229097

กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลสซึ่งเป็นตัวย่อยน้ำตาลทรีฮาโลส ในทางเดินอาหารส่วนกลางระหว่างระยะ larval diapause ของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis)* มีปริมาณต่ำ และจะเพิ่มสูงขึ้น 4 เท่าก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบตัวควบคุมหลายอย่างที่ควบคุมกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนและที่ไม่ใช่โปรตีน มีรายงานว่าตัวยับยั้งทรีฮาเลสเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการควบคุมกิจกรรมทำงานของเอนไซม์ทรีฮาเลส และกลไกการย่อยน้ำตาลทรีฮาโลสของแมลงในระหว่างการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากระยะตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ ดังนั้นเราจึงสนใจที่จะทำการแยกบริสุทธิ์ของตัว-ยับยั้งทรีฮาเลสเพื่อตรวจสอบผลของเอนไซม์ในระหว่างการเจริญของหนอนไหม (*Bombyx mori)* และ *O. fuscidentalis* โดยใช้เทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ด้วย 3 column (Mono Q, C18 และ C8 column) ผลการวิจัยสามารถแยกตัวยับยั้งทรีฮาเลสจากฮีโมลิมพ์ด้วยความบริสุทธิ์ของโมเลกุลที่แยกได้ 141 เท่า และผลผลิตที่ได้เท่ากับ 26% ใน *B. mori* และแยกได้ 216 เท่า และผลผลิตที่ได้เท่ากับ 33% ใน *O. fuscidentalis* และเมื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของตัวยับยั้งทรีฮาเลสในฮีโมลิมพ์ของ *B. mori* และ *O. fuscidentalis* โดย SDS-PAGE พบแถบบริสุทธิ์ของ *O. fuscidentalis* ไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยวิธี ingel digestion และ LC-MS พบลำดับกรดอะมิโน 7 ส่วน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 79 ตัว ซึ่งจากการเปรียบเทียบกับโปรตีนอื่นๆ พบว่ามีความใกล้เคียงกันกับโมเลกุลของโปรตีนสะสม 1 (Storage protein 1) ของ *O. fuscidentalis* 83.2% นอกจากนั้นในการวิจัยครั้งนี้ยังได้ศึกษาผลของฮอร์โมนบอมบิกซินต่อกิจกรรมการทำงานของตัวยับยั้งทรีฮาเลสใน *O. fuscidentalis* โดยผลจากการให้ฮอร์โมนบอมบิกซินแก่ตัวหนอนระยะไดอะพอสของ *O. fuscidentalis* พบว่าฮอร์โมนบอมบิกซินเพิ่มกิจกรรมการทำงานของตัวยับยั้งทรีฮาเลสในฮีโมลิมพ์ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากลไกควบคุมการใช้น้ำตาลทรีฮาโลสในระหว่างการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างใน *B. mori* และ *O. fuscidentalis* รวมทั้งแมลงอื่นๆ อาจถูกควบคุมโดยเอนไซม์ทรีฮาเลส ตัวยับยั้งทรีฮาเลส และฮอร์โมนบอมบิกซินอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยควบคุมกิจกรรมการทำงานของตัวยับยั้งทรีฮาเลสใน *O. fuscidentalis*

In the bamboo borer (*Omphisa fuscidentalis),* midgut trehalase activity during the larval diapause period was initially low and sharply increased fourfold prior to pupation. Previous studies identified various control factors of proteinaceous and non-proteinaceous trehalase inhibitors that regulate trehalase activity. It has been reported that trehalase inhibitors may be one of the important factors for controlling trehalase activity and the trehalose mechanism in larval-pupal transformation. Thus, we are interested in purification of this inhibitor to examine the effects of it during development in the silkworm (*Bombyx mori)* and *O. fuscidentalis*. Four-steps purification from larval hemolymph of the *B.mori* and *O. fuscidentalis* was performed by three column chromatography of HPLC (Mono Q, C18 and C8 column). Purification proteins from hemolymph of *B.mori* and *O. fuscidentalis* attained a 141-fold purification with a 26% yield and a 216-fold purification with a 33% yield, respectively. Characterization of trehelase inhibitors from hemolymph of *B. mori* and *O. fuscidentalis* by SDS-PAGE indicated that the molecular weight of these inhibitors in both species were approximately 75 kDa. Amino acid analysis of trehalase inihibitors in *O. fuscidentalis* hemolymph by ingel digestion and LC-MS analysis showed that 7 partial sequences of this inhibitor consisted of 79 amino acids which showed an 83.2% similarity with the storage protein 1 of the *O. fuscidentalis*. In this study, we also examined the effect of bombyxin on the trehalase inhibitor activity in the larval diapause of *O. fuscidentalis*. Results showed that bombyxin increased the trehalase inhibitor activity in the hemolymph of *O. fuscidentalis*. The present study suggest that the trehalose mechanism is controlled by trehalase and trehalase inhibitors in the development of *B. mori* and *O. fuscidentalis* and possibly other insects as well. A bombyxin may be one of co-regulating factors in controlling trehalase inhibitor activity in *O. fuscidentalis*.