

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การแยกโปรตีนสะสม

1) การหาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจาก column

หลังจากตกตะกอนโปรตีนในอีโมลิฟของหนอนเชื้อไผ่ระยะโคอะพอสด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว นำโปรตีนที่ได้มาใส่ใน Q-sepharose FF โปรตีนจะเกาะกับ beads ภายใน column จากนั้นทำการทดสอบหาความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนออกจาก column ดังกล่าว โดยใช้ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.1 M จนถึง 1.0 M ใน 30 mM Tris-HCl, pH 7.5 หลังจากนั้นเก็บโปรตีนที่แยกออกมาจาก column ที่แต่ละความเข้มข้นของ NaCl นำมาทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB ผลการทดลองแสดงในภาพ 11ก และ ภาพ 11ข จากผลการทดลองจะเห็นว่าสามารถแยก SP1 และ SP2 ออกจาก column ได้ที่ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.1 M จนถึง 0.4 M โดยปริมาณโปรตีนที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นของ NaCl นั้นจะแตกต่างกัน พบว่า SP1 แยกออกจาก column ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.1 M ส่วน SP2 แยกออกจาก column ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.2 M จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมใน buffer ที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์ SP1 และ SP2 อยู่ระหว่าง 0.1 M ถึง 0.4 M

2) การแยกบริสุทธิ์ขั้นที่ 1

ในการแยกบริสุทธิ์ขั้นที่ 1 นี้ใช้ Q-sepharose HP โดยนำโปรตีนจากอีโมลิฟหลังจากตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟตมาใส่ใน column equilibration buffer ที่ใช้คือ 30mM Tris-HCl, pH 7.5 และความเข้มข้นของ NaCl ใน elution buffer คือ ตั้งแต่ 0.1 M ถึง 0.4 M อัตราเร็วของ elution profile ที่ใช้คือ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองแสดงในรูปของ chromatogram ดังภาพ 12 ก จาก chromatogram ที่ได้จะเห็นว่า มี peak หลัก 2 peak กำหนดให้เป็น peak A และ peak B ในที่นี้คาดว่า peak A น่าจะเป็น peak ที่มี SP1 ส่วน peak B น่าจะเป็น peak ที่มี SP2 อยู่ เนื่องจากการทดลองที่ 1 พบว่า peak A แยกออกมาจาก column ก่อน SP2 โดยแยกออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.1 M ถึง 0.2 M ส่วน peak B นั้นแยกออกมาจาก column ที่ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.1 M ถึงประมาณ 0.3 M ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 1 และเพื่อยืนยันว่า peak A เป็น peak

ของ SP1 และ peak B เป็น peak ของ SP2 จึงนำโปรตีนที่ได้จาก fraction ของ peak A และ fraction ของ peak B มาทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB ผลการทดลองแสดงในภาพ 12 ข จาก SDS-PAGE จะเห็นว่า fraction ของ peak A (fraction 14-22) ประกอบด้วย SP1 ในปริมาณมากและ peak B (fraction 25-33) ประกอบด้วย SP2 ในปริมาณมากเช่นกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า peak A เป็น peak ของ SP1 และ peak B เป็น peak ของ SP2 นอกจากนี้ยังสังเกตได้อีกว่า fraction ที่มี SP1 เป็นส่วนประกอบมาก คือ fraction 16, 17 และ 18 ส่วน fraction ที่มี SP2 เป็นส่วนประกอบมากคือ fraction 27, 28, 29 และ 30 ดังนั้นจึงรวม fraction 16, 17 และ 18 เข้าด้วยกัน กำหนดให้เป็น SP1 fraction และรวม fraction 27, 28, 29 และ 30 เข้าด้วยกัน กำหนดให้เป็น SP2 fraction และจาก SDS-PAGE จะเห็นว่าใน SP1 fraction มี SP2 ปะปนอยู่และใน SP2 fraction ก็มี SP1 ปะปนอยู่เช่นกัน ดังนั้นจึงต้องทำการแยกโปรตีนที่ปะปนอยู่ออกไป โดยอาศัยกระบวนการแยกบริสุทธิ์ขั้นต่อไป

3) การแยกบริสุทธิ์ขั้นที่ 2

นำ SP1 fraction และ SP2 fraction ที่ได้จากการแยกขั้นที่ 1 มาผ่านการแยกขั้นที่ 2 โดยใช้ superose 6 column (Gel-filtration chromatography) โดย elution buffer ที่ใช้คือ 30mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 0.2 M NaCl ผลแสดงในภาพที่ 13 จาก chromatogram จะเห็นว่า SP1 แยกออกมาจาก column ที่เวลา 33.74 นาทีและ SP2 แยกออกมาจาก column ที่เวลา 33.55 นาที หลังจากเริ่มทำการแยก โดยทั้งสองแสดง peak หลักเพียง peak เดียว แสดงว่า SP1 และ SP2 ถูกแยกออกจากกันในส่วนตอนนี้ แต่พบว่ามี SP2 ปะปนอยู่ใน SP1 fraction และมี SP1 ปะปนอยู่ใน SP2 fraction โดยสังเกตได้จากแถบของ SP1 และ SP2 ที่ปะปนกันบน SDS-PAGE (ภาพ 15 ก และ ข) นอกจากนี้ยังพบว่ามี peak ขนาดเล็กอื่นๆ ปะปนอยู่บ้างเล็กน้อยแสดงว่ายังมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่บางส่วน ซึ่งถือว่า SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกขั้นที่ 2 นี้ยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ จึงต้องอาศัยกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไป

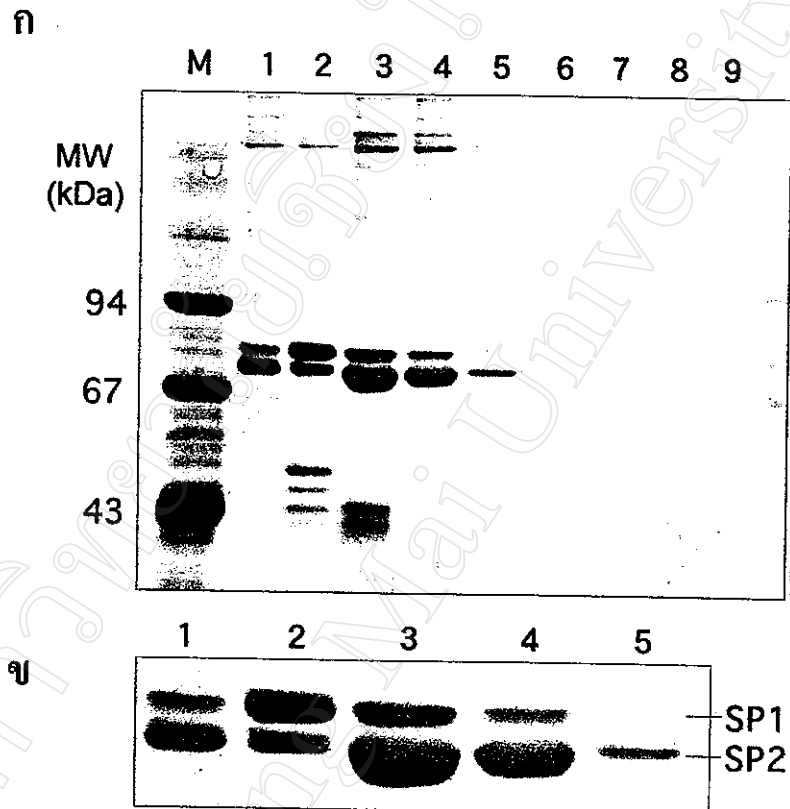
4) การแยกบริสุทธิ์ขั้นที่ 3

นำ SP1 fraction และ SP2 fraction ที่ได้จากการแยกขั้นที่ 2 มาผ่านกระบวนการแยกอีกครั้ง โดยใช้ Mono Q column chromatography โดย condition สำหรับการแยกบริสุทธิ์ของ SP1 และ SP2 ในครั้งนี้แตกต่างกัน คือ สำหรับ SP1 ใช้ elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0 – 0.3 M ส่วน SP2 นั้นใช้ elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0 – 0.4 M ผลแสดงในรูปของ chromatogram ในภาพ 14 จาก chromatogram จะเห็นว่า SP1 แยกออกมาจาก column ที่เวลา 20.07 นาที ส่วน SP2 นั้นแยกออกมาจาก column ที่เวลา 22.15 นาทีหลังจากเริ่มทำการแยกบริสุทธิ์ โดยทั้ง SP1 และ SP2

แสดง peak เคียวบน chromatogram จึงถือว่า SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกชั้นที่ 3 นี้มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของ SP1 และ SP2 ที่ได้จากการแยกในแต่ละชั้นจึงนำโปรตีนทั้งก่อนการแยกและโปรตีนที่ผ่านการแยกในแต่ละชั้นมาทำ SDS-PAGE (ภาพที่ 15) จาก SDS-PAGE จะเห็นว่าอีโมลิฟิเคชันก่อนการแยกบริสุทธิ์ (lane 1) ประกอบด้วยแถบของโปรตีนหลายชนิด ทั้ง SP1 SP2 และโปรตีนชนิดอื่นๆ หลังจากผ่านกระบวนการแยกชั้นที่ 1 แล้ว (lane 2) โปรตีนชนิดอื่นนอกเหนือจาก SP1 และ SP2 ถูกขจัดออกไปบางส่วน เมื่อผ่านการแยกชั้นที่ 2 แล้ว (lane 3) จะเห็นว่า SP2 ถูกขจัดออกจาก SP1 fraction และ SP1 ถูกขจัดออกจาก SP2 fraction เช่นกันแต่ถูกขจัดไม่สมบูรณ์ คือยังมี SP1 หรือ SP2 ปนอยู่บางส่วน เมื่อผ่านการแยกชั้นสุดท้ายแล้ว (lane 4) พบว่า SP2 ถูกขจัดออกจาก SP1 fraction และ SP1 ถูกขจัดออกจาก SP2 fraction โดยสมบูรณ์ และการแยกชั้นสุดท้ายนี้สามารถขจัดโปรตีนชนิดอื่นๆออกไปได้โดยสมบูรณ์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โปรตีนที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ในแต่ละขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์นั้นจะทำการตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งก่อนและหลังการแยกบริสุทธิ์ ผลการทดลองแสดงในตาราง 1 โดยในการทดลองนี้ใช้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นทั้งหมด 121 มิลลิกรัม จากนั้นปริมาณ SP1 และ SP2 จะลดลงหลังจากผ่านกระบวนการแยกทั้ง 3 ชั้น โดยปริมาณ SP1 ที่ได้รับจากการแยกบริสุทธิ์ขั้นสุดท้าย คือ 8 มิลลิกรัมและ SP2 12 มิลลิกรัม ซึ่งเพียงพอสำหรับการหาลำดับกรดอะมิโนและการสร้างแอนติบอดี



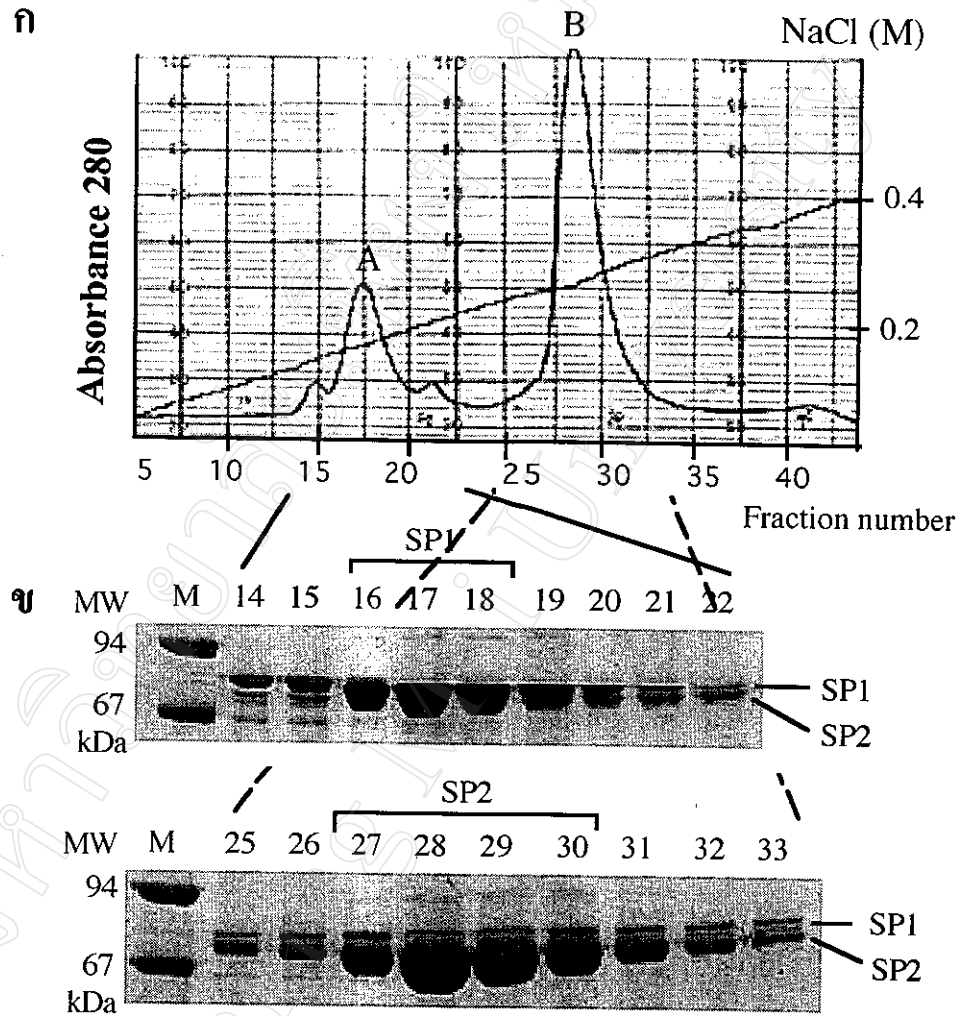
ภาพ 11 SDS-PAGE แสดงปริมาณ SP1 และ SP2 ที่แยกออกมาจาก Q-sepharose FF ที่ความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.8 M

lane 1 : equilibration buffer (30mM Tris-HCl, pH 7.5)

lane 2-9 : equilibration buffer ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.1-0.8 M ตามลำดับ

ก. ภาพเต็มของ SDS-PAGE

ข. ภาพขยายเฉพาะบริเวณแถบของ SP1 และ SP2



ภาพ 12 แสดงโปรตีนสะสมหลังจากผ่านการแยกชั้นที่ 1 : Q-sepharose HP

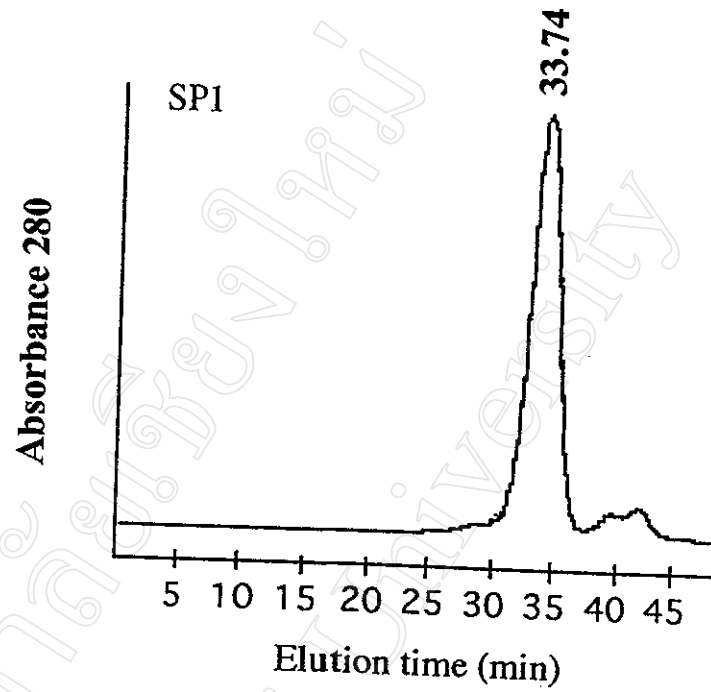
ก. chromatogram แสดง peak ของ โปรตีนสะสมที่แยกออกจาก

Q-sepharose HP peak A คือ SP1 และ peak B คือ SP2

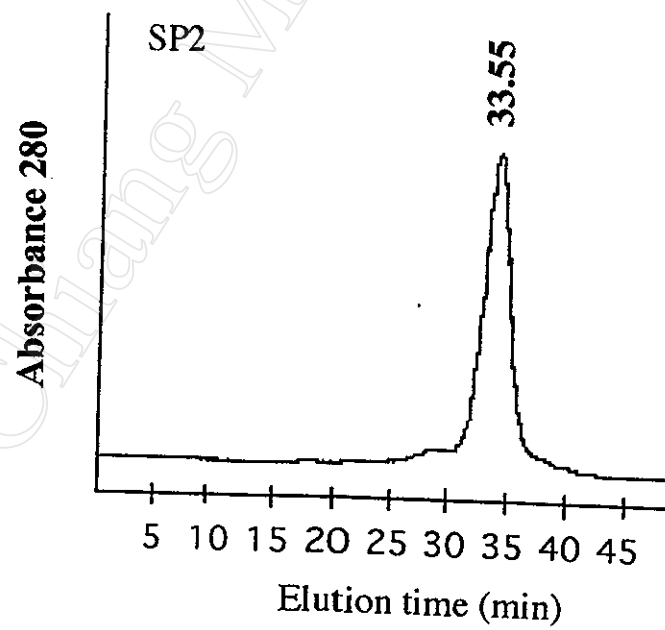
ข. SDS-PAGE แสดงปริมาณ SP1 และ SP2 ในแต่ละ fraction ตั้งแต่หมายเลข

14-22 และหมายเลข 25-33

ก



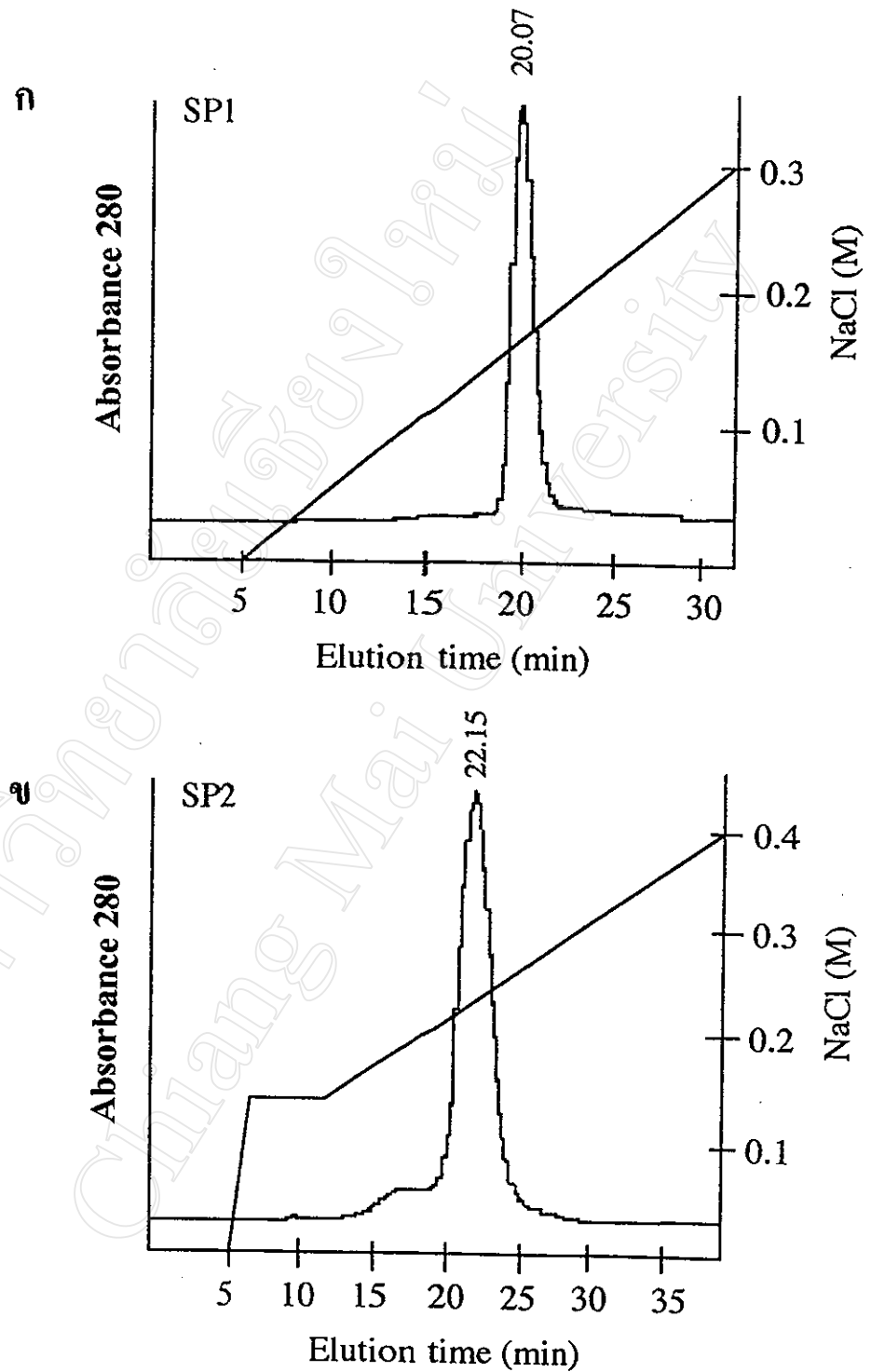
ข



ภาพ 13 chromatogram แสดง peak และเวลาที่โปรตีนสะสมแยกออกจาก Superose 6

ก. chromatogram แสดง peak ของ SP1

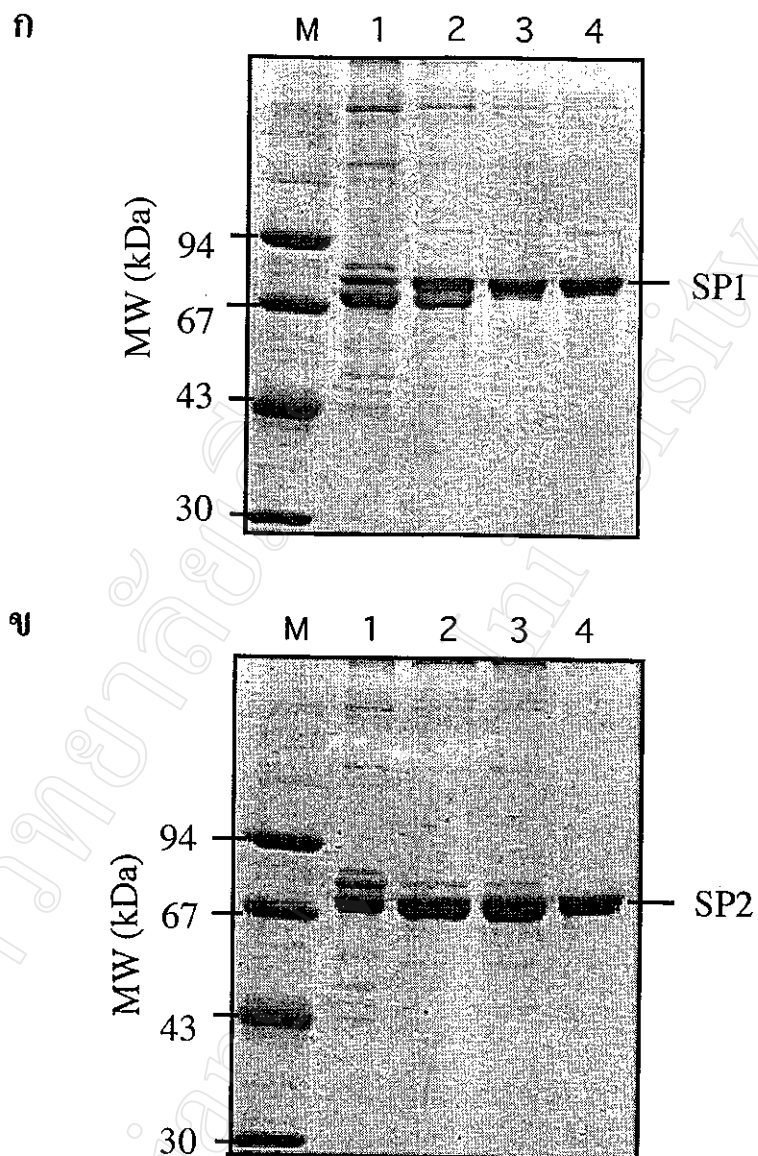
ข. chromatogram แสดง peak ของ SP2



ภาพ 14 chromatogram แสดง peak และเวลาที่โปรตีนสะสมแยกออกจาก Mono Q column

ก. chromatogram แสดง peak ของ SP1 ที่ความเข้มข้นของ NaCl 0-0.3 M

ข. chromatogram แสดง peak ของ SP2 ที่ความเข้มข้นของ NaCl 0-0.4 M



ภาพ 15 SDS-PAGE แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีนสะสมทั้งสองชนิดหลังจากผ่านการแยกแต่ละชั้น

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

- 1 คือ โปรตีนหลังจากตกตะกอนด้วย 70% ammonium sulfate
- 2 คือ โปรตีนหลังจากผ่านการแยกชั้นที่ 1 (Q-sepharose HP column)
- 3 คือ โปรตีนหลังจากผ่านการแยกชั้นที่ 2 (Superose 6 column)
- 4 คือ โปรตีนหลังจากผ่านการแยกชั้นที่ 3 (Mono Q column)

ก. SDS-PAGE แสดงแถบของ SP1

ข. SDS-PAGE แสดงแถบของ SP2

ตาราง 1 แสดงปริมาณโปรตีนสะสมที่ได้รับหลังจากผ่านการแยกบริสุทธิ์แต่ละขั้น

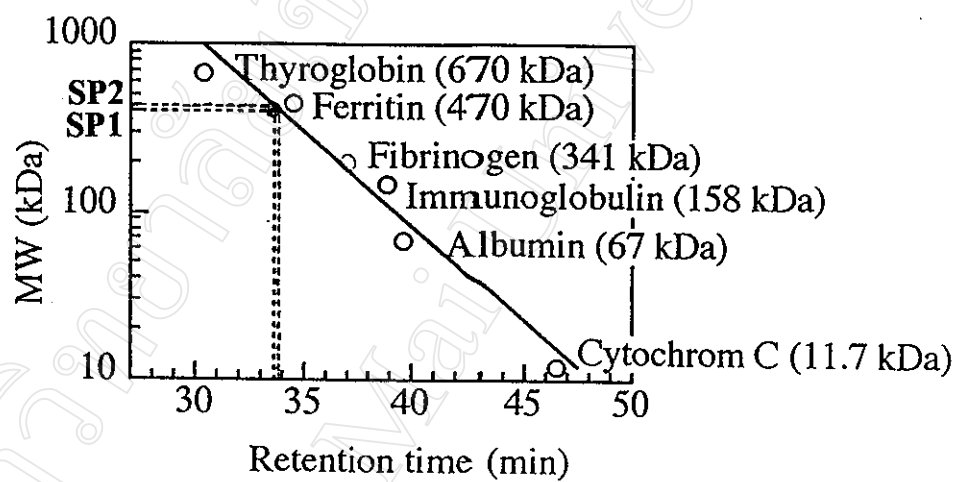
Purification step	Protein amount (mg)	% recovery
Dialysed sample	121	100
Q -sepharose HP (SP1)	19	16
Q -sepharose HP (SP2)	58	48
Superose 6 (SP1)	16	13
Superose 6 (SP2)	23	18
MonoQ (SP1)	8	7
MonoQ (SP2)	12	10

การทดลองที่ 2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสะสม

ในการทดลองนี้ได้ทำการหา native molecular weight และน้ำหนักโมเลกุลบน SDS-PAGE โดยการหา native molecular weight ทำโดยใช้ข้อมูลของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการแยกด้วย Superose 6 column โดยอาศัย retention time ที่ SP1 และ SP2 แยกออกจาก column โดย retention time ของ SP1 คือ 33.74 นาที และ SP2 คือ 33.55 นาที (ภาพ 13) นำค่า retention time ที่ได้มาหา native molecular weight โดยเปรียบเทียบกับ retention time ของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด คือ thyroglobulin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 670 kDa, ferritin 470 kDa, fibrinogen 341 kDa, immunoglobulin 158 kDa, albumin 67 kDa และ cytochrome C 11.7 kDa ผลการทดลองแสดงในรูปของ calibration curve ในภาพ 16 แสดงให้เห็นว่า SP1 มี native molecular weight เท่ากับ 403 kDa และ SP2 มี native molecular weight เท่ากับ 423 kDa

สำหรับน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของโปรตีนสะสม (subunit) นั้นหาได้จากการทำ SDS-PAGE ดังภาพ 15 ก และ ข พบว่า SP1 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 75.2 kDa และ SP2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72.2 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้กับ native molecular weight พบว่า SP1 และ SP2 ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยโปรตีน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมีโครงสร้างแบบ hexamer

Calibration curve (Superose 6)



ภาพ 16 Calibration curve แสดง native molecular weight ของโปรตีนสะสม โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด

SP1 มี native molecular weight เท่ากับ 403 kDa

SP2 มี native molecular weight เท่ากับ 423 kDa

การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสม

1) การหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal

การหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal ทำได้โดยการตัดแถบโปรตีนของ SP1 และ SP2 บน PVDF-membrane ไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ protein sequencer ผลที่ได้แสดงในรูปของ chromatogram โดยในหนึ่งโครมาโตแกรมจะแสดงผลของหนึ่ง residue ตามลำดับกรดอะมิโน ในการแปลผลนั้นทำได้โดยเปรียบเทียบความสูงของเส้นกราฟ โดยในหนึ่ง chromatogram จะมีเส้นกราฟหนึ่งเส้นที่มีความสูงเพิ่มขึ้น นำกราฟดังกล่าวไปเทียบกับ chromatogram ของกรดอะมิโนมาตรฐานก็จะได้กรดอะมิโนในแต่ละ residue จากผลการทดลองพบว่าสามารถหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal ได้เฉพาะ SP1 โดยลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ทั้ง 20 residues แสดงดังนี้

1	ser	thr	val	pro	val	ser	pro	phe	asn	(thr)	10
11	-	val	lys	(thr)	leu	pro	ile	-	-	leu	20

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal ของ SP1 ที่แน่นอนได้เพียง 15 residues เท่านั้น

2) การหา partial amino acid sequences

หาโดยการทดลอง 3 การทดลองในการหาลำดับกรดอะมิโน คือ ใช้ bromocyanide (BrCN) trypsin และ V8 protease เป็นตัวตัดสายเปปไทด์ โดยหลังจากตัดเปปไทด์ด้วย BrCN และ trypsin แล้วนำไปใส่ในเครื่อง HPLC จะได้ peak ของเปปไทด์หลังจากที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แสดงในรูปของ chromatogram (ภาพ 17 และ 18) ทั้ง SP1 และ SP2 ที่ถูกตัดด้วย BrCN และ trypsin แสดง peak หลัก ทำการเก็บ fraction ของ peak ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ protein sequencer ส่วนการตัดด้วย V8 protease นั้น หลังจากทำ SDS-PAGE แล้วทำการย้ายเปปไทด์ไปยัง PVDF-membrane หลังจากนั้นย้อม membrane ด้วยสีย้อม CBB จะได้แถบของเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กัน ตัดแถบเปปไทด์ออกจากแผ่น membrane แล้วนำไปหาลำดับกรดอะมิโน

ผลการวิเคราะห์สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ได้จากการตัดด้วย BrCN และ V8 protease ส่วน SP2 นั้นหาได้เฉพาะจากการตัดด้วย V8 protease เท่านั้น โดยลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้จากการตัดด้วย BrCN นั้นได้จากแถบเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 kDa โดยหาลำดับกรดอะมิโนได้ 20 residues ดังนี้

1	ala	ala	arg	pro	lys	leu	gly	phe	ala	pro	10
11	tyr	arg	tyr	leu	asp	tyr	(lys)	(ile)	(val)	pro	20

สำหรับลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้จากการตัดด้วย V8 protease ได้รับจากแถบเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 kDa ซึ่งสามารถหาได้ 20 residues ดังนี้

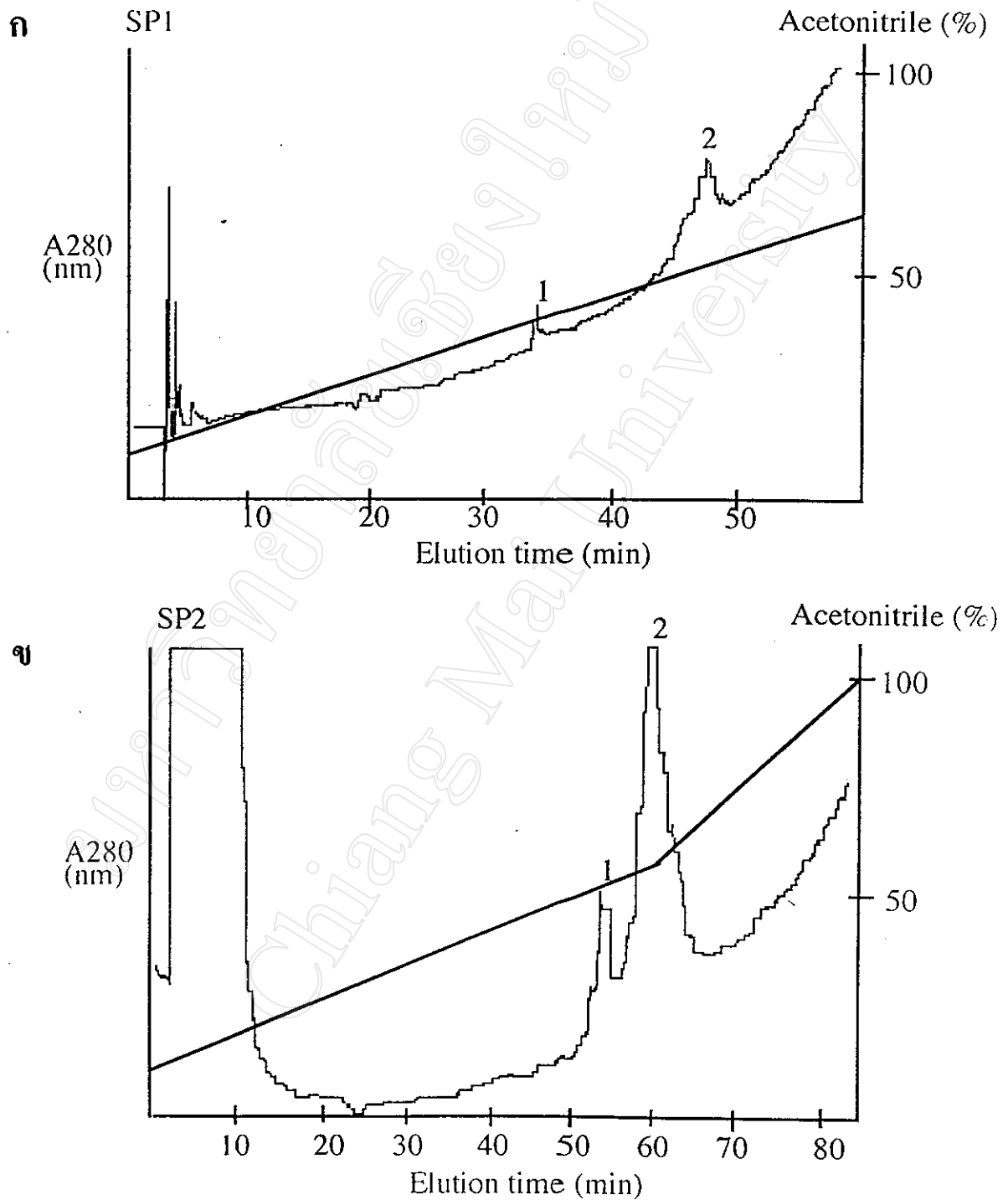
1	val	asp	leu	tyr	asn	asn	lys	gly	ile	asn	10
11	phe	val	gly	asn	val	asp	gln	ala	asn	pro	20

ลำดับกรดอะมิโนของ SP2 หาได้จากการตัดเปปไทด์ด้วย V8 protease ได้จากแถบเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16 kDa สามารถหาได้ 29 residues ดังนี้

1	leu	gly	leu	asp	ile	val	lys	gln	gly	tyr	10
11	ser	-	gly	leu	ala	tyr	his	asn	gly	ile	20
21	pro	tyr	(tyr)	val	arg	arg	asn	tyr	leu		30

หมายเหตุ : กรดอะมิโนใน () หมายถึง ผลการทดลองยังไม่ทราบแน่ชัด

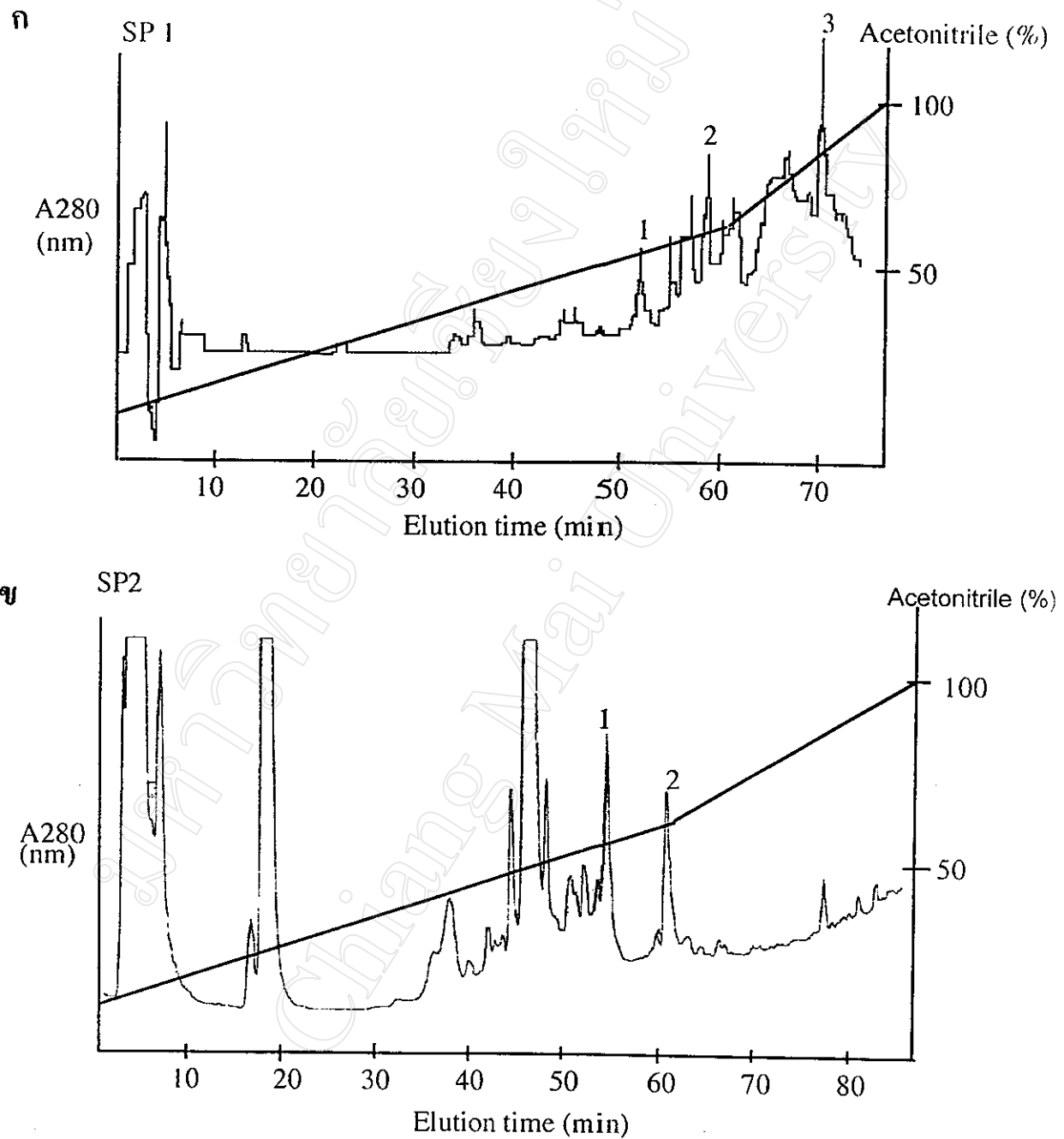
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สามารถหากรดอะมิโนในลำดับนี้ได้



ภาพ 17 chromatogram แสดง peak ที่ได้รับจาก HPLC หลังจากตัดโปรตีนสะสมด้วย BrCN

ก. chromatogram ของ SP1

ข. chromatogram ของ SP2



ภาพ 18 chromatogram แสดง peak ที่ได้รับจาก HPLC หลังจากตัดโปรตีนสะสมด้วย trypsin

ก. chromatogram ของ SP1

ข. chromatogram ของ SP2

ส่วนการตัดด้วย trypsin นั้น ไม่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้ทั้ง SP1 และ SP2
 จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้ นำมาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน
 ของแมลงชนิดอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม FASTA
 ลำดับกรดอะมิโนของ SP1 จากการตัดด้วย V8 protease เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ
 โปรตีนสะสมหลายชนิด ดังภาพ 19 และสรุปในตาราง 2

arylphorin- *Galleria mellonella*

```

                                10      20
                                VDLYNNKGINFVGNVDQANP
                                .....
NINDIQFIDTYEKTFLQLLQKGQFKAYKQEVLDYNSKSINFGVGNYSNADLYEKVPKRN
330      340      350      360      370      380

YWRSYEATARRVLGAAPRSSINYENMNIPALTDFYQTSRDPAFYQLYAKILDYINEYKE
390      400      410      420      430      440

```

arylphorin precursor- greater wax moth

```

                                10      20
                                VDLYNNKGINFVGNVDQANP
                                .....
NINDIQFIDTYEKTFLQLLQKGQFKAYKQEVLDYNSKSINFGVGNYSNADLYEKVPKRN
330      340      350      360      370      380

YWRSYEATARRVLGAAPRSSINYENMNIPALTDFYQTSRDPAFYQLYAKILDYINEYKE
390      400      410      420      430      440

```

arylphorin (partial) (*Saturnia boisduvali*)

```

                                10      20
                                VDLYNNKGINFVGNVDQANP
                                .....
NYESVRFLDTYEKSFVQLQKGHFQAYDKKIDLHNPKAINFVGNY
80      90      100      110      120

```

arylphorin (partial) (*Actias selene*)

```

                                10      20
                                VDLYNNKGINFVGNVDQANP
                                .....
NYEKVRFLDTYEKYFVQSLQKGELLGFNKKIDLHSPKAINFVGNY
80      90      100      110      120

```

ภาพ 19 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้รับจากการตัดด้วย
 V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

arylphorin (partial) (*Saturnia japonica*)

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVG NV DQANP
                                .....
NYESVRFLDTYEKYFVQCLQQGF EAYGKKIDLQDPKAINFVGNY
      80      90      100      110      120

```

hemocyanin : subunit = 6-cancer magist

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVG NV DQANP
                                .....
GVADVRDMLLYEERILDATAHGYVRINGQIVDLRNNDGIDLLGDVIESSLYSPNPQYYGA
      290      300      310      320      330      340

LHNTAHMMLGRQGDPHGKFDLPPGVLEHFETATRDPAFFRLHKYMDNIFRKHKDSLPPYT
      350      360      370      380      390      400

```

arylphorin (partial) (*Samia cynthia*)

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVG NV DQANP
                                .....
NYEAIRFLDIFEKTFVQSLQKGKFESYGKKIDFHDEKAINFVGNY
      80      90      100      110      120

```

arylphorin (partial) (*Bombyx mandarina*)

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVG NV DQANP
                                .....
NYERVRLDTYEKTFVQFLQKDHFEAFGQKIDFHDPKAINFVGNY
      80      90      100      110      120

```

arylphorin precursor (*Hyalophora cecropia*)

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVG NV DQANP
                                .....
NYEAIRFLDIFEKTFVQSLQKGQFESNGKKIDFHDEKAINFVGNYWQENADLYGEEVTKD
      330      340      350      360      370      380

YQRSYEIVARHVLGAAPKPFDKHIFMPSALDFYQTALRDPAFYQLYNRIVGYINAFKHYL
      390      400      410      420      430      440

```

ภาพ 19(ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้รับการตัดด้วย V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

cuticular molt protein precursor

```

          10      20
      VDL YNNK--GINFVGNVDQANP
      : : : : : : : : : : : :
WDIGSSFYVGSNKKIYEGVGLRSGSHTYGYNDKSIGINFIGNYNKDVPTDDQLNAVRDL
  90      100      110      120      130      140

LKCGVEQGHLTQDFHVVGQRQLMATEGPGRKLYAAIRKWPEWLEDTSISKSTTT
  150      160      170      180      190

```

storage protein 2 – Silkworm

```

          10      20
      VDL YNNKGINFVGNVDQANP
      : : : : : : : : : : : :
NYERVRLDTYEKTFVQFLQKDHFEAFGQKIDFHDPKAINFVGNYWQDNADLYGEEVTKD
  330      340      350      360      370      380

YQRSYEVFARRVLGAAPMPEDKYTFMPSAMDFYQTSLRDPAFYQLYNRIVEYIVEFKQYL
  390      400      410      420      430      440

```

arylphorin type storage protein SP2

```

          10      20
      VDL YNNKGINFVGNVDQANP
      : : : : : : : : : : : :
NYERVRLDTYEKTFVQFLQKDHFEAFGQKIDFHDPKAINFVGNYWQDNADLYGEEVTKD
  330      340      350      360      370      380

YQRSYEVFARRVLGAAPMPEDKYTFMPSAMDFYQTSLRDPAFYQLYNRIVEYIVEFKQYL
  390      400      410      420      430      440

```

sex-specific storage protein 2 precursor

```

          10      20
      VDL YNNKGINFVGNVDQANP
      : : : : : : : : : : : :
NYERVRLDTYEKTFVQFLQKDHFEAFGQKIDFHDPKAINFVGNYWQDNADLYGEEVTKD
  330      340      350      360      370      380

YQRSYEVFARRVLGAAPMPEDKYTFMPSAMDFYQTSLRDPAFYQLYNRIVEYIVEFKQYL
  390      400      410      420      430      440

```

arylphorin beta subunit precursor

```

          10      20
      VDL YNNKGINFVGNVDQANP
      : : : : : : : : : : : :
NYEKVRFLDTYEMSFLQFLQNGHFKAQDKIDFHDFKAINFVGNYWQDNADLYGEEVTKD
  330      340      350      360      370      380

YQRSYEIARQVLGAAPKPFDKYTFMPSALDFYQTSLRDPMFYQLYNRILKYIYEYKQYL
  390      400      410      420      430      440

```

ภาพ 19(ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้รับการตัดด้วย
V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

tobacco hornworm (*M. sexta*) arylphorin

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVGNVDQANP
                                ..... :
NYEKVRFLDTYEMSFLQLQNGHFKAFDQKIDF HDFKAINFVGNWQDNADLYGEEVTKD
330      340      350      360      370      380

YQRSYEIARQVLGAAPKPFDKYTFMPSALDFYQTSLRDPMFYQLYNRILKYIYEYKQYL
390      400      410      420      430      440

```

arylphoin (partial) (*Rhodinia fugax*)

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVGNVDQANP
                                ..... :
NYEKVRFLDTYEKTFLLQYLQKGHFQAYDQKINFHDSKAINFVGN
80      90      100      110      120

```

hexamerin 2 alpha (*Aedes aegypti*)

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVGNVDQANP
                                ..... :
YYDVELVDYEHRIREVIDQGYLVFPNGSHVDLTDPESIEYLGNIQGNPDVSNTRYKY
300      310      320      330      340      350

VGQIARILLGASVEHFDDHKVIPSVEHYETSLRDPMFYQLYKRRIIWEFKDHLPHYT
360      370      380      390      400      410

```

arylphorin alpha subunit precursor

```

                                10      20
                                VDL YNNKGINFVGNVDQANP
                                ..... :
NYEQIRFLDMFEMTFLLQYLQKGHFKAFDKEINFHDVKAVNFVGNWQANADLYNEEVTKL
330      340      350      360      370      380

YQRSYEINARHVLGAAPKPFNKYSFIPSALDFYQTSLRDPVFYQLYDRIINYINEFKQYL
390      400      410      420      430      440

```

ภาพ 19(ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้รับการตัดด้วย V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

ตาราง 2 แสดง homology ของลำดับกรดอะมิโนของ SP1 จากการตัดด้วย V8 protease
กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

ชนิดของโปรตีน	homology (%)
arylphorin – <i>Galleria mellonella</i>	74
arylphorin precursor – greater wax moth	74
arylphorin (partial) [<i>Saturnia boisduvali</i>]	71
arylphorin (partial) [<i>Actias selene</i>]	64
arylphorin (partial) [<i>Saturnia japonica</i>]	64
hemocyanin : subunit = 6-cancer magist	60
arylphorin (partial) [<i>Samia cynthia</i>]	57
arylphorin (partial) [<i>Bombyx mandarina</i>]	57
arylphorin precursor [<i>Hyalophora cecropia</i>]	53
cuticular molt protein precursor	53
storage protein 2 – Silkworm	53
arylphorin type storage protein SP2	53
sex-specific storage protein 2 precursor	53
Arylphorin beta subunit precursor	53
tobacco hornworm (<i>M.sexta</i>) arylphorin	53
arylphorin (partial) [<i>Rhodinia fugax</i>]	50
hexamerin 2 alpha [<i>Aedes aegypti</i>]	50
arylphorin alpha subunit precursor	47

ลำดับกรดอะมิโนของ SP2 จากการตัดด้วย V8 protease เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมหลายชนิด ดังภาพ 20 และสรุปในตาราง 3

hexamerin – *Galleria mellonella*

```

                                10      20
                                LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
                                ::- ::::: ::- ::::: ::- ::-
RGELFFFWNKQLLARYYMERLSVGLGEIPELGLNEVEEGYVSGLLYHNGIPYVRPNHLV
260      270      280      290      300      310

LNHQTWHAEEIEIEVYENRIRDMDIQGFYITNTGEHVSINSPDSIDVLGRLEAVNDSP
320      330      340      350      360      370

```

riboflavin binding hexamerin precursor

```

                                10      20
                                LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
                                ::- ::::: ::- ::::: ::- ::-
RGEWYWFVHKQLVTRYMERLSNGFGEIDELSGDVVNEGYNFGYMYHNGIPYVRPNHFFH
260      270      280      290      300      310

LDHPEHIGEIEKIKNYERRLRDAIESGYIINSAGDHVDISSPEAIDILGRLEAGVDSPN
320      330      340      350      360      370

```

arylphorin (clone B22) – bluebottle fly

```

                                10      20
                                LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
                                ::- ::::: ::- ::::: ::- ::-
YWLYNVLQLLSRYYMERLTHGYGEIPHSFLNTIEHGYDSQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
220      230      240      250      260      270

SYGKFSSYYKVMDFNRLDEIITKGV
280      290      300

```

arylphorin (*Calliphora vicina*)

```

                                10      20
                                LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
                                ::- ::::: ::- ::::: ::- ::-
YWLYNVRQLLSRYYMERLTHGYGEIPHSFLNTIEHGYDSQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
220      230      240      250      260      270

SYGKFDYYKVMDFNRLDEIITKGVVYTYEGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTFDNY
280      290      300      310      320      330

```

arylphorin subunit A4 (*Calliphora vicina*)

```

                                10      20
                                LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
                                ::- ::::: ::- ::::: ::- ::-
YWLYNVRQLLSRYYMERLTHGYGEIPHSFLNTIEHGYDSQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
310      320      330      340      350      360

SYGKFSSYYKVMDFNRLDEIITKGVVYTYEGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTFDNY
370      380      390      400      410      420

```

ภาพ 20 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SP2 ที่ได้รับจากการตัดด้วย V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

arylphorin – *Calliphora vicina*

```

              10      20
            LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
              :. . . . . : : : : : . : : :
YWLYNVRQLLSRYYMERLTHGYGEIPHFSFLNTIEHGYDSQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
310      320      330      340      350      360
SYGKFDYKYVMDFNRLDEIITKGYYVTYEGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTFDNY
370      380      390      400      410      420

```

arylphorin precursor (clone C223) – bluebottle fly

```

              10      20
            LGLDIVKQGYSG-LAYHNGIPYYVRRNYL
              :. . . . . : : : : : . : : :
YWLYNVRQLLSRYYMERLSHGFGIEPAFSFIDSEYGYNPQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
240      250      260      270      280      290
SFGKFDYFYKVLDFNRMDEIITKGYYVTYDGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTLHSY
300      310      320      330      340      350

```

arylphorin subunit C223 precursor

```

              10      20
            LGLDIVKQGYSG-LAYHNGIPYYVRRNYL
              :. . . . . : : : : : . : : :
YWLYNVRQLLSRYYMERLSHGFGIEPAFSFIDSEYGYNPQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
310      320      330      340      350      360
SFGKFDYFYKVLDFNRMDEIITKGYYVTYDGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTLHSY
370      380      390      400      410      420

```

arylphorin subunit A4 precursor

```

              10      20
            LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
              :. . . . . : : : : : . : : :
YWLYNVRQLLSRYYMERLTHGYGEIPHFSFLNTIEHGYDSQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
310      320      330      340      350      360
SYGKFSYKYVMDFNRLDEIITKGYYVTYEGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTFDNY
370      380      390      400      410      420

```

arylphorin precursor (clone A4) – bluebottle fly

```

              10      20
            LGLDIVKQGY-SGLAYHNGIPYYVRRNYL
              :. . . . . : : : : : . : : :
YWLYNVRQLLSRYYMERLTHGYGEIPHFSFLNTIEHGYDSQLVYHNGVGFYSYRKNYEVE
310      320      330      340      350      360
SYGKFSYKYVMDFNRLDEIITKGYYVTYEGKTIDLRKPESIEYIGSIMQGNVDTFDNY
370      380      390      400      410      420

```

ภาพ 20(ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ SP2 ที่ได้รับการคัดด้วย
V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

ตาราง 3 แสดง homology ของลำดับกรดอะมิโนของ SP2 จากการตัดด้วย V8 protease กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสมชนิดอื่น

ชนิดของโปรตีน	homology (%)
hexamerin – <i>Galleria mellonella</i>	69
riboflavin binding hexamerin precursor	55
arylphorin (clone B22) – bluebottle fly	46
arylphorin [<i>Calliphora vicina</i>]	46
arylphorin subunit A4 [<i>Calliphora vicina</i>]	46
arylphorin – <i>Calliphora vicina</i>	46
arylphorin precursor (clone C223) – bluebottle fly	42
arylphorin subunit C223 precursor	42
arylphorin subunit A4 precursor	42
arylphorin precursor (clone A4) – bluebottle fly	42

จากการเปรียบเทียบ homology ของลำดับกรดอะมิโนของ SP1 และ SP2 ที่ได้รับจากการตัดด้วย V8 protease กับโปรตีนชนิดอื่นๆ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ SP1 และ SP2 ที่ได้จากการตัดด้วย V8 protease มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนสะสมของแมลงหลายชนิด โดย SP1 คล้ายกับ arylphorin ของ *G. mellonella* มากที่สุด รองลงมาคือ arylphorin precursor ของ *H. cecropia* ส่วน SP2 นั้นคล้ายคลึงกับ hexamerin ของ *G. mellonella* มากที่สุด รองลงมาคือ riboflavin binding hexamerin precursor ของ *H. cecropia*

การทดลองที่ 4 การสร้างแอนติบอดี

1) การทำ titration ของ antiserum activity

หลังจากที่ได้ซีรัมแล้วนำมาทำการวัด activity ของซีรัม โดยการ titration ของ SP1 antiserum โดยใช้ Western blot analysis ละลาย antiserum ด้วย PBS ในอัตราส่วน 1 : 2,000, 1 : 4,000, 1 : 8,000, 1 : 16,000 และ 1 : 32,000 ตามลำดับ แล้วใช้ anti-rabbit IgG เป็น second antibody ใช้ในอัตราส่วน 1 : 2,000 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NIH-image ผลการทดลองแสดงในภาพ 21 จากผลการทดลองเห็นได้ว่าสามารถวัด activity ของ antibody ได้ทุกความเข้มข้น คือ

ความเข้มข้น 1 : 2,000 วัด relative intensity ได้ 100%

ความเข้มข้น 1 : 4,000 วัด relative intensity ได้ 75%

ความเข้มข้น 1 : 8,000 วัด relative intensity ได้ 81%

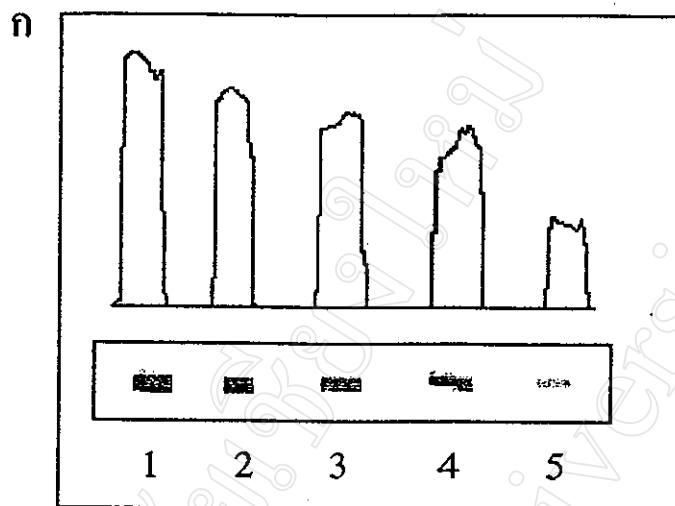
ความเข้มข้น 1 : 16,000 วัด relative intensity ได้ 71%

ความเข้มข้น 1 : 32,000 วัด relative intensity ได้ 32%

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ antibody ได้ที่ทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นของ antibody สูงจะแสดง intensity ที่ตรวจได้มากกว่าความเข้มข้นของ antibody ต่ำ

2) การหาปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่สามารถวัด antibody activity ได้

ทำ Western blot analysis โดยปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ 100 นาโนกรัม, 10 นาโนกรัม, 1 นาโนกรัม, 0.1 นาโนกรัม และ 0.01 นาโนกรัม โดยใช้ความเข้มข้นของ antibody 1 : 10,000 และใช้ความเข้มข้นของ second antibody 1 : 2,000 หลังจากนั้นนำไปวัดความเข้มของแถบ (intensity) ด้วยโปรแกรม NIH-image ผลการทดลองแสดงในภาพ 22 จากผลการทดลองจะเห็นว่าสามารถวัด intensity ของทั้ง SP1 และ SP2 ได้เพียงสองแถบ คือ 100 นาโนกรัม และ 10 นาโนกรัม โดย SP1 ที่มีปริมาณโปรตีน 100 นาโนกรัม มี intensity 100% ส่วน SP1 ที่มีปริมาณโปรตีน 10 นาโนกรัมนั้นมี intensity 12% SP2 ที่มีปริมาณโปรตีน 100 นาโนกรัม มี intensity 100% และ SP2 ที่มีปริมาณโปรตีน 10 นาโนกรัม มี intensity 17% จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าปริมาณโปรตีนที่น้อยที่สุดที่ SP1 และ SP2 antibody สามารถตรวจจับได้ คือ 10 นาโนกรัม และจะเห็นว่าที่ปริมาณโปรตีนเท่ากัน activity ของแอนติบอดีทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน



ข

Peak no.	Relative intensity (%)
1	100
2	75
3	81
4	71
5	32

Peak หมายเลข 1 คือ ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 2,000

Peak หมายเลข 2 คือ ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 4,000

Peak หมายเลข 3 คือ ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 8,000

Peak หมายเลข 4 คือ ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 16,000

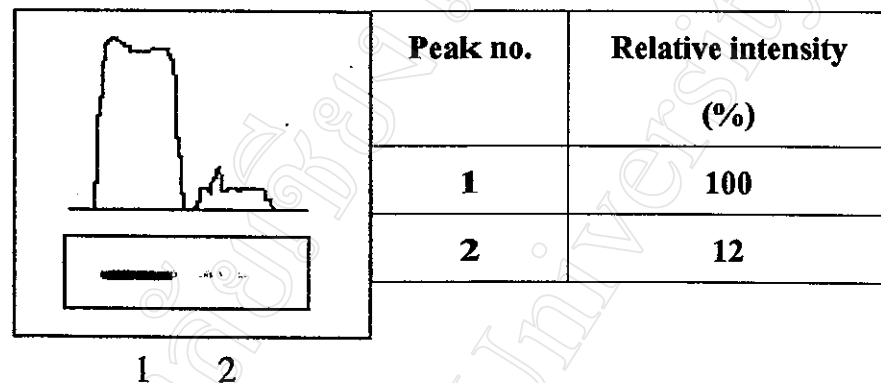
Peak หมายเลข 5 คือ ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 32,000

ภาพ 21 เปรียบเทียบ SP1 antiserum activity ที่ผลิตได้ เมื่อทำให้เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วนต่างๆ

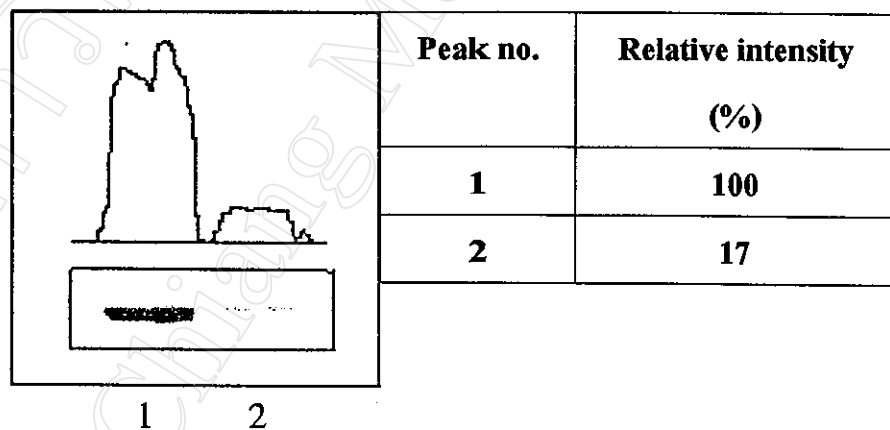
ก. Western blot analysis แสดง intensity ของแถบของแอนติบอดี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ข. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ intensity ของแถบแอนติบอดี

ก SP1



ข SP2



ภาพ 22 แสดงการเปรียบเทียบ antibody activity ของ SP1 และ SP2 ในรูปของ Western blot analysis และ ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ intensity

Peak หมายเลข 1 คือ ปริมาณ โปรตีน 100 นาโนกรัม

Peak หมายเลข 2 คือ ปริมาณ โปรตีน 10 นาโนกรัม

ก. แสดง intensity ของ SP1

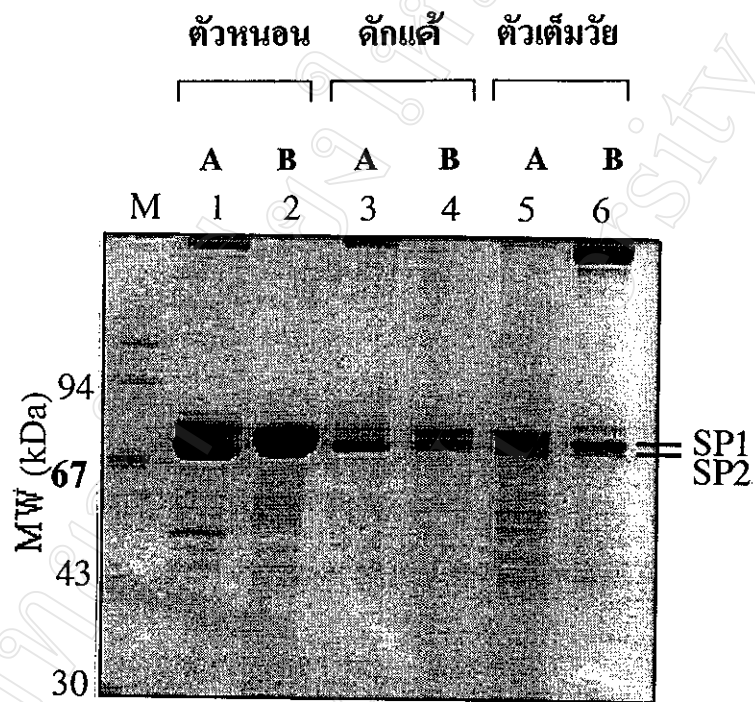
ข. แสดง intensity ของ SP2

การทดลองที่ 5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนสะสมในระยะต่างๆของการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

การศึกษการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของหนอนเยื่อไผ่ระยะ larval diapause, ระยะคักแค้ และตัวเต็มวัย นำตัวอย่างโปรตีนจากฮีโมกลิมพ์และ fat body ของทั้ง 3 ระยะการเจริญ ตัวอย่างละ 3 ไมโครกรัม นำมาทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB ผลการทดลองแสดงในภาพ 23 จาก SDS-PAGE จะเห็นว่าพบ SP1 และ SP2 ได้ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของทุกระยะการเจริญ โดยพบปริมาณมากที่สุดในระยะตัวหนอน รองลงมาคือ ระยะคักแค้ และตัวเต็มวัย ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ในแต่ละระยะการเจริญ พบว่าในระยะตัวหนอน ปริมาณ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์มีมากกว่าใน fat body ส่วนในระยะคักแค้นั้นพบว่าปริมาณ SP1 และ SP2 ใน fat body มีมากกว่าในฮีโมกลิมพ์ สำหรับตัวเต็มวัย พบว่า SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์มีมากกว่าใน fat body และเพื่อยืนยันว่าแถบโปรตีนที่ได้เป็นแถบของ SP1 และ SP2 จึงทำ Western blot และ immunostaining โดยใช้ชนิดและปริมาณโปรตีนเหมือนกับที่ใช้ทำ SDS-PAGE ทุกประการ ผลการทดลองแสดงในภาพ 24 จากผลการทดลองจะเห็นว่าสามารถตรวจพบ SP1 และ SP2 ได้ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของระยะตัวหนอน และระยะคักแค้ แต่ไม่สามารถตรวจพบได้ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของตัวเต็มวัย ส่วนผลของ SP2 นั้นคล้ายคลึงกับผลของ SP1 แต่มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของปริมาณ SP2 ในฮีโมกลิมพ์ของระยะตัวหนอนและระยะคักแค้ โดย intensity ของ SP1 และ SP2 แสดงในตาราง 4

ตาราง 4 แสดงผลการวิเคราะห์ intensity ของ SP1 และ SP2 ที่วัดได้จากฮีโมกลิมพ์ และ fat body ของตัวหนอน, คักแค้และตัวเต็มวัย

ชนิดของโปรตีน	ระยะของหนอนเยื่อไผ่	intensity (%)	
		ฮีโมกลิมพ์	fat body
SP1	ตัวหนอน	100	21
	คักแค้	37	46
	ตัวเต็มวัย	0	0
SP2	ตัวหนอน	100	12
	คักแค้	82	31
	ตัวเต็มวัย	0	0

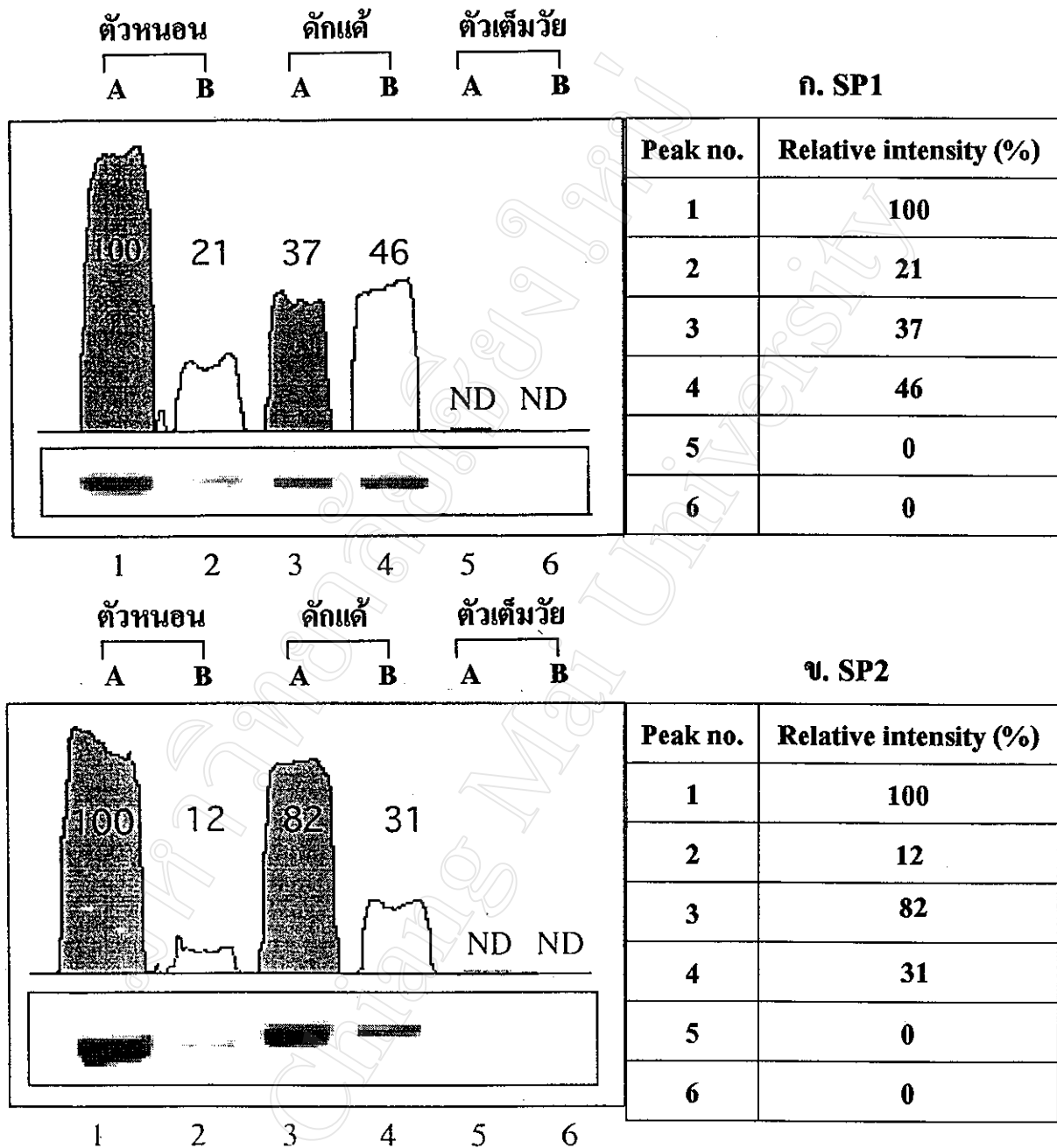


M คือ โปรตีนมาตรฐาน

A คือ โปรตีนจากฮีโมลิฟ

B คือ โปรตีนจากก้อนไขมัน

ภาพ 23 SDS-PAGE แสดงแถบของ SP1 และ SP2 ในระยะตัวหนอน, ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย



A คือ โปรตีนจากฮีโมกลิน

B คือ โปรตีนจากก้อนไขมัน

ภาพ 24 Western blot analysis แสดง intensity ของ SP1 และ SP2 ในระยะตัวหนอน
ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย

ก. แสดง intensity ของ SP1

ข. แสดง intensity ของ SP2

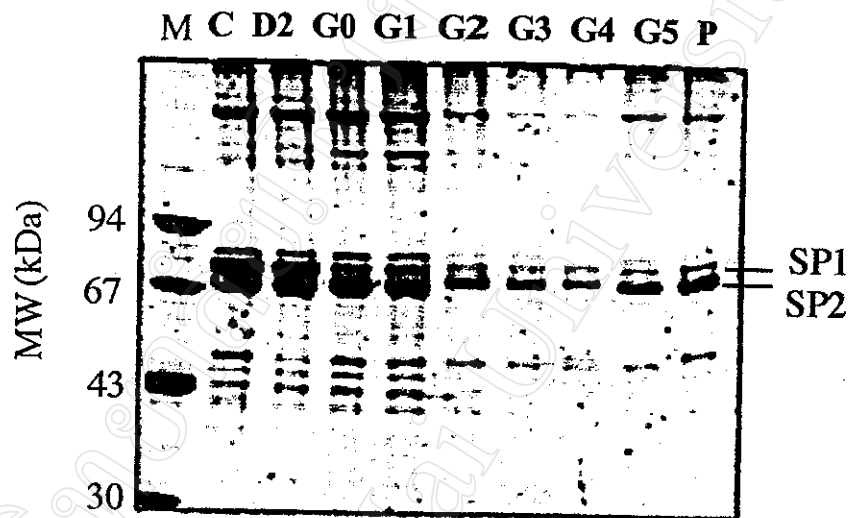
การทดลองที่ 6 การศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนสะสมในอีโมลิฟของหนอนเยื่อไผ่ระยะต่างๆ

ในการทดลองนี้ทำการหยดฮอร์โมนจูวีไนล์ความเข้มข้น 0.005 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร ให้แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะโคอะพอส จากนั้นทำการเก็บอีโมลิฟของหนอนที่การเปลี่ยนแปลงของตัวหนอนระดับต่างๆ ได้แก่ 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน, G0, G1, G2, G3, G4, G5 และ ดักแด้ที่เกิดขึ้นในคืนไผ่ตามธรรมชาติ หลังจากนั้นอีโมลิฟจากแต่ละระยะของการเปลี่ยนแปลงมาทำอิเล็กโตรโฟเรซิส แล้วเชื่อมด้วยสีย้อม CBB ผลการทดลองแสดงในภาพ 25 จาก SDS-PAGE จะเห็นว่าพบ SP1 และ SP2 เป็นปริมาณมากในอีโมลิฟของกลุ่มควบคุม, 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน G0 และ G1 แต่หลังจากนั้นปริมาณ SP1 และ SP2 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในระยะ G2, G3, G4, G5 และดักแด้ที่ได้รับจากธรรมชาติ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาโดยทำ Western blot และ immunostaining โดยใช้ชนิดและปริมาณโปรตีนเหมือนกับที่ใช้ทำ SDS-PAGE ทุกประการ ผลการทดลองแสดงในภาพ 26ก และ 26ข จะเห็นว่าสามารถตรวจพบ SP1 ได้ในกลุ่มควบคุม, 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน, G0 และ G1 แต่ไม่สามารถตรวจพบ SP1 ได้ในระยะ G2, G3, G4, G5 และดักแด้ที่เกิดขึ้นในคืนไผ่ตามธรรมชาติ ส่วนผลการทดลองของ SP2 นั้น พบว่าปริมาณของ SP2 ลดลงตั้งแต่ระยะ G0 ที่หนอนหยุดการเคลื่อนไหว จากนั้นจะพบในอีโมลิฟประมาณ 50% ตลอดระยะ G1 ถึง G5 ความเข้มของแถบของ SP1 และ SP2 จากอีโมลิฟและ fat body ของตัวหนอนที่การเปลี่ยนแปลงระยะต่างๆ ภายหลังจากได้รับ JHA แสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงผลการวิเคราะห์ intensity ของ SP1 และ SP2 จากอีโมลิฟของตัวหนอนที่การเปลี่ยนแปลงระยะต่างๆ ภายหลังจากได้รับ JHA

โปรตีน	intensity (%)								
	C	Day2	G0	G1	G2	G3	G4	G5	P
SP1	100	54	20	51	0	0	0	0	0
SP2	100	-	57	74	58	64	67	70	-

หมายเหตุ : ไม่แสดงผลของ SP2 ในระยะ day2 และ ดักแด้ที่ได้จากธรรมชาติ (P)



M คือ โปรตีนมาตรฐาน

C (กลุ่มควบคุม) : ฮีโมกลินพ์ของตัวหนอนระยะ larval diapause

D2 (day 2) : ฮีโมกลินพ์ของตัวหนอน 2 วัน หลังจากได้รับฮอร์โมน

G0 : ฮีโมกลินพ์ของตัวหนอนที่หยุดการเคลื่อนไหว

G1 : ฮีโมกลินพ์ของตัวหนอนที่ผนังลำตัวมีจุดสีแดงเล็กๆ เกิดขึ้น

G2 : ฮีโมกลินพ์ของตัวหนอนที่ผนังลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้ม

G3 : ฮีโมกลินพ์ของตัวหนอนที่ผนังลำตัวเปลี่ยนเป็นดักแด้

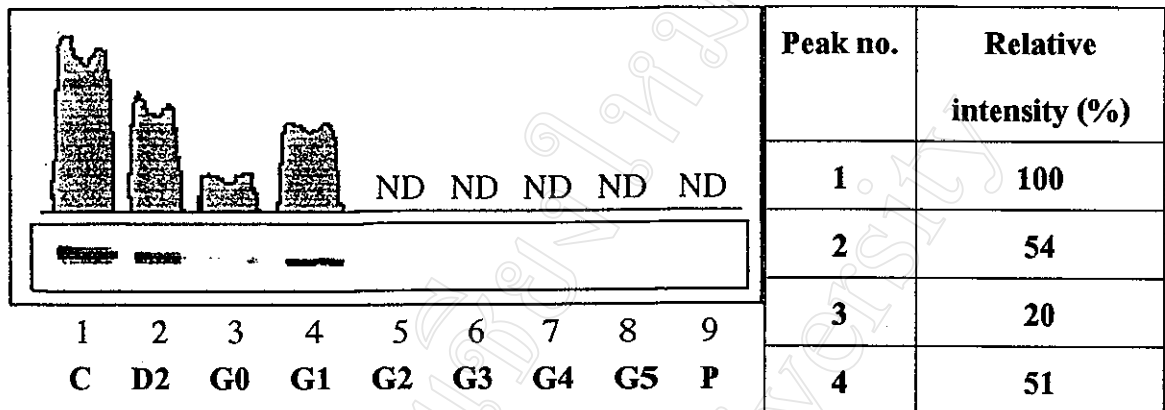
G4 : ฮีโมกลินพ์ของดักแด้ที่คิวติเคิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

G5 : ฮีโมกลินพ์ของดักแด้ที่คิวติเคิลเปลี่ยนเป็นสีดำ

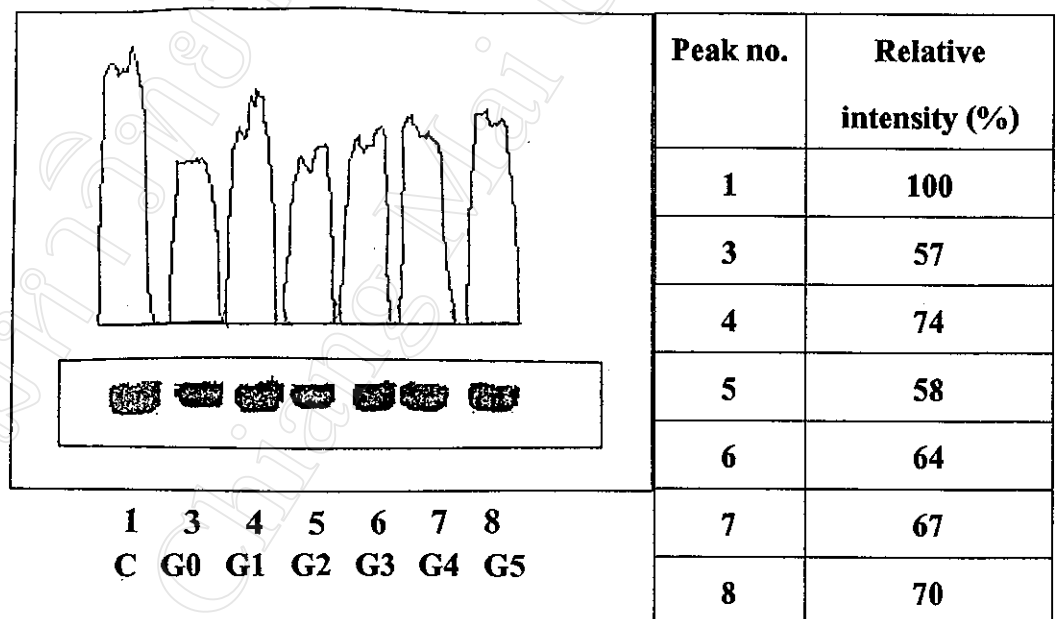
P : ฮีโมกลินพ์ของดักแด้ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ

ภาพ 25 SDS-PAGE แสดงแถบของ SP1 และ SP2 ภายหลังจากให้ JHA

ก SP1



ข SP2



ภาพ 26 Western blot analysis แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของ SP1 และ SP2 ใน
 ซีโมลิฟของตัวหนอนที่การเปลี่ยนแปลงระยะต่างๆ หลังจากให้ JHA

ก. แสดง intensity ของ SP1

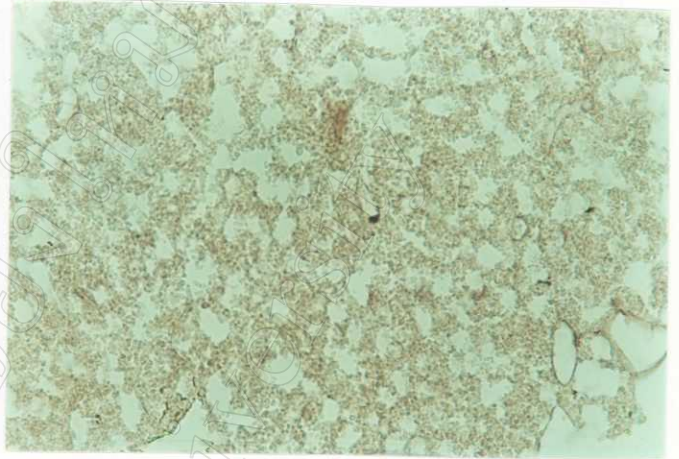
ข. แสดง intensity ของ SP2

**การทดลองที่ 7 การศึกษาแหล่งสังเคราะห์และหลังโปรตีนสะสมทั้งสองชนิด
โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry**

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับของโปรตีนสะสม SP1 และ SP2 ในระยะต่างๆ ของการเจริญของหนอนเชื้อไฟ ในการทดลองที่ 5 พบว่าสามารถตรวจพบ SP1 และ SP2 ได้ใน โปรตีนที่สกัดจาก fat body ของตัวหนอนและคักแค้ ในการทดลองนี้จึงทำการยืนยันผลดังกล่าวโดย นำ fat body ของตัวหนอนและคักแค้มาทำ paraffin section แล้วนำเนื้อเยื่อดังกล่าวมา incubate ด้วย anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antibody จากนั้นนำมา incubate ด้วย HRP conjugated anti-rabbit IgG ตรวจผลที่ได้โดยใช้ DAB จากผลการทดลองพบว่า ไม่สามารถตรวจพบสีน้ำตาล ของ DAB ได้ใน fat body ของตัวหนอนและคักแค้ของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้ incubate เนื้อเยื่อใน anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antibody (ภาพ 27ก, 28ก, 29ก และ 30ก) ส่วนเนื้อเยื่อของ fat body ของตัวหนอนและคักแค้ที่ incubate ด้วย anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antibody นั้น สามารถตรวจพบกรานูลเม็ดเล็กๆ ติดสีน้ำตาลของ DAB ได้ (ภาพ 27ข, 28ข, 29ข และ 30ข) แสดงว่ามี SP1 และ SP2 ใน fat body ของตัวหนอนและคักแค้



ก



ข

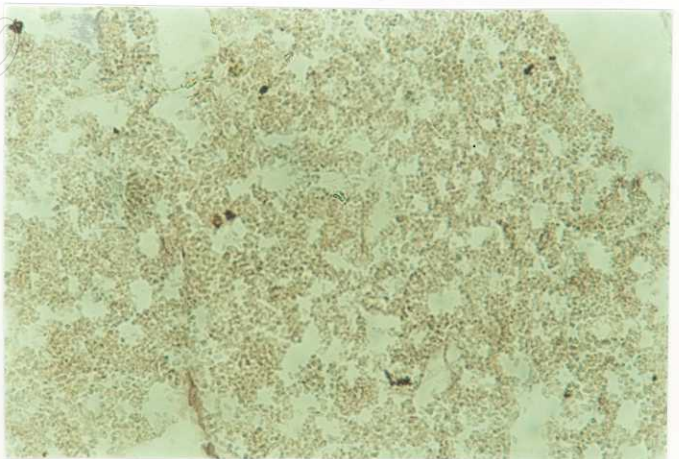
ภาพ 27 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ fat body ของตัวหนอนที่กำลังขยาย 100 เท่า

ก. กลุ่มควบคุม

ข. fat body ของตัวหนอนที่ incubate ด้วย anti-SP1 rabbit polyclonal antibody



ก

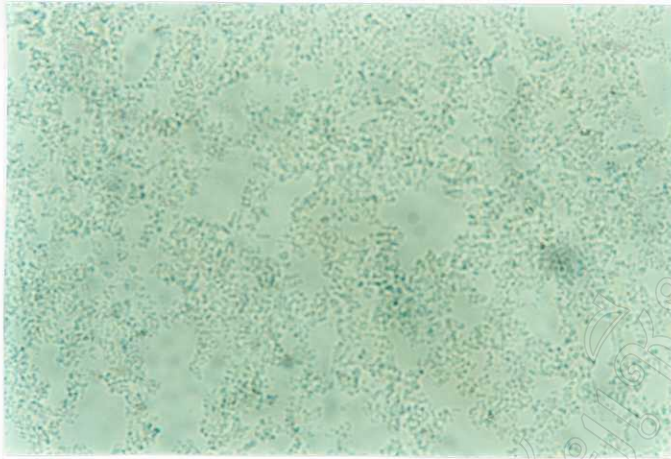


ข

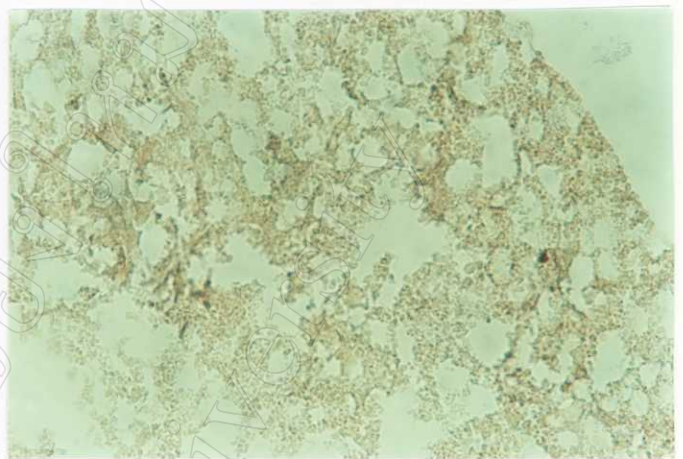
ภาพ 28 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ fat body ของตัวหนอนที่กำลังขยาย 100 เท่า

ก. กลุ่มควบคุม

ข. fat body ของตัวหนอนที่ incubate ด้วย anti-SP2 rabbit polyclonal antibody



ก

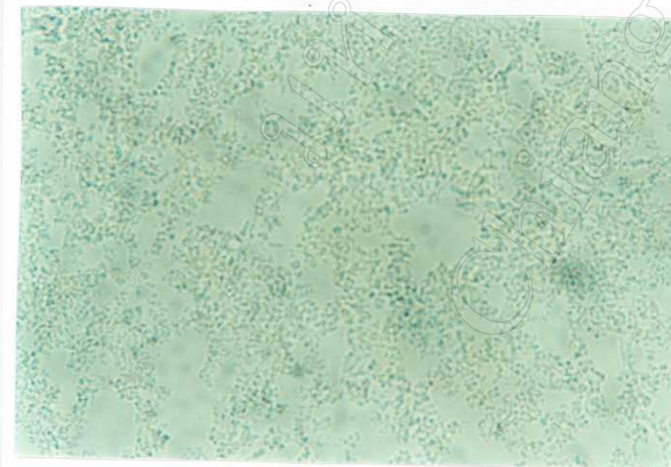


ข

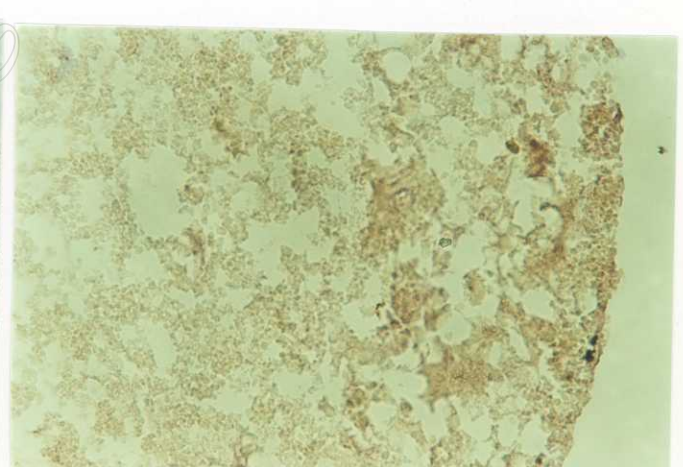
ภาพ 29 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ fat body ของดักแด้ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ก. กลุ่มควบคุม

ข. fat body ของดักแด้ที่ incubate ด้วย anti- SP1 rabbit polyclonal antibody



ก



ข

ภาพ 30 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ fat body ของดักแด้ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ก. กลุ่มควบคุม

ข. fat body ของดักแด้ที่ incubate ด้วย anti-SP2 rabbit polyclonal antibody