

ระดับอาร์เอ็นเอของโปรตีนหลักในนมผึ้งของผึ้งโพรง *Apis cerana*
จากผึ้งงานระยะต่างๆ วิเคราะห์โดย RT-PCR

นางสาวอุไรวรรณ ยิ้มประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-3535-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**QUANTIFICATION OF mRNA LEVELS OF MAJOR ROYAL JELLY
PROTEINS FROM WORKER ASIAN HIVE BEE, *Apis cerana*
AT VARIOUS STAGES USING RT-PCR**

Miss Uraiwan Yimprasert

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

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University


Academic Year 2005

ISBN 974-17-3535-9


481544

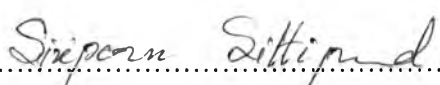
Thesis Title QUANTIFICATION OF mRNA LEVELS OF MAJOR ROYAL
 JELLY PROTEINS FROM WORKER ASIAN HIVE BEE, *Apis*
 cerana AT VARIOUS STAGES USING RT-PCR
By Miss Uraiwan Yimprasert
Field of study Biochemistry
Thesis Advisor Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.


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


 Deputy Dean for Administrative Affairs,
.....Acting Dean, The Faculty of Science
(Associate Professor Tharapong Vitidsant, Ph.D.)

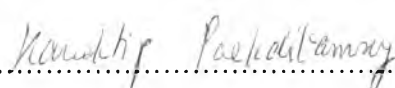
THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

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

.....Member
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

.....Member
(Sirawut Klinbunga, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

อุไรวรรณ ยิ้มประเสริฐ: ระดับอาร์เอ็นเอของโปรตีนหลักในนมผึ้งของผึ้งโพรง *Apis cerana* จากผึ้งงานระยะต่างๆ วิเคราะห์โดย RT-PCR. (QUANTIFICATION OF mRNA LEVELS OF MAJOR ROYAL JELLY PROTEINS FROM WORKER ASIAN HIVE BEE, *Apis cerana* AT VARIOUS STAGES USING RT-PCR) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ศิริพร สิริทิประณีต, 143 หน้า. ISBN 974-17-3535-9

ได้ใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR วัดระดับ mRNA ของโปรตีนหลักในนมผึ้งทั้ง 6 ชนิด และ Apisimin จากต่อมได้คอกของผึ้งโพรง *Apis cerana* ของผึ้งงานระยะต่างๆ 4 ระยะ ได้แก่ ผึ้งที่เพิ่งเกิดภายใน 24 ชั่วโมง ผึ้งพยาบาลอายุ 5-10 วัน ผึ้งพยาบาลอายุ 11-15 วัน และผึ้งหาอาหาร ผลการทดลองแสดงว่า ผึ้งที่เพิ่งเกิดภายใน 24 ชั่วโมง ตรวจพบเฉพาะ mRNA ของ Apisimin ซึ่งมีระดับ เท่ากับ 45.1 พิโคกรัมต่อผึ้งหนึ่งตัว ขณะที่ไม่พบ mRNA ของโปรตีนหลักทั้ง 6 ชนิด ส่วนอีก 3 ระยะ ที่เหลือ ตรวจพบทั้ง mRNA ของโปรตีนหลักในนมผึ้งทั้ง 6 ชนิด และ Apisimin ซึ่งผึ้งพยาบาลจะมีระดับ mRNA ของโปรตีนหลักในนมผึ้งชนิดที่ 1 ถึง 5 และ Apisimin มากกว่าผึ้งระยะหาอาหาร ยกเว้น mRNA ของโปรตีนหลักในนมผึ้งชนิดที่ 6 ที่ผึ้งหาอาหารมีระดับ mRNA มากกว่าผึ้งพยาบาล ในผึ้งพยาบาลอายุ 5-10 วัน มีปริมาณ mRNA ของโปรตีนหลักในนมผึ้งชนิดที่ 1 ถึง 6 และ Apisimin เท่ากับ 63.64, 38.17, 3.37, 3.40, 0.85, 0.15 และ 664.55 พิโคกรัมต่อผึ้งหนึ่งตัวตามลำดับ ผึ้งพยาบาลอายุ 11-15 วัน มีค่าเท่ากับ 55.86, 28.21, 2.33, 2.50, 0.96, 0.44 และ 602.0 พิโคกรัมต่อผึ้งหนึ่งตัวตามลำดับ และผึ้งหาอาหาร มีค่าเท่ากับ 3.25, 2.81, 0.09, 0.29, 0.03, 2.62 และ 236.04 พิโคกรัมต่อผึ้งหนึ่งตัวตามลำดับ เมื่อแสดงเป็นอัตราส่วนเปรียบเทียบระดับ mRNA ของโปรตีนชนิดเดียวกันจากผึ้งทั้ง 4 ระยะ คือ ผึ้งที่เพิ่งเกิดภายใน 24 ชั่วโมง : ผึ้งพยาบาลอายุ 5-10 วัน : ผึ้งพยาบาลอายุ 11-15 วัน : ผึ้งหาอาหาร ตามลำดับได้ดังนี้ โปรตีนหลักในนมผึ้งโพรงชนิดที่ 1 เท่ากับ 0 : 19.6 : 17.2 : 1 ชนิดที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0 : 13.6 : 10.0 : 1 ชนิดที่ 3 มีค่า เท่ากับ 0 : 36.7 : 25.4 : 1 ชนิดที่ 4 มีค่าเท่ากับ 0 : 11.7 : 8.6 : 1 ชนิดที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0 : 27.9 : 31.5 : 1 ชนิดที่ 6 มี ค่าเท่ากับ 0 : 1 : 2.8 : 17.1 และ Apisimin มีค่าเท่ากับ 1 : 14.7 : 13.4 : 5.2

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2548.....

4572600023: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: *Apis cerana* / WORKER / HONEYBEES / EMERGED BEE / NURSE BEE / FORAGER BEE / VARIOUS STAGES / SEMIQUANTITATIVE / RT-PCR / QUANTIFICATION / mRNAs LEVEL / MAJOR ROYAL JELLY PROTEINS / MRJPs

URAIWAN YIMPRASERT: QUANTIFICATION OF mRNA LEVELS OF MAJOR ROYAL JELLY PROTEINS FROM WORKER ASIAN HIVE BEE, *Apis cerana* AT VARIOUS STAGES USING RT-PCR. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., 143 pp. ISBN 974-17-3535-9

The semi-quantitative RT-PCR technique was used to examine the mRNA level of Major Royal Jelly Proteins type 1 – 6 (AcMRJP 1-6) and Apisimin in hypopharyngeal gland of *Apis cerana* worker bees at 4 stages as newly emerged bees, 5-10 -day-old nurse bees, 11-15 -day-old nurse bees, and forager bees. In this study, only mRNA level of AcApisimin was detected in newly emerged bees as 45.1 pg per individual bee whereas AcMRJP1-6 mRNA was not found. The mRNA levels of AcMRJPs and AcApisimin were found in the other stages. AcMRJP1-5 and AcApisimin mRNA levels in nurse bees were higher than those in forager bees. On the contrary, AcMRJP6 mRNA level in nurse bees was less than those of in forager bees. In 5-10 -day-old nurse bees, the mRNA levels of AcMRJP1-6 and AcApisimin were 63.64, 38.17, 3.37, 3.40, 0.85, 0.15, and 664.55 pg per individual bees, respectively, whereas in 11-15 -day-old nurse bees the mRNA levels were 55.86, 28.21, 2.33, 2.50, 0.96, 0.44, and 602.0 pg per individual bees, respectively, and forager bees were 3.25, 2.81, 0.09, 0.29, 0.03, 2.62, and 236.04 pg per individual bees, respectively. In addition, the relative ratio of mRNA level in 4 stages of honey bees (newly emerged bees : 5-10 -day-old nurse bees : 11-15 -day-old nurse bees : forager bees, respectively) was 0 : 19.6 : 17.2 : 1 for AcMRJP1, 0 : 13.6 : 10.0 : 1 for AcMRJP2, 0 : 36.7 : 25.4 : 1 for AcMRJP3, 0 : 11.7 : 8.6 : 1 for AcMRJP4, 0 : 27.9 : 31.5 : 1 for AcMRJP5, 0 : 1 : 2.8 : 17.1 for AcMRJP6 and 1 : 14.7 : 13.4 : 5.2 for AcApisimin.

Department..... Biochemistry..

Student's signature.....

Field of study..... Biochemistry..

Advisor's signature.....

Academic year..... 2005.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The thesis would not have been done but all great encouragement and supports. The first person who most inspired this work is Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, my thesis advisor. Deepest appreciation for her excellent guidance and her admirable characteristic, as the model of a good researcher, is expressed here.

Additional great appreciation to Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Professor Dr. Siriwat Wongsiri, Dr. Sirawut Klinbunga, and Assistant Professor Dr. Kanoktip Packdibamrung, for being as the member of my thesis committee and valuable comments.

I also give special thanks to Mr. Puttarat Saechana for helps and sample collection. Sincere thanks to all of my laboratory's members and every other for being such good and caring friends. All of you make the time being in the lab will always be the valuable part in my impression memory.

Now, I would like to devote the final place here to my beloved family for being such a great support and the forever source of love and care to me. You are everything of mine. Thank you of being you.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Colony Members	1
1.2 Honeybees in Thailand	5
1.3 Royal Jelly.....	6
1.4 Expression and Biological Activities of AmMRJPs Genes	25
1.5 Characterization and Regulatory Regions Analysis of AmMRJPs Genes	27
1.6 Characterization of MRJPs in <i>A. cerana</i>	28
1.7 Quantification of mRNA Level	32
1.8 Objective of This Thesis	39
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	41
2.1 Chemicals.....	41
2.2 Equipments	42
2.3 Inventory Supplies	43
2.4 Enzymes	43
2.5 Primers	43
2.6 Sample Preparations	44
2.7 Total RNA Extraction	45
2.8 First Stranded cDNA Synthesis....	47

2.9	Quantification of mRNA Level of AcMRJP and AcApsimin by Using Internal Standard as Endogenous Sequence	48
2.10	Quantification of mRNA Level of AcMRJP and Apsimin Using Internal Standard as Added Exogenous DNA	54
2.11	Quantification of mRNA Level of AcMRJP and AcApsimin Using Internal Standard as Added Exogenous cDNA	60
CHAPTER III	RESULTS.....	65
3.1	Total RNA Extraction	65
3.2	First Stranded cDNA Synthesis	66
3.3	Quantification of mRNA Level of AcMRJPs and AcApsimin by Using Internal Standard as Endogenous Sequence	69
3.4	Quantification of mRNA Level of AcMRJPa and AcApsimin Using Internal Standard as Added Exogenous DNA	76
3.5	Quantification of mRNA Level of AcMRJP and Apsimin Using Internal Standard as Added Exogenous cDNA	78
CHAPTER IV	DISCUSSION.....	110
CHAPTER V	CONCLUSIONS.....	116
REFERENCES	119
APPENDICES	131
Appendix A	132
Appendix B	137
Appendix C	139
BIOGRAPHY	143

LIST OF TABLES

		Page
Table 1.1	Compositions of fresh RJ of <i>A. mellifera</i>	15
Table 1.2	Compositions of fresh RJ of <i>A. cerana indica</i> and <i>A. cerana japonica</i>	16
Table 1.3	Amino acid composition of <i>A. mellifera</i> MRJPs	19
Table 1.4	Molecular characterization of cDNAs and deduced amino acid sequences of AmMRJPs.....	20
Table 3.1	Concentration of extracted total RNA.....	66
Table 3.2	Primer sequences for quantification using 28S rRNA as internal standard.....	73
Table 3.3	Primer sequences for quantification using genomic DNA competitor as internal standard	79
Table 3.4	Primer sequences for quantification using cDNA competitor as internal standard.....	84
Table 3.5	PCR conditions for quantification.....	88
Table 3.6	A summary of digestion pattern of amplification products on various restriction enzymes.....	89
Table 3.7	The transcription levels of AcMRJPs and AcApisimin mRNA	104
Table 3.8	The relative ratio of AcMRJPs mRNA in 5-10 -day-old nurse bees.....	105
Table 3.9	The relative ratio of AcMRJPs mRNA in 11-15 -day-old nurse bees.....	105
Table 3.10	The relative ratio of AcMRJPs mRNA in forager bees	105
Table 3.11	The transcription levels of AcMRJPs and AcApisimin mRNA per individual bees	105

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1.1	Diagram showing the organ systems of an adult female honeybee 7
Figure 1.2	A 3-day-old queen larva floating in royal jelly..... 7
Figure 2.1	The workflow for the quantification of mRNA level 49
Figure 2.2	The workflow for the quantification of mRNA level using endogenous internal standard..... 50
Figure 2.3	The workflow for the quantification of mRNA level using exogenous internal standard as added genomic DNA..... 56
Figure 2.4	The workflow for the quantification of mRNA level using exogenous internal standard as cDNA 61
Figure 2.5	Schematic of preparation procedure for internal standard and target... 64
Figure 3.1	The total RNA extracted from the hypopharyngeal glands 67
Figure 3.2	Determination of synthesized 1 st stranded cDNA concentration 68
Figure 3.3	Optimization of MgCl ₂ concentrations for AcMRJP4..... 70
Figure 3.4	Optimization of primer concentrations for AcMRJP4..... 71
Figure 3.5	PCR product determined from various cycle number for AcMRJP3-6, AcApisimin and 28S ribosomal RNA amplification 74
Figure 3.6	PCR product determined from various cycle number for AcMRJP1-2 and AcApisimin cDNA amplification 75
Figure 3.7	Optimization of annealing temperature 80
Figure 3.8	The result of competitive PCR using genomic DNA competitor. 81
Figure 3.9	The optimization of primer and MgCl ₂ concentration for AcMRJP2 gene amplification..... 85
Figure 3.10	The optimization of primer and MgCl ₂ concentration for AcMRJP5 cDNA amplification 86
Figure 3.11	The optimization of primer and MgCl ₂ concentrations for AcApisimin cDNA amplification 87
Figure 3.12	The restriction analysis of the amplification products from AcMRJP4 cDNA 90
Figure 3.13	AcMRJP4-6 cDNA competitor prepared from PCR. 91

	Page
Figure 3.14 The cDNA target amplified using 1 st cDNA as template and their corresponding competitor.	92
Figure 3.15 Competitor concentration using ethidium bromide intensity comparison.	93
Figure 3.16 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of 5-10 -day-old nurse bees using unsuitable competitor range.	96
Figure 3.17 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of 5-10 -day-old nurse bees at the constant 2 ng of the cDNA target.	97
Figure 3.18 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of 5-10 -day-old nurse bees at the constant 1 ng of the cDNA target.	98
Figure 3.19 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of 11-15 -day-old nurse bees at the constant 1 ng of the cDNA target.	99
Figure 3.20 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of 11-15 -day-old nurse bees at the constant 0.5 ng of the cDNA target.	100
Figure 3.21 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of forage bees at the constant 2 ng of the cDNA target.	101
Figure 3.22 The quantification of AcMRJP1 mRNA level of forage bees at the constant 1 ng of the cDNA target.	102
Figure 3.23 The AcMRJPs mRNA levels at various stages of worker bees.	106
Figure 3.24 The AcMRJP1, AcMRJP2 and AcApisimin mRNA levels at various stages of worker bees.	107
Figure 3.25 The transcription profiles of AcMRJPs mRNA at various stages of worker bees.	108
Figure 3.26 The transcription profiles of AcMRJP1, AcMRJP2 and AcApisimin mRNA at various stages of worker bees.	109

LIST OF ABBREVIATIONS

AcMRJPs	=	<i>Apis cerana</i> major royal jelly proteins
AmMRJPs	=	<i>Apis mellifera</i> major royal jelly proteins
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
MRJPs	=	major royal jelly proteins
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
total RNA	=	total ribonucleic acid
ng	=	nanogram
PCR	=	polymerase chain reaction
pg	=	picogram
RJ	=	royal jelly
SDS	=	sodium dodecyl sulfat
Tris	=	Tris (hydroxy methyl) aminomethane
µg	=	microgram
µl	=	microlitre
µM	=	micromolar