

การหาโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันและลักษณะทางพืชสวน
ของมะระจีนก

Determination of Local Bitter Gourd 30 KDa Protein
and Horticultural Characteristics

สโรชา กรีธาพล^{1/} ปรัชญา คงทวีเลิศ^{2/} และ มณีฉัตร นิกอร์พันธุ์^{1/}

Sarocho Kreethaphon^{1/} Prachya Kongtawelert^{2/} and Maneechat Nikornpun^{1/}

Abstract : 30 kilodalton (kDa) protein was determined on different parts of local bitter gourd and horticultural characteristics of 4 accessions, accession numbers 3, 7, 8 and 13 were studied. They were grown at Chiang Mai University, from April 2002 to April 2004. Randomized complete block design (RCBD) with 3 replications was used. Results showed that, the 4 accessions had number of days to 50% female flowering from 55 to 68 days, accession number 7 gave the earliest days to 50% female flowering ranged of 55 days and accession number 13 gave the longest days to 50% female flowering of 68 days. Botanical characteristics of the 4 accessions, average seed number per fruit of the 4 accessions ranged from 15 to 30 seeds, accession number 8 gave the highest seed number per fruit of 30 seeds and accession number 3 gave the lowest seed number per fruit of 15 seeds. Average fruit yields of the 4 accessions ranged from 320.09 to 1,186.44 kg/rai, accession number 7 gave the highest fresh fruit yield of 1,186.44 kg/rai and accession number 13 gave the lowest fresh fruit yield of 320.09 kg/rai.

30 kilodalton (kDa) protein was determined on local bitter gourd leaves at 10, 20, 30 and 40 days after fully opened. Fruit and endosperm of the 4 accessions at 8, 16 and 24 days after anthesis (self-pollination by hands). Protein was precipitated by ammonium and 30 kilodalton protein was determined by ELISA method per 5 gram of freshed individual sample. Endosperm showed the highest amount of 30 kilodalton protein in comparison with leaves and fruits.

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Endosperm of the 4 accessions at 24 days after anthesis gave the highest levels of 30 kilodalton protein, ranged from 23.09 to 47.97 μg , accession number 3 showed the highest 30 kilodalton protein of 47.97 μg . Leaves of the 4 accessions at 30 days after fully opened had the highest level of 30 kilodalton protein, ranged from 0.044 to 0.1154 μg , accession number 13 showed the highest level of 30 kilodalton protein of 0.1154 μg . Fruits of the 4 accessions at 24 days after anthesis of showed the highest levels of 30 kilodalton protein, ranged from 0.0071 to 0.0149 μg , accession number 13 showed the highest level of 30 kilodalton protein of 0.0149 μg .

บทคัดย่อ: ตรวจสอบโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันในส่วนต่างๆ ของมะระจีน (*Momordica charantia*) และศึกษาลักษณะทางพืชสวนของมะระจีนทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 โดยนำมาปลูก ณ แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่ เดือนเมษายน ปี 2545 - เดือนเมษายน ปี 2546 วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design) มี 3 ซ้ำ พบว่า สายพันธุ์ที่ทดสอบมีวันออกดอก 50% ของดอกเพศเมียหลังเพาะเมล็ดระหว่าง 55-68 วัน สายพันธุ์เบอร์ 7 เป็นพันธุ์ที่ออกดอกเร็วที่สุด คือ 55 วัน สายพันธุ์เบอร์ 13 เป็นพันธุ์ที่ออกดอกช้าที่สุด คือ 68 วัน ส่วนลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะระจีน 4 สายพันธุ์ พบว่า จำนวนเมล็ดต่อผลของมะระจีนทั้งหมดมีระหว่าง 15-30 เมล็ด สายพันธุ์เบอร์ 8 มีจำนวนเมล็ดต่อผลมากที่สุด คือ 30 เมล็ด และสายพันธุ์เบอร์ 3 มีจำนวนเมล็ดต่อผลน้อยที่สุด คือ 15 เมล็ด ผลผลิตของสายพันธุ์ทั้งหมดมีระหว่าง 320.09-1,186.44 กิโลกรัมต่อไร่ สายพันธุ์เบอร์ 7 ให้ผลผลิตสูงสุดที่สุด 1,186.44 กิโลกรัมต่อไร่ และสายพันธุ์เบอร์ 13 ให้ผลผลิตต่ำที่สุด 320.09 กิโลกรัมต่อไร่

การสกัดโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตัน จากใบที่ระยะ 10, 20, 30 และ 40 วันหลังใบคลี่ ส่วนผลและเอนโดสเปิร์มสกัดที่ระยะ 8, 16 และ 24 วันหลังดอกบานของมะระจีน (ผสมตัวเองด้วยมือ) โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และตรวจสอบโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตัน โดยวิธี ELISA โดยทำการศึกษาจากตัวอย่างน้ำหนักสดจำนวน 5 กรัม พบว่า ในเอนโดสเปิร์มมีปริมาณสูงสุด รองลงมา คือ ใบ และผลตามลำดับ เอนโดสเปิร์มที่ระยะ 24 วันหลังดอกบานมีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันสูงที่สุดอยู่ระหว่าง 23.09-47.97 ไมโครกรัม สายพันธุ์เบอร์ 3 มีปริมาณสูงสุด คือ 47.97 ไมโครกรัม ในใบมะระจีนใบที่ระยะ 30 วันหลังใบคลี่มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันสูงที่สุดอยู่ระหว่าง 0.044-0.1154 ไมโครกรัม สายพันธุ์เบอร์ 13 เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณสูงสุด คือ 0.1154 ไมโครกรัม ผลของมะระจีนทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลที่ระยะ 24 วันหลังดอกบานมีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันสูงที่สุดอยู่ระหว่าง 0.0071-0.0149 ไมโครกรัม สายพันธุ์เบอร์ 13 เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณสูงสุด คือ 0.0149 ไมโครกรัม

Index words: กิโลดัลตัน วิธีอิมมูโนแอสเสย์ที่ใช้เอนไซม์เชื่อมต่อกับแอนติบอดี ระยะออกดอก

Immunoassay, *Momordia charantia* Ribosome Inactive Protein (RIPs)

คำนำ

ในเมล็ดมะระจีนกมีโปรตีนที่เป็น Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาด 30 กิโลดัลตัน และมีผลยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัส HIV โดยยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase, integrase และยับยั้งการสร้าง viral core protein ของเชื้อ HIV (วิณา, 2543, ปัทมา, 2541 และเอมอร, 2545) โปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสที่พบในมะระจีนกเป็นประเภทที่ 1 ที่สามารถยับยั้ง translation ในยูคาริโอต สามารถทำให้เซลล์ตายได้ โปรตีนนี้ คือ α -momorcharin, β -momorcharin และ MAP30 (Momordica Anti-HIV Protein) พบในเมล็ด ผล และใบของมะระจีนก ซึ่ง α - และ β -momorcharin (α -MMC และ β -MMC) เป็นไกลโคโปรตีนสายเดี่ยว (มีคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 2% มีน้ำหนักโมเลกุล 2900 และ 2800 ดัลตันตามลำดับ (Yeung *et al.*, 1986) โดยในปี 1999 พบว่า α -MMC ยับยั้งการจำลองตัว HIV-1 ได้เป็นอย่างดี แต่ไม่ทำให้เรื้อรังใน T-lymphocytes ที่ติดเชื้อ จากการจำแนกกิจกรรมการต้านเชื้อเอชไอวี ชนิดที่ 1 อย่างรุนแรงของ α -momorcharin จากมะระจีนก และติดเชื้อเรื้อรังใน T-lymphocytes ผลกระทบจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของ α -momorcharin ถูกทดสอบโดย trypan blue dye exclusion หรือ colorimetric MTT assay ผลการทดลองพบว่า α -momorcharin ถูกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการสร้าง HIV-1 และ ลดการแสดงออกของแกนของสารที่กระตุ้นการสร้าง p24 และจำนวนของสารที่กระตุ้นการสร้างเซลล์บวก HIV อย่างรุนแรง แต่ไม่มีผลกับเชื้อ HIV-1 ที่ติดเชื้ออย่างเรื้อรังที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (Zheng *et al.*, 1999) ส่วน MAP30 เป็นโปรตีนสายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 263 ตัว (มีน้ำหนักประมาณ 30 กิโลดัลตัน)

(Lee-Huang *et al.*, 1995a) คุณสมบัติของ MAP30 คือ ยับยั้ง HIV integrase (Lee-Huang *et al.*, 1995b) มีความสัมพันธ์ที่ไม่กระตุ้น viral กลับไปเป็น DNA (Lee-Huang *et al.*, 1995a) จัดจำสารตั้งต้นทั้ง DNA และ RNA (Lee-Huang *et al.*, 1995c) เลือกทำลายเนื้องอกที่เปลี่ยนรูปแบบและทำลายเชื้อเอชไอวี (Lee-Huang *et al.*, 1995a) และ MAP30 ยังสามารถยับยั้งการเข้าทำลายในเซลล์อิสระของเชื้อเอชไอวีประเภทที่หนึ่ง (HIV-1) และการจำลองตัวของเชื้อ HIV ซึ่ง MAP30 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ไม่ติดเชื้อเพราะว่า MAP30 ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ที่มีความสมบูรณ์ได้ (Buchakul, 2001)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลผลิตและลักษณะทางพืชสวนของมะระจีนกในแต่ละสายพันธุ์
2. เพื่อสกัดหาโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันจากส่วนของใบ ผล และเอนโดสเปิร์ม (เมล็ด) ในระยะต่างๆของมะระจีนก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วิธีการสกัดโปรตีน

1.1 นำใบ ผล และเอนโดสเปิร์มในระยะต่างๆของมะระจีนกสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 ที่ได้มาจากการวางแผนการทดลอง randomized complete block design (RCBD) ปลุกทดสอบ ณ แปลงทดลองภาควิชา พืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2546 มา สกัดโปรตีนโดยวิธีของ Ditchaiwong (2003) โดยบดด้วยโกร่งแช่เย็น เติมน้ำละลาย 0.85% NaCl 20 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น กรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1; diameter 110 mm.) และปรับค่า pH ให้ได้ 3.6-4.0 ด้วย 1 M HCl นำสารละลายที่กรองได้ไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง การปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 1 ถึง 3 จะเก็บสารละลายที่ได้ (ทิ้งตะกอน) และบันทึกปริมาตรครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยหลังจากปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 2 ใส่ 16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยปริมาตรของสารละลายที่ได้ ผสมให้เข้ากัน และหลังจากปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 3 ใส่ 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ โดยปริมาตรของสารละลายที่ได้ ผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงครั้งที่ 4 เก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วย 50mM Na_2PO_4 ใช้ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร นำสารละลายมาทำให้นบริสุทธิ์โดยวิธี dialyse ในน้ำกลั่นนาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายทำให้แห้งด้วยความเย็น โดยใช้เครื่อง Lyophilizer ได้สารสกัดดิบ (crude extract)

2. หาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตัน

หาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีที่สามารถบ่งบอกถึงการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีในตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบได้

- Competitive ELISA (Competitive Solution Phase Assay) (Kantawong, 2003)

เคลือบไมโครเพลทขนาด 96 หลุม ด้วยแอนติเจนโดยใช้ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมในบัฟเฟอร์คาร์บอนเตไต์ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม incubate 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างด้วย PBS-tween (ในการล้างทุกครั้งล้าง 3 ครั้ง โดยใช้ 200 ไมโครลิตรต่อครั้ง) และเติม 1% BSA

จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-tween นำหลอดโพลีโอฟิลินใช้เป็นภาชนะในการเตรียมระหว่างสารละลายแอนติเจนและสารละลายแอนติบอดี (อัตราส่วนของแอนติบอดีที่ คือ 1 (ซีรัมกระต่าย) : 5000 (PBS-tween)) เพื่อเตรียมแอนติเจนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยที่ความเข้มข้นที่ศูนย์ใช้ซีรัมผสมกับแอนติบอดี (อัตราส่วน 1 : 1) และเตรียมตัวอย่าง (sample) นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางขึ้นที่ที่ต้องการทดสอบผสมกับ แอนติบอดีในอัตราส่วน 1 : 1 ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ใส่สารละลายตัวอย่างลงในไมโครเพลทจำนวน 50 ไมโครกรัมต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วย PBS-tween หลังจากนั้นเติม alkaline phosphatase-conjugated second antibody ใส่ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-tween แล้วเติม chromogenic substrate 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 ถึง 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเกิดสีใส่ 5 N NaOH จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุมแล้วนำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405/690 นาโนเมตร

ผลการทดลอง

1. ผลจากการเก็บตัวอย่างมะระขึ้นก 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางพืชสวน พบว่า วันออกดอก 50% ของดอกเพศเมียของมะระขึ้นกทั้ง 4 สายพันธุ์เริ่มออกดอกระหว่าง 55-68 วันหลังปลูก (ตารางที่ 1) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสายพันธุ์เบอร์ 7 ออกดอกเร็วกว่า 3 สายพันธุ์ เหลือคือ 55 วัน ส่วนสายพันธุ์เบอร์ 13 ออกดอกช้าที่สุดเหลือคือ 68 วัน ผลการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ของผล และปริมาณผลผลิตของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า ความยาวผลของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์มีความยาวระหว่าง 4.04-8.91 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสายพันธุ์เบอร์ 13 มีความยาวผลสั้นที่สุด คือ 4.04 เซนติเมตร ส่วนสายพันธุ์เบอร์ 7 มีความยาวผลยาวที่สุด คือ 8.91 เซนติเมตร จำนวนเมล็ดต่อผลของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์ มีจำนวนเมล็ดระหว่าง 15-30 เมล็ดต่อผลซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสายพันธุ์เบอร์ 3 มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล 15 เมล็ด สายพันธุ์เบอร์ 8 มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล 30 เมล็ด ซึ่งสายพันธุ์เบอร์ 8 นั้นไม่มีความ

แตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์เบอร์ 7 ที่มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อผล 28 เมล็ด แต่ทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์เบอร์ 3 และสายพันธุ์เบอร์ 13 ผลผลิตต่อไร่มีระหว่าง 320.09-1186.44 กิโลกรัมซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสายพันธุ์เบอร์ 7 มีน้ำหนักผลสดต่อไร่สูงสุด คือ 1186.44 กิโลกรัมซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์เบอร์ 8 ที่มีน้ำหนักผลสดต่อไร่ 713.52 กิโลกรัม ส่วนสายพันธุ์เบอร์ 13 มีน้ำหนักผลสดต่อไร่ต่ำสุด คือ 320.09 กิโลกรัม นั้นไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เบอร์ 3 แต่แตกต่าง สายพันธุ์เบอร์ 7 และเบอร์ 8

Table 1 Horticultural characteristics of local bitter gourd.

Accession number	Days to 50% female flower ^{1/}	Fruit length ^{2/} (cm)	Number of seed/fruit ^{3/}	Fruit yield ^{1/} (kg/rai)
3	64 b ^{4/}	4.65 b	15 c	398.18 b
7	55 c	8.91 a	28 a	1186.44 a
8	63 b	8.75 a	30 a	713.517 ab
13	68 a	4.04 c	18 b	320.09
LSD _{.05}	2.94	0.46	3.06	530.27
CV (%)	5.16	46.17	26.09	41

^{1/} Average of 6 plants, ^{2/} Average of 10 fruits, ^{3/} Means followed by different letters differ significantly at p≤.05 by LSD

Table 2 Levels of 30 kilodalton (kDa) protein (µg/5 g) in fruit and leaves of local bitter gourd.

Accession number	Fruit (days after anthesis)			Leaves (days after fully opened)			
	8	16	24	10	20	30	40
3	0.0016	0.0078	0.0071 b ^{3/}	0.012	0.073	0.0518	0.0459 ab
7	0.0037	0.0044	0.0105 ab	0.0173	0.0503	0.0474	0.0962 a
8	0.0135	0.0021	0.0103 ab	0.0171	0.0657	0.044	0.021 b
13	0.0011	0.0034	0.0149 a	0.0226	0.0598	0.1154	0.0373 b
LSD _{.05}	0.016	0.009	0.007	0.02	0.063	0.074	0.058
CV (%)	0	0	0	0	0	69.23	63.12

2. จากการหาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันจากส่วนของผล ใบ และเอนโดสเปิร์มใน ระยะต่างๆ ของมะระขึ้นทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวิธี ELISA โดยทำการศึกษาจากตัวอย่างน้ำหนักสด จำนวน 5 กรัม พบว่า ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันที่ได้จากส่วนของผลของมะระขึ้นทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า ผลมะระขึ้นที่มีอายุ 8 วันหลังดอกบานมี ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันอยู่ระหว่าง 0.0011-0.0135 ไมโครกรัม และ 16 วันหลังดอกบาน มีปริมาณระหว่าง 0.0021-0.0078 ไมโครกรัม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) แต่ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันในผลที่ อายุ 24 วันหลังดอกบานนั้นมีความระหว่าง 0.0071-0.0149 ไมโครกรัม มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติโดยมีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันอยู่ระหว่าง 0.0071 - 0.0149 ไมโครกรัม โดยสายพันธุ์เบอร์ 13 มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันสูงกว่า 3 สายพันธุ์ คือ 0.0149 ไมโครกรัม ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์เบอร์ 3 มี ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 0.0071 ไมโครกรัม แต่สายพันธุ์เบอร์ 8 และ เบอร์ 7 ที่มี ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 0.0103 และ 0.0105 ไมโครกรัมตามลำดับนั้น ไม่มีความแตกต่าง ทางสถิติจากสายพันธุ์เบอร์ 3 และเบอร์ 13 ส่วน ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันในใบมะระขึ้นทั้ง ที่อายุ 10, 20 และ 30 วันหลังใบคลี่มีปริมาณอยู่ ระหว่าง 0.012-0.0226, 0.0503-0.073 และ 0.044-0.01154 ไมโครกรัมตามลำดับและไม่มีความแตก ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณโปรตีน ขนาด 30 กิโลคัลตันในใบที่อายุ 40 วันหลังใบคลี่

นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมี ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันอยู่ระหว่าง 0.021-0.0962 ไมโครกรัม โดยสายพันธุ์เบอร์ 8 และ สายพันธุ์เบอร์ 13 ที่มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 0.021 และ 0.373 ไมโครกรัมตามลำดับ นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างจากสายพันธุ์ เบอร์ 7 ที่มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 0.0962 ไมโครกรัม ส่วนสายพันธุ์เบอร์ 3 ที่มี ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 0.0459 ไมโครกรัมไม่แตกต่างจากมะระขึ้นทั้ง 3 สายพันธุ์ ส่วนในเอนโดสเปิร์มของมะระขึ้นทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันสูงกว่าในผล และใบของมะระขึ้น โดยเอนโดสเปิร์มของมะระ ขึ้นทั้ง 4 สายพันธุ์ที่อายุ 8 วันหลังดอกบานมี ปริมาณระหว่าง 0.2109-0.543 ไมโครกรัม และ 16 วันหลังดอกบาน มีปริมาณระหว่าง 2.8896-4.3049 ไมโครกรัมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (ตารางที่ 3) ส่วนเอนโดสเปิร์มของมะระ ขึ้นทั้ง 4 สายพันธุ์ที่อายุ 24 วันหลังดอกบานนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมีปริมาณ โปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตันอยู่ระหว่าง 20.46-47.97 ไมโครกรัม โดยสายพันธุ์เบอร์ 13 และ เบอร์ 8 มี ปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 23.09 และ 25.21 ไมโครกรัมตามลำดับไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างจากสายพันธุ์ เบอร์ 3 ที่มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 47.97 ไมโครกรัม ส่วนสายพันธุ์เบอร์ 7 ที่มีปริมาณ โปรตีนขนาด 30 กิโลคัลตัน คือ 38.65 ไมโครกรัม ไม่แตกต่างจากมะระขึ้นทั้ง 3 สายพันธุ์

Table 3 Levels of 30 kilodalton (kDa) protein ($\mu\text{g}/5\text{ g}$) in endosperm of local bitter gourd.

Accession number	Endosperm (days after anthesis)		
	8	16	24
3	0.2902	4.305	47.97 a ^{3/}
7	0.2109	3.153	38.65 ab
8	0.543	2.89	25.21 b
13	0.3132	3.58	23.09 b
LSD _{.05}	0.448	1.717	20.463
CV (%)	57.45	25.55	16.86

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางพืชสวนของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Ditchaiwong (2003) ศึกษามะระขี้นกสายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 ที่ปลูกในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2543 รายงานว่าวันออกดอก 50% ของดอกเพศเมียอยู่ระหว่าง 40-47 วันหลังเพาะกล้า และความยาวเถาไม้ค่าอยู่ระหว่าง 297-474 เซนติเมตร ซึ่งมีสายพันธุ์เบอร์ 3 มีความยาวเถาไม้ที่สุดคือ 474 เซนติเมตร ผลการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผล และปริมาณผลผลิตของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์ แตกต่างจากการทดลองของ Ditchaiwong (2003) ที่มีความยาวผลของมะระขี้นกมีความยาวอยู่ระหว่าง 4.69-11.44 เซนติเมตร โดยสายพันธุ์เบอร์ 8 มีความยาวผลยาวที่สุดคือ 11.44 เซนติเมตร และสายพันธุ์เบอร์ 13 ผลมีความยาวสั้นที่สุดคือ 4.69 เซนติเมตร จำนวนเมล็ดต่อผลของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์ของ Ditchaiwong (2003) มีจำนวนเมล็ดอยู่ระหว่าง 13-31 เมล็ด โดยสายพันธุ์เบอร์ 7 มีปริมาณเมล็ดต่อ

ผลมากที่สุดคือ 31 เมล็ด ผลผลิตสดต่อไร่ของ Ditchaiwong (2003) พบว่ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 1,004-2,244 กิโลกรัมต่อไร่ โดยสายพันธุ์เบอร์ 7 มีปริมาณสูงสุดคือ 2,224 กิโลกรัมต่อไร่ และสายพันธุ์เบอร์ 13 มีปริมาณน้อยสุดคือ 1,004 กิโลกรัมต่อไร่ จากการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในครั้งนี้ และของ Ditchaiwong (2003) พบว่า สอดคล้องกับวัชร (2541) และรุ่งรัตน์ (2540) ที่กล่าวว่ามะระขี้นกมีความยาวของเถาไม้ได้ถึง 5 เมตร ผลยาวประมาณ 4-6 เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางผลประมาณ 2-5 เซนติเมตร

2. การหาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันในครั้งนี้ใช้วิธี ELISA ซึ่งวิธีการหาโดยวิธี ELISA นั้น วีระศักดิ์ (2544) กล่าวว่า เป็นวิธีที่สามารถหาปริมาณโปรตีนได้ผลดี ใช้สารเคมีที่เสถียรอย่างประหยัด และมีความจำเพาะเนื่องจากใช้แอนติเจนสองชนิดและมีความไวสูง โดยจากการหาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันในผล ใบ และเอนโดสเปิร์มในระยะต่างๆ ของมะระขี้นกทั้ง 4 สายพันธุ์ โปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันซึ่งสกัดมาจากผล และเมล็ดของมะระขี้นก (Lee-Huang *et al.*, 1995a)

Lee-Huang (1990) หาโปรตีน MAP30 ในเมล็ดแก่ (เอนโดสเปิร์ม) พบว่ามีโปรตีน 104.86-265.42 ไมโครกรัมต่อเอนโดสเปิร์มหนัก 5 กรัม และ Ditchaiwong (2003) หาโปรตีนในเมล็ดแก่ (เอนโดสเปิร์ม) ของมะระจีนกในสายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 พบว่ามีปริมาณ 206.39, 197.51, 179.86 และ 104.86 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเอนโดสเปิร์มสด 5 กรัม ตามลำดับ ส่วนการหาปริมาณ α -Momorcharin ในมะระจีนกของ Kantawong (2003) พบว่า ในส่วนของเมล็ด ใบ และผลของมะระจีนกในเมล็ดมีปริมาณ α -Momorcharin สูงที่สุด คือ 2.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ total protein ใบมีปริมาณ α -Momorcharin คือ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ total protein และในผลมีปริมาณ α -Momorcharin คือ 0.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ total protein ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองจากการหาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันในครั้งนี้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางพืชสวนของมะระจีนกทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เบอร์ 3, สายพันธุ์เบอร์ 7, สายพันธุ์เบอร์ 8 และสายพันธุ์เบอร์ 13 พบว่า วันออกดอก 50% ของดอกเพศเมีย พบว่ามะระจีนกทั้ง 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์เบอร์ 7 เป็นพันธุ์ที่ออกดอกเร็วที่สุดในมะระจีนก 4 สายพันธุ์ คือ 55 วันหลังเพาะเมล็ด สายพันธุ์เบอร์ 13 เป็นพันธุ์ที่ออกดอกช้าที่สุดในมะระจีนก 4 สายพันธุ์ คือ 68 วันหลังเพาะเมล็ด ส่วนลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะระจีนกทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์เบอร์ 7 มีผลยาวที่สุด คือ 8.91 เซนติเมตร สายพันธุ์เบอร์ 13 ผลมีขนาดเล็กที่สุด คือ 4.04 เซนติเมตร สายพันธุ์เบอร์ 8 มีจำนวนเมล็ดต่อผลมากที่สุด คือ 30 เมล็ด สายพันธุ์เบอร์ 3 มีจำนวน

เมล็ดต่อผลน้อยที่สุด คือ 15 เมล็ด ปริมาณผลผลิตสดต่อไร่ มะระจีนก สายพันธุ์เบอร์ 7 ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 1186.44 กิโลกรัมต่อไร่ และสายพันธุ์เบอร์ 13 ให้ผลผลิตต่ำที่สุด คือ 320.09 กิโลกรัมต่อไร่

จากการหาปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันจากน้ำหนักสด 5 กรัม ของผล ใบ และ เอนโดสเปิร์มในระยะต่างๆ ของมะระจีนก 4 สายพันธุ์ นั้น พบว่า ในเอนโดสเปิร์มมีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันสูงที่สุด รองลงมา คือ ใบ และผลตามลำดับ โดยในเอนโดสเปิร์มที่ระยะ 24 วันหลังดอกบานมีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันสูงที่สุด คือมีปริมาณอยู่ระหว่าง 23.09-47.97 ไมโครกรัม ซึ่งสายพันธุ์เบอร์ 3 เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณสูงที่สุด คือ 47.97 ไมโครกรัม ซึ่งในใบ และผลของสายพันธุ์เบอร์ 13 เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนขนาด 30 กิโลดัลตันสูงที่สุดในมะระจีนกทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยที่ระยะ 30 วันหลังใบคลี่ และผลที่ระยะ 24 วันหลังดอกบาน มีปริมาณ 0.1154 และ 0.0149 ไมโครกรัมตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- ปัทมา สุนทรสารทูล. 2541. มะระจีนก. จุลสารข้อมูลสมุนไพร ปีที่ 15 ฉบับที่ 2 มกราคม 2541. /ระบบออนไลน์/ <http://www.medplant.mahidol.ac.th/micro/charantia.htm>. (28 มีนาคม 2545).
- รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. พืชเครื่องเทศและสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 200 หน้า.
- วัชร ประชาศรียสรเดช. 2542. คุณค่าของผักพื้นบ้าน: มะระจีนก. เลขาธิการเกษตร ปีที่ 23 ฉบับที่ 11 เดือนพฤศจิกายน. กรุงเทพฯ. หน้า 169-170.
- วีณา จิรจรรย์ยากุล. 2543. ทางเลือกสำหรับผู้คิดเชื้อเอ็ดส์ (Natural Alternative Therapy). จุลสารข้อมูล

- สมุนไพรปีที่ 17 ฉบับที่ 4 กรกฎาคม 2543. [ระบบออนไลน์] [http://www.medplant.mahidol.ac.th/micro/17\(4\)_1.htm](http://www.medplant.mahidol.ac.th/micro/17(4)_1.htm)-21k. (26 มีนาคม 2544).
- วีระศักดิ์ สหชัยเสรี. 2544. โปรตีนเทคโนโลยี. โครงการตำรา และเอกสารประกอบการเรียนเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 238 หน้า.
- เอมอร โสมนะพันธุ์. 2545. สมุนไพรยับยั้งเอดส์ (ANTI-HIV (AIDS) HERBS). [ระบบออนไลน์] <http://www.boonmeeherb.com/tantil.htm>. (27 เมษายน 2545)
- Buchakul, N. 2001. The toxicity test of *Momorcharin charantia* L. seed protein. Thesis for Master of Science in Pharmacy (Toxicology). Mahidol University, Bangkok. 130 p.
- Ditchaiwong, C., P. Kongtawelert, S. Natakankitkul, M. Tongjiem and M. Nikornpun. 2002. Varietal evaluation and 30 kDa protein studies in local bitter gourd. Kasetart J. (Nat. Sci.). Kasetsart University. 36: 225-234.
- Ditchaiwong, C., P. Kongtawelert, S. Natakankitkul, M. Tongjiem and M. Nikornpun. 2003. Varietal evaluation and 30 kDa protein studies in local bitter gourd. The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic plants for Human Welfare (WOCMAP III) 3-4 February 2003. Chiang Mai. Thailand. OP 04-10 and PP 02-83.
- Kantawong, F.. 2003. Purification and characterization of α -Momorcharin from Bitter melon seeds for quantitative analysis by immunoassay. Master of Science in Biochemistry, Chiang Mai University, Chiang Mai. 91 p.
- Lee-Huang, S., P. L. Huang, P. L. Nara, C. Hao-Chen, K. Hsiang-fu, P. Huang, H. I. Huang and P. L. Huang. 1990. MAP30: A new inhibitor of HIV-1 infection and replication. FEBS Letters. 272(1-2):12-18.
- Lee-Huang, S., P. L. Huang, A. S. Bourinbaiar, H. C. Chen and H. F. Kung. 1995b. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 8818-8822.
- Lee-Huang, S., P. L. Huang, H. C. Chen, A. Bourinbaiar, H. I. Huang and H. F. Kung. 1995a. Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 of bitter melon. Gene 161: 151-156.
- Lee-Huang, S., H. F. Kung, P. L. Huang, A. S. Bourinbaiar, J. L. Morell, J. H. Brown, P. L. Huang, W. P. Tsai, A. Y. Chen, H. I. Huang and H. C. Chen. 1995c. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) inhibition, DNA-binding, RNA-binding, and ribosome inactivation activities in the N-terminal segments of the plant anti-HIV GAP31. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12208-12212.
- Yeung, H. W., W. W. Li, W. Y. Chan, L. K. Law and T. B. Ng. 1986. Alpha and beta momorcharins. Int. J. Pept. Protein Res. 28: 518-524.
- Zheng, Y. T., K. L. Ben and S. W. Jin. 1999. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 20(3): 239-243.