

องค์ประกอบทางเคมีของนมผึ้งและการค้นหาชิ้นในห้องสมุด cDNA ของต่อมแมนดิบิวลารีในผึ้งโพรง
Apis cerana โดยวิจิธาลำดับเบส

นางสาวน้ำทิพย์ ตรองนิพัทธ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2906-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHEMICAL COMPOSITION OF ROYAL JELLY AND SCREENING OF cDNA LIBRARY OF
MANDIBULAR GLAND OF *Apis cerana* BY DNA SEQUENCING



Miss Namtip Trongnipatt

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

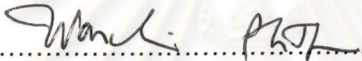
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

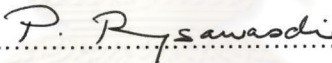
ISBN 974-17-2906-5

Thesis Title	Chemical composition of royal jelly and screening of cDNA library of mandibular gland of <i>Apis cerana</i> by DNA sequencing
By	Miss Namtip Trongnipatt
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Suchada Chuanuwatanakul

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


 Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

 Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

 Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Suchada Chuanuwatanakul)

 Member
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

 Member
(Assistant Professor Vichien Rimpanichayakit, Ph.D.)

น้ำทิพย์ ตรองนิพัทธ์: องค์ประกอบทางเคมีของนมผึ้งและการค้นหาฮีนในห้องสมุด cDNA ของต่อมแมนดิบิวลารีในผึ้งโพรง *Apis cerana* โดยวิธีหาลำดับเบส. (Chemical composition of royal jelly and screening of cDNA library of mandibular gland of *Apis cerana* by DNA sequencing) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ศิริพร สิริทธิประณีต, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. สุชาดา จุจนุวัฒน์กุล. 125 หน้า. ISBN 974-17-2906-5.

นมผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ผึ้งที่หลังจากต่อม hypopharyngeal และต่อม mandibular ของผึ้งงานอายุ 5-15 วัน ทำการผลิตนมผึ้งจากผึ้งโพรง *Apis cerana* สองกลุ่มประชากร คือ กลุ่มภาคเหนือและกลุ่มภาคใต้ในประเทศไทย พบว่าผึ้งโพรงไทยทั้งสองกลุ่มประชากร ผลิตนมผึ้งในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($P = 0.05$) โดยผึ้งกลุ่มภาคเหนือและภาคใต้ผลิตนมผึ้งได้เฉลี่ย 23.6 และ 25.4 มก./ถ้วยเพาะ/วันตามลำดับ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของนมผึ้ง ได้แก่ ปริมาณความชื้น, โปรตีน, ความเป็นกรด, เถ้า, ไขมัน และ 10-HDA พบว่าปริมาณโปรตีน และ ไขมันในนมผึ้งของทั้งสองกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีในนมผึ้งของผึ้งโพรงและผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* พบว่า ปริมาณโปรตีน, ความเป็นกรดและเถ้าของรอยัลเจลลี่จากผึ้งโพรงสูงกว่าในผึ้งพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณความชื้นและ 10-HDA ต่ำกว่าในผึ้งพันธุ์ และต่ำกว่ามาตรฐานของนมผึ้งสำหรับใช้เป็นอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข

การศึกษาในระดับยีนของนมผึ้งทำโดยสร้าง cDNA สายแรกจากต่อมแมนดิบิวลารี แล้วสร้าง cDNA ทั้งสองสายโดยวิธีเพิ่มขยายยีน (PCR amplification) ด้วยไพรเมอร์ arbitrary และไพรเมอร์ oligo (dT) จากนั้นจึงนำไปเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM-T easy และส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E coli* สายพันธุ์ JM109 ได้โคลนจำนวนทั้งหมด 7,829 โคลน ทำการสกัดพลาสมิดจากโคลนจำนวน 3,250 โคลน ขนาดประมาณ 300 ถึง 1,000 bp แล้วคัดเลือกพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นโคลน จำนวน 110 พลาสมิด เมื่อเปรียบเทียบผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ GenBank พบยีนที่มีค่า E value ต่ำกว่า 10^{-4} ทั้งหมด 27 ชนิด และเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นโปรตีน ได้ทั้งสิ้น 17 ชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272498023 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: HONEYBEES / *Apis cerana* / ROYAL JELLY / MANDIBULAR GLAND / CHEMICAL COMPOSITION / cDNA CLONING / SEQUENCING

NAMTIP TRONGNIPATT : CHEMICAL COMPOSITION OF ROYAL JELLY AND SCREENING OF cDNA LIBRARY OF MANDIBULAR GLAND OF *Apis cerana* BY DNA SEQUENCING. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSIS. SUCHADA CHUANUWATANAKUL, 125 pp. ISBN 974-17-2906-5.

Royal jelly is secreted product of nurse bee (5-15 days old) hypopharyngeal and mandibular glands. The honeybees in Thailand, *Apis cerana* from northern and southern populations were used to produce the royal jelly. The average amounts of royal jelly produced by two populations were 23.6 and 25.4 mg/cup/day, respectively. The significant difference between their productions was not found. The harvested royal jelly was analyzed for the chemical composition. The results showed significant differences in protein and lipid compositions between northern and southern *A. cerana*. Comparison with the chemical composition of *A. mellifera*, the protein, acidity and ash contents of *A. cerana* were higher than those in *A. mellifera*. In addition, the contents of moisture and 10-HDA were lower than those of standard composition for dietary grade of commercial royal jelly set by The Ministry of Public Health, Thai Government.

The extracted mRNAs of mandibular glands were used as template for first strand cDNA synthesis and amplified with the arbitrary and oligo (dT) primers. The amplified cDNAs were ligated with pGEM-T easy and transformed into *E. coli* strain JM109. Seven-thousands, eight hundreds and twenty nine cDNA clones were obtained. The extracted plasmid from 3,250 clones showed the inserted size range of approximately 300 to 1,000 bp. One hundred and ten recombinant plasmids were unidirectional sequenced. The nucleotide sequences were compared with the GenBank databases and it was found that there are 23 genes and 17 proteins with the E value less than 10^{-4} .

Department.....Biochemistry..... Student's signature..... *Namtip Trongnipatt*
 Field of study.....Biochemistry..... Advisor's signature..... *Siriporn Sittipraneed*
 Academic year2002..... Co-advisor's signature..... *S. Chuamwatanakul*

ACKNOWLEDGEMENT

Many helps and good gestures from many persons gave me enthusiasm to operate/proceed my thesis. First, I would give my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed for her great suggestions, encouragement, discussion, kindness and patient through my experiment.

All my appreciation is also expressed to my co-advisor, Assis. Prof. Suchada Juanuwattanakul and the thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi, Prof. Dr. Siriwat Wongsiri and Assis. Prof. Dr. Wichien Rimpanichkij.

For the supporter, I would like to thanks Thailand Research Foundation under the programme of Biodiversity Research and Training (BRT) for their financial supports. I also give this special thanks to the office of forest insect, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Mrs. Suporn Junpen and her family, Uncle Dum, Ajarn Pong Prohmjan, Dr. Sureerat Deowanish, Mrs. Rujiporn (Scientific and Technological research equipment centre, Chulalongkorn University), Miss Mananya Phiancharoen, Mr. Boonme Kawinsaeksun and Mr. Surachai Leepitakrat for their helps and sample supports.

I wish to extend my great gratitude to my parents, my brothers, my sisters and my family for their love and understanding.

I would give the special thanks for Mr. Wachira Suktawoncharoenphon, Mr. Kittipong Palaor, Miss Kunlaya Somboonwiwat, Miss Premreuthai Suphankul for their advises. I also thank Miss Nareuporn Laothanapaiboon, Miss Preeyada Koywiwattrakul and Miss Jittima Charoenpanich for their good relation.

Finally, I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends both in Biochemistry Department and Biology Department.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xiii
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	23
2.1 Part I Examination of royal jelly composition.....	23
2.1.1 Instruments.....	23
2.1.2 Inventory supplies.....	23
2.1.3 Chemicals.....	24
2.1.4 Identification of sample population.....	25
2.1.5 Production of fresh royal jelly.....	28
2.1.6 Determination of moisture content.....	28
2.1.7 Determination of crude protein content.....	29
2.1.8 Determination of acidity.....	30
2.1.9 Determination of 10-hydroxy- δ -2-decenoic acid.....	31

CONTENTS (continued)

	Page
2.1.10 Determination of ash.....	33
2.1.11 Determination of lipid content.....	34
2.1.12 Statistical Analysis.....	35
2.2 Part II Cloning, screening and sequencing of cDNA of mandibular gland.....	35
2.2.1 Instruments.....	35
2.2.2 Inventory supplies.....	37
2.2.3 Chemicals.....	37
2.2.4 Enzymes.....	39
2.2.5 Primers.....	40
2.2.6 Sample collections.....	40
2.2.7 Preparation of RNase-free solution, glassware and plasticware.....	41
2.2.8 Extraction of mRNA of mandibular gland.....	41
2.2.9 Construction of mandibular gland cDNA.....	43
2.2.10 cDNA cloning and screening.....	50
2.2.11 cDNA sequencing.....	51
CHAPTER III RESULTS.....	55
3.1 Part I: Examination of royal jelly composition.....	55

CONTENTS (continued)

	Page
3.1.1 Identification of the honeybee hive population.....	55
3.1.2 Production of fresh royal jelly sample.....	61
3.1.3 Chemical composition of royal jelly.....	63
3.2 Part II: Cloning, screening and sequencing of cDNA of mandibular gland.....	71
CHAPTER IV DISCUSSION.....	82
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	91
REFERENCES.....	93
APPENDIXES.....	99
BIOGRAPHY.....	125



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LISTS OF TABLES

TABLE	PAGE
1.1 Differences of worker and queen bee <i>Apis mellifera</i> in various aspects	6
1.2 Range of some nutritional composition of fresh royal jelly of <i>Apis mellifera</i>	9
1.3 Amino acid composition of <i>Apis mellifera</i> major royal jelly proteins (MRJPs).....	10
1.4 Amino acid composition ($\mu\text{g}\%$) of pure harvested royal jelly and of commercial royal jelly products.....	11
1.5 Vitamins and minerals contained in royal jelly of <i>Apis mellifera</i>	13
1.6 Organic acids present in royal jelly	15
1.7 Chemical composition of royal jelly produced by <i>Apis mellifera</i> and <i>Apis cerana japonica</i>	20
2.1 Primer sequencing annealing temperatures, concentrations of primers and MgCl_2 used for PCR amplification of <i>A. cerana</i> 12S, 16S, intergenic COI-COII.....	27
2.2 Arbitrary primers and Oligo (dT) primers used in second strand cDNA construction.....	48
2.3 Pair of primers used in the experiment.....	49

LISTS OF TABLES (continued)

TABLE	PAGE
3.1 The production values of royal jelly produced by northern and southern honeybee.....	62
3.2 t-values of royal jelly production by northern and southern honeybees (<i>A. cerana</i>) in Thailand (two tail test).....	63
3.3 The royal jelly moisture content (%) of commercial honeybee (<i>A. mellifera</i>), northern and southern honeybees (<i>A. cerana</i>) in Thailand.....	64
3.4 Total crude protein content (%) of commercial honeybee (<i>A. mellifera</i>), northern and southern honeybees (<i>A. cerana</i>) in Thailand.....	65
3.5 The acidity (ml of 1 N NaOH/ 100g royal jelly) of commercial royal jelly (from <i>A. mellifera</i>), northern and southern honeybees (<i>A. cerana</i>) royal jelly in Thailand.....	66
3.6 Ash (%) of commercial royal jelly (from <i>A. mellifera</i>) and harvested royal jelly (from <i>A. cerana</i>).....	67
3.7 The lipid content (%) of commercial honeybee (<i>A. mellifera</i>), northern and southern honeybees (<i>A. cerana</i>) royal jelly in Thailand.....	68
3.8 Quantities of 10-HDA (%) contained in lipid fraction of commercial (from <i>A. mellifera</i>), northern and southern (from <i>A. cerana</i>) royal jelly.....	69

LISTS OF TABLES (continued)

TABLE	PAGE
3.9 Chemical composition of royal jelly of <i>A. mellifera</i> and <i>A. cerana</i> in Thailand.....	70
3.10 The differences between northern and southern honeybees royal jelly in chemical components (two tails test).....	70
3.11 Comparison of the differences between commercial (from <i>A. mellifera</i>) and harvested (from <i>A. cerana</i>) royal jelly (two tails test).....	71
3.12 Concentration and purity of mRNA from triplicate experiments.....	72
3.13 Genes expressed in mandibular gland (Blastn).....	78
3.14 Protein expressed in mandibular gland (Blastx).....	79
3.15 Functional categories of the deduced proteins.....	80
3.16 The number of clones with complete ORF and incomplete ORF.....	81
3.17 The genes with complete ORF.....	81

LISTS OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1.1 Three types of individuals or castes in the honeybee hive	2
1.2 Age-related task performance by worker bees.....	3
1.3 The hypopharygeal (cephalic) and mandibular glands... ..	5
1.4 The queen cell.....	7
1.5 Caste-specific biosynthesis of mandibular acids in workers.....	18
3.1 High molecular weight DNA extracted from thorax of <i>A. cerana</i> individuals.....	56
3.2 The amplified products of intergenic COI-COII region, lrRNA gene and srRNA of <i>A. cerana</i> individuals.....	57
3.3 The amplified product of srRNA gene digested with <i>DraI</i> restriction endonuclease of <i>A. cerana</i> individuals.....	58
3.4 The amplified product of lrRNA gene digested with <i>DraI</i> restriction endonuclease of <i>A. cerana</i> individuals.....	59
3.5 The amplified product of intergenic COI-COII region digested with <i>DraI</i> restriction endonuclease of <i>A. cerana</i> individuals.....	60
3.6 The mRNA extracted from the mandibular gland of <i>A. cerana</i>	73
3.7 The cDNA-reamplified products by arbitrary and oligo (dT) primers.....	74

LISTS OF FIGURES (continued)

FIGURE	PAGE
3.8 Recombinant plasmid extracted from cDNA clones on 0.8 % agarose gel.....	75
3.9 PCR of fragments inserted in recombinant plasmid using T7 and SP6 primers.....	76



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A, T, C, G	=	nucleotide containing the base adenine, thymine, guanine and cytosine, respectively
bp	=	base pair
BSA	=	N,O-bis (trimethylsilyl acetamide)
°C	=	degree celcius
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CRJ	=	<i>A. cerana</i> royal jelly
DEPC	=	diethyl pyrocarbonate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
ddNTPs	=	dideoxyribonucleotide triphosphates (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
FID	=	flame ionization detector
HCl	=	hydrochloric acid
10-HDA	=	10-hydroxy- δ -2-decenoic acid
HDL	=	high density lipoprotein
kb	=	kilobase
KCl	=	potassium chloride

kg	=	kilogram
mg	=	milligram
MgCl ₂	=	magnesium chloride
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
MRJ	=	<i>A. mellifera</i> royal jelly
MRJP	=	major royal jelly protein
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
mtDNA	=	mitochondrial DNA
N	=	normality
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
nmol	=	nanomole
PCR	=	polymerase chain reaction
psi	=	pounds per square inch
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RJ	=	Royal jelly
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
sec	=	second
snRNP	=	spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein

		particle
TBE	=	Tris-borate buffer
TEMED	=	N, N, N', N'-tetramethylethy lenediamine
TMCS	=	trimethyl chlorosilane
Tris	=	tris (hydroxy methyl) aminomethane
UV	=	ultraviolet
v	=	volume
V	=	volt
w	=	weight
W	=	watt
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย