

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

#### การแยกโปรตีนสะสม

โปรตีนสะสมในอีโมลิฟของหนอนเชื้อไผ่ระยะโคอะพอสตูกแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนใน 70% แอมโมเนียมซัลเฟต (Munn and others, 1971 ; Levenbook and Bauer, 1980) แล้วนำมาผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ chromatography 3 ชนิด คือ Q-sepharose HP, Superose 6 และ Mono Q column chromatography เนื่องจากโปรตีนสะสมโดยทั่วไปไม่ละลายในน้ำกลั่นแต่ละลายในสารละลายเกลือ (Levenbook and Bauer, 1980) ดังนั้นก่อนทำการแยกจึงทำการหาความเข้มข้นของ NaCl ที่ใช้ในการแยกโปรตีนออกจาก column โดยใช้ Q-sepharose FF column จากการทดลองพบว่า SP1 และ SP2 สามารถแยกออกจาก column ได้ที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.1 M ถึง 0.4 M แสดงให้เห็นว่าค่าการละลายของ SP1 และ SP2 อยู่ระหว่างความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0.1 M ถึง 0.4 M โดย SP1 แยกออกจาก column ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.1 M ส่วน SP2 แยกออกจาก column ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl 0.2 M ซึ่งเห็นได้จากขนาดและความเข้มของแถบของ SP1 และ SP2 ที่ปรากฏบน SDS-PAGE จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าควรใช้ความเข้มข้นของ NaCl 0.1 M และ 0.2 M ในการแยก SP1 และ SP2 ออกจาก column

ขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์เริ่มด้วย Q-sepharose HP ใช้ elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ตั้งแต่ 0 M ถึง 0.4 M จาก chromatogram พบ peak หลัก 2 peak ซึ่งเป็น peak ของ SP1 และ SP2 แสดงว่าสามารถแยก SP1 และ SP2 ออกจากกันได้โดยใช้ Q-sepharose HP แต่แยกออกจากกันอย่างไม่สมบูรณ์ สังเกตได้จากมี SP1 ปนอยู่ใน SP2 fraction และ SP2 ที่ปนอยู่ใน SP1 fraction จึงทำการแยก SP1 ออกจาก SP2 fraction และแยก SP2 ออกจาก SP1 fraction ด้วย Superose 6 โดยใช้ elution buffer ที่มี NaCl 0.2 M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทั้ง SP1 และ SP2 สามารถแยกออกจาก column ได้ chromatogram ที่ได้จาก Superose 6 แสดง peak เดี่ยว ซึ่งแสดงว่าโปรตีนทั้งสองชนิดถูกแยกออกจากกัน ในขั้นตอนนี้ แต่เมื่อนำไปทำ SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนชนิดอื่นปะปนอยู่ใน SP1 และ SP2 fraction จึงต้องทำการแยกโปรตีนที่ปะปนออกจาก SP1 และ SP2 โดยใช้ chromatography ที่ 3 คือ Mono Q จาก chromatogram พบว่า peak ของ SP1 และ SP2 ที่ได้เป็น peak เดี่ยวและปรากฏแถบ

ของ SP1 และ SP2 เพียงแถบเดียวบน SDS-PAGE แสดงว่า SP1 และ SP2 ที่ผ่านกระบวนการแยกชั้นที่ 3 นี้มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป และจากการวัดปริมาณ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนจนถึงขั้นสุดท้ายนั้น พบว่าได้รับ SP1 8 มิลลิกรัม และ SP2 12 มิลลิกรัม คิดเป็น 7% และ 10% เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนเริ่มต้นซึ่งปริมาณโปรตีนดังกล่าวเพียงพอสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

### การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสะสม

จากการหา native molecular weight ของ SP1 และ SP2 โดยใช้ข้อมูลของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการแยกด้วย Superose 6 (Gel-filtration chromatography) หลังจากนำ retention time ของ SP1 (33.74 นาที) และ SP2 (33.55 นาที) มาเปรียบเทียบกับ retention time ของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด พบว่า SP1 มี native molecular weight เท่ากับ 403 kDa และ SP2 มี native molecular weight เท่ากับ 423 kDa ส่วนน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของ SP1 และ SP2 นั้นหาได้จากแถบที่ปรากฏบน SDS-PAGE สาเหตุที่ต้องหาหน่วยย่อยบน SDS-PAGE นั้นเนื่องจากการทำโปรตีนให้อยู่ในรูป monomers จะต้องใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น hydrogen bond disrupting reagents เป็นตัวแยก oligomers ให้เป็น monomers พบว่าหน่วยย่อยของ SP1 มีน้ำหนักโมเลกุล 75.2 kDa และหน่วยย่อยของ SP2 มีน้ำหนักโมเลกุล 72.2 kDa และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยกับ native molecular weight พบว่า SP1 และ SP2 ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยโปรตีน มีโครงสร้างเป็น hexamer จากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่า SP1 และ SP2 เป็นโปรตีนสะสมจริง เนื่องจากโปรตีนสะสมโดยทั่วไปมี native molecular weight ประมาณ 500 kDa และประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย (Roberts and Brock, 1981) ซึ่งเหมือนกับโปรตีนสะสมในแมลงชนิดอื่น เช่น SP-1 และ SP-2 ของ *B. mori* ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย 80 kDa (Fujiwara and Yamashita, 1990), major larval serum polypeptides (MLSP)-1, 2, 3 และ 4 ของ mediterranean fruit fly, *C. capitata* มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 81 kDa และ 87 kDa (Mintzas and Rina, 1986), hexameric storage protein (SPR) ของ *R. prolixus* มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยคือ 78 kDa และมี native molecular weight 470 kDa (Rehn and Rolom, 1990), hexamerins ใน honeybee, *A. mellifera* มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 65-70 kDa (Danty and others, 1998), arylphorin ของ honeybee, *A. mellifera* มี native molecular weight 470 kDa และมีน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยประมาณ 74 kDa (Ryan and others, 1984) แต่ก็มีโปรตีนสะสมบางชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างแตกต่างออกไป ได้แก่ โปรตีนสะสมในเนื้อเยื่อของ greater wax moth, *G. mellonella* ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนัก

โมเลกุล 74, 76, 81 และ 82 kDa และมี native molecular weight 235 kDa ซึ่งมีโครงสร้างเป็น trimer (Miller and Silhacek, 1982)

เมื่อเปรียบเทียบ native molecular weight และน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของ SP1 และ SP2 ของหนอนเชื้อไฟกับโปรตีนสะสมส่วนใหญ่แล้วถือว่ามีค่าใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่า SP1 และ SP2 เป็นโปรตีนสะสมที่มีโครงสร้างเป็น hexamer

## การหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสะสม

### 1. การหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal

จากการหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal สามารถหาลำดับกรดอะมิโนได้เฉพาะ SP1 ไม่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของ SP2 ได้ ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของ SP1 นั้นทราบเพียง 15 residues การหาลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ได้อย่างไม่สมบูรณ์และไม่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของ SP2 ได้นั้นอาจเกิดจากการที่กรดอะมิโนในตำแหน่ง N-terminal ถูกบดหรือถูกทำลายก่อนหรือในระหว่างที่เกิดกระบวนการการหาลำดับกรดอะมิโน ซึ่งเกิดเช่นเดียวกันในการทดลองของ Kramer *et al.* (1980) ที่หาความเหมือนของ N-terminal ของโปรตีนสองชนิดที่เป็นส่วนประกอบของ manducin ใน *M. sexta* แต่ไม่สามารถหาได้ ซึ่งในการหาลำดับกรดอะมิโนจะใช้หลักการ Edman degradation คือใช้ reagent ไปสร้าง derivative ที่ N-terminal (Findlay and Geisow, 1989) แต่ในการทดลองนี้ไม่ได้รับ phenylthiohydantoin (PTH) derivatives แสดงว่าอาจเกิดการบด N-terminal amino acid residue

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนทั้ง 15 residues มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดอื่นๆ พบว่าลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal ของ SP1 ไม่เหมือนกับโปรตีนสะสมของแมลงชนิดอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้อาจมีจำนวนไม่เพียงพอ

### 2. การหา partial amino acid sequences

หลังจากดัดสายโพลีเปปไทด์ด้วย BrCN, trypsin และ V8 protease แล้ว สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ได้จากการตัดด้วย BrCN และ V8 protease ส่วน SP2 หาได้จากการตัดด้วย V8 protease ลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้จากการตัดด้วย BrCN นั้นเหมือนกับโปรตีนหลายชนิด สำหรับลำดับกรดอะมิโนของ SP1 ที่ได้จากการตัดด้วย V8 protease มีความเหมือนกับ arylphorin ของแมลงหลายชนิด โดยเหมือนกับ arylphorin และ arylphorin precursor ของ *G. mellonella* มากที่สุด คือ 74% และเหมือนกับ arylphorin ของ *H. cecropia* 53% จากข้อมูลนี้สามารถกล่าวได้ว่า SP1

จัดอยู่ในกลุ่มของ arylphorin ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ SP2 ที่ได้จากการตัดด้วย V8 protease มีความเหมือนกับ hexamerin ของ *G. mellonella* 69% และ riboflavin binding hexamerin precursor ของ *H. cecropia* 55% แสดงว่า SP2 จัดอยู่ในกลุ่มของ hexamerin จากการทดลองนี้สามารถหา ลำดับกรดอะมิโนและชนิดของ SP1 และ SP2 ได้จากการตัดสายโพลีเปปไทด์ด้วย V8 protease ซึ่ง เอนไซม์ชนิดนี้จะตัดโพลีเปปไทด์ตรง carboxy side ของ aspartate และ glutamate residues (Miller and Silhacek, 1982) ซึ่งแสดงว่า V8 protease เหมาะสมสำหรับการหา partial amino acid sequences ของ SP1 และ SP2

ส่วนการหาลำดับกรดอะมิโนโดยตัดโพลีเปปไทด์ด้วย trypsin นั้นพบว่า หลังจากตัดโพลี เปปไทด์ด้วย trypsin แล้วนำไปผ่านการแยกด้วย C-18 HPLC จะได้ peak ของโปรตีนที่ผ่านการตัด ด้วย trypsin ของทั้ง SP1 และ SP2 นำ fraction จาก peak ดังกล่าวมาทำ SDS-PAGE สามารถยืนยัน ได้ว่า peak ที่ได้เป็น SP1 และ SP2 จริงแต่มี intensity ของแถบโปรตีนน้อย (ไม่ได้นำเสนอผลของ SDS-PAGE) เมื่อนำ fraction ของ SP1 และ SP2 ที่ได้ไปหาลำดับกรดอะมิโนโดย protein sequencer พบว่าไม่สามารถหาลำดับกรดอะมิโนของทั้ง SP1 และ SP2 ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้อาจเกิดการสูญเสีย โปรตีนในระหว่างหรือภายหลังจากการแยกด้วย C-18 HPLC ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้รับไม่เพียงพอสำหรับการหาลำดับกรดอะมิโน

## การสร้างแอนติบอดี

เมื่อนำแอนติบอดีของ SP1 และ SP2 ที่ผลิตได้มาศึกษาพบว่าแอนติบอดีของโปรตีนทั้งสอง ชนิดไม่ตอบสนองต่อกัน แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีของ SP1 และ SP2 มีความแตกต่างกันทาง immunology และมีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน แสดงว่า SP1 และ SP2 เป็นโปรตีนสะสมต่างชนิดกัน

### 1. การทำ titration ของ antiserum activity

จากการวัด activity ของแอนติบอดีที่อัตราส่วน 1 : 2,000, 1 : 4,000, 1 : 8,000, 1 : 16,000 และ 1 : 32,000 พบว่าสามารถวัด activity ของแอนติบอดีได้ที่ทุกความเข้มข้น โดยแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงมี activity สูงกว่าแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นต่ำ ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้น ของแอนติบอดี 1:10,000 เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ intensity ของแถบที่วัดได้อยู่ในระดับสูง (ประมาณ 70%) และเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมไม่สูงหรือต่ำเกินไป

## 2. การหาปริมาณโปรตีนต่ำที่สุดที่สามารถวัด antibody activity ได้

การทดลองนี้ใช้ปริมาณโปรตีนจากฮีโมลิมป์ 4 ความเข้มข้น คือ 100 นาโนกรัม, 10 นาโนกรัม, 0.1 นาโนกรัม และ 0.01 นาโนกรัม แล้วใช้แอนติบอดีความเข้มข้น 1 : 10,000 ความเข้มข้นของ second antibody คือ 1 : 2,000 ผลจากการวัด intensity ที่ปรากฏ พบว่าสามารถวัด intensity ได้เฉพาะปริมาณโปรตีน 100 นาโนกรัม และ 10 นาโนกรัม ซึ่ง intensity ของ SP1 และ SP2 ที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันทั้งสองปริมาณโปรตีน แสดงว่าที่ปริมาณโปรตีนเท่ากัน แอนติบอดีทั้งสองชนิดมี activity ใกล้เคียงกัน จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีของ SP1 และ SP2 ที่สร้างขึ้นมานั้นมี activity ค่อนข้างสูง เนื่องจากสามารถวัด activity ได้เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนเพียง 10 นาโนกรัม

## การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนสะสมในระยะต่างๆของการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

จากการทำ SDS-PAGE ของ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมป์และ fat body ของหนอนเยื่อไผ่ระยะ larval diapause, ระยะดักแด้และตัวเต็มวัย สามารถตรวจพบ SP1 และ SP2 ได้ในฮีโมลิมป์และ fat body ของทั้งสามระยะ โดยพบปริมาณมากที่สุดในระยะตัวหนอน รองลงมาคือระยะดักแด้และตัวเต็มวัยตามลำดับ ในระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยปริมาณ SP1 และ SP2 ในฮีโมลิมป์มีมากกว่าใน fat body แต่ในระยะดักแด้ปริมาณ SP1 และ SP2 ใน fat body มีมากกว่าในฮีโมลิมป์ แต่หลังจากทำ western blot และ immunostaining โดยใช้แอนติบอดีของ SP1 และ SP2 พบว่าผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากผลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE คือตรวจพบ SP1 และ SP2 ได้ในฮีโมลิมป์และ fat body ของระยะตัวหนอนและดักแด้ แต่ไม่พบในตัวเต็มวัย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าแถบโปรตีนของ SP1 และ SP2 ของตัวเต็มวัยที่ปรากฏบน SDS-PAGE อาจเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่ SP1 และ SP2 ที่แท้จริง คือมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งคาดว่าโปรตีนดังกล่าวคือ vitellogenin ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในไข่แดง ถูกสังเคราะห์ขึ้นในช่วงที่ใกล้เป็นตัวเต็มวัย เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อตัวเต็มวัยเป็นอย่างมาก ดังเช่นในการทดลองของ Wang and Haunerland (1993, 1994) ที่ศึกษาการนำกลับของ arylphorin ใน corn earworm, *H. zea* พบว่า arylphorin ถูกนำกลับเข้าไปเก็บสะสมในรูปของคริสตัลใน fat body ของดักแด้ จากนั้นเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัยกรานูลของ arylphorin บางส่วนจะถูกไฮโดรไลซ์ได้กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของตัวเต็มวัย แต่จะมี arylphorin จำนวนมากเหลืออยู่ในกรานูล จนเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัย arylphorin ดังกล่าวจะถูกเก็บเป็นแหล่งของกรดอะมิโนสำหรับการสร้าง vitellogenin ในไข่แดง เช่นเดียวกับใน *H. cecropia* ที่ 2/3 ของโปรตีนสะสมทั้งหมดถูกเก็บสะสมใน fat body โดยเพศผู้จะเก็บสะสมน้อยกว่าเพศเมีย ซึ่งอาจ

เป็นไปได้ว่าเพศเมียต้องใช้ประโยชน์จากโปรตีนดังกล่าวต่อไปเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ vitellogenin (Tojo and others, 1978)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของตัวหนอน คักแค้และตัวเต็มวัย เห็นได้อย่างชัดเจนว่า พบ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์ของตัวหนอนมากกว่าใน fat body ถึงประมาณ 5 เท่า และเมื่อเข้าสู่ระยะคักแค้ปริมาณ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์ลดลงแต่กลับเพิ่มมากขึ้นใน fat body จากนั้นจะลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ทั้งในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นถึง developmental profile ของ SP1 และ SP2 ได้ว่าโปรตีนสะสมทั้งสองชนิดถูกสังเคราะห์โดย fat body ในระยะตัวหนอน จากนั้นจะถูกหลั่งออกมาสู่ฮีโมกลิมพ์แล้วเก็บสะสมในฮีโมกลิมพ์ของระยะตัวหนอน โดยปริมาณของโปรตีนสะสมจะเพิ่มขึ้นและมีมากที่สุดในตัวหนอนระยะสุดท้าย จากนั้นเมื่อตัวหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะคักแค้ fat body จะเปลี่ยนแปลงหน้าที่จากการสังเคราะห์มาทำหน้าที่ในการนำ SP1 และ SP2 จากฮีโมกลิมพ์กลับเข้าไปสู่ fat body แหล่งเก็บสะสมโปรตีนสะสมจะเปลี่ยนจากฮีโมกลิมพ์มาเป็น fat body ของระยะคักแค้ จากนั้นในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงจากคักแค้ไปเป็นตัวเต็มวัย โปรตีนที่ถูกเก็บสะสมใน fat body ของคักแค้จะถูกนำไปใช้ในการเจริญและสร้างโครงสร้างของคักแค้และตัวเต็มวัย ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจพบ SP1 และ SP2 ในฮีโมกลิมพ์และ fat body ของตัวเต็มวัยได้ ซึ่งจากงานวิจัยสามารถพบโปรตีนสะสมได้เป็นครั้งแรกในระหว่างการเจริญของตัวหนอนที่ระยะต่างๆขึ้นกับชนิดของแมลง แต่ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นมากในตัวหนอนระยะสุดท้ายในแมลงทุกชนิดแล้วลดลงในระหว่างการเจริญของคักแค้หรือตัวเต็มวัยช่วงท้ายๆ พบโปรตีนสะสมใน *D. melanogaster* (Robert and others, 1977) *M. sexta* (Kramer and others, 1980) และ *C. vicina* (Levenbook and Bauer, 1980) เป็นครั้งแรกหลังจากการลอกคราบของตัวหนอนครั้งที่ 2 ส่วนใน *H. cecropia* นั้นปรากฏเป็นครั้งแรกในตัวหนอนระยะที่ 5 การสังเคราะห์ของโปรตีนสะสมจะเกิดขึ้นเรื่อยๆอย่างต่อเนื่อง จากนั้นระดับของโปรตีนสะสมในฮีโมกลิมพ์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่าสูงสุดในตัวหนอนระยะสุดท้าย ในระยะนี้โปรตีนสะสมจะถูกเก็บไว้ในฮีโมกลิมพ์และ fat body โดย fat body จะนำโปรตีนสะสมดังกล่าวเข้าไปเก็บในเซลล์ fat body ในรูปของคริสตัลหรือกรานูล (Thomson, 1975) ดังเช่น BmLSP ในระยะตัวหนอนของหนอนไหมที่ไม่มีการสะสมในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นนอกจากฮีโมกลิมพ์ (Fujiwara and Yamashita, 1990) แต่ในแมลงบางชนิดอาจพบกระจายในเนื้อเยื่ออื่นได้ เช่น LHP-I และ II ในผนังลำตัวของตัวหนอน *C. stygia* (Kinnear, 1973) และ LHP-I ในฮีโมไซท์ (hemocytes) ทางเดินอาหารและผนังลำตัวของตัวหนอน *C. vicina* ในช่วงก่อนการเข้าคักแค้ เมื่อตัวหนอนลอกคราบเข้าสู่ระยะคักแค้การสังเคราะห์โปรตีนสะสมจะหยุดลง ซึ่งการหยุดการสังเคราะห์นี้ไม่ได้เกิดจากการควบคุมย้อนกลับ (feedback control) (Thomson, 1975) ในระยะนี้ fat body จะเปลี่ยนมาทำหน้าที่นำกลับโปรตีน

สะสม แต่โปรตีนสะสมในแมลงบางชนิดไม่ถูกนำกลับจากฮีโมลิฟฟ์เข้าไปใน fat body เพียงแห่งเดียว เช่น MHP (Major haemolymph protein) ของ *B. mori* ในช่วงการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนระยะสุดท้ายเข้าสู่ระยะดักแด้ไม่เกิดการนำกลับแต่พบปริมาณมากใน oocyte, ผิวหนังชั้นเอพิเดอร์มิส, กล้ามเนื้อ, fat body และลำไส้ (Zhu and others, 1986) โปรตีนสะสมจะถูกใช้ในการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวเต็มวัย ทำให้ตรวจพบโปรตีนสะสมในฮีโมลิฟฟ์และ fat body ของตัวเต็มวัยได้น้อยหรือไม่พบเลย ซึ่งขึ้นกับชนิดของแมลง ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนสะสมในยุง *A. aegypti* และ *A. gambiae* ที่ถูกเก็บไว้ในโปรตีนกรานูลจะหายไปภายหลังการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัย 3 วัน (Raikhel and Lea, 1983) สำหรับ hexamerins ของ honeybee, *A. mellifera* Hex 70b และ Hex 70c มีปริมาณคงที่จากตัวหนอนระยะสุดท้ายจนถึงดักแด้ก่อนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ตัวเต็มวัย 6 วัน จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงแล้วหายไปในช่วงส่วน Hex 80 และ Hex 110 นั้นมีปริมาณค่อยๆ ลดลงแล้วหายไปก่อนการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัย (Danty and others, 1998) โปรตีนสะสม 4 ชนิดของ greater wax moth, *G. mellonella* ใน ฮีโมลิฟฟ์และ fat body มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัย ซึ่งโปรตีนดังกล่าวถูกทำให้แตกสลายแล้วถูกนำไปใช้ในการเจริญของดักแด้และตัวเต็มวัย ทำให้สามารถพบโปรตีนสะสมในเนื้อเยื่อบางส่วนของตัวเต็มวัย เช่น พบ arylphorin ของ *Calliphora* และ *C. capitata* ในส่วนที่เป็น insoluble ของคิวติเคิลของดักแด้และตัวเต็มวัย (Kaliafas and others, 1984) และพบ hexamerins ในหนวดของ honeybee, *A. mellifera* ทำให้ทราบว่า hexamerins ถูกใช้ในการสร้าง antennal cuticular tissue โดยการเริ่มต้นการเกิด sclerotization ของคิวติเคิลของหนวดจะเกิดในขณะที่มีการลดลงของ hexamerins ในหนวดของผึ้งที่เติบโตเป็นตัวเต็มวัยอย่างสมบูรณ์ (Danty and others, 1998) แต่ในแมลงบางชนิดโปรตีนสะสมไม่ถูกนำไปใช้ในระหว่างตัวหนอนทำให้พบโปรตีนสะสมเป็นจำนวนมากในฮีโมลิฟฟ์ของตัวเต็มวัย เช่น hexameric storage protein (SPR) ในฮีโมลิฟฟ์ของ *R. proxilus* (Kurt and others, 1990)

### การศึกษาผลของฮอร์โมนจูว์ไนล์ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนสะสมในฮีโมลิฟฟ์ของหนอนเยื่อไผ่ระยะต่างๆ

อัญชลี (2542) ได้ทดลองหาค่าฮอร์โมนจูว์ไนล์กำหนดหนอนเยื่อไผ่ระยะ larval diapause พบว่าฮอร์โมนจูว์ไนล์ชักนำให้ตัวหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ โดยฮอร์โมนจูว์ไนล์ชักนำให้ฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิฟฟ์เพิ่มสูงขึ้นในช่วง prepupal ส่งผลให้ตัวหนอนเกิดการเข้าดักแด้และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนสะสมภายในฮีโมลิฟฟ์ โดยปริมาณ SP1 จะแตกต่างกันในแต่ละระยะของการเปลี่ยนแปลง พบ SP1 ในระยะแรกๆ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะ prepupa จากนั้น

ปริมาณ SP1 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงที่เข้าดักแด้โดยสมบูรณ์ (G3) ในขณะที่สามารถพบ SP2 ได้ทุกระยะหลังจากหยดฮอร์โมนจูว์ไนล์

ในงานวิจัยนี้ทำการให้ฮอร์โมนจูว์ไนล์แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะ larval diapause ตัวหนอนที่ได้รับฮอร์โมนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ เมื่อนำโปรตีนในอีโมลิฟของแต่ละระยะ (กลุ่มควบคุม, 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน, G0, G1, G2, G3, G4, G5 และดักแด้ในธรรมชาติ) มาทำ SDS-PAGE สามารถพบ SP1 และ SP2 ได้ในทุกระยะ โดยพบ SP1 และ SP2 ปริมาณมากในอีโมลิฟของกลุ่มควบคุม, 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน, G0 และ G1 แต่หลังจากนั้นปริมาณ SP1 และ SP2 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดแต่ยังสามารถตรวจพบได้ในระยะอื่นๆ เมื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาทำ Western blot และ immunostaining พบว่าสามารถพบ SP1 ได้เฉพาะในกลุ่มควบคุม, 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน, G0 และ G1 แต่ไม่พบ SP1 หลังจากระยะ G2 เป็นต้นไป จะสังเกตได้ว่าระดับของ SP1 มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ หลังจากได้รับฮอร์โมนจูว์ไนล์จนถึงระยะ G1 จากนั้นจะหายไปจากอีโมลิฟทันทีตั้งแต่ระยะ G2 เป็นต้นไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ฮอร์โมนจูว์ไนล์แก่ตัวหนอน ฮอร์โมนจูว์ไนล์ชักนำให้ตัวหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นพร้อมกับการหายไปของ SP1 จากอีโมลิฟในระยะ G2 ซึ่งเป็นระยะที่ผนังลำตัวของตัวหนอนเปลี่ยนเป็นสีส้ม แสดงว่ามีการนำ SP1 กลับเข้าไปใน fat body ของดักแด้ หรืออาจมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ SP1 ของ fat body โดย SP1 ที่ถูกนำกลับเข้าไปนี้บางส่วนถูกนำไปใช้ในการสร้างคลิเคลิของดักแด้และบางส่วนถูกนำไปเก็บสะสมไว้สำหรับการสร้างโครงสร้างของตัวเต็มวัย นอกจากนี้ในเพศเมีย SP1 บางส่วนอาจถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์เป็น FSP ขึ้นมาใหม่ จากการทดลองของอัญชลี (2542) ที่ศึกษาโปรตีนในหนอนเยื่อไผ่เพศผู้และเพศเมีย พบว่าแต่ละเดิมในระยะตัวหนอนพบ FSP เพียง 1 ชนิด แต่เมื่อตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้กลับพบ FSP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ชนิด ในขณะที่พบ MSP เพียง 1 ชนิดในเพศผู้ทั้งในระยะตัวหนอนและดักแด้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า SP1 ที่ลดลงมากในระยะดักแด้ของเพศเมียบางส่วนได้ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ FSP ขึ้นมาใหม่ ซึ่ง FSP ที่ถูกสร้างขึ้นมานี้ อาจเป็น vitellogenin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการสร้างไข่แดง เนื่องจากจากการหาลำดับกรดอะมิโนในการทดลองที่ 3 พบว่า SP1 จัดอยู่ใน arylphorin family และจากรายงานของ Wang and Haunerland (1991) ที่กล่าวว่า arylphorin เป็นแหล่งสำหรับกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสร้างไข่แดง ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ De Kort and Koopmanschap (1991) ที่ทำการหยดฮอร์โมนจูว์ไนล์แก่ตัวหนอนระยะสุดท้ายของ *L. migratoria* พบว่าฮอร์โมนจูว์ไนล์มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ larval-storage protein I แต่กลับกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ high-molecular weight protein ชนิดอื่น ซึ่งต่อมาภายหลังทราบว่าโปรตีนดังกล่าวคือ vitellogenin (Ancsin and Wyatt, 1996)



จากผลการทดลองนี้พบว่า หลังจากหยดฮอร์โมนจูวีไนล์แล้วตัวหนอนเกิดการเข้าดักแด้ที่ระยะต่างๆ แต่ระดับของ SP2 ในฮีโมลิฟต์ลดลงประมาณ 50% และมีระดับค่อนข้างคงที่ในตัวหนอนทุกระยะตั้งแต่ G0-G5 แสดงว่าฮอร์โมนจูวีไนล์ไปมีผลชักนำให้เกิดการนำ SP2 กลับเข้าสู่ fat body ในระยะต้นของดักแด้ (prepupal) น้อยกว่า SP1 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า SP2 อาจไม่ใช่โปรตีนสะสมหลักที่จะถูกนำไปใช้ในการสร้างคิวติเคิลหรือโครงสร้างของตัวเต็มวัย

การสังเคราะห์และการนำกลับของโปรตีนสะสมขึ้นกับปัจจัย 2 อย่าง คือ สารอาหารที่ได้รับในช่วงที่เป็นตัวหนอนและฮอร์โมน โดยสารอาหารที่ได้รับในช่วงตัวหนอนจะถูกใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนสะสม ซึ่งหากตัวหนอนได้รับกรดอะมิโนไม่เพียงพอ การสังเคราะห์โปรตีนสะสมก็จะไม่เกิดขึ้นหรือหยุดลงทันที เช่น น้า *B. mori* (Tojo and others, 1981) และ *R. proxilus* (Kurt and others, 1990) มาทำการอดอาหาร พบว่าการสังเคราะห์โปรตีนสะสมหยุดลงทันที แต่ในหนอนเชื้อไฟที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นตัวหนอนที่อยู่ในระยะไคอะพอส ซึ่งก่อนหน้านี้ตัวหนอนมีการกินอาหารอย่างเต็มที่แล้วจึงมีการเก็บสะสมกรดอะมิโนอย่างเพียงพอ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงไม่สามารถศึกษาปัจจัยของปริมาณสารอาหารได้ ส่วนฮอร์โมนที่มีบทบาทในการควบคุมการผลิตและการนำกลับโปรตีนมี 2 ชนิด คือ ฮอร์โมนจูวีไนล์และฮอร์โมนเอกไดโซน การสังเคราะห์โปรตีนสะสมในช่วงต้นของตัวหนอนระยะสุดท้ายถูกชักนำโดยการลดต่ำลงของปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ภายในร่างกาย เมื่อตัวหนอนเข้าสู่ระยะ prepupa ระดับฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิฟต์จะเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเอกไดโซนนี้จะเป็นตัวชักนำให้ fat body เริ่มดึงโปรตีนสะสมจากฮีโมลิฟต์เข้ามาเก็บใน fat body (Riddiford and Truman, 1978) แต่หนอนเชื้อไฟที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวหนอนระยะสุดท้ายที่อยู่ในระยะไคอะพอส ซึ่งมีปริมาณของฮอร์โมนเอกไดโซนต่ำ การให้ฮอร์โมนจูวีไนล์นี้จะสามารถไปกระตุ้นการทำงานของต่อมโปรทอแรกซิกให้หลั่งฮอร์โมนเอกไดโซนเพื่อลอกคราบเป็นดักแด้ นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณโปรตีนในฮีโมลิฟต์ของหนอนเชื้อไฟเพิ่มขึ้นหลังจากที่ตัวหนอนได้รับฮอร์โมนจูวีไนล์ แสดงว่าฮอร์โมนจูวีไนล์กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนสะสมในหนอนเชื้อไฟ (อัญชลี, 2542) ส่วนการนำโปรตีนกลับเข้าไปเก็บสะสมใน fat body ในระยะ prepupa นั้นจะถูกชักนำโดยปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนที่เพิ่มสูงขึ้นในฮีโมลิฟต์ (Riddiford and Truman, 1978) และจากงานวิจัยของ Singtripop *et al.* (2000) ที่ตรวจพบว่าหลังจากให้ฮอร์โมนจูวีไนล์แก่ตัวหนอน ซึ่งระยะนี้ระดับของฮอร์โมนเอกไดโซนเพิ่มสูงขึ้นมาก แสดงว่าระดับฮอร์โมนเอกไดโซนที่เพิ่มขึ้นเป็นตัวกระตุ้นให้มีการนำ SP1 บางส่วนกลับเข้าไปเก็บสะสม fat body เช่นเดียวกับการทดลองของ Kramer *et al.* (1980) ที่รายงานว่า 20-hydroxyecdysone ใน *M. sexta* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการเข้าดักแด้ ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้จะไปกระตุ้นให้มีการนำกลับ FSP จากฮีโมลิฟต์เข้าสู่ fat body ฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone ไม่ได้มีผลต่อการนำ

กลับเพียงอย่างเดียวแต่ยังมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนสะสมอีกด้วย ซึ่งจากรายงานการทดลองของ Pau *et al.* (1979) ที่ให้ 20-hydroxyecdysone แก่ตัวหนอนของ *C. vicina* พบว่ายับยั้งการสังเคราะห์ LHP-I ซึ่งระดับของฮอร์โมนเอกไดโซนจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในตัวหนอนระยะที่ 3 ซึ่งเป็นสัญญาณให้หยุดการสังเคราะห์ LHP-I หลังจากได้รับฮอร์โมน 2 วัน นอกจากนี้ใน *C. ethius* (Dean, 1978) *E. kuhniella*, *P. crassical* และ *D. melanogaster* (Thomasson and Michell, 1972) 20-hydroxyecdysone ยับยั้งการสังเคราะห์และกระตุ้นการนำกลับและการเก็บสะสมในโปรตีนกรานูล โดยในช่วงต้นของตัวหนอนระยะที่ 3 ของ *D. melanogaster* (Berreur and others, 1979) และ *C. vicina* (Koolman, 1980) 20-hydroxyecdysone จะถูกหลั่งออกมาเล็กน้อยซึ่งฮอร์โมนนี้เองที่ชักนำให้หยุดการสังเคราะห์โปรตีนสะสมจาก fat body และพบว่า 20-hydroxyecdysone สามารถชักนำให้เกิด autophagocytosis ใน fat body ทางอ้อมอีกด้วย

มีนักวิจัยหลายท่านทำการศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีนัลที่มีต่อการสังเคราะห์และนำกลับโปรตีนสะสม ยกตัวอย่างเช่น Tojo *et al.* (1981) ทดลองตัดต่อม corpora allata ออกจากตัวหนอน *B. mori* ซึ่งเป็นการทำให้ขาดฮอร์โมนจูวีนัล พบว่าชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนสะสมในช่วงที่ตัวหนอนกินอาหารและชักนำให้มีการนำกลับโดย fat body เร็วขึ้นในระหว่างที่เปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ และเมื่อหยุดฮอร์โมนจูวีนัลให้แก่ตัวหนอนปกติ พบว่าฮอร์โมนจูวีนัลยับยั้งการสร้างคิวติเคิลของดักแด้ได้ ซึ่งฮอร์โมนจูวีนัลมีผลยับยั้งการนำกลับโปรตีนสะสมชนิดอื่นเช่นเดียวกันใน MHP ของ *B. mori* (Izumi and others, 1984) และ SL-1 และ SL-2 ของ Common cutworm (*S. litura*) แต่การสังเคราะห์ของ SL-3 ไม่ถูกยับยั้งโดยฮอร์โมนจูวีนัล

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนจูวีนัลมีผลชักนำให้ฮอร์โมนเอกไดโซนภายในตัวหนอนเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ และในระดับเซลล์สามารถชักนำให้เกิดการนำกลับของ SP1 และ SP2 เข้าไปใน fat body ของดักแด้ หรืออาจยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนสะสมใน fat body ด้วย

### การศึกษาแหล่งสังเคราะห์และหลังโปรตีนสะสมทั้งสองชนิด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับของโปรตีนสะสม SP1 และ SP2 ในระยะต่างๆ ของการเจริญของหนอนเชื้อไผ่ ในการทดลองที่ 5 พบว่าสามารถตรวจพบ SP1 และ SP2 ได้ในโปรตีนที่สกัดจาก fat body ของตัวหนอนและดักแด้ ในการทดลองนี้จึงทำการยึ้นชิ้นผลดังกล่าวโดยนำ fat body ของตัวหนอนและดักแด้มาทำ paraffin section แล้วนำเนื้อเยื่อที่ได้มาทำ immunohistochemistry โดย incubate เนื้อเยื่อใน anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antibody

และใช้ตัวตรวจสอบ คือ DAB จากผลการทดลองพบว่า ไม่สามารถตรวจพบสีน้ำตาลของ DAB ได้ใน fat body ของตัวหนอนและดักแด้ของกลุ่มควบคุม แต่สามารถตรวจพบสีน้ำตาลของ DAB ใน fat body ของตัวหนอนและดักแด้กลุ่มที่ incubate ใน anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antibody แสดงว่ามี SP1 และ SP2 ใน fat body ของตัวหนอนและดักแด้ดังกล่าว ในการทดลองนี้ไม่สามารถบอกความแตกต่างของความเข้มของ DAB บนเนื้อเยื่อได้ ทำให้ไม่ทราบความแตกต่างของปริมาณ SP1 และ SP2 ใน fat body ของตัวหนอนและ แต่สามารถสรุปได้ว่ามี SP1 และ SP2 ใน fat body ของตัวหนอนและดักแด้จริง เมื่อพิจารณาลักษณะเนื้อเยื่อของ fat body ของตัวหนอนและดักแด้ พบว่ามีกรานูลเม็ดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อ กรานูลดังกล่าวคือ โปรตีนกรานูลที่ถูกเก็บสะสมไว้ใน fat body จากการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่า SP1 และ SP2 ถูกสังเคราะห์จาก fat body ของตัวหนอน จากนั้นจะถูกห่อหุ้มเก็บสะสมไว้ในอีโมลิฟของระยะตัวหนอน เมื่อตัวหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ SP1 และ SP2 ดังกล่าวจะถูกนำกลับเข้าไปใน fat body แล้วเก็บสะสมไว้ในรูปของโปรตีนกรานูลภายใน fat body ของดักแด้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Tojo *et al.* (1980) ที่ศึกษา SP1 และ SP2 ในอีโมลิฟและ fat body ของตัวหนอนระยะสุดท้ายของ *B. mori* พบว่าในระหว่างที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักแด้ SP1 และ SP2 ในอีโมลิฟมีความเข้มข้นลดลงแต่กลับเพิ่มมากขึ้นใน fat body ของดักแด้ และจากการศึกษาลักษณะของ fat body โดย electron microscopy พบว่าเกิดการสร้างโปรตีนกรานูลใน fat body ซึ่งเกิดในขณะเดียวกันกับการสลายของ mitochondria และ endoplasmic reticulum ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนกรานูลใน cytoplasm ของ fat body ของตัวเมียมียามากกว่าตัวผู้และกรานูลของตัวเมียมียามีลักษณะเป็นคริสตัลซึ่งแตกต่างจากในตัวผู้ คือตัวผู้มีกรานูลที่ไม่มีคริสตัลมากกว่า การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์ fat body ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักแด้ พบได้เช่นเดียวกันใน *H. cecropia* (Tojo and others, 1978) ที่ fat body มีการเปลี่ยนแปลงหน้าที่จากการสังเคราะห์โปรตีนมาทำหน้าที่ในการเก็บสะสมโปรตีนสำหรับการเจริญเป็นตัวเต็มวัยและใน vacuoles มีการสลายของ mitochondria และ endoplasmic reticulum เช่นเดียวกัน