



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การสร้าง *E. Coli* ที่สามารถผลิตโปรตีนหลักกรอยัลเจลลี
ของผึ้งด้วยการโคลนดีเอ็นเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โดย

ศิริพร สิทธิประณีต

เมษายน ๒๕๔๗

จุฬ
วท 15
12141





บทคัดย่อ

ได้โคลน cDNA ของ Major Jelly Protein ของผึ้งโพรง *Apis cerana* (AcMRJP) โดยใช้ผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR หลังศึกษาสมบัติเฉพาะพบว่าได้โคลนของ MRJP1 และ MRJP2 โดย Open Reading Frames (ORF) ของ AcMRJP1 และ MRJP2 มีขนาด 1302 และ 1392 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งระบุการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 433 และ 463 residues ตามลำดับ ความคล้ายคลึงของ MRCJP1 และ MRCJP2 ระหว่างผึ้งโพรงและผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) เป็น 93 และ 92 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ และเป็น 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกรดอะมิโนตามลำดับ เมื่อ subclone cDNA ของ AcMRJP1 โดยใช้ expression vector, pET17b และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* Rosetta (DE3) pLys S พบการแสดงออกเพื่อผลิตโปรตีน AcMRJP1 ในรูปไม่ละลายน้ำมีขนาด 47.9 kDa การวิเคราะห์โดยใช้ Western blot แสดงว่ามีการแสดงออกให้ AcMRJP1 ใน *E. coli* ได้ การแสดงออกพบหลังจากชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และระดับการแสดงออกสูงสุดคงที่หลังชักนำได้ 4 ชั่วโมง การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวในจำนวน 1 ลิตร จะให้ผลิตผลโปรตีน AcMRJP1 ประมาณ 20 มิลลิกรัม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ คท
คท 15
เลขทะเบียน 012141
วัน, เดือน, ปี 10 ส.ค. 2548

Abstract

Major Royal Jelly Proteins cDNA of *Apis cerana* (AcMRJPCDNA) were cloned and characterized. The Open Reading Frames (ORF) of AcMRJP1 and AcMRJP2 were 1302 and 1392 nucleotides encoding 433 and 463 amino acid residues, respectively. The similarity of AcMRJP1 and MRJP2 and their homologues in *Apis mellifera* were 93 and 92% for nucleotide whereas 90 and 86% for deduced amino acid. The complementary DNA of AcMRJP1 was subcloned into expression vector, pET17b, and transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) pLys S. Recombinant AcMRJP1 47.9 kDa was expressed as inclusion bodies. Western blot analysis revealed successful expression of recombinant AcMRJP1 after 1 hour of IPTG induction and reached saturation level after 4 hours. The yield of purified AcMRJP1 was approximately 20 mg protein per litre of liquid culture.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. ศีราวุธ กลิ่นบุหงา สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณ คุณจันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และ คุณพุทธรัตน์ เสชนะ ที่ช่วยทำวิจัย ค้นคว้าข้อมูล รวบรวมผลงาน และจัดทำบัญชี งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ. ที่นี้ด้วย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
กิตติกรรมประกาศ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
คำย่อ	viii
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	7
การอภิปรายผลการทดลอง	16
สรุปผลการทดลอง	18
หนังสืออ้างอิง	19



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ 1. องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนหลักในรอยัลเจลลีโปรตีนทั้ง 5 ชนิด

2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่ 1.	PCR product ที่ได้จากการสังเคราะห์ full length cDNA ของผึ้งโพรง	7
รูปที่ 2.	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ AcMRJP1	8
รูปที่ 3.	ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ AcMRJP2	10
รูปที่ 4.	PCR product ที่ได้จากการสังเคราะห์ full length MRJPAcDNA ของผึ้งโพรง	12
รูปที่ 5.	โปรตีนที่ได้จากการแยกขนาดด้วย SDS-PAGE	13
รูปที่ 6.	โปรตีนที่ได้จากการแยกสกัดให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column และแยกขนาดด้วย SDS-PAGE	14
รูปที่ 7.	โปรตีนที่ติดตามผลด้วย Western blot	15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

AcMRJP	=	<i>Apis cerana</i> major royal jelly protein
AcMRJpDNA	=	cDNA of <i>Apis cerana</i> major royal jelly protein
A, T, C, G	=	nucleotide containing the base adenine, thymine, cytosine and guanine, respectively
bp	=	base pair
^o C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
g	=	gravity force
HCl	=	hydrochloric acid
IPTG	=	isopropylthio- β -D-galactoside
LB medium	=	Lauri-Bertani medium
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
MRJP	=	major royal jelly protein
MRJpDNA	=	major royal jelly protein complementary deoxyribonucleic acid
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NaCl	=	sodium chloride
ng	=	nanogram
nm	=	nanometre
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	=	polymerase chain reaction
RNA	=	ribonucleic acid
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine
Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
UV	=	ultraviolet
μ g	=	microgram
μ l	=	microlitre
μ M	=	micromolar



บทนำ

รอยัลเจลลีเป็นผลิตภัณฑ์จากผึ้งที่มีมูลค่าสูงที่สุด ใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อบำรุงสุขภาพที่มีการผลิตขายทั้งในรูปรอยัลเจลลีสด ผง อัดเม็ด และ แคปซูล รอยัลเจลลีผลิตจากต่อมไคคอฮอย (hypopharyngeal gland) และต่อมขากรรไกร (mandibular gland) ของผึ้งงานที่มีอายุ 5-15 วัน (Brouwer, 1982; Knecht and Kaatz, 1990; Lensky and Rakover, 1983) ซึ่งเรียกผึ้งงานเหล่านี้ว่า ผึ้งพยาบาล (nurse bee) รอยัลเจลลีเป็นอาหารหลักที่ผึ้งพยาบาลใช้เลี้ยงตัวอ่อน (larvae) ของผึ้งทุกประเภท (ผึ้งตัวผู้, ผึ้งงาน และผึ้งนางพญา) รอยัลเจลลีมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญพัฒนาเป็นวรรณะต่าง ๆ ของผึ้ง (Moritz and Southwick, 1992) การได้รับรอยัลเจลลีในแต่ละวรรณะของผึ้งนั้นแตกต่างกัน ตัวอ่อนของผึ้งตัวผู้จะได้รับรอยัลเจลลี 1-8 วัน ส่วนตัวอ่อนผึ้งงานจะได้รับรอยัลเจลลีเพียง 3 วันแรกโดยตัวอ่อนที่มีอายุ 1 วันจะได้รับปริมาณมากที่สุด ขณะที่ตัวอ่อนผึ้งนางพญาจะได้รับรอยัลเจลลีในปริมาณมากตลอดชีวิต เป็นเหตุให้ผึ้งนางพญามีลักษณะแตกต่างไปจากผึ้งงานทั้ง ๆ ที่เป็นเพศเมียเหมือนกัน โดยผึ้งนางพญาจะมีขนาดใหญ่กว่า มีการเจริญพัฒนาของรังไข่ทำให้สามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ ขณะที่ผึ้งงานจะมีการพัฒนาอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ภายในรัง (เลี้ยงตัวอ่อน ทำความสะอาดรัง ป้องกันรัง หาน้ำหวานและเกสรดอกไม้) ช่วงของการเจริญเติบโตจากตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัยของผึ้งนางพญาจะใช้เวลาเฉลี่ยเพียง 15-16 วัน ขณะที่ผึ้งงานจะใช้เวลา 21 วัน นอกจากนี้ผึ้งนางพญาจะมีอายุยืนโดยเฉลี่ย 2-3 ปี ขณะที่ผึ้งงานจะมีอายุเพียง 2-3 เดือน (ศิริวัฒน์, 2532., Krell, 1996)

รอยัลเจลลีเป็นสารประกอบที่เป็นกรด มีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.2-4.2 ประกอบด้วย ความชื้น 66-70 เปอร์เซ็นต์, โปรตีน 12-17 เปอร์เซ็นต์, น้ำตาล 11-12.5 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 3-5.5 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 1-2 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง (Howe, Dimick and Benton, 1985; Palma, 1992) จะเห็นได้ว่าโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณมากที่สุด ตัวอ่อนผึ้งที่ไม่ได้รับโปรตีนเพียงพอจะไม่เจริญเติบโตและถูกกำจัดออกจากรัง หรือมีผลทำให้ตัวอ่อนเจริญไม่เต็มที่ จึงเป็นตัวเต็มวัยที่มีขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ (Craisheim, 1990) จากรายงานเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนในรอยัลเจลลีมีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนผึ้งอย่างมาก

ปัจจุบันได้มีการศึกษาโปรตีนในรอยัลเจลลีในระดับโมเลกุล โดยพบว่ามีกรดอะมิโนที่สังเคราะห์โปรตีนในรอยัลเจลลีจากต่อมไคคอฮอย (hypopharyngeal gland) ของผึ้งพยาบาล Schmitzova และคณะ (1998) ได้จัดกลุ่ม MRJP ซึ่งพบเป็นปริมาณมากในรอยัลเจลลีของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ออกเป็น 5 ชนิด (family) MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 และ MRJP5 ความแตกต่างลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะทางด้านปลาย N โดยโปรตีนทั้งหมดนี้มีกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) เป็นองค์ประกอบสูงถึง 40-51 % ดังแสดงในตารางที่ 1

องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนหลักในรอยัลเจลลีโปรตีนทั้ง 5 ชนิด

	MRJP1	MRJP2	MRJP3	MRJP4	MRJP5
Ala	3.9	6.2	4.9	4.3	3.8
Arg	3.4	3.8	4.9	4.1	9.0
Asn	6.9	11.3	15.9	13.8	8.7
Cys	2.5	1.5	1.1	1.3	1.0
Gln	3.9	5.1	7.1	6.3	3.8
Glu	3.9	3.8	3.8	3.9	2.5
Gly	5.6	6.0	6.4	4.1	4.0
His	2.3	2.4	2.2	3.9	1.8
Ile	6.0	5.1	4.0	3.2	4.8
Lue	9.5	8.2	6.8	9.7	5.2
Lys	5.1	6.9	5.8	5.0	4.3
Met	3.5	2.4	2.2	2.4	11.4
Phe	4.2	4.4	1.7	2.2	2.6
Pro	3.7	3.1	2.5	2.2	2.6
Ser	8.1	5.8	5.9	8.4	6.2
Thr	6.3	4.6	4.0	4.7	5.6
Trp	1.2	1.3	0.9	1.3	1.1
Tyr	4.4	3.5	3.1	3.9	3.3
Val	6.5	7.5	6.8	8.0	5.6
Ess.Aa.	48%	47%	39.3%	44.5%	51.4%

หมายเหตุ : กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) พิมพ์ด้วยตัวเน้น

ข้อมูลจาก Schmitzova ., et. al., 1998.

นอกจากนั้นยังสามารถโคลน cDNA และศึกษาลำดับเบสของ cDNA สำหรับ MRJP ทั้ง 5 ชนิดของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ได้แล้ว (Klaudiny et al., 1994; Schmitzova et al., 1998) โปรตีนในกลุ่ม MRJP นี้มีอยู่ในสัดส่วน 82-90% ของโปรตีนทั้งหมดในรอยัลเจลลี นอกจากนั้นยังพบว่าโปรตีนหลักในรอยัลเจลลีทั้ง 5 ชนิดเป็นไกลโคโปรตีน (Schmitzova et al., 1998)

การวิจัยครั้งนี้ต้องการที่จะตรวจรหัสพันธุกรรมและตรวจความสามารถในการแสดงออกของ MRJPCDNA ของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ในระบบอื่น (heterologus system) ซึ่งในที่นี้ ได้แก่ *E. coli* โดยการวิจัยจะเริ่มจากการ

เตรียม full length MRJpCpDNA ของผึ้งโพรงจากนั้นนำมาเชื่อมกับ Expression vector (pET system) และ transform เข้าสู่ *E. coli* ต่อไป จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของ MRJP ทั้ง 5 ชนิด ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองของยุโรป ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อใช้เพิ่มปริมาณ cDNA ของ MRJP ชนิดใดชนิดหนึ่ง ของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทยด้วย PCR ได้ โดยขั้นตอนแรกจะสังเคราะห์ first strand cDNA ด้วย Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากแม่พิมพ์ mRNA ที่สกัดจากส่วนหัวของผึ้ง โดยใช้ Oligo(dT) เป็นไพรเมอร์ ก่อนที่จะใช้ first strand cDNA นี้เป็นแม่พิมพ์สังเคราะห์ MRJpCpDNA ด้วย ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างผึ้งโพรง *Apis cerana*

เก็บตัวอย่างผึ้งโพรงในระยะผึ้งพยาบาลที่มีอายุอยู่ในช่วง 5-15 วัน โดยแช่ผึ้งลงถังไนโตรเจนเหลว เมื่อนำมาถึงห้องปฏิบัติการจึงเก็บไว้ในตู้ -80°C

สกัด total RNA

สกัด total RNA จากส่วนหัวของผึ้งพยาบาล 30 -50 ตัว ด้วย Trizol Reagent (Gibco – BRL) วิเคราะห์ปริมาณ RNA ที่สกัดได้โดยวัด OD260 และกำจัด DNA ที่อาจปนเปื้อนโดยการย่อยด้วย RNase – free DNase I จากนั้นจึงใช้ RNA ที่สกัดได้นี้เตรียม first-strand cDNA ต่อไป

การสังเคราะห์ first-strand cDNA และ full length MRJPCDNA

สังเคราะห์ first-strand cDNA โดยใช้ Omniscript RT kit (Qiagen) ตามวิธีการที่แนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ total RNA ที่สกัดจากส่วนหัวของผึ้งพยาบาล 2 μg เป็น RNA template ใช้ oligo(dT)₁₂₋₁₆ เป็น primer สังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วย reverse transcriptase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37°C

แบ่งเก็บ first-strand cDNA ไว้เป็นหลอดย่อย ๆ หลอดละ 5 μl และใช้ first-strand cDNA นี้เป็นแม่พิมพ์สังเคราะห์ full length cDNA ด้วย PCR ต่อไป

การสังเคราะห์ full length cDNA ของ MRJP ของผึ้งโพรงจะทำโดยใช้ PCR และไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) โดย forward primer จะมี restriction site ของ *EcoRI* ส่วน reverse primer จะมี restriction site ของ *KpnI* ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นดังต่อไปนี้

EcoRI

- Forward primer 5' - TAG GAA TTC TAA ATG ACA AGG TGG TTG TTC ATG - 3'

KpnI

- Reverse primer 5' - GGG GTA CCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TA -3'

สังเคราะห์ full length cDNA ของ MRJP ของผึ้งโพรงด้วย PCR ในสารผสมให้เกิดปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 200 mM of each dNTPs, 0.6 μM of each primers, 1 U Pfu DNA Polymerase (Promega) ปฏิกิริยา PCR จะทำโดยมี Initial denaturation 92°C , 3 min และ 5 รอบของ Denaturation 92°C , 1 min, Annealing 50°C , 1.30 min และ Extension 68°C , 4 min ติดตามด้วย Denaturation 94°C , 1 min, Annealing 60°C , 1.30 min และ Extension 72°C , 4 min

PCR product ที่สังเคราะห์ได้นำมาวิเคราะห์ด้วย 1.2 % agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบการเรืองแสงของแถบ DNA โดย UV transilluminator

การสร้าง recombinant DNA และการโคลน recombinant DNA

ทำให้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มีปลายเหนียว (sticky end) โดยการตัดด้วย *EcoRI* และ *KpnI* จากนั้นจึงใช้ DNA ligase (promega) เชื่อมชิ้น cDNA เข้ากับพลาสมิด pUC18 ที่ตัดด้วย *EcoRI* และ *KpnI* แล้วจึงเคลื่อน recombinant DNA เข้าสู่ *E. coli* DH5 α ด้วยการทำให้ electroporation ตรวจสอบ recombinant clone โดยใช้ blue white colony (Sambrook และ Russell, 2001) นำ clone สีขาวที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin มาสกัด recombinant plasmid หลังตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ insert ด้วยการตัดด้วย *EcoRI* และ *KpnI* นำมาวิเคราะห์ผลด้วย 1.2 % agarose gel electrophoresis แล้วจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length cDNA ของ MRJP

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน DNA insert จาก recombinant plasmid ที่สกัดพลาสมิดจาก recombinant clone ด้วยวิธีของ Sanger (Sanger et al., 1977) โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer (ABI377, PE Applied Biosystems, USA) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MRJPCDNA ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารยีน (GenBank)

การโคลนยีน MRJPCDNA เข้าสู่ expression vector

สังเคราะห์ full length MRJPCDNA เพื่อใช้ subclone ด้วย PCR โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MRJPCDNA ของผึ้งโพรงที่วิเคราะห์ไว้ ออกแบบของไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นจุดตัดของ *NheI* และ *KpnI* และมีส่วนของรหัสพันธุกรรมที่จะแปลรหัสเป็น histidine (CAT) 6 residues ทางด้านปลาย C terminal ของ MRJPCDNA ที่จะสังเคราะห์ขึ้น ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ คือ

NheI

- Expression forward primer 5' - CATGCCATGGCTAGCCATCATCATCATCATAGCAT
TCTTCGAGGAGAATC - 3'

KpnI

- Expression reverse primer 5' - CGGGGTACCTTACAGATGTATTGAAATTTTGA - 3'

การเพิ่มปริมาณ MRJPCDNA ใช้ปฏิกิริยา PCR ที่ประกอบด้วย Initial denaturation 92 $^{\circ}$ C, 3 min และ 5 รอบของ Denaturation 92 $^{\circ}$ C, 1 min, Annealing 50 $^{\circ}$ C, 1.30 min และ Extension 68 $^{\circ}$ C, 4 min ติดตามด้วย 35 รอบของ Denaturation 94 $^{\circ}$ C, 1 min, Annealing 60 $^{\circ}$ C, 1.30 min และ Extension 72 $^{\circ}$ C, 4 min

หลังเพิ่มปริมาณ MRJPCDNA ด้วย PCR โดยใช้ recombinant plasmid (pUC18- MRJPCDNA) เป็นแม่พิมพ์ และใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบไว้ข้างต้นแล้ว ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ (*NheI* และ *KpnI*) จากนั้นจึงนำมาเชื่อมกับ pET17b ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *NheI* และ *KpnI* ด้วย DNA ligase และถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* rosseta โดย electrophoration คัด recombinant clone ที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin และ chloramphenicol สกัดพลาสมิดจาก recombinant clone ตรวจสอบชิ้น insert cDNA ด้วย PCR โดยรายละเอียดของวิธีการต่าง ๆ เป็นไปตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต pET17b (Novagen, Madison, USA)

การศึกษาการแสดงออกของ MRJPAcDNA

เลี้ยง recombinant clone โดยเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ใน 1 ml LB medium ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ และ chloramphenicol 34 $\mu\text{g/ml}$ จนถึงระยะ log phase (OD_{600} เท่ากับ 0.6) จากนั้นเหนี่ยวนำทำให้เกิดการแสดงออกของ MRJPAcDNA โดยการเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 mM บ่มเชื้อต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่น 10000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายเซลล์ในบัฟเฟอร์ PBS (phosphate buffered saline) ทำให้แตกโดยการ sonicate ตรวจวิเคราะห์จำนวนชนิดและขนาดของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ตามวิธี Laemmli 1970

การแยกโปรตีน MRJP จาก recombinant clone ให้บริสุทธิ์

เลี้ยง recombinant clone และเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์ MRJP ด้วย IPTG (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 mM) หลังปั่นเก็บเซลล์แล้วละลายเซลล์ด้วย binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) ทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ affinity column (HiTrap Chelating HP columns, Amersham Pharmacia Biotech) ซึ่งโปรตีนที่มี Histidine จำนวน 6 residues (Histag) จะจับติดอยู่กับคอลัมน์ จะโปรตีนที่จับกับ column ออกด้วย elution buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 8 M Urea, pH 7.4) เก็บโปรตีนที่สกัดได้ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส วิเคราะห์โปรตีนที่แยกได้ด้วย 12 % SDS-PAGE

การวิเคราะห์ผลโปรตีน AcMRJP1 ด้วย SDS-PAGE และ Western blot

สกัดโปรตีน AcMRJP ให้บริสุทธิ์โดยใช้ affinity column และแยกขนาดด้วย 12 % SDS-PAGE ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนจาก SDS-PAGE gel ไปยังแผ่น PVDE membrane (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) ตามวิธีการของ Towbin (1979) บ่มแผ่น membrane ด้วย skimmed milk-PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น membrane ด้วย PBS-Tween20 สองครั้ง บ่มแผ่น membrane กับ Anti-His-HRP (1:1000, Penta-His, Qiagen, USA) ใน 5% non-fat dried milk-PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่ H_2O_2 และ diaminobenzidine (DAB) และวัดผลการเกิดปฏิกิริยาของ peroxidase

ศูนย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลการทดลอง

การสังเคราะห์ full length cDNA ของ MRJP

สังเคราะห์ full length ของ MRJp cDNA ด้วย PCR โดยใช้ specific primers 1 คู่ (Forward primer 5'- TAG GAA TTC TAA ATG ACA AGG TGG TTG TTC ATG- 3' และ Reverse primer 5'- GGG GTA CCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TA- 3') และใช้ first-strand cDNA เป็นแม่พิมพ์ PCR product ที่สังเคราะห์เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย 1.2 % agarose gel electrophoresis หลังย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบการเรืองแสงของแถบ DNA โดย UV transilluminator พบว่ามีแถบ DNA ขนาด 1500 และ 1600 bp (รูปที่ 1) โดยแถบ DNA ขนาด 1500 และ 1600 bp นั้นคาดว่าน่าจะเป็น cDNA ของ MRJP1 และ MRJP2 ของผึ้งโพรง ทั้งนี้เทียบจากขนาดของ MRJP1 และ MRJP2 ที่พบในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)



รูปที่ 1 PCR product ที่ได้จากการสังเคราะห์ full length cDNA ของผึ้งโพรง

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII

ช่องที่ 2 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 200 bp ladder

ช่องที่ 3 : PCR product

การโคลน cDNA ของ MRJP ของผึ้งโพรง

แยกแถบ DNA ขนาด 1500 และ 1600 bp ที่สังเคราะห์ได้จาก PCR โดยการแยกออกจาก agarose gel ด้วยการใช้ Qiaquick gel extraction kit (Qiagen) นำ cDNA ขนาด 1500 และ 1600 bp ที่แยกได้มากำจัดโปรตีน โดยการย่อยด้วย proteinase K (50 µg/ml ใน 0.5 % SDS) ที่ 65° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัด DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin (Nagel) ก่อนตัด cDNA ขนาด 1500 และ 1600 bp ที่แยกได้ด้วย *EcoRI* และ *KpnI* เชื่อมชิ้น cDNA หลังตัด กับ pUC18 ที่ตัดด้วย *EcoRI* และ *KpnI* จากนั้นจึงใส่ recombinant DNA ที่เตรียมได้เข้าสู่ *E. coli* DH5α ด้วยวิธี electroporation นำ recombinant clone มาสกัด plasmid หลังตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA insert แล้วจากนั้นจึงนำ full length cDNA ที่โคลนได้ทั้งขนาด 1500 และ 1600 bp มาวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ full length cDNA ของ MRJP ของผึ้งโพรง (AcMRJP1)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น cDNA ขนาด 1500 bp พบว่าประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1423 bp เป็นส่วน open reading frame 1392 bp ซึ่งสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 433 residues ให้โปรตีนขนาดประมาณ 49 kDa เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ขนาด 1500 bp มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MRJP1 ที่มีรายงานในผึ้งพันธุ์, *Apis mellifera* (AmMRJP1) พบว่ามีความเหมือนกันถึง 93 % และลำดับอะมิโนมีความเหมือนกันถึง 90 %

เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้โดยการถอดรหัสจาก cDNA พบว่า MRJP1 ของผึ้งโพรง, *Apis cerana* (AcMRJP1) ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic 44.1 %, neutral 28.4 % และ hydrophilic 27.8 % ทำนายค่า pI ประมาณ 5.4 มีตำแหน่ง N-link glycosylation (NXS/T) อยู่ 3 ตำแหน่งที่ 29, 145 และ 178 (รูปที่ 2)

```

ATGACAAGGTGGTTGTTTCATGGTGGTATGCCTTGGCATAGTTTGTCAAGGTACGACAAGC      60
M T R W L F M V V C L G I V C Q G T T S
AGCATTCTTCGAGGAGAATCTTTAAACAAATCATTAAAGCGTCCTTCACGAATGGAAATTC      120
S I L R G E S L N K S L S V L H E W K F
TTTGATTATGATTCGATAGCGATGAAAGAAGACAAGATGCAATTCTATCTGGCGAATAC      180
F D Y D F D S D E R R Q D A I L S G E Y
GACTACAGGAAAAATTATCCATCCGACGTTGATCAATGGCATGGTAAGATTTTGTCCACC      240
D Y R K N Y P S D V D Q W H G K I F V T
ATGCTAAGATACAATGGCGTACCTTCCTCTTTGAACGTGATATCTAAAAAGATCGGTGAT      300
M L R Y N G V P S S L N V I S K K I G D
GGTGGACCTCTTCTCAACCTTATCCCGATTGGTCGTTTGCTAAATATGACGATTGCTCT      360
G G P L L Q P Y P D W S F A K Y D D C S
GGAATCGTGAGCGCCACAAAACCTTGGGATCGACAAATGCGACAGATTGTGGGTTCTGGAC      420
G I V S A T K L A I D K C D R L W V L D
TCAGGTCTTGTCAATAATACTCAACCCATGTGTTCTCCAAAACCTGCTCACCTTTGATCTG      480
S G L V N N T Q P M C S P K L L T F D L
ACTACCTCGCAATTGCTCAAGCAAGTCGAAATACCGCATGATGTTGCCGTAATGCCACC      540
T T S Q L L K Q V E I P H D V A V N A T

```


ACAGGAAAGGGAAGACTATCATCTCTAGCTGTTCAACCTTTAGATTGCAATATAAATGGT 600
 T G K G R L S S L A V Q P L D C N I N G
 GATACTATGGTATACATAGCAGACGAGAAAGGTGAAGGTTTAATCGTGTATCATGATTCT 660
 D T M V Y I A D E K G E G L I V Y H D S
 GATAATTCTTTCCATCGATTGACTTCCAAAACCTTTCGATTACGATCCTAAATTTACCAA 720
 D N S F H R L T S K T F D Y D P K F T K
 ATGACGATCAATGGAGAAAAGTTTCACAACGCAAAGTGGAAATTTCTGGAATGGCTCTTAGT 780
 M T I N G E S F T T Q S G I S G M A L S
 CCCATGACTAACAATCTCTATTACAGTCCTGTAGCTTCTACCAGTTTGTATTATGTTAAC 840
 P M T N N L Y Y S P V A S T S L Y Y V N
 ACGGAACAATTTCAGAACATCCAATTATGAACAAAATGCCGTACATTATGAAGGAGTTCAA 900
 T E Q F R T S N Y E Q N A V H Y E G V Q
 AATATTTTGGATACCCAATCGTCTGCTAAAGTAGTATCGAAAAGTGGCGTCTCTTCTTC 960
 N I L D T Q S S A K V V S K S G V L F F
 GGACTGGTGGGCGATTTCAGCTCTTGGCTGCTGGAACGAACATCGATCACTTGAAAGACAC 1020
 G L V G D S A L G C W N E H R S L E R H
 AATATCCGTACCGTCGCTCAAAGTGATGAGACACTTCAAATGATCGTTGGCATGAAGATT 1080
 N I R T V A Q S D E T L Q M I V G M K I
 AAGGAAGCCCTTCCACACGTGCCCATATTCGATAGATATATAAACCGTGAATACATATTG 1140
 K E A L P H V P I F D R Y I N R E Y I L
 GTTTTAAGTAACAGAATGCAAAAAATGGCGAATAATGACTATAAATTCAACGATGTAAAC 1200
 V L S N R M Q K M A N N D Y N F N D V N
 TTCAGAATTATGGACGCTAATGTAAATGACTTGATATTGAACACTCGTTGCGAAAATCCT 1260
 F R I M D A N V N D L I L N T R C E N P
 AATAATGATAACACCCCTTTCAAATTTCAATACATCTGTAATAATCTGTTTTTTTCGATA 1320
 N N D N T P F K I S I H L *
 TATATTAATATTGTTTCGAAATTTCTTATGAATGTATTATGAATGTATAAAATAAATATT 1380
 GTTTTCGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1421

รูปที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ AcMRJP1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พิมพ์ด้วยตัวอักษรเฉียงเป็นส่วนของ forward และ reverse primer, ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของ signal peptide ตำแหน่งของดาว คือ termination codon และ ตำแหน่ง N-glycosylation แสดงด้วยกล่องสี่เหลี่ยม

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของจีน cDNA ขนาด 1600 bp พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1565 bp ประกอบไปด้วย reading frame 1392 bp ที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 463 residues ให้โปรตีนขนาดประมาณ 52 kDa เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AmMRJP ที่มีรายงานไว้แล้ว พบว่ามีความเหมือน AmMRJP2 ถึง 92 % และลำดับอะมิโนมีความเหมือนกันถึง 82 %

เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้โดยการถอดรหัสจาก cDNA พบว่า AcMRJP2 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic 42.3 %, neutral 31.3 % และ hydrophilic 26.4 % ทำนายค่า pI ประมาณ 7.88 มีตำแหน่ง N-link glycosylation (NXS/T) อยู่ที่ 145 และ 178 (รูปที่ 3)

ATGACAAGGTGGTTGTTTCATGGTGGCATGCCTTGGCATAGCTTGTCAAGGCGCCATTATT 60
M T R W L F M V A C L G I A C Q G A I I

CGACAAAATTCTGCAAAAAACTTGGAAAATTCGTTGAACGTAATTCACGAATGGAAATAT 120
 R Q N S A K N L E N S L N V I H E W K Y

ATCGATTATGATTTTCGGTAGCGAAGAAAGAAGACAAGCTGCGATTCAATCTGGCGAATAC 180
 I D Y D F G S E E R R Q A A I Q S G E Y

GATCATACGAAAAATTATCCCTTCGATGTCGATCAATGGCATGATAAGACTTTTGTCCACC 240
 D H T K N Y P F D V D Q W H D K T F V T

ATACTAAAGTACGATGGTGTGCCTTCTACTTTGAACATGATATCTAACAAAATCGGTAAG 300
 I L K Y D G V P S T L N M I S N K I G K

GGTGGACGCCTTCTACAACCATATCCTGATTGGTCGTGGGCAGAGAATAAAGATTGCTCT 360
 G G R L L Q P Y P D W S W A E N K D C S

GGAATCGTGAGCGCTTTCAAAATTGCGATTGACAAAATTCGACAGATTGTGGGTTTGGAT 420
 G I V S A F K I A I D K F D R L W V L D

TCAGGTCTTATCAATAGAACTGAACCTATATGTGCTCCAAAGTTGCATGTCTTTGATCTG 480
 S G L I **N R T** E P I C A P K L H V F D L

AAAAACACAAAGCACCTTAAGCAAATCGAAATACCGCATGATATTGCCGTAAATGCCACC 540
 K N T K H L K Q I E I P H D I A V **N A T**

ACAGGAAAGGGAGGGCTAGTCTCTCTAGTTGTTCAAGCCATGGATCCTATGAATACTTTA 600
 T G K G G L V S L V V Q A M D P M N T L

GTATACATAGCAGACCATAAGGGTGATGCTTTGATCGTCTATCAAAAATTCGGATGATTCC 660
 V Y I A D H K G D A L I V Y Q N S D D S

TTCCATCGAATGACTTCCAACACTTTCGATTACGATCCCAGATATGCCAAAATGACGATC 720
 F H R M T S N T F D Y D P R Y A K M T I

AATGGAGAAAGTTTACATTGAAAAATGGAATTTGTGGAATGGCTCTTAGTCCCCTGACG 780
 N G E S F T L K N G I C G M A L S P V T

AACAACTTTATTACAGTCCTCTCGCTTCTCACGGTTTGTATTATGTCAACACGGAACCA 840
 N N L Y Y S P L A S H G L Y Y V N T E P

TTTATGAAATCACAATTTGGAGACAATAATAACGTGCAATATGAAGGATCCCAAGATACT 900
 F M K S Q F G D N N N V Q Y E G S Q D T

TTGAACACGCAATCATTGGCTAAAGCAGTATCGAAAGATGGCGTCTCTTCGTCGGACTT 960
 L N T Q S L A K A V S K D G V L F V G L

GTGGGTAATTCAGCTCTTGGATGCTTGAACGAGCATCAACCACTTCAGAGAGAAAATTTA 1020
 V G N S A L G C L N E H Q P L Q R E N L

GAACTGGTCGCCCAAATGAAAAACACTTCAAATGATCGCAGGTATGAAAAATTAAGGAA 1080
 E L V A Q N E K T L Q M I A G M K I K E
 GAGCTTCCACATTTTCGTAGGAAGTAACAAACCTGTAAAGGACGAATATATGTTAGTTTTA 1140
 E L P H F V G S N K P V K D E Y M L V L
 AGTAACAAAATGCAGAAAATAGTAAATAATGATTTTAATTTCAACGACGTAAACTTCCGA 1200
 S N K M Q K I V N N D F N F N D V N F R
 ATTTTGGGTGCGAATGTAAAGGAATTAATGAGAAATACTCATTGCGCAAATTTTAACAAT 1260
 I L G A N V K E L M R N T H C A N F N N
 AAAAAATAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAACAATAACAATCAGAAG 1320
 K N **N Q K N N** **N Q K N N** N Q N N N **N Q K**
 AATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAT 1380
N N **N Q K N N** **N Q K N N** **N Q K N N** N Q N
 ACTAACAATTAGAATGATAATCAAGTTCGTGTTCTTCAAAAATCGCATTAAAAATCAATAA 1440
 T N N *
 ACCAAATTATTTTTTAAATATTTTTTCGATGTAAACAAAATTTTTTAAATATTTTCATT 1500
 ATATTATAAATAAATAAATAAATATCGTTTTTCGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1560
 AAAAA 1565

รูปที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ AcMRJP2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พิมพ์ด้วยตัวอักษรเรียงเป็นส่วนของ forward และ reverse primer, ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของ signal peptide ตำแหน่งของดาว คือ termination codon และ ตำแหน่ง N-glycosylation แสดงด้วยกล่องสี่เหลี่ยม บริเวณที่เป็นกล่องทึบเป็นส่วนที่เป็น Nitrogen-rich pentapeptide repeats (NQKNN)

กรดอะมิโนที่ได้โดยการถอดรหัสจาก cDNA พบว่า AcMRJP2 พบว่าทางด้านปลาย N ของลำดับกรดอะมิโน จะมีตำแหน่งของ Nitrogen-rich pentapeptide repeats อยู่ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน arginine, glutamine และ lysine

ทางด้านปลายทางด้านอะมิโนกรุปของทั้ง AcMRJP1 และ AcMRJP2 มีลำดับกรดอะมิโนเป็นชนิด hydrophobic ซึ่งมีความเหมือนกับปลายทางด้านอะมิโนกรุปของ MRJPs ที่รายงานโดย Schmitzova et. al. (1998) ซึ่งพบว่าเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เป็น signal peptide การทำนายจุดตัดของพันธะเปปไทด์ของ signal peptide ออกจาก structural protein ทำโดยใช้โปรแกรม SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) พบว่า AcMRJP1 มีจุดตัดอยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง ser-20 และ ser-21 AcMRJP2 มีจุดตัดอยู่ที่ตำแหน่ง gly-17 และ ala-18

การโคลน MRJpDNA เข้าสู่ expression vector (pET17b)

ได้ทำการ subclone ส่วน MRJp1cDNA จาก pUC18-recombinant plasmid ไปสู่ expression vector (pET17b) เพื่อตรวจการแสดงออกของ MRJp1cDNA พร้อมทั้งวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้จากการแสดงออก นอกจากนั้นยังทำการ purified ผลิตภัณฑ์โปรตีนนั้นด้วย การติดตามและ purified โปรตีนจะทำโดยอาศัยหลักการที่โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นได้จาก recombinant plasmid มี histidine tag (His6) อยู่ที่ปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนนั้น

การเพิ่มปริมาณ MRJpDNA ด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Expression forward primer (5'- CATGCCATGGCTAGCCATCATCATCATCATAGCATTCTTCGAGGAGAATC - 3') และ Expression reverse primer (5'- CGGGGTACCTTACAGATGTATTGAAATTTTGAAAGG - 3') PCR product ที่สังเคราะห์เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย 1.2 % agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจสอบการเรืองแสงของแถบ DNA โดย UV transilluminator พบว่ามีแถบ DNA ขนาด 1400 bp ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 PCR product ที่ได้จากการเตรียม full length MRJpAcDNA ของฝั่งโพรง

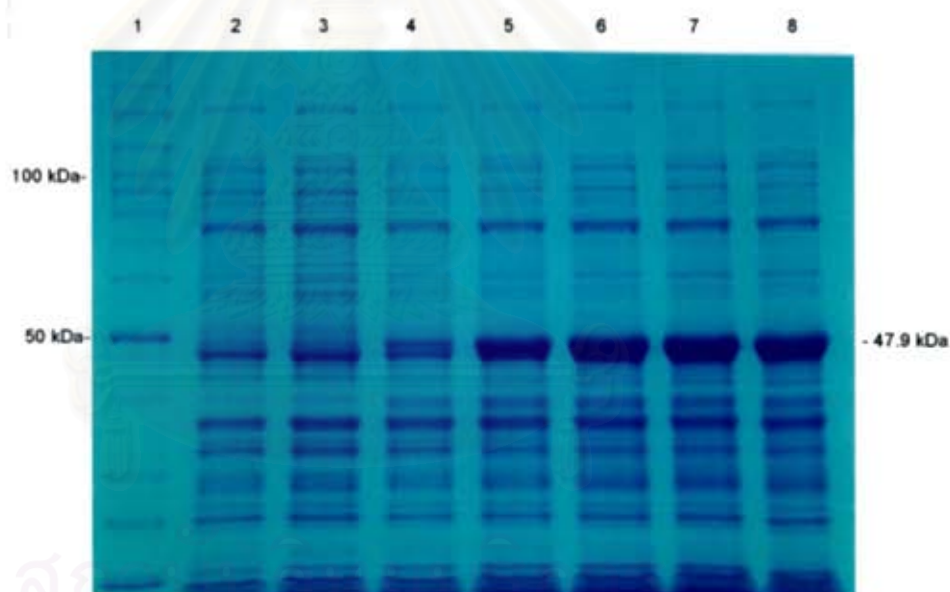
ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII

ช่องที่ 2 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 200 bp ladder

ช่องที่ 3 : PCR product

การแสดงออกและการแยก MRJpC DNA จาก recombinant clone ให้บริสุทธิ์

เมื่อ subclone AcMRJp1cDNA เข้าไปใน pET17b ที่ตัดด้วยเอนไซม์ NheI และ KpnI เมื่อเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ AcMRJp1 ด้วยการเติม IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 mM จะพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนตั้งแต่ 1 ชั่วโมงแรก ระดับการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นจนคงที่หลังเหนี่ยวนำ 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5) AcMRJp1 ที่ผลิตขึ้นจะอยู่ในรูป insoluble ไม่พบการย่อยสลายของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นระหว่างการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ โปรตีนที่ได้จากการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column (HiTrap Chelating HP columns) ภายใต้สภาวะเสียสภาพด้วย 8 M urea และ 250 mM imidazole) และแยกต่อด้วย 12 % SDS-PAGE พบว่ามีขนาด 47.9 kDa (รูปที่ 6) ปริมาณการแยกสกัดให้บริสุทธิ์เมื่อเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร จะสามารถผลิต AcMRJp1 ได้ 20 mg

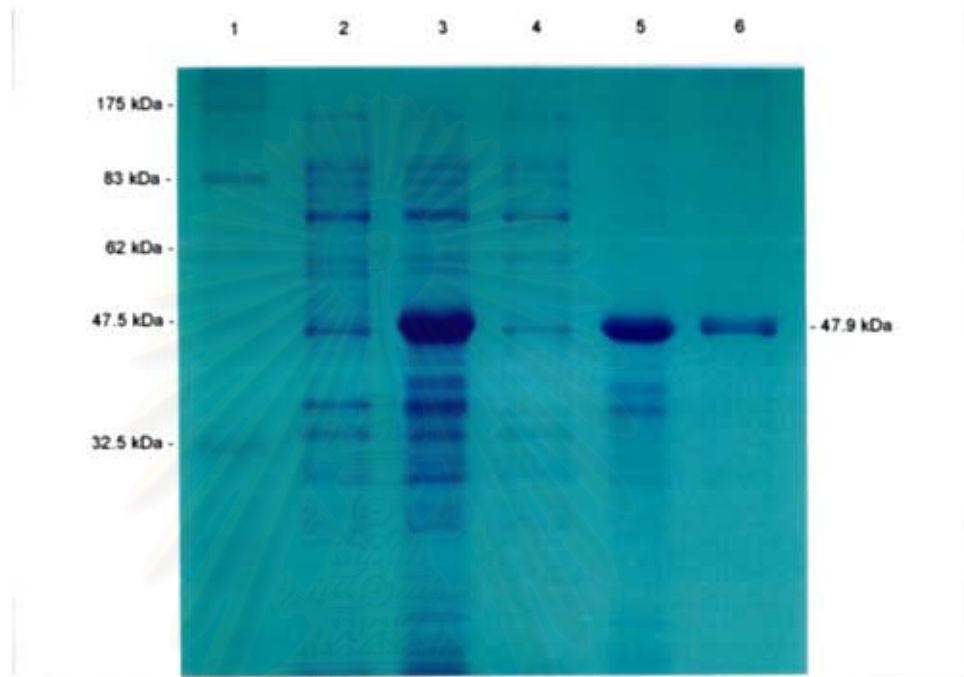


รูปที่ 5 โปรตีนที่ได้จากการแยกขนาดด้วย SDS-PAGE

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2-3 : โปรตีนที่ได้จาก *E. coli* ที่มี recombinant plasmid pET-AcMRJp1 (ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG)

ช่องที่ 4-8 : โปรตีนที่ได้จาก *E. coli* ที่มี recombinant plasmid pET-AcMRJp1 (เหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นระยะเวลา 1-5 ชั่วโมง)



รูปที่ 6 โปรตีนที่ได้จากการสกัดให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column และแยกขนาดด้วย SDS-PAGE

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 : โปรตีนที่ได้จาก *E. coli* ที่มี recombinant plasmid pET-AcMRJP (ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG)

ช่องที่ 3 : โปรตีนที่ได้จาก *E. coli* ที่มี recombinant plasmid pET-AcMRJP (เหนี่ยวนำด้วย IPTG)

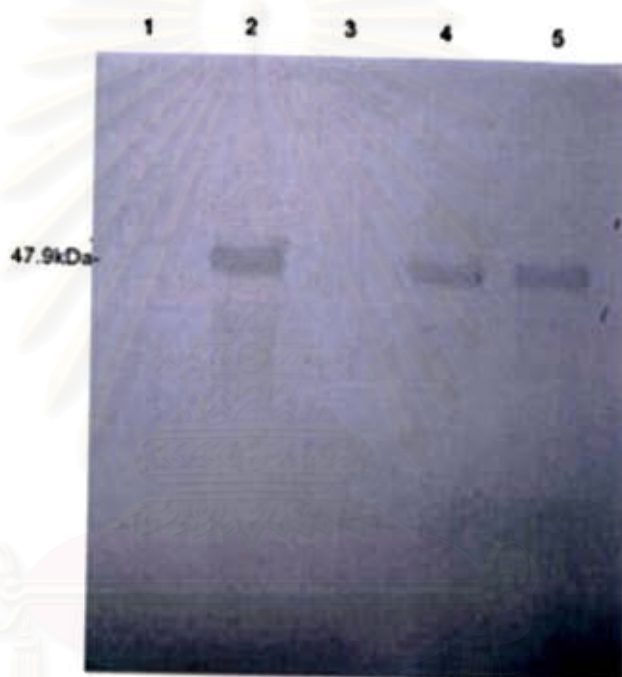
ช่องที่ 4 : crude extract, ในส่วน soluble fraction

ช่องที่ 5 : โปรตีน ในส่วน insoluble fraction

ช่องที่ 6 : AcMRJP1 ที่แยกให้บริสุทธิ์ affinity column

การแสดงผลของโปรตีน AcMRJP1 ด้วย SDS-PAGE และ Western blot

หลังสกัดโปรตีน AcMRJP1 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ affinity column และแยกขนาดของโปรตีนด้วย 12 % SDS-PAGE แล้ว ได้ทำ Western blot โดยการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่น PVDE membrane และตรวจสอบขนาดของโปรตีนโดยใช้ antibody ที่จำเพาะกับ histidine tag พบว่าโปรตีนที่จำเพาะกับ Anti-his มีขนาด 47.9 kDa ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 โปรตีนที่ติดตามผลด้วย Western blot

- ช่องที่ 1 : โปรตีนที่ได้จาก pET-AcMRJP (ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG)
- ช่องที่ 2 : โปรตีนที่ได้จาก pET-AcMRJP (เหนี่ยวนำด้วย IPTG)
- ช่องที่ 3 : crude extract, ส่วน soluble fraction
- ช่องที่ 4 : ส่วน insoluble fraction
- ช่องที่ 5 : AcMRJP1 ที่แยกให้บริสุทธิ์ด้วย affinity column

การอภิปรายผลการทดลอง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ MRJpC DNA ของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MRJpC DNA ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่มีรายงานในธนาคารยีน (GenBank) ด้วยวิธี RT-PCR ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1500 และ 1600 bp เมื่อนำชิ้น DNA นี้มาโคลนลงใน pUC18 และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ทั้งสองชิ้นนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ MRJp1cDNA และ MRJp2cDNA ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) AcMRJp1cDNA มี open reading frame 1302 bp ถอดรหัสให้กรดอะมิโนได้ 433 residues ส่วน AcMRJp2cDNA มี open reading frame 1392 bp ถอดรหัสให้กรดอะมิโนได้ 463 residues ซึ่งทั้ง AcMRJp1cDNA และ AcMRJp2cDNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับของ MRJp1 และ MRJp2 ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ถึง 93 และ 92 เปอร์เซ็นต์ มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันถึง 90 และ 86 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ค่า pI ที่คำนวณได้จากทั้ง AcMRJp1cDNA และ AcMRJp2cDNA มีค่าเท่ากับ 5.4 และ 7.88 ตามลำดับ ซึ่งค่านี้จะสอดคล้องกับค่า pI ที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติของ AcMRJp1 และ AcMRJp2 ด้วย chromatography ซึ่งเท่ากับ 5.2-5.7 และ 7.0-8.0 ตามลำดับ (Srisuparb et al., 2003) เมื่อคำนวณปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) ที่เป็นองค์ประกอบใน AcMRJp1 และ AcMRJp2 มีค่าเท่ากับ 48.5 และ 45.4 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นปริมาณสูง และสอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่มีรายงานอยู่ใน MRJps ของผึ้งพันธุ์, *Apis mellifera* (Schmitzova et al., 1998) จากการโคลน cDNAMRJP ของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ครั้งนี้ สามารถโคลนได้เป็น Full length cDNA ที่มีทั้ง start codon และ stop codon ดังนั้นจึงสามารถนำเอา cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้นี้ไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้สร้าง MRJpC DNA ที่เหมาะสมเพื่อใช้ subclone cDNA เข้าสู่ Expression vector (pET) ต่อไปได้

การ subclone AcMRJp1cDNA เข้าสู่ Expression vector (pET17b) นั้น ได้ออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ศึกษาไว้แล้วข้างต้น โดยในไพรเมอร์นั้นจะเติมส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสให้ Histidine จำนวน 6 residues เข้าไปด้วย การโคลนยีนครั้งนี้ได้นำ pET-MRJp1cDNA เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ rosetta ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถถอดรหัสกรดอะมิโนที่มี codon ที่หายาก (rare codon) ได้ ซึ่งจะเป็นการลดความผิดพลาดในการถอดรหัสของโปรตีน จากนั้นจึงทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน AcMRJp1 ด้วย IPTG (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 mM) พบมีการแสดงออกของโปรตีนตั้งแต่ 1 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกจะเพิ่มขึ้นจนคงที่เมื่อใช้เวลานานี่ 4 ชั่วโมงเป็นต้นไป การวิเคราะห์ total protein ที่สังเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 5) พบว่า AcMRJp1 มีขนาด 47.9 kDa และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลด้วย Western blot ที่ติดตามผลด้วย antibody ของ His-tag พบว่าผลที่ได้เหมือนกันคือได้ AcMRJp1 มีขนาด 47.9 kDa AcMRJp1 ที่ผลิตได้นั้นจะอยู่ในรูป insoluble ปริมาณการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์เมื่อเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร จะสามารถผลิตโปรตีนได้ 20 mg และไม่พบการย่อยสลายของโปรตีนขณะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน

Judova และคณะ (1998) และ Bilikova และคณะ (1999) ได้ทำการทดลองโคลนยีน AmMRJp1 และ AmMRJp2cDNA เข้าไปใน expression vector ชนิด pQE-32 และ pQE-30 แล้วจึงทำการ transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ M15 พบว่าจะมีการแสดงออกของโปรตีนเมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG หลังจากใช้เวลา 1 ชั่วโมง

(AmMRJP1) และเวลา 5 ชั่วโมง (AmMRJP2) ซึ่งโปรตีนทั้งสองจะอยู่ในรูป insoluble จากการเลี้ยงเซลล์ 1 ลิตร สามารถแยกสกัดโปรตีนของ MRJP1 ให้บริสุทธิ์ได้เพียง 0.6 mg และจะได้ MRJP2 ในปริมาณที่ต่ำ นอกจากนั้น ยังพบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ไปเป็นระยะเวลาานจะทำให้ MRJP1 และ MRJP2 ถูกย่อยสลายได้ด้วย proteases ที่ผลิตจาก host cell

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิต MRJP ของผึ้งโพรงไทยในเซลล์ *E. coli* ได้อย่างมีคุณภาพและให้ผลผลิตในปริมาณสูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการโคลนยีน cDNA ของ MRJP เข้าสู่สิ่งมีชีวิตอื่นโดยเฉพาะพืช เป็นงานที่มีศักยภาพสูง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถใช้ RT-PCR สังเคราะห์ MRJPCDNA ของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ได้ 2 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก cDNA ของ MRJPs ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)
2. MRJP1cDNA ของผึ้งโพรง (AcMRJPCDNA) มีส่วน open reading frame 1302 bp ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 433 residues
3. MRJP2cDNA ของผึ้งโพรง (AcMRJPCDNA) มีส่วน open reading frame 1392 bp ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน 463 residues
4. การแสดงออกของ AcMRJP1cDNA ใน *E. coli* rosetta ให้โปรตีนขนาด 47.9 kDa การแสดงออกพบตั้งแต่ 1 ชั่วโมงแรกหลังเหนี่ยวนำด้วย IPTG ระดับการแสดงออกจะเพิ่มขึ้น และคงที่หลังเหนี่ยวนำ 4 ชั่วโมง AcMRJP1 ที่ผลิตได้ อยู่ในรูป insoluble และไม่พบการย่อยสลายของ AcMRJP1 ระหว่างการเหนี่ยวนำ
5. สามารถผลิต AcMRJP1 ได้ถึง 20 mg จากเซลล์ *E. coli* ที่เลี้ยงจำนวน 1 ลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- ศิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2532. *ชีววิทยาของผึ้ง*. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์คั่นอ้อ. กรุงเทพมหานคร.
- Albert, S., Klaudiny, J. and Simuth, J. 1999. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 427-434.
- Bilikova, K., Klaudiny, J. and Simuth, J. 1999. Characterization of the basic major royal jelly protein MRJP2 of Honeybee (*Apis mellifera*) and its preparation by heterologous expression in *E. coli*. *Biologia Bratislava*. 54: 733-739.
- Brouwer, E. V. M. 1982. Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee. *J. Apic. Res.* 21(4): 193-198.
- Crailsheim, K. 1990. The protein balance of the honeybee worker. *Apidologie*. 21: 417-429.
- Howe, S. R., Dimick, P. S. and Benton, A. W. 1985. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. *J. Apic. Res.* 24(1): 52-61.
- Judova, J., Klaudiny, J. and Simuth, J. 1998. Preparation of recombinant most abundant MRJP1 of royal jelly. *Biologia Bratislava*. 53: 777-784.
- Kimura, Y., Kajiyama, S., Kanaeda, J., Izukawa, T. and Yonekura, M. 1999. N-linked sugar chain of 55 kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(12): 2099-2102.
- Klaudiny, J., Hanes, J., Kulifajova, J., Albert, S. and Simuth, J. 1994. Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honeybee (*Apis mellifera* L.) for coding related proteins of royal jelly. *J. Apic. Res.* 33(2): 105-111.
- Knecht, d. and Kaatz, H. H. 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honeybees. *Apidologie*. 21: 457-468.
- Krell, R. 1996. *Value-added products from beekeeping*. FAO Agricultural services bulletin, Rome, Italy.
- Laemmli, U. K., Malbert, E., Showe, M. and Kellenberger, E. 1970. Form determining fraction of the gene required for the assembly of the head of bacteriophage T₄. *J. Mol. Biol.* 49: 99-113.
- Lensky, L. and rakover, Y. 1983. Separate protein body compartments of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 75: 607-615.
- Moritz, R. F. and Southwick, E. E. 1992. Bees a superorganisms. An evolutionary reality, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Plama, M, S. 1992. Composition of freshly harvested Brazilian royal jelly: Identification of carbohydrates from the sugar fraction. *J. Apic. Res.* 31(1): 42-44.
- Sahmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J. and Simuth, J. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *CMLS*. 54: 1020-1030.

- Sambrook, J. and Rusell, D. W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Thrid edition. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklens. And Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
- Srisuparbh, D., Klinbunga, S., Wongsiri, S. and Sittipraneed, S. 2003. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honeybee (*Apis cerana*). *J. Biochem. Mol. Biol.* 36: 572-579.
- Towbin, H. Starhelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: prodedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนครั้งนี้ได้ส่งเพื่อเป็นผลงานตีพิมพ์ใน

Journal of Biochemistry and Molecular Biology

เมื่อ 30 มกราคม 2547

ดั่ง manuscript ที่แนบมานี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cloning, Expression and Genomic Organization of Genes Encoding

Major Royal Jelly Protein 1 and 2 of the Honey Bee (*Apis cerana*)

Chanprapa Imjongjirak¹, Sirawut Klinbunga², Siriporn Sittipraneed^{1*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

Key words: Honeybee, *Apis cerana*, cloning, expression, major royal jelly proteins, gene organization

To whom correspondence should be addressed;

Corresponding addressed: S. Sittipraneed, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Tel. (+66) -2-2185416, (+66) -2-2185434

Fax (+66) -2-2185436

e-mail: ssiripor@netserv.chula.ac.th

Running title: Major royal jelly proteins of *Apis cerana*

ABSTRACT

Major Royal Jelly Proteins cDNAs of *Apis cerana* (AcMRJP) were cloned and characterized. The open reading frames (ORF) of AcMRJP1 and AcMRJP2 were 1302 and 1392 nucleotides encoding 433 and 463 amino acid residues, respectively. Sequence divergence between AcMRJP1 and AcMRJP2 and their corresponding protein families in *A. mellifera* was 0.0618 and 0.0934 at nucleotide level and 0.0912 and 0.1438 at the protein level, respectively. Phylogenetic analysis supports orthologous similarity between these protein families. Deduced amino acids indicated high essential amino acid content of AcMRJP1 and AcMRJP2 (48.5 and 45.4%, respectively). Genomic organization of AcMRJP1 and AcMRJP2 were determined. Both AcMRJP1 (3660 bp) and AcMRJP2 (3875 bp) genes include six exons and five introns where all boundaries conform the GT/AG rule. AcMRJP1 and AcMRJP2 cDNAs were cloned into pET17b and transformed in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Both recombinant (r) AcMRJP1 (47.9 kDa) and rAcMRJP2 (51.7 kDa) were expressed in the insoluble form. Western blot analysis and N-terminal sequencing of solubilized proteins revealed successful expression of rAcMRJP1 and rAcMRJP2 *in vitro*. The yields of purified rAcMRJP1 and rAcMRJP2 were approximately 20 and 8 mg protein per liter of the flask culture, respectively.

INTRODUCTION

Royal jelly (RJ) is secreted from the hypopharyngeal and mandibular glands of 5 – 15 days old nurse bees and plays an important role for larval development (Lensky and Rakover, 1983; Knecht and Kaatz, 1990; Kubo *et al.*, 1996). Newly emerged bee larvae are fed by RJ for 3 days but only larvae that are developed into queen bees are continually fed throughout their lives (Schmitzova *et al.*, 1998).

RJ of *A. mellifera* comprises $12.7 \pm 0.8\%$ proteins, $11.9 \pm 0.7\%$ carbohydrates, $6.1 \pm 0.4\%$ lipids and $68.3 \pm 1.4\%$ moisture contents (Takenaka and Takenaka, 1996). Major royal jelly proteins (MRJPs) represent 82 – 90% of total proteins in RJ of *A. mellifera*. Five families of MRJPs of *A. mellifera* (AmMRJP1 – 5) with the molecular weight of 49 – 87 kDa were identified based on *N*-terminal sequences of purified proteins and cDNA sequences (Klaudiny *et al.*, 1994; Schmitzova *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999b; Simuth *et al.*, 2001).

Recently, Okamoto *et al.* (2003) reported that AmMRJP3 has potent anti-allergic activity by inhibition of interleukin-4 (IL-4), IL-2 and IFN- γ production. Intraperitoneal administration of AmMRJP3 inhibited anti-OVA IgE and IgG1 levels in the serum of immunized mice indicating clinical significance on potent immunoregulatory effects of AmMRJP3.

The full length of AmMRJP3 (RJP57-1) and AmMRJP4 (RJP57-2) cDNA were isolated and characterized using the cDNA library established from heads of *A. mellifera carnica* nurse bees (Klaudiny *et al.*, 1994). Subsequently, complete sequences of highly expressed transcripts encoding AmMRJP1 (Judova *et al.*, 1998;

Schmitzova *et al.*, 1998) and AmMRJP2 (Bilikova *et al.*, 1999) were characterized and expressed *in vitro*.

In Thailand, an alternative honey bee species *A. cerana* is indigenously found and widely used for commercial beekeeping primarily owing to its resistant to the bee mite (*Varroa jacobsoni*). The composition of *A. cerana* RJ is composed of $16.4 \pm 2.5\%$ proteins, $9.4 \pm 0.6\%$ carbohydrates, $7.4 \pm 0.6\%$ lipids and $65.3 \pm 2.5\%$ moisture content, respectively (Takenaka and Takenaka, 1996). Queen rearing experiments illustrated that *A. mellifera* queens could not be successfully reared with *A. cerana* RJ and *vice versa* (Pothichot and Wongsiri, 1993). This implied possible differences of potential composition of RJ from *A. mellifera* and *A. cerana*.

Takenaka and Takenaka (1996) analyzed water soluble proteins in RJ of *A. mellifera* and *A. cerana* by electrophoresis. Fourteen of twenty one protein bands were shared between RJ proteins of these bees. A highly aggregated protein was found in *A. cerana* but not in *A. mellifera*. Two protein bands (bands 10 and 11; 42.7 – 66.2 kDa) were major and only found in *A. mellifera* RJ.

Recently, Srisuparbh *et al.* (2003) constructed an expressed sequence tag (EST) library from hypopharyngeal glands of *A. cerana*. Forty-two of sixty-six sequenced ESTs were homologues of AmMRJPs (families 1, 2, 3 and 4). The ORF of AcMRJP1 deduced from 3 separate clones; pCUAC147, pCUAC171 and pCUAC322, was 1302 nucleotides encoding 433 amino acids. In addition, AcMRJP1, 2 and 3 were chromatographically purified by Q-Sepharose and Sephadex G200 and further characterized by *N*-terminal and internal peptide sequencing.

We then extend our studies by isolation and *in vitro* expression of AcMRJP1 and AcMRJP2 cDNAs. In addition, gene organization of AcMRJP1 and AcMRJP2 were also elucidated.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



MATERIALS AND METHODS

Biological specimens

Nurse bees of *A. cerana* (< 10 days) from a single colony (Bangkok, central Thailand) were collected when they were feeding the brood. The head of each nurse bee was dissected out and immediately placed in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed.

Total RNA and genomic DNA extraction

Total RNA was extracted from heads of *A. cerana* using TRIzol (Invitrogen) and further treated with DNase I (Promega, USA; 2 units/ μg of total RNA) at 37°C for 20 minutes. Genomic DNA was extracted from the thorax of each bee using a phenol–chloroform–SDS method described by Smith and Hagen (1997).

Isolation of AcMRJP1 and AcMRJP2 cDNAs

Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using an Omniscript RT Kit (Qiagen, USA). Five microlitres of the first strand cDNA was subjected to PCR in a 25 μl reaction volume containing 20 mM Tris–HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 200 mM of each dNTP, 0.6 μM of FMJ: 5'–TAGGAATTCTAAATGACAAGGTGGTTGTTTCATG–3', with the introduced initiation codon ATG and *Eco* RI site and RMJ: 5'–GGGGTACCC(T)₂₈A–3' with an introduced *Kpn* I site (Albert *et al.*, 1999b; Klaudiny *et al.*, 1994; Schmitzova *et al.*, 1998) and 1 U *Pfu* polymerase (Promega, USA). The amplification reaction was composed of denaturation at 92°C for 3 minutes followed by 5 cycles of denaturation at 92°C for 1 minute, annealing at 50°C , for 1.5 minutes and extension at 68°C for 4

minutes and additional 35 cycles of 94°C for 1 minute, 60°C for 1.5 minutes and 72°C for 4 minutes. The final extension was carried out at 72°C for 10 minutes.

The amplification products (1423 bp and 1565 bp in size) were treated with proteinase K (50 µg/ml in the presence of 0.5% SDS) at 65 °C for 1 hour and purified using a Nucleospin PCR Purification Kit (Nucleospin, MACHEREY-NAGEL) before digested with *Eco* RI and *Kpn* I. DNA fragments were then purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) and ligated with *Eco* RI and *Kpn* I – digested pUC18 and electrotransformed into *E. coli* XL1-Blue. Recombinant clones were selected by a *lac Z'* system (Maniatis *et al.*, 1982). Sizes of inserts were verified by colony PCR using pUC1: 5'-CCGGCTCGTATGTTGTGTGGA-3' and pUC2: 5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3', as primers. Restriction cleavage sites of inserts were examined by single and double digestion with *Ssp* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Cla* I, *Pvu* I.

Isolation and characterization of AcMRJP1 and AcMRJP2 genes

AcMRJP1 and AcMRJP2 genes were obtained from amplification of three overlapping regions (Fig. 1 and Table 1). Initially, genomic DNA was amplified by FMRJP and RMRJP primers using identical conditions as described for RT-PCR. Semi-nested PCR (*m*M1F + RMRJP and *m*M2F + RMRJP) was carried out using the gel-eluted PCR product from FMRJP + RMRJP as the template. The resulting product was ligated to dephosphorylated and *Sma* I – digested pGEM-3Zf(+), electrotransformed to *E. coli* XL1-Blue and sequenced.

The second overlapping region of MRJP1 and MRJP2 were amplified using 3M1/2F (positions 660th – 687th nucleotide) + 3M1R (1364th – 1387th nt) and 3M1/2F (654th –

678th nt) + 3M2R (1425th – 1449th nt), respectively. The gel-eluted PCR product was then subjected to semi-nested PCR using 3M1F (685th – 710th nt) + 3M1R and 3M2F (682nd – 706th) + 3M2R, respectively. The amplification products were processed as above.

The upstream 5' region of AcMRJP1 and AcMRJP2 were amplified from genomic DNA of *A. cerena* using 5M1F (604 bp upstream region, accession number AF388203) + 5M1R (374th – 395th nt of AcMRJP1) and 5M2F (859 bp upstream region, accession number AY078399) + 5M2R (352nd – 378th nt of AcMRJP2). Semi-nested PCR was carried out for the AcMRJP2 using the original forward primer and 5M2R-1 (133rd – 160th nt). The resulting products were cloned and sequenced.

DNA sequencing and data analysis

Plasmid DNA was extracted from each recombinant clones and sequenced for both directions using an automated sequencer (ABI377, PE Applied Biosystems, USA). DNA sequences were further edited with GENETYX (Software Development Inc.) and blasted against data in the GenBank using BlastN and BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The putative cleavage site of the signal peptide, the TATA box and ultraspiracle transcriptional factor (USP-TF) binding sites were predicted by SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), Neural network Promoter Prediction, NNPP2.1 (<http://www.fruitfly.org/seq-tools/promoter.html>) and Genomatixsuite (<http://www.genometix.de>), respectively.

Multiple sequence alignments of nucleotide and translated amino acids were performed using Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Aligned sequences were

bootstrapped 1000 times using Seqboot. Sequence divergence between different families of MRJPs were calculated based on the two parameter method (Kimura, 1980) using Dnadist. Bootstrapped neighbor-joining trees were constructed using Neighbor and Consense. All phylogenetic reconstruction programs are routine in PHYLIP (Felsenstein, 1993). Trees are appropriately illustrated using TREEVIEW (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod.html>).

Construction of AcMRJP1 and AcMRJP2 expression vectors

Fragments coding mature AcMRJP1 and AcMRJP2 were amplified using primers; Exp1F (5'-CATGCCATGGCTAGCCATCATCATCATCATAGCATTCTTCGAGGAGAATC-3') and Exp1R (5'-CGGGGTACCTTACAGATGTATTGAAATTTGAAAGG-3') and Exp2F (5'-GAAGATCTGGCTAGCCATCATCATCATCATCATGCCATTATTCGACAAAATTC-3') and Exp2R (5'-CGGGGTACCTTAATTGTTAGTATTCTGATTGTTATT-3'), respectively. A *Nhe* I site (underlined) and six His encoded nucleotides (boldface) and a *Kpn* I site (underlined) were introduced to the forward and reverse primers.

PCR was carried out as described previously. The amplification product was digested with *Nhe* I and *Kpn* I, ligated to compatible pET17b (Novagen, Madison, USA) and transformed into *E. coli* XL1-Blue. Plasmid DNA was extracted from recombinant clones (pCUAcMRJP1 and pCUAcMRJP2) and subsequently transformed into *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen, Madison, USA) for expression *in vitro*.

Expression and purification of rAcMRJP1 and rAcMRJP2

Aliquots of 1 ml of recombinant *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, cultured in LB medium containing 50 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol at 37 °C to 0.6 OD₆₀₀, were taken at one hour intervals (1 – 5 hours) after induced by 0.4 mM IPTG and centrifuged at 10000 *g* for 10 minutes at 4°C and stored at –80 °C. The crude extract was examined by SDS–PAGE according to Laemmli (1970).

For purification of rAcMRJP1 and rAcMRJP2, aliquots of 100 ml of IPTG–induced culture were harvested by centrifugation. The pellet were resuspended in the binding buffer (20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride), sonicated and centrifuged. Soluble and insoluble fractions were analyzed by SDS–PAGE. AcMRJPs in the insoluble fraction were purified under denaturing conditions (8 M urea and 250 mM imidazole) using HiTrap Chelating HP affinity chromatography following the protocol recommended by the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). Purified proteins were stored at –20 °C.

SDS–PAGE and Western blot analysis

Purified rAcMRJP1 and rAcMRJP2 were analyzed in 12% SDS–PAGE. Electrophoresed proteins were transferred to a PVDF membrane (Hybond–P, Amersham Pharmacia Biotech; Towbin, 1979) and incubated with 5% dried skimmed milk–PBS for 1 hour at room temperature. The membrane was washed twice in PBS–Tween20 and incubated with diluted Anti–His–HRP Conjugate (1:1000, Penta–His, Qiagen, USA) in 5% non–fat dried milk–PBS for 1 hour. The

peroxidase activity was detected by adding H₂O₂ and diaminobenzidine (DAB) chromogenic substrates.

N-terminal amino acid sequencing

Purified rAcMRJP1 and rAcMRJP2 were resolved in 12% SDS-PAGE and electroblotted onto a PVDF membrane. *N*-terminal sequences of these proteins were examined using an ABI 494 protein sequencer (Applied Biosystems, Department of Biological Science, National University of Singapore).



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



RESULTS AND DISCUSSION

Isolation, cloning and characterization of AcMRJP1 and AcMRJP2 cDNAs

PCR products (1423 bp, pRT–AcMRJP1 and 1565 bp, pRT–AcMRJP2) representing complete ORFs of AcMRJP1 (1302 bp encoding a polypeptide of 433 amino acid residues, accession number AF525776) and AcMRJP2 (1392 bp encoding a polypeptide of 463 amino acid residues, accession number AF525777) were successfully cloned and sequenced. The putative single (AATAAA) and multiple (AATAAATAAAATAAA) polyadenylation signals are found at 14 nucleotides upstream from the poly (A) tail of AcMRJP1 and AcMRJP2 cDNAs. The latter also contain a consensus AATAAA at 73 bp upstream from the multiple polyadenylation signal sequence. Identical overlapping consensus polyadenylation signal sequence was previously found in MRJP3 of *A. mellifera* (AmMRJP3) at an identical position with that of AcMRJP2 (Klaudiny *et al.*, 1994).

Similarity of AcMRJP1 and AcMRJP2 and their homologues in *A. mellifera* were 93% and 92% (nucleotides) and 90% and 86% (deduced amino acids), respectively. The putative cleavage site of signal peptidase was located between S₂₀ – S₂₁ and G₁₇ – A₁₈. Three (29th, 145th and 178th amino acid residues) and two (145th and 178th amino acid residues) predicted *N*-linked glycosylation sites (NXS/T) were observed in the deduced proteins and their homologues in *A. mellifera*. The calculated pI of AcMRJP1 and AcMRJP2 was 5.4 and 7.88 which are concordant with pI of 5.2 – 5.7 and 7.0 – 8.0 examined from chromatographically purified AcMRJP1 and AcMRJP2, respectively (Srisuparbh *et al.*, 2003).

Sequence comparisons showed 14 mismatches between AcMRJP1 in the present study and that previously deposited in the GenBank (Srisuparbh *et al.*, 2003). Ten of these did not cause amino acid replacement. Nevertheless, non-synonymous mutations were found from P₁₀₆ to Q, A₁₁₂ to S, G₁₃₈ to V and L₁₅₀ to M by substitutions of C₃₁₇, G₃₃₄, G₄₁₃ and C₄₄₈ to A, T, T and A, respectively. Internal peptide sequencing of purified AcMRJP1 supported the existence of Q₁₀₆ and S₁₁₂ for AcMRJP1 in this study. Nevertheless, N₂₉ of AcMRJP1 found in both studies was D as revealed by internal peptide sequencing (Srisuparbh *et al.*, 2003) suggesting allelic variants of AcMRJP1. The cDNA and genomic sequences of AcMRJP2 are first reported by this study. No sequence differences were observed between genomic DNA sequence of AcMRJP1 and AcMRJP2 and their corresponding cDNA sequences. The essential amino acid content of deduced AcMRJP1 and AcMRJP2 was relatively high (48.5% and 45.4%, respectively) which is comparable to that of AmMRJP1 (48%), AmMRJP2 (47%) (Schmitzova *et al.*, 1998).

Multiple alignments revealed four conserved cysteines typically found across different families of MRJPs (data not shown). No repeated units of amino acids were found in AcMRJP1, AmMRJP1 and AmMRJP4 but repetitive regions with different sequences and localization were found in the remaining protein families. AcMRJP2 contains six complete repeated units; NQKNN encoded by AATCAGAA(A/G)AATAAC, at the C-terminus (423rd to 457th residues). Apparently, pentameric amino acid repeats with Q(N/K)(D/N/T/A/G)(N/G/D)(I/N/K/R) sequences were found in the C terminus of AcMRJP2, AmMRJP2 and AmMRJP3. In addition, DRM and its variants (DRI, DRT and DTM) were found at the C terminus of AmMRJP5 (Schmitzova *et al.*, 1998).

Genes coding for AmMRJPs are present as single copy genes per haploid genome (Malecova *et al.*, 2003). Bilikova *et al.* (1999) illustrated that the single protein band of purified AmMRJP2 analyzed by SDS-PAGE was composed of at least 8 different isoelectricfocusing variants of pH 7.5 – 8.5. Schmitzova *et al.*, (1998) examined nucleotide differences of 4 AmMRJP3 and 2 AmMRJP5 isoforms and indicated that polymorphism of the proteins are related with length variability of repetitive regions among honey bee individuals in the colony. Therefore, intra- and inter-colonial variability of an AcMRJP2 gene in different populations of *A. cerana* in Thailand should be further examined.

Gene organization of AcMRJP1 and AcMRJP2

Complete gene sequences of AcMRJP1 and AcMRJP2 were deduced from nucleotide sequences of overlapped clones of each family. As in *A. mellifera*, both AcMRJP1 and AcMRJP2 genes comprise 6 exons and five introns from the translational initiation site to the stop codon (3660 bp and 3875 bp in length; accession numbers AY515688 and AY515689; Figs. 2 and 3). The length of each exon varied from 133 bp (exon 5) – 284 bp (exon 4) and 133 bp (exon 5) – 287 bp (exon 4) for AcMRJP1 and AcMRJP2 genes, respectively. The GC content reflects a slightly greater thermal stability in exons (34% – 42% and 28% – 42%) than in introns (15% – 29 % and 16% – 24%) of AcMRJP1 and AcMRJP2 genes (Table 2).

Exon/intron boundary sites determined by the corresponding cDNA sequences are consistent with the GT/AG rule. Introns 2, 3, and 5 of AcMRJP1 and AcMRJP2 interrupt ORFs between two codons (type 0 intron) whereas the remaining introns interrupt the coding sequences after the 1st or 2nd of the codons (type 1 intron).

Malecova *et al.* (2003) reported two ultraspiracle transcriptional factor (USP-TF, GGTCA) binding sites in AmMRJP1 and only one binding site in AmMRJP2 – 5 immediately downstream from the predicted TATA box. The predicted CAAT regulatory box (CCAAT) is located between 69 – 65 nucleotides downstream from the transcription starting point in AmMRJP1 but is absent from AmMRJP2 – AmMRJ5. USP is a member of ligand – modulated transcription factor that regulate cell homeostasis, reproduction and differentiation and development (Sergaves, 1991). In *Drosophila melanogaster*, USP– TF specifically binds to active juvenile hormones (Jones and Sharp, 1997).

The putative TATA box of AcMRJP1 and AcMRJP2 was found at – 31 and –32 nt upstream from the transcription initiation site, respectively. The putative CAAT box was also found in AcMRJP1 (CAAAT) at an identical position with CCAAT reported in AmMRJP1 (Malecova *et al.*, 2003) but that consensus sequence was not found in AcMRJP2. Both AcMRJP1 and AcMRJP2 contained a single USP binding site at the 5' UTR immediately following the TATA box.

Genetic Distance and phylogenetic relationships of AcMRJPs

Interspecific sequence divergence between MRJP1 and MRJP2 of *A. cerana* and *A. mellifera* was low (0.0618 – 0.0934 and 0.0912 – 0.1438) whereas divergence between different families of MRJPs in *A. mellifera* was 0.2419 (AmMRJP2 – AmMRJP3) – 0.4490 (AmMRJP3 – AmMRJP5) and 0.4252 – 0.8439 at nucleotide and deduced protein levels, respectively.

Bootstrapped NJ trees constructed from sequence divergence of nucleotides and deduced amino acids (Fig. 4) revealed close relationships between AcMRJP1 –

AmMRJP1 and AcMRJP2 – AmMRJP2 from different bee species as typically found in genes born from gene duplication process (Mitsuo *et al.*, 2001). Albert *et al.* (1999a) determined evolutionary relationships of AmMRJP family and reported that family variants of MRJP genes are resulted from near-simultaneous gene duplication, with MRJP4 was possibly the earliest divergence from other families.

Expression, characterization and purification of rAcMRJP1 and rAcMRJP2 proteins

AcMRJP1 (pRT–AcMRJP1) and AcMRJP2 (pRT–AcMRJP2) were subcloned into pET17b for expression *in vitro* (called pCUAcMRJP1 and pCUAcMRJP2, respectively). Overexpression of these proteins was induced after the addition of IPTG (0.4 mM final concentration) for 1 hour and reached the saturated expression level after 4 hours (Fig. 5). Both proteins were expressed as the insoluble form and did not degrade during longer incubation period. Sizes of purified rAcMRJP1 and rAcMRJP2 (HiTrap Chelating HP affinity chromatography under denaturing conditions of 8 M urea and 250 mM imidazole) were 47.9 and 51.7 kDa determined by SDS–PAGE and positively identified by western blot analysis. (Fig. 6). *N*-terminal amino acid sequencing revealed ASHHHHHSILRGESLNKSL (rAcMRJP1) and ASHHHHHHAIIRQN(S/N)(S/A) KNL (rAcMRJP2) matched with those of expected sequences except a lack of an *N*-terminal methionine (M) which is often removed from expressed proteins in the *E. coli* expression systems (Hirel *et al.*, 1989). The yield of purified rAcMRJP1 and rAcMRJP2 from the 1 liter flask culture was 20 mg and 8 mg, respectively.

Judova *et al.*, (1998) and Bilikova *et al.*, (1999) cloned AmMRJP1 and AmMRJP2 cDNAs into pQE–32 and pQE–30 vectors and expressed recombinant constructs in

E. coli M15[pREP4]. The highest production of recombinant proteins was observed at 1 hour (rAmMRJP1) and 5 hours (rAmMRJP2) after the addition of IPTG, respectively. Both proteins were dominantly expressed in the insoluble form. Only 0.6 mg of purified rAmMRJP1 and lower amount of rAmMRJP2 were obtained from 1 liter culture. Unlike rAcMRJP2, rAmMRJP2 was degraded by proteases of the host cells with prolonged culture period.

Our results indicated successful isolation and *in vitro* expression of AcMRJP1 and AcMRJP2 in the *E. coli* expression system. Relatively high amount of recombinant proteins were obtained from a small scale culture and larger quantity of rAcMRJP1 and rAcMRJP2 can be scaled up using batch or continuous culture systems for further use of these expressed proteins in other applications.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Research Affairs, Chulalongkorn University (Ratchadapiseksomphoch) and the TRF/BIOTEC special program for BRT No. R-645005 that was awarded to S. Sittipraneed. A student grant was supported by the Thai Government Fund for Academic Staff Development Programme of Ministry of University Affairs, Ministry of Education that was awarded to C. Imjongjirak.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REFERENCES

Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzova and Simuth, J. (1999a) The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J. Mol. Evol.* **49**, 290–297.

Albert, S., Klaudiny, J. and Simuth, J. (1999b) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honey bee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 427–434.

Bilikova, K., Klaudiny, J. and Simuth, J. (1999) Characterization of the basic major royal jelly protein MRJP2 of honeybee (*Apis mellifera*) and its preparation by heterologous expression in *E. coli*. *Biologia, Bratislava* **54**, 733–739.

Felsenstein J.(1993) *PHYLIP (Phylogenetic Inference Package)* version 3.5c., Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. and Blanquet, S. (1989) Extent of *N*-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8247–8251.

Jones, G. and Sharp, P. A. (1997) Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13499–13503.

- Judova, J., Klaudiny, J. and Simuth, J. (1998) Preparation of recombinant most abundant MRJP1 of royal jelly. *Biologia, Bratislava* **53**, 777–784.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.
- Klaudiny, J., Hanes, J., Kulifajova, J., Albert, S. and Simuth, J. (1994) Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) for coding related proteins of royal jelly. *J. Apic. Res.* **33**, 105–111.
- Knecht, D. and Kaatz, H.H. (1990) Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie* **21**, 457–468.
- Kubo, T., Sasaki, M., Nakamura, J., Sasagawa, H., Ohashi, K., Takeuchi, H. and Natori, S. (1996) Change in the expression of hypopharyngeal-gland /proteins of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J. Biochem.* **119**, 291–295.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lensky, L. and Rakover, Y. (1983) Separate protein body compartments of worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **75**, 607–615.
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. (1982) *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York, USA.

Malecova, B., Ramser, J., O'Brien, J.K, Janitz, M., Judova, J., Lehrach, H. and Simuth, J. (2003) Honeybee (*Apis mellifera* L.) *mrjp* gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of *mrjp1*, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene* **303**, 165–175.

Mitsuo, R., Sato, M. and Itakura, T. (2001) Cloning, Sequencing and phylogenetic analysis of complementary DNA of novel cytochrome P-450 CYP1A in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Mar. Biotechnol.* **3**, 218–223.

Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda and M., Kurimoto, M. (2003) Major royal jelly protein 3 modulates immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci.* **73**, 2029–2045.

Pothichot, S. and Wongsiri, S. (1993) Attempts in queen rearing of *Apis cerana* larvae in *Apis mellifera* colonies and *Apis mellifera* larvae in *Apis cerana* colonies. *Asian Apic.* 128–133.

Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, S., Schroder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova, J. and Simuth, J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 1020–1030.

Sergaves, W.A. (1991). Something old, some things new: the steroid receptor superfamily in *Drosophila*. *Cell* **67**, 225–228.

Simuth, J. (2001) Some properties of the main protein of honey bee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie* **32**, 69–80.

Smith, D. R. and Hagen, R. H. (1997) The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. *J. Kansas Entomol. Soc.* **64**, 294–310.

Srisuparbh, D., Klinbunga, S., Wongsiri, S. and Sittipraneed, S. (2003) Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 572–579.

Takenaka, T. and Takenaka, Y. (1996) Royal jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 518–520.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight metric choices. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.

Towbin, H., Starhelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table. 1 Primers and primer sequences used for amplification of AcMRJP1 and AcMRJP2 genes

Primer	Sequence (5' – 3')
5M1F	ACATCACTATTCTCATTGCATCAGA
5M1R	TTGTCGATCGCAAGTTTTGTGG
FMRJP	TGCCTYGGYATAGYTTGTCAA
RMRJP	TCAYGGGACTRAGWGCMATTC
mM1F	AAACTGCAGCTAGCAATTCTTCGAGGAGAATC
3M1/2F	TGATTCYTTCCATCGAWTGACTTCC
3M1R	CGAAAACAATATTTATTTTATACATTCA
3mM1F	TCCAAAACCTTTCGATTACGATCCTAA
5M2F	TGAGAATGAATTGCAGAATATGGTCGCT
5M2R	GAAAGCGCTCACGATTCCAGAGCAATC
5mM2R-1	CAGCTTGTCTTCTTTCTTCGCTACCGAA
mM2F	AAACTGCAGCTGCCATTATTCGACAAAATTCTGCAA
3M2R	TAATTTGGTTTATTGATTTTAATGC
3mM2F	ACTTTCGATTACGATCCCAGATATG

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2 GC content and length of exons and introns in AcMRJP1 and AcMRJP2 genes

Exon	Genomic DNA (No. of nucleotides)	GC content (%)	Intron	Genomic DNA (No. of nucleotides)	GC content (%)
AcMRJP1					
1	1–223 (223 bp)	37	1	224–333 (110 bp)	15
2	334–497 (164 bp)	40	2	498–581 (84 bp)	20
3	582–803 (222 bp)	41	3	804–1383 (580 bp)	21
4	1384–1667 (284 bp)	35	4	1668–1997 (330 bp)	20
5	1998–2130 (133 bp)	42	5	2131–2693 (563 bp)	29
6	2694–2969 (276 bp)	34			
AcMRJP2					
1	1–223 (223 bp)	37	1	224–360 (137 bp)	20
2	361–524 (164 bp)	40	2	525–612 (88 bp)	18
3	613–825 (213 bp)	39	3	826–1353 (528 bp)	16
4	1354–1640 (287 bp)	37	4	1641–1815 (175 bp)	20
5	1816–1648 (133 bp)	42	5	1949–2816 (868 bp)	24
6	2817–3188 (372 bp)	28			

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Schematic diagrams of *A. cerana* MRJP1 (A) and MRJP2 (B) cDNA and genes. Complete cDNAs were obtained by RT-PCR whereas genomic DNA fragments of AcMRJP1 and AcMRJP2 were obtained from amplification of overlapping PCR amplification products. Non-coding regions are represented by solid bars. Introns (with numbers) are gray-shaded. Primers used for amplification of genomic AcMRJP1 and AcMRJP2 and corresponding clones are illustrated.

Fig. 2 Organization of AcMRJP1 gene. Coding nucleotides and deduced amino acids of each exon are capitalized. Introns are shaded and illustrated with lower letters. The TATA box and start and stop codons are shaded and bold-italicized. Signal peptide sequence and poly A additional signal site are underlined.

Fig. 3 Organization of AcMRJP2 gene. Coding nucleotides and deduced amino acids of each exon are capitalized. Introns are shaded and illustrated with lower letters. The TATA box and start and stop codons are shaded and bold-italicized. Signal peptide sequence and poly A additional signal site are underlined. Pentameric amino acid repeats are found at the C terminus of this deduced protein.

Fig. 4 Bootstrapped neighbor-joining tree illustrating relationships between different families of AmMRJPs (1 – 5) and AcMRJP1 and AcMRJP2. Values at the node (nucleotides, above and deduced amino acid, below) indicated the percentage of times that the particular node occurred in 1000 trees that were generated by bootstrapping the original nucleotide or deduced protein sequences.

Fig. 5 SDS-PAGE analysis to examine expression of pCUAcMRJP1 (A) and pCUAcMRJP2 (B) under non-induced (lanes 1 – 2, panels A and B) and induced with 0.4 mM IPTG for 1 – 5 hours (lanes 3 – 7, A and B) in the crude extract of *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS. Lanes M are protein standard ladder.

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blot analyses to examine subcellular localization of rAcMRJP1 (A and B) and rAcMRJP2 (C and D) in non-induced (lanes 1) and IPTG- induced (lanes 2) crude extract, soluble (lanes 3) and insoluble (lanes 4) fractions and purified rAcMRJP1 (lanes 5 panels A and B) and rAcMRJP2 (lanes 5, panels C and D) of recombinant *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS clones. Both recombinant proteins are expressed in the insoluble form.

A

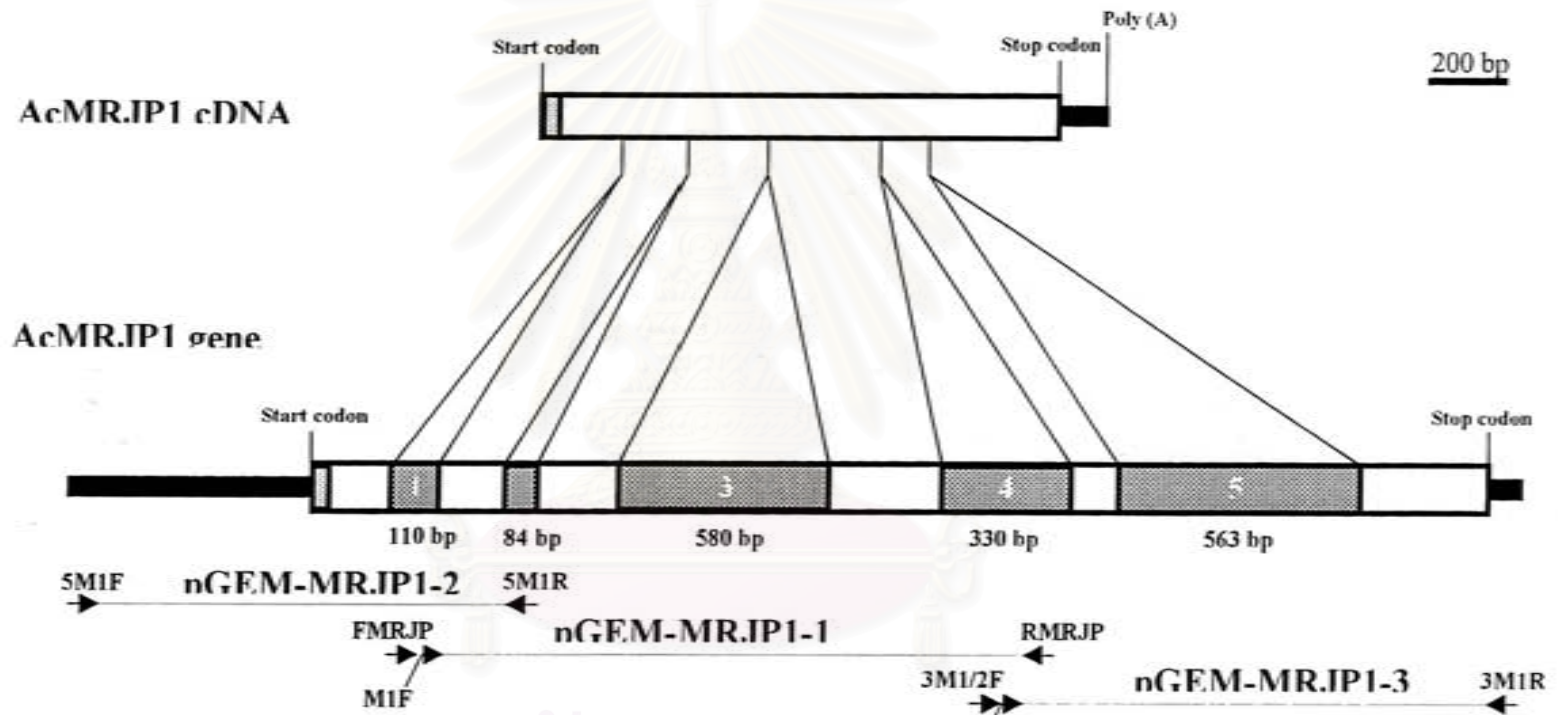


Fig. 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B

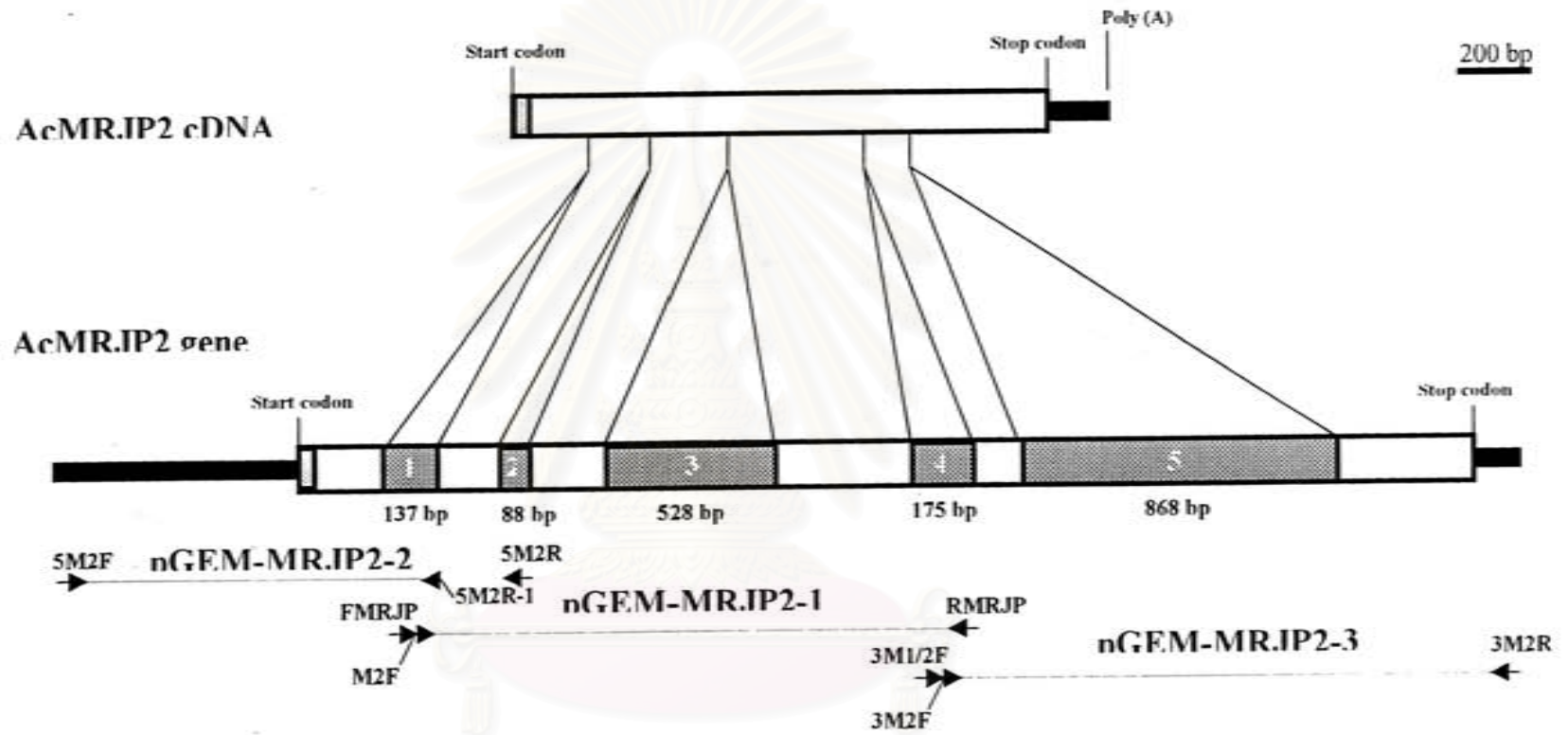


Fig. 1 (cont.)

ACATCACTATTCTCATTGCATCAGACCTGCAAAAAGAAATTGAATTTTTTGGATTTTTGTA
 TCTACATCTTTTTTTAATTGCAATAAATTCCAAATAAATTAATAAACATAATATTTT
 TCAATATAATTATTCTAATTTTTAAAAAATTACACTACATATTTTTTTTTTTTGAATTAA
 TCATTATCTCAATTAACATTTCTCCAGAACTATAGATGAAGCGAGACACAAAAAATAG
 TGTGACATAATAGATAAACAAAATTTGTAAAATTTCTACTCAAACAATATCTTTTTTAGG
 GAATATAAATTATAGACCTGTCACATTCTAATTTCTTACAACATATCTACAAGATAAATA
 AGATAATTTCAAGAATTTCAAAGGAATTTAAAAATACAATTTACTTTATCTCTATAAAGT
 ATACGTCATTACCGCCTATATATTTGACCGATCGTTGGTGAAAATTC AACAGCTCCTGCA
 GTTCACGTACAATATCCATTGCTTCGTTACTCGCAGCCTAGGTAAGTGTCCAAATATCT
 CAATTGTAATACTCCTATACGAAACACCTTATTATTTTTCTGACAAGACGAAATATTTGT
 AGAAAAATGACAAGGTGGTTGTTATGGTGGTATGCCTTGGCATAGTTTGTCAAGGTACG
 M T R W L F M V V C L G I V C Q G T

ACAAGCAGCATTCTTCGAGGAGAATCTTTAAACAAATCATTAAGCGTCCTTCACGAATGG
 T S S I L R G E S L N K S L S V L H E W

AAATCTTTGATTATGATTTTCGATAGCGATGAAAGAAGACAAGATGCAATTCTATCTGGC
 K F F D Y D F D S D E R R Q D A I L S G

GAATACGACTACAGGAAAAATTATCCATCCGACGTTGATCAATGGCATGgtaaattagat
 E Y D Y R K N Y P S D V D Q W H G
 cataaaatattttaatattgcattttacttgtccaaaattcctaatatccaatgattaca
 atttaaaaaatattaaacatttttcatttcttattcaagGTAAGATTTTTTGTACCATGC
 K I F V T M L

TAAGATACAATGGCGTACCTTCCTCTTTGAACGTGATATCTAAAAAGATCGGTGATGGTG
 R Y N G V P S S L N V I S K K I G D G G

GACCTCTTCTTCAACCTTATCCCGATTGGTTCGTTTGCTAAATATGACGATTGCTCTGGAA
 P L L Q P Y P D W S F A K Y D D C S G I

TCGTGAGCGCCACAAAATTGCGgtaattgaacattgtctttatgattatatcttcacaa
 V S A T K L A
 ttaattttccaaagaaaaagaagattcatttgttatgtgatatttagATCGACAAATGCG
 I D K C D

ACAGATTGTGGGTTCTGGACTCAGGTCTTGTCAATAATACTCAACCCATGTGTTCTCCAA
 R L W V L D S G L V N N T Q P M C S P K

AACTGCTCACCTTTGATCTGACTACCTCGCAATTGCTCAAGCAAGTCGAAATACCGCATG
 L L T F D L T T S Q L L K Q V E I P H D

ATGTTGCCGTAAATGCCACCACAGGAAAGGGAAGACTATCATCTCTAGCTGTTCAACCTT
 V A V N A T T G K G R L S S L A V Q P L

TAGATTGCAATATAAATGGTGATACTATGgtgagtttataattataaagtaggcaactta
 D C N I N G D T M
 cttttcttggaaattttcattcactttgtgtatttctagcgatgctaagcgatgaataatt
 catatggaaatataacttaaaattagaaaaagtaatatcgacagaatgataaaatccaaaa
 taataccctcttaaaataattctacctgaaatcttaagacaaagaattagaatgtctctta
 cgttacttctgctcttatataaaaaaaaatgcatcttgtaattttttttgatggtttc
 tttggcaaaaagataaaaaatataaagttctctctctatatatatatgtgatattagact
 ttctcaataaatcgttaatctttgaaactaaaattgaaaaatattagcaaaaatgaatgt
 attttcaatattttttatttaaatatattataattatataattgagagaaaaaaattc
 ttctcaacgcattaggtttataaaaaaaaacatctatgaaagttacaaaatcaaaaa
 aaaaagttgaaatttatcggacaatattattaattacaataaatcataccatgataatg
 atataacagGTATACATAGCAGACGAGAAAGGTGAAGTTTAAATCGTGTATCATGATTCT

Fig. 2

V Y I A D E K G E G L I V Y H D S

GATAATTCTTTCCATCGATTGACTTCCAAAACCTTTTCGATTACGATCCTAAATTTACCAA
D N S F H R L T S K T F D Y D P K F T K

ATGACGATCAATGGAGAAAAGTTTACAACGCAAAGTGGAAATTTCTGGAATGGCTCTTAGT
M T I N G E S F T T Q S G I S G M A L S

CCCATGACTAACAATCTCTATTACAGTCCTGTAGCTTCTACCAGTTTGTATTATGTTAAC
P M T N N L Y Y S P V A S T S L Y Y V N

ACGGAACAATTCAGAACATCCAATTATGAACAAAATGCCGTACATTATGAAGGgtaaata
T E Q F R T S N Y E Q N A V H Y E G
taaaattaagtttacttttaataatgttactatattcagtgaggagaattgattctaaaat
ataacgtttttcaactgtctgaatcgtgattaagataattttaagttttctaatataa
aatattcaaatattgaaacattgttaaatgaaataaggctgaaaatatagaattgtatct
ctgctaacgcaaatttaaattacttacaatttaataaataaaaacttgaaattattataca
acaatatttctatagcttttagaatcgatatcacagatttggttcatttttttagttaa
tccacatttttactgattccagAGTTCAAATATTTTGGATACCCAATCGTCTGCTAAA
V Q N I L D T Q S S A K

GTAGTATCGAAAAGTGGCGTCCTCTTCTTCGGACTGGTGGGCGATTACGCTCTTGGCTGC
V V S K S G V L F F G L V G D S A L G C

TGGAACGAACATCGATCACTTGAAAGACACAATATCgtttagcaactgcaaatgtttttg
W N E H R S L E R H N I
attttggttatattttcgtgtcacattttcttctaccatagttatgactactaagcatg
aacttctcgcagggacaaaacaatccactactagattgacagggaa caagtcacgtgatg
cgaagctgcttgggcccagtgacgtaccctgtgtatgtagtgggataatgtggatatcatt
tcaggttcaggcaggaattgaatataatgtttagtaataaaggaagaaatgtctctacgat
ttatattagtacatcttttctctatatataattaataatattttcgttttcatcttaat
ttttaaaattatgtttatcttcaattatctcttaatggtccaatcgaaatgtcacaatcg
ctatcaattgattagcatttgcacttttctgtaattaataagaaatatttcgatttgatc
gaaattcgataatcgaaactaaaaattatttaatatgaatgcggtttctgtaataagttg
atcatatatatttcttaaaaaaggatataaataaaaaagaaattattttgaaattacagC
R

GTACCGTCGCTCAAAGTGATGAGACACTTCAAATGATCGTTGGCATGAAGATTAAGGAAG
T V A Q S D E T L Q M I V G M K I K E A

CCCTCCACACGTGCCCATATTCGATAGATATATAAACCGTGAATACATATTGGTTTTAA
L P H V P I F D R Y I N R E Y I L V L S

GTAACGAATGCAAAAAATGGCGAATAATGACTATAACTTCAACGATGTAAACTTCAGAA
N R M Q K M A N N D Y N F N D V N F R I

TTATGGACGCTAATGTAAATGACTTGATATTGAACACTCGTTGCGAAAATCCTAATAATG
M D A N V N D L I L N T R C E N P N N D

ATAACACCCTTTCAAATTTCAATACATCTGTAATCTGTTTTTTTCGATATATATTA
N T P F K I S I H L

AATATTGTTTCGAAATTTCTTATGAATGTATTATGAATGTATAAAATAAATATTGTTTTCG

Fig. 2 (cont.)

TCCTTCCATCGAATGACTTCCAACACTTTCGATTACGATCCCAGATATGCCAAAATGACG
 S F H R M T S N T F D Y D P R Y A K M T

ATCAATGGAGAAAGTTTACATTGAAAAATGGAATTTGTGGAATGGCTCTTAGTCCCCTG
 I N G E S F T L K N G I C G M A L S P V

ACGAACAATCTTTATTACAGTCCTCTCGCTTCTCACGGTTTGTATTATGTCAACACGGAA
 T N N L Y Y S P L A S H G L Y Y V N T E

CCATTTATGAAATCACAATTTGGAGACAATAAACGTGCAATATGAAGGgtaaataaa
 P F M K S Q F G D N N N V Q Y E G

aaataatttcttaaattttatgaaatagaataatgttaaataatagttaaataatgttcaatgttctg
 gaaattttttgtaaagtttaattcaagaatagcgtttcaattttatttcttgcacagc
 atcttgcacattcttagtttagttgcttatttcttattaatttcagATCCCAAGATACTTT
 S Q D T L

GAACACGCAATCATTGGCTAAAGCAGTATCGAAAGATGGCGTCCTCTTCGTCGGACTTGT
 N T Q S L A K A V S K D G V L F V G L V

GGGTAATTCAGCTCTTGGATGCTTGAACGAGCATCAACCACTTCAGAGAGAAAATTTAg
 G N S A L G C L N E H Q P L Q R E N L

tagtagttttttattgtgtctctttttcttcacattttttgttatattttcttgggtacat
 ttcttctatcagacgctattatcactataattaaacctgaattttcacatgaaaagtat
 acatcgactgtagatttgacagaaacaggaatcgacgtgatatgatgcaacttgctttg
 ctgtagatcacgtgatataaattatgttagtactagtagtgggataatgtgatgacat
 cctgttctggaattgaggtgtggtatttagtatagatgacgtagtttaagtccttctaga
 tttatgagaaattttcttaaataataataattataattcgtttatttcattattttttc
 ctttaaaaatcttaaatttttaatttaataaaaattttaacggcaacgaaaaacctgaaaag
 tagatatataattaaattttataatagtgccttagtttaattttctgctttttgcttttt
 tctctttaaaaataatcataatattaatcatttctgctttcatttctatcgttttttctt
 ttataaaaatctgttcttttttttaaaagtttatatttaagatctttatcgacaatcgaa
 atataactttgaaatagttagaattattagtttaatttagaaattcttaattaatttagta
 aatgcttcaatttgagttcgagttgatagttgattaaaaattatttgatgtaaacgcaat
 tttctttgtaaacatattgggaacaatttatagtatgttgaaaatacttaattaataatc
 gaatttatgtcaatttatgttctcaaagcaacaatgttttatatgatgaaatataaata
 aaaatgaaactatttcgaaattacagGAACTGGTCGCCCCAAAATGAAAAACACTTCAA
 E L V A Q N E K T L Q M

TGATCGCAGGTATGAAAATTAAGGAAGAGCTTCCACATTTTCGTAGGAAGTAACAAACCTG
 I A G M K I K E E L P H F V G S N K P V

TAAAGGACGAATATATGTTAGTTTTAAGTAACAAAATGCAGAAAATAGTAAATAATGATT
 K D E Y M L V L S N K M Q K I V N N D F

TTAATTTCAACGACGTAAACTTCCGAATTTTGGGTGCGAATGTAAAGGAATTAATGAGAA
 N F N D V N F R I L G A N V K E L M R N

ATACTCATTGCGCAAATTTAACAATAAAAAATAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATA
 T H C A N F N N K N N Q K N N N Q K N N

ACAATCAGAACAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATA
 N Q N N N N Q K N N N Q K N N N Q K N N

ACAATCAGAAGAATAACAATCAGAATACTAACAATTAGAATGATAATCAAGTTCGTCGTT
 N Q K N N N Q N T N N

Fig. 3 (cont.)

TGAGAATGAATTGCAGAATATGGTCGCTAATAATAAGACTTTTCAAATTATTAGTTCTAC
 AATTAAGATTTTCCAATTTAATTCGGTATTTAACTCATCATATGTGAATATATATATAT
 TGATTTTGAATAGAAAATATTACAAAATGTTAAATGGGAATTTAAATCTCGATAACATGA
 ATCCCTAAATTTTGAATGAGAATATAAAAAACATTAACATATAAATTATTTCTATTTTAAAA
 AATTGCTCTTCATATTTTTTTGGAACTAAATATTATCTCTCTTAATAGTTTTTTTGAAC
 TCCGTATGAAGCTAAACACACACGCAAAAATAGAGGTGTGGCAAAGCATTTTTTAGGGAAT
 ATAAATTATAACCCGTCACATTCTAATCCTTTAAGAAATATCTACAAGATAAACGAAAAT
 TTTGAAAATTCAAAAACAATTTACTTTATCTCTGTAAAGTACGTACCATTACCACC~~TA~~
~~TATATT~~GACCAACCGTAGTCAAATCAACAGTTGTACAGTTCACTTACATTCTGCAGT
 ATCCTAAGTAAGTTTCTTGATTATCTTGATTATAATATTTATTTGCAATCTTTCATTAT
 CTGGAAAATGAAATATTTATTTTAGAAAAATGCAAAAGTGGTTGTTTATGGTGGCATGC
 M T K W L F M V A C

CTTGGCATAGCTTGTCAAGGCGCCATTATTTCGACAAAATCTGCAAAAAACTTGGAAAAT
 L G I A C Q G A I I R Q N S A K N L E N

TCGTTGAACGTAATTCACGAATGGAATATATCGATTATGATTTCCGGTAGCGAAGAAAGA
 S L N V I H E W K Y I D Y D F G S E E R

AGACAAGCTGCGATTCAATCTGGCGAATACGATCATAAGAAAATTATCCCTTCGATGTC
 R Q A A I Q S G E Y D H T K N Y P F D V

GATCAATGGCATGgtaaaattttcttatttttaaactattaatagcattttaatcgtcgaa
 D Q W H D
 AcacttaataattcaataattttcatcgctcgtatttcttcatTTTTgaataattaaaaag
 atattccacgTTTTgtatttctgtttaagATAAGACTTTTGTACCATACTAAAGTACG
 K T F V T I L K Y D

ATGGTGTGCCTTCTACTTTGAACATGATATCTAACAAAATCGGTAAGGGTGGACGCCTTC
 G V P S T L N M I S N K I G K G G R L L

TACAACCATATCTGATTGGTCGTGGGCAGAGAATAAAGATTGCTCTGGAATCGTGAGCG
 Q P Y P D W S W A E N K D C S G I V S A

CTTTCAAATTCGCGtaattgaacattttttctatatttatctttaaaattaattttcc
 F K I A
 tcttcatagaaaaagaagattcatttgcgtatgatatttagATTGACAAATTCGACAGA
 I D K F D R

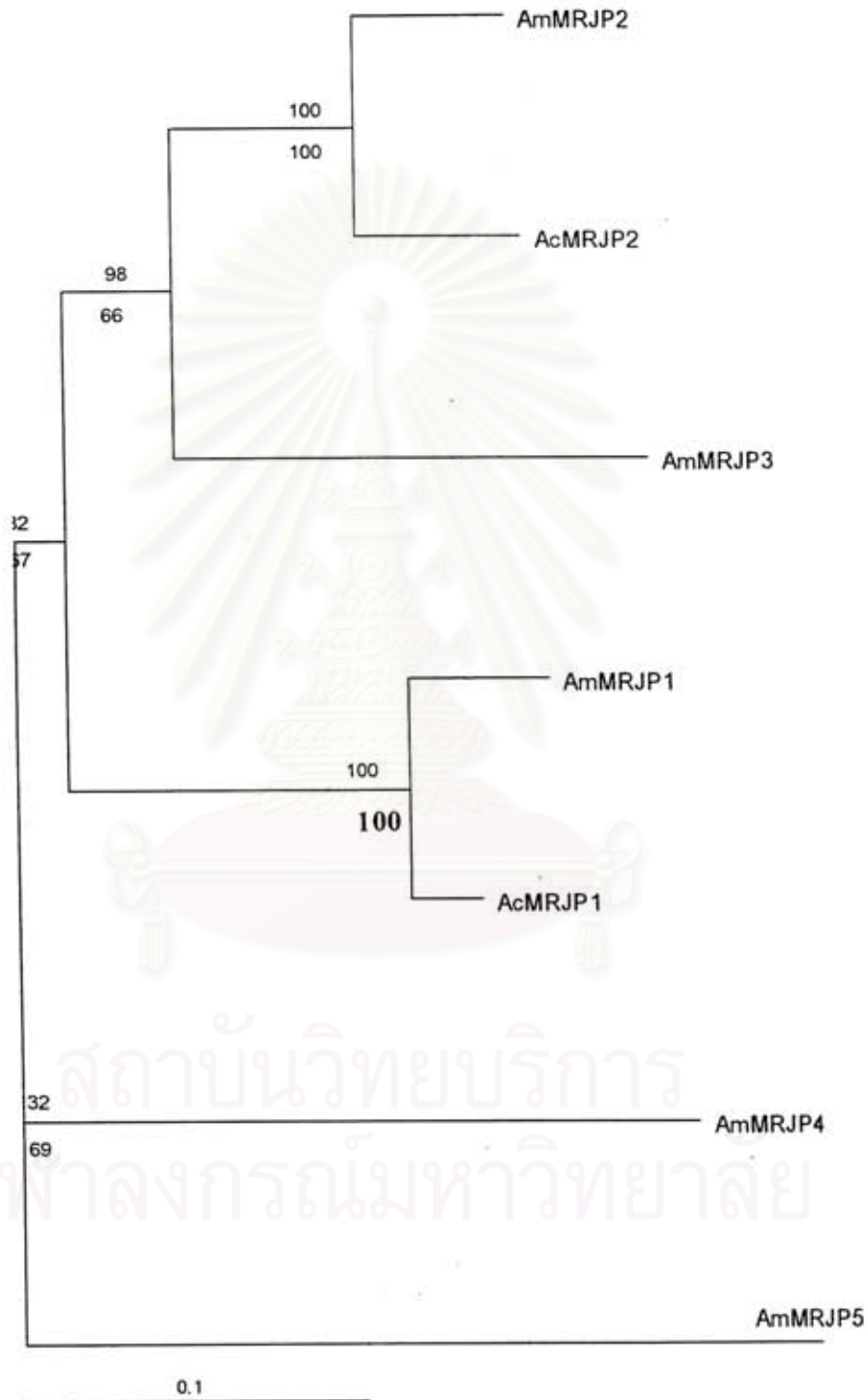
TTGTGGGTTTTGGATTCAAGTCTTATCAATAGAAGTGAACCTATATGTGCTCCAAAGTTG
 L W V L D S G L I N R T E P I C A P K L

CATGTCTTTGATCTGAAAAACACAAAGCACCTTAAGCAAATCGAAATACCGCATGATATT
 H V F D L K N T K H L K Q I E I P H D I

GCCGTAATGCCACCACAGGAAAGGGAGGGCTAGTCTCTCTAGTTGTTCAAGCCATGGAT
 A V N A T T G K G G L V S L V V Q A M D

CCTATGAATACTTTAgTgagtttaaattacattaaaatttaaattagagattaattaga
 P M N T L
 cattgcatatgataaaaaataaaattcataactttcgaatagtaaaatagttaaatttag
 attaaaaattgaaatttacaatatataactaattgtactattttttgtataaaaaaat
 gattttataactttctctgatgttttacttttagaaaaattgatcatattaaattagattt
 tttatcattaaattttataaaatttttaaataactataatttttgatgtttttttattt
 gaattattacttaagcatatttaaatatttataatcaattttattatgatcgagtgagtt
 aattttaaagaacaactgaatgactatttttcaaagctatgtattctagaaaaaaaag
 atctccagaatctgggcaaaattttataaagcatacatttaatgaaagttataaaatcaag
 aaaaatttaaaattttatcgacaataattattatgatatgatataatgattaatcatataa
 tagGTATACATAGCAGACCATAAGGGTGTGCTTTGTATCGTCTATCAAATTCGATGAT
 V Y I A D H K G D A L I V Y Q N S D D

Fig. 3



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

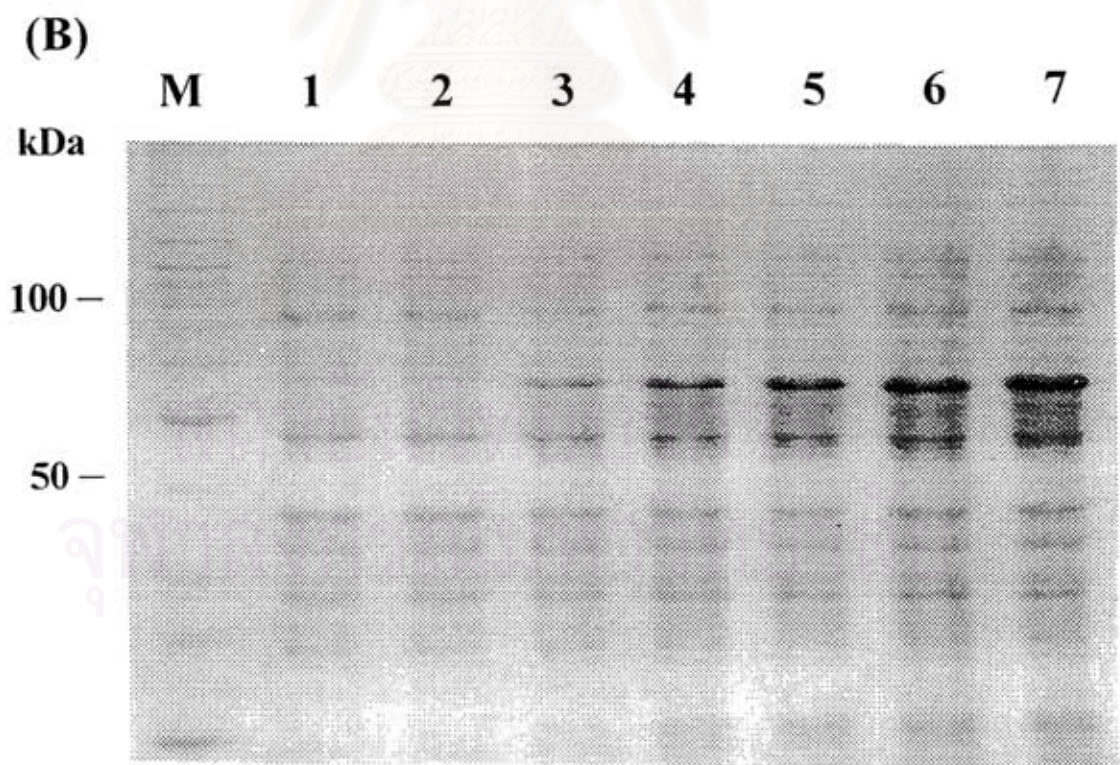
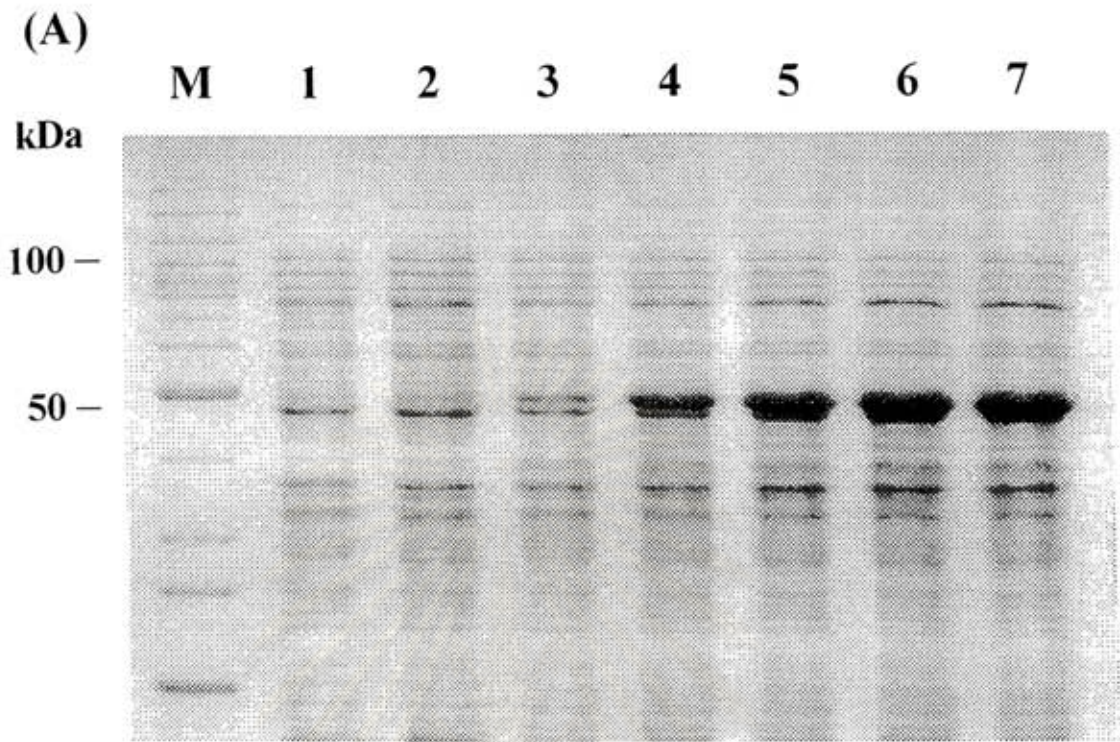


Fig. 5

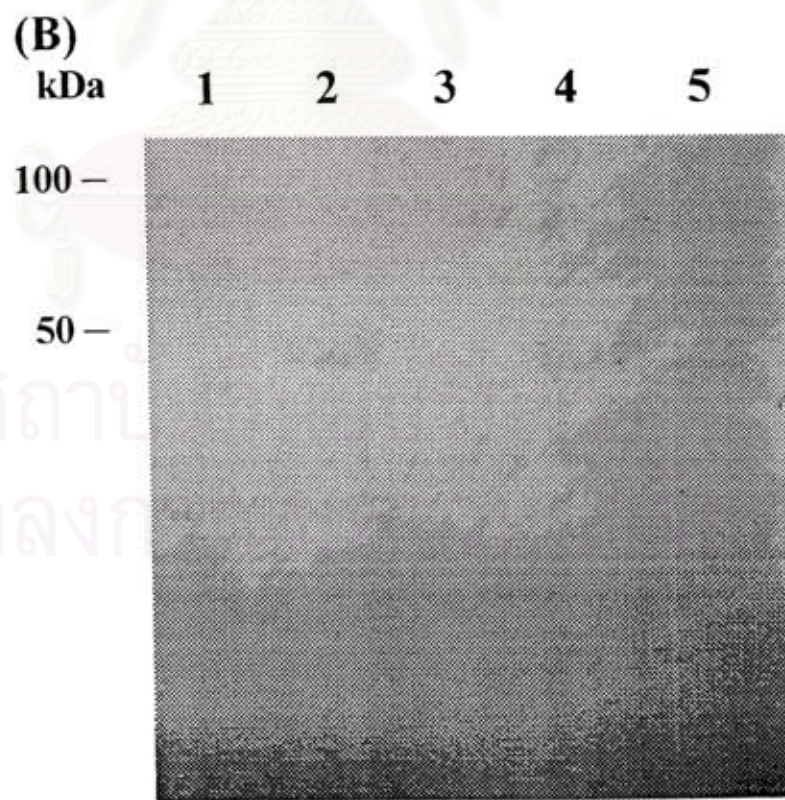
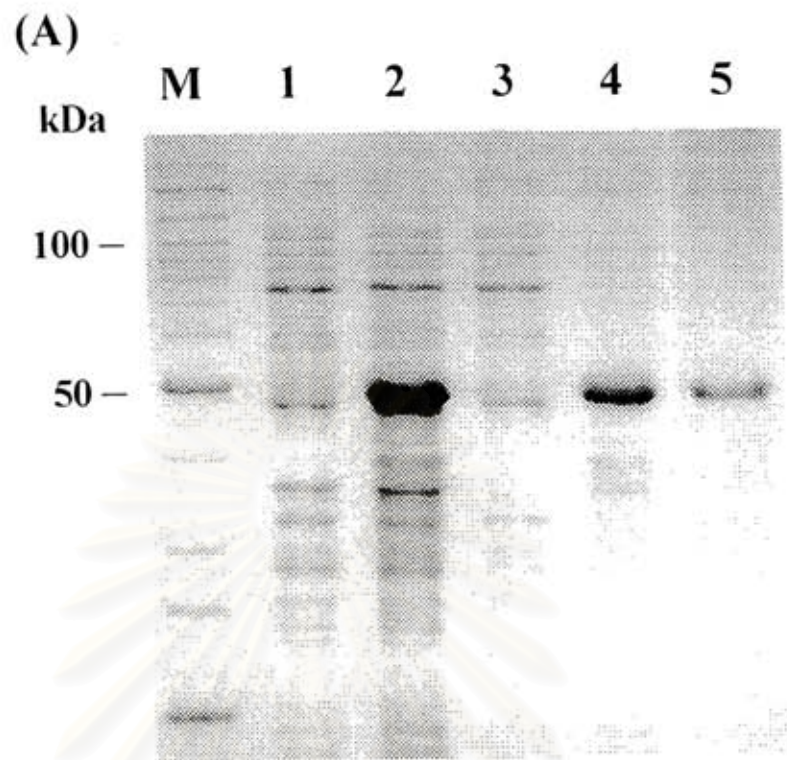


Fig. 6

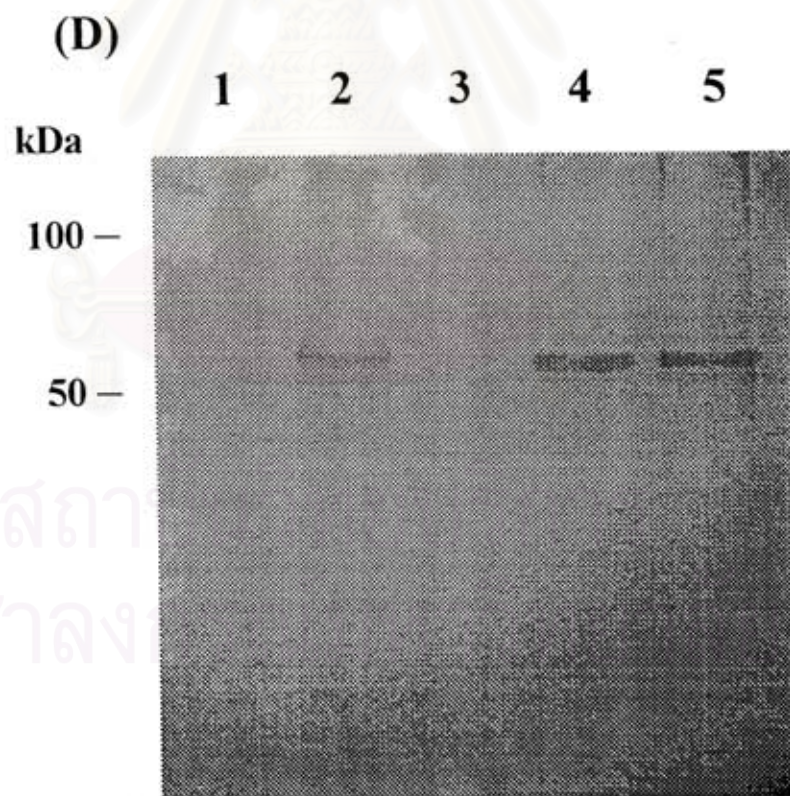
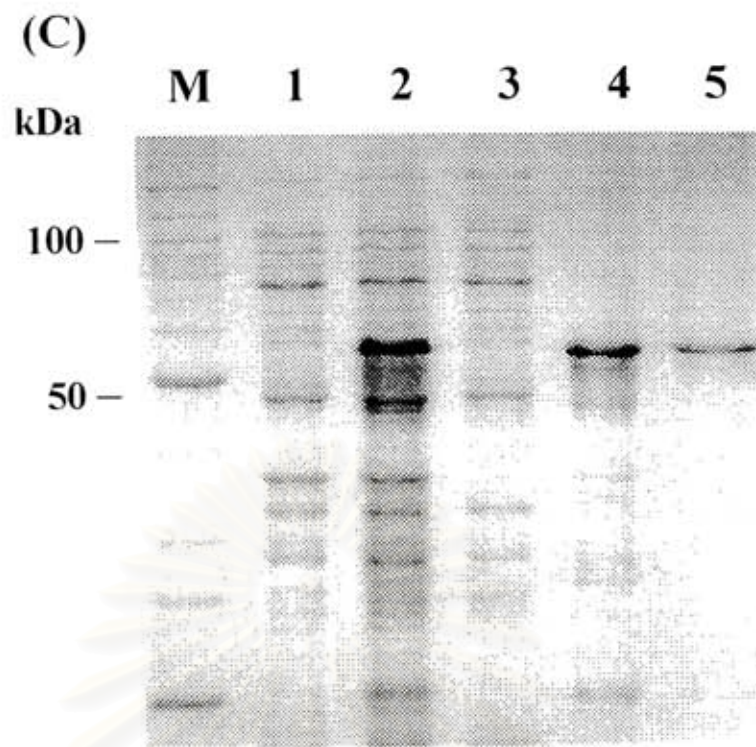


Fig. 6 (cont.)

สรุปการใช้จ่ายเงินโครงการ
การสร้าง *E. coli* ที่สามารถผลิตโปรตีนหลักของเซลล์ของผึ้งด้วยการโคลนดีเอ็นเอ

หมวด	งวดที่ 1 (1 เม.ย. 46 – 15 ต.ค. 46) (บาท)	งวดที่ 2 (15 ต.ค. 46 – 15 เม.ย. 47) (บาท)
1. ค่าจ้างผู้วิจัย	24,000.00	24,000.00
2. ค่าใช้สอย		
ค่าตัวอย่างผึ้ง	3,000.00	-
ค่าเดินทาง	4,000.00	-
ค่าพิมพ์รายงาน	-	1,560.00
ค่าส่ง Fax ไปต่างประเทศ	-	500.00
สำนักงาน	232.00	442.00
วัสดุวิทยาศาสตร์	88,777.44	90,503.38
รวม	<u>120,009.44</u>	<u>117,005.38</u>
จำนวนเงินที่ได้รับอนุมัติ	120,000.00	117,000.00
ยอดเงินคงเหลือ	-9.44	-5.38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงรายละเอียดการใช้เงิน
รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 (ฉบับสมบูรณ์)
ระหว่าง 15 ตุลาคม 2546 – 15 เมษายน 2547

หมวด ค่าจ้างผู้วิจัย

ลำดับ ที่	เลขที่ใบเสร็จ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	หมายเหตุ
1.	ใบสำคัญรับเงิน	15 พ.ย. 46	ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยนิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี (นายพุทธรัตน์ เสงชนะ)	4,000.00	
2.	ใบสำคัญรับเงิน	15 ธ.ค. 46	..	4,000.00	
3.	ใบสำคัญรับเงิน	15 ม.ค. 47	..	4,000.00	
4.	ใบสำคัญรับเงิน	15 ก.พ. 47	..	4,000.00	
5.	ใบสำคัญรับเงิน	15 มี.ค. 47	..	4,000.00	
6.	ใบสำคัญรับเงิน	15 เม.ย.47	..	4,000.00	
รวม				24,000.00	

(สองหมื่นสี่พันบาทถ้วน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงรายละเอียดการใช้จ่ายเงิน
รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 (ฉบับสมบูรณ์)
ระหว่าง 15 ตุลาคม 2546 - 15 เมษายน 2547

หมวด ค่าใช้สอย

ลำดับที่	ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	หมายเหตุ
1.	ใบสำคัญรับเงิน	15/4/47	ค่าพิมพ์รายงาน	1560	นายพุทธรัตน์ เสงชนะ
2.	199577	24/12/46	ค่าส่ง Fax	100	ศูนย์หนังสือจุฬา ฯ
3.	201934	10/3/46	ค่าส่ง Fax	500	ศูนย์หนังสือจุฬา ฯ
รวม				2060	
(สองพันหกสิบล้าน)					

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงรายละเอียดการใช้จ่ายเงิน
รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 (ฉบับสมบูรณ์)
ระหว่าง 15 ตุลาคม 2546 - 15 เมษายน 2547



หมวด ค่าวัสดุ

ลำดับ ที่	เลขที่ใบเสร็จ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	หมายเหตุ
ก.	วัสดุสำนักงาน				
1.	700101	10/10/46	กระดาษปก, เทป	42.00	ร้านสหกรณ์จุฬา ฯ
2.	701129	7/11/46	ค่าถ่ายเอกสาร	24.50	ร้านสหกรณ์จุฬา ฯ
3.	701167	10/11/46	สันปก, แผ่นใสปก	32.00	ร้านสหกรณ์จุฬา ฯ
4.	701541	18/11/46	สันปก, แผ่นใสปก	64.00	ร้านสหกรณ์จุฬา ฯ
5.	995197	16/03/47	ค่าถ่ายเอกสาร	279.50	ร้านสหกรณ์จุฬา ฯ
			รวม	442.00	
ข.	วัสดุวิทยาศาสตร์				
1.	5087	20/12/46	Oligonucleotide synthesis	1,540.80	บ. แปซิฟิก ไซแอนซ์ จำกัด
2.	5089	..	Oligonucleotide synthesis	3,338.40	บ. แปซิฟิก ไซแอนซ์ จำกัด
3.	5098	..	Kanamycin	2,996.00	บ. แปซิฟิก ไซแอนซ์ จำกัด
4.	5099	..	DyNAzyme II DNA polymerase	1,819.00	บ. แปซิฟิก ไซแอนซ์ จำกัด
5.	5598	10/01/47	Sequencing Kit Set	10,272.00	บ. ควอลิเทคอินสตรูเมนต์ จำกัด
6.	4700428	15/01/47	pGEM-Teasy Vector	8,025.00	บ. ไบโอแอกทีฟ จำกัด
7.	4700481	..	Glass plate (For electrophoresis)	4,494.00	บ. ไบโอแอกทีฟ จำกัด
8.	55238	1/02/47	QIAquick Gel Extraction Kit	6,708.90	บ. ชีระเทรคดิง จำกัด
9.	55239	..	QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	9,341.10	บ. ชีระเทรคดิง จำกัด
10.	09056	25/02/47	cDNA polymerase Mix	18,725.00	บ. เคลต้า แล็บบอราตอรี จำกัด
11.	41665	10/03/47	Protein ladder	4,039.25	บ. กิบบไทย จำกัด
12.	IV0311280	22/03/47	Oligonucleotide synthesis	3,552.40	บ. เอส.เอ็ม. เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด
13.	S0P003136/03	9/04/47	[α - ³³ P]dATP	15,651.53	บ. อเมอแซม ไบโอไซส์ (ประเทศไทย) จำกัด
			รวม	90,503.38	

(เก้าหมื่นห้าร้อยสามบาทสามสิบแปดสตางค์)

