**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การแยกบริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติของ α-Momorcharin จากเมล็ดมะระขี้นก เพื่อการตรวจวัดปริมาณโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา

**ชื่อผู้เขียน** นางสาว ฟ้าใส คันธวงค์

**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** สาขาวิชาชีวเคมี

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ | ประธานกรรมการ |
| ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย | กรรมการ |
| รศ. ดร. วิบูลย์ รัตนาปนนท์ | กรรมการ |
| ผศ. ดร. พลังพล คงเสรี | กรรมการ |

## บทคัดย่อ

α-momorcharin เป็นโปรตีนขนาด 30 kDa ที่พบในเมล็ดมะระขี้นก โปรตีนชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของไรโบโซม โดยการตัด adenine ตำแหน่ง 4324 ออกจาก 28s ไรโบโซม (*N*-glycosidase activity) ดังนั้นเซลล์ที่ได้รับ α-momorcharin จึงไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้และตายในที่สุด คุณสมบัตินี้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งและโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการสกัด α-momorcharin จากเมล็ดมะระขี้นก และทำการผลิต polyclonal antibodies ต่อโปรตีนดังกล่าวเพื่อนำมาใช้ในการหาปริมาณ α-momorcharin ในส่วนต่างๆของมะระขี้นก

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการสกัด α-momorcharin จากเมล็ดมะระขี้นกโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนมาแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟี ชนิด hydroxyapatite โปรตีนที่แยกได้จาก คอลัมน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โครมาโตรกราฟฟี มี 3 peak คือ peak 1, 2 และ 3 peak 3 ถูกนำไปศึกษาลำดับของกรดอะมิโนและศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโน ผลการหาลำดับของกรดอะมิโนและการศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโน ทำให้ทราบว่าโปรตีนที่สกัดได้คือ α-momorcharin และ polyclonal antibodies ต่อ α-momorcharin ที่ผลิตขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับ α-momorcharin ด้วยความไวสูงเมื่อศึกษาด้วย ELISA โดยมีค่า $IC_{50}$ ที่ 10 μg/ml จากการศึกษาด้วยวิธี Immunoblot พบว่า polyclonal antibodies ที่ผลิตได้สามารถทำปฏิกิริยากับ peak 1 และ 2 จากคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีได้ด้วยความแรงที่ต่ำกว่า peak 3 (α-momorcharin)

เมื่อทำการตรวจหา α-momorcharin จากส่วนต่างๆของต้นมะระขี้นกโดยวิธี ELISA พบว่ามีปริมาณสูงสุดในเมล็ด, ใบ และ ผล ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดที่มาจากต่างสายพันธุ์มีปริมาณ α-momorcharin ต่างกัน

จากการทดสอบหาคุณสมบัติ *N*-glycosidase activity ต่อ ribosome ใน rabbit reticulocyte lysate พบว่า α-momorcharin ที่แยกบริสุทธิ์ได้นี้ยังมีคุณสมบัติ ribosome-inactivating activity อยู่

โดยสรุปแล้ว การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยก α-momorcharin จากเมล็ดมะระขี้นก โดยที่โปรตีนยังมีคุณสมบัติเป็น ribosome-inactivating protein อยู่ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาการหาปริมาณ α-momorcharin จากส่วนต่างๆของต้นมะระขี้นกโดยวิธี ELISA แต่เนื่องจาก polyclonal antibodies ที่ได้สามารถเกิด cross-reaction กับโปรตีนชนิดอื่นในมะระขี้นก ดังนั้นการนำวิธีนี้มาหาปริมาณ α-momorcharin จึงต้องมีการพัฒนาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Purification and Characterization of α-Momorcharin from Bitter Melon Seeds for Quantitative Analysis by Immunoassay

**Author** Miss Fahsai Kantawong

**M.S.** Biochemistry

**Examining committee**
Associate Professor Dr. Prachya Kongtawelert Chairman
Assistant Professor Dr. Siriwan Ongchai Member
Associate Professor Dr. Viboon Rattanapanone Member
Assistant Professor Dr. Palangpon Kongseree Member

## Abstract

α-Momorcharin is a 30-kDa type 1 ribosome-inactivating protein (Type 1 RIPs) found in bitter melons. It has *N*-glycosidase activity that plays important role in the inactivation of ribosome by depurination adenine 4324 from a 28s ribosome. Thus protein translation is inhibited and leads to the death of the target cell. This advantage is applied to kill tumor cells and viral infected cells.

The main focus of this project was to develop a novel effective method to purify α-momorcharin from the bitter melon seeds by using ammonium sulfate protein precipitation and followed by one-step hydroxyapatite column chromatography (Bio-Gel HPHT). From the HPHT column chromatography, three peaks of protein were observed. The last peak was subjected to do *N*-terminal amino acid sequencing (10 amino acids) and amino acid analysis. The data of *N*-terminal amino acid sequence and amino acid analysis indicated that the highly purified protein from the third peak was

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

α-momorcharin. This purified α-momorcharin was used as an immunogen to produce polyclonal antibodies in order to develop a quantitative method for the α-momorcharin by immunoassay (ELISA). The $IC_{50}$ from the competitive ELISA was 10 μg/ml. Cross-reaction to the first and the second peaks could also be detected by immunobloting technique. It was found that the purified α-momorcharin from this method has *N*-glycosidase activity on rabbit reticulocyte ribosome.

Quantitative method of α-momorcharin by ELISA was demonstrated that the seeds contained the highest amount of α-momorcharin in comparison with leaves and fruits, respectively. The amount of α-momorcharin among the seeds from various sources were different.

From these results, it could be concluded that the effective technique for purification of α-momorcharin from the bitter melon seeds was successfully developed.

In addition, the purified protein was found to remain its *N-glycosidase* activity. The polyclonal antibodies which raised against this purified protein could be successfully used to develop an ELISA tachnique for quantitative method of α-momorcharin in *Momordica charantia* plant such as seeds, leaves and fruits.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved