ลักษณะสมบัติของยีนแอลฟา – กลูโคซิเดสในผึ้งมิ้ม *Apis florea*

นางสาวรัมภาลัย ผดุงศุภไลย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3245-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I22466522

CHARACTERIZATION OF ALPHA – GLUCOSIDASE GENE

IN *Apis florea*

Miss Rumpalai Padoongsupalai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-3245-3

Thesis title	Characterization of alpha – glucosidase gene in *Apis florea*
By	Miss Rumpalai Padoongsupalai
Field of study	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.
Thesis Co – advisor	Assistant Professor Polkit Sangvanich, 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 Manasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

.....Thesis Co - advisor
(Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, Ph.D.)

.....Member
(Ubolsree Leartsakulpanich, Ph.D.)

รัมภาลัย ผดุงศุภไลย: ลักษณะสมบัติของยีนแอลฟา – กลูโคซิเดสในผึ้งมิ้ม *Apis florea*. (CHARACTERIZATION OF ALPHA – GLUCOSIDASE GENE IN *Apis florea*) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช จำนวน 101 หน้า. ISBN 974-14-3245-3

ผึ้งมิ้มเป็นผึ้งพื้นเมืองชนิดหนึ่งของประเทศไทยมีขนาดเล็กและสร้างรังลักษณะเป็นรวงรังชั้นเดียว น้ำผึ้งคือหนึ่งในผลผลิตสำคัญที่ได้จากผึ้ง น้ำผึ้งได้จากการทำงานของแอลฟากลูโคซิเดสหรือเอจี (EC 3.2.1.20) เอจีเป็นเอนไซม์ย่อยพันธะ 1 - 4 แอลฟากลูโคซิดิกของซูโครสในน้ำหวานให้เป็นฟรักโทสและกลูโคสในน้ำผึ้ง เอจีสร้างจากต่อมไฮโปฟาริงค์ซึ่งอยู่ในส่วนหัวของผึ้ง การศึกษาครั้งนี้ได้สกัดอาร์เอ็นเอจากไข่ ส่วนหัวของผึ้งพยาบาลและผึ้งหาอาหาร และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์ที - พีซีอาร์ ผลที่ได้พบการแสดงออกของยีน*เอ*จีสูงสุดในผึ้งหาอาหาร (760.589) และมีการแสดงออกในผึ้งพยาบาล (386.633) แต่ไม่พบการแสดงออกในระยะไข่ (16.082) จากเทคนิคอาร์ที - พีซีอาร์ทำให้ได้ซีดีเอ็นเอของยีนยาวถึง 1,793 คู่เบส การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (568 ตัว) โดยโปรแกรมคลัสทอล ดับบลิวพบว่ามีค่าเหมือนยีนนี้ในผึ้งพันธุ์ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับยีนที่ใกล้เคียงกันในสิ่งมีชีวิตอื่นด้วยโปรแกรมยูพีจีเอ็มเอและเนเบอ - จอยนิ่ง ทำเอจีให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟฟี สกัดเอนไซม์อย่างหยาบจากตัวผึ้งหาอาหาร (500 กรัม) ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (พีเอช 6.3)ได้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ 0.30 ยูนิต/ มิลลิกรัม แล้วตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (0.18 ยูนิต/ มิลลิกรัม) ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่ใช้ประจุประเภทดีอีเออี - เซลลูโลส (0.17 ยูนิต/ มิลลิกรัม) ตามด้วยคอลัมน์เจลฟิลเทรชั่นประเภทซุปเปอร์เด็กซ์ 200 (0.5 และ 2.38 ยูนิต/ มิลลิกรัม) และเซฟฟาเด็กซ์ จี - 150 (1.355 ยูนิต/ มิลลิกรัม) หาค่าแอกทิวิตีของเอจีโดยวิธีของโมโมส นำหลอดที่มีค่าแอกทิวิตีสูงมาแยกด้วยเอสดีเอส - โพลีอะคริลาไมด์เจลและย้อมหาแอกทิวิตีพบแถบสีแดงปรากฏ นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนมาทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วนำไปแยกโดยเอสดีเอส - โพลีอะคริลาไมด์เจลตัดแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 73 กิโลดาลตัน มาตรวจสอบเปปไทด์โดยมัลดิทอฟ เอ็มเอส พบเปปไทด์ 6 ตัว ที่ตรงกับโปรตีนนี้ในผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*; Q17958) ครอบคลุมลำดับกรดอะมิโน 12 เปอร์เซ็นต์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เอจีที่บริสุทธิ์บางส่วน คือพีเอช 5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 40 นาที โดยใช้ความเข้มข้นของซูโครส 80 มิลลิโมลาร์

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....รัมภาลัย ผดุงศุภไลย.....

ปีการศึกษา.....2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....พลกฤษณ์ แสงวณิช.....

4672386823: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORDS: *Apis florea*/ alpha - glucosidase/ purification/ cDNA/ homology
RUMPALAI PADOONGSUPALAI: CHARACTERIZATION OF ALPHA – GLUCOSIDASE GENE IN *Apis florea*. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. CHANPEN CHANCHAO, Ph.D., THESIS CO - ADVISOR: ASST. PROF. POLKIT SANGVANICH, Ph.D. 101 pp. ISBN 974-14-3245-3

Apis florea, dwarf honeybee is one of native species in Thailand. It is small in body size and builds a small nest consisting of a single comb. Honey is one of the important products from honeybee. The honey is mainly produced by the activity of alpha - glucosidase, AG. The AG (E.C.3.2.1.20) is an enzyme that can hydrolyze 1, 4 - linked - alpha - glucosidic bond in sucrose, nectar, to be fructose and glucose, honey. The AG is synthesized in hypopharyngeal glands (HPGs) located in a head of honeybee. Total RNA was isolated from eggs, heads of nurse bees, and heads of forager bees. They were amplified by RT – PCR and the results indicated that the expression of *AG* is highest in forager bees (760.589). In addition, it was highly expressed in nurse bee (386.623) but was not expressed in egg (16.082). The length (1,739 bp) of *AG* cDNA was obtained by RT - PCR. The nucleotide and deduced amino acid (568 amino acids) sequences were aligned by Clustal W program. The result showed the amino acid identity of about 95% to the *AG* in *A. mellifera*. Phylogenetic trees were made by UPGMA and NJ programs. The AG was purified by column chromatography. Forager bees (500 g) in sodium phosphate buffer (pH 6.3) were homogenized to be crude (0.30 u/ mg), precipitated with 95% ammonium sulfate (0.18 u/ mg), and purified by ion exchange chromatography on DEAE - cellulose (0.17 u/ mg) followed by gel filtration on Superdex 200 (0.5 and 2.38 u/ mg) and Sephadex G - 150 (1.355 u/ mg). Protein in fractions containing AG activity, by Momose's method, was separated by SDS - PAGE and renatured. The activity band of AG could be recovered. The partial purified and concentrated AG was separated by SDS - PAGE. The target band (73 kDa) was cut from a polyacrylamide gel and peptide identified by MALDI - TOF MS. The MALDI - TOF peptide mass maps of partially purified AG showed six matching masses of AG in *A. mellifera* (Q17958) with 12% coverage. The optimum condition for AG activity in partial purified enzyme was at pH 5, at temperature of 55°C, and at incubation time of 40 min. The concentration of sucrose at 80 mM was used.

Field of study.....Biotechnology... . Student's signature..Rumpalai Padoongsupalai.....
Academic year.....2005... ..... .Advisor's signature.....Chanpen Chanchao.....
Co - advisor's signature.....Polkit Sangvanich.....

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to express my sincere gratitude and great appreciation to Assistant Professor Dr. Chanpen Chanchao, my advisor, for her kindness, meaningful guidance, invaluable suggestions, and encouragement throughout this study.

My deep appreciation is expressed to Assistant Professor Dr. Polkit Sangvanich, my co - advisor, for his valuable suggestions and comments.

Furthermore, I would like to express my gratitude to Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart, Dr. Ubolsree Leartsakulpanich for serving as thesis committee.

I am particularly indebted to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, Assistant Professor Dr. Patchanee Singh-asa, Assistant Professor Dr. Orawan Sattayalai, Assistant Professor Dr. Jessada Denduangboripant, Ms. Archariya Chaiyarat for laboratory facilities.

I am deeply appreciated to Dr. Dumrongkiet Arthan and Mr. Thakorn Sornwatana at Central Lab for Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University for their advices and useful suggestions.

I would like to thank Ms. Prapaipit Srimawong, Mr. Apichart Karnchanatat and Ms. Narumon Sawasdipuksa for training techniques in a laboratory.

I am greatly thankful to Ms. Orawan Duangpakdee, Ms. Tipwan Sappasat, and members of Bee Research Unit for their field supports and suggestions.

I would like to thank Central Molecular Laboratory, Department of Biology and Research Center for Bioorganic Chemistry Unit, Department of Chemistry for laboratory facilities

I also would like to extend my thanks to members of Central Molecular Laboratory, Department of Biology, members of Protein Unit, Department of Chemistry, and all of my friends in Biotechnology for their help, suggestions, and kind friendship.

I wish to acknowledge Thailand Research Fund, grants# MRG4780007 and RTA4580012, Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkorn University, grants# CEB_M_12_2005 and CEB_P_5_2006 and Graduate School of Chulalongkorn University for financial support.

Finally, I would like to express my infinite appreciation to my family for their unlimited love, encouragement, and continuous support throughout my life.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....xi

LIST OF FIGURES.....xii

ABBREVIATIONS.....xiv

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

CHAPTER II LITERATURE REVIEWS

2.1 Biology of honeybee.....3

2.2 Hypopharyngeal gland.....6

2.3 Honey crop 6

2.4 Royal jelly (Bee milk).....8

2.5 Honey.....9

2.6 Alpha glucosidase 9

CHAPTER III: MATERIALS AND METHODS

3.1 Equipments.....13

3.2 Chemicals.....14

3.3 Beekeeping.....16

3.4 Isolation of total RNA.....17

3.5 Agarose gel electrophoresis

3.5.1 Native agarose gel.....18

Page

3.5.2 Formaldehyde gel.....18

3.6 Primer design.....18

3.7 RT - PCR amplification.....19

3.8 Purification of PCR product

3.8.1 Purification from solution.....20

3.8.2 Purification from gel.....20

3.9 Sequence alignment and phyiogenetic analyses.....20

3.10 Quantitative measurement of nucleotides

3.10.1 RNA.....21

3.10.2 DNA.....21

3.11 Expression profile of AG in life cycle.....21

3.12 Crude extract for SDS - PAGE.....21

3.13 Crude extract for chromatography.....21

3.14 Protein precipitation by ammonium sulfate.....22

3.15 Dialysis.....22

3.16 Chromatography

3.16.1 Anion exchange (DEAE - cellulose).....22

3.16.2 Gel filtration (Superdex 200).....22

3.16.3 Gel filtration (Sephadex G - 150).....22

3.16.4 Cation exchange (CM - cellulose).....22

3.17 Protein assay

3.17.1 Bradford assay.....23

3.17.2 Absorbancy at 280.....23

3.18 Enzyme assay.....23

Page

3.19 Polyacrylamide gel electrophoresis.....23

3.20 Renatured SDS-PAGE.....24

3.21 Coomassie brilliant blue stain (CBB).....24

3.22 Activity stain.....24

3.23 Two - dimensional electrophoresis of honeybee.....24

3.24 Protein detection of 2 - D gel.....25

3.25 Protein digestion.....25

3.26 Optimum conditions for AG activity

3.26.1 Optimum pH.....26

3.26.2 Optimum temperature.....26

3.26.3 Selective concentration of substrate.....26

3.26.4 Optimum incubation time.....26

CHAPTER IV RESULTS

4.1 Expression level of alpha glucosidase *(AG)* in *Apis florea*..... 27

4.2 The cDNA sequence.....29

4.3 Major protein pattern of crude extract.....40

4.4 Ammonium sulfate precipitation.....41

4.5 AG purification

4.5.1 Crude protein with ammonium sulfate precipitation

4.5.1.1 Anion exchange (DEAE - cellulose).....43

4.5.1.2 Gel filtration (Superdex 200).....44

4.5.1.3 Gel filtration (Sephadex G – 150).....47

4.5.1.4 Cation exchange (CM - cellulose).....48

Page

4.5.2 Crude protein without ammonium sulfate precipitation

4.5.2.1 Anion exchange (DEAE - cellulose).....50

4.6 MALDI - TOF peptide mass mapping.....55

4.7 Comparison of amino acid sequence between deduced amino acid sequence from cDNA and amino acid from MALDI – TOF MS.....56

4.8 Two - dimensional electrophoresis.....56

4.9 Optimum conditions for AG.....57

4.9.1 Optimum pH.....58

4.9.2 Optimum temperature.....58

4.9.3 Selective concentration of substrate for partial purified AG.....59

4.9.4 Optimum incubation time of partial purified AG.....59

CHAPTER V DISCUSSIONS.....60

CHAPTER VI CONCLUSIONS.....67

REFERENCES.....69

APPENDICES.....72

BIOGRAPHY.....101

LIST OF TABLES

Page

2.1 Compositions of *A. mellifera* royal jelly.....8

2.2 Ouchterlony double diffusion tests for AG in honeybee organs.....12

4.1 Intensity of amplified product bands from expression profile of *AG*.....28

4.2 Similarity of the *AG* sequence in *A. florea* (1,739 bp) and that in other organisms.....36

4.3 Summary of purification of AG activity from *A. florea*.....52

LIST OF FIGURES

Page

2.1 Distribution of *A. florea*.....4

2.2. Phenotypes of *A. florea* in each caste.....5

2.3 Location of hypopharyngeal glands and honey crop 7

2.4 Hydration reaction of alpha glucosidase.....10

3.1 *A. florea* colony 17

3.2 Location of primers for RT - PCR.....19

4.1 Total RNA extracted from heads of *A. florea* on native agarose gel (A)
and formaldehyde gel (B).....27

4.2 Expression profile of *AG*.....28

4.3 Control experiment by using primers from *EF* and *28S RNA* genes.....29

4.4 RT - PCR product by 3 different pairs of primers.....30

4.5 The multiple alignment of nucleotide sequences of *AG* in *A. florea*
with other organisms.....31

4.6 The multiple alignment of amino acid sequences deduced from
the cDNA sequences of AG in *A. florea* with other organisms.....35

4.7 A phylogenetic tree of AG by UPGMA 38

4.8 A phylogenetic tree of AG by NJ 39

4.9 Pattern of major proteins in crude of head and honey crop.....40

4.10 Specific activity of crude precipitation by various
concentration of ammonium sulfate.....41

4.11 Protein profile of precitate from various concentrations
of ammonium sulfate (AS).....42

4.12 AG on a DEAE cellulose column.....43

Figure **Page**

4.13 AG on a gel filtration (Superdex - 200) column.....44

4.14 AG on a gel filtration (Superdex - 200) column.....45

4.15 CBB staining of SDS - PAGE.....46

4.16 AG on a gel filtration (Sephadex G - 150) column.....47

4.17 SDS - PAGE of positive fractions from Sephadex G - 150.....48

4.18 AG on CM cellulose of unbound peak sample from DEAE 49

4.19 AG on CM cellulose Crude protein 50

4.20 Unprecipitated AG on DEAE cellulose.....51

4.21 CBB staining (A) and activity staining (B) of fractions containing highest activity from DEAE – cellulose and Sephadex G – 150.....53

4.22 Relationship between R_f and log MW of broad range protein MW marker, to estimate MW of AG from Fig. 3.21.....54

4.23 Relationship between R_f and log MW of low MW marker, to estimate MW of Af1, Af2, and Af3 54

4.24 The amino acid sequence of AG in *A. mellifera*.....55

4.25 Comparison of amino acid sequences between deduced amino acid sequence from cDNA and amino acid sequence from MALDI – TOF MS.....56

4.26 Two-D electrophoresis of crude protein (2 mg). 57

4.27 The optimum pH of purified AG in *A. florea* was 5.0.....58

4.28 The optimun temperature of purified AG in *A. florea* was 55°C.....58

4.29 The optimun concentration of purified AG in *A. florea* was 80 mM.....59

4.30 The optimun incubation time of purified AG in *A. florea* was 40 min.....59

LIST OF ABBREVIATION

AG	Alpha glucosidase enzyme
AG	Alpha glucosidase gene
AS	Ammonium sulfate
bp	Base pair
^{o}C	Degree Celsius
Da	Dalton
g	Gram
h	Hour
HPGs	Hypopharyngeal glands
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of Flight
µg	Microgram
µl	Microliter
µM	Micromolar
mg	Milligram
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mim	Minute
M	Molar
MW	Molecular weight
nm	Nanometer
M_r	Nominal mass

1 - D electrophoresis	One - dimensional electrophoresis
2 - D electrophoresis	Two - dimensional electrophoresis
PAGE	Polyacrylamide - gel electrophoresis
R_f	Relative mobility
rpm	Revolutions per minute
RT	Room temperature
s	Second
SDS	Sodium - dedocyl sulfate
SDS - PAGE	Sodium - dedocyl sulfate polyacrylamide - gel electrophoresis
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine
Tris	Tris (hydroxymethyl) - aminoethane
UV	Ultraviolet spectroscopy
u	Unit (s)
V	Volt
W	Watt
w/ v	weight by volume
v/ v	volume by volume