แอกติวิตีของแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสในระยะการเจริญของวรรณะผึ้งงานในผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* Linneaus, 1758

นางสาวทิพย์วรรณ สรรพสัตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1452-1

ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN DEVELOPMENTAL STAGES OF HONEYBEE WORKER *Apis mellifera* Linneaus, 1758

Miss Tipwan Suppasat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-1452-1

Thesis Title	ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN DEVELOPMENTAL STAGES OF HONEYBEE WORKER *Apis mellifera* Linneaus, 1758
By	Miss Tipwan Suppasat
Field of study	Zoology
Thesis Advisor	Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.

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

(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

.....Member

(Ubolsree Leartsakulpanich, Ph.D.)

ทิพย์วรรณ สรรพสัตย์: แอกติวิตีของแอลคาไลน์ฟอสฟาเทสในระยะการเจริญของวรรณะผึ้งงานในผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* Linneaus, 1758 (ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN DEVELOPMENTAL STAGES OF HONEYBEE WORKER *Apis mellifera* Linneaus, 1758) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศ. ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า จำนวนหน้า 114 หน้า. ISBN 974-17-1452-1

การศึกษาแอกติวิตีของแอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (AP) ในผึ้งงานของผึ้งพันธุ์ เริ่มตั้งแต่ไข่อายุ 48 ชั่วโมง จนถึงตัวเต็มวัยที่จะออกจากเซลล์ โดยเก็บตัวอย่างระยะห่างกัน 48 ชั่วโมง ระยะการเก็บตัวอย่างทำโดยการแต้มสีที่รวงรัง จากการศึกษาการแสดงออกของ AP ในเนื้อเยื่อของผึ้งงานโดยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา พบแอกติวิตีสูงที่เนื้อเยื่อปกคลุม เนื้อเยื่อทางเดินอาหาร กล้ามเนื้อ ในเซลล์จะพบมากในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ และพบเป็นอิสระในเซลล์ ทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของลำดับเบสของยีนส์ *AP* ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้ลำดับเบสบางส่วนที่มีความยาว 429 คู่เบส มีเปอร์เซนต์ของความเหมือนของยีนส์ *AP* ในผีเสื้อไหม 39.7% และในแมลงหวี่ (*Aph-4*) 39.2% ตรวจวัดแอกติวิตีที่จำเพาะของสารสกัดอย่างหยาบ จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับสารตั้งต้นพาราไนโตรฟีนอลฟอสเฟต วัดการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร หลังจากทำการทดลองซ้ำจากผึ้ง 3 รัง พบว่าตัวอย่างผึ้งที่มีอายุ 144 ชั่วโมงมีแอกติวิตีที่จำเพาะของ AP สูงสุด ($1.5X10^{-4}$ u/mg) สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 9.5-9.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการทนความร้อนสูง นอกจากนี้ผลจากการย้อมสารสกัดอย่างหยาบด้วยสารตั้งต้น NBT/BCIP โดยใช้ 12% Polyacrylamide gel ที่ไม่ถูกทำให้เสียสภาพพบว่าผลของแอกติวิตีของ AP สอดคล้องกับผลของการไฮโดรไลซิส และพบว่ามวลโมเลกุลของ AP บนเจลที่กล่าวข้างต้นมีค่าประมาณ 150 กิโลดาลตัน การแสดงออกของ AP พบตั้งแต่ในระยะไข่ 48 ชั่วโมง และในระยะตัวหนอนมีการเกิดแอกติวิตีมากที่สุด ในระยะดักแด้มีแอกติวิตีน้อยสุด และแนวโน้มของแอกติวิตีในตัวเต็มวัยจะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญต่างๆ

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4372273223: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORD: Alkaline phosphatase/*A. mellifera*/workers/para-nitrophenol phosphate/NBT/BCIP/specific activity/non-specific *AP*/*AP* gene

TIPWAN SUPPASAT: ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN DEVELOPMENTAL STAGES OF HONEYBEE WORKER *Apis mellifera* Linneaus, 1758. THESIS ADVISOR: SIRIWAT WONGSIRI, Ph. D. THESIS CO-ADVISOR: CHANPEN CHANCHAO, Ph. D. 114 pp. ISBN 974-17-1452-1

Alkaline phosphatase (AP) of *A. mellifera* workers was determined from 48 h egg (1^{st}) to emerging adult (10^{th}). The interval of each stage was 48 h. The sample was marked with painting color. For histochemical study, high activity was in an integument, alimentary, or muscle, etc. Mostly, it was found at membrane and as free AP in cell. Genomic DNA was amplified by designed primers from conserved regions of the *AP* from various organisms. Partial DNA sequence of *AP* at the length of 429 bp was obtained. The sequence shows 39.7% homology to *AP* in *Bombyx mori* and 39.2% homology to *APh-4* gene in *Drosophila melanogaster*. AP activity in crude extract was assayed by hydrolysis of para-nitrophenol phosphate as substrate. Samples were collected from 3 hives. The highest specific activity (1.5×10^{-4} unit/mg) was from the 144 h sample. The optimum conditions were pH at 9.5-9.6, temperature at 50°C. It is also heat tolerant. According to the activity stain on 12% native polyacrylamide gel (native PAGE), the AP activity was positive during the mentioned period at the molecular mass of 150 kDa. An expression of AP by this experiment was begun from egg. The highest AP activity was found in larva while the least AP activity was in pupa. In adult, the AP activity trended to be high again. The fluctuated level of AP activity is possible to be involved in developmental processes.

Department.....Biology.....Student's signature.....Tipwan Suppasat.....

Field of study...Zoology.....Advisor' signature.....Siriwat Wongsiri.....

Academic year.....2002.....Co-advisor's signature.....Chanpen Chanchao.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor and co-advisor, Dr. Siriwat Wongsiri and Dr. Chanpen Chanchao, for their valuable advice, guidance, encouragement, and support throughout this thesis. My gratitude is also extended to Dr. Kumthorn Thirakhupt, Dr. Siriporn Sittipraneed, and Dr. Ubolsree Leartsakulpanich for serving as thesis committee. In addition, my special thank is to Dr. Kingkaew Wattanasermkit, Dr. Patchanee Singh-asa, Dr. Orawan Sattayalai, Dr. Sujinda Malaivijitnon, Dr. Sureerat Deowanish, and staff of Bee Research Unit for laboratory service.

I would like to thank Ms. Sumpan Suwannarat, Ms. Artchariya Chaiyarat, Ms. Yupin Chudthaisong, Mrs. Duangporn Srisuparbh, and Ms. Prapaipit Srimawong for their technical service. Furthermore, I would like to extend my sincere thank to staff and friends of the Biology and Biochemistry Department and Biotechnology Program for their help and warm relationship.

This work was supported by the Graduate school fund of Chulalongkorn University, Ministry of University Affairs (MUA)-CU Thesis Grant, the Asahi Glass Foundation, and Department of Biology.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my family for unlimited love, understanding, and support and to Mr. Nattapot Warrit for article searching, love and encouragement.

CONTENTS

CONTENTS (continued)

LIST OF TABLES

Page

LIST OF FIGURES

Page

LIST OF FIGURES (continued)

LIST OF FIGURES (continued)

LIST OF FIGURES (continued)

LIST OF FIGURES (continued)

LIST OF FIGURES (continued)

LIST OF FIGURES (continued)

ABBREVIATIONS

AP	Alkaline phosphatase
AC	Acid phosphatase
bp	Base pair
^{o}C	Degree celcius
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LM	Light microscope
h	Hour
min	Minute
M	Molar
mM	Millimolar
µM	Micromolar
PCR	Polymerase Chain Reaction
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
pM	Picomolar
µg	Microgram
ng	nanogram
mg	Milligram
µl	Microlitre
ml	Millilitre
nm	Nanometre
rpm	Revolution per minute
RT	Room temperature
Sec	second
SM	Stereomicroscope