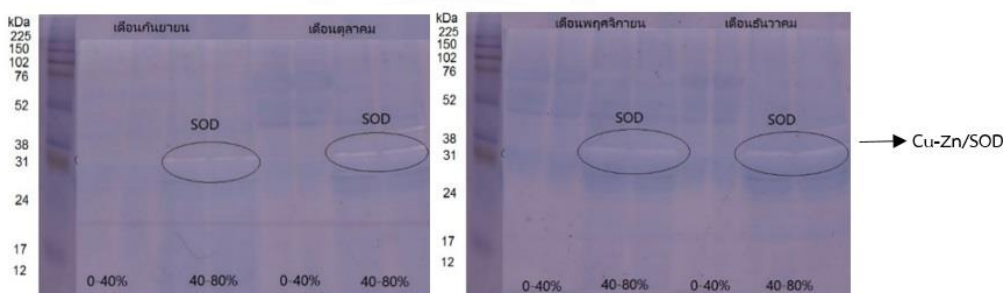
จากผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase (SOD) ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD Activity Staining พบว่าเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนธันวาคม มีโปรตีน Superoxide Dismutase ตามรูปเจลที่แสดงด้านล่าง คือพบโปรตีน SOD ในสารสกัดโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-80% เท่านั้น และพบว่าโปรตีน SOD มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 31 กิโลดาลตัน ซึ่งจัดเป็น isoenzyme ชนิด Cu-Zn/SOD และจะไม่สามารถตรวจพบโปรตีน SOD ในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคม ตามภาพที่แสดงด้านล่าง จากนั้นนำแถบโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน SOD ด้วยโปรแกรม ImageJ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ SOD ในเหง้ากระชายเหลือง แสดงในหัวข้อ 4.5.2



ภาพที่ 39 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วง เดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ (ซ้าย) เดือนมีนาคม และเดือนเมษายน (ขวา)



ภาพที่ 40 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน (ซ้าย) เดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคม (ขวา)



ภาพที่ 41 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกันยายน เดือนตุลาคม (ซ้าย) เดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม (ขวา)

Superoxide Dismutase หรือ SOD จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากเกินไปเกินสมดุล และเพื่อป้องกันการทำลายของเซลล์ โดยแบ่งเป็น isoenzyme หลายชนิด เช่น Cu/Zn – SOD จะป้องกันเซลล์ในไซโทพลาสซึม และ Mn - SOD จะป้องกันไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) จากการถูกทำลายของสารอนุมูลอิสระ เป็นต้น (131) และยังพบว่า SOD

เกี่ยวข้องกับขบวนการชะลอความแก่ (anti-aging treatment) เนื่องจากเมื่อระดับ SOD ลดลงระดับสารอนุมูลอิสระจะสูงขึ้นในคนที่มีอายุมากขึ้น (79) นอกจากนี้ยังมีการนำ SOD มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น เป็นสารตัวกลางที่ช่วยต้านการอักเสบจากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (Tissue injury) เช่น โรคไขข้ออักเสบ โรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น และยังช่วยป้องกันผลข้างเคียงของยารักษามะเร็งได้ด้วย (22) SOD จัดเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต ดังนั้น ในตัวอย่างกระชายเหลืองเดือนมกราคม ซึ่งตรวจไม่พบ SOD ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ไม่ได้หมายถึงไม่มี SOD ในตัวอย่าง แต่อาจมีปริมาณที่ต่ำกว่าความไว (sensitivity) ของวิธีนี้จะตรวจวัดได้

4.5.2 การวัดปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 เดือน

ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 เดือน

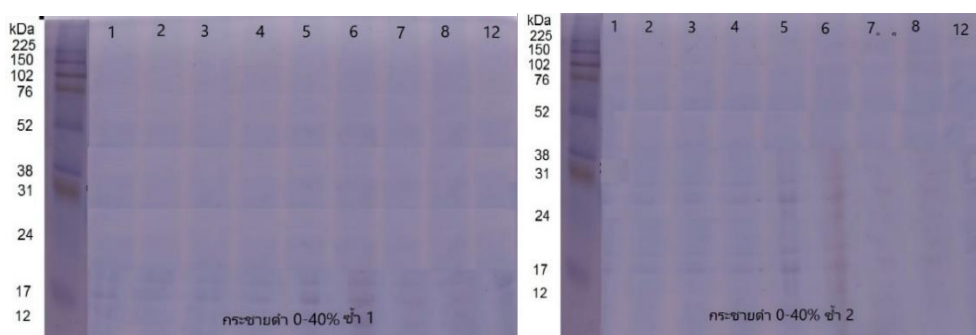
Month	Superoxide Dismutase (%)
January	Non-detectable
February	78.71
March	46.93
April	38.33
May	67.79
June	69.09
July	31.15
August	36.91
September	60.18
October	66.87
November	78.68
December	100.00

จากตารางผลการวัดปริมาณ Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า เหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม มีปริมาณโปรตีน SOD

สูงที่สุด ซึ่งคิดเป็น 100% และเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม มีปริมาณโปรตีน SOD ต่ำที่สุด คิดเป็น 31.15%

4.5.3 การตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ในกระชายดำที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือน ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining

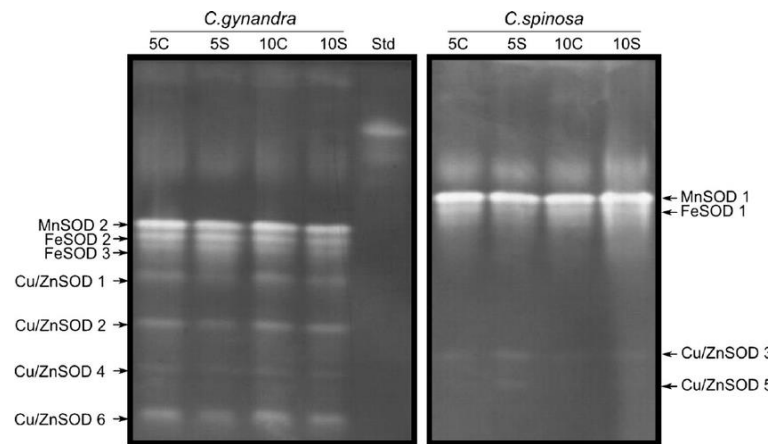
จากผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase (SOD) ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD Activity Staining พบว่า ไม่พบแถบโปรตีน SOD ในสารสกัดโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% ในทุกเดือนที่เก็บเกี่ยวเหง้ากระชายดำ ดังแสดงในภาพที่ 8



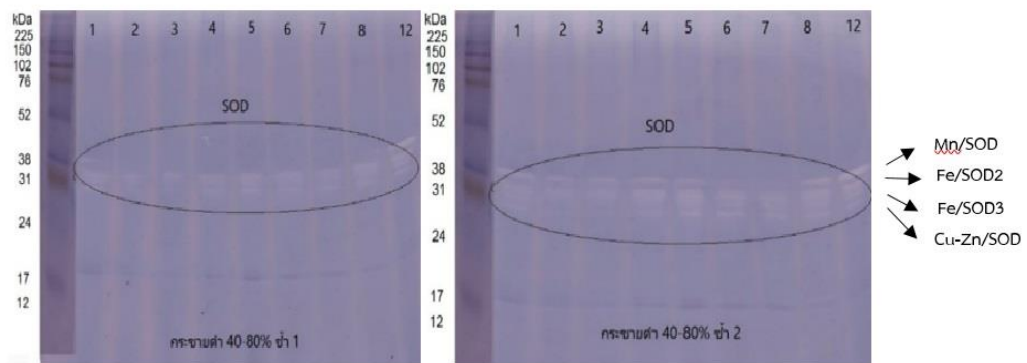
*หมายเลขด้านบนบนเจล หมายถึง ตัวอย่างที่เก็บในเดือนที่ต่างกัน เช่น 1 หมายถึง เดือนมกราคม เป็นต้น

ภาพที่ 42 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% ที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือน ซ้ำที่ 1 (ซ้าย) และ ซ้ำที่ 2 (ขวา)

ผลการตรวจยืนยันโปรตีน Superoxide Dismutase (SOD) ด้วยวิธี Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-80% (ภาพที่ 9) จะพบแถบโปรตีน SOD ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันในทุกๆเดือน ซึ่งพบว่า มี SOD มากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากมีแถบโปรตีนที่ใสไม่มีสี 3 แถบที่แยกจากกัน ซึ่งเป็น Isoenzyme ของโปรตีน SOD โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Uzilday, B. และคณะ ในปี 2012 พบว่า มีการศึกษา isoenzyme ของ โปรตีน SOD ในสารสกัดโปรตีนของพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Cleome gynandra* และ *Cleome spinose* ซึ่งย้อมด้วยวิธี Riboflavin-NBT solution และทำการหา isoenzyme ด้วยวิธีการยับยั้ง Cu/Zn-SOD และ Fe-SOD โดยการเติมโพแทสเซียมไฮยาไนด์ลงไป เพื่อทำการการหา isoenzyme ชนิด Mn-SOD นอกจากนี้ยังมีการย้อม แบบ POX และ NOX เพื่อหา isoenzyme ชนิดต่างๆ โดยพบว่า isoenzyme ชนิด Mn-SOD ปรากฏเป็นแถบโปรตีนบนสุด และ แถบที่ถัดลงมา คือ isoenzyme ชนิด Fe-SOD และ แถบโปรตีนแถบสุดท้ายคือ isoenzyme ชนิด Cu/Zn-SOD (20)



ภาพที่ 43 การระบุชนิด Isoenzyme ของ Superoxide Dismutase ในพืช *Cleome gynandra* และ *Cleome spinosa* (20)



*หมายเลขด้านบนเจล หมายถึง ตัวอย่างที่เก็บในเดือนที่ต่างกัน เช่น 1 หมายถึง เดือนมกราคม เป็นต้น

ภาพที่ 44 ผลการตรวจวิเคราะห์โปรตีน Superoxide Dismutase ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD Activity Staining ในเหง้ากระชายดำที่ตัดตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 40-80% ที่เก็บเกี่ยวทั้งหมด 9 เดือน ชำที่ 1 (ซ้าย) และ ชำที่ 2 (ขวา)

จากนั้นนำแถบโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน SOD ด้วยโปรแกรม ImageJ ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ SOD ในเหง้ากระชายดำ แสดงในหัวข้อ 4.5.4

4.5.4 การวัดปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 9 เดือน

ตารางที่ 14 ปริมาณโปรตีน Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทั้งหมด 9 เดือน

Month	Superoxide Dismutase (%)
January	100.00
February	94.08
March	94.09
April	94.09
May	94.09
June	94.09
July	94.09
August	93.52
December	89.36

จากตารางผลการวัดปริมาณ Superoxide Dismutase ในเหง้ากระชายดำ พบว่าเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม มีปริมาณโปรตีน SOD สูงที่สุด คิดเป็น 100% และเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม มีปริมาณโปรตีน SOD ต่ำที่สุด คิดเป็น 89.36%

4.6 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำด้วยวิธี ABTS assay

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay โดยทำการเก็บเหง้ากระชายเหลืองทั้งหมด 12 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนธันวาคม 2557 และเดือนมกราคม ถึง เดือนเมษายน 2558 ที่แหล่งเพาะปลูกเดียว ในอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม สำหรับเหง้ากระชายดำ จะทำการเก็บทั้งหมด 9 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึง เดือนสิงหาคม และเดือนธันวาคม 2557 และเดือนมกราคม ถึง เดือนเมษายน 2558 ที่แหล่งเพาะปลูกเดียว ในอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ จากนั้นนำเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำมาสกัดโปรตีน ด้วยวิธีการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-

80% จากนั้นทำการทดสอบความสามารถของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay เพื่อศึกษาผลของช่วงเวลาเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกันต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี ABTS assay โดยวัดค่า Radical scavenging activity (%) จากนั้นนำค่า % Radical scavenging activity ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) โดยนำไปเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ Antioxidant activity โดยคิดเป็นค่าไมโครกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหลือง ซึ่งมีหน่วยเป็น $\mu\text{g VCEAC}$ (Vitamin C equivalent antioxidant capacity) /mg protein จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกันยายน มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ได้มากที่สุด มีค่าเท่ากับ $100.87 \pm 6.13 \mu\text{g VCEAC}/\text{mg protein}$ (ตารางที่ 6) เนื่องจากตัวอย่างเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บในเดือนกันยายน จะเป็นช่วงเวลาที่กระชายเหลืองมีการสะสมธาตุอาหารอย่างเต็มที่ เนื่องจากในจังหวัดนครปฐม จะเริ่มปลูกกระชายเหลืองในช่วงเดือนมีนาคมของแต่ละปี และต้องรออย่างน้อย 6 เดือน คือเดือนกันยายน จึงจะเก็บเกี่ยวกระชายเหลืองได้ เพื่อให้เหง้ากระชายเหลืองมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ดังนั้นในระยะเวลา 6 เดือนที่รอการเก็บเกี่ยว เหง้ากระชายเหลืองจึงมีการสะสมสารอาหาร และ Phytochemicals อย่างเต็มที่ จึงทำให้เหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกันยายน มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ได้มากที่สุด เช่นเดียวกับกระชายดำ สามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ได้มากที่สุด ในเดือนธันวาคม ซึ่งมีค่าเท่ากับ $938.20 \pm 44.88 \mu\text{g VCEAC}/\text{mg protein}$ (ตารางที่ 7) เนื่องจากในอำเภอเขาชัย จังหวัดเพชรบูรณ์ จะเริ่มปลูกกระชายดำในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคมของทุกปี และเริ่มเก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม ดังนั้นในช่วงระยะเวลาที่รอการเก็บเกี่ยว เหง้ากระชายดำจึงมีการสะสมสารอาหารและ Phytochemicals อย่างเต็มที่ จึงทำให้เหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ได้มากที่สุด

ผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Priyanka S., *et al.*, (2013). ที่ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay ของสารสกัดจากแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) พบว่าปริมาณของสารพวก Phytochemicals และสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในแปะก๊วยจะขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืช (132) ซึ่งส่งผลต่อการการสะสมสารดังกล่าว

สารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม สามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ได้น้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $8.85 \pm 0.50 \mu\text{g VCEAC}/\text{mg protein}$ และเมื่อนำผลการทดสอบความสามารถของการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ของสารสกัดกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวใน

เดือนมกราคม ซึ่งมีค่าน้อยที่สุด มาเป็นตัวเปรียบเทียบกับเดือนอื่นๆ พบว่า ผลของความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ในสารสกัดกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม เดือนเมษายน เดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม เดือนกันยายน เดือนตุลาคม เดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม มีค่ามากกว่าเดือนมกราคม และมีค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหลือง ทั้งหมด 12 เดือน ด้วยวิธี ABTS assay

Month	ABTS (Antioxidant activity) ($\mu\text{g VCEAC/mg protein}$)
January	8.85 \pm 0.50
February	23.15 \pm 0.61*
March	34.97 \pm 0.74*
April	15.59 \pm 0.49*
May	22.04 \pm 0.62*
June	39.46 \pm 0.51*
July	21.88 \pm 0.60*
August	71.47 \pm 4.04*
September	100.87 \pm 6.13*
October	73.39 \pm 3.40*
November	37.08 \pm 1.52*
December	36.30 \pm 1.09*

* บ่งชี้ถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay ในแต่ละเดือนที่แตกต่างกับเดือนมกราคมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ตารางที่ 16 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้า
กระชายดำ ทั้งหมด 9 เดือน ด้วยวิธี ABTS assay

Month	ABTS (Antioxidant activity) ($\mu\text{g VCEAC/mg protein}$)
January	99.34 \pm 5.13*
February	136.66 \pm 8.35*
March	188.78 \pm 12.91*
April	71.76 \pm 4.00
May	91.62 \pm 5.00*
June	74.56 \pm 6.31
July	90.89 \pm 4.82*
August	384.23 \pm 21.74*
December	938.20 \pm 44.88*

*ปั้งชี้ถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay ในแต่ละเดือนที่แตกต่างกับเดือนมกราคมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

สารสกัดโปรตีนจากกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนเมษายน สามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ได้น้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $71.76 \pm 4.00 \mu\text{g VCEAC/mg protein}$ และเมื่อนำผลการทดสอบความสามารถของการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ของสารสกัดกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนเมษายน ซึ่งมีค่าน้อยที่สุด มาเป็นตัวเปรียบเทียบกับเดือนอื่นๆ พบว่า ผลของความสามารถในการต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS ในสารสกัดกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม เดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม และเดือนธันวาคม มีค่ามากกว่าเดือนเมษายน และมีค่าที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) แม้ว่าจะยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนจากพืชที่เก็บเกี่ยวในเวลาที่แตกต่างกัน แต่มีการศึกษาของ Maria G.M., *et al.*, (2010). ที่ได้ทำการศึกษาผลการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระตามฤดูกาลของสารสกัดจากผิวของรังผึ้งในประเทศ โปรตุเกส พบว่า ในฤดูใบไม้ผลิ (Spring) จะมีสารพวกฟีนอลิก (total phenols, flavones, flavonols, flavanones and

dihydroflavonols) ที่ถูกตรวจพบในสารสกัดจากผิวของรังผึ้ง (hydro-alcoholic extracts) สูงกว่าในช่วงฤดูหนาวและให้ค่าที่แตกต่างกันในช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวแตกต่างกันด้วย (133)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการนำเทคนิค Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics ได้แก่ วิธี GeLC-MS/MS และ วิธี Label-free LC-MS/MS มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่พบในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ โดยการระบุชนิดของโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองด้วย GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบจำนวนโปรตีน 43 และ 32 ชนิด ตามลำดับ ขณะที่การระบุชนิดของโปรตีนจากเหง้ากระชายดำ ด้วย GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS พบโปรตีนจำนวน 34 และ 9 ชนิด ตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า การใช้วิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อผลการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันด้วย ทั้งชนิดและจำนวนของโปรตีนที่ตรวจพบ

วิธี GeLC-MS/MS สามารถระบุชนิดและตรวจพบจำนวนโปรตีนจำนวนที่มากกว่า Label-free LC-MS/MS ทั้งจากการศึกษาในโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลือง และโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายดำด้วยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก GeLC-MS/MS ได้ทำการแยกโปรตีนออกจากกันก่อนด้วย SDS-PAGE และผ่านขั้นตอน In gel digestion ก่อนจะนำเปปไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ขณะที่วิธี Label-free LC-MS/MS นั้น ได้ทำการวิเคราะห์เปปไทด์ที่ได้ขั้นตอน In solution digestion มาวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS โดยตรง ซึ่งเปปไทด์ทั้งหมดจะถูกแยกด้วยระบบ HPLC เพียงอย่างเดียว ทำให้การแยกเปปไทด์จำนวนมากในเวลาเดียวกันเป็นไปได้โดยไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ส่งผลต่อจำนวนเปปไทด์ที่เข้าสู่เครื่อง Mass Spectrometer ในเวลาพร้อมๆกัน ทำให้เกิด Ion suppression ขึ้นในขั้นตอน Ionization ทำให้จำนวนเปปไทด์ที่ตรวจวัดได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น จึงควรที่จะเพิ่มขั้นตอนการแยกเปปไทด์ก่อนเข้าสู่ MS เช่น การใช้ระบบ Two Dimensional-Liquid Chromatography (2D-LC) นอกจากนี้ ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดและปริมาณโปรตีนในพืช ความสามารถในการแตกตัวของเปปไทด์ การทำงานของเอนไซม์ทริปซิน เป็นต้น (111) อย่างไรก็ตาม วิธี GeLC-MS/MS มีข้อด้อยเมื่อเทียบกับ Label-free LC-MS/MS คือ ต้องใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ต่อหนึ่งตัวอย่าง เป็นภาระต่อเครื่อง MS มากกว่า และมีขั้นตอนที่ซับซ้อนมากกว่า แต่ทั้ง GeLC-MS/MS และ Label-free LC-MS/MS มีข้อจำกัด คือ การระบุชนิดของโปรตีนโดยข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass Spectrometer นั้น ต้องทำการสืบค้นผ่านฐานข้อมูล ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าฐานข้อมูลโปรตีนในพืชยังไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะกระชายเหลืองและกระชายดำ และพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นๆ

จากผลการระบุชนิดของโปรตีน พบโปรตีนที่น่าสนใจ คือ Superoxide Dismutase (SOD) ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดภาวะที่สารอนุมูลอิสระมีมากเกินไป และเพื่อป้องกันการทำลายของเซลล์ จึงได้ทำการยืนยันผลของการระบุชนิดโปรตีน SOD จากวิธี GeLC-MS/MS ด้วยการวิเคราะห์โปรตีน SOD ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ SOD-Staining Activity จากตัวอย่างโปรตีนที่สกัดจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ และเมื่อหาปริมาณ SOD พบว่าปริมาณของ SOD เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเก็บเกี่ยวตัวอย่างที่แตกต่างกัน รวมถึงปริมาณของโปรตีนชนิดอื่น ๆ ในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ใช้วิธี Label-free LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ด้วย อย่างไรก็ตาม แม้ว่าผู้วิจัยจะได้ทำการเก็บตัวอย่างจากสถานที่เพาะปลูกแหล่งเดียวกัน แต่ยังไม่อาจยืนยันได้ชัดเจนว่าเป็นตัวอย่างที่มาจากต้นเดียวกัน จึงยังไม่อาจสรุปได้ว่าควรเก็บเกี่ยวเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำในระยะเวลาใด แต่สรุปได้ว่าระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวตัวอย่างที่ต่างกัน ส่งผลต่อชนิดและปริมาณโปรตีน ปริมาณ SOD รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay

ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS assay แต่เป็นการศึกษาในสารสกัดโปรตีนรวมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ยังไม่ได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์ จึงไม่อาจระบุได้ชัดเจนว่าโปรตีนชนิดใดบ้างที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ หรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โปรตีน Zingipain-1 ซึ่งเคยมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า Zingipain-1 ที่ตรวจพบในพืชชนิดอื่น มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส (16) เป็นต้น จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต โดยการแยก โปรตีน Zingipain-1 จากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค ซึ่งอาจนำผลที่ได้ไปใช้พัฒนายาได้ต่อไป นอกจากนี้ ยังอาจมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และยังไม่ได้รับการศึกษาวิจัยมาก่อน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาโดยทำการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และทำการศึกษาต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, et al. Gateway compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*. 2006;45(4):616-29.
2. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L. Farm animal milk proteomics. *Journal of proteomics*. 2012;75(14):4259-74.
3. Sowell RA, Owen JB, Butterfield DA. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing research reviews*. 2009;8(1):1-17.
4. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*. 2002;1(5):376-86.
5. Everley PA, Krijgsveld J, Zetter BR, Gygi SP. Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(7):729-35.
6. Shi T, Zhou J-Y, Gritsenko MA, Hossain M, Camp DG, Smith RD, et al. IgY14 and SuperMix immunoaffinity separations coupled with liquid chromatography– mass spectrometry for human plasma proteomics biomarker discovery. *Methods*. 2012;56(2):246-53.
7. Delahunty C, Yates lii JR. Protein identification using 2 d-lc-ms/ms. *Methods*. 2005;35(3):248-55.
8. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, et al. Less label, more free: approaches in label free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. 2011;11(4):535-53.
9. Zhu W, Smith JW, Huang C-M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *BioMed Research International*. 2009;2010.
10. Haqqani AS, Kelly JF, Stanimirovic DB. Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Genomics Protocols*. 2008:241-56.

11. Song M-N, Moon P-G, Lee J-E, Na M, Kang W, Chae YS, et al. Proteomic analysis of breast cancer tissues to identify biomarker candidates by gel-assisted digestion and label-free quantification methods using LC-MS/MS. *Archives of pharmacal research*. 2012;35(10):1839-47.
12. Johansson C, Samskog J, Sundström L, Wadensten H, Björkesten L, Flensburg J. Differential expression analysis of *Escherichia coli* proteins using a novel software for relative quantitation of LC MS/MS data. *Proteomics*. 2006;6(16):4475-85.
13. Kiat TS, Pippen R, Yusof R, Ibrahim H, Khalid N, Rahman NA. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006;16(12):3337-40.
14. Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*. 2004;75(1):89-92.
15. Boonmee A, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Karnchanatat A, Sangvanich P. A proteomic analysis of *Curcuma comosa* Roxb. rhizomes. *Proteome science*. 2011;9(1):1.
16. Karnchanatat A, Tiengburanatanam N, Boonmee A, Puthong S, Sangvanich P. Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* Valetton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2011;41(2):138-53.
17. Pulla Reddy AC, Lokesh BR. Effect of dietary turmeric (*curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food and Chemical Toxicology*. 1994;32(3):279-83.
18. Moon-ai W, Niyomploy P, Boonsombat R, Sangvanich P, Karnchanatat A. A superoxide dismutase purified from the rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb. as inhibitor of nitric oxide production in the macrophage-like RAW 264.7 cell line. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2012;166(8):2138-55.
19. Boonmee A, Srisomsap C, Karnchanatat A, Sangvanich P. An antioxidant protein in *Curcuma comosa* Roxb. Rhizomes. *Food chemistry*. 2011;124(2):476-80.

20. Uzilday B, Turkan I, Sekmen AH, Ozgur R, Karakaya HC. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. *Plant Science*. 2012;182:59-70.
21. Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(13):4697-9.
22. Yam J, Frank L, Roberts RJ. Oxygen toxicity: comparison of lung biochemical responses in neonatal and adult rats. *Pediatric Research*. 1978;12(2):115-9.
23. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2002;74(18):4741-9.
24. Gel electrophoresis of protein 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=20.
25. Principle of 2 - Dimensional Gel Electrophoresis (2 D- GE). Available from: [http://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_Electrophoresis/Two_Dimensional_Polyacrylamide_Gel_Electrophoresis\(2D-PAGE\)](http://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_Electrophoresis/Two_Dimensional_Polyacrylamide_Gel_Electrophoresis(2D-PAGE)).
26. Gel electrophoresis of protein April 24 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=20.
27. Two- dimensional gel electrophoresis. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Two-dimensional_gel_electrophoresis.
28. Merl J, Ueffing M, Hauck SM, von Toerne C. Direct comparison of MS based label free and SILAC quantitative proteome profiling strategies in primary retinal Müller cells. *Proteomics*. 2012;12(12):1902-11.
29. Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan M-C, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P. 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of proteomics*. 2013;88:4-13.
30. Addis MF, Tanca A, Pagnozzi D, Crobu S, Fanciulli G, Cossu Rocca P, et al. Generation of high quality protein extracts from formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Proteomics*. 2009;9(15):3815-23.
31. Piersma SR, Warmoes MO, de Wit M, de Reus I, Knol JC, Jiménez CR. Whole gel processing procedure for GeLC- MS/ MS based proteomics. *Proteome science*. 2013;11(1):1.

32. Fratantoni SA, Piersma SR, Jimenez CR. Comparison of the performance of two affinity depletion spin filters for quantitative proteomics of CSF: Evaluation of sensitivity and reproducibility of CSF analysis using GeLC MS/MS and spectral counting. *PROTEOMICS-Clinical Applications*. 2010;4(6-7):613-7.
33. Paulo JA, Lee LS, Wu B, Repas K, Banks PA, Conwell DL, et al. Proteomic analysis of endoscopically (endoscopic pancreatic function test) collected gastroduodenal fluid using in-gel tryptic digestion followed by LC-MS/MS. *Proteomics-Clinical Applications*. 2010;4(8-9):715-25.
34. Paulo JA, Kadiyala V, Lee LS, Banks PA, Conwell DL, Steen H. Proteomic analysis (GeLC-MS/MS) of ePFT-collected pancreatic fluid in chronic pancreatitis. *Journal of proteome research*. 2012;11(3):1897-912.
35. Ke E, Patel BB, Liu T, Haluszka O, Hoffman JP, Ehya H, et al. Proteomic analyses of pancreatic cyst fluids. *Pancreas*. 2009;38(2):e33.
36. Paulo JA, Kadiyala V, Banks PA, Steen H, Conwell DL. Mass spectrometry-based (GeLC-MS/MS) comparative proteomic analysis of endoscopically (ePFT) collected pancreatic and gastroduodenal fluids. *Clinical and translational gastroenterology*. 2012;3(5):e14.
37. Becher D, Hempel K, Sievers S, Zühlke D, Pané-Farré J, Otto A, et al. A proteomic view of an important human pathogen- towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome. *PLoS One*. 2009;4(12):e8176.
38. Williams JN, Skipp PJ, Humphries HE, Christodoulides M, O'Connor CD, Heckels JE. Proteomic analysis of outer membranes and vesicles from wild-type serogroup B *Neisseria meningitidis* and a lipopolysaccharide-deficient mutant. *Infection and immunity*. 2007;75(3):1364-72.
39. Xie J. Establishment of a two-dimensional electrophoresis map of human mitochondrial proteins: Humboldt- Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät- Universitätsklinikum Charité; 2003.
40. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Available from: <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/high-performance-liquid-chromatography-hplc>.

41. อารีจิตรานุสรณ์ รช. โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (HPLC). Available from: <http://home.kku.ac.th/chuare/12/HPLC.pdf>.
42. Rohn J. High Performance Liquid Chromatography : Module 4. Available from: <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-6/>.
43. Rohn J. High Performance Liquid Chromatography : Module 4 April; 24 2016. Available from: <http://lab-training.com/landing/free-hplc-training-programme-6/>.
44. Yamaguchi K. Cold- spray ionization mass spectrometry: principle and applications. *Journal of mass spectrometry*. 2003;38(5):473-90.
45. Cosine product method for Spectrum Search. Available from: <http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/respect/search/spectrum>.
46. สถิรพันธุ์ ศตอกแพรตอญม. เทคนิคการคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์ (Hyphenated Techniques of the Pharmaceutical Analytical Instruments). *วารสารไทยไทซ์ซินิพนธ์*. 2549:1-23.
47. ESI - Electrospray Ionization
May, 4, 2016 [cited 2016 1 June]. Available from: <http://www.pharmacelsus.de/esi/>.
48. Corrosion C. Quadrupole Mass Spectrometer Working Principle Animation April 25 2016 Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=qxPb9vFWdqo>.
49. Quadrupole Mass Analysis April 24 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>.
50. Mass Spectrometry April 24 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://alevelnotes.com/Mass-Spectrometry/124>.
51. ฟรินน์.com. กระจาย สรรพคุณและประโยชน์ของกระจายเหลือง 49 ข้อ. Available from: <http://frynn.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%A2/>.
52. Taweechaisupapong S, Singhara S, Lertsatitthanakorn P, Khunkitti W. Antimicrobial effects of Boesenbergia pandurata and Piper sarmentosum leaf extracts on planktonic cells and biofilm of oral pathogens. *Pak J Pharm Sci*. 2010;23(2):224-31.

53. Greenerald. ก ร ะ ช า ย เ ห ลี อ ง . Available from: <http://www.greenerald.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%8A%E0%B8%B2%E0%B8%A2/>.
54. Ching AYL, Tang SW, Sukari MA, Lian GEC, Rahmani M, Khalid K. Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.). *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2007;11(1):154-9.
55. Abdelwahab SI, Mohan S, Abdulla MA, Sukari MA, Abdul AB, Taha MME, et al. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;137(2):963-70.
56. Isa NM, Abdul AB, Abdelwahab SI, Abdullah R, Sukari MA, Kamalidehghan B, et al. Boesenbergin A, a chalcone from *Boesenbergia rotunda* induces apoptosis via mitochondrial dysregulation and cytochrome c release in A549 cells in vitro: Involvement of HSP70 and Bcl2/Bax signalling pathways. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(1):87-97.
57. Mahmood A, Mariod AA, Abdelwahab SI, Ismail S, Al-Bayat F. Potential activity of ethanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) rhizomes extract in accelerating wound healing in rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(15):1570-6.
58. Lau K, Zakaria M, Radu S, Razis A, Faizal A, Rukayadi Y. Antibacterial activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. A. extract against *Escherichia coli*. *International Food Research Journal*. 2013;20(6):3319-23.
59. Taechowisan T, Chanaphat S, Ruensamran W, Phutdhawong WS. Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014;4(4):8.
60. Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. 2005;76(2):233-6.
61. Rukayadi Y, Shim JS, Hwang JK. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses*. 2008;51(4):308-12.
62. Thavara U, Tawatsin A, Bhakdeenuan P, Wongsinkongman P, Boonruad T, Bansiddhi J, et al. Repellent activity of essential oils against cockroaches (Dictyoptera:

Blattidae, Blattellidae, and Blaberidae) in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007;38(4):663-73.

63. Tan EC, Karsani SA, Foo GT, Wong SM, Rahman NA, Khalid N, et al. Proteomic analysis of cell suspension cultures of *Boesenbergia rotunda* induced by phenylalanine: identification of proteins involved in flavonoid and phenylpropanoid biosynthesis pathways. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2012;111(2):219-29.

64. กระชายดำ. Available from: <http://natres.skcrmuti.ac.th/WAN/kachai-dum.html>.

65. From ก. A. ก. ร. ช. ช. ย. ต. ำ. Available from: <http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=22>.

66. คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. กระชายดำ. Available from: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=160>.

67. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Karalai C, Ponglimanont C, Cheenpracha S. Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. Food Chemistry. 2009;115(2):534-8.

68. Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, Petsom A, Danielson UH. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. Die Pharmazie- An International Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006;61(8):717-21.

69. Banjerdpongchai R, Suwannachot K, Rattanapanone V, Sripanidkulchai B. Ethanollic rhizome extract from *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker induces apoptosis in HL-60 cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2008;9(4):595-600.

70. Vichitphan S, Vichitphan K, Sirikhansaeng P. Flavonoid content and antioxidant activity of KRACHAI-DUM (*Kaempferia parviflora*) wine. KMITL Science and Technology Journal. 2007;7:97-105.

71. Nuengchamnong N, Ingkaninan K. On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell. Food Chemistry. 2010;118(1):147-52.

72. Julie S, Jurenka M. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent. Alternative medicine review. 2009;14(2).

73. Sangvanich P, Kaeothip S, Srisomsap C, Thiptara P, Petsom A, Boonmee A, et al. Hemagglutinating activity of Curcuma plants. *Fitoterapia*. 2007;78(1):29-31.
74. Tiptara P, Petsom A, Roengsumran S, Sangvanich P. Hemagglutinating activity and corresponding putative sequence identity from *Curcuma aromatica* rhizome. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(6):1025-34.
75. Kheeree N, Sangvanich P, Puthong S, Karnchanatat A. Antifungal and antiproliferative activities of lectin from the rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010;162(3):912-25.
76. Petnual P, Sangvanich P, Karnchanatat A. A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial, and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Science and Biotechnology*. 2010;19(4):907-16.
77. Smitha S, Dhananjaya B, Dinesha R, Srinivas L. Purification and characterization of a 34 kDa antioxidant protein (β -turmerin) from turmeric (*Curcuma longa*) waste grits. *Biochimie*. 2009;91(9):1156-62.
78. Ramadas D, Srinivas L. Antioxidant effects of 28 kDa antioxidant protein from turmeric (*Curcuma longa* L). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011;4(3):119-23.
79. Masaki H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*. 2010;58(2):85-90.
80. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1583-606.
81. Kopkan L, Castillo A, Navar LG, Majid DS. Enhanced superoxide generation modulates renal function in ANG II-induced hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2006;290(1):F80-F6.
82. Makino A, Skelton MM, Zou A-P, Roman RJ, Cowley AW. Increased renal medullary oxidative stress produces hypertension. *Hypertension*. 2002;39(2):667-72.
83. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griending KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circulation Research*. 1999;85(1):23-8.

84. Darley-usmar VM, Hogg N, O'leary VJ, Wilson MT, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free radical research communications*. 1992;17(1):9-20.
85. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*. 2004;84(4):1381-478.
86. Nelson SK, Bose SK, McCord JM. The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16(2):195-200.
87. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*. 2014;6(5):1068-78.
88. Bertrand RL, Eze MO. Modifying Polyacrylamide Background Color for the Nitroblue Tetrazolium- Based Superoxide Dismutase Staining Assay. *Advances in Enzyme Research*. 2014;2014.
89. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1971;44(1):276-87.
90. Donnelly J, McLellan K, Walker J, Robinson D. Superoxide dismutases in foods. A review. *Food chemistry*. 1989;33(4):243-70.
91. Terada LS, Leff JA, Guidot DN, Shiba GA, Repine JE. Metals inhibit riboflavin-catalyzed generation of superoxide anion in vitro. *Inflammation*. 1990;14(2):217-21.
92. Enzyme Manual: Superoxide Dismutase 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.worthington-biochem.com:8080/enzyme-manual/SODBE/>.
93. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(5):1768-74.
94. Lu M, Yuan B, Zeng M, Chen J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*. 2011;44(2):530-6.

95. Cai Y-Z, Mei S, Jie X, Luo Q, Corke H. Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. 2006;78(25):2872-88.
96. Wojdyło A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*. 2007;105(3):940-9.
97. Kim DSHL, Park S- Y, Kim J- Y. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A(1 – 42) insult. *Neuroscience Letters*. 2001;303(1):57-61.
98. Chun K-S, Park K-K, Lee J, Kang M, Surh Y-J. Inhibition of mouse skin tumor promotion by anti-inflammatory diarylheptanoids derived from *Alpinia oxyphylla* Miquel (Zingiberaceae). *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2002;13(1):37-45.
99. Phansawan B. Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2556.
100. Oliveira Sd, Souza GAd, Eckert CR, Silva TA, Sobral ES, Fávero OA, et al. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*. 2014;37(3):497-503.
101. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9–10):1231-7.
102. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*. 2003;83(4):547-50.
103. ปิยะวดี เจริญวัฒนา สป, ดำรงค์, เพชรประไพ คแ. การตรวจหาฤทธิ์ และสมบัติทางชีวเคมีของสารต้านอนุมูลสกัดจากบัวหลวง. รายงานวิจัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ปทุมธานี. 2552:92.
104. เ ท ค นี ค Salting out- Salting in. Available from: <http://linjah.exteen.com/20080905/salting-out-salting-in>.
105. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Basic protein and peptide protocols*. 1994:9-15.

106. Bradford assay. 2013, July 14 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm>.
107. Godfrey T WS, In: Godfrey T WSene. Introduction to industrial enzymology. Industrial enzymology,.Macmillan Press, London, pp 1-8.
108. Douglas ES, Penny LS. The Plastid Genome of the Cryptophyte Alga, *Guillardia theta*: Complete Sequence and Conserved Synteny Groups Confirm Its Common Ancestry with Red Algae. *Journal of Molecular Evolution*. 1999;48(2):236-44.
109. Dzieciatkowska M, Hill R, Hansen KC. GeLC-MS/MS analysis of complex protein mixtures. *Shotgun Proteomics: Methods and Protocols*. 2014:53-66.
110. Higgs RE, Knierman MD, Gelfanova V, Butler JP, Hale JE. Label-free LC-MS method for the identification of biomarkers. *Clinical Proteomics: Methods and Protocols*. 2008:209-30.
111. Protein Digestion 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.creative-proteomics.com/services/digestion-in-gel-or-in-solution.htm>.
112. Protein Digestion 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.creative-proteomics.com/services/digestion-in-gel-or-in-solution.htm>.
113. BnaA05g06360D [*Brassica napus*] 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078CDD5>.
114. BnaA03g32320D protein 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078CAJ5>.
115. BnaC08g28270D protein 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078C577>.
116. BnaC05g27440D protein 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078C916>.
117. Plant U-box 13 isoform 2 2016 [cited 2016 16 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A061GXZ2>.
118. Piersma SR, Fiedler U, Span S, Lingnau A, Pham TV, Hoffmann S, et al. Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. *Journal of proteome research*. 2010;9(4):1913-22.

119. Hubner NC, Ren S, Mann M. Peptide separation with immobilized pl strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics*. 2008;8(23-24):4862-72.
120. Tan E, Karsani S, Foo G, Wong S, Rahman NA, Khalid N, et al. Proteomic analysis of cell suspension cultures of induced by phenylalanine: identification of proteins involved in flavonoid and phenylpropanoid biosynthesis pathways. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2012;2(111):219-29.
121. Li R, Volenec J, Joern B, Cunningham S. Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. *Crop Science*. 1996;36(3):617-23.
122. Pang KS, Terrell JA, Nelson SD, Feuer KF, Clements M-J, Endrenyi L. An enzyme-distributed system for lidocaine metabolism in the perfused rat liver preparation. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 1986;14(2):107-30.
123. Johnson HS, Hatch M. Properties and regulation of leaf nicotinamide–adenine dinucleotide phosphate–malate dehydrogenase and ‘malic’ enzyme in plants with the C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochemical Journal*. 1970;119(2):273-80.
124. Brown RJ, Ernstrom C, Johnson ME. Milk-clotting enzymes and cheese chemistry. *Fundamentals of dairy chemistry*: Springer; 1988. p. 609-54.
125. Thompson DM. Repeated acquisition as a behavioral base line for studying drug effects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1973;184(2):506-14.
126. BnaC0 8 g2 8 2 7 0 D 2 0 1 6 [cited 2 0 1 6 1 6 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078C577>.
127. BnaC0 5 g2 7 4 4 0 D 2 0 1 6 [cited 2 0 1 6 1 6 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078C916>.
128. BnaA1 0 g1 9 0 1 0 D 2 0 1 6 [cited 2 0 1 6 1 6 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078BYW9>.
129. BnaUnng0 0 3 4 0 D 2 0 1 6 [cited 2 0 1 6 1 6 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078GR61>.
130. BnaA0 3 g4 6 5 5 0 D 2 0 1 6 [cited 2 0 1 6 1 6 May]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/A0A078FCC4>.

131. Kang S-G, Choi J-E, An H, Park Y-M, Lee H-J, Han C, et al. Manganese superoxide dismutase gene Ala-9Val polymorphism might be related to the severity of abnormal involuntary movements in Korean schizophrenic patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2008;32(8):1844-7.
132. Sati P, Pandey A, Rawat S, Rani A. Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system. *Journal of Pharmacy Research*. 2013;7(9):804-9.
133. Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(12):3418-23.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง

1. ผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำ ด้วยวิธี Bradford assay ในช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน

1.1 ผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองด้วยวิธี Bradford assay

ตารางที่ 17 ปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 12 เดือน

Month	Total Protein 0-40% (mg/ml)	Total protein 40-80% (mg/ml)
January	21.53 ± 1.32*	0.41 ± 0.03
February	15.21 ± 1.56*	1.66 ± 0.02**
March	13.42 ± 0.27*	2.61 ± 0.16**
April	29.04 ± 1.24*	1.65 ± 0.16**
May	12.94 ± 1.09*	4.42 ± 0.29**
June	11.37 ± 0.25*	4.24 ± 0.51**
July	18.41 ± 2.41*	5.71 ± 0.30**
August	2.94 ± 0.20*	1.84 ± 0.44**
September	0.80 ± 0.22	1.54 ± 0.19**
October	2.93 ± 0.12*	1.39 ± 0.15**
November	7.05 ± 0.34*	3.25 ± 1.12**
December	16.01 ± 1.70*	1.85 ± 0.28*

*บ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนรวม ในแต่ละเดือนที่แตกต่างกับเดือนกันยายนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

**บ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนรวม ในแต่ละเดือนที่แตกต่างกับเดือนมกราคมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

จากตาราง ผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0-40% ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 12 เดือน เมื่อนำผลการวัดปริมาณโปรตีนรวม พบว่ามีค่าต่ำที่สุดในเดือนกันยายน และเมื่อนำมาเป็นตัวเปรียบเทียบกับเดือนอื่นๆ พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม เดือนเมษายน เดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม เดือนตุลาคม เดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม มีค่ามากกว่าเดือนกันยายน และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) และปริมาณโปรตีนรวมในกระชายเหลืองจะมีค่าสูงที่สุด คือช่วงที่เก็บเกี่ยวในเดือนเมษายน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 29.04 ± 1.24 mg/ml

จากตาราง การเปรียบเทียบผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-80% ในสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 12 เดือน เมื่อนำผลการวัดปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากกระชายเหลือง ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดในเดือนมกราคม มาเป็นตัวเปรียบเทียบกับเดือนอื่นๆ พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวใน เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม เดือนเมษายน เดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม เดือนกันยายน เดือนตุลาคม เดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม มีค่ามากกว่าเดือนมกราคม และมีค่าแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) และปริมาณโปรตีนรวมในกระชายเหลืองจะมีค่าสูงที่สุด คือช่วงที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.71 ± 0.30 mg/ml

1.2 ผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายดำด้วยวิธี Bradford assay

ตารางที่ 18 ปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 9 เดือน

Month	Total protein 0-40% (mg/ml)	Total protein 40-80% (mg/ml)
January	9.44 ± 1.44	4.86 ± 0.27**
February	17.73 ± 0.32*	6.66 ± 0.37**
March	16.20 ± 1.59*	4.06 ± 0.29
April	13.70 ± 0.21*	4.12 ± 0.11
May	11.68 ± 0.28*	5.30 ± 0.98**
June	9.11 ± 0.48	4.28 ± 0.57
July	14.05 ± 2.86*	5.45 ± 0.88**
August	11.44 ± 0.97*	6.47 ± 0.60**
December	13.58 ± 1.01*	6.41 ± 0.30**

*บ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนรวม ในแต่ละเดือนที่แตกต่างกับเดือนมิถุนายนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

**บ่งชี้ถึงปริมาณโปรตีนรวม ในแต่ละเดือนที่แตกต่างกับเดือนมีนาคมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

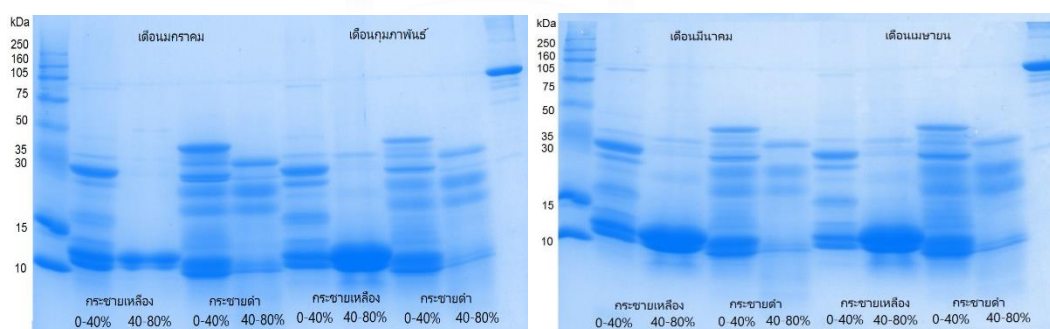
จากตาราง การเปรียบเทียบผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0-40% ในสารสกัดโปรตีนจากกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 9 เดือน เมื่อนำผลการวัดปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากกระชายดำ ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดในเดือนมิถุนายน มาเป็นตัวเปรียบเทียบกับเดือนอื่นๆ พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในกระชายเหลืองที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม เดือนเมษายน เดือนพฤษภาคม เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม และเดือนธันวาคม มีค่ามากกว่าเดือนมิถุนายน และมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) และปริมาณโปรตีนรวมในกระชายดำจะมีค่าสูงที่สุดคือช่วงที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 17.73 ± 0.32 mg/ml

จากตาราง การเปรียบเทียบผลการวัดปริมาณโปรตีนรวมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 40-80% ในสารสกัดโปรตีนจากกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 9 เดือน เมื่อนำผลการวัดปริมาณโปรตีนรวม ในสารสกัดโปรตีนจากกระชายดำ ซึ่งมีค่าต่ำที่สุดในเดือนมีนาคม มาเป็นตัวเปรียบเทียบกับเดือนอื่นๆ พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในกระชายดำที่เก็บเกี่ยวในเดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนเมษายน เดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม เดือนสิงหาคม และเดือนธันวาคม มีค่ามากกว่าเดือนมีนาคม และมีค่าแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) และปริมาณโปรตีนรวมในกระชายดำจะมีค่าสูงที่สุดคือช่วงที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.66 ± 0.37 mg/ml

2. ผลของการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

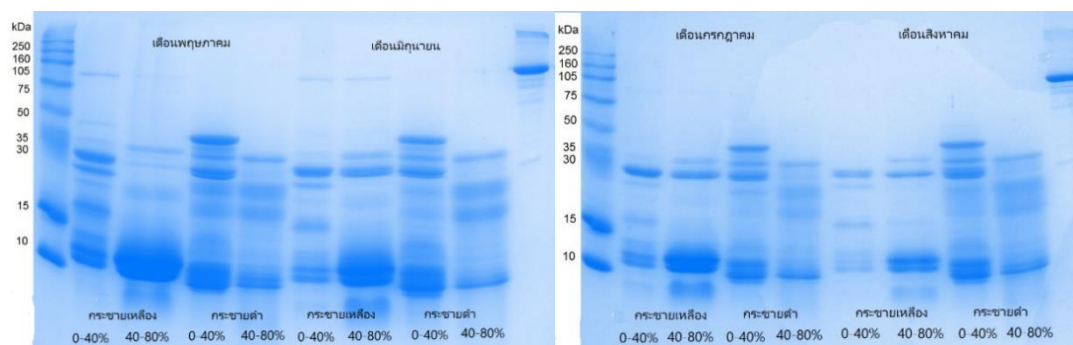
จากผลการแยกสารสกัดโปรตีนจากเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวทุกเดือน ด้วยวิธี SDS-PAGE เป็นการนำสารสกัดโปรตีนที่มีความเข้มข้น 10 μ g หยอดลงในแต่ละหลุมของแผ่นเจล SDS-PAGE จากนั้นรันด้วยกระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ต่อเจล จากนั้นย้อมเจลด้วยวิธี Colloidal Commassie Blue G-250 เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ผลของเจลที่ได้จะแสดงตามภาพด้านล่าง

2.1 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม และเดือนเมษายน ด้วยวิธี SDS-PAGE



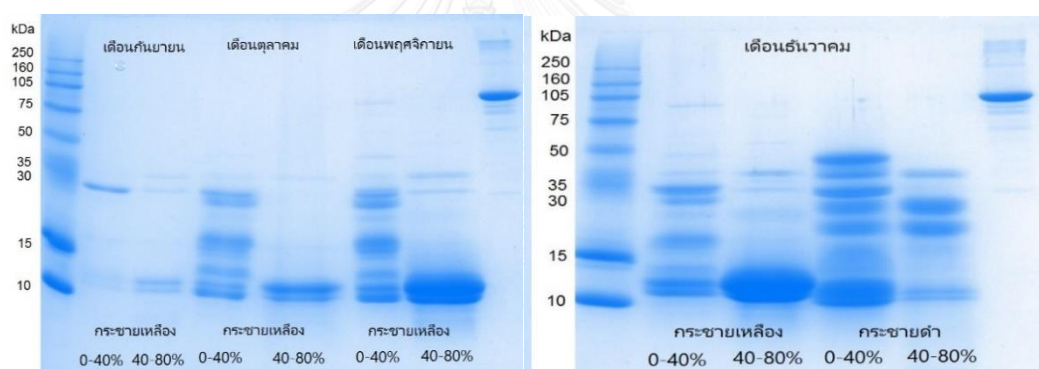
ภาพที่ 45 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคม เดือนกุมภาพันธ์ เดือนมีนาคม และเดือนเมษายน ด้วยวิธี SDS-PAGE

2.2 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม เดือนมิถุนายน เดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคม ด้วยวิธี SDS-PAGE



ภาพที่ 46 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม เดือน มิถุนายน เดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคม ด้วยวิธี SDS-PAGE

2.3 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกันยายน เดือน ตุลาคมเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม ด้วยวิธี SDS-PAGE



ภาพที่ 47 ผลการแยกโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-40% และ 40-80% ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกันยายน เดือน ตุลาคมเดือนพฤศจิกายน และเดือนธันวาคม ด้วยวิธี SDS-PAGE

3. ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองและเหง้ากระชายดำที่เก็บเกี่ยวในตัวอย่างที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 และตัวอย่างที่ 3 ด้วยวิธี GelC MS/MS

จากผลการระบุชนิดของโปรตีนในกระชายเหลืองและกระชายดำด้วยวิธี GelC-MS/MS เป็นการนำสารสกัดโปรตีนมาวัดปริมาณโปรตีนรวมด้วยวิธี Bradford assay จากนั้นนำโปรตีนที่มีความเข้มข้น 10 µg มาทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นตัดเจลเป็นแผ่นสีเหลืองเล็กๆ และนำแต่ละเจลมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง LC-MS/MS และนำข้อมูลที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS ไปวิเคราะห์กับโปรแกรม MASCOT search engine โดยใช้ฐานข้อมูล Zingiberaceae ซึ่งจะบ่งบอกถึง แถบโปรตีนที่ตัดในเจล (Band) ID ของโปรตีน (Uniprot ID) ชื่อโปรตีน (Protein name) สปีชีส์ที่พบโปรตีนชนิดนั้นๆ (Organism) ลำดับของกรดอะมิโนในตัวอย่างที่ตรงกับฐานข้อมูล (Sequence coverage (%)) จำนวนของเปปไทด์ในตัวอย่างที่ตรงกับฐานข้อมูล (Peptides matched) น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (Molecular weight) ค่า pI ของโปรตีน และค่า Protein score ซึ่งคิดจากจำนวนเปปไทด์ในตัวอย่างที่ตรงกับฐานข้อมูล ยิ่งค่าสูงยิ่งดี และแสดงผลตามตารางข้างล่าง

3.1 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 และตัวอย่างที่ 3 ด้วยวิธี GelC MS/MS

3.1.1 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 ด้วยวิธี GelC MS/MS

ตารางที่ 19 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80%, และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
1	gij18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		5	20	24228	422
2	gij449326850	hypothetical chloroplast RF19	Alpinia zerumbet	7	8	213922	158

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
3	gi 18202415	Zingipain- 2 or Cysteine proteinase GP-II		3	15	23907	121
4	gi 57118009	cysteine protease gp3a	Zingiber officinale	2	1	50924	63
5	gi 6137410	Chain A, The 2.1 Angstrom Structure Of A Cysteine Protease With Proline Specificity From Ginger Rhizome,	Zingiber Officinale	7	2	23907	50
6	gi 674954227	BnaC06g19550D	Brassica napus	1	2	57126	37
7	gi 508699795	Plant U- box 49 isoform 4	Theobroma cacao	4	1	58034	34
8	gi 674963275	BnaA10g18560D	Brassica napus	2	1	49584	34
9	gi 674957320	BnaA04g03370D	Brassica napus	1	1	29963	32
10	gi 674939826	BnaA06g05420D	Brassica napus	3	2	23995	32
11	gi 674958685	BnaA05g06750D	Brassica napus	2	1	12155	29
12	gi 674958646	BnaA05g06360D	Brassica napus	6	4	160571	29
13	gi 657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1	Malus domestica	4	1	45723	27

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
14	gij674962225	BnaC07g05100D	Brassica napus	3	1	71134	25
15	gij674963889	BnaA10g24700D	Brassica napus	4	1	104848	24
16	gij256002665	copper/zinc superoxide dismutase	Curcuma aromatica	1	1	15168	24
17	gij674964704	BnaC01g02870D	Brassica napus	6	1	296960	21
18	gij674954933	BnaA03g04250D	Brassica napus	2	1	21736	20
19	gij674959986	BnaC08g23330D	Brassica napus	6	1	41796	19
20	gij674962683	BnaC03g07700D	Brassica napus	2	1	25904	16
21	gij674964517	BnaC01g04740D	Brassica napus	1	1	12000	14

3.1.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 2 ด้วยวิธี GelC MS/MS

ตารางที่ 20 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
1	gij18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		3	14	24228	372
2	gij557637559	hypothetical chloroplast RF19	Curcuma roscoeana	1	7	216862	97
3	gij57118009	cysteine protease gp3a	Zingiber officinale	1	1	52029	69
4	gij6137410	Chain A, The 2.1 Angstrom Structure Of A Cysteine Protease With Proline Specificity From Ginger Rhizome, Zingiber Officinale		1	1	15168	68
5	gij674958646	BnaA05g06360D	Brassica napus	1	2	23907	43
6	gij256002665	copper/ zinc superoxide dismutase	Curcuma aromatica	1	2	66130	35

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
7	gij674954933	BnaA03g04250D	Brassica napus	1	1	51733	32
8	gij355333071	Chain A, Recombinant Human Serum Albumin From Transgenic plant		1	1	26361	30
9	gij674958770	BnaA05g07600D	Brassica napus	1	1	183300	30
10	gij674876153	BnaCnng30180D	Brassica napus	1	2	63540	29
11	gij619492980	183 kDa replicase [Plant transient expression vector pGR2i-dCP:GFP]		1	1	25908	27
12	gij674866992	BnaAnng23210D	Brassica napus	1	1	48473	26
13	gij674959326	BnaA03g30160D	Brassica napus	1	3	82814	25
14	gij397725632	gluta- disulfide reductase, plant	Sphingobium sp. AP49	1	1	108137	22
15	gij674964057	BnaA10g26380D	Brassica napus	1	1	160571	20
16	gij674953593	BnaA05g01320D	Brassica napus	1	2	21736	20
17	gij674955463	BnaA09g33860D	Brassica napus	1	1	131042	19
18	gij674956444	BnaC04g39490D	Brassica napus	1	1	11526	18

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
19	gij674959410	BnaA03g29320D	Brassica napus	1	1	76155	17

3.1.3 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 3 ด้วยวิธี GelC MS/MS

ตารางที่ 21 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 3 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
1	gij18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		2	5	24228	121
2	gij18202415	Zingipain- 2 or Cysteine proteinase GP-II		2	2	23907	52
3	gij557637559	hypothetical chloroplast RF19	Curcuma roscoeana	1	5	216862	77
4	gij674958646	BnaA05g06360D	Brassica napus	1	1	38376	34
5	gij657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1	Malus domestica	2	2	18573	32
6	gij674954933	BnaA03g04250D	Brassica napus	1	1	48820	32
7	gij674959494	BnaA03g28480D	Brassica napus	1	1	164306	28

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
8	gij669034083	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	Hedychium coronarium	1	1	97659	24
9	gij674920607	BnaA02g13390D	Brassica napus	1	1	45723	23
10	gij674962838	BnaA03g09250D	Brassica napus	1	1	160571	21
11	gij674955780	BnaC07g19860D	Brassica napus	1	1	21736	20
12	gij674945666	BnaC02g32640D	Brassica napus	1	1	49227	20
13	gij674937488	BnaA07g25910D	Brassica napus	1	1	38890	19
14	gij720068209	PREDICTED: heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26-like isoform X1	Nelumbo nucifera	1	1	16784	16
15	gij508699516	Glutamate recertor 2 plant	Theobroma cacao	1	1	80638	16

3.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 ตัวอย่างที่ 2 และตัวอย่างที่ 3 ด้วยวิธี Gel-C MS/MS

3.2.1 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 ด้วยวิธี GelC MS/MS

ตารางที่ 22 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
1	gij18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		2	24	24228	604
2	gij355333071	Chain A, Recombinant Human Serum Albumin From Transgenic plant		1	2	66130	72
3	gij557637559	hypothetical chloroplast RF19	Curcuma roscoeana	1	3	216862	56
4	gij674959110	BnaA03g32320D	Brassica napus	1	1	71315	49
5	gij413909848	Cu,Zn superoxide dismutase, partial	Curcuma aromatica	1	2	12846	49
6	gij674963806	BnaA10g23870D	Brassica napus	1	1	39824	31
7	gij674957341	BnaA04g03580D	Brassica napus	1	1	27232	31
8	gij658023515	PREDICTED: common plant	Malus domestica	1	2	55479	30

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
		regulatory factor 1 isoform 1-like					
9	gij674956173	BnaC08g03250D	Brassica napus	1	1	17962	28
10	gij674955463	BnaA09g33860D	Brassica napus	1	1	131042	28
11	gij674958171	BnaA01g01390D	Brassica napus	1	1	7350	27
12	gij674963703	BnaA10g22840D	Brassica napus	1	1	153295	27
13	gij674954438	BnaA01g09780D	Brassica napus	1	1	12108	27
14	gij674965535	BnaA07g18180D	Brassica napus	1	1	57126	24
15	gij674954737	BnaA03g02290D	Brassica napus	1	1	68005	22
16	gij657392695	plant organelle RNA recognition domain protein	Medicago truncatula	1	1	53160	21
17	gij674871558	BnaAnng18410D	Brassica napus	1	1	62096	18
18	gij674902173	BnaC05g21910D	Brassica napus	1	1	13924	17
19	gij674958646	BnaA05g06360D	Brassica napus	1	1	160571	17
20	gij674959494	BnaA03g28480D	Brassica napus	1	1	38376	17
21	gij508773629	Plant intracellular Ras-	Theobroma cacao	1	1	62969	17

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
		Group- related LRR protein 9					
22	gij146145877	plant dual-specificity MAP kinase family domain protein	Tetrahymena thermophila	1	1	44091	15

3.2.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 2 ด้วยวิธี GelC MS/MS

ตารางที่ 23 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
1	gij18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		2	16	24228	485
2	gij355333071	Chain A, Recombinant Human Serum Albumin From Transgenic plant		1	1	66130	39
3	gij674959110	BnaA03g32320D	Brassica napus	1	1	118645	33
4	gij674955463	BnaA09g33860D [Brassica napus]	Brassica napus	1	1	71315	32
5	gij412990846	plant synaptotagmin	Bathycoccus presinos	1	3	47523	29

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
6	gij657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1 [Malus domestica]		1	1	51088	27
7	gij674955383	BnaA09g33060D	Brassica napus	1	1	190256	25
8	gij657960835	BnaC07g43170D	Brassica napus	1	1	131042	24
9	gij657955665	BnaC07g18710D	Brassica napus	1	3	73528	20
10	gij657959328	BnaA03g30140D	Brassica napus	1	1	24223	19
11	gij731321786	PREDICTED: common plant regulatory factor 1-like isoform X1	Beta vulgaris subsp. vulgaris	1	1	37256	19
12	gij657961084	BnaC07g45660D	Brassica napus	1	1	134884	17
13	gij657965427	BnaA07g17100D	Brassica napus	1	2	28164	14

3.2.3 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 3 ด้วยวิธี GelC MS/MS

ตารางที่ 24 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 3 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% และการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE, โดยวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
1	gij18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		2	21	24228	642
2	gij674959110	BnaA03g32320D	Brassica napus	2	2	15168	79
3	gij674959494	BnaA03g28480D [Brassica napus]	Brassica napus	1	4	213922	73
4	gij657955665	BnaC07g18710D [Brassica napus]	Brassica napus	1	1	71315	66
5	gij256002665	copper/ zinc superoxide dismutase	Curcuma aromatica	1	1	127974	36
6	gij449326850	hypothetical chloroplast RF19	Alpinia zerumbet	1	1	38376	33
7	gij657959142	BnaA03g32000D [Brassica napus]	Brassica napus	1	1	50924	32
8	gij57118011	cysteine protease gp3b	Zingiber officinale	1	1	17347	31
9	gij657957357	BnaA04g03740D	Brassica napus	1	1	16784	29
10	gij720068209	PREDICTED: heavy metal-associated isophenylated	Nelumbo nucifera	1	2	45723	27

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
		plant protein 26-like isoform X1					
11	gij657968700	PREDICTED: common plant regulatory factor 1 isoform X1	Malus domestica	1	1	46214	26
12	gij674955968	BnaA07g05890D	Brassica napus	1	1	73528	23
13	gij674882145	BnaC08g14760D	Brassica napus	1	1	82723	22
14	gij441428253	Cyclopropane fatty-acryl-phospholipid synthase, plant type	Photobacterium sp. AK15	1	1	46639	22
15	gij674962584	BnaC03g06710D	Brassica napus	1	1	154115	20
16	gij674965723	BnaA07g20060D	Brassica napus	1	2	54098	19
17	gij186478739	plant thionin family protein	Arabidopsis thaliana	1	1	10263	18
18	gij674959497	BnaA03g28450D	Brassica napus	1	1	58778	18
19	gij674964488	BnaC01g05030D	Brassica napus	1	1	116338	18
20	gij674959367	BnaA03g29750D	Brassica napus	1	1	102071	18
21	gij674959896	BnaC08g24230D	Brassica napus	1	1	71420	17
22	gij674876658	BnaA01g36520D	Brassica napus	1	1	35989	17

No	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	Protein Score
23	gi 674961051	BnaC07g45330D	Brassica napus	1	1	31692	17
24	gi 674958327	BnaC09g25790D	Brassica napus	1	1	121334	16

4. ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 และในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

4.1 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

4.1.1 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 25 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical MW (Da)	pl	Protein Score
1	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		11.3	3	24228	5.12	49
	gi 674961641	BnaC08g28270D	Brassica napus	1	1	96842	6.61	33
	gi 674960227	BnaC05g27440D	Brassica napus	11.4	1	10180	5.42	31
	gi 674904442	BnaA06g19270D	Brassica napus	4.1	1	43439	5.68	30

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
	gi 674958811	BnaA05g08010D	Brassica napus	6.9	1	40359	7.22	26
2	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		14	3	24228	5.12	47
	gi 674961641	BnaC08g28270D	Brassica napus	1	1	96842	6.61	41
	gi 674955562	BnaC03g53810D	Brassica napus	5.2	2	70457	5.65	21
3	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		12.2	3	24228	5.12	47
	gi 6137410	Chain A, The 2. 1 Angstrom Structure Of A Cysteine Protease With Proline Specificity From Ginger Rhizome, Zingiber Officinale		12.7	3	23907	4.82	37
	gi 508699795	Plant U-box 49 isoform 4	Theobroma cacao	3.8	2	58034	6.94	35
	gi 674962019	BnaC04g16790D	Brassica napus	10.3	1	13543	10.35	33
	gi 674958685	BnaA05g06750D	Brassica napus	10.3	1	12155	10.18	32

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
	gi 743881172	PREDICTED: filament-like plant protein 4	Elaeis guineensis	2.1	3	120632	5.34	20
	gi 729330099	PREDICTED: filament-like plant protein 4	Tarenaya hassleriana	1.4	2	108293	5.14	20
	gi 657980584	PREDICTED: filament-like plant protein 7	Malus domestica	2.1	2	119220	5.73	20
	gi 674963320	BnaA10g19010D	Brassica napus	11.5	2	24176	9.99	20
	gi 674871025	BnaC08g19200D	Brassica napus	2.6	2	102057	5.12	20
	gi 645277925	PREDICTED: filament-like plant protein 7	Prunus mume	1.7	2	123219	5.45	20
	gi 674877011	BnaC05g50270D	Brassica napus	2.1	2	105979	5.17	20
	gi 122242586	Filament-like plant protein 4		2.1	2	109743	5.2	20
	gi 674905370	BnaUnng00340D	Brassica napus	0.6	1	106656	5.7	20
	gi 674954758	BnaA03g02500D	Brassica napus	2.5	1	23202	10.01	20

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
	gi 674958117	BnaA01g01930D	Brassica napus	3.1	1	21953	9.34	20
	gi 674960776	BnaC07g42580D	Brassica napus	1.2	1	47158	6.71	20
	gi 674961953	BnaC04g16130D	Brassica napus	1	1	58242	8.51	20
	gi 674867697	BnaAnng22340D, partial	Brassica napus	0.7	1	90089	9.2	20

4.1.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วย

วิธี Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 26 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายเหลืองจากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
1	gi 674955158	BnaA03g06500D	Brassica napus	4.7	2	51755	6	105
	gi 674957342	BnaA04g03590D	Brassica napus	12.2	2	27209	5.52	87
	gi 674959098	BnaA03g32440D	Brassica napus	3.9	1	50495	6.69	73
	gi 380467954	cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	Zingiber officinale	14.4	2	21221	7.66	55

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
	gi 57118009	cysteine protease gp3a	Zingiber officinale	3.4	1	52029	6.17	53
	gi 674959032	BnaA04g07960D	Brassica napus	0.9	1	75121	8.84	43
	gi 674961641	BnaC08g28270D	Brassica napus	1	1	96842	6.61	35
	gi 674962037	BnaC04g16970D	Brassica napus	12.5	1	6422	11.79	31
	gi 674957328	BnaA04g03450D	Brassica napus	7.1	1	27043	4.67	30
	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I		7.2	2	24228	5.12	29
2	gi 674955158	BnaA03g06500D	Brassica napus	7.2	4	51755	6	127
	gi 380467954	cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	Zingiber officinale	14.4	2	21221	7.66	98
	gi 57118009	cysteine protease gp3a	Zingiber officinale	5.9	2	52029	6.17	60
	gi 674957341	BnaA04g03580D	Brassica napus	4.7	1	27232	5.57	55
	gi 674960435	BnaC06g33830D	Brassica napus	2.7	2	29523	10.7	38

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
	gi 674961641	BnaC08g2 8270D	Brassica napus	1	2	96842	6.61	37
	gi 674960227	BnaC05g2 7440D	Brassica napus	11.4	1	10180	5.41	32
3	gi 674955158	BnaA03g0 6500D	Brassica napus	4.7	2	51755	6	126
	gi 380467954	cytosolic glyceralde- hyde- 3- phosphate dehydroge- nase, partial	Zingiber officinale	14.4	2	21221	7.66	79
	gi 674957341	BnaA04g0 3580D	Brassica napus	4.7	1	27323	5.57	79
	gi 57118009	cysteine protease gp3a	Zingiber officinale	5.9	2	52029	6.17	69
	gi 674959032	BnaA04g0 7960D	Brassica napus	0.9	1	75121	8.84	49
	gi 674959098	BnaA03g3 2440D	Brassica napus	6.4	2	50495	6.69	45
	gi 674961641	BnaC08g2 8270D	Brassica napus	3	3	96842	6.61	40
	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		16.7	4	24228	5.12	39

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
	gi 674960227	BnaC05g27440D	Brassica napus	11.4	1	10180	5.42	37
	gi 674922258	BnaA03g46550D	[Brassica napus	7.2	1	37909	9.87	35
	gi 674955792	BnaC07g19980D	Brassica napus	1.8	1	37267	9.1	33
	gi 674960435	BnaC06g33830D	Brassica napus	2.7	2	29523	10.7	31

4.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่จากตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

4.2.1 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 1 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 27 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่จากตัวอย่างที่ 1 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
1	gi 674867298	BnaCnng52220D	Brassica napus	3.6	1	52357	9.64	44
	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I		4.5	1	24228	5.12	25
	gi 355501173	receptor-like	Medicago truncatula	1.9	1	57137	8.48	23

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
		kinase plant						
	gi 674965264	BnaA07g15470D	Brassica napus	0.4	1	148964	4.83	20
2	gi 508786811	Plant U-box 13 isoform 2	Theobroma cacao	1.1	1	72043	5.66	35
	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I		4.5	1	24228	5.12	27
3	gi 18202414	Zingipain-1 or Cysteine proteinase GP-I		4.5	1	24228	5.12	37
	gi 674956003	BnaA07g06240D	Brassica napus	5.9	2	53256	5	29
	gi 355501173	receptor-like kinase plant	Medicago truncatula	1.9	1	57137	8.48	25
	gi 674956036	BnaA07g06570D	Brassica napus	9.6	2	15614	10.47	18

4.2.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำจากตัวอย่างที่ 2 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี

Label-free LC-MS/MS

ตารางที่ 28 การระบุชนิดของโปรตีนในเหง้ากระชายดำที่จากตัวอย่างที่ 2 จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-80% โดยวิเคราะห์ด้วย Label-free LC-MS/MS และระบุชนิดของโปรตีนด้วย MASCOT search engine (MASCOT DAEMON)

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pI	
1	gi 449326850	hypothetical chloroplast RF19	Alpinia zerumbe	0.4	1	213922	9.61	49
	gi 508786811	Plant U- box 13 isoform 2	Theobroma cacao	1.1	1	72043	5.66	39
	gi 674930939	BnaA02g229 90D	Brassica napu	1.4	1	55553	6.4	38
	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		4.5	1	24228	5.12	36
	gi 355501173	receptor-like kinase plant	Medicago truncatula	1.9	1	57137	8.48	28
2	gi 449326850	hypothetical chloroplast RF19	Alpinia zerumbe	0.4	1	213922	9.61	42
	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		4.5	1	24228	5.12	42
	gi 508786811	Plant U- box 13 isoform 2	Theobroma cacao	1.1	1	72043	5.66	40

Repeat	Uniprot ID	Protein name	Organism	Sequence coverage (%)	Peptides matched	Theoretical		Protein Score
						MW (Da)	pi	
	gi 674930939	BnaA02g22990D	Brassica napu	1.4	1	55553	6.4	34
3	gi 449326850	hypothetical chloroplast RF19	Alpinia zerumbe	1	1	213922	9.61	39
	gi 18202414	Zingipain- 1 or Cysteine proteinase GP-I		1	1	24228	5.12	38
	gi 508786811	Plant U- box 13 isoform 2	Theobroma cacao	1	1	72043	5.66	34
	gi 674930939	BnaA02g22990D	Brassica napu	1	1	55553	6.4	34

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิชญา ลักษณะวิลาศ เกิดเมื่อวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ. 2532 ณ โรงพยาบาล ระนอง จังหวัดระนอง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2554 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับ บัณฑิตศึกษา หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 โดยได้รับ ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ครั้งที่ 3/2557 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

