

เทคนิคโปรตีโอมิกสำหรับการวิเคราะห์วิถีชีวสังเคราะห์สารพิษในสบู่ดำ

Proteomic Techniques for Analysis of Toxin Biosynthetic Pathways in *Jatropha curcas*

สุภา แก้วสุริวงษ์¹ จันทรสม์ โคมเวียน² สิทธิรักษ์ รอยตระกูล³และ วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกุล^{4*}

Supha Kaewsuriwong¹ Jantarush Comwien² Sittiruk Roytrakul² and Warawut Chulalaksananukul^{4*}

¹ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาสหสาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120

⁴หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

¹Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Department of Environmental Science, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Genome Institute, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), NSTDA, Pathumthani 12120, Thailand

⁴Biofuels by Biocatalysts Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

*Corresponding author: warawut.c@chula.ac.th.

บทคัดย่อ

ฟอรับอลเอสเทอร์จัดเป็นสารพิษหลักที่พบได้ในส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ โดยปริมาณสารพิษฟอรับอลเอสเทอร์ที่แยกได้จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยมีปัจจัยเสริมมาจากสภาวะแวดล้อมและดินในแต่ละพื้นที่ปลูก เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า สารฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารพิษที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอก ซึ่งส่งผลเสียโดยตรงกับคนและสัตว์ เป็น

เหตุให้สบู่ดำเป็นพืชที่ไม่สามารถนำมาใช้ได้ในด้านอาหารของคนและสัตว์ แต่ด้วยสบู่ดำนั้นมีปริมาณน้ำมันที่สูง จึงมีการนำน้ำมันและกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันได้นั้นมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันกากสบู่ดำยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้เนื่องด้วยปัญหาสารพิษที่อยู่ในสบู่ดำ จึงนำมาสู่การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในผลสบู่ดำ เพื่อนำมาอธิบายวิถีชีวสังเคราะห์ของสารสารฟอรับอล

เอสเทอร์และวิถีที่เกี่ยวข้อง ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเชิงปริมาณและคุณภาพที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูง การนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ในผลสบู่ดำ ข้อมูลที่ได้นี้จะประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำให้ลดสารพิษนี้ลงได้ในอนาคต

ABSTRACT

Phorbol esters (PEs) are main toxins found in several parts of *Jatropha curcas*. The amount of PEs in *Jatropha curcas* differ by species depending on the climate and soil in each area. PEs are known to promote tumor growth and are poisonous to humans and animals. Several utilizations of *Jatropha* oil and *Jatropha* kernel meal obtained after oil extraction are therefore restricted. In this work, protein expression in *Jatropha curcas* fruits was studied to understand PEs biosynthetic pathway and its related pathway. Proteomics is a technique used to analyse changes in quantity and quality of protein expression with high efficiency and accuracy. The use of proteomics approach to study changes of PEs biosynthetic proteins in fruits would be highly beneficial in *Jatropha curcas* breeding to reduce PEs in the future.

คำสำคัญ: สบู่ดำ; ฟอร์บอลเอสเทอร์; โปรตีโอมิกส์

Keywords: *Jatropha curcas*; phorbol esters; proteomics

บทนำ

สบู่ดำเป็นพืชที่มนุษย์รู้จักและคุ้นเคยมายาวนาน ปัจจุบันสบู่ดำกำลังได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวางในแง่ของพืชที่มีศักยภาพในการนำเมล็ดมาสกัดน้ำมันเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทนเชื้อเพลิงที่มาจากฟอสซิล (fossil fuel) ทำให้ในประเทศอินเดีย จีน อเมริกาได้ และแอฟริกาจึงมีการปลูกพืชสบู่ดำเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (Devappa *et al.*, 2010a) นอกจากนี้กากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันยังพบว่ามีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่ากากถั่วเหลือง ซึ่งมีความเหมาะสมอย่างมากที่จะนำมาใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ (Devappa *et al.*, 2010b; Yunping *et al.*, 2012) แต่การนำน้ำมันและกากสบู่ดำที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่ายังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากสบู่ดำมีสารพิษอยู่หลายชนิด และพบกระจายทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เคอร์ซิน (curcin) ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitors) และฟอร์บอลเอสเทอร์ (phorbol esters, PEs) (Wei, 2011) ซึ่งจากสารพิษต่างๆ ที่แยกได้จากสบู่ดำพบว่าฟอร์บอลเอสเทอร์เป็นสารพิษหลักที่พบและพบมากสุดในเมล็ด โดยปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ยังเป็นดัชนีชี้วัดความเป็นพิษของสบู่ดำแต่ละสายพันธุ์

ในบทความนี้จะกล่าวถึง ความเป็นมาของสบู่ดำ วิถีสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ (terpenoid biosynthesis pathway) เมทาบอลิต์ที่เกี่ยวข้องรวมถึงแนวทางการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์และความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้อธิบายกลไก หน้าที่และการทำนายยีนในวิถีสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจในวิถีสังเคราะห์สารพิษฟอร์บอลเอสเทอร์ในสบู่ดำ ซึ่งข้อมูลต่างๆ เหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและนำมาประยุกต์ในงานด้านการแพทย์และ

การเกษตรในอนาคต เช่น การสกัดสารพิษเคมีเพื่อนำมาทำเป็นยารักษาโรคหรือยากำจัดศัตรูพืช การหาวิธีกำจัดหรือลดปริมาณสารพิษจากน้ำมันและกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันเพื่อลดข้อจำกัดในการนำมาใช้งาน รวมถึงการหาวิธีในการควบคุมการส่งออกของยีนและปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำที่ไม่มีหรือมีสารพิษฟอรับอลเอสเทอร์น้อยที่สุด

สบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae (วงศ์เดียวกับยางพารา) ซึ่งมีอยู่ทั้งหมดประมาณ 175 สกุล (Devappa *et al.*, 2010b) สบู่ดำจัดเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเขตร้อนแถบอเมริกาใต้ มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. และมีชื่อเรียกทั่วไป ได้แก่ Physic nut, Purging nut, Fig nut, Pig nut, Sabudam (Sujatha and Mukta, 1996; Siang *et al.*, 2012) ลักษณะโดยทั่วไป สบู่ดำจัดเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง มีอายุยาวนานหลายสิบปี สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมและดินในแต่ละพื้นที่ได้ดี โตเร็ว มีปัญหาโรคและแมลงรบกวนน้อย ในประเทศไทยสบู่ดำสามารถเจริญได้ทุกที่และมีชื่อเรียกเฉพาะถิ่นที่แตกต่างกันไป ภาคใต้เรียก หงเทศ ภาคกลางเรียก สบู่ดำ ภาคเหนือเรียก มะหุ้งฮั่ว ภาคอีสานเรียก บักเยาหรือบักสีหลอด (รักษ์ พฤษชาติ, 2552)

สบู่ดำจัดเป็นพืชที่สามารถนำทุกส่วนมาใช้ประโยชน์ได้โดยเฉพาะเมล็ด ภายในเมล็ดมีน้ำมันสะสมอยู่ประมาณ 54-58 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันที่ได้จากการสกัดสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้โดยตรงกับเครื่องยนต์ที่มีกำลังรอบต่ำหรือสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล (Wei, 2011; Xu *et al.*, 2011) ได้ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางด้านอาหาร นอกจากนี้เมล็ดยังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 22-28 เปอร์เซ็นต์ และจาก

ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่สูงจึงได้มีความพยายามในการหาวิธีกำจัดหรือลดปริมาณสารพิษออกกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันเพื่อนำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งปัจจุบันพบว่ากากที่เหลือส่วนใหญ่ยังถูกทิ้งหรือนำไปใช้ในการทำปุ๋ย (Devappa *et al.*, 2010b; Wei, 2011) จากรายงานการศึกษาของ Wei (2011) กรดไขมันที่สร้างและสะสมในเมล็ดสบู่ดำจะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลี-

เซอรอล (triacylglycerol, TAG) ที่สำคัญองค์ประกอบของกรดไขมันในเมล็ดสบู่ดำยังเหมือนกันกับกรดไขมันที่เป็นสารอาหารของมนุษย์ แต่น้ำมันก็ไม่สามารถนำมาใช้เพื่อการบริโภคได้เนื่องจากมีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์อยู่หลายชนิดโดยเฉพาะฟอรับอลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นสารพิษหลักที่พบในเมล็ดสบู่ดำและเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้การนำน้ำมันรวมถึงกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมาใช้ประโยชน์มีข้อจำกัด

สารฟอรับอลเอสเทอร์

ฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารพิษที่พบได้ในเมล็ดและน้ำยางของพืชวงศ์ Euphorbiaceae และ Thymelaeaceae (Ahmed and Salimon, 2009) ซึ่งในสบู่ดำจะพบสารฟอรับอลเอสเทอร์ได้ในเมล็ด ใบ ลำต้น ราก ดอกและเปลือกลำต้น แต่จะไม่พบสารดังกล่าวในน้ำยาง โดยภายในเมล็ดจะมีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์อยู่สูงที่สุด

ฟอรับอลเอสเทอร์จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มทิกเลน (tiglane) หรือ เตตราไซคลิกไดเทอร์พีนส์ คาร์บอนสเคเลตัน (tetracyclic diterpene carbon skeleton) ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันกับโครงสร้างของสารในกลุ่มทิกเลน โดยโครงสร้างพื้นฐานของสารในกลุ่มทิกเลนประกอบด้วยวงแหวน 4 วง และมีแอลกอฮอล์เป็นส่วนหนึ่งในโครงสร้าง (Figure 1) ขณะที่โครงสร้างพื้นฐานของสารฟอรับอลเอสเทอร์ประ-

กอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งจะเข้าจับกับโครงสร้างด้วยพันธะเอสเทอร์ในตำแหน่งๆ ต่างกัน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดสารฟอร์บอล เอสเทอร์ มีรายงานว่าสารฟอร์บอลเอสเทอร์ที่แยกได้จากน้ำมันสบู่ดำมีอยู่ทั้งหมด 6 แบบ (Goel *et al.*, 2007; Ahmed and Salimon, 2009) (Figure 2)

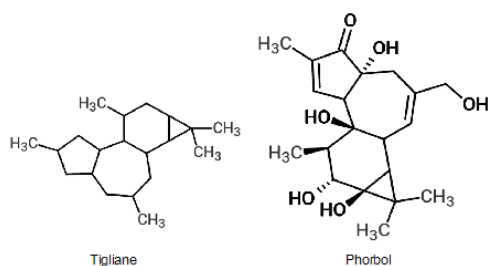


Figure 1 Chemical structures of tiglane and phorbol (source: Goel *et al.*, 2007)

ฟอร์บอลเอสเทอร์จัดเป็นสารซึ่งเมื่อได้รับพืชจะส่งผลโดยตรงกับคนและสัตว์ จากรายงานการศึกษาสารฟอร์บอลเอสเทอร์สามารถส่งเสริมการเกิดเนื้องอก (tumor promoting activity) โดยสารจะไปกระตุ้นโปรตีน ไคเนส ซี (protein kinase C) ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ การสังเคราะห์โปรตีนรวมถึงดีเอ็นเอผิดปกติไป นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และชักนำให้เกิดลิมโฟลิต (Ahmed and Salimon, 2009) ได้ (Figure 3)

วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์

วิถีชีวสังเคราะห์ในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูแคริโอต (Eukaryote) ที่มีบทบาทสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ มี 3 วิธี คือ วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ วิถีชีวสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ (Isoprenoid biosynthesis pathway) และวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนส์ (terpenes biosynthesis pathway) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์

สารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เช่น สเตอรอลด์ (sterols) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฮอร์โมน (hormones) และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite)

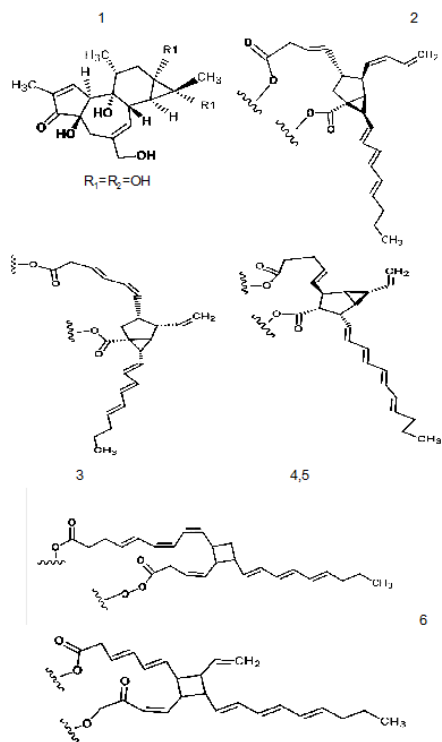


Figure 2 Chemical structures of Jatropa factors (C1 to C6) from *J. curcas* (source: Haas *et al.*, 2002)

เช่น มอโนเทอร์พีนส์ (monoterpenes) ไดเทอร์พีนส์ (diterpene) หรือ ไดเทอร์พีนอยด์ (diterpenoid) และ เซสควิเทอร์พีนส์ (sesquiterpenes) (Kirby *et al.*, 2010) วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ประกอบด้วย 2 วิถีย่อย ได้แก่ 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway ที่เกิดในคลอโรพลาสต์ และ mevalonic acid (MVA) pathway ที่เกิดในไซโทซอล (Vickers *et al.*, 2009) (Figure 4)

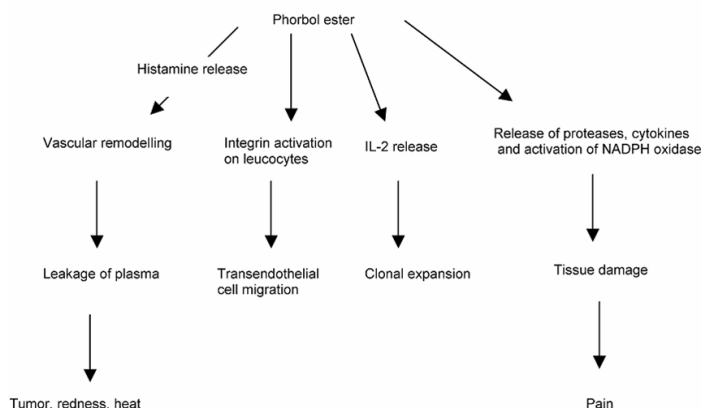


Figure 3 Some responses induced by phorbol esters (Goel *et al.*, 2007)

จากรายงานการวิจัยวิธีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ที่พบในสัตว์ เชื้อราและแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตอรอยด์ ฮอร์โมนและฟีโรโมน (Pheromone) (Miziorko *et al.*, 2011) ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนจากรายงานการวิจัยของ Caballero *et al.*

(2014) ที่ได้นำเอาเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ในวิถี mevalonate จากต่อมที่ผลิตฟีโรโมนในริ้นฝอยทราย (*Lutzomyia longipalpis*) โดยสามารถระบุโปรตีนได้ทั้งหมด 542 ชนิด และพบมีโปรตีนในวิถี

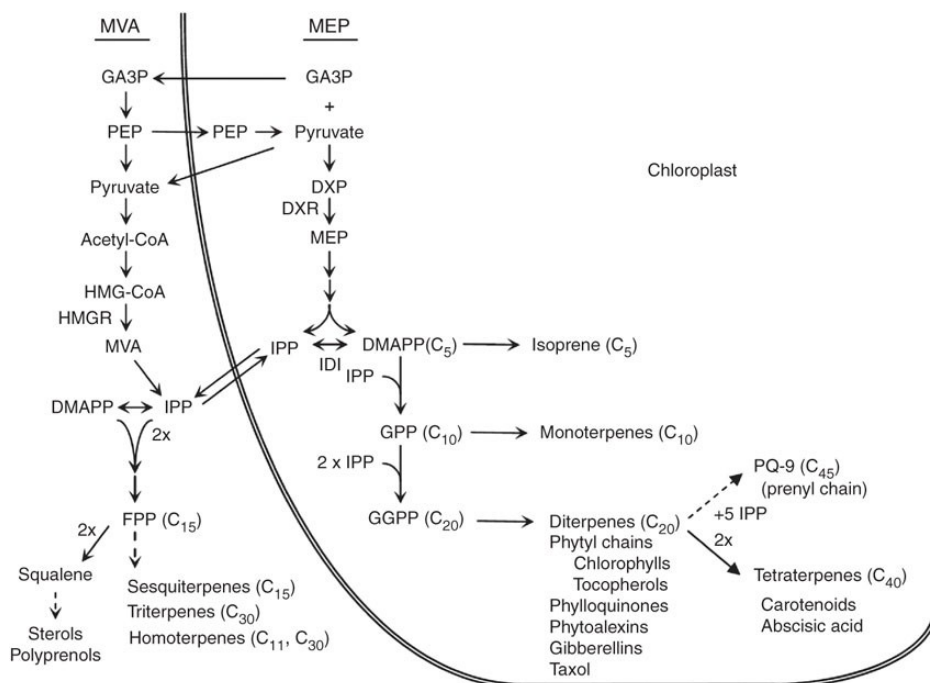


Figure 4 Isoprenoid biosynthesis pathway in plant cell (Vickers *et al.*, 2009)

mevalonate อยู่ 12 ชนิด ที่ทำหน้าที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของฟิโรโมนหรือกลิ่น เช่น glutaminyl-tRNA synthetase, phosphoglycerate kinase, succinylCo-A synthetase alpha subunit, transketolase, glutathione S transferases, cytochrome family proteins นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีในวิถี mevalonate สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Nieto *et al.* (2009) ในพืช *Arabidopsis thaliana* ที่พบว่า 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR, EC 1.1.1.34) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีหลักในวิถี mevalonate

ในพืชวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์มีความสัมพันธ์กับการชีวสังเคราะห์สารพิษเคมีโดยมีสารตั้งต้น คือ ไอโซเพนทิลไพโรฟอสเฟต (isopentyl pyrophosphate (IPP)) และไดเมทิลอัลลิล ไดฟอสเฟต (dimethylallyl -diphosphate, DMAPP)

ไดเทอร์พีนส์เป็นสารในกลุ่มเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ วิถีชีวสังเคราะห์สารเกิดขึ้นได้โดยมีสารตั้งต้น คือ เจรานิลเจารานิล ไพโรฟอสเฟต (geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)) จากรายงานการวิจัยของ Devappa *et al.* (2011) สามารถแยกไดเทอร์พีนส์จากสบู่ดำได้มากถึง 68 ประเภท เช่น คาสบีนส์ (casbene) ดาฟเนน (daphnane) ลาทิลเลน (lathyrane) จาโตรเพน (jatrophone) โพโดคาร์เพน (podocarpane) แรมโนโฟเลน (rhamnofolane) (Figure 5) กลุ่มสารไดเทอร์พีนส์ที่แยกได้จากสบู่ดำพบว่าเป็นสารที่มีพิษ (Devappa *et al.*, 2011) เช่น ฟอร์บอลเอสเทอร์

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยที่สามารถอธิบายถึงวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ ได้

อย่างชัดเจน (Devappa *et al.*, 2011) แต่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าฟอร์บอลเอสเทอร์ เป็นพิษ ก็เป็นอนุพันธ์ของสารประเภทสารพิษในกลุ่มทิกเลน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (diterpenes) และไดเทอร์พีนส์ที่อยู่ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ดังนั้นความเข้าใจในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ อาจนำมาใช้ในการอธิบายและทำนายยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ได้

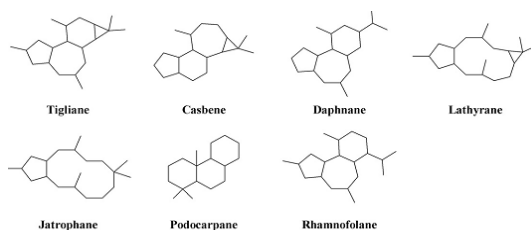


Figure 5 Chemical structures of some *Jatropha* diterpenes (Sabandar *et al.*, 2013)

เทคนิคทั่วไปในการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน

เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตจะมีจำนวนและชนิดโปรตีนแตกต่างกัน ภายใต้การควบคุมการทำงานของยีน ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีนก็จะแตกต่างกันไปด้วย ซึ่งวิธีในการติดตามการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ด้วย Western blot และการวิเคราะห์จากกิจกรรมของเอนไซม์

Western blot หรือ immunoblotting เป็นวิธีที่ใช้ติดตามการแสดงออกของโปรตีนเฉพาะที่สนใจในเชิงปริมาณ โดยมีขั้นตอนต่างๆ เช่น การตรวจสอบโปรตีน (protein assay) การแยกโมเลกุลโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) การเปลี่ยนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยังเมม

เบรน (protein transfer) และการตรวจสอบโปรตีน (protein detection) (Gürtler *et al.*, 2013) ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ก็มีหลักการคล้ายกับวิธี Western blot แต่ในขั้นตอนการวิเคราะห์และประมวลผลจะแตกต่างกัน เนื่องจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์มีความซับซ้อนน้อยกว่า โดยภาพรวมทั้ง 2 วิธีนี้ จะมีข้อจำกัดในเรื่องความจำเพาะของแอนติบอดีหรือสารที่นำมาใช้ติดตามการแสดงออกของโปรตีน

เทคนิคโปรติโอมิกส์กับการทำนายยีนที่สัมพันธ์กับการชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์

โปรติโอมิกส์ คือเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของโปรตีนที่มีการแสดงอยู่ทั้งหมดในเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษา ถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 และเริ่มรู้จักกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (Vanderschuren *et al.*, 2013)

โปรติโอมิกส์จัดเป็นเทคนิคในการวิเคราะห์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำมากเนื่องจากเป็นผลการพิสูจน์โมเลกุลของโปรตีนที่พร้อมทำงานจริง ณ เวลานั้นๆ (Booranasisak *et al.*, 2013) ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาอธิบายกลไกการทำงาน หน้าที่ รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนด้วยกัน ขณะเดียวกันก็มีข้อจำกัดในเรื่องของฐานข้อมูลอ้างอิง กล่าวคือไม่สามารถระบุโปรตีนได้ทั้งหมด ขั้นตอนพื้นฐานโดยทั่วไปของการวิเคราะห์ทางโปรติโอมิกส์ มีดังนี้

1. การแยกโมเลกุลโปรตีน เริ่มจากการสกัดโปรตีนจากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นจึงแยกโมเลกุลโปรตีนด้วย polyacrylamide gel ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ two-dimensional (2-D) polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) (Thelen, 2013) ในการแยก โดยเจลทั้ง 2 แบบ จะมี

หลักในการแยกโมเลกุลโปรตีนที่ต่างกัน ซึ่งการเลือกชนิดเจลที่จะใช้ในการแยกตัวอย่างก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานและการนำไปวิเคราะห์ต่อ เช่น SDS-PAGE จะแยกโมเลกุลโปรตีนตามขนาด ขณะที่ 2-D gel electrophoresis จะใช้วิธี Isoelectric focusing (IEF) แยกประจุสุทธิของโปรตีน (ค่า pI) ตามด้วยการใช้ SDS-PAGE แยกโมเลกุลโปรตีนตามขนาด

2. การวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์ (peptide) เริ่มจากการตัดแถบโปรตีนที่ปรากฏบนเจลตามช่วงมวลโมเลกุลให้เป็นชิ้นเล็กๆ และทำการย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์โดยใช้เอนไซม์ เช่น ทริปซิน (trypsin) จากนั้นจึงใช้หลักการเปลี่ยนสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้กลายเป็นไอออนด้วยเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ ยกตัวอย่างเช่น Liquid Chromatography Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry (LC-MS / MS) และ matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) - time of flight (TOF) mass spectrometry หรือ MALDI-TOF (Newton *et al.*, 2004) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วทั้ง LC-MS / MS และ MALDI-TOF จะมีหลักการทำงานที่คล้ายกัน ดังนั้นการเลือกใช้เครื่องมือให้เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานที่ต้องการศึกษา

3. การระบุโปรตีน เริ่มจากการนำข้อมูล MS/MS spectra ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS หรือ MALDI-TOF มาวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ต่างๆ (Table 1) รวมถึงนำมาสืบค้นกับฐานข้อมูลจนกระทั่งได้ออกมาเป็นรายชื่อโปรตีนและรูปแบบการแสดงออก ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เราสามารถนำมาระบุหน้าที่ โครงสร้าง กลไกการทำงาน ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนด้วยกันหรือโปรตีนกับสารชีวโมเลกุลอื่นๆ รวมถึงวิถีชีวสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องได้

Table 1 Internet sites used for proteomic analysis (Newton *et al.*, 2004)

Internet site	Useful utilities	Site address
Protein prospector	Search databases with PMF and MS/MS data. theoretical data for a known peptide sequence	http://prospector.ucsf.edu
PROWL	Search databases with PMF and MS/MS data. Provide theoretical data and useful protocols	http://prowl.rockefeller.edu/PROWL/prowl.html
ExPASy	PMF database searches, theoretical tools and links to many other sites	http://us.expasy.org
PeptideSearch	Search PMF data or a sequence tag	http://www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages
Mascot	Search databases with PMF and MS/MS data and sequence tags	http://www.matrixscience.com
PepMAPPER	Search databases with PMF data	http://wolf.bms.umist.ac.uk/mapper/
MOWSE	Search databases with PMF data	http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse
PredictProtein server	Gives theoretical fragments and data on a protein amino acid sequence	http://www.ebi.ac.uk/~rost/predictprotein/
BLAST	Search sequence tags	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

ปัจจุบันเทคนิคโปรตีโอมิกส์ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายด้านการเกษตรและการแพทย์ ในด้านการเกษตรได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ศึกษากับพืชต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์แตกต่างกันไป และในสับุดำก็มีรายงานการวิจัยของ Yang *et al.* (2009) ซึ่งได้นำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาอธิบายการแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของไขมันตั้งแต่ช่วงที่เมล็ดงอกและหลังการงอกของเมล็ดสับุดำ โดยพบว่ามี 50 โปรตีน ที่สัมพันธ์กับวิถีต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของไขมัน เช่น เบต้าออกซิเดชัน (β -oxidation), วัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate

cycle), ไกลโคไลซิส (glycolysis), วัฏจักรกรดซิตริก (citric acid cycle), กลูโคนีโอเจนีซิส (Gluconeogenesis) และ เพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate)

นอกจากนี้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ยังได้นำมาใช้อธิบายกลไกและหน้าที่รวมถึงแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กับการสร้างและการสะสมกรดไขมันจากตัวอย่างระยะพัฒนาการของเมล็ดสับุดำ มีผลการวิจัยที่นำเอาผลการแสดงออกโปรตีนมาใช้หาความสัมพันธ์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งพบว่ามีโปรตีน 22 ชนิดที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์กรดไขมัน (Table 2) และจากการ

เลือกติดตามระดับการแสดงออกของ 4 ยีน ได้แก่ *acetyl CoA carboxylase (ACCCase)*, *phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)*, *mercaptopyruvate sulfertransferase (MST)* และ *4-coumarate : coenzyme A ligase (4CL)*) ด้วยเทคนิค realtime PCR พบว่าแนวโน้มการแสดงออกของทั้ง 4 ยีน ในแต่ละตัวอย่าง สอดคล้องกับข้อมูลปริมาณกรดไขมันอิสระที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) และมีการเสนอกฎไกการแสดงออกของยีนเหล่านี้ต่อระดับการผลิตน้ำมันของเมล็ดสบู่ดำระยะต่างๆของพัฒนาการเมล็ด (Booranasrisak *et al.*, 2013)

เทคนิคโปรตีนโอมิกส์สามารถนำมาใช้วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนในเอ็มบริโอ (embryo) และเอนโดสเปิร์ม (endosperm) จากตัวอย่างเมล็ดสบู่ดำแห้ง พบว่าเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดมีโปรตีนบางส่วนของที่แสดงออกแตกต่างกัน และสามารถระบุหน้าที่ของโปรตีนได้ 14 ชนิด เช่น dihydrolipoamide acetyltransferase, Small Ras-like GTP-binding protein, Branched-chain amino acid transaminase, S-D-lactoylglutathione methylglyoxal lyase โดยพบว่าโปรตีนในเอนโดสเปิร์มจะทำหน้าที่ในการสะสมสารอาหารสำหรับใช้ในการงอกของเมล็ด ขณะที่โปรตีนที่พบในเอ็มบริโอจะทำหน้าที่นำสารอาหารจากเอนโดสเปิร์มมาใช้ในการเจริญของต้นกล้า (Liu *et al.*, 2009) ต่อมา มีการศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีนจากเอ็มบริโอและเอนโดสเปิร์มเมล็ดสบู่ดำที่แก่เต็มที่และได้ผลสอดคล้องกันโดยพบว่าเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดมีโปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกัน 28 ชนิด เช่น Regulator of ribonuclease-like protein 3, 14-3-3-like protein, Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, Tubulin alpha-1 chain เป็นต้น นอกจากนี้จากการ

จัดกลุ่มตามหน้าที่ชัดเจนว่าการแสดงออกของโปรตีนที่พบมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของน้ำมันในเมล็ด การส่งสัญญาณ การถอดรหัสเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนรวมถึงวัฏจักรของเซลล์ที่สำคัญกับการงอกของเมล็ด (Liu *et al.*, 2011)

จากรายงานการวิจัยจะเห็นว่าเทคนิคโปรตีนโอมิกส์สามารถที่จะนำมาใช้อธิบายกลไกการแสดงออกของโปรตีนได้เป็นอย่างดี ซึ่งข้อมูลการแสดงออกของโปรตีนเป็นผลมาจากการทำงานของยีน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนมาใช้หาความสัมพันธ์กับยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารพิษฟอรับอลเอสเทอร์ในสบู่ดำได้ และจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบมีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ เช่น รายงานการวิจัยของ Lin *et al.* (2009) ที่ได้ศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีน 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *Jc-HMGR*) โดยยีนจะสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase HMGR (EC: 1.1.1.34)) มากระตุ้นอะซิติลโคเอ (acetyl CoA) ในวิถีย่อย mevalonic acid (MVA) pathway ให้มีการสร้างไอโซพรีนส์ และจากการโคลนยีนดังกล่าวจากใบสบู่ดำด้วยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) พบว่ายีนมีความยาวของ cDNA ทั้งหมด 1950 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณที่สามารถอ่านรหัสได้ 1752 คู่เบส แปลรหัสออกมาได้ 584 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุลอยู่ที่ 62.4 kDa และมีค่า pI อยู่ที่ 7.63 จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน *E. coli* พบว่ายีน *Jc-HMGR* ทำให้มีสร้างและสะสมของบีตาแคโรทีน (β -carotene) โดยสังเกตุได้จากสีโคโลนีของแบคทีเรียที่เปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีส้ม-เหลือง ซึ่งทั้งบีตาแคโรทีนและฟอรับอลเอส

เทอร์จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มไดเทอพีนส์ จึงคาดว่า ยีน *Jc-HMGR* จะทำให้มีสร้างและสะสมของสาร พอร์บอลลเอสเทอร์ด้วยเช่นกัน

สำหรับการศึกษาลักษณะและหน้าที่ของ ยีน *geranylgeranyl diphosphate synthase*) โดย ยีนจะสร้างเอนไซม์ที่มีชื่อว่า *geranylgeranyl diphosphate synthase* (GGPPS, EC: 2.5.1.29)

ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ โดยมี *geranyl diphosphate* (GPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง GGPP จากการโคลนยีนดังกล่าว จากเมล็ดสบู่ดำด้วยเทคนิค RACE พบว่ายีนมีความยาวของ cDNA ทั้งหมด 1414 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณที่สามารถอ่านรหัสได้ 1,113 คู่

Table 2 Proteins related to fatty acid biosynthesis that are likely to have altered expression profiles during *J. curcas* kernel development (Booranasrisak *et al.*, 2013)

Accession number	Name of identified protein	Organism	Peptide sequence
gi 162949342	4-Coumarate:coenzyme A ligase 1	<i>Physcomitrella patens subsp. californica</i>	KKSLQSEVRG
gi 11181943	Acetyl CoA carboxylase pRS1	<i>Brassica napus</i>	RKLLIVANDVTFKA
gi 572606	Acetyl-CoA carboxylase	<i>Brassica napus</i>	RKIIIVANDVTFKA
gi 11869927	Acetyl-CoA carboxylase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RKLLVIANDVTFKA
gi 116060125	Animal-type fatty acid synthase	<i>Ostreococcus tauri</i>	RTSGCEKG
gi 237682390	Branched-chain aminotransferase 4	<i>Brassica rapa</i>	KKWIPPPGRG
gi 108706991	Branched-chain-amino-acid aminotransferase 5	<i>Oryza sativa</i>	KAQMDAKSRG
gi 56606540	Dormancy-associated protein	<i>Codonopsis lanceolata</i>	KVVTGEGSGGKF
gi 15231611	Glycosyl hydrolase family 38 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	KRGEAVDAEKL
gi 25992001	Lecithine cholesterol acyltransferase	<i>Medicago truncatula</i>	KLTFETAFLK
gi 116061081	Lipase	<i>Ostreococcus tauri</i>	RVDAVTFGQPRV
gi 224579301	Mercaptopyruvate sulfurtransferase	<i>Solanum lycopersicum</i>	KLVASVTCRM
gi 2145479	Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Vanilla aphylla</i>	RKSAAELVKL
gi 54291440	Pr1-like protein	<i>Oryza sativa</i>	RSGAVDGVGGNTAKR
gi 116000579	Mitochondrial carrier protein	<i>Ostreococcus tauri</i>	KEAGVDLKSCRR
gi 116055441	Short chain alcohol dehydrogenase	<i>Ostreococcus tauri</i>	RAVVDRT
gi 21553535	Ras-GTPase-activating protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RGGGSS
gi 38228683	Receptor-like protein kinase	<i>Fagus sylvatica</i>	KGLNAKI
gi 255080050	Serine acetyl transferase	<i>Micromonas sp. RCC29</i>	RDHSLVKK
gi 27545461	S-related kinase 10.1A	<i>Arabidopsis lyrata</i>	KQLWYTPKD
gi 255547946	Steroid dehydrogenase	<i>Ricinus communis</i>	KKSQLQASQG
gi 2586125	β -Keto acyl reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	KDVSDSIRS

Caballero NG, Vega AR, Lopes GD, Valenzuela JG, Ribeiro JMC, Carvalho PC, Valente RH, Brazil RP and Cuervo P (2014) Expression of the mevalonate pathway enzymes in the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sex pheromone gland demonstrated by an integrated proteomic

- approach. *J Proteome Res* 96: 117–132.
- Devappa RK, Makkar HPS and Becker K (2010a) *Jatropha* toxicity: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 13: 476–507.
- Devappa RK, Makkar HPS and Becker K (2010b) Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass Bioenerg* 34: 1125–1133.
- Devappa RK, Makkar HPS and Becker K (2011) *Jatropha* diterpenes: a review. *J Am Oil Chem Soc* 88: 301–322.
- Goel G, Makkar HPS, Francis G and Becker K (2007) Phorbol esters: Structure, biological activity and toxicity in animals. *Int J Toxicol* 26: 279–288.
- Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE and Posch A (2013) Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 433: 105–111.
- Haas W, Sterk H and Mittelbach M (2002) Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. *J Nat Prod* 65: 1434–1440.
- Kirby J, Nishimoto M, Park JG, Withers ST, Nowroozi F, Behrendt D, Rutledge EJG, Fortman JL, Johnson HE, Anderson JV, *et al.* (2010) Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 71: 1466–1473.
- Lin J, Jin Y, Zhou M, Zhou X and Wang J (2009) Molecular cloning, characterization and functional analysis of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Jatropha curcas*. *Afr J Biotechnol* 8: 3455–3462.
- Lin J, Jin Y, Zhou X and Wang J (2010) Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Jatropha curcas*. *Afr J Biotechnol* 9: 3342–3351.
- Liu H, Liu YJ, Yang MF and Shen SH (2009) A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. *J Integr Plant Biol* 51: 850–857.
- Liu H, Yang Z, Yang M and Shen S (2011) The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas*. *Plant Sci* 181: 660–666.
- Miziorko HM (2011) Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 505: 131–143.
- Nakano Y, Ohtani M, Polsri W, Usami T, Sambongi K and Demura T (2012) Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Plant Biotechnol* 29: 185–189.
- Newton RP, Brenton AG, Smith CJ and Dudley E (2004) Review: Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65: 1449–1485.
- Nieto B, Forés O, Arró M and Ferrer A (2009) Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-

- translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry* 70: 53–59.
- Sabandar CW, Ahmat N, Jaafar FM and Sahidin I (2013) Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* 85: 7–29.
- Siang TC, Soong ST and Yien ATS (2012) Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. *Afr J Biotechnol* 11: 8022–8031.
- Sujatha M and Mukta N (1996) Morphogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44: 135–141.
- Thelen JJ (2013) Proteomics tools and resources for investigating protein allergens in oilseeds. *Regul Toxicol Pharmacol* 54: S41–S45.
- Vanderschuren H, Lentz E, Zainuddin I and Gruissem W (2013) Proteomics of mode I and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *J Proteomics* 93: 5–19.
- Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT and Loreto F (2009) A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat Chem Biol* 5: 283–291.
- Wei H (2011) Biochemical and genetic analyses of *Jatropha curcas* L. seed composition. Department of biology University of York. PhD Thesis.
- Xu R, Wang R and Liu A (2011) Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Biomass Bioenerg* 35: 1683–1693.
- Yang MF, Liu YJ, Liu Y, Chen H, Chen F and Shen SH (2009) Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*. *J Proteome Res* 8: 1441–1451.
- Yunping B, Ha BTN, Eunice Y, Chueng LL and Yan H (2012) Light induced degradation of phorbol esters. *Ecotoxicol Environ Saf* 84: 268–273.