การโคลนและการหาลำดับเบสของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสำหรับโปรตีนหลักในรอยัลเจลลี ชนิดที่ 4 และ 5 ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย

นายเขมนันท์ เซ็นภักดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5452-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND SEQUENCING OF cDNA ENCODING MAJOR ROYAL JELLY PROTEIN FAMILY 4 AND 5 OF *Apis cerana* IN THAILAND

Mr. Khemmanun Cenphakdee

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5452-3

Thesis Title	Cloning and sequencing of cDNA encoding major royal jelly protein family 4 and 5 of *Apis cerana* in Thailand
By	Mr. Khemmanun Cenphakdee
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

..... Member

(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เขมนันท์ เซ็นภักดี : การโคลนและการหาลำดับเบสของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสำหรับโปรตีนหลักในรอยัลเจลลีชนิดที่ 4 และ 5 ของผึ้งโพรง *Apis cerana* ในประเทศไทย. (CLONING AND SEQUENCING OF cDNA ENCODING MAJOR ROYAL JELLY PROTEIN FAMILY 4 AND 5 OF *Apis cerana* IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ศิริพร สิทธิประณีต, 132 หน้า, ISBN 974-17-5452-3

รอยัลเจลลีเป็นอาหารที่ผึ้งผลิตเพื่อเลี้ยงตัวอ่อน ในรอยัลเยลลีมีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ 8 ชนิด (MRJP1-8) ในงานวิจัยนี้ได้โคลน cDNA ของโปรตีนหลัก MRJP3, MRJP4, MRJP5 และ MRJP6 จากต่อมใต้คอหอยของผึ้งโพรง (*Apis cerana*) โดยใช้เทคนิค reverse transcription-PCR (RT-PCR) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำไปโคลนและจำแนกโดยใช้การหาแผนที่ยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยสามารถจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ AcMRJP3 และจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ AcMRJP4, AcMRJP5 และ AcMRJP6 ได้ จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ AcMRJP3 เหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AcMRJP3 ที่ถูกรายงานก่อนหน้านี้และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' UTR ของยีนนี้ด้วย จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AcMRJP4 cDNA พบว่าประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาด 1458 คู่เบส ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วย 485 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 52.8 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น 42.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AcMRJP5 cDNA พบว่าประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาด 1740 คู่เบส ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วย 579 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 66.2 กิโลดาลตัน และมีกรดอะมิโนจำเป็นเป็นองค์ประกอบ 51.9 เปอร์เซ็นต์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AcMRJP6 cDNA พบว่าประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาด 1308 คู่เบส ซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วย 435 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 47.4 กิโลดาลตัน และมีกรดอะมิโนจำเป็นเป็นองค์ประกอบ 46.8 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AcMRJP4 , AcMRJP5 และ AcMRJP6 คล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โปรตีนดังกล่าวในผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* 89, 91 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจาก AcMRJP5 cDNA ตรงบริเวณระหว่างกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 367 และ 540 จะมีลำดับซ้ำที่ประประกอบด้วย 3 กรดอะมิโน คือ aspartic acid (D), arginine (R) และ methionine (M) โดยพบชุดซ้ำดังกล่าว 51 ซ้ำ บริเวณซ้ำดังกล่าวพบในตำแหน่งเดียวกันกับที่พบใน MRJP5 ของผึ้งหลวง (*A. dorsata*) และผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) แต่มีจำนวนชุดซ้ำที่แตกต่างกัน เมื่อนำ cDNA ของ MRJP4 มาทำการแสดงออกในเชื้อ *E. coli* พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่มีขนาด 53 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของโปรตีนที่คำนวนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (55.7 กิโลดาลตัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....ชีวเคมี.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....
ปีการศึกษา.....2546.....

ลายมือชื่อนิสิต .....เขมนันท์ เซ็นภักดี.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....—.....

4372221623 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : ROYAL JELLY/ NUCLEOTIDE SEQUENCE/ PCR CLONING/ MRJP/ *Apis cerana*
KHEMMANUN CENPHAKDEE : CLONING AND SEQUENCING OF cDNA ENCODING MAJOR ROYAL JELLY PROTEIN FAMILY 4 AND 5 OF *Apis cerana* IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., 132 pp. ISBN 974-17-5452-3

Royal jelly is the food for bee larvae and plays an essential role in honeybee nutrition. Major protein of royal jelly designated as MRJPs are members of one protein family consisted of 8 closely related proteins (MRJP1-MRJP8). In this study, MRJP3, MRJP4, MRJP5 and MRJP6 were isolated from hypopharyngeal gland of *Apis cerana* nurse bee by Reverse transcription-PCR (RT-PCR). The RT-PCR products were cloned, and then identified by restriction mapping and nucleotide sequencing. The partial nucleotide sequence of AcMRJP3 cDNA and complete nucleotide sequence of AcMRJP4, AcMRJP5 and AcMRJP6 cDNA were identified. Partial sequence of AcMRJP3 cDNA obtained as almost 100% identity in overlap sequence with the sequence of AcMRJP3 cDNA previously report. The nucleotide sequence at 3' untranslated region (3' UTR) of AcMRJP3 gene was obtained in this study. The AcMRJP4 cDNA contained 1458 bp ORF encoding 485 amino acid residues with deduced molecular weight of 52.8 kDa, composed of 42.4 % essential amino acids. The AcMRJP5 cDNA contained 1740 bp ORF encoding 579 amino acid residues with deduced molecular weight of 66.2 kDa , composed of 51.9 % essential amino acids. The AcMRJP6 cDNA contained 1308 bp ORF encoding 435 amino acid residues with deduced molecular weight of 47.4 kDa, composed of 46.8% essential amino acids. Nucleotide sequence of AcMRJP4, AcMRJP5 and AcMRJP6 cDNA showed high homology with those of AmMRJP4 (89%), AmMRJP5 (91%) and AmMRJP6 (92%), respectively. The deduced amino acids of AcMRJP5 showed the extensive repeat region located between amino acid residue position 367 and 540. The repeat unit was dominant in tripeptide DRM that occurred 51 times and located at the same position within *A. dorsata* and *A. mellifera* but differ in repeat unit sizes. The expression of MRJP4 cDNA as performed by using *E. coli* expression approach. The SDS-PAGE analysis revealed protein band of 53 kDa which was similar to the expected molecular weigh of 55.7 kDa estimated from the nucleotide sequence data.

Department .....Biochemistry..... Student's signature..Khemmanun Cenphakdee..
Field of study.....Biochemistry..... Advisor's signature..Siriporn Sittipraneed.
Academic year.....2003..... Co-advisor's signature .....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed for her excellent instruction, guidance, encouragement and supporting through the period of my study.

The special thanks are also extend to Dr. Sirawut Klinbunga for this help in data computerized analysis, discussion and serving as thesis committee.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Dr. Tipaporn Limpaseni and Assistant Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit for serving as thesis committee.

This thesis was supported by Thailand Research Foundation under the programme of Biodiversity Research and Training (BRT) and Rajadha phisake sombhoge.

My cordial thanks also go to all friends of the Biochemistry, Biotechnology and Biology department for their help, assistance and friendship.

Finally, I wish to express my gratitude to my father, brother and my family for their love, encouragement and understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv
ENGLISH ABSTRACT v
ACKNOWLEDGEMENT vi
CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES x
ABBREVIATIONS xii
CHAPTER I INTRODUCTION 1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS 23
2.1 Chemicals 23
2.2 Equipments 24
2.3 Inventory supplies 25
2.4 Enzymes 25
2.5 Primer 26
2.6 Bacterial strains 26
2.7 Plasmids 26
2.8 Sample preparations 26
2.9 Molecular cloning of AcMRJPs cDNA 27
2.9.1 mRNA extraction 28
2.9.2 Synthesis of MRJP cDNA by Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 29
2.9.3 Purification of cDNA product by recovery from agarose gel 32
2.9.4 Ligation of MRJP cDNA to pGEM®-T easy vector 33
2.9.5 Electro-transformation of recombinant DNA into *E. coli* JM109 33
2.9.6 Blue-White colony screening for recombinant plasmid 34
2.9.7 Characterization of the insert DNA of recombinant plasmid 35
2.10 cDNA cloning and expression of AcMRJP4 protein in *E.coli* 41
2.10.1 PCR Amplification 41
2.10.2 Purification of PCR product 41

Page

2.10.3 Recombinant DNA preparation 42
2.10.4 Tranformation to *E. coli* JM109 host 44
2.10.5 Nucleotide sequencing 44
2.10.6 Transformation of recombinant plasmid to expression host 44
2.10.7 Identification of recombinant clones by colony PCR 45
2.10.8 Expression of AcMRJP4 protein in *E.coli* 45
2.10.9 Protein detection by SDS-PAGE 46
CHAPTER III RESULTS 48
3.1 Cloning and characterization of AcMRJPs cDNA 48
3.2 Overexpression of AcMRJP4 protein in *E. coli* 92
CHAPTER IV DISCUSSION 100
CHAPTER V CONCLUSION 109
REFERENCES 111
APPENDICES 116
BIOGRAPHY 132

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1.1 Composition of fresh RJ of *A. cerana indica*, *A. cerana japonica* and *A. mellifera* 6

1.2 Amino acid composition of *Apis mellifera* MRJPs 9

1.3 Molecular characterization of cDNAs and deduced amino acid sequences of AmMRJP 11

2.1 Nucleotide sequence of all primers used in AcMRJP gene amplification and Sequencing 39

3.1 Restriction map of AmMRJP3-AmMRJP6 cDNA in pGEM®-T easy vector digested with restriction enzyme *Ssp*I 54

3.2 Molecular characterization of cDNAs and deduced amino acid sequences of AcMRJP 84

3.3 Amino acid composition of AcMRJPs 85

3.4 Estimated genetic distance among MRJPs families 89

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1.1 Diagram showing the organ systems of an adult female honeybee 3

1.2 Phylogeny of MRJP/YELLOW proteins of *A. mellifera* 22

2.1 Position of primers for AcMRJP cDNA amplification and sequencing 40

3.1 PCR amplification for full length cDNA of AcMRJP4 49

3.2 PCR amplification for full length cDNA of AcMRJP5 50

3.3 Restriction analysis of recombinant plasmid containing 1,500 bp cDNA insert 55

3.4 Restriction analysis of recombinant plasmid containing 1,600 bp cDNA insert 56

3.5 Restriction analysis of recombinant plasmid containing 1,900 bp cDNA insert 57

3.6 Alignment of the partial nucleotide sequence of recombinant plasmid containing 2,000 bp cDNA insert (2000bpRC) with AcMRJP3 cDNA 58

3.7 Alignment of the partial deduced amino acid sequence of recombinant plasmid containing 2,000 bp cDNA insert (2000bpRC) with AcMRJP3 61

3.8 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AcMRJP4 64

3.9 Alignment of the nucleotide sequence of AcMRJP4 cDNA with AmMRJP4 cDNA published sequence 66

3.10 Alignment of the deduced amino acid sequence of AcMRJP4 cDNA with AmMRJP4 cDNA published sequence 68

3.11 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AcMRJP5 71

3.12 Alignment of the nucleotide sequence of AcMRJP5 cDNA with AmMRJP5 cDNA published sequence 73

3.13 Alignment of the deduced amino acid sequence of AcMRJP5 cDNA with AmMRJP5 cDNA published sequence 76

3.14 Nucleotide and deduced amino acid sequences of AcMRJP6 79

3.15 Alignment of the nucleotide sequence of AcMRJP6 cDNA with AmMRJP6 cDNA published sequence 81

3.16 Alignment of the deduced amino acid sequence of AcMRJP6 cDNA with AmMRJP6 cDNA published sequence 83

3.17 Alignment of deduced amino acid sequence of AcMRJP cDNA 86

Figure Page

3.18 A bootstrapped tree illustrating relationship of MRJPs 90
3.19 A bootstrapped tree illustrating relationship of MRJPs 91
3.20 PCR amplification of AcMRJP4 cDNA without signal sq. for expression 95
3.21 Cloning of pET19b expression vector containing AcMRJP4 cDNA in *E.coli* JM 109 96
3.22 Alignment of the deduced amino acid sequence of AcMRJP4 cDNA transformant number 5 (MRJP405) with deduced amino acid sequence of AcMRJP4 cDNA in pET 19b vector transformant number 1 (Exp401) 97
3.23 Colony PCR for identified cloning to expression host 98
3.24 Protein pattern of crude extract of AcMRJP4 protein producing tranformant vary in induction time 99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

AcMRJP	=	Apis cerana major royal jelly protein
AmMRJP	=	Apis Mellifera major royal jelly protein
A,T,C,G	=	nucleotide containing the bases adenine, thymine, cytosine and guanine, respectively
bp	=	base pair
°C	=	degree celcius
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	=	hydrochloric acid
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
mg	=	milligram
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
ng	=	nanogram
PCR	=	polymerase chain reaction
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
Tris	=	tris(hydroxy methyl)aminomethane
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar
UV	=	ultraviolet
V	=	volt

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย