รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากน้ำยางของต้น **Artocarpus heterophyllus**

โดย ผศ.ดร.จารุวรรณ ศิริเทพทวี และคณะ

พฤษภาคม พ.ศ. 2553

สัญญาเลขที่ MRG5180004

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus*

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ผศ.ดร.จารุวรรณ ศิริเทพทวี	ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

คณะผู้วิจัยได้จัดทำรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง "การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus*" เพื่อเผยแพร่งานวิจัยที่เป็นองค์ความรู้ใหม่ถึงประโยชน์ของสมุนไพรไทยที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้เนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะผู้วิจัยจึงขอแสดงความขอบคุณหน่วยงานที่ให้การสนับสนุนมา ณ โอกาสนี้

ผศ.ดร.จารุวรรณ ศิริเทพทวี

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	3
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาของการทำวิจัย	10
บทที่ 2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง (Experimental Procedures and Results)	16
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง (Discussion and Conclusion)	42
เอกสารอ้างอิง	45
Output ที่ได้จากโครงการ	48
ภาคผนวก	49
ผลงานที่ได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ	50
Manuscript ที่ได้ส่งเพื่อรอผลพิจารณาให้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	55

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180004

ชื่อโครงการ : โครงการ การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus*

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.จารุวรรณ ศิริเทพทวี ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และ รศ.ดร.สมปอง ธรรมศิริรักษ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail address : jaruwan_siritape@yahoo.com และ somkly@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ : งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสกัดไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่งจากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus* ด้วยเทคนิคการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนและการแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนโปรตีนที่ได้ทีมีคุณสมบัติทนความร้อนและมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนที่มีหลายสับยูนิต (HSHMG) มีน้ำหนักโมเลกุลโดยรวมมากกว่า 97 กิโลดัลตัน แต่ละสับยูนิตมีขนาด 29, 31 และ 33 kDa ซึ่งมีค่า *pI* เท่ากับ 6.93, 6.93 และ 6.63 ตามลำดับ CD spectrum แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนนี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ในสภาวะที่มี 2 mM $CaCl_2$ และ 2 mM $MgCl_2$ ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลับคืนได้เมื่อเติม 4 mM EDTA จากการศึกษาด้วย peptide mass fingerprint พบว่าโปรตีน HSHMG จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน Hsps/chaperones มีคุณสมบัติในการยับยั้งปัจจัยภายในของระบบการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ นอกจากนี้โปรตีน HSHMG ยังมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งโปรตีนในกลุ่มเซอรีนโปรตีเอส ซึ่งคุณสมบัติในการยับยั้งของ HSHMG จะลดลงเมื่อเติม 2 mM $CaCl_2$ และ 2 mM $MgCl_2$

คำหลัก : *Artocarpus heterophyllus*, jakfruit, latex, serine protease inhibitor

Abstract

Project Code : MRG5180004

Project Title : Purification and characterization of proteins associated with coagulant and anticoagulant activity from *Artocarpus heterophyllus* latex

Investigator : Assistant Professor Dr. Jaruwan Siritapetawee, Department of Biochemistry, College of Medicine and Public Health, Ubon Rajathanee University, and Associate Professor Dr. Sompong Thammasirirak , Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University

E-mail Address : jaruwan_siritape@yahoo.com และ somkly@kku.ac.th

Project Period : 2 Years

Abstract: A heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) from *Artocarpus heterophyllus* latex was purified by a combination of heat precipitation and ion-exchange chromatography. The size of this multimeric protein from SDS-PAGE was more than 97 kDa. The apparent molecular masses of the monomeric proteins were 29, 31 and 33 kDa. The isoelectric points (*pIs*) of the monomers were 6.93, 6.63 and 6.63, respectively. CD spectrum of HSHMG was changed by 2 mM $CaCl_2$ and 2 mM $MgCl_2$ and it can be returned to the native state by added 4 mM EDTA. Peptide mass fingerprint revealed that HSHMG was a complex protein referred to Hsps/chaperones. HSHMG had an effect on intrinsic pathways of the human blood coagulation system. Moreover, HSHMG had the serine protease inhibitor property. In addition, the inhibitory activity of HSHMG can be reduced by 2 mM $CaCl_2$ and 2 mM $MgCl_2$.

Key words: *Artocarpus heterophyllus*, jakfruit, latex, serine protease inhibitor

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

---

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวและยับยั้งการแข็งตัวของเลือดจากน้ำยางของต้น *Artocarpus heterophyllus*

(ภาษาอังกฤษ) Purification and characterization of proteins associated with coagulant and anticoagulant activity from *Artocarpus heterophyllus* latex

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

หัวหน้าโครงการ ดร. จารุวรรณ ศิริเทพทวี

หน่วยงานที่สังกัด วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ที่อยู่ 85 ถ.สถลมาร์ค อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี

หมายเลขโทรศัพท์ 045-353900 ต่อ 5859 Mobile Phone: 08-98479090 โทรสาร 045-353901

E-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

3. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

น้ำยาง (Plant latex) สามารถพบได้ในพืชหลายวงศ์ (family) เช่น Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Moraceae และ Apocyanaceae โดยทั่วไปแล้วน้ำยางมักประกอบไปด้วย hydrolytic enzyme หลายชนิด รวมทั้ง wax, resin และ lipid like substances ซึ่งบทบาทของน้ำยางต่อสรีระวิทยาของพืชยังไม่ทราบแน่ชัดนัก เคยมีรายงานว่า hydrolytic enzymes จากน้ำยางของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งจำพวก proteases ช่วยป้องกันพืชจากการติดเชื้อโรคต่างๆ และ เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่รุนแรงหรือเป็นอันตราย (harsh conditions)

นอกจากนี้น้ำยางยังสามารถมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสามารถใช้เป็นยาพื้นบ้าน (folk medicine) ได้ น้ำยางจากพืชหลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการ hemostatis, การรักษาบาดแผล (wound healing) และ ลดอาการปวดบวมอักเสบ

สำหรับการแพทย์แผนไทยได้มีการใช้น้ำยางของต้นไม้มาใช้ในการรักษาแผล เช่น น้ำยางจากต้นขนุน (ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Artocarpus heterophyllus*) และจากการวิจัยเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าส่วนน้ำใส (pre-heated supernatant) ภายหลังจากปั่นเหวี่ยงของ crude latex ของขนุนมีคุณสมบัติ anticoagulant activity เมื่อทดสอบกับเลือดของมนุษย์ด้วยวิธี whole blood clotting time และเมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปต้มที่ความร้อน 100 $^{\circ}$C (heated supernatant) แล้วนำไปปั่นแยกชั้นด้วยเทคนิค centrifugation พบว่าส่วนน้ำใสที่ได้มีคุณสมบัติยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anticoagulation activity) โดยให้เวลาในการหยุดการแข็งตัวของเลือดเมื่อทดสอบด้วยวิธี whole blood clotting time นานกว่าปกติ (prolong) ซึ่งคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ anticoagulation และ coagulation ของกระบวนการแข็งตัวของเลือดของน้ำยางของต้นขนุนอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการหายของบาดแผล (wound healing) ซึ่งทั่วไปจะเกี่ยวกับทั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด (coagulation) และ การละลายลิ่มเลือด (fibrynolysis) และเนื่องจากคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนที่แยกได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างส่วน pre-heated supernatant และ heated supernatant ของน้ำยางขนุนดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นคุณสมบัติในการเป็น coagulation และ anticoagulation ของน้ำยางขนุนอาจเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยางซึ่งจะต้องมีการพิสูจน์ต่อไป

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ในน้ำยางและแยกเอาโปรตีนที่มีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ blood coagulation system ของมนุษย์ ออกมาเพื่อศึกษาคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ procoagulation และ blood clot hydrolysis โดยงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ของการใช้ประโยชน์จากน้ำยางของต้นขนุนในด้านการมีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับระบบการแข็งตัวของ

เลือด เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัตินี้มาก่อน จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับน้ำยางของต้นขนุนจะเป็นในแง่ภาวะภูมิแพ้ที่สามารถเกิดขึ้นได้จากน้ำยางของต้นขนุน และเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำยางขนุนกับต้น *Hevea brasiliensis* และคุณสมบัติของโปรตีนบางโปรตีนในน้ำยางที่มีคุณสมบัติ serine-centred protease แต่ไม่ได้รายงานเกี่ยวกับประโยชน์ที่จะสามารถนำองค์ประกอบของน้ำยางจากต้นขนุนมาใช้ได้

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงสามารถช่วยให้เข้าใจบทบาทของน้ำยางของขนุนในการรักษาแผล รวมทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและใช้ในการวิจัยต่อไปในอนาคตได้ เช่น การวิจัยเกี่ยวกับการรักษาแผลเรื้อรัง หรือรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด เช่น thrombosis และ hemophilia เป็นต้น

4. วัตถุประสงค์

4.1 เพื่อแยกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ จาก crude latex ของต้นขนุน และทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

4.2 เพื่อบ่งชี้หรือกำหนดชนิดของโปรตีนดังกล่าวรวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีน และโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน (protein secondary structure)

4.3 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนดังกล่าวในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการละลายลิ่มเลือด (blood clot hydrolysis)

5. ระเบียบวิธีวิจัย

5.1 การเก็บน้ำยาง

น้ำยางจะเก็บจากต้นขนุนที่พบได้ในเขตอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยจะทำการเก็บโดยการกรีดยางจากขั้วของผลขนุน และเก็บใส่ในขวดแก้วปากกว้างที่สะอาด เมื่อเก็บเสร็จแล้วจะนำน้ำยางมาเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

5.2 การแยกและทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ coagulation และ anticoagulation activity จากน้ำยาง (crude latex)

นำน้ำยางที่เก็บไว้มาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกเอาส่วนน้ำใสมาต้มที่ความร้อน 100 °C หลังจากนั้นปั่นแยกเอาส่วนน้ำใส มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทาง chromatography และ ศึกษาความบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และทดสอบว่ามี coagulation และ anticoagulation activity โดยใช้วิธี Prothrombin time (PT) test, Activated partial thromboplastin time (APTT) test

5.3 Biophysical characterization

นำสารละลายโปรตีนที่มี activity ที่ต้องการมาทำการศึกษาคุณสมบัติดังต่อไปนี้

5.3.1 Identify ชนิดและศึกษา primary structure ของโปรตีนโดยใช้เทคนิค เช่น MALDI-TOF peptide mass fingerprint (in gel digestion)

5.3.2 ศึกษาคุณสมบัติโดยทั่วไปของโปรตีน เช่น การทนต่อความร้อน, PI เป็นต้น

5.3.3 ศึกษา secondary structure ของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Circular dichroism spectroscopy

5.4 Biochemical characterization

5.4.1 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น protease enzyme การศึกษาคุณสมบัติในการเป็น protease ของ HSHMG อาศัยการย่อย substrate คือ gelatin และ casein และดู zymography ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Shimokawa และคณะ (2002)

5.4.2 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG คุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG ทำการศึกษาโดยใช้น้ำยา commercial คือ QuantiCleaveTM Protease Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)

5.4.3 การทดสอบเกี่ยวกับกระบวนการห้ามเลือด (coagulation และ anticoagulation activities) ตัวอย่างเลือดที่จะนำมาทดสอบกระบวนการห้ามเลือดต้องเป็นตัวอย่างที่ได้จากการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำของมนุษย์ที่เป็นบุคคลที่ไม่มีประวัติป่วยด้วยโรคเลือด และได้รับยาที่ต้านการแข็งตัวของเลือดจำพวก Warfarin, ยากลุ่มเอ็นเซด (non-steroidal anti-inflammatory; NSAIDs) เช่น ยาแอสไพริน ยาไอบูโพรเฟน (ibuprofen) เป็นต้น จำนวนตัวอย่างที่ใช้ คือ 10 คน

5.4.3.1 Prothrombin time (PT) test เพื่อวัด extrinsic pathway ของกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป

5.4.3.2 Activated partial thromboplastin time (APTT) test เพื่อวัด intrinsic pathway ของกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป

5.4.3.3 Fibrin clot hydrolyzing activity ใช้วิธีตาม Rajesh และคณะ (2006) โดยการใช้ fibrinogen ผสมกับ 0.5 M $CaCl_2$ และ thrombin (0.25 NIH U) หลังจากนั้นนำก้อน fibrin ที่ได้มา incubated กับ latex และ purified latex เป็นเวลา 150 นาที นำส่วนผสมที่ได้ไปแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis เพื่อดู fibrinopeptides patterns

6. แผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

<u>6 เดือนที่หนึ่ง</u>

1. เตรียมน้ำยางโดยการกรีดยางจากส่วนขั้วของผลขนุน

2. ทำการ purify โปรตีนจากน้ำยางขนุนด้วยเทคนิค chromatography และทดสอบ coagulant และ anticoagulant activities ด้วยวิธี PT และ APTT เพื่อหา fraction ที่มี activities ดังกล่าว ดูความ purity ของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE electrophoresis

6 เดือนที่สอง

1. ทำการ purify โปรตีนจากน้ำยางขนุนด้วยเทคนิค chromatography และทดสอบ coagulant และ anticoagulant activities ด้วยวิธี PT และ APTT เพื่อหา fraction ที่มี activities ดังกล่าว ดูความ purity ของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE electrophoresis

2. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของสารออกฤทธิ์จากน้ำยางที่ทำให้บริสุทธิ์ได้

3. ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีนที่ได้ คือ molecular weight ด้วยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometry, ค่า PI, การทนต่ออุณหภูมิในสิ่งแวดล้อม

4. เตรียมเขียนงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

6 เดือนที่สาม

1. ทำการ identify protein โดยใช้วิธี MALDI-TOF peptide mass fingerprint (in gel digestion)

2. ศึกษาโครงสร้าง secondary structure โดยใช้เทคนิค Circular dichroism spectroscopy

6 เดือนที่สี่

1. ศึกษาคุณสมบัติในการห้ามเลือดของโปรตีนด้วยวิธี whole blood clotting time, Prothrombin time (PT) test, Activated partial thromboplastin time (APTT) test และ fibrin clot hydrolyzing activity และศึกษา

คุณสมบัติการเป็น protease enzyme โดยการวิเคราะห์ด้วย caseinolytic และ gelatinolytic activity assay และศึกษาคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor

2. เขียนสรุปรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

3. เตรียมเขียนงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

บทที่ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาของการทำวิจัย

น้ำยาง (Plant latex) สามารถพบได้ในพืชหลายวงศ์ (family) เช่น Euphorbiaceae, Asclepiadaceae, Moraceae และ Apocyanaceae โดยทั่วไปแล้วน้ำยางมักประกอบไปด้วย hydrolytic enzyme หลายชนิด รวมทั้ง wax, resin และ lipid like substances ซึ่งบทบาทของน้ำยางต่อสรีระวิทยาของพืชยังไม่ทราบแน่ชัดนัก เคยมีรายงานว่า hydrolytic enzymes จากน้ำยางของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งจำพวก proteases ช่วยป้องกันพืชจากการติดเชื้อโรคต่างๆ และ เมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่รุนแรงหรือเป็นอันตราย (harsh conditions) นอกจากนี้ น้ำยางยังสามารถมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสามารถใช้เป็นยาพื้นบ้าน (folk medicine) ได้ น้ำยางจากพืชหลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการห้ามเลือด (haemostasis) การรักษาบาดแผล (wound healing) และลดอาการปวดบวมอักเสบ (pain and inflammation)

สำหรับการแพทย์แผนไทยได้มีการใช้น้ำยางของต้นไม้มาใช้ในการรักษาแผล เช่น น้ำยางจากต้นขนุน(ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Artocarpus heterophyllus*) และจากการวิจัยเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า crude latex ของขนุนมีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ (anticoagulant activity) เมื่อทดสอบกับเลือดของมนุษย์ด้วยวิธี whole blood clotting time ซึ่งคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ anticoagulation ของกระบวนการแข็งตัวของเลือดนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการหายของบาดแผล (wound healing) ซึ่งทั่วไปจะเกี่ยวกับทั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด (coagulation) และ การละลายลิ่มเลือด (fibrynolysis) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ในน้ำยางและแยกเอาโปรตีนที่มีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ blood coagulation ออกมาเพื่อศึกษาคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับ procoagulation และ blood clot hydrolysis โดยงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ของการใช้ประโยชน์จากน้ำยางของต้นขนุนในด้านการมีคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับระบบการแข็งตัวของเลือด เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัตินี้มาก่อน จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับน้ำยางของ

ต้นขนุนจะเป็นในแง่ภาวะภูมิแพ้ที่สามารถเกิดขึ้นได้จากน้ำยางของต้นขนุน และเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำยางขนุนกับต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และคุณสมบัติของโปรตีนบางโปรตีนในน้ำยางที่มีคุณสมบัติ serine-centered protease แต่ไม่ได้รายงานเกี่ยวกับประโยชน์ที่จะสามารถนำองค์ประกอบของน้ำยางจากต้นขนุนมาใช้ได้

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงสามารถช่วยให้เข้าใจบทบาทของน้ำยางของขนุนในการรักษาแผล รวมทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและใช้ในการวิจัยต่อไปในอนาคตได้ เช่น การวิจัยเกี่ยวกับการรักษาแผลเรื้อรัง หรือรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด เช่น thrombosis เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อแยกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ จาก crude latex ของต้นขนุน และทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

2. เพื่อบ่งชี้หรือกำหนดชนิดของโปรตีนดังกล่าวรวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรตีน และโครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน (protein secondary structure)

3. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนดังกล่าวในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดและการละลายลิ่มเลือด (blood clot hydrolysis)

บทที่ 2

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ขนุน (สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข, 2541)

ชื่ออื่นๆ : มะหนุน (ภาคเหนือ, ภาคใต้), ขะนู (ชอง-จันทบุรี), นากอ (มลายู-ปัตตานี), ขะเนอ (เขมร), เนน (ชาวบนนครราชสีมา), นะยวยซะ (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี), ซีคึย, ปะหนอย (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), ล้าง (เงี้ยว-ภาคเหนือ) ปอหล่อปิด (จีน), หมักหมี้ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ)

ชื่อสามัญ : Jack Fruit Tree

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Artocarpus Heterophyllus*

วงศ์ : Moraceae

ลักษณะทั่วไป: ต้น : เป็นพรรณไม้ยืนต้น ลำต้นมีความสูงประมาณ 8-15 เมตร มียางขาวทั้งต้น

ใบ : จะออกสลับกัน และมีลักษณะกลมรียาวประมาณ 7-15 ซม. ตรงปลายใบของมันจะแหลมและสั้น ฐานใบจะเรียว ใบอ่อนบางครั้งจะมีรอยเว้าเข้าลึกๆ 2 รอย แบ่งใบออกเป็น 3 ส่วน หลังใบจะเรียบเป็นมัน เนื้อใบเหนียวคล้ายหนัง ก้านใบยาวประมาณ 1-2.5 ซม. ใบนั้นจะหลุดร่วงง่าย

ดอก : จะออกเป็นช่อ และช่อดอกตัวเมียจะอยู่บนต้นเดียวกัน ส่วนช่อดอกตัวผู้จะออกที่ปลายกิ่งหรือง่ามใบ เป็นแท่งยาวประมาณ 2.5 ซม. และมีกาบหุ้มช่อดอกอยู่ 2 กลีบ ดอกย่อยนั้นจะมีเกสรตัวผู้ 1 อัน ช่อดอกตัวเมียเป็นแท่งกลมยาวออกจากลำต้นหรือกิ่งก้านขนาดใหญ่

เมล็ด (ผล) : ผลจะเป็นผลรวม มีลักษณะกลมยาวประมาณ 25-60 ซม. ขนาดใหญ่ๆ และอาจหนักถึง 20 กก. ส่วนเนื้อหุ้มเมล็ดจะมีสีเหลือง ถ้าสุกจะมีกลิ่นหอม

เปลือกนอก : จะเป็นตุ่มหนามเล็กๆ รูปหกเหลี่ยม

ส่วนที่ใช้ : เมล็ด เนื้อหุ้มเมล็ด ใบ ยาง แกนและราก ใช้เป็นยา

สรรพคุณ :

เมล็ด ให้ใช้ประมาณ 60-240 กรัม ต้มสุกกิน จะมีรสชุ่มช่วยขับน้ำนมในสตรีหลังคลอด มีน้ำนมน้อยหรือไม่มีน้ำนม ช่วยบำรุงร่างกาย

เนื้อหุ้มเมล็ด ให้ใช้สด ผสมกับน้ำหวานกินบำรุงกำลัง หรือจะกินเป็นขนมก็ได้

ใบ ใช้สด นำมาตำให้ละเอียด อุ่นแล้วพอกแผล ใบแห้งให้บดเป็นผงโรย หรือใช้ผสมทาตรงที่เป็นแผล ใช้สำหรับภายนอก รักษาแผลมีหนองเรื้อรัง

ยาง จะมีรสจืด ฝาดเล็กน้อย ให้ใช้ยางสด ทาบริเวณที่บวมอักเสบ แผลมีหนองเรื้อรัง ต่อมน้ำเหลืองอักเสบเกิดจากแผลมีหนองที่ผิวหนัง

แกนและราก ใช้แห้งประมาณ 30-60 กรัม นำมาต้มน้ำรับประทาน จะมีรสหวานชุ่ม รักษากามโรค และบำรุงเลือด

ตำรับยา : ให้ใช้เมล็ด 60-240 กรัม หรือจะใช้เมล็ดนำมาต้มให้สุกกิน หรือจะนำมาผสมกับน้ำหวานและกะทิกิน สำหรับสตรีหลังคลอด ที่มีน้ำนมน้อยหรือไม่มีน้ำนมใช้กินได้

ปัจจุบันได้มีงานมากมายเกี่ยวกับประโยชน์และคุณสมบัติของสารประกอบที่อยู่ในส่วนต่าง ๆ ของต้นขนุน เช่น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของต้นขนุน (Khan และคณะ, 2023) สารสกัดจำพวก lectin จากต้นขนุนสามารถยับยั้งการติดเชื้อ herpesvirus ได้ (Wetprasit และคณะ, 2000)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่กล่าวมาส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นขนุน แต่งานวิจัยทางคุณสมบัติของน้ำยางจากต้นขนุนยังมีน้อย พบว่ามีเพียงการศึกษาองค์ประกอบของน้ำยางที่ได้จากต้นขนุนเปรียบเทียบกับน้ำยางที่ได้จากยางธรรมชาติ (natural rubber) ของต้น *Hevea brasiliensis* (Mekkriengkrai และคณะ, 2004)

ในปี 1990 Prasad และ Virupaksha ได้ทำการแยกโปรตีน artocarpin จากน้ำยางของต้นขนุนและพบว่ามีคุณสมบัติเป็น serine-centred protease (Prasad และ Virupaksha, 1990) นอกจากนี้ยังมีผู้วิจัยพบว่าน้ำยางจากต้นขนุนสามารถทำให้เกิดอาการแพ้แบบ anaphylaxis ได้ (Chantaphakul และคณะ, 2002)

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับน้ำยางของขนุนข้างต้น พบว่ายังไม่มีรายงานหรือการทำวิจัยที่เกี่ยวกับประโยชน์ของน้ำยางขนุนในทางการแพทย์ และการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนในยางขนุนที่เกี่ยวข้องกับ coagulation และ anticoagulation acitivity ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้

2.2 น้ำยางจากต้นไม้ (plant latex)

น้ำยางจากต้นไม้มีองค์ประกอบเป็นสารผสมระหว่างสารประกอบจำพวกอินทรีย์และอนินทรีย์ (Silva และคณะ, 2003), wax และ hydrolytic enzymes (Yugami และคณะ, 1998) สำหรับคุณสมบัติในการเป็น hydrolytic enzymes ของน้ำยางต้นไม้พบว่ามีบทบาทสำคัญในทางสรีระวิทยาของพืช, host pathogen interaction (Kotaro และคณะ, 2004) และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Richter และคณะ, 2002) งานวิจัยที่สนับสนุนคุณสมบัติของน้ำยางจากต้นไม้มีดังนี้คือ

ในปี 2003 Osoniyi และ Onajobi ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติ coagulant และ anticoagulant activities ในน้ำยางของ *Jatropha curcas* พบว่าต้น *Jatropha curcas* มีน้ำยางที่สามารถทำให้เวลาในการแข็งตัวของเลือดมนุษย์สั้นลง (reduced clotting time) และเมื่อเมื่อทำการเจือจางน้ำยางพบว่าต้องใช้เวลานานขึ้นในการทำให้เลือดแข็งตัว (prolonged clotting time) แสดงว่าในน้ำยางมีองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับทั้ง procoagulant และ anticoagulant activities

น้ำยางจากต้น *Calotropis gigantea* พบว่ามีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา โดยพบว่า crude extract สามารถทำให้เกิด hemorrhage บนผิวหนังของสัตว์ทดลอง และช่วยให้เลือดแข็งตัวได้เร็วขึ้นโดยการลด

เวลาcoagulation time ของ citrated plasma นอกจากนี้ crude extract proteins ของน้ำยางจากต้นไม้นี้ยังสามารถ hydrolyze casein, human fibrinogen และ crude fibrin clot ได้ จากงานวิจัยข้างต้นแสดงว่า น้ำยางของต้น *Calotropis gigantea* มีคุณสมบัติทั้ง procoagulation และ blood clot hydrolysis ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล (Rajesh และคณะ, 2005)

น้ำยางจากต้น *Synadenium gratii* พบว่าประกอบด้วย glycoprotein ทำหน้าที่เป็น serine protease ที่มีขนาด 34.4 kDa secondary structure ของโปรตีนนี้ประกอบด้วย α-helix 7%, β-pleated sheets 48% และ random coils 46% คุณสมบัติของโปรตีนนี้คือเป็น fibriongen degrading protease สามารถ hydrolyze ทุก subuints ของ partially cross-linked fibrin clot (α-chains, β-chains และ γ-γ dimer) (Rajesh และคณะ, 2006)

Freitas และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษา enzymatic activites และ protein profile จากน้ำยางของต้น *Calotropis procera* พบว่าโปรตีนในน้ำยางประกอบด้วย superoxide dismutase ซึ่งเป็น anti-oxidant, cysteine proteinases และ chitinase enzymes ซึ่งการพบ enzymes เหล่านี้ในน้ำยางจะเป็นข้อมูลช่วยยืนยันว่าน้ำยางมีองค์ประกอบที่ช่วยให้พืชป้องกันตัวเองจากการติดเชื้อ phytopathogens และป้องกันแมลงได้

จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าน้ำยางจากต้นไม้มีคุณสมบัติมากมายรวมทั้งยังสามารถออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ และจากงานวิจัยเบื้องต้นที่คณะวิจัยพบว่า crude extract จากลำต้นและใบของขนุนมีคุณสมบัติ anticoagulant activity โดยทำให้ whole blood clotting time ยาวนานขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา โดยสามารถใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังซึ่งมักจะมีเลือดเข้ามาหล่อเลี้ยงได้น้อย คุณสมบัติ anticoagulant activity ของยางขนุนจึงอาจสามารถช่วยให้เลือดไหลเวียนมาหล่อเลี้ยงแผลได้ดีขึ้นทำให้แผลเรื้อรังหายได้เร็วขึ้น (Lijnen, 2002) และคุณสมบัตินี้อาจพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในการรักษาโรคในอนาคตได้ เช่น myocardial infarction (Rajesh และคณะ, 2006) เป็นต้น

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง (Experimental Procedures and Results)

1.น้ำยาและสารเคมี

1.1 BCA assay kit (Pierce, Rockford, USA)

1.2 IEF pH gradient strip 7.3 cm. pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden)

1.3 GLycoprotein detection kit (Sigma, USA)

1.4 Trypsin sequencing-grade (Promega, USA)

1.5 Thromboplastin-calcium reagent (PT reagent) (HemoStat THROMBOPLASTIN-SI, Human Gesellschaft Für Biochemica and Diagnostica mbH, Germany)

1.6 Partial tissue thromboplastin activator (aPTT-EL reagent) (HemoStat THROMBOPLASTIN-SI, Human Gesellschaft Für Biochemica and Diagnostica mbH, Germany)

1.7 Serine protease from Bacillus sp. (Sigma, USA)

1.8 QuantiCleaveTM Protease Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)

1.9 น้ำยาและสารเคมีอื่น ๆ ใช้ของบริษัทต่าง ๆ คือ Sigma (USA), Fluka (USA), GE Healthcare (Sweden), Carlo Erba (Italy), Merck (Germany)

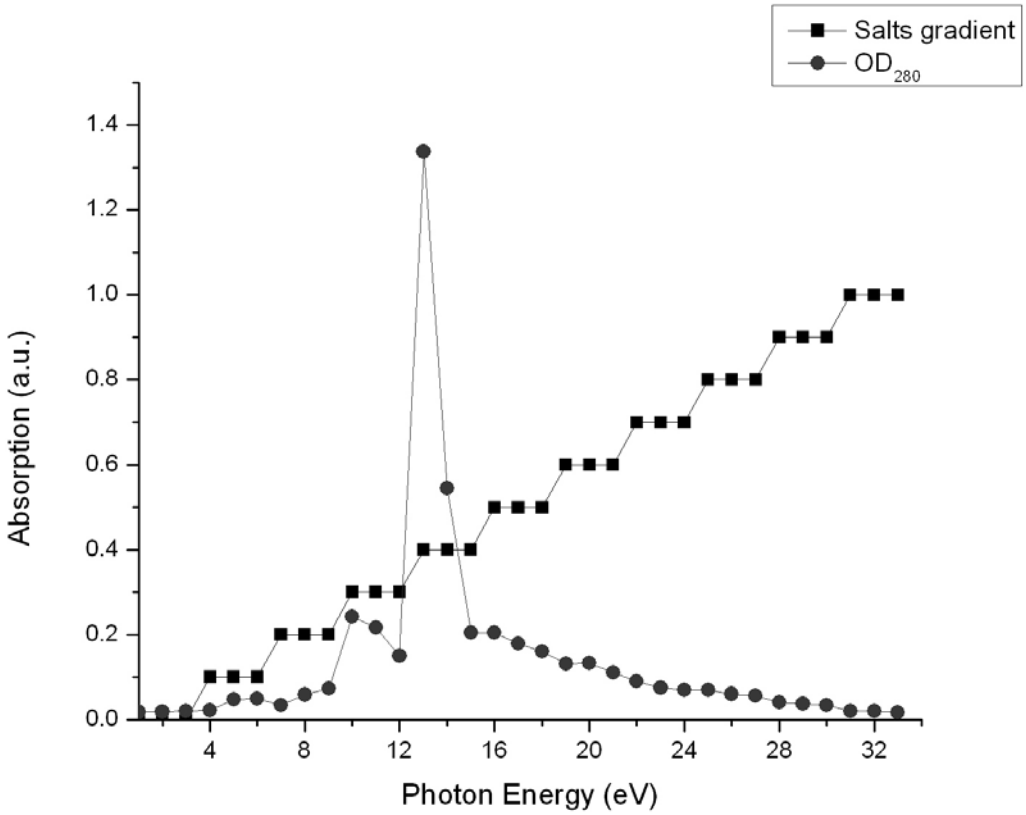
2. ตัวอย่างพืชและการเก็บน้ำยาง

ต้นขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) ที่ใช้เก็บน้ำยางตลอดโครงการวิจัยใช้ขนุนต้นเดียวกันจำนวน 1 ต้น เป็นต้นขนุนที่ปลูกใน เขตพื้นที่ ต.บ้านศรีไค อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี

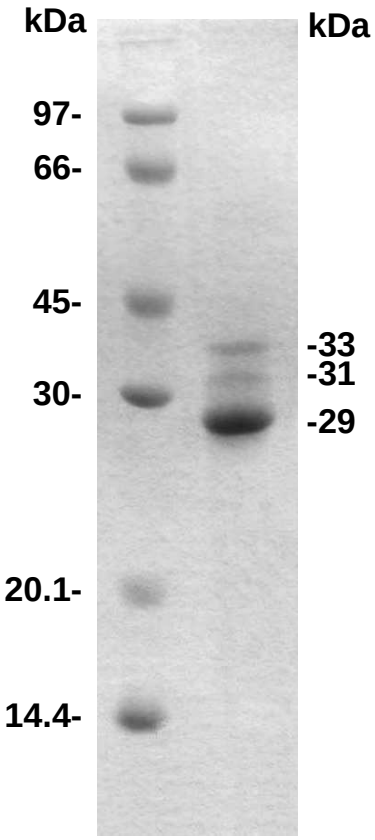
เก็บน้ำยางโดยการกรีดที่ขั้วของลูกขนุน และใช้ beaker แก้วรองน้ำยาง หากยังไม่ใช้จะแช่น้ำยางไว้ในตู้เย็นที่ -20 °C

2.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Protein purification)

น้ำยางที่เก็บได้จากส่วนก้านของลูกขนุน นำมาปั่นแยกด้วยเครื่อง high speed centrifuge นำส่วนที่ได้หลังจากปั่น มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ปั่นแยกด้วยเครื่อง high speed centrifuge อีกครั้ง ส่วนน้ำที่ได้มา dialysis ด้วย 50 mM sodium acetate buffer pH 4.5 แล้วนำไปปั่นด้วย high speed centrifuge จะได้ส่วนตะกอนแยกออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนตะกอนไปละลายด้วย 25 mM Tris-HCl pH 8.8 นำไป purify ด้วย anion exchange chromatography (Q sepharose) โดยใช้ step gradient salt elution หรือ NaCl concentration 0-1 M ใน buffer 25 mM Tris-HCl pH 8.8 ได้ chromatogram ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยโปรตีนที่ต้องการจะออกมาสูงสุดในช่วง fractions ความเข้มข้นของ NaCl อยู่ในช่วง 0.3-0.4 M และโปรตีนที่ได้เมื่อแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli และคณะ, 1970) พบว่า fraction ของโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยแถบโปรตีน (protein bands) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 29, 31 และ 33 kDa โดยมี protein band หลักคือ MW 29 kDa (ดังแสดงในรูปที่ 2)



รูปที่ 1 แสดง chromatogram เมื่อทำการ purify โปรตีนของน้ำยางขนุนด้วย Q sepharose column chromatography ใช้ flow rate 1 ml/min



รูปที่ 2 แสดง protein bands ที่แยกด้วยเทคนิค 12.5% gel SDS-PAGE ของโปรตีนจากน้ำยางขนุนภายหลัง purify ด้วย Q sepharose anion exchange chromatography

โปรตีนที่ได้เมื่อผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มี % yield เท่ากับ 1.1 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่1 แสดงขั้นตอนการ purify โปรตีนจากน้ำยางของขนุนและ % yield ที่ได้

Purification step	Protein concentration (mg)	Yield (%)
1. Total crude latex protein	1,662.2	100
2. Supernatant after boiling	807.8	4.6
3. Dialysis with 50 mM Sodium acetate pH 4.5	85.7	5.2
4. Q sepharose anion exchange chromatography	18.6	1.1

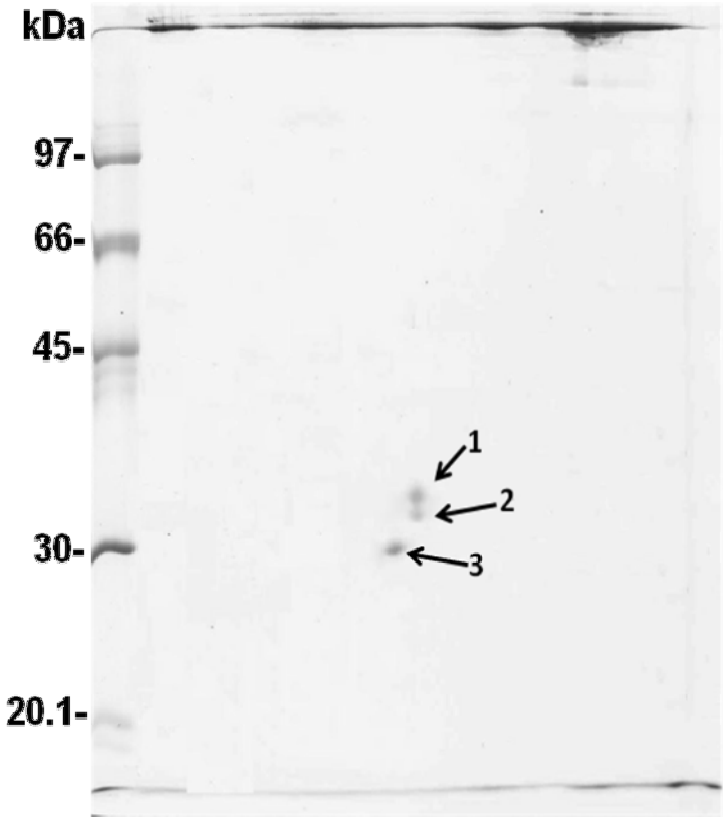
2.3 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยน้ำยา BCA assay kit ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลาย BCA working reagent 2 ml นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 30 นาที หาความเข้มข้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.4 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 μg นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามประจุใน first dimension โดยใช้ pH gradient strip pH 3-10 ยาว 7 cm และทำการแยกโปรตีนตามขนาด melecular weight อีกครั้งใน second dimension ด้วย 12.5% gel SDS-PAGE แล้วย้อมโปรตีนด้วย colloidal Coomassie

brilliant blue G-250 พบว่าโปรตีนที่ได้มีจำนวน 3 spots ดังแสดงในรูปที่ 3 ขนาด molecular weight และ PI ของแต่ละ spot แสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 3 ผล 2D gel electrophoresis ของโปรตีนจากยางขนุนที่ทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 2 แสดงจำนวน spot ค่า PI และ molecular weight ของโปรตีนของยางขนุนที่ทำให้บริสุทธิ์

Spot no.	pI	MW
1	6.63	33,000
2	6.63	31,000
3	6.93	29,000

2.5 การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจาก spot ที่ได้จาก 2D gel electrophoresis

Spot ของโปรตีนที่ได้จาก 2D gel electrophoresis ในข้อ 2.4 จะถูกตัดออกจากเจล และนำไปย่อยด้วย enzyme trypsin วิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF MS ณ หน่วยบริการชีวภาพ (BioService Unit : BSU) ประเทศไทย ซึ่งได้ผลดังนี้

Spot ที่ 1 ให้ผล peptide mass fingerprinting แสดงในรูปที่ 4 และ identify ว่ามีความสอดคล้องกับชนิดของโปรตีนที่มีขนาด 26.779 kDa chloroplastic small heat-shock protein ของ *Petunia hybrida*

Spot ที่ 2 ให้ผล peptide mass fingerprinting แสดงในรูปที่ 5 และ identify ว่ามีความสอดคล้องกับชนิดของโปรตีนที่มีขนาด 60.429 kDa ของ mitochondrial chaperonin CPN60-like 2 จาก *Arabidopsis thaliana*

Spot ที่ 3 ให้ผล peptide mass fingerprinting แสดงในรูปที่ 6 และ identify ว่ามีความสอดคล้องกับชนิดของโปรตีนที่มีขนาด 25.328 kDa ของ chloroplastic small heat-shock protein จาก *Arabidopsis thaliana*

Fig. 4A

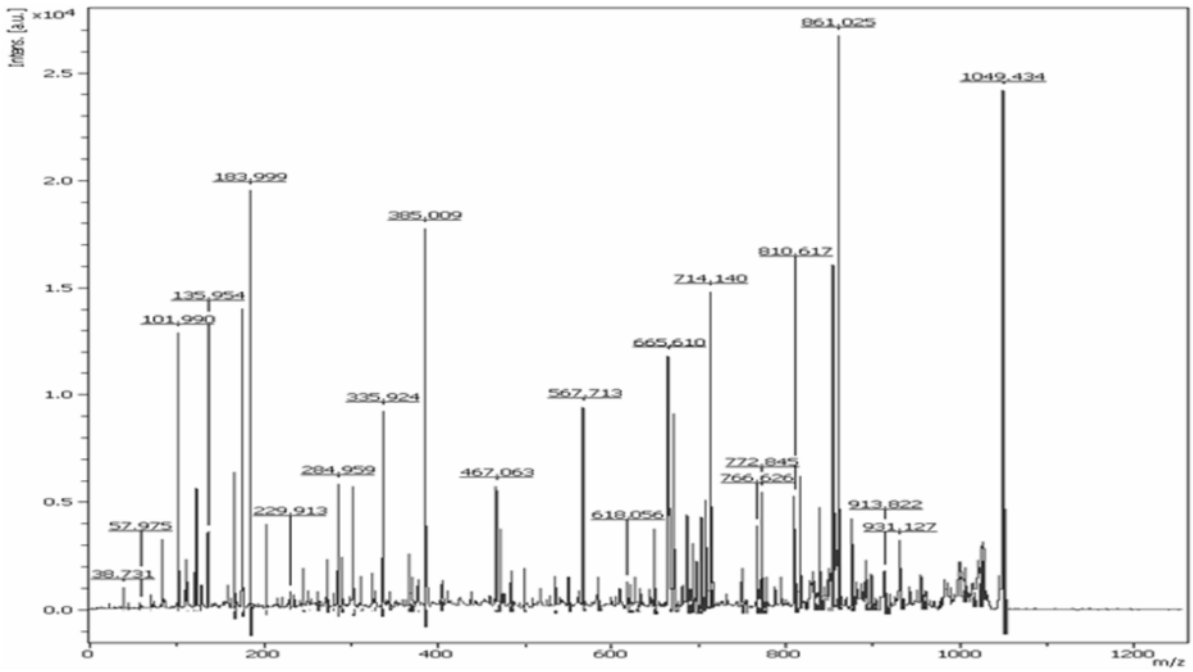


Fig. 4B

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 5	618.0560	617.0487	617.2843	-0.2355	0	-.MNPEK.F
2 - 9	1000.9000	999.8927	999.5138	0.3790	1	M.NPEKFTHK.T
65 - 72	913.8220	912.8147	912.5756	0.2391	1	R.VINQALKK.L
92 - 94	387.9440	386.9367	386.2641	0.6726	0	K.VIR.R
95 - 101	772.8450	771.8377	771.4351	0.4026	1	R.RAQAAQK.S
95 - 103	1015.1610	1014.1537	1014.5682	-0.4145	2	R.RAQAAQKSR.G
139 - 145	861.0250	860.0177	859.4763	0.5414	1	K.SEVEKLR.G
185 - 190	816.8450	815.8377	816.4090	-0.5712	1	R.DEEIRR.V
254 - 259	766.6260	765.6187	765.3293	0.2894	0	R.GEFEER.L
260 - 265	687.4350	686.4277	686.4690	-0.0413	1	R.LKSVLK.E
266 - 273	876.2050	875.1977	875.3872	-0.1895	0	K.EVEDAEGK.V

รูปที่ 4 MALDI-TOF mass spectrometry analysis ของ spot ที่ 1 (A) peptide mass fingerprint ของ monomer ของ HSHMG (33 kDa). (B) Peptide mass fingerprint ที่วิเคราะห์ด้วย MASCOT search engine พบว่ามี peptide mass จำนวน 11 จากทั้งหมด 77 mass ที่พบว่าตรงกันกับโปรตีน chloroplastic small heat-shock protein จาก *Petunia hybrida* โดยครอบคลุมโปรตีนทั้งหมดประมาณ 24%

Fig. 5A

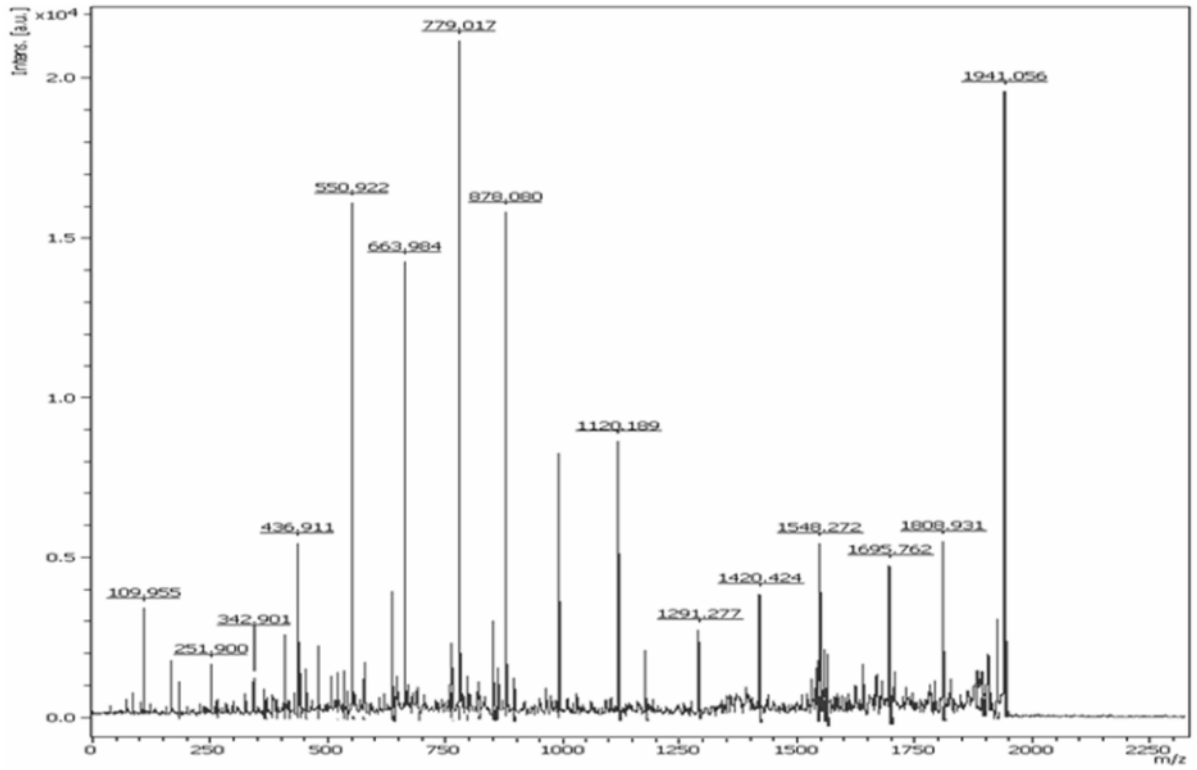


Fig. 5B

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
303 - 307	533.9300	532.9227	532.3043	0.6184	0	K.VCAIK.A
336 - 341	646.9910	645.9837	645.3697	0.6140	0	R.GLSLEK.I
353 - 357	575.6400	574.6327	574.3439	0.2889	0	K.VTVTR.D
353 - 370	1924.1690	1923.1617	1924.0378	-0.8761	2	K.VTVTRDDTIILHGGGDKK.L
386 - 398	1557.5620	1556.5547	1555.7114	0.8433	1	K.STSTFDQEKTQER.L
395 - 401	861.0780	860.0707	860.4716	-0.4008	1	K.TQERLSK.L
402 - 410	878.0800	877.0727	876.5069	0.5658	0	K.LSGGVAVFK.V
411 - 422	1177.1810	1176.1737	1175.5418	0.6319	0	K.VGGASESEVGER.K
423 - 425	418.9340	417.9267	417.2336	0.6932	1	R.KDR.V
516 - 529	1548.2720	1547.2647	1546.8429	0.4218	1	K.YVDMVKAGIIDPVK.V

รูปที่ 5 MALDI-TOF mass spectrometry analysis ของ spot ที่ 2 (A) peptide mass fingerprint ของ monomer ของ HSHMG (31 kDa). (B) Peptide mass fingerprint ที่วิเคราะห์ด้วย MASCOT search engine พบว่ามี peptide mass จำนวน 10 จากทั้งหมด 67 mass ที่พบว่าตรงกันกับโปรตีนขนาด60.429 kDa ของ mitochondrial chaperonin CPN60-like 2 จาก *Arabidopsis thaliana* โดยครอบคลุมโปรตีนทั้งหมดประมาณ 14%

Fig. 6A

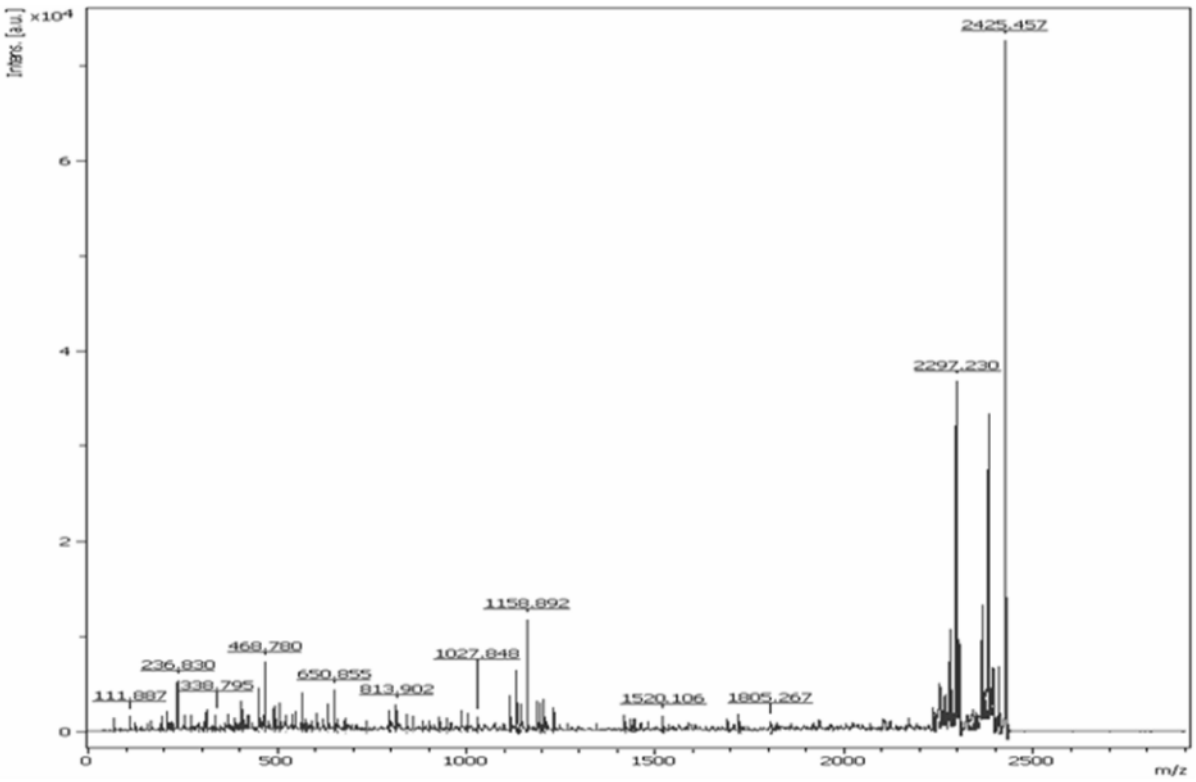


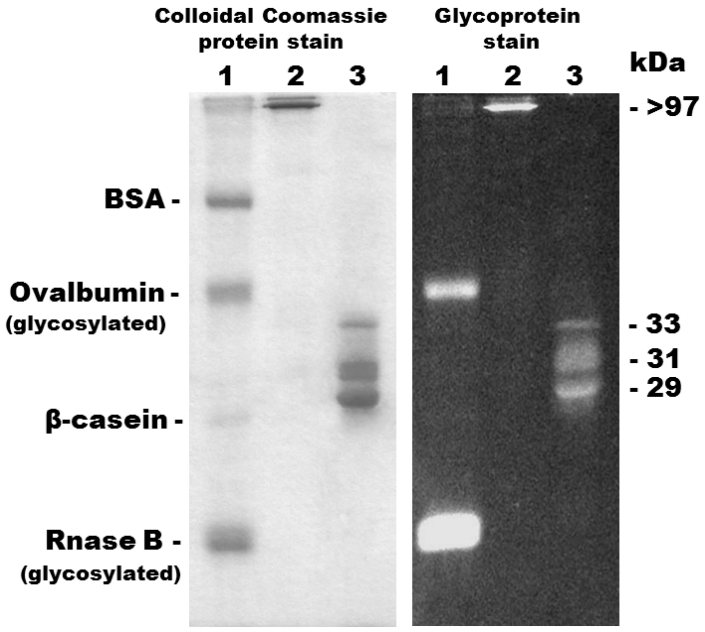
Fig. 6B

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 25	2409.6420	2408.6347	2409.1920	-0.5572	0	-.MASTLSFAASALCSPLAPSPSVSSK.S
2 - 25	2279.3400	2278.3327	2278.1515	0.1812	0	M.ASTLSFAASALCSPLAPSPSVSSK.S
26 - 36	1194.9900	1193.9827	1194.6033	-0.6206	0	K.SATPFSVSFPR.K
42 - 43	287.8020	286.7947	287.1957	-0.4010	0	R.IR.A
42 - 61	2340.6210	2339.6137	2339.1942	0.4196	2	R.IRAQDQRENSIDVVQQGQQK.G
94 - 96	406.7670	405.7597	406.1998	-0.4401	0	R.TMR.Q
97 - 115	2260.8300	2259.8227	2258.9792	0.8435	1	R.QMLDTMDRMFEDTMPVSGR.N
105 - 126	2381.0130	2380.0057	2381.1216	-1.1159	2	R.MFEDTMPVSGRNRGGSGVSEIR.A
116 - 126	1130.9320	1129.9247	1130.5792	-0.6545	1	R.NRGGSGVSEIR.A
140 - 141	305.7820	304.7747	305.1521	-0.3774	0	K.MR.F
150 - 153	489.7610	488.7537	489.2435	-0.4897	0	K.EDVK.I
165 - 168	461.7980	460.7907	460.2281	0.5626	0	K.GEQK.K
221 - 227	813.9020	812.8947	813.4596	-0.5649	0	K.VIDVQIQ.-

รูปที่ 6 MALDI-TOF mass spectrometry analysis ของ spot ที่ 3 (A) peptide mass fingerprint ของ monomer ของ HSHMG (29 kDa). (B) Peptide mass fingerprint ที่วิเคราะห์ด้วย MASCOT search engine พบว่ามี peptide mass จำนวน 10 จากทั้งหมด 67 mass ที่พบว่าตรงกันกับโปรตีนขนาด25.328 kDa chloroplastic small heat-shock protein จาก *Arabidopsis thaliana* โดยครอบคลุมโปรตีนทั้งหมดประมาณ 46%

2.6 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีนของโปรตีนที่แยกได้จากยางขนุน

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์เมื่อนำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนที่ผสมกับ sample buffer ที่ประกอบด้วย 2-mercaptoethanol แล้วให้ความร้อนที่ 95 ºC นาน 5 นาที และ ไม่ได้ให้ความร้อน พบว่าโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จะเกาะกันเป็น multimer ที่มีขนาด melecular weight มากกว่า 100 kDa เมื่อไม่ได้ให้ความร้อน และเมื่อให้ความร้อนจะได้โปรตีนแยกออกเป็น 3 bands หลักดังแสดงในผลการทดลองในรูปที่ 7 และเมื่อนำโปรตีนมาศึกษาคุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีนด้วย fluorescent glycoprotein detection kit (Sigma) พบว่าโปรตีนทั้ง 3 เป็น glycoprotein ที่เมื่อรวมกันแล้วจะมี molecular weight มากกว่า 97 kDa จึงเรียกโปรตีนนี้ว่า "heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG)" (แสดงในรูปที่ 7)



รูปที่ 7 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นไกลโคโปรตีนของโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากยางขนุน (HSHMG) lane 1 = standard glycosylated (BSAและ non-glycosylated protein, lane 2 = unheated HSHMG และ lane 3 = Heated HSHMG

2.7 การทดสอบคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับระบบการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ (Human blood coagulation activity)

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จากน้ำยางขนุนนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ต่อระบบการแข็งตัวของเลือดมนุษย์จำนวน 10 คน ด้วยวิธี Activated partial thromboplastin time (APTT) test (Brown, 1988) และ Prothrombin time (PT) test (Brown, 1988) พบว่า HSHMG มีคุณสมบัติยับยั้งปัจจัยภายในของระบบการแข็งตัวของเลือด (intrinsic factors) คือ VIII, IX, XI, XII and Prekallikrein (Fletcher factor) โดยทำให้เกิดการ clot ของ plasma ต้องใช้เวลานานขึ้น (prolong clotting time) เมื่อทดสอบด้วย Activated partial thromboplastin time (APTT) test โดยไม่ยับยั้งปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) และปัจจัยร่วม (common pathway factors) เมื่อทดสอบด้วย Prothrombin time (PT) test คือ V, VII, X, prothrombin and fibrinogen ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผล PT และ APTT เปรียบเทียบระหว่างโปรตีน HSHMG (latex) และกลุ่ม control

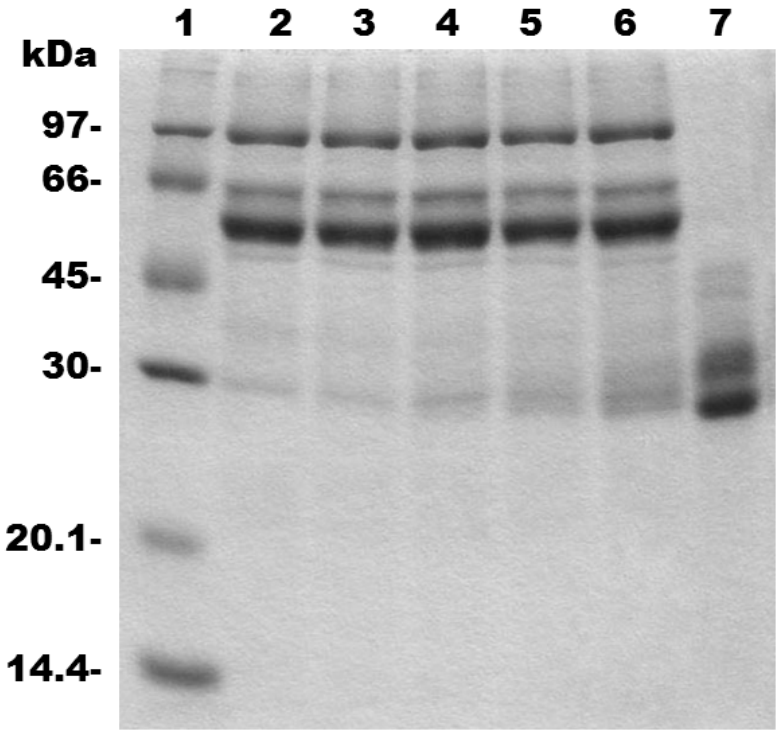
Latex (μg)	PT (s)	APTT (s)
Control (Tris-HCl, pH 8.8)	15.7 ± 2.8[a]	44.6 ± 4.8[a]
18.5	15.5 ± 2.5[b]	43.8 ± 4.3[b]
37	15.8 ± 2.3[b]	44.9 ± 5.2[b]
185	16.1 ± 2.5[b]	61.5 ± 7.8[c]
370	16.3 ± 2.5[b]	79.0 ± 10.1[c]

ค่าที่ได้แสดงในรูป mean ± S.D. (n = 10) เปรียบเทียบ human blood coagulation time ระหว่าง purified latex และ control โดยใช้สถิติ independent samples t-Test อักษร (b) แสดงถึงว่าเวลาที่ทำให้เกิด fibrin clot ของพลาสม่าเมื่อเติม HSHMG ไม่มีความแตกต่างจากที่ไม่เติม หรือ control (a) อย่างมีนัยยะสำคัญ ที่ $P > 0.05$. และอักษร (c) แสดงเวลาที่ทำให้เกิด fibrin clot ของพลาสมาเมื่อเติม HSHMG มีความแตกต่างจากที่ไม่เติม หรือ control อย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P < 0.05$

2.8 การทดสอบคุณสมบัติในการสลายก้อนไฟบริน (Fibrin clot hydrolyzing activity)

ทดสอบคุณสมบัติในการสลายไฟบรินของโปรตีน HSHMG โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rajesh และคณะ (2006) โดยการใช้ fibrinogen ผสมกับ 0.5 M CaCl2 และ thrombin (0.25 NIH U) หลังจากนั้นนำก้อน fibrin ที่ได้มา incubated กับ HSHMG ที่มีปริมาณต่าง ๆ คือ 0, 18.5, 92.5, 185, 370 μg เป็นเวลา 150 นาที นำส่วนผสมที่ได้ไปแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis เพื่อดู fibinopeptides patterns

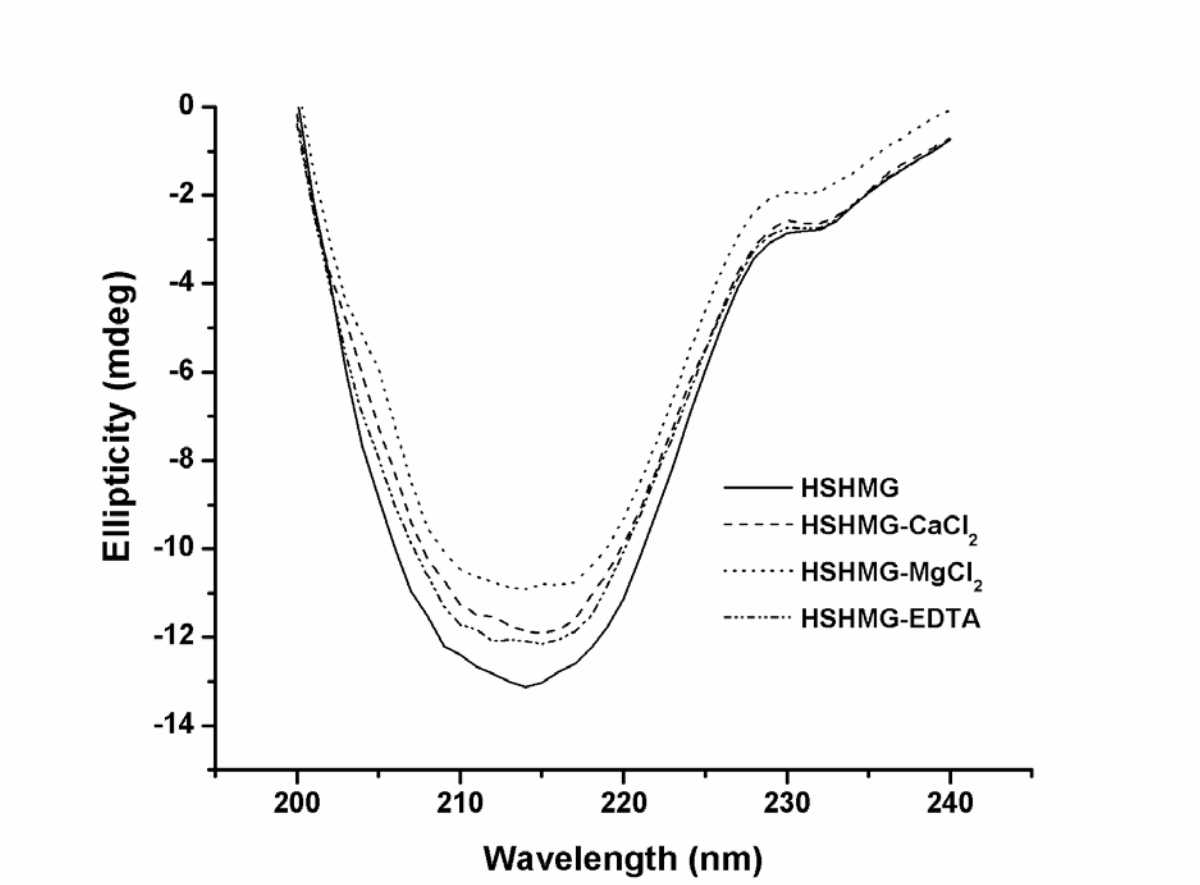
ผลการทดลองพบว่าโปรตีน HSHMG ไม่มีคุณสมบัติในการสลายก้อนไฟบรินดังแสดงในรูปที่ 8



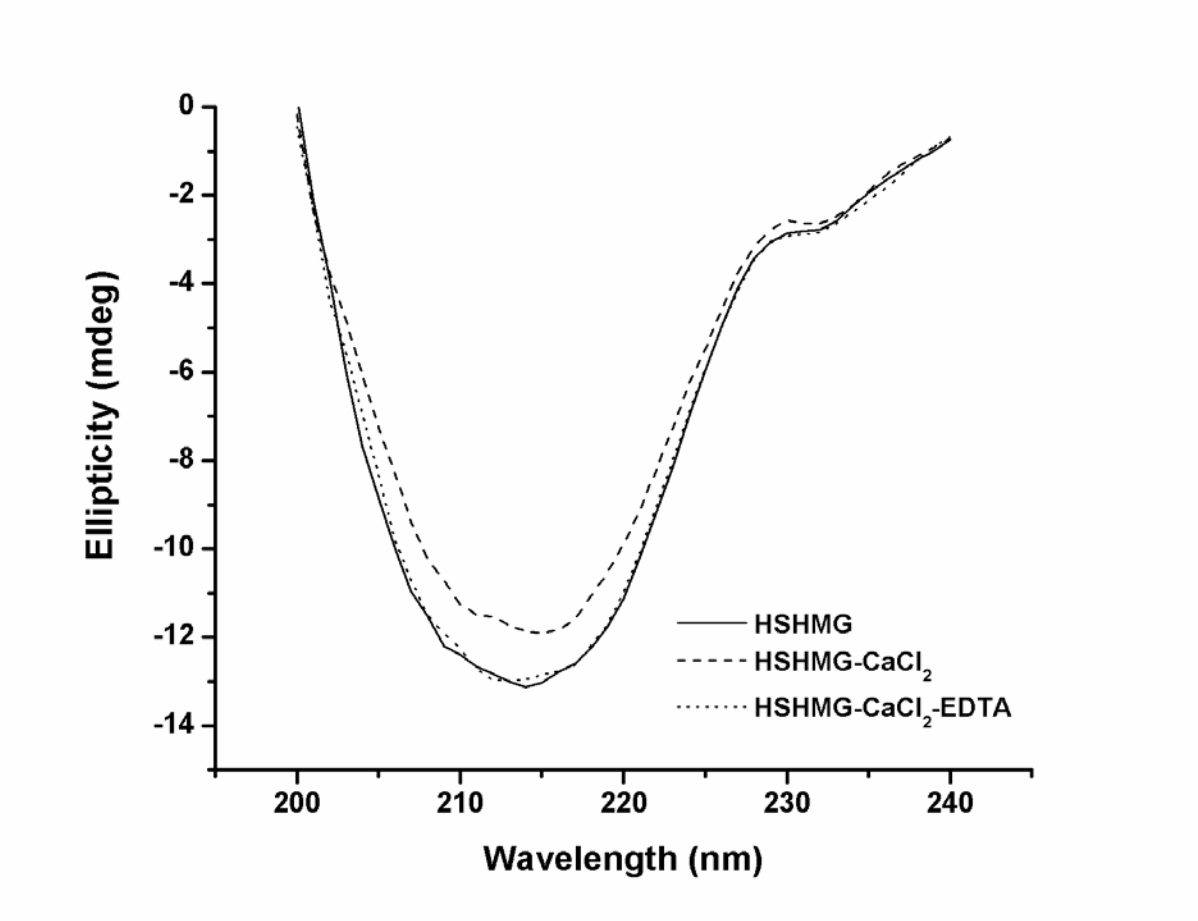
รูปที่ 8 การทดสอบคุณสมบัติในการสลายก้อนไฟบรินของ HSHMG เมื่อใช้ HSHMG ปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0 μg (lane2), 18.5 μg (lane 3), 92.5 μg (lane 4), 185 μg (lane 5), 370 μg (lane 6) โดย lane 1 = standard molecular weight protein markers และ lane 7 = heated HSHMG protein

2.9 ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) และผลของประจุของสารที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของ HSHMG ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy (CD spectroscopy)

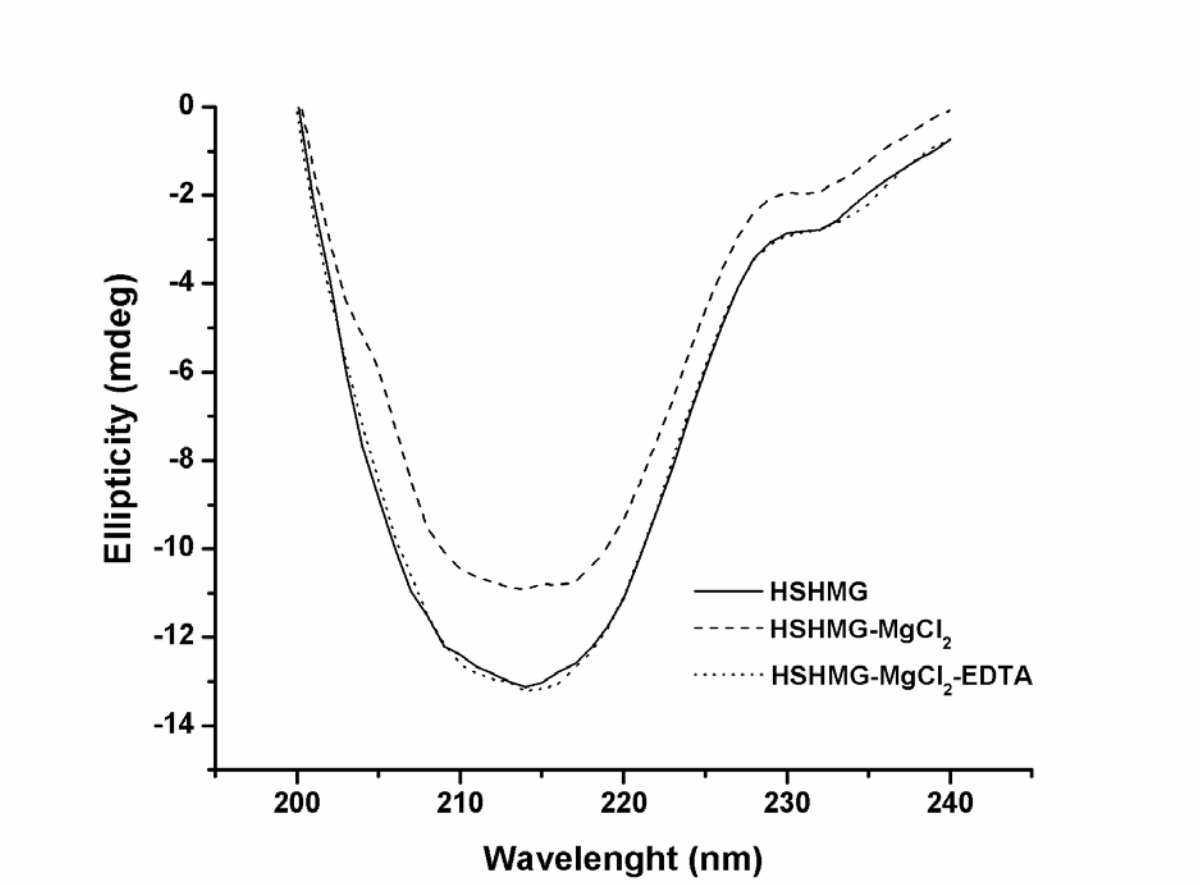
โครงสร้าง secondary structure ของ HSHMG ศึกษาด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan) โดยใช้โปรตีนความเข้มข้น 1 mg/ml ใช้ speed 20 nm/min, 2 nm bandwidth, 100 mdeg sensitivity, average response time of 2 s และ optical path length เท่ากับ 0.2 mm และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย K2D program (http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d.html) พบว่าโปรตีน HSHMG นี้ประกอบด้วย α-helix 23%, β-sheet 40% และ random coil 0.36% และพบว่าสารละลาย 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$ และ 4 mM EDTA (รูปที่ 9) สามารถทำให้ secondary structure ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงได้โดยดูจากการเปลี่ยนตำแหน่งของ CD spectra และพบว่าโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจาก $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ สามารถเปลี่ยนแปลงกลับคืนได้เมื่อเติม EDTA ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 ตามลำดับ



รูปที่ 9 CD spectra ของ HSHMG และเมื่ออยู่ในสารละลาย 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$ และ 4 mM EDTA



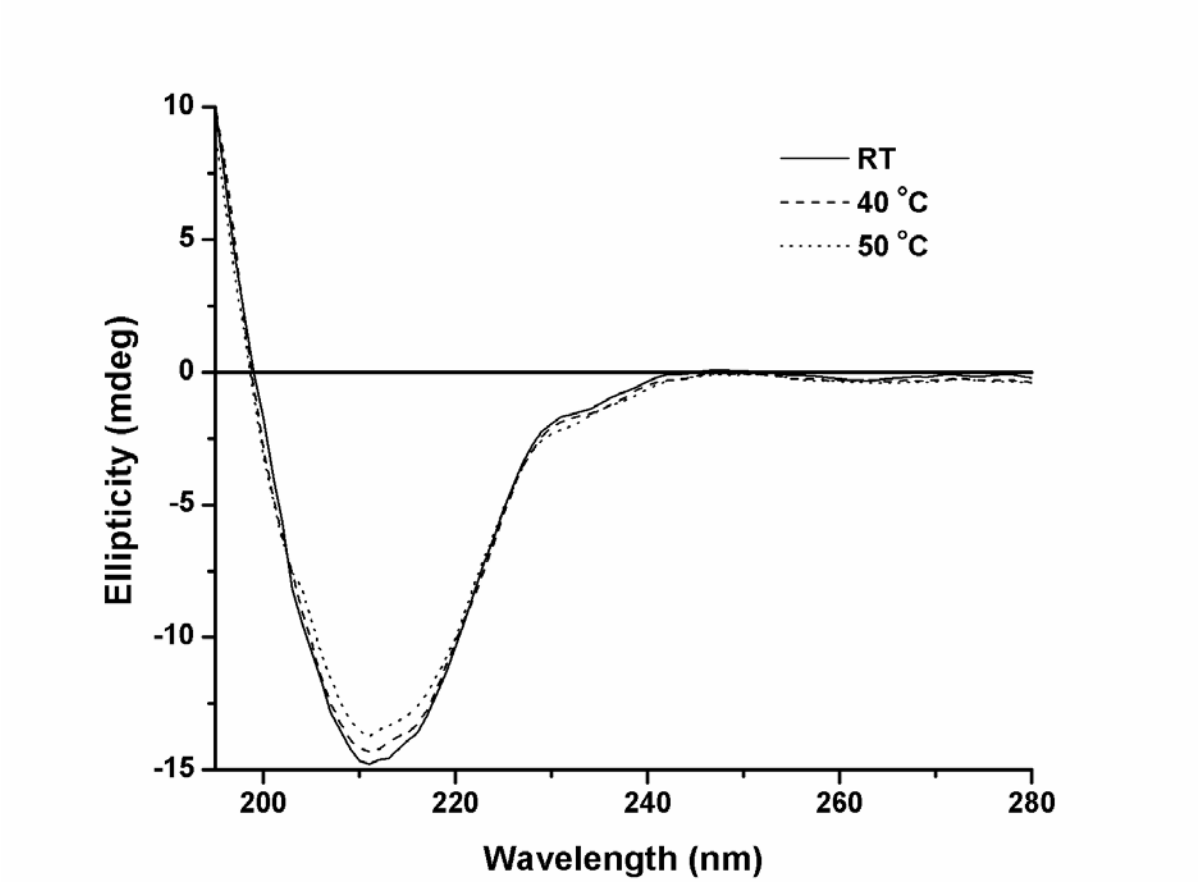
รูปที่ 10 CD spectra ของ HSHMG และเมื่ออยู่ในสารละลาย 2 mM $CaCl_2$ (HSHMG-$CaCl_2$) และโครงสร้างเปลี่ยนกลับคืนเหมือน HSHMG เมื่อเติม 4 mM EDTA (HSHMG-$CaCl_2$-EDTA)



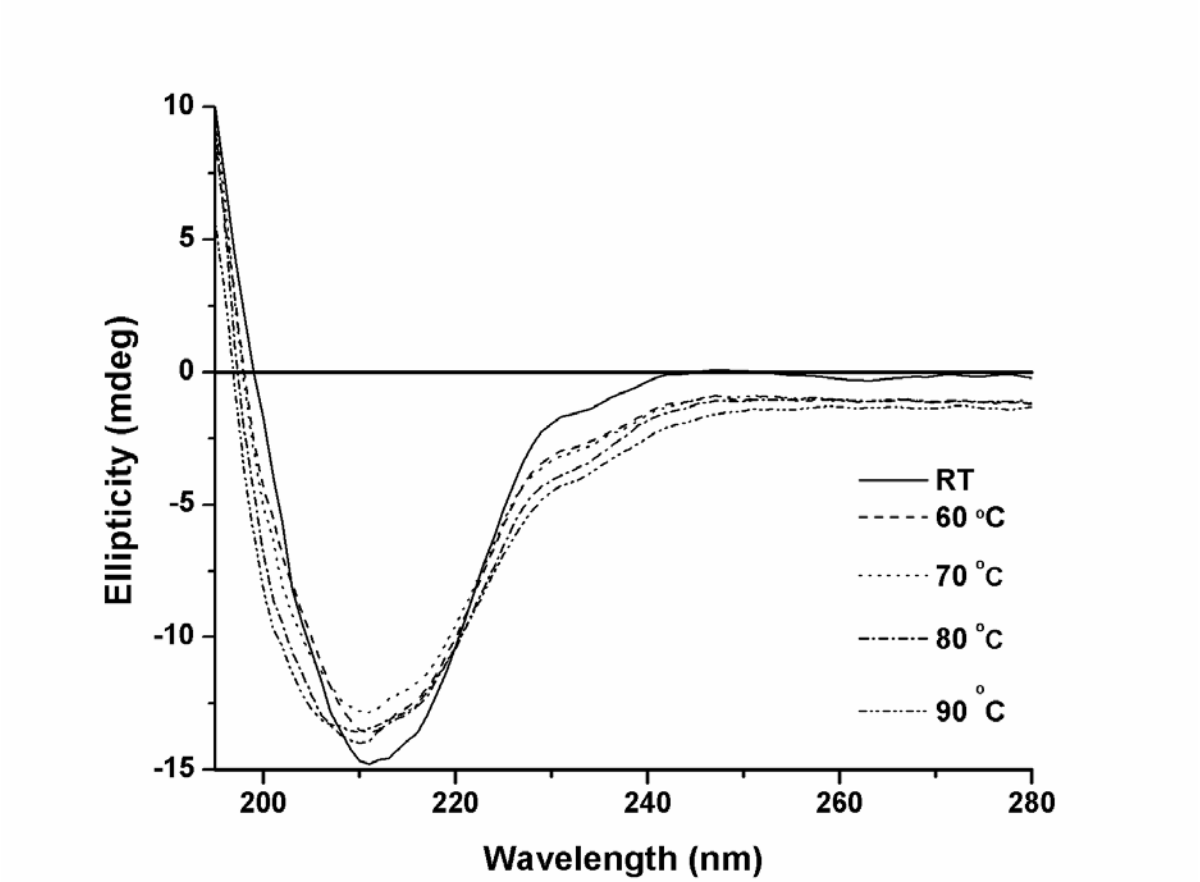
รูปที่ 11 CD spectra ของ HSHMG และเมื่ออยู่ในสารละลาย 2 mM $MgCl_2$ (HSHMG-$MgCl_2$) และโครงสร้างเปลี่ยนกลับคืนเหมือน HSHMG เมื่อเติม 4 mM EDTA (HSHMG-$MgCl_2$-EDTA)

2.10 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรตีนทนต่อความร้อน (heat stable protein) ของ HSHMG ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy

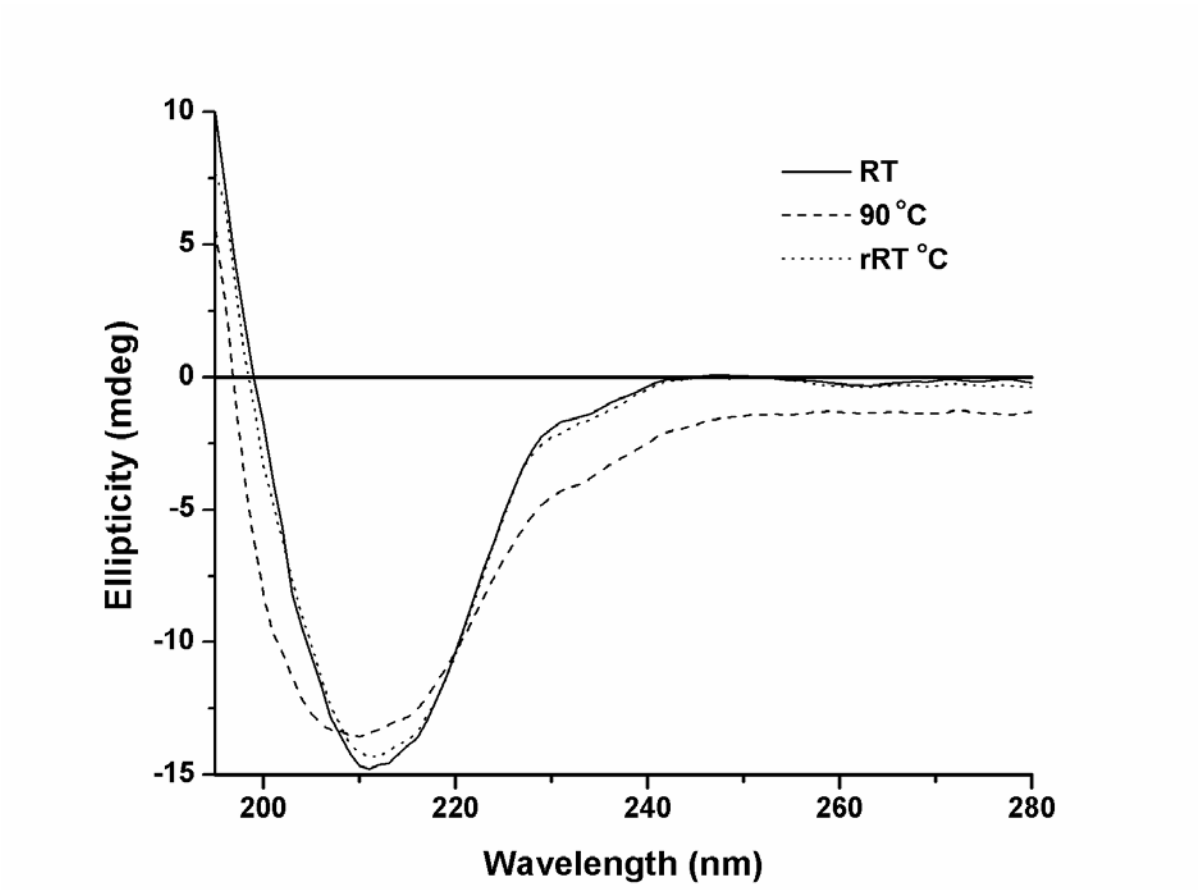
การศึกษาคุณสมบัติในการเป็น heat stable protein ของ HSHMG ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy โดยใช้โปรตีนความเข้มข้น 1 mg/ml ใช้ speed 20 nm/min, 2 nm bandwidth, 100 mdeg sensitivity, average response time of 2 s, optical path length เท่ากับ 0.2 mm และเพิ่มความร้อนจาก room temperature (RT; 25 °C) เป็น 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 °C พบว่าระดับความร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 °C ไม่ทำให้โปรตีน HSHMG มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (แสดงในรูปที่ 12) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีก พบว่าที่อุณหภูมิ 60 °C นั้น โมเลกุลของโปรตีนมีการจัดเรียงตัวเริ่มไม่เป็นระเบียบ (disordered structure) เพิ่มขึ้น และจะเห็นได้ชัดเมื่อเพิ่มอุณหภูมิไปเรื่อย ๆ จนถึง 90 °C (แสดงในรูปที่ 13) หลังจากนั้นทำการลดอุณหภูมิของโปรตีนจาก 90 °C จนกระทั่งเท่ากับอุณหภูมิห้อง (reversing temperature to room temperature; rRT) พบว่าโปรตีน HSHMG สามารถจัดเรียงตัวกลับคืนได้ใกล้เคียงกับโปรตีนเริ่มต้น (แสดงในรูปที่ 14) ซึ่งแสดงถึงว่าโปรตีนนี้มีคุณสมบัติเป็น heat stale protein



รูปที่ 12 CD spectra ของ HSHMG ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ อุณหภูมิห้อง (room temperature; RT), 40 °C และ 50 °C



รูปที่ 13 CD spectra ของ HSHMG ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ อุณหภูมิห้อง (room temperature; RT), 60, 70, 80 และ 90 °C

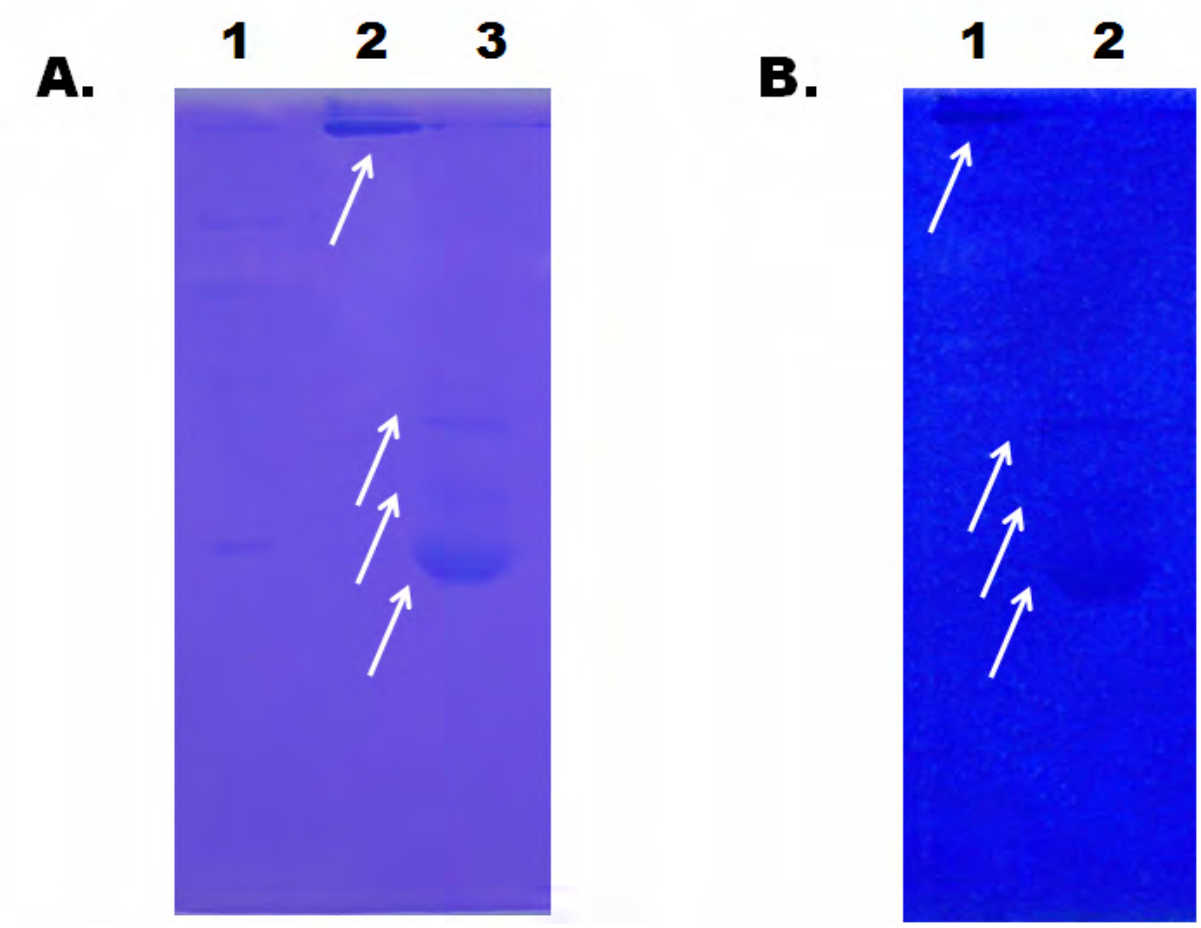


รูปที่ 14 CD spectra ของ HSHMG ที่แสดงถึงการเป็น heat stable protein โดย HSHMG สามารถกลับคืนโครงสร้างเดิมได้ภายหลังจากที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบไม่เป็นระเบียบเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงถึง 90 °C และลดอุณหภูมิลงมาจนกระทั่งเท่าอุณหภูมิห้องเหมือนเดิม (reversing room temperature, rRT)

2.11 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น protease ของ HSHMG

การศึกษาคุณสมบัติในการเป็น protease ของ HSHMG อาศัยการย่อย substrate คือ gelatin และ casein และดู zymography ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Shimokawa และคณะ (2002) ซึ่งมีวิธีโดยย่อดังนี้ ทำการแยกโปรตีน HSHMG ทั้งในรูปแบบที่ต้มและไม่ผ่านการต้มใน sample buffer ที่ไม่มี reducing agent (non-reducing SDS gel sample buffer) ใน 10% SDS-PAGE ที่มี gelatin หรือ casein เป็นองค์ประกอบในเนื้อ gel และให้ทำปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 37 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วย้อม gel ด้วย Coomassie brilliant blue R-250 enzymatic activity สังเกตดูได้จากบริเวณของ protein band บนเนื้อ gel ที่ย้อมไม่ติดสี (transparent bands)

ผลการทดลองพบว่าโปรตีน HSHMG ทั้งในรูปแบบที่เป็น multimeric (ไม่ผ่านการต้มใน non-reducing sample buffer) และที่แยกเป็น monomer (โดยผ่านการต้มใน non-reducing sample buffer) ไม่มีคุณสมบัติเป็น protease โดยไม่พบ transparent bands ในเนื้อ gel บริเวณที่มี molecular weight เท่ากับ HSHMG เมื่อใช้ gelatin และ casein เป็น substrate (แสดงในรูปที่ 15)



รูปที่ 15 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น protease ของ HSHMG โดย zymography เมื่อใช้ gelatin (A) หรือ casein (B) เป็น substrate ทั้งในรูปแบบที่เป็น multimeric (lane 2 ในรุป A และ 1 ในรูป B) และที่แยกเป็น monomer (lane 3 ในรุป A และ 2 ในรูป B) และลูกศรแสดงถึงการไม่มีคุณสมบัติเป็น protease ของ HSHMG โดยไม่พบ transparent bands ในเนื้อ gel บริเวณที่มี molecular weight เท่ากับ HSHMG (บริเวณลูกศรชี้) Lane 1 = standard molecular weight protein markers

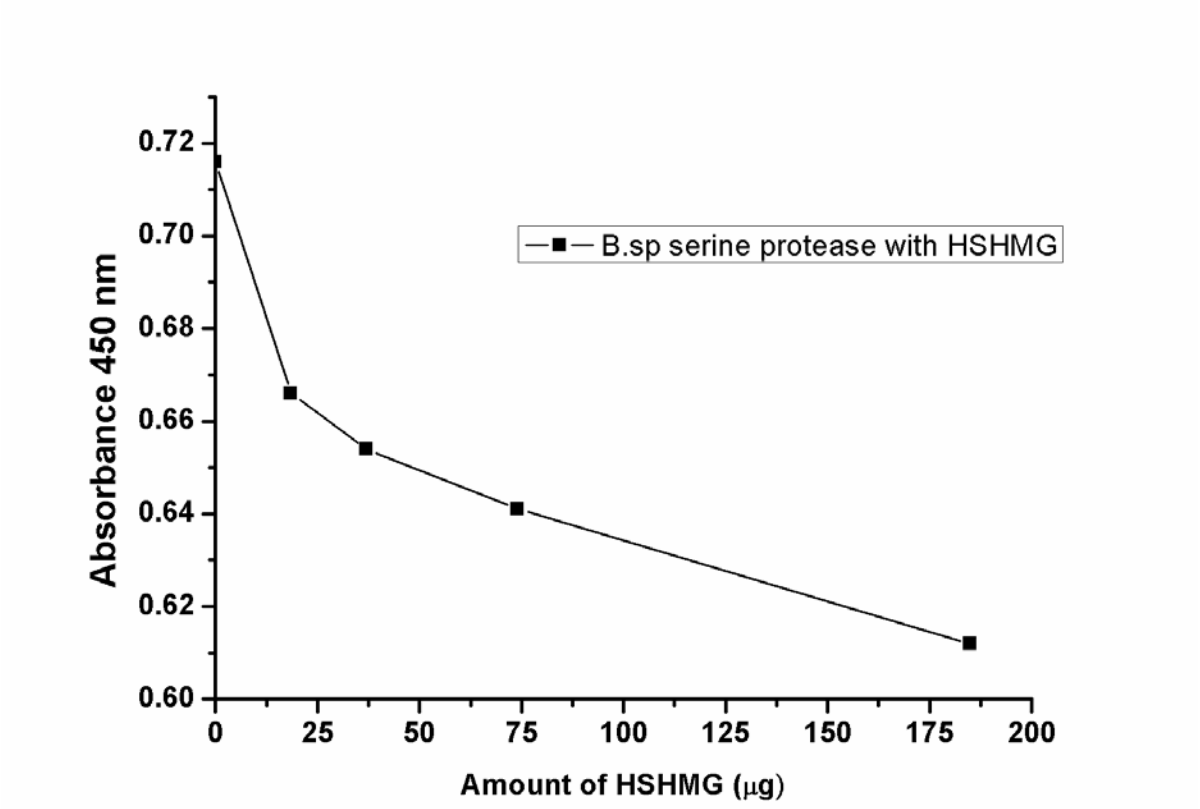
2.12 ศึกษาคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG

คุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG ทำการศึกษาโดยใช้น้ำยา commercial คือ QuantiCleaveTM Protease Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) มีวิธีโดยย่อดังนี้ เติม succinylated casein solution ลงใน microplate หลุมละ 100 μl และสำหรับหลุมที่เป็น blank เติม assay buffer (50 mM borate pH 8.5) แทน หลังจากนั้นเติม serine protease (จากเชื้อ *Bacillus* sp., sigma, USA) ความเข้มข้น 1 mg/ml ลงไปใน microplate หลุมละ 50 μl ของ HSHMG ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 18.5, 37, 74 และ 185 μg หลังจากนั้น incubate ที่ 37 °C นาน 20 นาที หลังจากนั้นเติม trinitrobenzenesulfonic acid (TNBSA) 50 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (RT) นาน 20 นาที นำ microplate ไปค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 450 nm การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงจะแสดงให้เห็นถึงการมีคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG

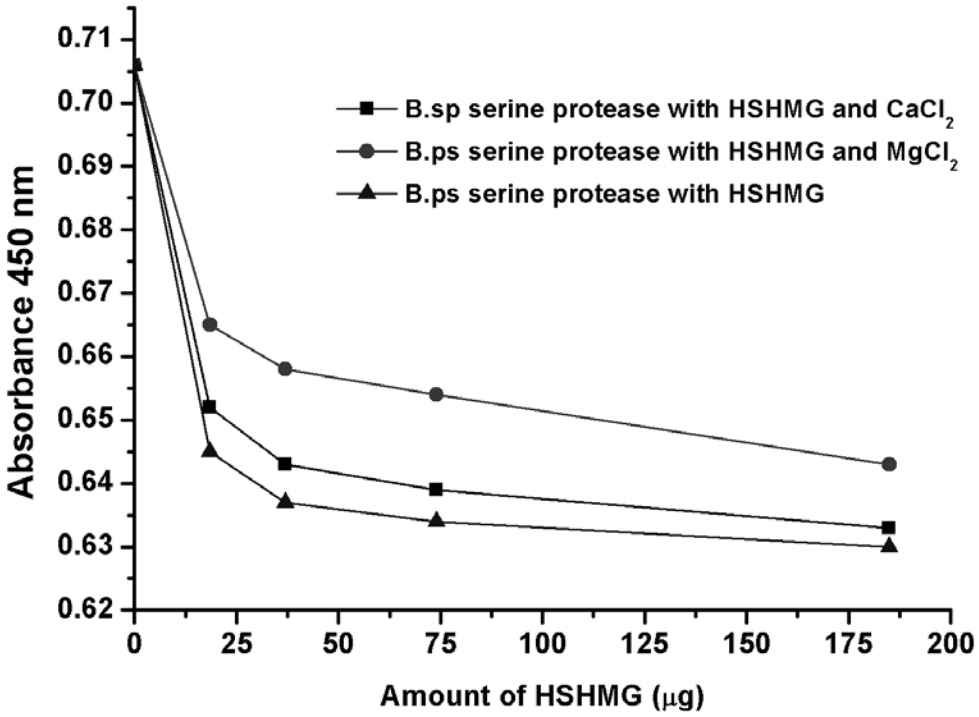
จากการทดลองพบว่า HSHMG มีคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor (ดังแสดงในรูปที่ 16) โดยสามารถลด activity ของ serine protease จาก *Bacillus* sp. อย่างเห็นได้ชัดเมื่อใช้ HSHMG (inhibitor) ที่ความเข้มข้น 18.5 μg และปฏิกิริยาการยับยั้งเริ่มคงที่ความเข้มข้นของ inhibitor เท่ากับ 37 μg

2.13 ศึกษาผลของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ต่อคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG

การศึกษาผลของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ต่อคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG ทำการศึกษาโดยใช้น้ำยา commercial คือ QuantiCleaveTM Protease Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) ซึ่งมีวิธีการทดลองคล้ายคลึงกับขั้นตอนที่ 2.12 มีส่วนที่ต่างคือ จะมีการเติม 2 mM $CaCl_2$ หรือ 2 mM $MgCl_2$ ลงใน assay buffer ผลการทดลองพบว่า เมื่อมี Ca^{2+} และ Mg^{2+} อยู่ในปฏิกิริยาจะทำให้คุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMG ลดลง (ดังแสดงในรูปที่ 17) โดย Mg^{2+} มีผลต่อการลดการทำงานของ HSHMG มากกว่า Ca^{2+}



รูปที่ 16 การยับยั้งการทำงานของ serine protease จาก *Bacillus* sp. โดย HSHMG ที่ความเข้มข้น 0, 18.5, 37, 74 และ 185 μg



รูปที่ 17 การศึกษาผลของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ต่อคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ของ HSHMGF โดยเติม 2 mM $CaCl_2$ และ 2 mM $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยาการวิเคราะห์

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง (Discussion and Conclusion)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดแยกโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อนจากน้ำยางของต้นขนุน (jackfruit) หรือ *A. heterophyllus* โดยใช้หลักการของ heat extraction และ ion-exchange chromatography ได้โปรตีนที่มี คุณสมบัติเป็น heteromultimeric glycoprotein มี molecular weight มากกว่า 97 kDa จึงเรียกโปรตีนนี้ว่า heat-stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) และแต่ละ monomer ประกอบไปด้วย glycoprotein ที่มี molecular weight 33, 31 และ 29 kDa มี *pI* 6.63, 6.63 และ 6.93 ตามลำดับ และจากการ identify protein ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่า HSHMG เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม heat-shock protein (Hsps) และ chaperones family จำพวก chaperoin ทั้ง Hsps และ chaperones เป็นกลุ่มโปรตีนที่จะพบว่ามีการสร้างขึ้นมาเมื่อเซลล์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น หรือมีภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดของเซลล์ (cell stress) (Wang และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับ protein folding, assembly, translocation และ degradation ของเซลล์ และยังเกี่ยวข้องกับความคงทนของโปรตีนและผนังเซลล์ในสภาวะที่มี stress เกิดขึ้น (Dafforn และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังได้มีรายงานถึงบทบาทของโปรตีนในกลุ่มนี้ที่มีคุณสมบัติเป็น serine protease inhibitors เช่น SERPINH 1 (Dafforn และคณะ, 2001)

โปรตีนที่มีหน้าที่เป็น serine protease inhibitors นั้น มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์มากมาย เช่น squash family เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ (Hayashi และคณะ, 1994) เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงผลของ HSHMG ต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ที่วิถี (pathway) ต่าง ๆ ซึ่งปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดมักมีคุณสมบัติเป็น serine protease จากการทดลองพบว่า HSHMG สามารถยับยั้งการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic pathway ซึ่งเกี่ยวข้อง

กับปัจจัยการแข็งตัวของเลือดดังต่อไปนี้ IX, XI, XII และ Prekallikrein โดยไม่มีผลต่อ extrinsic pathway และ common pathway คือปัจจัยการแข็งตัวของเลือด VII, X และ prothrombin และโปรตีน HSHMG ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ fibrinolysis

จากการศึกษาโครงสร้าง secondary structure ของโปรตีน HSHMG ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy (CD spectroscopy) พบว่า native structure ของ HSHMG ประกอบด้วย α-helix 23%, β-sheet 40% และ random coil 0.36% โดยโครงสร้างเหล่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้เมื่อ HSHMG อยู่ในสารละลายที่มี 2 mM $CaCl_2$ และ 2 mM $MgCl_2$ และจะกลับสู่โครงสร้างเดิมเมื่อเติม chelating agent (4 mM EDTA) นอกจากนี้โปรตีน HSHMG ยังแสดงคุณสมบัติเป็น heat stable โดยการที่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิม (native structure) ได้เมื่อให้ความร้อนถึง 90 $^{\circ}$C แล้วลดอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิปกติ (room temperature)

จากการศึกษาคุณสมบัติในการเป็น protease และ protease inhibitor ของ HSHMG พบว่า HSHMG ไม่มีคุณสมบัติเป็น protease เมื่อใช้ gelatin และ casein เป็น substrate แต่มีคุณสมบัติเป็น protease inhibitor ของเอนไซม์กลุ่ม serine protease ที่ได้จากเชื้อ *Bacillus sp.* และคุณสมบัติในการ inhibit จะลดลงเมื่อเติม 2 mM $CaCl_2$ และ 2 mM $MgCl_2$ ลงในปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของ HSHMG ซึ่งการที่เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยลงอาจเนื่องจาก Ca^{2+} และ Mg^{2+} ทำให้โครงสร้างของ HSHMG เปลี่ยนแปลง โดย Mg^{2+} ทำให้ HSHMG ลดคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานได้มากกว่า Ca^{2+} ซึ่งผลสอดคล้องกับผลของ CD spectroscopy ที่พบว่า Mg^{2+} สามารถทำให้โครงสร้างของ HSHMG เปลี่ยนแปลงจาก native ไปมากกว่าที่มี Ca^{2+}

ในการศึกษาครั้งต่อไปจะทำการศึกษาผลของ HSHMG ต่อปัจจัยการแข็งตัวของเลือดของมนุษย์ใน intrinsic pathway อย่างจำเพาะ และการเป็น protease inhibitors เพิ่มเติม ซึ่งประโยชน์ของคุณสมบัติเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับทางการแพทย์ เช่น กระบวนการหายของบาดแผล (wound healing), blood

coagulation, angiogenesis หรือการแพร่กระจายของเนื้องอก (tumor invasion) (Bode และ Huber, 2000; Ivanciu และคณะ, 2007)

เอกสารอ้างอิง

เอกสารสมุนไพรไทย. สำนักวิทยบริการ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Bode W, Huber R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochim Biophys Acta 2000; 1477: 241-52.

Brown BA. 1988. Haematology: Principles and Procedures, 5th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 195-215.

Dafforn TR, Della M, Miller AD. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. J Biol Chem 2001; 276: 49310-49319.

Chantaphakul H, Tiyasatapon S, Phanupak P, Ruxrungtham K. Jackfruit induced anaphylaxis and latex allergy. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: S219.

Freitas CDT, Oliveira JS, Miranda MRA, Macedo NMR, Sales MP, Villas-Boas LA, Ramos MV. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. Plant Physiol Biochem 2007; 45: 781-789.

Hayashi K, Takehisa T, Hamato N, Takano R, Hara S, Miyata T, Kato H. Inhibition of serine proteases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. J Biochem 1994; 116: 1013-1018.

Ivanciu L, Gerard RD, Tang H, Lupu F, Lupu C. Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27: 310-316.

Khan MR, Omoloso AD, Kihara M. Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*. Fitoterapia 2003; 74:501-505.

Kotaro K, Chikara H, Masatoshi N, Ken T, Yasumori T, Makoto H, Katsuyuki K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. Plant J. 2004; 37: 370-378.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. Biochemistry (Moscow) 2002; 67: 92-98.

Mekkriengkrai D, Ute K, Swiezewska E, Chojnacki T, Tanaka Y, Sakdapipanich JT. Structural characterization of rubber from jackfruit and euphorbia as a model of natural rubber. Biomacromolecules 2004; 5: 2013-2019.

Osoniyi O, Onajobi F. Coagulant and anticoagulant activities in Jatropha curcas latex. 2003; 89: 101-105.

Prasad RKM, Virupaksha TK. Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. Phytochemistry 1990; 29: 1763-1766.

Rajesh R, Gowda CDR, Nataraju A, Dhananjaya BL, Kemparaju K, Vishwanath BS. Procoagulant activity of *Calotropis giantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. Toxicon 2005; 46: 84-92.

Rajesh R, Ntaraju A, Gowda CDR, Frey BM, Frey FJ, Vishwanath BS. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Syndadenium frantii* latex: action of human fibriongen and fibrin clot. Biochimie 2006; 88: 1313-1322.

Richter G, Hans PS, Friedrich D, Peter L. Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*. Br J Haematol 2002; 119: 1042-1051.

Shimokawa, K, Katayama, M, Matsuda, Y, Takahashi, H, Hara, I, Sato, H, Kaneko, S. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. Mol Hum Reprod 2002; 8: 32-36.

Silva JRA, Amaral, ACF, Siani, AC, Rezende CM, Felcman J, Pinto AC. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. Acia Amazonica 2003; 33: 105-110.

Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Sci 2004; 9: 244-252.

Wetprasit N, Threesangsri W, Klamklai N, Chulavatnatol M. Jackfruit lectin: properties of mitogenicity and the inhibition of herpesvirus infection. Jpn J Infect Dis 2000; 53:156-161.

Yugami T, Sato M, Nakamura A, Komiyama T, Kitagawa K, Akasawa A, Ikezawa Z. Plant defense-related enzymes as latex antigens. J. Allergy Clin Immunol 1998; 101: 379-385.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. สามารถสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์เป็น anticoagulant ของเลือดของมนุษย์ใน intrinsic pathway และสารสกัดโปรตีนที่ได้มีคุณสมบัติเป็น serine protease inhibitor ซึ่งผลงานวิจัยครั้งนี้มีโอกาสที่จะใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ในอนาคต ซึ่งจะต้องมีการค้นคว้าและศึกษาต่อไป

2. งานวิจัยนี้ได้นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ ดังนี้

2.1 Siritapetawee, J. and Thammasirirak, S. The Effect of a Heat Stable Heteromultimeric Glycoprotein from *Artocarpus heterophyllus* Latex on Human Blood Coagulation Time. **Poster presentation.** The 4th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand "Protein Research from Basic Studies To Applications in Health Sciences". Conference Center, Chulabhorn Research Institute, Vibhavadee Rangsit Road, Bangkok, Thailand, August 26-28, 2009.

2.2 Siritapetawee, J. and Thammasirirak, S. Purification and Characterization of A Heat Stable Heteromultimeric Glycoprotein Effects on Human Blood Coagulation time from *Artocarpus heterophyllus* Latex. **Poster presentation.** การประชุม “นักวิจัยรุ□นใหม□ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.”. โรงแรม ฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจ้นท์ บีช ชะอำ จ.เพชรบุรี ประเทศไทย, 15-17 ตุลาคม 2552.

3. งานวิจัยนี้รอผลการพิจารณาให้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ดังนี้

3.1 Siritapetawee, J. and Thammasirirak, S. Purification and Characterization of a heat stable glycoprotein from jackfruit latex with an effect on human blood coagulation time. **Phytochemistry.** mannuscript have been sent.

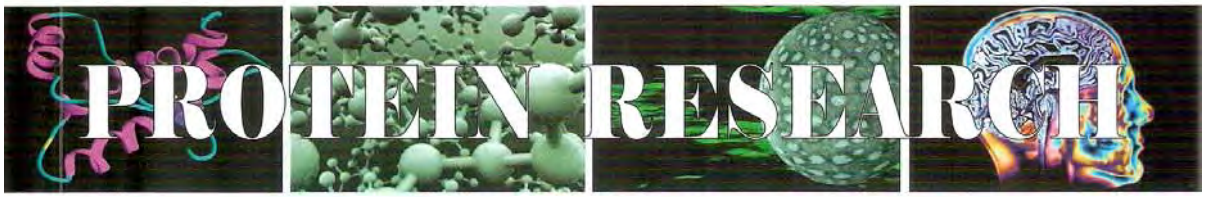
ภาคผนวก

ผลงานที่ได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

Protein Society of Thailand

ABSTRACTS AND PROCEEDINGS

THE 4th ANNUAL
SYMPOSIUM OF PROTEIN SOCIETY OF THAILAND



FROM BASIC STUDIES TO APPLICATIONS IN HEALTH SCIENCES

26-28 AUGUST 2009

CHULABHORN RESEARCH INSTITUTE CONFERENCE CENTER

Organized By

BMB

Poster Presentation 1

THE EFFECT OF A HEAT STABLE HETEROMULTIMERIC GLYCOPROTEIN FROM *ARTOCARPUS HETEROPHYLLUS* LATEX ON HUMAN BLOOD COAGULATION TIME

Jaruwan Siritapetawee[1], and Sompong Thammasirirak[2]

[1]College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand; [2]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand; Tel: +66-45-353953; Fax: +66-45-353901; E-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

A heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) from *Artocarpus heterophyllus* latex was purified by the combination of heat precipitation and ion-exchange chromatography. The size of this multimeric protein on SDS-PAGE was more than 97 kDa. The apparent molecular mass of each monomeric protein was 29, 31 and 33 kDa. The isoelectric points (pI) of the monomers were 6.93, 6.63 and 6.63, respectively. Prothrombin time (PT) and activated partial thrombin time (APTT) tests were used to investigate the effect of HSHMG on human blood coagulation time. The result of the APTT test showed that HSHMG had an effect on the intrinsic pathway of human blood coagulation system by significantly increasing the blood clotting time ($P < 0.05$) in parallel with increasing amounts of HSHMG. The PT test illustrated that HSHMG had no significant effect on the human extrinsic blood coagulation system.

Supported by the Thailand Research Fund (TRF) and the Commission on Higher Education (CHE), Ministry of Education.

บทคัดย่อ
การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9

วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552
โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

Purification and Characterization of A Heat Stable Heteromultimeric Glycoprotein Effects on Human Blood Coagulation time from *Artocarpus heterophyllus* Latex

Siritapetawee, J.[1*], Thammasirirak, S.[2]

[1]*Department of Biochemistry, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand*
[2]*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*

Abstract

A heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) from *Artocarpus heterophyllus* latex was purified by the combination of heat precipitation and ion-exchange chromatography. The size of this multimeric protein on SDS-PAGE was more than 97 kDa. The apparent molecular mass of each monomeric protein was 29, 31 and 33 kDa. The isoelectric points (pI) of the monomers were 6.93, 6.63 and 6.63, respectively. HSHMG had inhibitory effect on serine protease isolated from *Bacillus* sp. Prothrombin time (PT) and activated partial thrombin time (APTT) tests were used to investigate the effect of HSHMG on human blood coagulation time. The result of the APTT test showed that HSHMG had an effect on the intrinsic pathway of human blood coagulation system by significantly increasing the blood clotting time ($P < 0.05$) in parallel with increasing amounts of HSHMG. The PT test illustrated that HSHMG had no significant effect on the human extrinsic blood coagulation system.

Keywords: *Artocarpus heterophyllus*, heat stable glycoprotein, plant latex, prothrombin time, activated partial thrombin time

*Corresponding author.
Tel.: 0-4535-3900 ext. 3953; Fax: 0-4535-3901
E-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

Manuscript

ที่ได้ส่งเพื่อรอผลพิจารณาให้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (Phytochemistry impact factor 2.946)

Purification and Characterization of a heat stable glycoprotein from jackfruit latex with an effect on human blood coagulation time

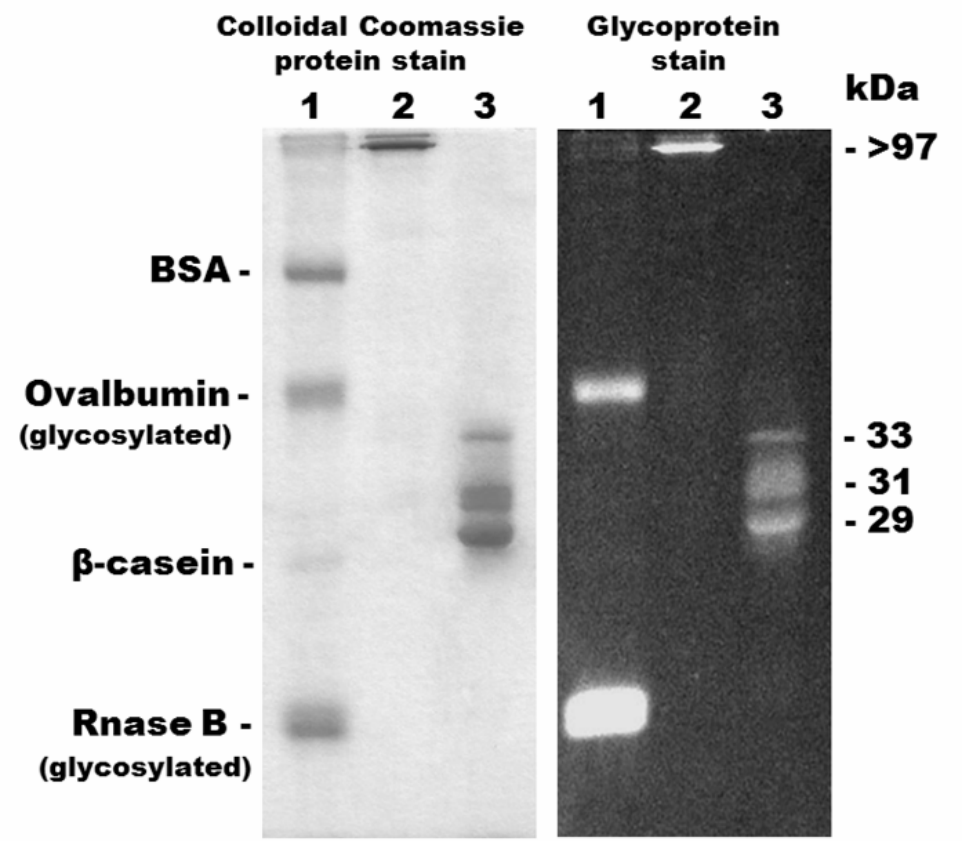
Jaruwan Siritapetawee[a*] and Sompong Thammasirirak[b]

[a] Department of Biochemistry, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand, and [b]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

*****Corresponding author. E-mail address: jaruwan_siritape@yahoo.com, Tel: +66-898479090, Fax: +66-45-353901

Graphical Abstract

A heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) from *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) latex was purified and characterized. This protein acted as a serine protease inhibitor and had an effect on intrinsic pathways of the human blood coagulation system.



Article Outline

1. Introduction

2. Results and discussion

2.1 Purification and identification of a heat-stable heteromultimeric glycoprotein from A. heterophyllus latex

2.2 Effect of a heat-stable heteromultimeric glycoprotein from A. heterophyllus latex on prothrombin time (PT)

and activated partial thromboplastin time (APTT)

2.3 Proteolyitc and serine protease inhibitor activities

3. Conclusion

4. Experimental

4.1 Plant material

4.2 Protein extraction and purification

4.3 Determination of protein concentration

4.4 Electrophoresis

4.4.1 One dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)

4.4.2 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

4.5 Glycosylation

4.6 Protein identification and peptide mass analysis by MALDI–TOF MS

4.7. Assay for prothrombin time (PT)

4.8. Activated partial thromboplastin time (APTT)

4.9. Enzymatic assays

4.9.1 Detection of proteases by zymography

4.9.2 Serine protease inhibitors

Acknowledgements

Figures and Legends

Tables

References

Purification and Characterization of a heat stable glycoprotein from jackfruit latex with an effect on human blood coagulation time

Jaruwan Siritapetawee[a,*] and Sompong Thammasirirak[b]

[a] *Department of Biochemistry, College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand, and* [b]*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.*

*Corresponding author. Tel.: +66-898479090 ; Fax: +66-45-353901.
E-mail address: jaruwan_siritape@yahoo.com

Abstract A heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) from *Artocarpus heterophyllus* latex was purified by a combination of heat precipitation and ion-exchange chromatography. The size of this multimeric protein from SDS-PAGE was more than 97 kDa. The apparent molecular masses of the monomeric proteins were 29, 31 and 33 kDa. The isoelectric points (*pIs*) of the monomers were 6.93, 6.63 and 6.63, respectively. Peptide mass fingerprint revealed that HSHMG was a complex protein which contributed to cellular hemostasis in normal and stress conditions of jackfruit referred to Hsps/chaperones. HSHMG had an effect on intrinsic pathways of the human blood coagulation system by significantly prolonging the activated partial thrombin time (APTT). In contrast, it has no effect on the human extrinsic blood coagulation system using the prothrombin time (PT) test. The prolonged APTT resulted from the serine protease inhibitor property of HSHMG since it reduced the activity of the serine protease from *Bacillus* sp.

Keywords: *Artocarpus heterophyllus*; Jackfruit; Latex; Blood; Coagulation

1. Introduction

Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) belongs to the family Moraceae, which is widely distributed in tropical areas including Thailand (Kabir , 1995; Mekkriengkrai et al., 2004; Shyamalamma et al., 2008). It has many health benefits proven in laboratories. For example, the carotenoid compositions of jackfruit were analyzed by high-performance liquid chromatography connected to a photodiode array and mass spectrometry detector (HPLC-PDA-MS/MS) (de Faria et al., 2009). The main carotenoids were all-trans-lutein (24-44%), all-trans-beta-carotene (24-30%), all-trans-neoxanthin (4-19%), 9-cis-neoxanthin (4-9%) and 9-cis-violaxanthin (4-10%) (Mekkriengkrai et al., 2004). Jackfruit seeds were found to be good sources of mineral elements (Ajayi, 2008). Potassium is the prevalent mineral element, following by sodium, magnesium and then calcium (Ajayi, 2008). In addition, some parts of a jackfruit have been used as folk medicine. For

instance, its leaves and roots were used for anemia, asthma, dermatosis, diarrhea and cough as an expectorant (Fernando et al., 1991).

Jackfruit is also a kind of rubber-producing plant. All parts of the tree contain sticky white latex (Mekkriengkrai et al., 2004). It has been revealed that plant latex has medicinal properties. For example, fig tree latex was used to treat warts in short-duration therapy with no report of side-effect (Bohlooli et al., 2007). Plant latex had clot inducing and dissolving properties in human hemostasis (Osoniyi and Onajobi, 2003; Shivaprasad et al., 2009). Moreover, plant latex is widely used in developing countries as an effective treatment for various wound healing. Carica papaya latex was reported used in wound healing by the mice burn model (Gurung & Skalko-Basnet, 2009). In addition, the ethanolic and dichloromethane extracts of *Mammea americana* latex were found to possess excellent antisecretory and/or gastrotective effects in all gastric models (Toma et al., 2005). This evidence supports the possibility to employ plant latex for various treatments in medicine. In an attempt to obtain new information on biological properties of jackfruit, a heat stable heteromultimeric glycoprotein (HSHMG) was purified and characterized from its latex in this work. The effect of HSHMG on human blood coagulation time was also investigated.

2. Results and discussion

2.1 Purification and identification of a heat-stable heteromultimeric glycoprotein from *A. heterophyllus* latex

A heat stable glycoprotein was extracted and purified from latex of *A. heterophyllus* (jackfruit) using the method described above. Q Sepharose Fast Flow column chromatography revealed a sharp peak of protein, eluted at around 0.4 M NaCl (Fig. 1). This protein appeared heteromutltimeric on SDS-PAGE with a molecular mass of more than 97 kDa (Fig. 2). The apparent molecular mass of each monomeric protein was 33, 31 and 29 kDa (Fig. 2a). The isoelectric points (*pI*) of the monomers were 6.63 (spot number 1), 6.63 (spot number 2) and 6.93 (spot number 3), respectively (Fig.2b). The final yield of protein obtained from each extraction was approx. 1.1% (18.6 mg) (Table 1). Glycosylation test confirmed that this heat-stable multimeric protein and all of its monomers were glycoprotein as shown in Fig. 3. Consequently, the multimer of this protein was more than 97 kDa and its higher summation than of all molecular weights of its monomers was due to the glycosylation process after protein translation **(**Rayon et. al, 1998). This heat stable heteromultimeric glycoprotein isolated from jackfruit latex was therefore designated as HSHMG.

HSHMG was identified by MALDI-TOF MS. Three spots of various isoelectric points and molecular weights were cut out. In-gel digestion of protein spots by trypsin was performed to cleave proteins at arginine and lysine residues. Peptide mass fingerprints were obtained from MALDI-TOF mass spectrometry using the MASCOT search engine to query the SwissProt 57.7 protein database allowing up to two missed cleavages. The result of spot number 1 in the peptide mass fingerprinting is shown in Fig. 4. The peptide mass fingerprint was identified as 26.779 kDa of chloroplastic small

heat-shock protein of *Petunia hybrida*. The spot number 2 in the peptide mass fingerprinting is shown in Fig. 5. The peptide mass fingerprint was identified as 60.429 kDa of mitochondrial chaperonin CPN60-like 2 of *Arabidopsis thaliana*. The spot number 3 in the peptide mass fingerprinting is shown in Fig. 6. The peptide mass fingerprint of spot number 3 was identified as 25.328 kDa of chloroplastic small heat-shock protein of *Arabidopsis thaliana*. The results of peptide mass fingerprint searches showed that all of the 3 spots HSHMG were related to plant heat-shock proteins (Hsps) and a family of chaperones; chaperonin. Hsps/chaperones have functionally related proteins whose expression is increased when cells are exposed to elevated temperature or other stress e.g. abiotic stresses (Wang et al., 2004). In addition, they are key components contributing to cellular hemostasis in cells, both in cells under optimal and adverse growth conditions. They are responsible for protein folding, assembly, translocation and degradation in normal cellular processes. They are also function in the stabilization of proteins and membranes, and can assist in protein refolding under stress conditions (Carranco et al., 1997; Wang et al., 2004). Another property of Hsps is that they act as protease inhibitors, for instance, heat shock protein 47 (Hsp 47) which known as SERPINH 1 (Dafforn et al., 2001). SERPINH 1 is a serpin which serves as a human chaperone protein for collagen. This protein is a member of the serpin superfamily of serine protease inhibitors (Dafforn et al., 2001). Its expression is induced by heat-shock.

The results of peptide mass fingerprint reveal that HSHMG was a complex protein which contributed to cellular hemostasis in normal and stress conditions of jackfruit or it had a role as Hsps/chaperone. The new biological properties of HSHMG from jackfruit latex were investigated in this study. These investigations focused on the protease and protease inhibitor properties which acted on the human blood coagulation system.

2.2 Effect of a heat-stable heteromultimeric glycoprotein from *A. heterophyllus* latex on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT)

The effect of HSHMG on the human blood coagulation system was determined by mixing various amounts of HSHMG (18.5, 37, 185, 370 μg) in 25 mM Tris-HCl, pH 8.8 with 100 μl of 10 samples of human plasma individually to coagulate in the PT test and APTT tests. The results of the PT and APTT tests are shown in Table 2. HSHMG had no significant effect on the PT at every concentration. HSHMG had significant effect on the APTT by prolonging the clotting time corresponding with an increase in its concentration.

The human blood clotting process is very complex and involves both the intrinsic, extrinsic and common pathways (Brown, 1988). HSHMG had an effect on the intrinsic pathway of plasma clotting factors (VIII, IX, XI, XII and Prekallikrein (Fletcher factor) due to it prolonging the APTT time. The plasma clotting factors (V, VII, X, prothrombin and fibrinogen) of extrinsic and common pathways are not affected by HSHMG.

2.3 Proteolyitc and serine protease inhibitor activities

Both gelatin- and casein- zymography were employed to confirm that HSHMG and its monomers had no protease activity (data not shown).

HSHMG had no proteolytic activity when assessed by gelatin- and casein zymography but it was involved with the intrinsic factors of human blood coagulation as it could increase the clotting time of the APTT. Since some of the intrinsic factors are serine protease (Hayashi et al., 1994), the inhibitory effect on serine protease of HSHMG was determined. The activity of serine protease inhibitor was determined in terms of inhibition of proteolytic activity, as revealed through reduction of absorbance values of the HSHMG of the reaction mixture at 450 nm. Results are shown in Fig. 7 and indicate that HSHMG is effective against the proteolytic activity of a serine protease (from *Bacillus* sp). The inhibitory actions of HSHMG by prolonging the APTT and reduction of *Bacillus* serine protease activity were similar with protease inhibitors in the squash family (Hayashi et al., 1994). All kinds of serine protease inhibitors including the squash family are not necessary to inhibit all serine protease enzymes. For example, Hayashi et al. (1994) isolated 8 squash family inhibitors from the seeds of bitter gourd, squash, gourd and luffa and examined their effect on serine proteases of the blood coagulation system. All inhibitors inhibited the protease activity of factor XIIa, plasma kallikrein, and factor Xa but did not inhibit significantly those of factor XIa, factor IXa and thrombin. Corresponding with this work, HSHMG could inhibit the serine protease activities of intrinsic factors: IX, XI, XII and Prekallikrein, but in contrast, it did not inhibit the serine protease activities of extrinsic and common pathway factors: VII, X and prothrombin. However, the specific inhibition of HSHMG on each blood coagulation factor will be determined in a further study.

The protease inhibitor property of HSHMG is very useful in modern and traditional medicine, because protease inhibitors are involved in blood coagulation, fibrinolysis, angiogenesis, wound healing, and tumor invasion (Bode & Huber, 2000; Ivanciu et al. 2007).

3. Conclusions

This work demonstrates the serine protease inhibitor property of a heteromultimeric glycoprotein purified from jackfruit latex. This protein affected the intrinsic factors of human blood coagulation by prolonging the APTT.

In addition, this protein was identified as a heat-shock/chaperone protein which is useful in cellular hemostasis. These properties may give benefit in medicine e.g. wound healing, blood coagulation and fibrinolysis. In further studies, the specific inhibitory activities of HSHMG on specific blood coagulation factors will be determined. Moreover, the structure and functions of HSHMG will be investigated.

4. Experimental

4.1. Plant material

The latex used for purification and characterization in this work was obtained from *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit). The latex was collected from a jackfruit tree in Ubon Ratchathani province, Thailand.

4.2. Protein extraction and purification

The latex was collected in a clean glass beaker. The whole latex was centrifuged at 13,000 x *g* for 30 min at room temperature. The clear supernatant was boiled on a water bath by maintaining the temperature at 90 ºC for 3 min. The coagulated proteins were removed by centrifugation at 13,000 x *g* for 30 min and the supernatant was collected for dialysis. The boiled supernatant was dialyzed overnight against 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. Then the clear supernatant was collected by centrifugation at 13,000 *g* for 40 min. The clear supernatant was subjected to purification by Q Sepharose Fast Flow column (1.5 cm x 3 cm) (GE Healthcare, Sweden). The proteins were fractionated with a 0–1 M step gradient of NaCl in 25m M Tris-HCl buffer, pH 8.8 and an applied flow rate of 1 ml/min. Eluted fractions of 2 ml were collected and the A_{280} was measured for every fraction. Protein fractions were analyzed further on SDS/12.5%PAGE. Concentrations of the purified latex proteins were determined with the BCA kit.

4.3. Determination of protein concentration

Protein concentrations were estimated using the BCA assay kit (Pierce, Rockford, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. A purified latex protein (0.1 ml) was mixed with 2 ml of the BCA working reagent. After the reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min, absorbance at 562 nm was measured with a spectrophotometer. BSA at various concentrations ranging from 0.025–2.0 mg/ml was used to construct a standard calibration curve and to determine protein concentrations of unknown samples.

4.4. Electrophoresis

4.4.1 One dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out according to the method of Laemmli et al. (1970) on 12.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS using Tris-glycine buffer pH 8.8. The bands were visualized by staining with Coomassie brilliant blue R-250.

4.4.2 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

Purified latex protein (100 μg) was separated in the first dimension with 7 cm immobilized pH gradient strip pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden). The strip was rehydrated for 12 h

and focussed for 9250 total Vh using Ettan™ IPGphor (GE Healthcare, Sweden). Then, it was washed in equilibration buffer containing 5% iodoacetamide. The second dimension was resolved by 12.5% Tris-glycine SDS-PAGE. Protein was visualized by staining with colloidal Coomassie brilliant blue G-250.

4.5. Glycosylation

The possible glycosylation of the purified proteins was analyzed by the GlycoProfile™ III fluorescent glycoprotein detection kit (Sigma, USA) after 1D SDS-PAGE. After staining with the GlycoProfile detection kit, the gel was stained with Colloidal Coomassie brilliant blue G-250.

4.6. Protein identification and peptide mass analysis by MALDI–TOF MS

The protein bands from 2D SDS-PAGE gels (see above) were excised, destained, reduced, alkylated with iodoacetamide and digested with sequencing-grade trypsin (Promega) following a standard protocol (Shevchenko et al., 1996). After overnight digestion at 37 °C, the peptides were extracted and dried in a SpeedVac vacuum centrifuge. A small fraction of these tryptic peptides was used in peptide mass fingerprinting (PMF). PMF were obtained by BioService Unit (BSU), National Science and Technology Development Agency, Pathumthani, Thailand, using an Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik Bremen, Germany in reflective mode) in an α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix.

Databank searching was performed with the MASCOT search engine (http://www.matrixscience. com) based on the Viridiplantae (green plants) of SwissProt 57.7 protein database using the assumption that peptides are monoisotopic. Up to two-missed trypsin cleavages was allowed.

4.7. Assay for prothrombin time (PT)

Prothrombin time (PT) was used for determination of the effect of the purified latex proteins on extrinsic and common pathways of human blood coagulation factors (Brown, 1988). Plasma was obtained by centrifuging human citrated blood (10 samples) for 15 min at 1500 x *g*. Thromboplastin-calcium reagent (HemoStat THROMBOPLASTIN-SI, Human Gesellschaft für Biochemica and Diagnostica mbH, Germany) was reconstituted with distilled water according to the manufacturer's instructions. Then it was pre-warmed in a water bath at 37 °C for at least 10 min. One hundred microliters of plasma was placed in a test tube and incubated in the water bath for 3-5 min at 37 °C. For the controls, 100 µl of pre-warmed 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, followed by 200 µl of the pre-warmed thromboplastin-calcium reagent was rapidly pipetted into the plasma while simultaneously starting a timer. The test tube was then gently tilted back and forth, until a clot formed, at which time the timer was stopped and the clotting time recorded. For the test samples, 100 µl of each pre-warmed amounts of purified latex protein (18.5, 37, 185, 370 µg, respectively) in 25 mM Tris-HCl,

pH 8.8 was mixed with the plasma, just before adding the thromboplastin-calcium reagent. All experiments were carried out in duplicate.

4.8. Activated partial thromboplastin time (APTT)

The effect of purified latex proteins on intrinsic and common pathways of human blood coagulation factors was determined by APTT tests (Brown, 1988). Ten plasma samples were prepared using the same method as for PT tests. The partial tissue thromboplastin with activator (aPTT-EL reagent) (HemoStat aPTT-EL, Human Gesellschaft für Biochemica and Diagnostica mbH, Germany) and 0.02 M $CaCl_2$ were pre-warmed to 37 °C separately in a water bath. One hundred microliters of plasma was placed in a test tube. After incubating for 1-2 min in a water bath, 100 µl of aPTT-EL reagent was added, and the contents were mixed rapidly. The mixture was then incubated for another 3-5 min, after which 100 µl of 25 mM Tris-HCl, pH 8.8 (for control), then 100 µl of the pre-warmed $CaCl_2$ solution was added while simultaneously starting a timer. The test tube was then gently tilted back and forth, until a clot formed, at which time the timer was stopped and the clotting time recorded. For the test samples, 100 µl of each pre-warmed amount of purified latex protein (18.5, 37, 185, 370 µg) in 25 mM Tris-HCl, pH 8.8 was mixed with the contents of the test tube just prior to the addition of $CaCl_2$, and readings taken as before. All experiments were carried out in duplicate.

4.9. Enzymatic assays

4.9.1 Detection of proteases by zymography

Proteolytic activities of the purified proteins were testeded using gelatin- and casein-zymography by slightly modifying the method of Shimokawa et al. (2002). Briefly, the purified protein was mixed with non-reducing SDS gel sample buffer and applied with and without boiling to a 10% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS and 1 mg/ml gelatin or casein solution. After electrophoresis, the gel was washed three times in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5 containing 0.15 mol/NaCl, 5 mmol/l $CaCl_2$, 5 µmol/l ZnCl, 0.02% NaN_3, 0.025% Triton X-100 at room temperature, and then incubated in the same buffer without Triton X-100 (two changes) at 37 °C for 20 h. Proteins were stained by Coomassie brilliant blue R-250. Enzymatic activity was detected as transparent bands.

4.9.2 Serine protease inhibitors

The purified latex protein function as an inhibitor for a serine protease (from *Bacillus* sp.; sigma, USA) was determined using QuantiCleaveTM Protease Assay Kit (Pierce, Rockford, U.S.A.).The assays were performed in microplates following the manufacturer's instructions. One hundred microliters of succinylated casein solution was added to microplate wells and 100 µl assay buffer as blanks. Fifty microliters of (1 mg/ml) protease were added, followed by 50 µl of the

purified latex proteins (with concentrations of 18.5, 37, 74 and 185 μg). The microplates were incubated for 20 min at 37 ºC. Fifty microliters of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBSA) were added and plates were incubated for 20 min at room temperature. Microplates were measured for absorbance at 450 nm (A_{450}) with a microplate reader spectrophotometer. For each well the change in absorbance was calculated by subtracting the A_{450} of the blank from that of the corresponding casein well. The decreasing absorbance was generated by the protease inhibitor function of the purified latex proteins. All tests were done in duplicate.

Acknowledgements

We gratefully thank the the Thailand Research Fund (TRF) and the Commission on Higher Education (CHE), Ministry of Education (GRANT MRG5180004) for supporting this research.

Figures and Legends

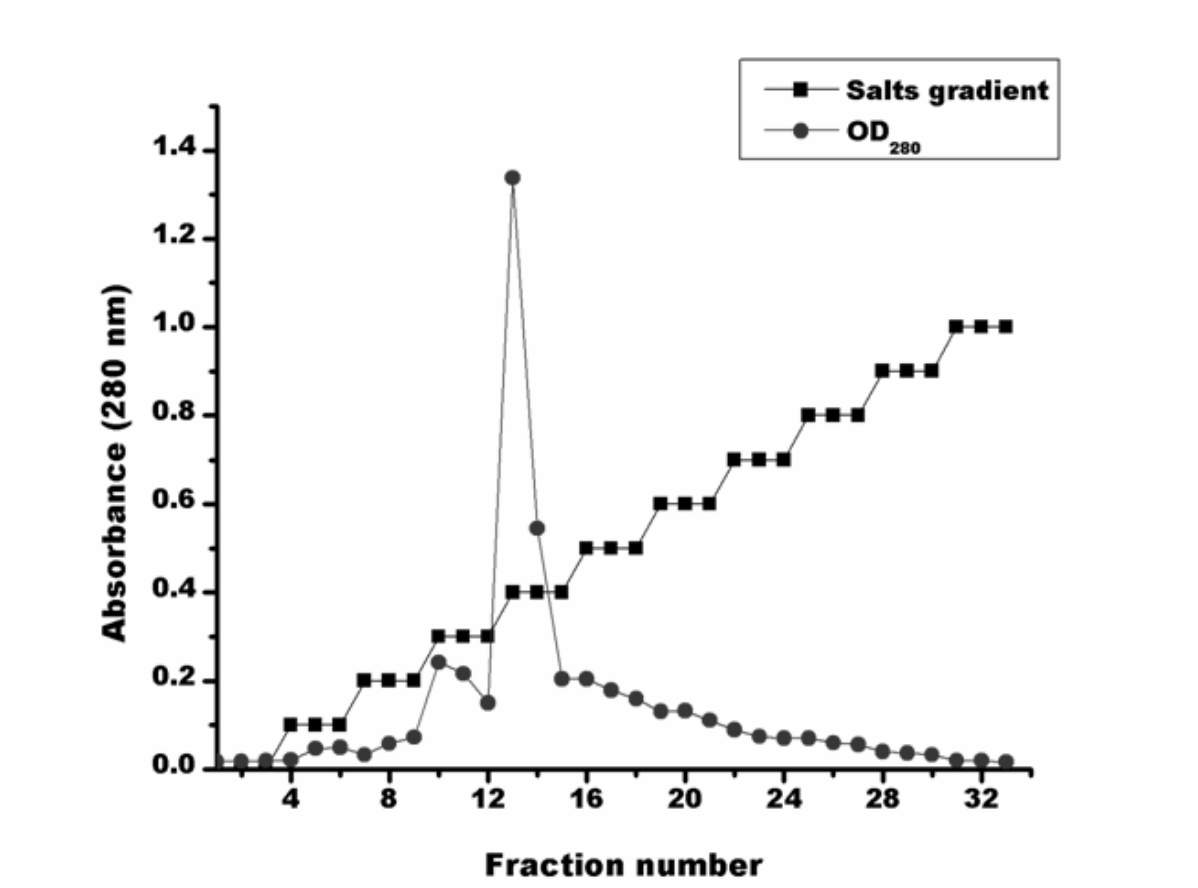


Fig. 1. Purifiction of HSHMG from jackfruit latex using Q Sepharose Fast Flow column chromatography. The HSHMG was eluted by 0.4 M NaCl (Fraction number 12-16).

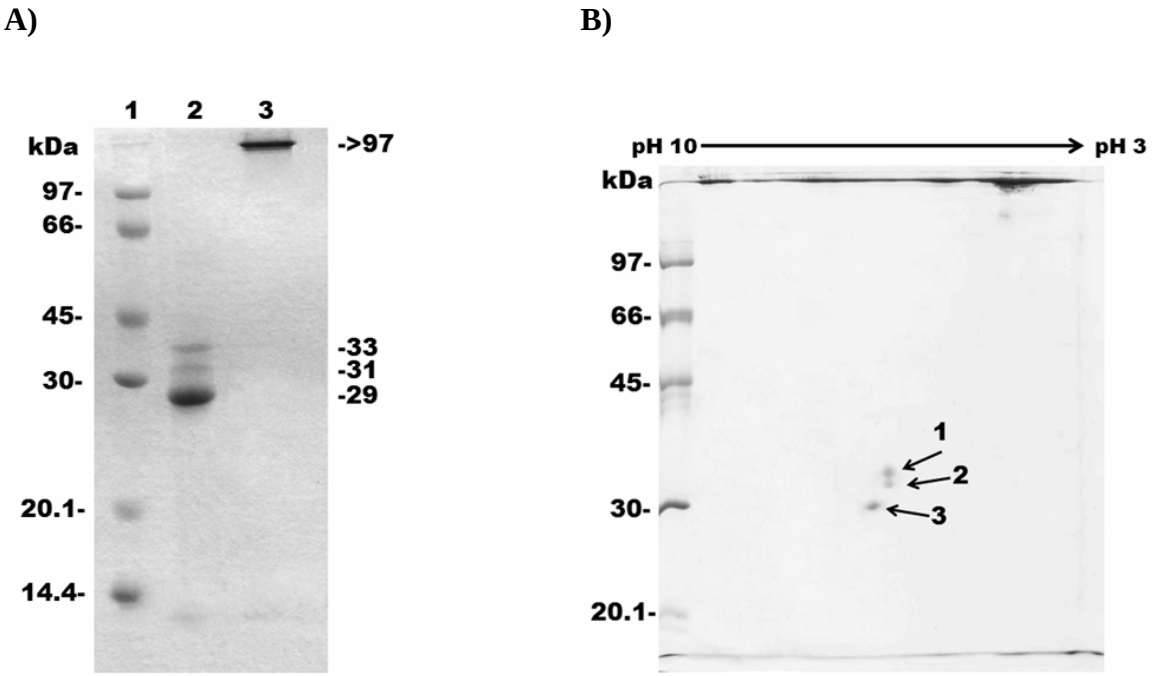


Fig. 2. 1D and 2D SDS-PAGE of HSHMG and its monomers purified from jackfruit latex by Q Sepharose Fast Flow column chromatography. (A) Samples (5 μg) were solubilized in 5X SDS sample buffer containing 2-mercaptoethanol either unheated HSHMG (lane 2) and heated HSHMG to become different monomers (lane 3). Lane 1 is standard molecular weight markers. The *pIs* of proteins were detected by 2D-PAGE (B).

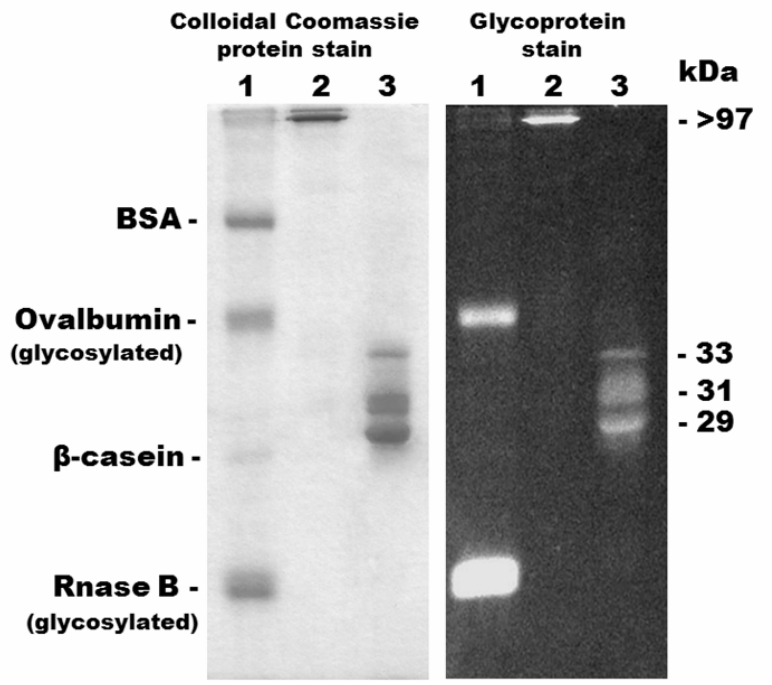
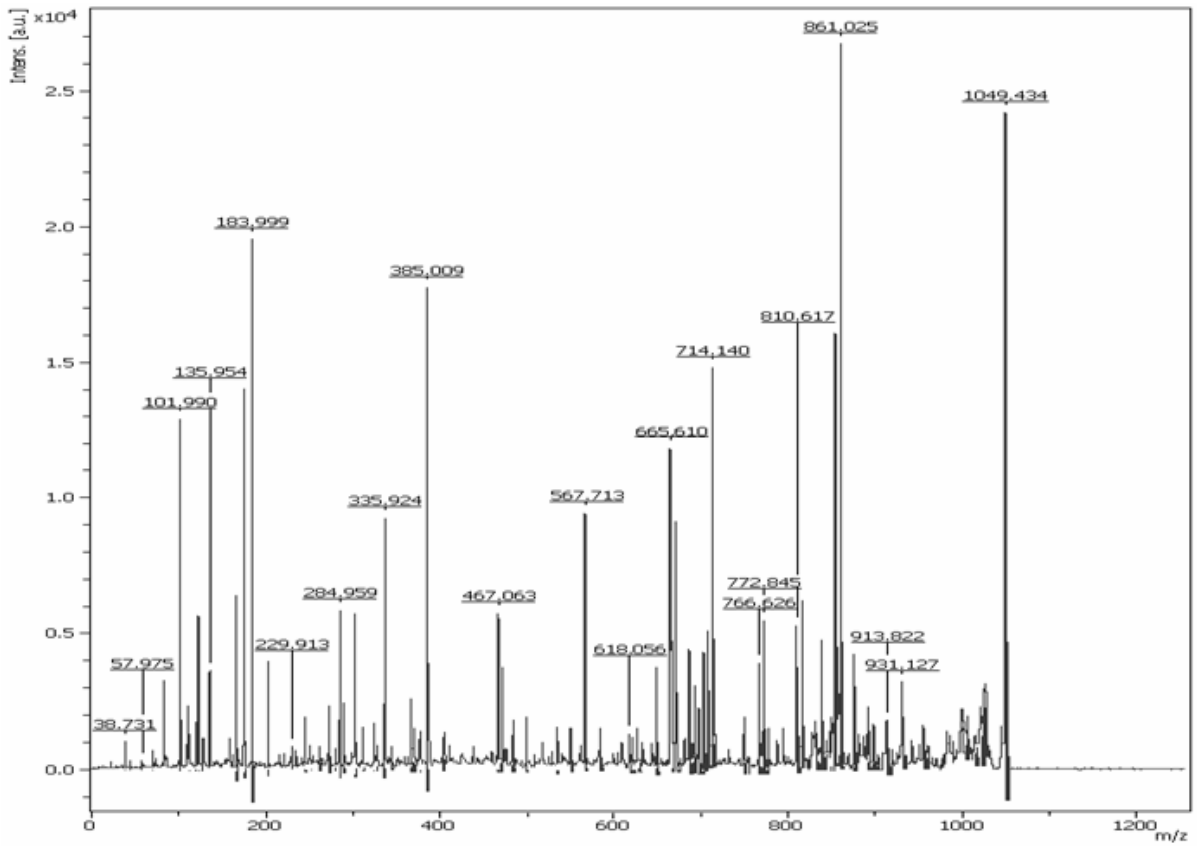


Fig. 3. Glycoprotein staining of HSHMG proteins from jackfruit latex. Glycoprotein stain (Right). Lane 1 is marker proteins. The glycosylated markers are ovalbumin and Rnase B, and non-glycosylated markers are Bovine serum albumin (BSA) and β-casein. Lanes 2 and 3 are HSHMG and its monomers, respectively. After the glycoprotein stain, the gel (Right) was stained with Colloidal Coomassie briliant blue G-250 (Left).

A)

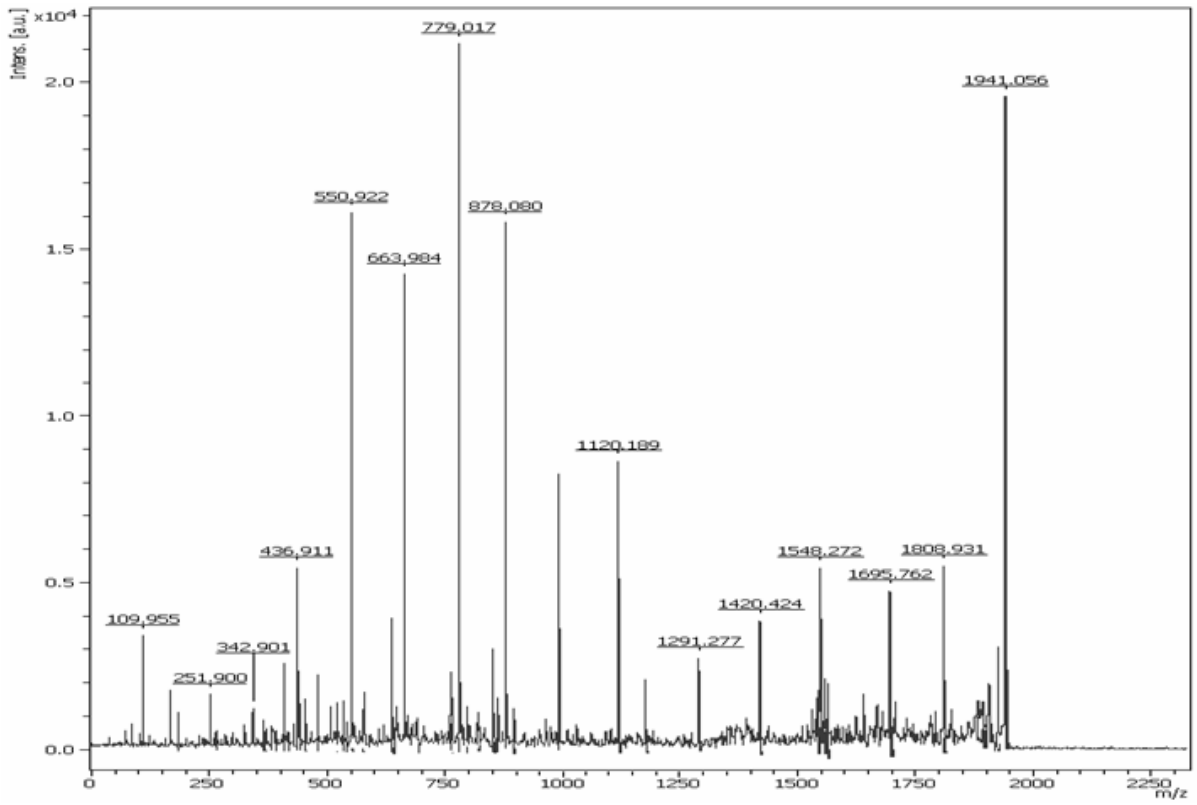


B)

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 5	618.0560	617.0487	617.2843	-0.2355	0	-.MNPEK.F
2 - 9	1000.9000	999.8927	999.5138	0.3790	1	M.NPEKFTHK.T
65 - 72	913.8220	912.8147	912.5756	0.2391	1	R.VINQALKK.L
92 - 94	387.9440	386.9367	386.2641	0.6726	0	K.VIR.R
95 - 101	772.8450	771.8377	771.4351	0.4026	1	R.RAQAAQK.S
95 - 103	1015.1610	1014.1537	1014.5682	-0.4145	2	R.RAQAAQKSR.G
139 - 145	861.0250	860.0177	859.4763	0.5414	1	K.SEVEKLR.G
185 - 190	816.8450	815.8377	816.4090	-0.5712	1	R.DEEIRR.V
254 - 259	766.6260	765.6187	765.3293	0.2894	0	R.GEFEER.L
260 - 265	687.4350	686.4277	686.4690	-0.0413	1	R.LKSVLK.E
266 - 273	876.2050	875.1977	875.3872	-0.1895	0	K.EVEDAEGK.V

Fig. 4. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of spot number 1. (A) Illustration of a peptide mass fingerprint of a monomer of HSHMG (33 kDa). (B) Peptide mass fingerprint of the observed mass was performed using the MASCOT search engine. Observed masses (11 of 77 masses) were matched to 26.779 kDa of chloroplastic small heat-shock protein of *Petunia hybrida*. Them matched masses were converted to amino acid sequences along variable residue sites and covered 24% of the protein sequence.

A)

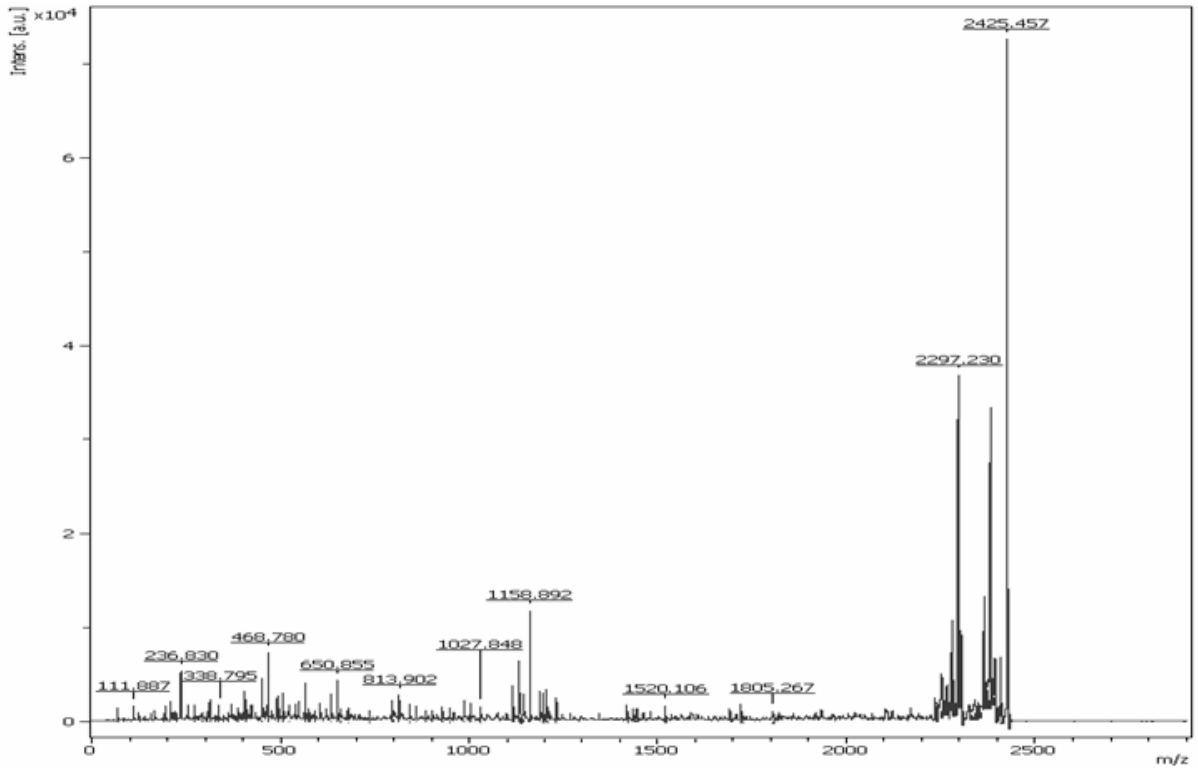


B)

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
303 - 307	533.9300	532.9227	532.3043	0.6184	0	K.VCAIK.A
336 - 341	646.9910	645.9837	645.3697	0.6140	0	R.GLSLEK.I
353 - 357	575.6400	574.6327	574.3439	0.2889	0	K.VTVTR.D
353 - 370	1924.1690	1923.1617	1924.0378	-0.8761	2	K.VTVTRDDTIILHGGGDKK.L
386 - 398	1557.5620	1556.5547	1555.7114	0.8433	1	K.STSTFDQEKTQER.L
395 - 401	861.0780	860.0707	860.4716	-0.4008	1	K.TQERLSK.L
402 - 410	878.0800	877.0727	876.5069	0.5658	0	K.LSGGVAVFK.V
411 - 422	1177.1810	1176.1737	1175.5418	0.6319	0	K.VGGASESEVGER.K
423 - 425	418.9340	417.9267	417.2336	0.6932	1	R.KDR.V
516 - 529	1548.2720	1547.2647	1546.8429	0.4218	1	K.YVDMVKAGIIDPVK.V

Fig. 5. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of spot number 2. (A) Illustration of a peptide mass fingerprint of a monomer of HSHMG (31 kDa). (B) Peptide mass fingerprint of the observed mass (10 of 67) was performed using the MASCOT search engine. Observed masses (11 of 77 masses) were matched to 60.429 kDa of mitochondrial chaperonin CPN60-like 2 of *Arabidopsis thaliana*. Them matched masses were converted to amino acid sequences along variable residue sites and covered 14% of the protein sequence.

A)



B)

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 25	2409.6420	2408.6347	2409.1920	-0.5572	0	-.MASTLSFAASALCSPLAPSPSVSSK.S
2 - 25	2279.3400	2278.3327	2278.1515	0.1812	0	M.ASTLSFAASALCSPLAPSPSVSSK.S
26 - 36	1194.9900	1193.9827	1194.6033	-0.6206	0	K.SATPFSVSFPR.K
42 - 43	287.8020	286.7947	287.1957	-0.4010	0	R.IR.A
42 - 61	2340.6210	2339.6137	2339.1942	0.4196	2	R.IRAQDQRENSIDVVQQGQQK.G
94 - 96	406.7670	405.7597	406.1998	-0.4401	0	R.TMR.Q
97 - 115	2260.8300	2259.8227	2258.9792	0.8435	1	R.QMLDTMDRMFEDTMPVSGR.N
105 - 126	2381.0130	2380.0057	2381.1216	-1.1159	2	R.MFEDTMPVSGRNRGGSGVSEIR.A
116 - 126	1130.9320	1129.9247	1130.5792	-0.6545	1	R.NRGGSGVSEIR.A
140 - 141	305.7820	304.7747	305.1521	-0.3774	0	K.MR.F
150 - 153	489.7610	488.7537	489.2435	-0.4897	0	K.EDVK.I
165 - 168	461.7980	460.7907	460.2281	0.5626	0	K.GEQK.K
221 - 227	813.9020	812.8947	813.4596	-0.5649	0	K.VIDVQIQ.-

Fig. 6. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of spot number 3. (A) Illustration of a peptide mass fingerprint of a monomer of HSHMG (29 kDa). (B) Peptide mass fingerprint of the observed mass (10 of 67) was performed using the MASCOT search engine. Observed masses (13 of 129 masses) were matched to 25.328 kDa of chloroplastic small heat-shock protein of *Arabidopsis thaliana*. Then matched masses were converted to amino acid sequences along variable residue sites and covered 46% of the protein sequence.

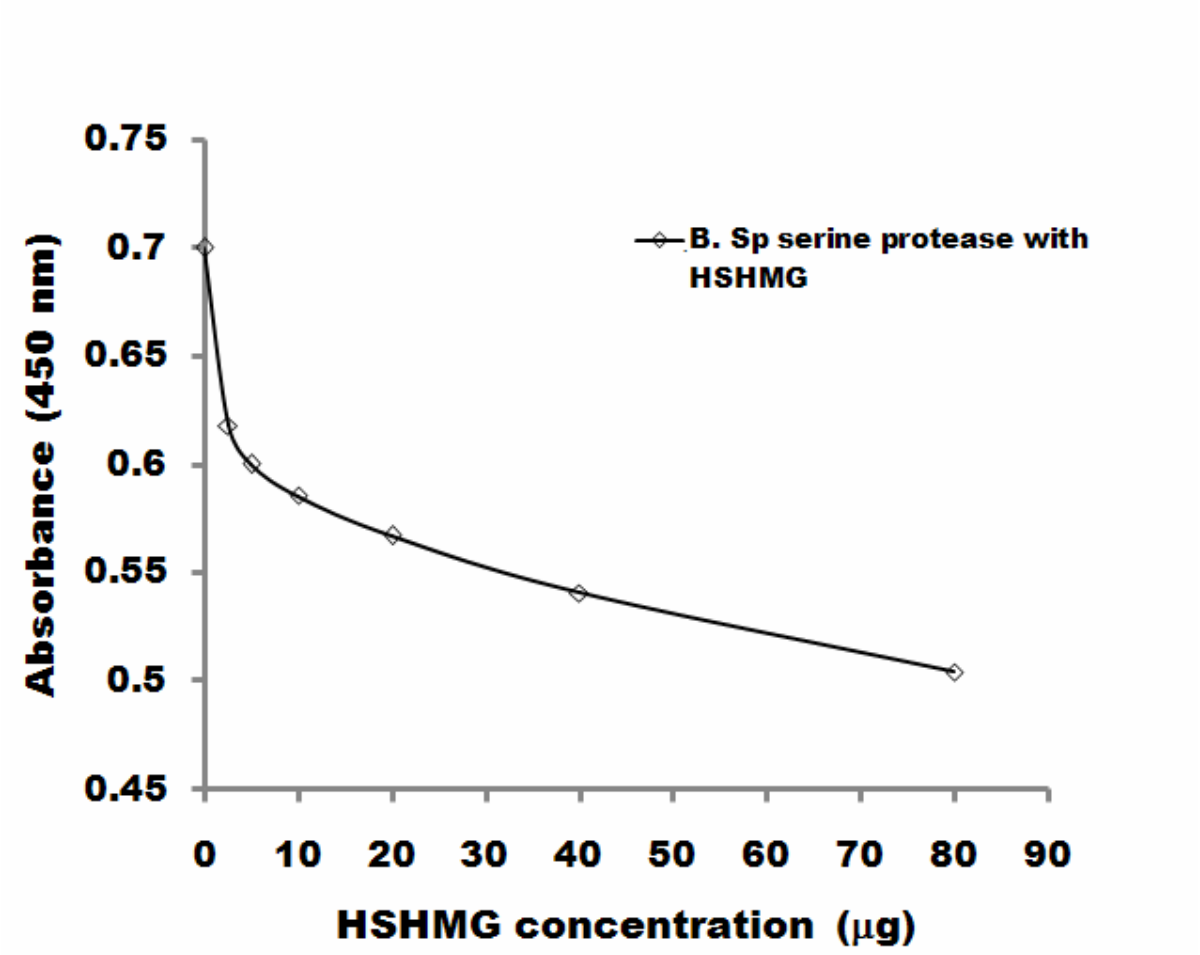


Fig. 7. Functional activity assay of HSHMG as serine protease inhibitors. Functional activity of HSHMG was tested with the serine protease from *Bacillus* sp. Enzyme and HSHMG were mixed and allowed to bind for 20 min at 37 °C. The decreasing absorbance (A_{450}) was generated by the protease inhibitor function of the purified latex proteins.

Tables

Table 1 Purification of HSHMG from jackfruit latex. The results are the average values of two separate experiments.

Purification step	Protein concentration (mg)	Yield (%)
1. Total crude latex protein	1,662.2	100
2. Supernatant after boiling	807.8	4.6
3. Dialysis with 50 mM Sodium acetate, pH 4.5	85.7	5.2
4. Q sepharose anion exchange Chromatography (HSHMG fraction)	18.6	1.1

Table 2 Effect of HSHMG on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT)

Latex (μg)	PT (s)	APTT (s)
Control (Tris-HCl, pH 8.8)	15.7 ± 2.8[a]	44.6 ± 4.8[a]
18.5	15.5 ± 2.5[b]	43.8 ± 4.3[b]
37	15.8 ± 2.3[b]	44.9 ± 5.2[b]
185	16.1 ± 2.5[b]	61.5 ± 7.8[c]
370	16.3 ± 2.5[b]	79.0 ± 10.1[c]

Values are mean ± S.D. (n = 10). Comparison of human blood coagulation time between purified latex (HSHMG) and control was performed using independent samples *t*-Test. For PT, letter (b) is not significantly different from letter (a) at $P > 0.05$. For APTT, letter (b) is not significantly different from letter (a) at $P > 0.05$. Letter (c) is significantly different from letter (a) at $P < 0.05$.

References

Ajayi, I.A., 2008. Comparative study of the chemical composition and mineral element content of *Artocarpus heterophyllus* and *Treculia africana* seeds and seed oils. Bioresour. Technol. 99, 5125-5129.

Bode, W., Huber, R., 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochim. Biophys. Acta. 1477, 241-52.

Bohlooli, S., Mohebipoor, A., Mohammadi, S., Kouhnavard, M., Pashapoor, S., 2007, Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts (*Verruca vulgaris*) vs. cryotherapy. Int. J. Dermatol. 46, 524-526.

Brown, B.A., 1988. Haematology: Principles and Procedures, 5th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 195-215.

Carranco, R., Almoguera, C., Jordano, J., 1997. A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. J. Biol. Chem. 272, 27470-27475.

Dafforn, T.R., Della, M., Miller, A.D., 2001. The molecular interactions of heat shock protein 47 (Hsp47) and their implications for collagen biosynthesis. J. Biol. Chem. 276, 49310-49319.

Fernando, M.R., Wickramasinghe, N., Thabrew, M.I., Ariyananda, P.L., Karunanayake, E.H., 1991. Effect of *Artocarpus heterophyllus* and *Asteracanthus longifolia* on glucose tolerance in normal human subjects and in maturity-onset diabetic patients. J. Ethnopharmacol. 31, 277-282.

Gurung, S., Skalko-Basnet, N., 2009. Wound healing properties of Carica papaya latex: in vivo evaluation in mice burn model. J. Ethnopharmacol. 121, 338-341.

Hayashi, K., Takehisa, T., Hamato, N., Takano, R., Hara, S., Miyata, T., Kato, H., 1994. Inhibition of serine proteases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. J. Biochem. 116, 1013-1018.

Ivanciu, L., Gerard, R.D., Tang, H., Lupu, F., Lupu, C., 2007. Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27, 310-316.

Kabir, S., 1995. The isolation and characterisation of jacalin [*Artocarpus heterophyllus* (jackfruit) lectin] based on its charge properties. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27, 147-156.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Mekkriengkrai, D., Ute, K., Swiezewska, E., Chojnacki, T., Tanaka, Y., Sakdapipanich, J.T., 2004. Structural characterization of rubber from jackfruit and euphorbia as a model of natural rubber. Biomacromolecules 5, 2013-1019.

Osoniyi, O., Onajobi, F., 2003. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. J. Ethnopharmacol. 89, 101-105.

Rayon, C., Lerouge, P., Faye, L., 1998. The protein N-glycosylation in plants. J. Exp. Bot. 49, 1463–1472.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68, 850–858.

Shimokawa, K., Katayama, M., Matsuda, Y., Takahashi, H., Hara, I., Sato, H., Kaneko, S., 2002. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. Mol. Hum. Reprod. 8, 32-36.

Shivaprasad, H.V., Rajesh, R., Nanda, B.L., Dharmappa, K.K., Vishwanath, B.S., 2009. Thrombin like activity of *Asclepias curassavica* L. latex: action of cysteine proteases. J. Ethnopharmacol. 123, 106-109.

Shyamalamma, S., Chandra, S.B., Hegde, M., Naryanswamy, P., 2008. Evaluation of genetic diversity in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) based on amplified fragment length polymorphism markers. Genet. Mol. Res. 7, 645-656.

Toma, W., Hiruma-Lima, C.A., Guerrero, R.O., Brito, A.R., 2005. Preliminary studies of *Mammea americana* L. (Guttiferae) bark/latex extract point to an effective antiulcer effect on gastric ulcer models in mice. Phytomedicine 12, 345-350.

Wang, W., Vinocur. B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Sci. 9, 244-252.