ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์ การหาลักษณะเฉพาะและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนสะสม SP1 และ SP2 ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่
ชื่อผู้เขียน	นางสาว จตุพร ตั้งจิตรวิทยากูล
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ	ประธานกรรมการ
รศ. สมศักดิ์ วนิชาชีวะ	กรรมการ
รศ. ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโกชัย	กรรมการ
Prof. Dr. Sho Sakurai	กรรมการ

บทคัดย่อ

หนอนเยื่อไผ่ เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน จัดอยู่ในวงศ์ Pyralidae อันดับ Lepidoptera พบในบริเวณภาคเหนือของไทย ลาวและพม่า ซึ่งมีวงชีวิตยาวนานถึง 1 ปี ระยะที่นานที่สุดคือตัวหนอนระยะ larval diapause โดยทั่วไปแล้วในฮีโมลิมพ์ของแมลงในอันดับ Lepidoptera ระยะตัวหนอนจะประกอบด้วยโปรตีนสะสม (storage proteins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวหนอนไปเป็นตัวเต็มวัย ในฮีโมลิมพ์ของหนอนเยื่อไผ่ระยะ larval diapause ประกอบด้วยโปรตีนสะสมที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนสะสมชนิดที่ 1 (storage protein 1 ; SP1) และโปรตีนสะสมชนิดที่ 2 (storage protein 2 ; SP2) โปรตีนดังกล่าวถูกทำให้ตกตะกอนโดย ammonium sulfate และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟี 3 ชนิด คือ Q-sepharose, Superose 6 และ Mono Q column หลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้เจลอิเล็กโตรโฟเรซิส จากการหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่แสดงแถบเดี่ยวบน SDS-PAGE พบว่า SP1 และ SP2 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 76 และ 73 kDa ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์โดย gel chromatography แสดงให้เห็นว่า SP1 และ SP2 ใน native condition มีขนาดโมเลกุล 403 และ 423 kDa ตามลำดับ จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโปรตีนสะสมทั้ง 2 ชนิดเป็น hexamer โดยทั่วไปแล้วโปรตีนสะสมในกลุ่ม Lepidoptera ถูกผลิตโดย fat body และหลั่งออกมาสู่ฮีโมลิมพ์ของตัวหนอนระยะ feeding stage หลังจากนั้นจะถูกนำกลับเข้าไปใน fat body อีกครั้งในระยะก่อนการเข้าดักแด้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ SP1 และ SP2 โดยใช้ anti-SP1 และ anti-SP2 polyclonal antibodies ในกระต่าย ในการวิเคราะห์โดยการทำ Western blot ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ SP1 ในฮีโมลิมพ์ลดลงอย่างรวดเร็วในระยะดักแด้ ในขณะที่ SP2 มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า SP1 ถูกนำกลับเข้าไปสะสมใน fat body ในช่วงก่อนการเข้าดักแด้ เนื่องจากการนำกลับโปรตีนสะสมอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนจูวีไนล์ ในการทดลองนี้จึงให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (JHA) 0.005 ไมโครกรัมแก่ตัวหนอนระยะไดอะพอส พบว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ชักนำให้เกิดการนำกลับ SP1 และ SP2 จากฮีโมลิมพ์ของตัวหนอนเข้าไปเก็บสะสมใน fat body ของดักแด้ ผลจากการทำ immunohistochemistry ของ fat body ของตัวหนอนและดักแด้ สามารถตรวจพบ SP1 และ SP2 ได้ใน fat body ของตัวหนอนและดักแด้ แสดงว่า SP1 และ SP2 ถูกสังเคราะห์จาก fat body ของตัวหนอนและหลั่งออกสู่ฮีโมลิมพ์ในระยะ feeding period และ SP1 ถูกนำกลับเข้าไปเก็บสะสมใน fat body ของดักแด้เพื่อใช้ในการเจริญขั้นต่อไป ในขณะที่ SP2 จะยังคงอยู่ในฮีโมลิมพ์ในช่วง early-pupal stage

Thesis Title Purification, Characterization and Changes of the Storage Proteins SP1 and SP2 During the Development of Bamboo Borer

Author Ms. Jatuporn Tungjitwitayakul

M.S. Biology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop	Chairperson
Assoc. Prof. Somsak Wanichacheewa	Member
Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalaphochai	Member
Prof. Dr. Sho Sakurai	Member

ABSTRACT

Bamboo borer is a moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson (Lepidoptera, Pyralidae) found in northern Thailand, Laos and Myanmar which have annual life cycle. Larval diapause period of the bamboo borer is the longest stage of the life cycle. In general lepidopterans larval haemolymph contains large amount of storage protein which is major protein during larval-adult transformation. Two kinds of storage proteins designed as storage protein 1 (SP 1) and storage protein 2 (SP2) were found as major components of haemolymph proteins of the diapausing larvae. They were purified from larval haemolymph by ammonium sulfate precipitation, followed by three different column chromatographies using Q-sepharose, Superose 6 and Mono Q column. Each of the purified proteins exhibited a single band on SDS-PAGE. The molecular sizes of SP1 and SP2 are estimated to be 76 kDa and 73 kDa, respectively. Column chromatographical analysis on Superose 6 indicates that the molecular sizes of SP1 and SP2 in native conditions are 403 kDa and 423 kDa, respectively, showing that these storage proteins are hexamers. Storage proteins in lepidopterans are usually produced by fat body and secreted into haemolymph during feeding period and reabsorbed into the fat body during prepupal period. Accordingly, we examined the developmental changes in SP1 and SP2 concentrations by Western blot analysis using anti-SP1

and anti-SP2 rabbit polyclonal antibodies. Results showed that in haemolymph, SP1 concentration dramatically decreased at pupation while SP2 concentration slightly changed. The present study indicates that SP1 may be incorporated into fat bodies at prepupal period. Since the storage protein uptake is under the control of juvenile hormone, 0.005 μg of juvenile hormone analogue (JHA) was applied to diapausing larvae for storage proteins analysis. Results showed that SP1 and SP2 uptake were induced by juvenile hormone. Immunohistochemical study showed that SP1 and SP2 was found in larval and pupal fat bodies. These indicate that SP1 and SP2 are produced by larval fat body and secreted into haemolymph in feeding period and SP1 is reabsorbed into fat body during prepupal period for further development while SP2 remains in haemolymph through early-pupal period.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University