

สัญญาเลขที่ RMU5080008

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

(รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ธันวาคม 2549 - วันที่ 30 พฤศจิกายน 2552)

โครงการ การโคลนนิ่งและการแสดงออกของเเคไคโซนรีเซพเตอร์ยีนและอัลตราสไปราเคิลโปรตีน
ชักนำโดยฮอร์โมนจูวีในเส้นการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

รองศาสตราจารย์ ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(งานวิจัยยังไม่เสร็จสมบูรณ์ โปรดอย่านำไปใช้อ้างอิง)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องหนอนเชื้อไฟนี้ได้ทำต่อเนื่องมาเป็นเวลามากกว่า 10 ปี โดยได้รับการสนับสนุนด้านเครื่องมือพื้นฐานจากกองทุนอิตาลี ประเทศญี่ปุ่น และด้านทุนวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยผู้วิจัยได้รับทุนวิจัยหลังปริญญาเอก 2 ปี (พ.ศ. 2540-2541) ทุนพัฒนานักวิจัย ระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ. 2543-2546) และในงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนพัฒนานักวิจัยจากทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยเป็นระยะเวลา 3 ปี (1 ธันวาคม 2549- 30 พฤศจิกายน 2552) ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้ความสำคัญงานวิจัยของหนอนเชื้อไฟของประเทศไทยซึ่งเป็นงานวิจัยพื้นฐานและเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ให้กับทางด้านวิทยาศาสตร์ของแมลง (Insect Science) ถึงแม้ว่างานวิจัยของหนอนเชื้อไฟอาจจะไม่ได้นำไปสู่การพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีขั้นสูงหรือเห็นผลอย่างรวดเร็วด้านการวิจัยมุ่งเป้าก็ตาม แต่ผู้วิจัยเชื่อว่าองค์ความรู้ใหม่ที่ได้รับจากงานวิจัยหนอนเชื้อไฟจะช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจให้กับศาสตร์ทางด้านสรีรวิทยาของแมลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการให้ความรู้และข้อมูลใหม่ๆ เกี่ยวกับฮอร์โมนและการเข้าสู่โคอะพอสของแมลงโดยใช้หนอนเชื้อไฟเป็นโมเดล และอาจมีประโยชน์สำหรับผู้สนใจจะนำข้อมูลเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้พัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงต่อไป

และท้ายที่สุดผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้บริหารกองทุนและบุคลากรทุกท่านที่ให้โอกาสและมีส่วนเกี่ยวข้องและช่วยส่งเสริมให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้

รศ.ดร.ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

1 ธันวาคม 2552

เอกสารสรุปผลงานตอนที่ 1

การโคลนนิ่งและการแสดงออกของเอกไดโซนรีเซพเตอร์ยีนชักนำโดย
ฮอร์โมนจูวีในระหว่างการเจริญของหนอนเชื้อไฟ

รหัสโครงการ **RMU5080008**

ชื่อโครงการ การโคลนนิ่งและการแสดงออกของเคไโดโซนรีเซพเตอร์ยีนชักนำโดยฮอร์โมนจูวีไนล์
ในระหว่างการพัฒนาของหนอนเยื่อไผ่

ชื่อนักวิจัย รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: scboi020@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 1 ธันวาคม 2549 - 30 พฤศจิกายน 2552

บทคัดย่อ

หนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis*) เป็นระยะตัวหนอนอินสตาร์ที่ 5 ของผีเสื้อกลางคืน เข้าสู่ระยะไคอะพอสในต้นไผ่ตั้งแต่เดือนกันยายนถึงเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป ในระหว่างระยะไคอะพอสพบที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนเคไโดโซนในฮีโมลิฟต์ต่ำและจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสิ้นสุดระยะไคอะพอส การให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue : JHA, methoprene) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส ทำให้ปริมาณฮอร์โมนเคไโดโซนเพิ่มสูงขึ้น พร้อมกับเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ ผลนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ JHA อาจจะไปกระตุ้นต่อมโปรทอแรคติกให้เพิ่มการหลั่งเคไโดโซนในฮีโมลิฟต์ การกระตุ้นและการสิ้นสุดไคอะพอสอาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนจำเพาะในแต่ละเนื้อเยื่อ เคไโดโซนรีเซพเตอร์ยีน (EcR) เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของแมลงซึ่งผ่านกลไกของสองนิวเคลียร์รีเซพเตอร์คือ EcRc และ ultraspiracle protein (USP) เนื่องจาก JHA เพิ่มปริมาณฮอร์โมนเคไโดโซนในฮีโมลิฟต์ของหนอนเยื่อไผ่ให้สูงขึ้น การควบคุมการแสดงออกของเคไโดโซนรีเซพเตอร์ยีนอาจจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ JHA ในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการแยก ecdysone receptor (*OfEcR*) ทั้งสอง isoform คือ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* และศึกษาการแสดงออกของยีนหลังจากให้ฮอร์โมน JHA ผลจากการโคลน *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* ที่ได้ประกอบด้วย A/B, C, D และ E regions พบว่า *OfEcR-A* มีความยาว 2,400 bp ประกอบด้วย 514 กรดอะมิโน และ *OfEcR-B1* มีความยาว 2,407 bp ประกอบด้วย 541 กรดอะมิโน ทั้งสอง isoforms มีความแตกต่างกันในส่วน N-terminal A/B จากข้อมูล database แสดงให้เห็นว่า *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* มีความเหมือนสูงเมื่อเทียบกับ *Chilo suppressalis* EcR (*CsEcR-A and B1*), *Choristoneura fumiferana* EcR (*CfEcR-A and B1*) และ *Bombyx mori* EcR (*BmEcR-A and B1*) ตามลำดับ และมีความเหมือนน้อยเมื่อเทียบกับ *Drosophila melanogaster* EcR (*DmEcR-A and B1*) การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* ในต่อมโปรทอแรคติกในช่วง 0-22 วันหลังจากให้ JHA 0.1 ไมโครกรัม พบว่าการแสดงออกของทั้ง *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA เพิ่มขึ้น หลังจากให้ฮอร์โมน JHA 14 วันและเพิ่มสูงสุดวันที่ 20 การเพิ่มขึ้นสูงสุดของทั้งสองไอโซฟอร์มนี้สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ระดับฮอร์โมนเคไโดโซนเพิ่มขึ้นในฮีโมลิฟต์ จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า JHA กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเคไโดโซนในฮีโมลิฟต์และการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนนี้ชักนำให้การแสดงออกของ EcR mRNAs ในต่อมโปรทอแรคติกเพิ่มขึ้นด้วย

คำหลัก : bamboo borer, *Omphisa*, ecdysone receptor, JHA

Project code **RMU5080008**

Project title Cloning and expression of ecdysone receptor gene induced by juvenile hormone during the development of bamboo borer

Investigator Tippawan Singtripop

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address: scboi020@chiangmai.ac.th

Project period: 1 December 2006- 30 November 2009

Abstract

The bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*, the fifth instars larvae enter diapause in the bamboo stem in September and are in diapause until the following May. During larval diapause, the ecdysteroid titer remains at low levels and increases towards the diapause termination. An application of juvenile hormone analogue (JHA), methoprene, to diapause larvae induces an increase in ecdysteroid titer and eventually pupation. These results indicate that JHA may stimulate the prothoracic glands (PG) to increase ecdysteroid titer in hemolymph. Diapause initiation and termination may involve in changes in expression of specific genes in individual tissues. Ecdysone receptor (EcR) gene is a regulatory specific of insect molting which is mediated via two nuclear receptor superfamily members, ecdysone receptor and its heterodimeric partner, ultraspiracle protein (USP). Since JHA increases ecdysteroid titer in hemolymph of the diapause larvae of the bamboo borer, control of the expression of the ecdysone receptor gene (*EcR*) in the PGs may be involved in the action of JHA. In the present study, we first identified, two isoforms of ecdysone receptor from the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* (*OfEcR*) and examined for their expression levels during the diapause period as well as those after JHA application. We have cloned both *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* encoding the A/B, C, D, and E regions. The *OfEcR-A* mRNA was 2,400 bp in length which encoding 514 amino acids and *OfEcR B1* was 2,407 bp in length which encoding 541 amino acids. Two isoforms differed only in the N-terminal A/B region. A database search revealed that the *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* have high sequence identity with *Chilo suppressalis EcR* (*CsEcR-A and B1*), *Choristoneura fumiferana EcR* (*CfRcR-A and B1*) and *Bombyx mori EcR* (*BmEcR-A and B1*), respectively and lower identity to the *Drosophila melanogaster EcR* (*DmEcR-A and B1*). The expression profile of *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* in the PG during 0-22 day of 0.1 ug JHA application showed that both *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* mRNA expression in the PG increased 14 days after JHA application and peaked at Day 20. These peaks of both isoforms correlated with the time of the increase in the ecdysteroid titer in hemolymph. These results suggest that JHA stimulates the increase in hemolymph ecdysteroids, and then the increased ecdysteroids induce the increase in EcR mRNAs in PG.

Keywords: bamboo borer, *Omphisa*, ecdysone receptor, JHA

บทนำ

หนอนเยื่อไผ่ เป็นระยะตัวหนอน (larva) ของผีเสื้อกลางคืน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Omphisa fuscidentalis* Hampson จัดอยู่ใน อันดับ Lepidoptera วงศ์ Pyralidae จะพบที่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย รู้จักดีในชื่อของรถด่วน ซึ่งเป็นที่นิยมรับประทานในกลุ่มคนพื้นเมืองทั่วไป หนอนเยื่อไผ่จัดอยู่ในกลุ่ม holometabolous ที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) กล่าวคือ มีระยะตัวเต็มวัยไข่ ตัวหนอน และดักแด้ จากการศึกษาการเจริญของหนอนพบว่าระยะการเจริญของหนอนมี 2 ระยะคือระยะการเจริญขึ้นต้น และระยะลาร์วัลไดอะพอส (larval diapause) ระยะการเจริญขึ้นต้นมี 5 อินสตาร์ (instar) (Singtripop *et al.*, 1999) พบในเดือนสิงหาคมหลังจากแม่ผีเสื้อวางไข่ 4-6 วัน หนอนมีขนาดลำตัวและความกว้างของกะโหลกหัว (head capsule) เล็กมาก ส่วนระยะไดอะพอส พบตั้งแต่เดือนกันยายนถึงพฤษภาคม ในระยะนี้ไม่มีความแตกต่างของขนาดลำตัวและความกว้างของ head capsule ไม่มีการกินอาหารและกระบวนการเมตาบอลิซึมต่ำ จากการศึกษาการดำรงชีวิตและลักษณะวงจรชีวิตพบว่าแม่ผีเสื้อจะวางไข่ที่โคนกาบหน่อไผ่ในช่วงประมาณเดือนสิงหาคม เมื่อฟักออกมาเป็นตัวหนอนแล้วจะเคลื่อนย้ายและเจาะรูเข้าไปอาศัยอยู่ในลำต้นของหน่อไผ่ และกัดกินเยื่อไผ่อ่อนซึ่งบออยู่ภายในเป็นอาหารแล้วเจาะทะลุผ่านข้อปล้องไผ่ไผ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนเกือบถึงยอด ในช่วงนี้ตัวหนอนจะมีการเจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อเจริญเต็มที่แล้วจะกลับลงมาอยู่รวมกันที่ปล้องที่ 1 หรือ 2 ถัดจากปล้องล่างที่เคยเจาะรูเอาไว้ในตอนแรก ระยะที่อาศัยอยู่ในลำต้นไผ่เป็นตัวหนอนอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤษภาคม ประมาณ 280-304 วัน จากนั้นเข้าดักแด้ภายในกระบอกไผ่ไผ่ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคมประมาณ 30-40 วัน และออกเป็นตัวเต็มวัยเจริญเป็นผีเสื้อกลางคืนประมาณเดือนสิงหาคม มีอายุประมาณ 15-20 วัน ตัวเต็มวัยของผีเสื้อกลางคืนมีลักษณะคือ ตัวเมียมีสีน้ำตาลส้ม ปีกคู่หน้ามีรอยหยักพาดขวางสีดำเข้ม หนวดเป็นแบบเส้นด้าย (filiform) ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ จะเห็นได้ว่าหนอนเยื่อไผ่มีวงจรชีวิตยาวนานถึง 1 ปี ซึ่งแตกต่างจากแมลงในกลุ่มเดียวกันเป็นอย่างมาก และระยะที่ใช้เวลานานที่สุด คือ ระยะตัวหนอนในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤษภาคมของปีถัดไป เรียกระยะนี้ว่า ระยะไดอะพอส (diapause stage)

จากการศึกษาหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสพบว่ามีความเข้มข้นของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิฟต์ต่ำ (Singtripop *et al.*, 1999) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงระยะไดอะพอสนี้ ต่อมโปรทอแรคซิกถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนเอกไดโซน หนอนจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ นอกจากนี้ Singtripop *et al.* (2000) ได้พบว่าการให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue : JHA, methoprene) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส มีผลทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ แสดงให้เห็นว่า JHA ที่ให้ไปมีผลต่อการทำให้ระยะลาร์วัลไดอะพอสสิ้นสุดลง และจากผลการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าสมองและต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนที่ได้รับ JHA มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาได้ใกล้เคียงกับในระยะดักแด้ จึงเป็นไปได้ว่าอวัยวะเป้าหมายของ JHA อาจเป็นสมองและต่อมโปรทอแรคซิก แต่จากการศึกษาของ Singtripop *et al.* (2000) พบว่าหนอนในระยะไดอะพอสที่ทำการผ่าตัดเอาสมองออกแล้วให้

JHA สามารถเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ได้เช่นเดียวกัน แสดงว่า JHA อาจจะมีผลโดยตรงต่อต่อมโปรทอแรคซิกทำให้ต่อมโปรทอแรคซิกมีกิจกรรมในการหลั่งฮอร์โมน (secretory activity) เพิ่มขึ้น ต่อมาจึงผลิตฮอร์โมนเอกไดโซนมากขึ้น และชักนำให้หนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ได้

Riddiford (1993) กล่าวว่าควบคุมการลอกคราบและการเกิดเมตามอร์ฟอซิสมีความเกี่ยวข้องกันในระดับโมเลกุล อันเนื่องมาจาก EcR (ecdysone receptor) และ JHR (juvenile hormone receptor) โดยอธิบายจากการศึกษาที่ใน *M. sexta* และ *B. mori* เป็นหลัก โดยความเข้มข้นของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิฟม์นำไปสู่การลอกคราบได้เนื่องจากการจับกันของฮอร์โมนเอกไดโซนกับ EcR และ partner protein คือ Ultraspiracle (USP) และ immunophilin (Song *et al.*, 1997) เกิดเป็น ecdysone receptor complex ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ regulatory gene นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระยะต่อไป ในช่วงที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิฟต์ลดลงนั้น พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของไอโซฟอร์มของ EcR ตลอดจน ecdysteroid-induced regulatory factors ต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ในที่สุด

EcR เป็นรีเซพเตอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม nuclear hormone receptor superfamily ประกอบด้วยส่วนต่างๆ 5 ส่วน คือ A/B, C, D, E และ F region พบเป็นครั้งแรกใน แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) มี 3 isoforms คือ EcR-A, EcR-B1 และ EcR-B2 โดยแต่ละ isoform มีความแตกต่างกันบริเวณ A/B region (Kamimura *et al.*, 1997) แต่ในแมลงชนิดอื่นพบว่ามี 2 isoforms คือ EcR-A และ EcR-B1 เช่น ใน *M. sexta* (Jindra *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1995), *G. mellonella* (Jindra and Riddiford, 1996), *B. mori* (Kamimura *et al.*, 1996) และ *C. suppressalis* (Minakuchi *et al.*, 2002)

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงการแสดงออกของ EcR mRNA (EcR mRNA expression) ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของแมลง เพื่อนำมาใช้อธิบายถึงกลไกควบคุมการทำงานในระดับโมเลกุล โดยการศึกษา ใน *M. sexta* แสดงให้เห็นว่า EcR ของ *M. sexta* ที่ homolog กับ EcR ของ *D. melanogaster* มีการแสดงออกในปุ่มปีกและต่อมโปรทอแรคซิกของตัวหนอน รวมถึงเนื้อเยื่อปีกของดักแด้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีแสดงออกของ EcR mRNA มากที่สุดในปุ่มปีกในช่วงตัวหนอนอินสตาร์สุดท้าย 1 วัน หลังจากการเข้าสู่ระยะที่มีการเคลื่อนไหว ในขณะที่การแสดงออกของ EcR mRNA ในต่อมโปรทอแรคซิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของระยะการเคลื่อนไหว และพบว่ามีปริมาณสูงหลังจากช่วงเวลาดังกล่าว นอกจากนี้ในช่วงก่อนเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยมีการแสดงออกสูงสุด (peak) ของ EcR mRNA ปรากฏในเนื้อเยื่อปีกหลังจากที่ตัวหนอนเกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งระดับสูงสุดของทั้งสองเนื้อเยื่อดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซน และ 20-hydroxyecdysone แสดงให้เห็นว่าปริมาณของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิฟต์มีผลต่อการแสดงออกของ EcR mRNA (Fujiwara *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ Gilbert *et al.* (1997) ยังกล่าวว่า 20-hydroxyecdysone มีผลกระตุ้นการทำงานของต่อมโปรทอแรคซิกโดยเพิ่มการแสดงออกของ USP mRNA รวมไปถึงเพิ่มกระบวนการ phosphorylation ของ USP ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ EcR ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมนเอกไดโซนและส่วนประกอบของ ecdysone receptor complex ของต่อมโปรทอแรคซิกมีผลต่อศักยภาพ (potential) ของต่อม

ในการสร้างฮอร์โมนเอกไดโชนและการควบคุมแบบ feedback inhibition อีกด้วย จึงเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเอกไดโชนมีผลต่อการแสดงออกของ EcR mRNA เช่นเดียวกับที่มีการศึกษาถึงการแสดงออกของ EcR mRNA ใน spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) ที่พบว่าการแสดงออกของ EcR mRNA จะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อปรากฏว่ามีปริมาณสูงสุดของฮอร์โมนเอกไดโชนในช่วงที่เกิดการลอกคราบ และมีการแสดงออกของ EcR mRNA ลดลงในช่วงระหว่างการลอกคราบ (intermolt) นอกจากนี้ยังพบว่าในตัวหนอนอินสตาร์ที่ 6 มีการแสดงออกของ EcR mRNA เกิดขึ้นที่อวัยวะที่มีไขมันและส่วนทางเดินอาหาร และยังพบการแสดงออกของ EcR mRNA สูงที่สุดที่เนื้อเยื่อต่างๆ ดังกล่าวเมื่อเข้าสู่ระยะก่อนเข้าดักแด้ซึ่งเป็นระยะที่มีปริมาณของฮอร์โมนเอกไดโชนในฮีโมลิมฟ์สูงสุด (Kothapalli et al., 1995)

สำหรับงานวิจัยในหนอนเยื่อไผ่พบว่าการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอกไดโชนเนื่องมาจากการกระตุ้นโดยฮอร์โมนจูวีไนล์ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว อาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเอกไดโชนรีเซพเตอร์ยีน (Ecdysone receptor gene : *EcR*) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษากลไกของฮอร์โมนจูวีไนล์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของ *EcR* ในต่อมโปรทอแรคซิคของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานถึงลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนใน *EcR* ของหนอนเยื่อไผ่มาก่อน ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงต้องทำการ clone *EcR* ของหนอนเยื่อไผ่ เพื่อหาลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนและรวมทั้งหาความสัมพันธ์ของ *EcR* และ *USP* จากนั้นจะใช้ partial sequence ของลำดับเบสที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างและความสัมพันธ์ของ *EcR* และ *USP* expression ต่อไป

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า ในปัจจุบันงานวิจัยทางด้านหนอนเยื่อไผ่ได้มีความก้าวหน้าไปมากจนถึงระดับโมเลกุล ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะสามารถอธิบายถึงบทบาทของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการสิ้นสุดของระยะไคอะพอสในหนอนเยื่อไผ่ระดับโมเลกุล และจะเสริมข้อมูลทางสรีรวิทยาของงานวิจัยที่ได้ทำสำเร็จมาแล้ว ซึ่งความรู้จากงานวิจัยครั้งนี้ถือว่าเป็นองค์ความรู้ใหม่ในระดับโมเลกุลเพื่อใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของระบบฮอร์โมนได้ชัดเจนยิ่งขึ้น อีกทั้งยังจะนำไปสู่การวิจัยและการค้นคว้าในระดับสูงเพื่อการพัฒนาความรู้ในงานวิจัยสาขาต่อมไร้ท่อวิทยาของแมลงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณลักษณะและรูปแบบ (isoform) ของ ecdysone receptors ของหนอนเยื่อไผ่ โดยการทำ RNA extraction, Cloning และ sequence analysis ได้ศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนกับ ecdysone receptors sequence กับแมลงชนิดอื่นๆ
2. เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนจูวีไนล์ต่อการแสดงออกของ ecdysone receptors gene ของต่อมโปรทอแรคซิคในหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส โดยการทำ RNA extraction, RT-PCR และ ใช้เทคนิค Real time quantitative PCR

วิธีการทดลอง

การโคลนและหาลำดับเบสของเอกไดโซนรีเซพเตอร์ยีน (Ecdysone receptor gene: EcR) เพื่อศึกษาผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR mRNA ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส

ทำการหยด JHA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/5ไมโครลิตรของอะซิโตน/ตัว แก่หนอนระยะไคอะพอส จากนั้นเมื่อหนอนเข้าสู่ระยะ G0 ทำการผ่าตัดเอาผิวหนังและไขมันของหนอนใส่ลงในสารละลาย TRIzol แล้วทำการสกัด RNA จากผิวหนังออกมา เมื่อได้ RNA แล้ว ทำ DNase treatment แล้วสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี reverse transcription เพื่อใช้เป็น template ในการทำ PCR ต่อไป แยก band ที่เกิดจาก PCR นำมาทำ gene clean แล้วจึงนำไป insert ใน plasmid DNA (pZErO™-2) โดยการทำให้ ligated จากนั้นนำ plasmid DNA ดังกล่าวไปทำการ transformation ใน *E. coli* ทำการตรวจหา plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนของ ยีนที่ต้องการ เมื่อตรวจพบแล้วทำการสกัด plasmid DNA เพื่อนำไปทำการหาลำดับเบสของ EcR จากนั้นจึง ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน (gene specific primers) เพื่อทำการ amplify และหาลำดับเบสของ full length EcRs 2 isoforms คือ OfEcR-A และ OfEcR-B1 โดย cDNA ที่ใช้เป็น template สังเคราะห์จาก mRNA โดยใช้วิธี 5'/3'RACE (5'/3' Rapid Amplification cDNA ends) จากนั้นจะทำการศึกษาการแสดงออกของ OfEcR-A และ OfEcR-B1 ใน midgut ของหนอนที่ได้รับและไม่ได้รับ JHA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยในการศึกษาครั้งนี้จะต้องทำการโคลนและหาลำดับเบสของ ribosomal protein L3 gene ซึ่งเป็น house keeping gene เพื่อใช้เป็น internal standard สำหรับการทำให้ RT-PCR

การ โคลน และหาลำดับเบส

1. การเตรียม RNA จากผิวหนังและไขมันของหนอนเยื่อไผ่โดยใช้สารละลาย TRIzol
 - 1.1 homogenize ผิวหนังและไขมันของหนอนเยื่อไผ่ ปริมาณ 25 มิลลิกรัม ในสารละลาย TRIzol 500 ไมโครลิตร ให้ละเอียดที่สุด
 - 1.2 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15~30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที
 - 1.3 เติมน้ำ 0.2 volume ของ CIA แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 15 วินาที
 - 1.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 นาที
 - 1.5 นำสารจากข้อ 1.4 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
 - 1.6 ดูด supernatant แล้วถ่ายลงในหลอดใหม่
 - 1.7 เติมน้ำ isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับ supernatant ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงซ้ำๆ (inverting shake)
 - 1.8 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
 - 1.9 นำสารจากข้อ 1.8 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- 1.10 คือดสารละลาย isopropanol ออก จะได้ตะกอน RNA ที่ก้นหลอด
- 1.11 เติม TRIzol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
- 1.12 เขย่าอย่างแรงแล้ว vortex เป็นเวลา 1 นาที
- 1.13 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำตามวิธีการข้อ 1.3 จนถึงข้อ 1.6 อีกครั้ง
- 1.14 เก็บตัวอย่าง RNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. การทำ DNase treatment

- 2.1 นำสารจากข้อ 1.14 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูด isopropanol ออก แล้วเติม 75% เอทานอล 500 ไมโครลิตร
- 2.2 นำสารจากข้อ 2.1 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด 75% เอทานอลออก
- 2.3 วางไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 2.4 ละลายใน DEPC-treated water ปริมาณ 35 ไมโครลิตร
- 2.5 เติม DNase buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร
- 2.6 เติม DNase I ปริมาณ 1 ไมโครลิตร
- 2.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
- 2.8 เติม DMPC-treated water ปริมาณ 160 ไมโครลิตร
- 2.9 เติม PCI ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงจนเห็นสารละลายมีลักษณะขุ่น
- 2.10 แชนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที
- 2.11 นำสารจากข้อ 2.10 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที แล้วดูด supernatant ออก แล้วถ่ายไปยังหลอดใหม่
- 2.12 ปรับปริมาณที่ได้ให้เป็น 200 ไมโครลิตร โดย DMPC-treated water
- 2.13 เติม CIA ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
- 2.14 แชนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที
- 2.15 นำสารจากข้อ 2.14 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด supernatant ออก ถ่ายลงหลอดใหม่
- 2.16 เติม 0.1 volume ของ 3M NaOAc (pH 5.2) ลงใน supernatant
- 2.17 เติม 2.0 volume ของ 99.5% เอทานอล เขย่าให้เข้ากัน
- 2.18 เก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำ reverse transcription ต่อไป

3. การสังเคราะห์ first strand-cDNA

- 3.1 นำสารจากข้อ 2.18 มาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 นาที

- 3.2 คือดเอาเอธานอลออกแล้วล้างด้วย 75% เอธานอล ปริมาณ 500 ไมโครลิตร
- 3.3 นำสารจากข้อ 3.2 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.4 คือดเอาเอธานอลออกแล้ววางผึ่งไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 15 นาที
- 3.4 ละลายใน DMPC-treated water ปริมาณ 11 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจวัดหาค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA ที่ได้
- 3.6 ใช้ RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม
- 3.7 เติม TMN (oligo dT) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3.8 เติม 5 x RT buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร
- 3.9 เติม 10 mM dNTPs ปริมาณ 2 ไมโครลิตร
- 3.10 เติม Rever Tra Ace ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆดังนี้
 - อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
 - อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 - อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 3.11 เติม TE ปริมาณ 80 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็น template สำหรับ PCR ต่อไป

4. การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

- 4.1 การทำ PCR โดยใช้ cDNA เป็น template และชุด primers ต่างๆ ในการ amplify EcRs ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร

10x buffer	2	ไมโครลิตร
2mM dNTPs	2	ไมโครลิตร
25mM MgSO ₄	0.8	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1	ไมโครลิตร
10 μM reverse primer	1	ไมโครลิตร
template	2	ไมโครลิตร
KOD plus polymerase	0.4	ไมโครลิตร
Milli Q water	11.8	ไมโครลิตร

ขั้นตอนในการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ denaturation step

annealing step และ extension step ซึ่งอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนจะกล่าวโดยละเอียดในขั้นต่อไป

- 4.2 นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR 20 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 2 ไมโครลิตรแล้ว load ลงใน 1.5% agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 200 มิลลิแอมแปร์ โดยใช้เครื่องกำเนิดไฟฟ้า EC 250-90 (electrophoresis power supply)
- 4.3 ย้อมเจลด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิตร เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

5. การทำบริสุทธิ์ DNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยวิธี gene clean

- 5.1 ตัดแถบ band ที่ได้บน agarose gel จากการทำ PCR ใส่ลงในหลอดแล้วชั่งน้ำหนักเจลที่ได้
- 5.2 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- 5.3 เติม NaI ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่วัดได้
- 5.4 ทำให้เจลละลายใน NaI โดยใช้ vortex
- 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ทุกๆ 1 นาทีจนเจลละลายจนหมด
- 5.6 เติม Glass milk ปริมาณ 5 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยพลิกไปมา
- 5.7 แชนบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันโดย vortex ทุกๆ 1 นาที
- 5.8 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที
- 5.9 ดูดเอา supernatant ออก
- 5.10 เติมสารละลาย New wash ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดย vortex
- 5.11 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที
- 5.12 ดูดเอา supernatant ออก
- 5.13 ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 5.10-5.12 อีก 2 ครั้ง
- 5.14 แชนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- 5.15 เติม TE ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต
- 5.16 แชนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 5.17 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที
- 5.18 ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่
- 5.19 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำ ligation ต่อไป

6. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ (Ligation)

- 6.1 ใส่ plasmid DNA ที่ใช้เป็นเวกเตอร์คือ pZErO™-2 ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม) ลงในสารละลายที่ได้จากการทำ gene clean ของ PCR ครั้งที่ 3 ปริมาณ 6 ไมโครลิตร
- 6.2 เติม ligation enzyme ปริมาณ 5 ไมโครลิตร
- 6.3 บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

7. การนำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ (Transformation)

- 7.1 ทำให้ competent cells (*E. coli* TOP10) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ละลายบนน้ำแข็ง
- 7.2 เติมสารละลายที่ได้จากการทำ ligation ลงใน competent cells
- 7.3 แช่ในน้ำแข็งเวลา 45 นาที
- 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (heat shock) เป็นเวลา 1 นาที
- 7.5 แช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว 2 นาที
- 7.6 เติม SOC medium ปริมาณ 800 ไมโครลิตร
- 7.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
- 7.8 แบ่งสารละลายที่ได้จากข้อ 7.7 เป็นสองหลอด หลอดละ 200 และ 800 ไมโครลิตร
- 7.9 นำสารจากข้อ 7.8 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 7.10 ดูด supernatant ออก ให้เหลือหลอดละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปต ละลายตะกอนของที่ก้นหลอดทั้งสอง
- 7.11 ดูดสารละลายที่ได้ แล้วหยดลงบนจานเพาะเลี้ยง LB plate ที่มี kanamycin แล้ว spread ให้เซลล์ กระจายอย่างทั่วถึง
- 7.11 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

8. การตรวจสอบโคโลนีที่ต้องการ

- 8.1 เลือกโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB medium/kanamycin ปริมาณ 300 ไมโครลิตร
- 8.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- 8.3 เติม PCI ปริมาณ 300 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีขุ่น
- 8.4 นำสารจากข้อ 8.3 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูด supernatant ออก ถ่ายไปยังหลอดใหม่
- 8.5 เติม 2M NaOH ปริมาณ 15% ของ supernatant
- 8.6 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- 8.7 เติม 3M NaOAc ปริมาณ 10% ของสารละลายในข้อ 8.6
- 8.8 เติม 99.5% เอทานอล ปริมาณ 2 เท่าของ ปริมาตรสารละลายที่ได้จากข้อ 8.7
- 8.9 บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 8.10 นำสารจากข้อ 8.9 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด supernatant ออก
- 8.11 ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% เอทานอล ปริมาณ 700 ไมโครลิตร
- 8.12 นำสารจากข้อ 8.11 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูด supernatant ออก
- 8.13 ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
- 8.14 ละลายด้วย TE buffer 10 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex
- 8.15 ดูดสารละลายจากข้อ 8.14 มา 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 4 ไมโครลิตร และ loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปิเปตแล้ว load บน 1.2% agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 200 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 35 นาที
- 8.16 นำเจลแช่ในเอซีเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิตร เป็นเวลา 35 นาที
- 8.17 นำมาตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator เพื่อตรวจสอบหา positive cloned

9. การทำ plasmid DNA purification โดยใช้ FlexiPrep Kit

- 9.1 เลือกโคโลนีที่ให้ positive band จากการตรวจสอบมาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดกลางโดยใช้ LB medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 9.2 ถ่ายลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 9.3 นำสารจากข้อ 9.2 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- 9.4 เติม Solution I ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
- 9.5 เติม Solution II ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จนสารละลายเป็นสีใส
- 9.6 เติม Solution III ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายมีลักษณะเหมือนวุ้น
- 9.7 นำสารจากข้อ 9.6 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 9.8 ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่
- 9.9 เติม isopropanol ปริมาณ 7 เท่า ของ supernatant ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex
- 9.10 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 9.11 นำสารจากข้อ 9.10 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 10 นาที

- 9.12 ดูดเอา supernatant ออก
- 9.13 เติม 70% เอทานอล ปริมาณ 200 ไมโครลิตร
- 9.14 นำสารจากข้อ 9.13 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 9.15 ดูดเอา supernatant ออก
- 9.16 วางผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- 9.17 เติม Sephaglas™ FP. ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex เป็นเวลา 1 นาที
- 9.18 นำสารจากข้อ 9.17 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
- 9.19 ดูดเอา supernatant ออก
- 9.20 ล้างด้วย wash buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
- 9.21 นำสารจากข้อ 9.20 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
- 9.22 ดูดเอา supernatant ออก
- 9.23 ล้างด้วย 70% เอทานอล ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex
- 9.24 นำสารจากข้อ 9.23 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
- 9.25 ดูดเอา supernatant ออก
- 9.26 วางผึ่งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
- 9.27 เติม TE buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex
- 9.28 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex ทุกๆ 2 นาที
- 9.29 นำสารจากข้อ 9.28 ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- 9.30 ดูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่
- 9.31 เก็บตัวอย่าง plasmid DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. การหาลำดับเบส

10.1 การเตรียม PCR สำหรับการหาลำดับเบส

10.1.1 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 9 มาทำ PCR โดยแบ่งออกเป็น 8 หลอด คือ

<u>หลอดที่ 1</u>	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร

<u>หลอดที่ 2</u>	A reagent	2	ไมโครลิตร
	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
<u>หลอดที่ 3</u>	G reagent	2	ไมโครลิตร
	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
<u>หลอดที่ 4</u>	C reagent	2	ไมโครลิตร
	template	5	ไมโครลิตร
	universal forward primer	1	ไมโครลิตร
	T reagent	2	ไมโครลิตร

สำหรับหลอดที่ 5-8 ทำเช่นเดียวกับหลอดที่ 1-4 แต่เปลี่ยนจาก universal forward primer เป็น universal reverse primer

PCR condition ที่ใช้ คืออุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 25 รอบ

10.1.2 นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ทั้ง 8 หลอด หลอดละ 7 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาณ 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปใส่ไว้ใน aspirator เป็นระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้ความเข้มข้นมากขึ้น สำหรับการหาลำดับเบสในขั้นต่อไป

10.2 การเตรียม sequencing gel

10.2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับ sequencing gel เตรียมได้โดยผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกัน คือ

50% long ranger gel solution	3.6	มิลลิลิตร
ยูเรีย	11	กรัม
Milli Q water	14	มิลลิลิตร

10.2.2 เขย่าสารให้เข้ากันเบาๆ

10.2.3 เมื่อยูเรียละลายหมดแล้วเติม 10X TBE สำหรับเครื่อง sequencer ของ Hitachi ปริมาณ 3.6 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน

10.2.4 นำสารจากข้อ 10.2.3 เข้าเครื่อง vacuum เพื่อดูดเอาฟองอากาศออกจากสารละลายเป็นเวลา 30 นาที

10.2.5 นำแผ่นกระจกแก้วประกบเข้าด้วยกันโดยใช้แถบพลาสติก (spacer) เป็นตัวกำหนดความหนาของเจลที่จะใช้

- 10.2.6 นำเอาสารละลายจากข้อ 10.2.5 มาเติม 10% APS ปริมาณ 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาณ 15 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ
- 10.2.7 เทสารจากข้อ 10.2.6 ลงไปในแผ่นกระจกแก้วที่เตรียมไว้ โดยขณะเทสารละลายให้เอียงแผ่นกระจกแก้วนั้นเล็กน้อย
- 10.2.8 นำ comb พลาสติกสอดลงไปในด้านข้างของเจลที่เตรียมไว้ทิ้งให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ใช้ระยะเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึง comb พลาสติกออก แล้วต่อเข้ากับช่องของชุด sequencer ด้านบน
- 10.2.9 ต่อชุด sequencer และ sequencing gel ที่เตรียมแล้วเข้าด้วยกัน แล้วเติม 0.6X TBE ในช่องของชุด sequencer ทั้งบนและล่าง
- 10.2.10 ทำการ Prerun เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง
- 10.3 เมื่อครบ 1 ชั่วโมง แล้วใส่ comb กระดาษเพื่อทำเป็น lane สำหรับการ load ตัวอย่าง ลงไปอย่างรวดเร็วระหว่างช่องด้านบน กับ sequencing gel แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นใน lane ให้หมด
- 10.4 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารจากข้อ 10.1.2 ใส่ลงในช่องของแผ่นเจล โดยใส่หนึ่งช่องต่อหนึ่งตัวอย่าง เมื่อ load ตัวอย่างครบแล้วให้รีบดึง comb กระดาษออก ปล่อยให้เครื่องทำงานใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง
- 10.5 หากลำดับของเบสในแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง DNA sequencer นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS (Hitachi software engineering, Tokyo)

2. การโคลนและหาลำดับเบสของ *Omphisa ecdysone receptors* สอง isoforms คือ EcR-A และ EcR-B1

2.1 การหาลำดับเบสของ OfEcRs ครั้งที่ 1 (partial sequencing)

ทำการ amplify EcR gene ซึ่งเป็น partial sequence (มนพร, 2546) อีกครั้งเพื่อให้ได้ลำดับเบสที่ถูกต้องที่สุด โดยการออกแบบไพรเมอร์ 2 ชุด ที่มีส่วนที่ซ้อนทับกัน คือ EcR Upper sequence primers และ EcR Lower sequence primers ขนาดของผลผลิต (PCR product) ที่คาดว่าจะได้คือ 567 bp และ 572 bp ตามลำดับ โดยใช้ PCR condition ดังนี้

EcR Upper sequence

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 68 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 45 รอบ

EcR Lower sequence

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 68 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 45 รอบ

เมื่อได้ PCR product ตามต้องการแล้วจึงทำการโคลนและหาลำดับเบสตามวิธีการที่กล่าวไว้ข้างต้น

2.2 ทำการออกแบบ gene specific primer 2 ตัวคือ GSP1 และ GSP2 โดยอาศัยลำดับเบสที่ได้จากข้อ 4.1.1 แล้ว amplify full length EcRs โดยวิธี 5' RACE-PCR ซึ่งใช้ cDNA ที่สังเคราะห์จาก mRNA ด้วยวิธี 5' RACE (Rapid Amplification cDNA end) (Clontech Laboratory, Inc.) ในขั้นตอนนี้ต้องทำ PCR 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ใช้ GSP1 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาเป็น template ของการทำ PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้ GSP2 ซึ่งใช้ PCR condition เดียวกันคือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 25 รอบ ขนาดของ PCR product โดยประมาณอยู่ที่ 900- 1,000 bp จากนั้นทำการโคลนและหาลำดับเบส

2.3 เมื่อทำการวิเคราะห์ผลของลำดับเบสที่ได้จากข้อ 4.1.2 พบว่าเป็น EcR-B1 จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อ amplify EcR-B1 อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ 3 ตัวคือ EcR-B1 primer, GSP1 และ GSP2 ใช้ 5' RACE cDNA เป็น template ทำ PCR 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 amplify โดยใช้ EcR-B1 primer และ GSP1 โดยมี PCR condition คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 74 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ นำ PCR product ไป amplify อีกครั้งโดย EcR-B1 proto primer และ GSP2 ซึ่ง PCR condition คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที, 68 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 25 รอบ PCR product มีขนาดประมาณ 600 bp

2.4 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับ amplify EcR-A โดยอาศัยข้อมูลจาก EcR-A ของ *M. sexta*, *B. mori* และ *C. fumiferana* ไพรเมอร์ที่ได้คือ EcR-A proto ใช้ 5' RACE cDNA เป็น template ทำ PCR 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 amplify โดยใช้ EcR-A proto และ GSP1 โดยมี PCR condition คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 74 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 40 รอบ นำ PCR product ไป amplify อีกครั้งโดย EcR-A proto และ GSP2 ซึ่ง PCR condition คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 74 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 45 รอบ ขนาดของ PCR product ประมาณ 600 bp

3. การโคลนและหาลำดับเบสของ *Omphisa* Ribosomal protein L3; *RpL3* (partial sequencing)

ทำการ amplify RpL3 โดยใช้ไพรเมอร์ของ *B. mori* คือ BmRpL3 forward primer และ reverse primer ขนาดของ PCR product คือ 420 bp สำหรับ PCR condition ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นจึงทำการโคลนและหาลำดับเบส

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของ OfEcR-A mRNA และ OfEcR-B1 mRNA ใน midgut ของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับ JHA

1. ให้ JHA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตรของอะซิโตน/ตัว แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส จำนวน 50 ตัว ทำการเก็บ midgut ภายหลังการให้ฮอร์โมนทุก 2 วันจนกระทั่งเข้าสู่ระยะดักแด้
2. สกัด RNA จาก midgut โดยใช้สารละลาย TRIzol แล้ว นำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment, ใช้ RNA ปริมาณ 200 นาโนกรัมมาสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี reverse transcription

3. การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA โดยเทคนิค RT-PCR

หลักการที่สำคัญคือหลีกเลี่ยง plateau effect ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยการหาจำนวนรอบของการทำ PCR ของแต่ละยีนให้อยู่ในช่วง exponential phase และหลีกเลี่ยงความแปรปรวนของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด (tube to tube-variation) จึงต้องทำ PCR ซ้ำ 3 หลอดเพื่อหาค่าเฉลี่ย

PCR reaction 10 ไมโครลิตร

10X buffer	1	ไมโครลิตร
2mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.05	ไมโครลิตร
10 µM forward primer	0.2	ไมโครลิตร
10 µM reverse primer	0.2	ไมโครลิตร
Template	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	6.55	ไมโครลิตร

PCR condition ที่ใช้ในการทำ PCR

List of specific primer	Annealing temperature	No. of cycle in exponential phase	No. of cycle for PCR
OfEcR-A 5'-CTGAAGCACGAGGTGGCATAC-3' 5'-CGTAGCTGCTCGATGACAGG-3'	56 °C	36-41	38
OfEcR-B1 5'-GTCCAATAACGGTGGCTTTCA-3' 5'-CGTGGGTGGCATCGGTAA-3'	57 °C	33-42	39
OfRpL3 5'-TCTACCCCAAGAAGAGGTCTCG-3' 5'-ACGACAGTCCTCAGACATGTGC-3'	58 °C	25-28	26

4. นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer ปริมาณ

ไมโครลิตร แล้ว load บน 1.2% Agarose S gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 200 มิลลิแอมแปร์ เป็นระยะเวลา 25 นาที

5. ย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นระยะเวลา 35 นาที ถ่ายรูปเจลที่ได้แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบ band ที่เกิด โดย โปรแกรม NIH Image

6. นำค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบ band ที่ได้มาหารด้วยค่าเฉลี่ยของ OfRpL3 เมื่อใช้ cDNA ตัวอย่าง เดียวกัน

ผลการทดลอง

การโคลนและการหาลำดับเบสของยีน **Ecdysone receptors isoform A และ B1** ของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa EcR; OfEcR-A, OfEcR-B1*)

ในการศึกษาลำดับเบสของ EcR isoform A และ isoform B1 ของหนอนเยื่อไผ่ พบว่า *OfEcR-A* มีขนาด 2,400 bp หรือ 514 amino acid และ *OfEcR-B1* มีขนาด 2,407 bp หรือ 541 amino acid ซึ่งทั้งสอง isoform มีความแตกต่างกันเฉพาะในส่วนของ A/B specific-region เท่านั้น และ *EcR-B1* มีความเหมือนสูงเมื่อเทียบกับแมลงในอันดับ Lepidoptera โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูง (identity, similarity) เมื่อเทียบกับ *EcR-B1* ของ *B. mori* (*BmEcR-B1*), *M. sexta* (*MsEcR-B1*), *C. fumiferana* (*CfEcR-B1*), *C. suppressalis* (*CsEcR-B1*) และ *D. melanogaster* (*DmEcR-B1*) แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำเมื่อเทียบกับ EcR isoform A (*EcR-A*) ภาพที่ 1

OfEcR-A	-----MDLKHEVAYR---GLPSQVKAEPGVSTNGHPVNGHVRENMAGA	40
OfEcR-B1	MRRRWSNNGGFQTLRMLEESSSEVTSSSALGLPPAMVMSPESLASPEYSNLELWTYEDGI	60
	: . ** : *** . : . * : . . * . : :	
OfEcR-A	TAAGSPSPG---AAVQPQP--NNGYSSPLSSSYGPYSPNG--KIGREELSPASSVNGCS	93
OfEcR-B1	AYSTAPSL LGNACTMQQPPTQALPSMPLPMPPTTPKSENESMSGREELSPASSVNGCS	120
	: : : ** . : : * * : * ** . . * * * . *****	
OfEcR-A	TDGEARRQKKGPAPRQEEELCLVCGDRASGYHYNALTCEGCKGFFRFSVTKNAVYICKFG	153
OfEcR-B1	TDGEARRQKKGPAPRQEEELCLVCGDRASGYHYNALTCEGCKGFFRFSVTKNAVYICKFG	180

OfEcR-A	HGCEMDMYMRKCCQECRLKKCLAVGMRPECVVPEPQCAQKRKEKKAQREKDKLPVSTTTV	213
OfEcR-B1	HGCEMDMYMRKCCQECRLKKCLAVGMRPECVVPEPQCAQKRKEKKAQREKDKLPVSTTTV	240

OfEcR-A	DDHMPAIMQCDPPPPEAARIHEVVPRFLSEKLMEQNRLKNIPPLSANQQFLIARLVWYQD	273
OfEcR-B1	DDHMPAIMQCDPPPPEAARIHEVVPRFLSEKLMEQNRLKNIPPLSANQQFLIARLVWYQD	300

OfEcR-A	GYEQPSEEDLKRVTTQWQSADAEDSDMPFRQITENTILTVQLIVEFAKGLPGFSKISQ	333
OfEcR-B1	GYEQPSEEDLKRVTTQWQSADAEDSDMPFRQITENTILTVQLIVEFAKGLPGFSKISQ	360

OfEcR-A	PDQITLLKACSSEVMMLRVARRYDAASDSVLFANNQAYTRDNYRKAGMAYVIEDLLHFCR	393
OfEcR-B1	PDQITLLKACSSEVMMLRVARRYDAASDSVLFANNQAYTRDNYRKAGMAYVIEDLLHFCR	420

OfEcR-A	CMYSMSMDNVHYALLTAVVIFSDRPGLEQPQLVEEIQRYYLNTLRMYIMNQHSASPRCSV	453
OfEcR-B1	CMYSMSMDNVHYALLTAVVIFSDRPGLEQPQLVEEIQRYYLNTLRMYIMNQHSASPRCSV	480

OfEcR-A	LYAKILSVLTELRTLGMQNSNMCISLKLKNRSCRHSSKKSG	494
OfEcR-B1	LYAKILSVLTELRTLGMQNSNMCISLKLKNRSCRHSSKKSG	521

ภาพที่ 1. ลำดับกรดอะมิโนของ *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* ของหนอนเยื่อไผ่

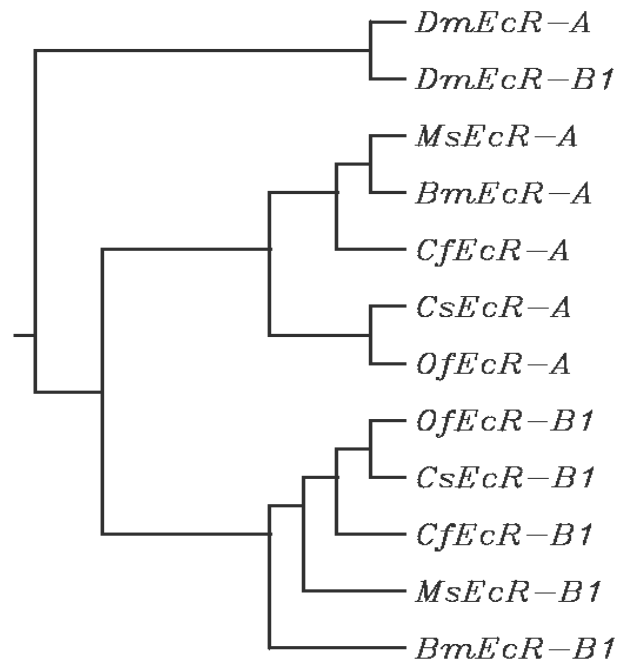
GenBank accession nos: EF667890 for *OfEcR-A* and EF667891 for *OfEcR-B1*.

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *OfEcR-A* ไปเทียบกับ *EcR-A* ของแมลงชนิดอื่นๆ พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity, similarity) สูงเมื่อเทียบกับ *B. mori* (*BmEcR-A*), *M. sexta* (*MsEcR-A*), *C. fumiferana* (*CfEcR-A*), *C. suppressalis* (*CsEcR-A*), และ *D. melanogaster* (*DmEcR-A 9k*, ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

	A/B	C	D	E/F	Total	GenBank
<i>C. suppressalis</i>	EcR-A	90.3	98.5	89.6	92.6	92.3 AB067811
	EcR-B1	90.8				92.3 AB067812
<i>C. fumiferana</i>	EcR-A	86.8	98.5	86.8	86.9	88.5 AF092030
	EcR-B1	89.3				94.5 U29531
<i>B. mori</i>	EcR-A	85.2	98.5	76.6	82.0	83.8 D87118
	EcR-B1	80.0				82.5 D43943
<i>M. sexta</i>	EcR-A	64.6	98.5	87.9	85.0	81.3 U49246
	EcR-B1	76.4				84.8 U19812
<i>D. melanogaster</i>	EcR-A	22.5	93.9	37.4	36.7	37.3 S63761
	EcR-B1	29.8				39.0 M74078

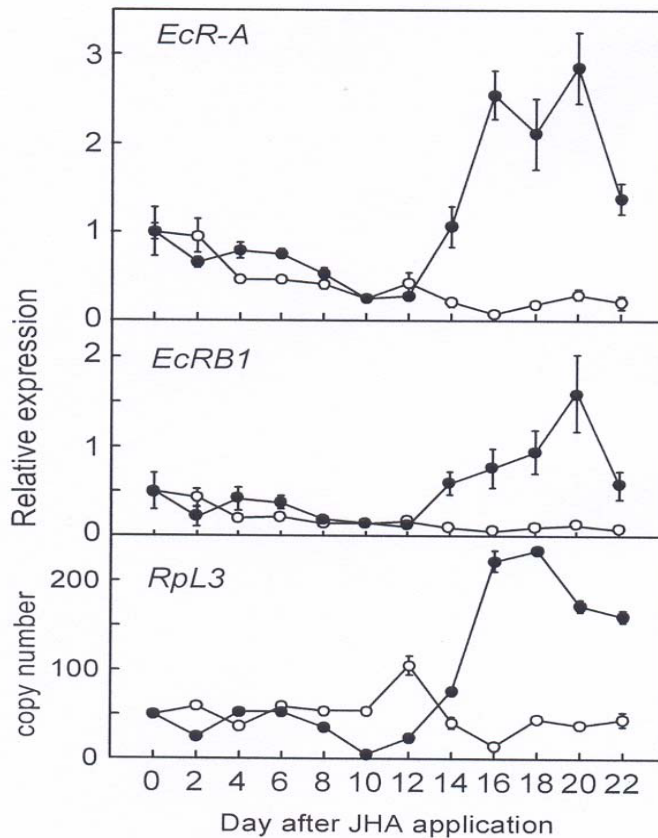
ตารางที่ 1. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง A, B, C และ E ของ *OfEcR* ของหนอนเยื่อไผ่ กับแมลงชนิดต่างๆ ความเหมือนแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์

เมื่อโคลนและหาลำดับเบสของ EcR ของหนอนเยื่อไผ่ได้ทั้งสอง isoform แล้วจึงทำการเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนในส่วน A/B-region ระหว่าง *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *EcRs* ของแมลงชนิดอื่น โดยสามารถนำเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการระหว่างหนอนเยื่อไผ่และแมลงชนิดต่างๆ ได้โดยใช้โปรแกรม NJ-Tree analysis (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2. การวิเคราะห์ เปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโน ของตำแหน่ง A/B ของ *EcR-A* และ *B1* ในหนอน เยื่อไผ่เปรียบเทียบกับ *B. mori*, *M. sexta*, *C. fumiferana*, *C. suppressalis* และ *D. melanogaster* โดยวิธี NJ-Tree (neighbor-joining tree) analysis

การวิเคราะห์การแสดงออกของ *EcR-A* mRNA และ *EcR-B1* mRNA ใน prothoracic gland โดยใช้วิธี Real Time Q-PCR พบว่า ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *Of EcR-A* และ *OfEcR-B1* mRNA มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 หลังจากให้ JHA ถึงระยะ G0 แต่การแสดงออกของ *OfEcR-A* จะเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 18 และสูงสุดที่ระยะ G1 ซึ่งรูปแบบการแสดงออกของ *OfEcR* ทั้งสอง isoforms สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิมฟ์ แสดงให้เห็นว่า JHA กระตุ้นให้ ecdysteroid ในฮีโมลิมฟ์เพิ่มขึ้น ซึ่งระดับ ecdysteroid ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ EcR (ภาพที่ 3) (รายละเอียดของแสดงในภาคผนวก)



ภาพที่ 3. การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *OfEcR-A* and *OfEcR-B1* isoform ในต่อมโปรทอแรคซิคของ หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส หลังจากให้ JHA 1 ไมโครกรัม (วงกลมปิด) หรือให้อะซิโตนของกลุ่มควบคุม (วงกลมเปิด) ตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค real-time Q-PCR และ *RpL3* mRNA เป็น internal standard แต่ละจุดคือ mean $\pm$ SD

บทวิจารณ์

ผลของ JHA ต่อการแสดงออกของ EcR-A และ EcR-B1 mRNA ใน midgut ของหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส

การหาลำดับเบสของ EcR-A และ EcR-B1 และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ หนอนเยื่อไผ่พบว่า *OfEcR-A* มีขนาด 1,922 bp หรือ 494 amino acid และ *OfEcR-B1* มีขนาด 1,929 bp หรือ 521 amino acid และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของทั้งสอง isoform พบว่ามี เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity และ similarity) เท่ากับ 83.4% และ 85.3% ตามลำดับ ซึ่งส่วนที่มีความแตกต่างกันคือบริเวณ A/B specific region เท่านั้น แต่ในส่วน A/B common, C, D และ E region มีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน 100% เช่นเดียวกับแมลงชนิดอื่นๆ คือ EcR แต่ละ isoform จะมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเฉพาะในส่วนที่เป็น A/B specific region เท่านั้น ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบความเหมือนของ

ลำดับกรดอะมิโน ของ OfEcR-A และ OfEcR-B1 ในส่วน A/B region กับแมลงชนิดอื่นๆ ได้แก่ *B. mori* (BmEcR-A, BmEcR-B1), *M. sexta* (MsEcR-A, MsEcR-B1), *C. fumiferana* (CfEcR-A, CfEcR-B1), *C. suppressalis* (CsEcR-A, CsEcR-B1) และ *D. melanogaster* (DmEcR-A, DmEcR-B1) เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างหนอนเยื่อไผ่กับแมลงดังกล่าว พบว่า OfEcR-A มีความเหมือนกับ CsEcR-A มากที่สุด (90.3% identity) รองลงมาคือ CfEcR-A, BmEcR-A, MsEcR-A และ DmEcR-A มีความเหมือนกับ OfEcR-A น้อยที่สุด (18.4% identity) ส่วน OfEcR-B1 มีความเหมือนกับ CsEcR-B1 มากที่สุด 90.8% identity รองลงมาคือ CfEcR-B1, BmEcR-B1, MsEcR-B1 และ DmEcR-B1 มีความเหมือนกับ OfEcR-B1 น้อยที่สุด (29.8% identity) แสดงให้เห็นว่า EcR ทั้งสอง isoform ของหนอนเยื่อไผ่มีความเหมือนสูงกับ *C. suppressalis*, *C. fumiferana*, *B. mori* และ *M. sexta* เนื่องจากเป็นแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่นเดียวกัน ส่วน EcR ของ *D. melanogaster* มีความแตกต่างกับ EcR ของหนอนเยื่อไผ่มากที่สุดเนื่องจากเป็นแมลงในอันดับ Diptera นอกจากนั้นผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยแสดงในรูปแบบของ NJ-Tree พบว่าแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่ม EcR ของแมลงในอันดับ Diptera และกลุ่ม EcR ของแมลงในอันดับ Lepidoptera ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มของ EcR-A และ EcR-B1 ซึ่ง EcR ทั้งสอง isoform ของหนอนเยื่อไผ่มีความใกล้ชิดกับหนอนเจาะลำต้นข้าว (*C. suppressalis*) มากที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เทคนิค RT-PCR สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของ OfEcR-A และ OfEcR-B1 mRNA ใน midgut ของหนอนเยื่อไผ่หลังจากได้รับ JHA โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR นั้นออกแบบจากลำดับเบสในส่วน of A/B specific region ซึ่งสามารถจับได้จำเพาะกับแต่ละ isoform เท่านั้น และใช้ ribosomal protein L3 ที่มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันในระยะต่างๆ เป็น internal standard ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ EcR-B1 mRNA มีจุดสูงสุดของการแสดงออก (peak) เกิดขึ้นสองครั้ง ครั้งแรกเป็น peak ขนาดเล็กที่เกิดขึ้นในวันที่ 12 หลังจากการให้ฮอร์โมน แล้วเกิด peak ขนาดใหญ่ในวันที่ 20 และระยะ G0 ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ EcR-A mRNA จะเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 18 และสูงสุดที่ระยะ G1 เมื่อทำการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของ EcR mRNAs กับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิฟของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย JHA (Singtripop *et al.*, 2000) พบว่าการเพิ่มขึ้นของ EcR mRNAs นั้นมีรูปแบบที่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิฟ โดยการแสดงออกของ EcR mRNAs จะเพิ่มขึ้นก่อนที่ระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิฟจะเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ OfEcR mRNAs ถูกชักนำด้วยการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอกไดโซน ซึ่งโดยทั่วไปในแมลงชนิดอื่นๆ ก็พบว่าการแสดงออกของ EcR mRNAs isoforms ต่างๆ ถูกชักนำด้วยฮอร์โมนเอกไดโซนโดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของฮอร์โมน ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ EcR mRNAs แต่ละ isoform นั้นจะเกิดขึ้นแบบชั่วคราวและมีรูปแบบที่แตกต่างกันโดยจะสัมพันธ์กับการเพิ่มของระดับฮอร์โมนเอกไดโซน (Hiruma *et al.*, 1997)

จากผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง midgut ใน Grace's medium ที่มี 20E ความเข้มข้นไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า 20E มีผลโดยตรงในการกระตุ้น ดังนั้นจึงคาดว่า JHA มีผลกระตุ้นให้

ระดับของฮอร์โมนเอกไดโคโซนในฮีโมลิฟเพิ่มขึ้นแล้วระดับของฮอร์โมนเอกไดโคโซนที่เพิ่มขึ้นนี้ไปมีผลกระตุ้นการแสดงออกของ EcR mRNA ใน midgut ซึ่งการแสดงออกของ EcR mRNA อาจเพิ่มขึ้นในวันที่ 18 หลังจากได้รับ JHA จากผลการทดลองพบว่าทั้งสอง isoform เริ่มถูกกระตุ้นในวันที่ 18 ตามที่คาดไว้ ซึ่งผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการให้ JHA แก่หนอนเยื่อไผ่มีผลทำให้ระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิฟเพิ่มสูงขึ้น โดยเกิดการเพิ่มขึ้นสองครั้งการเพิ่มขึ้นครั้งแรกเกิดขึ้นวันที่ 16 จากนั้นมีการเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 20 และสูงสุดเมื่อหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ แสดงให้เห็นว่า JHA กระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมนเอกไดโคโซนเพิ่มขึ้นแล้วการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอกไดโคโซนในฮีโมลิฟนี้อาจไปมีผลกระตุ้นการแสดงออกของ EcR mRNA ของหนอนเยื่อไผ่ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาใน anterior silk glands ของ *B. mori* พบว่า 20E มีผลชักนำให้เกิดการเข้าดักแด้ และในขณะเดียวกันก็พบว่าการแสดงออกของทั้ง EcR-A และ EcR-B1 mRNA เกิดขึ้น (Kamimura *et al.*, 1999)

จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ EcR-B1 mRNA พบว่าจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 12 จะเริ่มเพิ่มขึ้นเมื่อหนอนเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ G0 ซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 วัน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ส่วน EcR-B1 อาจจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจาก larval midgut ไปเป็น pupal midgut ซึ่งในช่วงที่แมลงเกิดกระบวนการเมตาโมρφอซิส เซลล์ของตัวอ่อน (larval cell) เช่น midgut อีพิเดอร์มิส และ fat body จะถูกแทนที่ด้วย imaginal cells หรือมีการพัฒนาเป็นเซลล์ของตัวเต็มวัย เช่น ในแมลงหวี่พบว่า เนื้อเยื่อของตัวอ่อน (larval tissue) จะถูกแทนที่ด้วย imaginal disc ในขณะที่เปลี่ยนรูปร่างเป็นตัวเต็มวัย โดยพบว่า EcR-B1 จะเป็น isoform ที่มีอิทธิพลต่อการเกิด proliferation ของ larval tissue ส่วน EcR-A จะมีความสำคัญในช่วงที่ imaginal disc เกิดกระบวนการ differentiation (Talbot *et al.*, 1993) ส่วนใน *B. mori* พบว่าใน midgut, fat body และอีพิเดอร์มิส มีการแสดงออกของ EcR-B1 mRNA สูง (Kamimura *et al.*, 1996, 1997) แต่สำหรับสมมติฐานข้างต้นยังต้องมีการทดลองเพิ่มเติมจึงจะสามารถยืนยันสมมติฐานดังกล่าวได้

ในการศึกษาลำดับเบสของ EcR isoform A และ isoform B1 ของหนอนเยื่อไผ่ ครั้งนี้เพื่อยืนยันผลของ JHA ในระดับโมเลกุล พบว่า OfEcR-A มีขนาด 1,922 bp หรือ 494 amino acid และ OfEcR-B1 มีขนาด 1,929 bp หรือ 521 amino acid ซึ่งทั้งสอง isoform มีความแตกต่างกันเฉพาะในส่วน of A/B specific-region เท่านั้น และมีความเหมือนสูงเมื่อเทียบกับแมลงในอันดับ Lepidoptera การวิเคราะห์การแสดงออกของ EcR-A mRNA และ EcR-B1 mRNA ใน midgut โดยใช้วิธี RT-PCR พบว่า JHA มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ EcR-A mRNA และ EcR-B1 mRNA ใน midgut ซึ่งการแสดงออกของทั้งสอง isoform นั้นเพิ่มขึ้นก่อนที่ระดับ ecdysteroid ในฮีโมลิฟจะเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Andres, A. J., Fletcher, J. C., Karim, F. D. and Thummel, C. S. 1993. Molecular analysis of the Initiation of insect metamorphosis: A comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. Dev. Biol., 160 : 388-404.
- Ashburner, M., Chihara, C., Meltzer, P., and Richards G. 1974. On the temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 38 : 655-662
- Bender M., Imam F. B., Talbot W. S., Ganetzky B. and Hogness D.S. 1997. *Drosophila* ecdysone receptor mutation reveal functional difference among receptor isoforms. Cell, 91, 777-788.
- Bergot B. J., Jamieson G. C., Ratcliff MA. and Schooley D. A. 1980. JH Zero: New naturally occurring insect juvenile hormone from developing embryos of the tobacco hornworm. Science, 210, 36-338.
- Bowers W.S. and Friedman S. 1963. Mobilization of fat body glycogen by an extract of corpus cardiacum. Nature, 198, 685.
- Bruning E. and Lanzrein R. 1987. Function of juvenile hormone III in embryonic development of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. Int. J. Insect Reprod. Dev., 12, 29-44.
- Denlinger D.L. 1985. Hormonal control of diapause. In Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, Oxford, Pergamon Press, pp. 353-413.
- Dorn A. 1982. Precocene-induced effects and possible role of juvenile hormone during embryogenesis of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. Gen. Comp. Endocrinol., 46, 42-52.
- Edwards J.P., Corbitt T.S., McArdle H.F., Short J.E. and Weaver R.J. 1995. Endogenous levels of insect juvenile hormone in larval, pupal and adult stages of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. J. Insect Physiol., 41, 41-651.
- Fristrom D. and Fristrom J. W. 1993. The metamorphic development of the adult epidermis. In “The development of *Drosophila melanogaster*” (M. Bate and A Martinez Arias, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainveiw , pp. 843-897.
- Fujiwara H., Jindra M., Newitt R., Palli S. R., Hiruma K. and Riddiford L. M. 1995. Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and developmental profile of its mRNA in wings. Insect. Biochem. Mol. Biol., 25, 845-856.
- Gilbert L.I. 1989. The endocrine control of molting in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, as a model system. In Koolman J. (Ed.), Ecdysone, Stuttgart, Georg Thieme,

pp. 448-471.

- Goto M., Li Y.P., Kayaba S., Outani S. and Suzuki K. 2001. Cold hardiness in summer and winter diapause and post-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. under temperature acclimation. *J. Insect. Physiol.*, 47, 709-714.
- Gu S.H. and Chow Y.S. 1993. Role of low ecdysteroid levels in the early last larval instar of *Bombyx mori*. *Experientia*, 49, 806-809.
- Hammock B.D. 1985. Regulation of juvenile hormone titer : Degradation. In Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*, New York, Pergamon Press, pp. 431-472.
- Hannan G. N. and Hill R. J. 1997. Cloning and characterization of Lc Ecr: A functional ecdysone receptor from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 27, 479-488.
- Hiruma K., Bocking D., Larfont R. and Riddiford L.M. 1997. Action of different ecdysteroid on the regulation of mRNAs for the ecdysone receptor, MHR3, dopa decarboxylase, and larval cuticle protein in the larval epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 107, 84-97.
- Hiruma K., Hardie J. and Riddiford L.M. 1991. Hormonal regulation of epidermal metamorphosis in vitro : control of expression of a larval-specific cuticle gene. *Dev. Biol.*, 144, 369-378.
- Huet F., Ruiz C. and Richards G. 1993. Puffs and PCR: The in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone response in *Drosophila*. *Development*, 118, 613-627.
- Jesudason P., Venkatesh K. and Roe R.M. 1990. Haemolymph juvenile hormone esterase during the life cycle of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.*, 20, 593- 604.
- Jindra M., Malone F., Hiruma K. and Riddiford L. M. 1996. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of mRNA for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, 180, 258-272.
- Judy K.J., and Gilbert L.I. 1969. Morphology of the alimentary canal during metamorphosis of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera : Saturniidae). *Ann Ent. Soc. Am.*, 62, 1438-1446.
- Kamimura M., Tomita S. and Fujiwara H. 1996. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113, 341-347.
- Kamimura M., Tomita S., Kiuchi M. and Fujiwara H. 1997. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms. Ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *Eur. J. Biochem.*, 248, 786-793.

- Kiguchi K. and Riddiford L.M. 1978. The role of juvenile hormone in pupal development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol., 24, 673-680.
- Koelle M. R., Talbot W. S., Segreaves W. A., Bender M. T., Cherbas P. and Hogness D. S. 1991. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. Cell, 76, 59-77.
- Martinez A., Scanlon D., Gross B., Prerara S. C., Palli S. R., Greenland J., Windas J., Pongs O., Broad P. and Jepson I. 1999. Transcriptional activation of the clone *Heliothis virescens* (Lepidoptera) ecdysone receptor (HvEcR) by Muristerone A. Insect. Biochem. Mol. Biol., 29, 915-930.
- Minakuchi C., Nakagawa Y., Kiuchi M., Tomita S. and Kamimura M. 2002. Molecular cloning, expression analysis and functional confirmation of two ecdysone receptor isoforms from the rice stem borer *Chilo suppressalis*. Insect. Biochem. Molec. Biol., 320, 999-1008.
- Mouillet J. F., Delbecq J. R. Quennedey B., and Delachambre J. 1997. Cloning of two putative ecdysone receptor isoforms from *Tenebrio molitor* and their developmental expression in the epidermis during metamorphosis. Eur. J. Biochem., 248, 856-863.
- Nijhout H.F. 1994. Diapause. In Insect hormones, Princeton, Princeton University Press, pp. 168.
- Nijhout H.F. and Wheeler D.E. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. Quart. Rev. Biol., 57, 109-133.
- Oda Y., Uejima M., Iwami M. and Sakurai S. 2000. Role of ecdysteroids in the dynamic of insect hemolymph sugar. Zool. Sci., 17, 785-789.
- Perera S.C., Ladd T. R., Dhadialla T. S., Knell P. J., Sohi S. S., Retnakaran A. and Palli S. R. 1999. Studies on two ecdysone receptor isoforms of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Eur. J. Entomol., 92, 325-332.
- Peter M.G., Shirk P.D., Dahm K.H. and Roller H. 1981. On the specificity of juvenile hormone biosynthesis in the male cecropia moth. Z. Naturf., 36, 579-585.
- Richard D. S., Applebaum S. W., Sliter T. J., Baker F. C., Schooley D. A., Reuter C.C., Henrich V.C., and Gilbert L. I. 1989. Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis in vitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: A putative juvenile hormone in the higher Diptera. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 1421-1425.
- Riddiford L.M. 1985. Hormone action at the cellular level. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds.), Pergamon Press, Oxford vol. 8, pp 37-84.
- Riddiford L.M. 1980. Progress in Ecdysone Research. In Hoffmann (Ed.), Hormone in the

- regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm, Amsterdam, Elsevier North-Holland Biomedical Press, pp. 409-430.
- Riddiford L.M. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General consideration and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24, 213-274.
- Safranek L., Cymborowski B. and Williams C.M. 1980. Effects of juvenile hormone on ecdysone-dependent development in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biol. Bull.*, 158, 248-256.
- Sakurai S., Warren J.T. and Gilbert L.I. 1991. Ecdysteroid synthesis and molting by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, in the absence of prothoracic glands. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 18, 13-36.
- Saleh D. S., Zhang J., Wyatt G. R., and Walker V. K. 1998. Cloning and characterization of an ecdysone receptor cDNA from *Locusta migratoria*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 143, 91-99.
- Sanburg L.L., Kramer K.J., Kexdy F.J. and Law J.H. 1974. Juvenile hormone specific esterase in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, 21, 873-887.
- Schneiderman H.A. and Gilbert L.I. 1964. Control of growth and development in insects. *Science*, 143, 325-333.
- Schooley D. A., Baker F. C., Tsai L. W., Miller C.A. and Jamieson, G. C. 1984. Juvenile hormone 0, I, and II exist only in Lepidoptera. In "Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones" (J.A.Hoffmann and M.Porchet,eds.) Springer-verlag, Berlin.pp. 373-383.
- Schubiger M., Wade A. A., Carney G. E., Truman J. W., and Bender M. 1998. Drosophila EcR-B1 ecdysone receptor isoforms are required for larval molting and for neuron remodeling during metamorphosis. *Development*, 125, 2053-2062.
- Sehnal F. 1985. Growth and life cycles. In Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Oxford, Pergamon Press, pp.1-86.
- Sehnal F. and Akai H. 1990. Insect silk glands: Their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 19, 79-132.
- Singtripop T., Oda Y., Wanichacheewa S. and Sakurai S. 2002. Sensivity of juvenile hormnoe and ecdysteroid in the diapause larvae of *Omphisa fuscidentalis* based on the hemolymph trehalose dynamic index. *J. Insect. physiol.*, 48, 817-824.

- Singtripop, T., Wanichecheewa S. and Sakurai S. 2000. Juvenile hormone-mediated termination of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. Insect. Biochem. Molec. Biol., 30, 847-854.
- Singtripop T., Wanichecheewa S., Tsuzuki S. and Sakurai S. 1999. Larval growth and diapause in a tropical moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson. Zool. Sci., 16, 725-733.
- Slama K. 1995. The present status of the mode of action of insect juvenile hormone. J. Zool., 45, 71-78.
- Spark T.C., Hammock B.D. and Riddiford L.M. 1983. The haemolymph juvenile hormone esterase of *Manduca sexta* (L.)-inhibition and regulation. Insect Biochem., 13, 529-541.
- Strambi A. 1990. Physiology and reproduction in social wasps. In Engles U.V. (Ed.), Social insects, an evolutionary approach to castes and reproduction, Berlin, Springer-Verlag, pp. 59-75.
- Swevers L., Cherbas L., Cherbas P. and Iatrou K. 1995. *Bombyx* EcR (BmEcR) and *Bombyx* USP (BmCP1) combine to form a functional ecdysone receptor. Insect. Biochem. Mol. Biol., 26, 217-221.
- Talbot W. S., Swyryd E. A. and Hogness D. S. 1993. Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. Cell, 73, 1323-1337.
- Truman J. w., Talbot W.S., Fahrbach S. E. and Hogness D. S. 1994. Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage specific responses to ecdysteroids during Drosophila and Manduca development. Development, 120, 219-234.
- Vince R.K. and Gilbert L.I. 1976. Juvenile hormone esterase activity in precisely timed last instar larvae and pharate pupae of *Manduca sexta*. Insect Biochem., 7, 115-120.
- Wegmann I. S. Ouack S., Spindler K. -D., Dorsch-Häsler K., Vögt M. and Lezzi M. 1995. Immunological studies on the developmental and chromosomes distribution of ecdysteroid receptor protein in *Chironomus tentans*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 30, 95-114.
- Weirich G., Wren J. and Siddall J.B. 1973. Developmental changes of the juvenile hormone esterase Activity in haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem., 3, 397-407.
- Williams C.M. 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the *Cecropia* silkworm. Biol. Bull., 103, 120-138.
- Williams C.M. 1956. The juvenile hormone of insects. Nature, 178, 212-213.
- Wyatt G.R., Loughheed T.C. and Wyatt S.C. 1956. The chemistry of insect hemolymph. I. organic components of the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, and two other species. J. Gen. Physiol., 39, 853-868.

- Yao T.-P., Forman B. M., Jiang, Z., Cherbas L., Chen J. -D., Mckeown M., Cherbas P. and Evans R. M. 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature*, 366, 476-479.
- Yao T.-P., Segraves W.A., Oro A.E., Mckeown M. and Evans R.M. 1992. *Drosophila* Ultra-spiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, 71 ,63-72.

เอกสารสรุปผลงานตอนที่ 2

การโคลนนิ่งและการแสดงออกของอัลตราสไปราเคิลโปรตีนชักนำ
โดยฮอร์โมนจูวีไนล์ในระหว่างการเจริญของหนอนเยื่อไผ่

รหัสโครงการ **RMU508000ค8**

ชื่อโครงการ การโคลนนิ่งและการแสดงออกของอัลตราสไปราเคิลโปรตีนชักนำโดยฮอร์โมนจูวีไนล์
ในระหว่างการพัฒนาของหนอนเยื่อไผ่

ชื่อนักวิจัย รศ.ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไทรภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: scboi020@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 1 ธันวาคม 2549 - 30 พฤศจิกายน 2552

บทคัดย่อ

ในระหว่างระยะไคอะพอสพบว่ามีความเข้มข้นของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิมพ์ต่ำและจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสิ้นสุดระยะไคอะพอส การให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue : JHA, methoprene) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส ทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนเพิ่มสูงขึ้น พร้อมกับเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ดักแด้ เนื่องจากเอกไดโซนรีเซพเตอร์(EcR) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบของแมลงซึ่งผ่านกลไกของสองนิวเคลียร์รีเซพเตอร์ คือ EcRc และ ultraspiracle protein (USP) การสิ้นสุดของระยะลาร์วาลไคอะพอสเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนจำเพาะในแต่ละเนื้อเยื่อ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการแยกและศึกษาการแสดงออกของ ecdysone receptor (*OfEcR*) ทั้งสอง isoform คือ *OfEcR-A* และ *OfEcR-B1* และ USP mRNA ในต่อมโปรทอแรคซิค(PG) หลังจากฉีดฮอร์โมนเอกไดโซน มีความยาว 2005 bp ประกอบด้วย 409 กรดอะมิโน ในกลุ่ม lepidopteran *OfUSP2* มีความเหมือนสูงเมื่อเทียบกับ *Chilo suppressalis* (82.07%) และความเหมือนน้อยเมื่อเทียบกับ *Drosophila melanogaster* (71.97%) จากการทำ RT-PCR analysis เพื่อวัดการแสดงออกของ *OfUSP-2 mRNA* ของต่อมโปรทอแรคซิคหลังจากฉีดฮอร์โมน 20E แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของ *OfUSP-2* คงที่ในช่วง D0-G0 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ G1 และหลังจากนั้นลดลงที่ G2-G3 การแสดงออกของ *OfEcR-B1 mRNA* เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ Day 2 ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ *OfEcR-A mRNA* เพิ่มขึ้นในช่วง Day 1-Day2 และลดลงที่ G0 และกลับมาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ G1 และ G2 ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า 20E ชักนำการแสดงออกของยีนทั้ง *OfEcRs* และ *OfUSP-2 mRNA* ในต่อมโปรทอแรคซิค

คำหลัก : *EcR*, *USP*, *Omphisa*, Juvenile hormone

Project code **RMU5080008**

Project title Cloning and expression of ultraspiracle protein induced by juvenile hormone
during the development of bamboo borer

Investigator Tippawan Singtripop

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address: scboi020@chiangmai.ac.th

Project period : 1 December 2006- 30 November 2009

Abstract

During larval diapause, the ecdysteroid titer remains at low levels and increases towards the diapause termination. An application of juvenile hormone analogue (JHA), to diapause larvae induces an increase in ecdysteroid titer and eventually pupation. (Singtripop *et al.*, 2000). Since ecdysone receptor (EcR) gene is a regulatory specific of insect molting which is mediated via two nuclear receptor superfamily members, *EcR* and its heterodimeric partner, ultraspiracle (USP), diapause termination may involve in expression of specific genes in individual tissues. In the present study, we first identified the *USP* isoforms and examined the changes in *EcR* and *USP* mRNA expression in the prothoracic gland (PG) after 20E injection. The *O. fuscidentalis* USP-2 (*OfUSP-2*) was 2,005 bp in length and contained an open reading frame (ORF) encoding a 409 amino acid protein. Among the lepidopteran *USP*, *OfUSP-2* showed high identity with *Chilo suppressalis* (82.07%) and low identity with *Drosophila melanogaster* (71.97%). RT-PCR analysis of *OfUSP-2* mRNA expression in PG after 20E injection showed that *OfUSP-2* were consistent in D0-G0 and slightly increased at G1 and then declined in G2-G3. *OfEcR-B1* mRNA expression peaked at day 2. In contrast *OfEcR-A* mRNA expression increased at day 1-day 2 and declined at G0 and then increased sharply again at G1 and G2. The present results indicate that 20E induce both *OfEcRs* and *OfUSP-2* mRNA expression in the PG.

Keywords: *EcR*, *USP*, *Omphisa*, Juvenile hormone

บทนำ

หนอนเยื่อไผ่เป็นระยะตัวหนอนของผีเสื้อกลางคืน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Omphisca fuscidentalis* Hampson หนอนเยื่อไผ่จัดเป็นแมลงในกลุ่ม holometabolous โดยพบว่าในกระบวนการเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) ของแมลงกลุ่ม holometabolous จะมีการเจริญเปลี่ยนแปลงของระยะไข่เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัย โดยต้องผ่านขั้นของระยะตัวหนอนไปสู่ระยะดักแด้ ซึ่งในแต่ละขั้นของการเจริญได้ถูกกำหนดขึ้นโดยมีปัจจัยต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม โดยทำงานผ่านระบบกลไกต่างๆ ของร่างกายที่ค่อนข้างซับซ้อน ในการเจริญเปลี่ยนแปลงระยะหลังเอ็มบริโอ (post-embryonic development) ของแมลงนั้น ได้แบ่งระยะตัวหนอนออกเป็นขั้น ซึ่งแต่ละขั้นที่เกิดจากการลอกคราบเรียกว่า อินสตาร์ (instar) โดยจำนวนอินสตาร์จะขึ้นอยู่กับชนิดของแมลง จากการศึกษาการเจริญของหนอนเยื่อไผ่พบว่า ระยะการเจริญของหนอนเยื่อไผ่มี 2 ระยะ คือ ระยะการเจริญขึ้นต้นและระยะลาร์วัลไดอะพอส (larval diapause) ระยะการเจริญขึ้นต้นมี 5 อินสตาร์ (Singtripop *et al.*, 1999) ในตัวหนอนระยะสุดท้ายของหนอนเยื่อไผ่จะอยู่ในระยะลาร์วัลไดอะพอส เป็นเวลานาน 9 เดือน ตั้งแต่เดือนกันยายนจนถึงเดือนมิถุนายนปีถัดมา

โดยทั่วไปเมื่อแมลงเข้าสู่ระยะไดอะพอส จะมีผลทำให้อัตราเมตาบอลิซึม (metabolism) ในร่างกายลดต่ำลง ลดการเคลื่อนไหว หยุดการกินอาหารและชะลอการเจริญเติบโตของร่างกาย รวมทั้งไม่มีการเจริญของอวัยวะต่างๆ (Tauber *et al.*, 1986) โดยปัจจัยที่มีผลทำให้เกิดไดอะพอสนั้น เนื่องมาจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมและการควบคุมกลไกการทำงานต่างๆ ของระบบประสาทและฮอร์โมนภายในร่างกาย แต่สำหรับหนอนเยื่อไผ่นั้นสามารถเกิดไดอะพอสได้ทุกรุ่น โดยเกิดในระยะเวลาเดียวกันและเวลาใกล้เคียงกันทุกปี ดังนั้นปัจจัยที่สำคัญที่นำไปสู่การเกิดไดอะพอสในหนอนเยื่อไผ่อาจจะเป็นการควบคุมโดยระบบประสาทและฮอร์โมน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างการเจริญเติบโตหรือเมตามอร์โฟซิส มีฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องได้แก่ ฮอร์โมนจูวีไนล์ (juvenile hormone) ที่ผลิตจากต่อมคอร์ปัสอัลลาตัม (corpus allatum) และฮอร์โมนเอกไดโซน (ecdysone) ที่ผลิตจากต่อมโปรทอแรคซิก (prothoracic gland) โดยกลไกที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของระยะตัวหนอนเข้าสู่ระยะดักแด้ในแมลง จะเริ่มจากการถูกกระตุ้นของสมอง ทำให้สมองหลั่งฮอร์โมนโปรทอแรคซิก ทำให้เกิดการหลั่งของฮอร์โมนเอกไดโซน ซึ่งฮอร์โมนเอกไดโซน จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานและการสร้างผนังลำตัวหรือคิวติเคิลใหม่ (new cuticle) ของตัวหนอน ทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ ส่วนฮอร์โมนจูวีไนล์นั้นจะมีหน้าที่ในการรักษารูปร่างลักษณะของระยะตัวหนอนไม่ให้เจริญเป็นตัวเต็มวัย (เสาวภา, 2525 และ Slaman, 1995)

จากการศึกษาหนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอสพบว่า มีระดับของฮอร์โมนเอกไดโซนในฮีโมลิम्ฟต่ำ (Singtripop *et al.*, 1999) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงระยะไดอะพอสนี้ ต่อมโปรทอแรคซิกถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนเอกไดโซน หนอนเยื่อไผ่จึงไม่เกิดการเข้าสู่ระยะดักแด้ นอกจากนี้พบว่าการให้ฮอร์โมนจูวีไนล์สังเคราะห์ (juvenile hormone analogue : JHA) แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไดอะพอส สามารถชักนำให้หนอนเยื่อไผ่อินสตาร์สุดท้ายเกิดการสิ้นสุดระยะลาร์วัลไดอะพอสได้ แสดงว่า JHA อาจไปกระตุ้นการ

ทำงานของต่อมโปรทอแรคซิก ให้หลังฮอร์โมนเอกไดโซนเพิ่มสูงขึ้น ทำให้หนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ (Singtripop *et al.*, 2000) โดยกลไกการควบคุมกระบวนการเมตาโมρφอซิสและการลอกคราบนั้นเป็นผลมาจากกลไกการทำงานของฮอร์โมนเอกไดโซนในระดับโมเลกุล ซึ่งเกิดจากการจับกันของฮอร์โมน 20-hydroxy ecdysone (20E) กับเอกไดโซนรีเซพเตอร์ (Ecdysone receptor; EcR) และ อัลตราสไปราเคิลโปรตีน (ultraspiracle protein; USP) ซึ่งเป็น partner protein ของ EcR จากนั้นจะเกิดเป็นเอกไดโซนรีเซพเตอร์คอมเพล็กซ์ (ecdysone receptor complex) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสทางพันธุกรรม รวมทั้งการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการลอกคราบในแมลง (Riddiford, 1993)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงกระบวนการทำงานในระดับโมเลกุลอย่างมาก นำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกการควบคุมการเจริญของแมลงได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยมีส่วนใหญ่ที่ถูกกระตุ้นระหว่างกระบวนการเมตาโมρφอซิสนั้น คาดว่าถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเอกไดโซนในฮิโมลิฟท์ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการแสดงออกของยีนจะถูกกระตุ้นก่อนที่จะเกิด peak ของฮอร์โมนเอกไดโซน จากการศึกษาพบว่า การเจริญเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลมาจากปริมาณฮอร์โมนเอกไดโซนที่เพิ่มขึ้นในตัวหนอนอินสตาเร่สุดท้ายของแมลงกลุ่ม Lepidoptera ซึ่งวัดได้สูงสุด 2 peaks คือ peak แรกมีขนาดเล็ก พบว่าหนอนจะหยุดการกินอาหาร ในขณะที่ peak ที่ 2 จะเพิ่มขึ้นก่อนที่จะกลายเป็นดักแด้เพื่อชักนำให้เกิดการเข้าดักแด้ ในเวลาเดียวกันกับ peak ที่ 2 ของฮอร์โมนเอกไดโซนที่เพิ่มขึ้นนั้น ปริมาณฮอร์โมนจูวีไนล์ในฮิโมลิฟท์ก็เพิ่มสูงขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อการรักษาสภาพของการลอกคราบในแมลง (Dean *et al.*, 1980; Smith, 1985; Sakurai *et al.*, 1998)

จากข้อมูลดังกล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนเอกไดโซนมีผลโดยตรงต่อการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง อีกทั้ง JHA สามารถชักนำให้หนอนเชื้อไฟเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ จึงเป็นไปได้ว่า JHA อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนในระดับโมเลกุล ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการชักนำการแสดงออกของยีน EcR และ USP โดยฮอร์โมน JHA และ 20E ในการสิ้นสุดระยะไดอะพอสของหนอนเชื้อไฟ ทั้งในสถานะ *in vivo* และ *in vitro* รวมทั้งการหาลำดับเบสและกรดอะมิโนของ USP ของหนอนเชื้อไฟทั้ง 2 ไอโซฟอร์ม (isoforms) เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนต่อไป

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1: การศึกษาผลของ JHA และ 20E ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP* ของหนอนเยื่อไผ่ในสถานะ *in vivo*

ทำการสกัด total RNA จากต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมนในช่วงเดือนสิงหาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 จากนั้นนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR

1.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP* ของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมน JHA ความเข้มข้นต่างๆ โดยการแบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หยอดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 2 หยอดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 3 หยอดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

โดยใช้ micro syringe หยด JHA ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในอะซิโตน โดยหยดบริเวณด้านบนของปล้องกลางลำตัวจนถึงปล้องสุดท้ายของหนอนเยื่อไผ่ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่แต่ละกลุ่มๆ ละ 10 ตัว ทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งหนอนเยื่อไผ่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาตามระดับการเปลี่ยนสี 5 ระดับ (ภาพ 1) ดังนี้

G0	หมายถึง	สีขาวปกติ แต่ตัวหนอนจะหยุดเคลื่อนไหว
G1	หมายถึง	เริ่มเห็นจุดสีส้มกระจายตามผิวลำตัว
G2	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นสีส้มทั้งตัว
G3	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นคิวติเคิลสีน้ำตาลของระยะดักแด้
G4	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นคิวติเคิลสีน้ำตาลเข้ม
G5	หมายถึง	ผิวลำตัวเปลี่ยนเป็นคิวติเคิลสีน้ำตาลดำ



G0 G1 G2 G3 G4 G5

ภาพ 1. แสดงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ตามระดับการเปลี่ยนสีของลำตัว 5 ระดับ

จากนั้นนำตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิมาสกัด RNA โดยใช้ D-solution แล้วนำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อให้ได้ cDNA ตามลำดับ

1.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP* ของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมน 20E ความเข้มข้นต่างๆ โดยการแบ่งหนอนเยื่อไผ่ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดฮอร์โมน 20E ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 2 ฉีดฮอร์โมน 20E ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 3 ฉีดฮอร์โมน 20E ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรต่อตัว

ใช้ microsyringe ฉีด 20E ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในน้ำกลั่น โดยฉีดเข้าที่ขาเทียมคู่ที่ 1 หรือ 2 ของหนอนเยื่อไผ่ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิมของหนอนเยื่อไผ่แต่ละกลุ่มๆ ละ 10 ตัว ทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาตามระดับการเปลี่ยนสีในข้อ 1.1 จากนั้นนำตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิมาสกัด RNA โดยใช้ D-solution แล้วนำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อให้ได้ cDNA ตามลำดับ

วิธีการสกัด RNA มีดังนี้

1. เตรียม D-solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเติม -mercaptoethanol ปริมาณ 7.2 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา (inverting mix)
2. เตรียม HMW buffer 50 ไมโครลิตร และเติม proteinase K ลงไป 5 ไมโครลิตร
3. ผ่าตัดต่อมโปรทอแรคซิมของหนอนเยื่อไผ่ 10 ตัว ในแต่ละกลุ่มการทดลอง ล้างด้วยสารละลายริงเกอร์
4. นำต่อมโปรทอแรคซิมทั้งหมดใส่ใน HMW buffer (ที่เตรียมไว้ในข้อ 2)
5. incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. ใช้ homogenizer บดต่อมโปรทอแรคซิมใน HMW buffer จากนั้นเติม D-solution (ที่เตรียมไว้ในข้อ 1) ลงไป 500 ไมโครลิตร บดต่อจนละเอียด โดยตั้งแต่นั้นตอนนี้นี้ต้องทำบนน้ำแข็ง
7. เติม 2M NaOAc ปริมาณ 50 ไมโครลิตร
8. เติม phenol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร
9. เติม chloroform ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
10. vortex เป็นเวลา 10 วินาที
11. incubate บนน้ำแข็ง 15 นาที
12. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
13. คูด supernatant ใส่หลอดใหม่ให้ได้มากที่สุด แล้วตกตะกอนด้วย 1 volume ของ isopropanol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
14. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. คัด supernatant ที่ได้จากนั้นละลายตะกอน (pellet RNA) ด้วย D-solution 500 ไมโครลิตร
16. ทำตามข้อ 7-15 อีกครั้ง
17. คัด supernatant ที่ได้จากนั้นล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75% ปริมาณ 500 ไมโครลิตร
18. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
19. คัดเอทานอลออกให้หมด แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
20. ละลายตะกอนที่ได้ด้วย DEPC-H₂O ปริมาณ 11 ไมโครลิตร
21. คัดสารละลาย RNA ที่ได้ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เจือจางด้วย Milli Q ปริมาณ 99 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า OD ที่ 260/280 เพื่อหาปริมาณของ RNA

ขั้นตอนการทำ DNase treatment

1. เติม 10X Dnase buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงใน RNA ปริมาณ 10 ไมโครลิตร
2. เติม DEPC-H₂O ปริมาณ 7 ไมโครลิตร
3. เติม DNase I ปริมาณ 1 ไมโครลิตร
4. incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
5. เติม 25 mM EDTA ปริมาณ 1 ไมโครลิตร
6. incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็ง
7. เติม 2 volume ของเอทานอล 99.5% และ 0.1 volume ของ 3M NaOAc pH 5.2
8. incubate ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการสังเคราะห์ cDNA โดยการทำให้ reverse transcription ต่อไป

ขั้นตอนการทำ Reverse Transcription

1. นำสารละลายจากข้อ 8. มาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. คัดเอทานอลออกให้หมด แล้วเติมเอทานอล 75% ปริมาณ 200 ไมโครลิตร
3. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. คัดเอทานอลออกให้หมด แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
5. ละลายตะกอนที่ได้ด้วย DEPC-H₂O ปริมาณ 11 ไมโครลิตร
6. คัดสารละลาย RNA ที่ได้ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เจือจางด้วย Milli Q ปริมาณ 99 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 260/280 เพื่อคำนวณหาปริมาณ RNA ที่ได้
7. คำนวณ 0.2 ไมโครกรัมของ RNA ที่ได้ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 11 ไมโครลิตรด้วย DEPC-H₂O
8. เติม TMN ปริมาณ 2 ไมโครลิตร
9. incubate ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีโดยใช้เครื่อง PCR จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งทันที

10. เติม 10x RT buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร
11. เติม 10mM dNTPs ปริมาณ 2 ไมโครลิตร
12. เติม DEPC-H₂O ปริมาณ 2.8 ไมโครลิตร
13. เติม MMLV Reverse Transcriptase ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร
14. incubate ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้
 - อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
 - อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 - อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
15. เติม TE ปริมาณ 80 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็น template สำหรับทำ PCR ต่อไป

ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. Reaction volume ที่ใช้ มีดังต่อไปนี้

10X Taq buffer	1	ไมโครลิตร
2mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	1	ไมโครลิตร
Forward primer	0.2	ไมโครลิตร
Reverse primer	0.2	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.05	ไมโครลิตร
Milli Q water	1	ไมโครลิตร
Template	1	ไมโครลิตร
Total	10	ไมโครลิตร

2. PCR condition

- PCR condition ของ *OfRpL3*

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 จำนวน รอบ

- PCR condition ของ *OfEcR-A*

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
จำนวน รอบ

- PCR condition ของ *OfEcR-B1*

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
จำนวน รอบ

- PCR condition ของ *OfUSP-2*

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
จำนวน รอบ

3. นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR 10 ไมโครลิตรผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร มา load บน 1.2% agarose gel โดยใช้ gel electrophoresis กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ 180 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 25 นาที
4. ย้อมเจลด้วย ethidium bromide 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 30 นาที
5. ถ่ายรูปเจลที่ได้ด้วย Biodoc-it® imaging system แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของ แถบแบนที่เกิดขึ้น โดยใช้โปรแกรม NIH image

การทดลองที่ 2: การศึกษาผลของ JHA และ 20E ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *EcR-B1* และ *OfUSP* ในสถานะ *in vitro*

ทำการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ โดยใช้หนอนเยื่อไผ่จากธรรมชาติในช่วงเดือนสิงหาคม 2551 ถึงเดือนมกราคม 2552 จากนั้นทำการสกัด RNA จากต่อมโปรทอแรคซิกที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ D-solution แล้วนำ RNA ที่ได้มาทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อให้ได้ cDNA ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR

2.1 การศึกษาผลของ 20E ต่อการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *EcR-B1* และ *OfUSP* ในสถานะ *in vitro* โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิกใน Grace's insect medium

กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิกใน Grace's insect medium ที่เติม 20E ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

โดย Grace's insect medium ที่ใช้ในการทดลองจะเติมยาปฏิชีวนะ ได้แก่ penicillin, streptomycin และ kanamycin อย่างละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิกในตู้ปลอดเชื้อ ซึ่งอุปกรณ์ที่ใช้ต้องผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อตามความเหมาะสม โดยวิธีการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิกมีดังนี้

1. นำอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิก รวมทั้งน้ำกลั่น เอทานอล และ สารละลายริงเกอร์ (ยกเว้น Grace's insect medium, FBS และยาปฏิชีวนะ) ฟ่นเอทานอล 70% แล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อเพื่อเปิด UV อย่างน้อย 15 นาที

1. เตรียม Grace's insect medium ที่ปรับ pH 6.37 มาเติม FBS 10% และยาปฏิชีวนะอย่างละ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. แบ่ง Grace's insect medium ที่เตรียมได้จากข้อ 2 มาเติม 20E ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. กรอง Grace's insect medium ที่เติมฮอร์โมนแล้ว โดยใช้ filter ขนาด 0.22 ไมครอน ต่อกับหลอดฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร
4. แบ่ง Grace's insect medium ที่กรองแล้ว ใส่ใน petridish ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิก 10 คู่
5. ฟ่นเอทานอล 70% ก่อนนำหนอนเยื่อไผ่เข้าตู้ปลอดเชื้อ
6. นำหนอนเยื่อไผ่จุ่มในเอทานอล 70% นานประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง
7. ทำการผ่าตัดเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่
8. ล้างต่อมโปรทอแรคซิกด้วยสารละลายริงเกอร์ 3 ครั้ง และ Grace's insect medium ที่ปรับ pH แล้ว 1 ครั้ง ก่อนจะนำต่อมโปรทอแรคซิกใส่ลงใน petridish ที่เตรียมไว้ในข้อ 5
9. ปิดฝา petridish นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส

10. นำตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิคหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง มาสกัด RNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

2.2 การศึกษาผลของ JHA ต่อการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *EcR-B1* และ *OfUSP* ในสภาวะ *in vitro* โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิคใน Grace's insect medium

กลุ่มที่ 2 เพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิคใน Grace's insect medium ที่เติม JHA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิคในตู้ปลอดเชื้อและเพาะเลี้ยงใน Grace's insect medium ที่ได้แบ่งกลุ่มไว้ โดยเพาะเลี้ยงตามช่วงเวลาที่ได้เลือกไว้ในผลการทดลองข้อ 2.1 จากนั้นนำตัวอย่างของต่อมโปรทอแรคซิคมาสกัด RNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการทดลองโดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของฮอร์โมน JHA และ 20E จาก 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็น 0.1 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิคในตู้ปลอดเชื้อและเพาะเลี้ยงใน Grace's insect medium โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิคมาสกัด RNA เพื่อใช้ในการตรวจสอบ Dose independent ต่อการแสดงออกของยีน *OfEcR-A*, *EcR-B1* และ *OfUSP* ในสภาวะ *in vitro* ของหนอนเยื่อไผ่

การทดลองที่ 3: การโคลนยีนอัลตราสไปราเคิล (Ultraspiracle protein: USP) และศึกษาผลของ JHA และ 20E ต่อการแสดงออกของ USP mRNA ในหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส

ทำการหยดฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรอะซิโตน แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิคของหนอนเยื่อไผ่ทุกๆ 2 วัน แล้วทำการสกัด RNA จากต่อมโปรทอแรคซิคออกมา เมื่อได้ RNA แล้วจึงนำ RNA ที่ได้ไปทำ DNase treatment และ reverse transcription เพื่อใช้เป็น template ในการทำ PCR ต่อไป สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR เป็น degenerated primer ที่ออกแบบโดยอาศัย conserved region ของ USP ในหนอนใบยาสูบ โดยแถบเบสที่เกิดจาก PCR นำมาทำ gene clean แล้วจึงนำไป insert ใน plasmid DNA โดยการทำ ligation จากนั้นนำ plasmid DNA ดังกล่าวไปทำการ transformation ใน *E.coli* ทำการตรวจหา plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนยีนที่ต้องการเมื่อตรวจพบแล้วทำการสกัด plasmid DNA เพื่อนำไปหาลำดับเบสของ USP จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของ USP mRNA ในต่อมโปรทอแรคซิคของหนอนเยื่อไผ่ต่อไป

การทดลองที่ 3.1 การหาลำดับเบสของ Ultraspiracle protein

เตรียม RNA จากต่อมโปรทอแรคซิคของหนอนเยื่อไผ่ จากนั้นทำ DNase treatment แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปทำ PCR ตามวิธีการดังที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อได้แถบเบสที่ต้องการแล้วนำมาทำ gene clean และ ligation จากนั้นทำ transformation แล้วตรวจสอบ plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการ เพื่อทำการสกัด plasmid DNA แล้วนำไปหาลำดับเบสต่อไป

การทำ DNA purification โดยการทำให้ gene clean

1. ตัดแถบแบนที่ได้บน agarose gel จากการทำให้ PCR ใส่ลงในหลอดแล้วล้างน้ำหนักเจลที่ได้
2. เติม FADF buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ประมาณ 1 นาที
3. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ทุกๆ 2-3 นาที จนเจลละลายจนหมด
4. นำออกมาวางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15-20 นาที
5. วาง FADF column ในหลอด collection tube ขนาด 2 ไมโครลิตร
6. เติมน้ำละลายที่ได้จากข้อ 3 ปริมาณ 800 ไมโครลิตร ลงใน FADF column
7. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
8. นำ FADF column ใส่ลงไปใน collection tube
9. เติม wash buffer ปริมาณ 700 ไมโครลิตรลงไปใน FADF column
10. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
11. นำ FADF column ใส่ลงไปใน collection tube อีกครั้ง
12. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
13. นำส่วนของ FADF column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube
14. เติม elution buffer ปริมาณ 20-40 ไมโครลิตร บริเวณตรงกลางของ FADF column
15. วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 3 นาที จนน้ำละลาย elution buffer ถูกดูดซึมจนหมด
16. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
17. เก็บสารละลายจากข้อ 16 ไว้ที่ตู้แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำ ligation ต่อไป

การทำ Ligation

1. ใส่ plasmid DNA ที่ใช้เป็นเวกเตอร์คือ pTZ57 R/T ปริมาณ 1.80 ไมโครลิตร (100 นาโนกรัม) ลงในสารละลายที่ได้จากการทำให้ gene clean ปริมาณ 1.41 ไมโครลิตร
2. เติม ligation buffer ปริมาณ 6.0 ไมโครลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

การทำ Transformation

1. ทำให้ competent cell (*E. coli* DH10B) ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ละลายบนน้ำแข็ง
2. เตรียมสารละลาย solution A + solution B ปริมาณอย่างละ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
3. นำ competent cell ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
4. ดูด supernatant ออกจนหมด

5. เติมสารละลาย AB solution ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุกๆ 10 นาที
7. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
8. คูด supernatant ออกจนหมด
9. เติมสารละลาย AB solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตละลายตะกอนของ plasmid DNA ที่ก้นหลอด
10. วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
11. แบ่งสารละลายของ plasmid DNA ออกเป็น 2 หลอดๆ ละ 100 ไมโครลิตร
12. เติมสารละลาย ligation mixture ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
13. วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
14. คูดสารละลายของ plasmid DNA จากทั้งสองหลอด หยดลงไปในจานเพาะเลี้ยง (LB agar plate) ที่มี IPTG, X-gal อย่างละ 40 ไมโครลิตร และ ampicillin 20 ไมโครลิตร
15. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

การสกัด plasmid DNA โดยใช้ GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit

1. เลือกโคโลนีสีขาว นำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาดกลาง โดยใช้ LB medium ปริมาณ 1-5 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
2. เมื่อครบเวลาที่เพาะเลี้ยง ให้ย้ายลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
4. เติม resuspension solution ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
5. เติม lysis solution ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายเหนียวข้น
6. เติม neutralization solution ปริมาณ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายเหนียวข้น มีตะกอนขุ่นสีขาว
7. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
8. คูด supernatant ออกแล้วถ่ายลงหลอดใหม่
9. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
10. คูด supernatant ออกแล้วใส่ลงใน spin column ปริมาณ 450 ไมโครลิตร
11. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
12. นำ spin column ออกแล้วใส่ในหลอดใหม่ คูด supernatant ใส่ลงไปอีกครั้ง ปริมาณ 450 ไมโครลิตร
13. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
14. นำ spin column ออกแล้วใส่ในหลอดใหม่
15. เติม wash solution ปริมาณ 500 ไมโครลิตร

16. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
17. นำ spin column ออก จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ภายในหลอดทิ้ง
18. เติม wash solution ปริมาณ 500 ไมโครลิตร
19. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
20. นำ spin column ใส่ลงในหลอดใหม่
21. เติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร
22. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
23. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
24. เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง

1. การหาลำดับเบสของ Ultraspiracle protein (USP) ในหนอนเยื่อไผ่

จากการศึกษาพบว่า USP ในหนอนเยื่อไผ่ มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ USP-1 และ USP-2 ซึ่งการผลการทดลองได้ทำการหาลำดับเบสของ USP-2 (*Omphisa* USP-2) พบว่ามีขนาด 2005 คู่เบส หรือคิดเป็นกรดอะมิโน 409 ตัว (ภาพ 2) เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ USP ในแมลงชนิดอื่นๆ ที่มีข้อมูลใน GeneBank database แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS พบว่ามี identity ของ nucleotide สูงที่สุดใน rice stem borer (*Chilo suppressalis*: CsUSP) คิดเป็น 82.07% และมี identity ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับ common fruit fly (*Drosophila melanogaster*: DmUSP) คิดเป็น 71.79% สำหรับ identity ของ *OfUSP* กับแมลงชนิดอื่นๆ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้คือ USP ของ cluster caterpillar (*Spodoptera litura*: SlUSP) คิดเป็น 81.60%, USP ของหนอนใบยาสูบ (*M. sexta*: MsUSP) คิดเป็น 80.23%, USP ของหนอนไหม (*Bombyx mori*: BmUSP) คิดเป็น 79.33% และ USP ของ spruce budworm (*Choristoneura fumifera*: CfUSP) คิดเป็น 77.73%(ภาพที่ 3 และ ตารางที่ 1)

ภาพที่ 2 แสดงลำดับเบส (DNA sequence) และลำดับกรดอะมิโนของยีน *OfUSP-2*

[illegible]

47

Species	Identity (%)
<i>Chilo suppressalis</i> (CsUSP)	82.07
<i>Spodoptera litura</i> (SlUSP)	81.60
<i>Manduca sexta</i> (MsUSP)	80.23
<i>Bombyx mori</i> (BmUSP)	79.33
<i>Drosophila melanogaster</i> (DmUSP)	71.79

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปรียบเทียบ identity ระหว่าง USP ในแมลงกลุ่มอื่นๆ

2. ผลของ JHA และ 20E ต่อการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B* และ *OfUSP-2* ในต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส ในสถานะ *in vivo*

การทดลองนี้ได้ให้ฮอร์โมน JHA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้คือ 0.1, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรอะซิโตนแก่หนอนเยื่อไผ่ ในช่วงเดือนกันยายน 2550 จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิกทุกๆ 2 วัน จนหนอนเยื่อไผ่เข้าสู่ระยะ G3 จากนั้นนำตัวอย่างต่อมโปรทอแรคซิกมาสกัด RNA แล้วนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B* และ *OfUSP-2* mRNA โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบตรงตำแหน่ง A/B specific region ของทั้ง *OfEcR-A*, *OfEcR-B* และ *OfUSP-2* ซึ่งมีความจำเพาะแต่ละไอโซฟอร์ม (isoform-specific primers) ทำให้ได้ PCR product ที่มีขนาด 123, 251 และ 177 คู่เบสตามลำดับ โดยในการทดลองนี้ใช้ *OfRpL3* เป็น internal standard หรือ reference gene

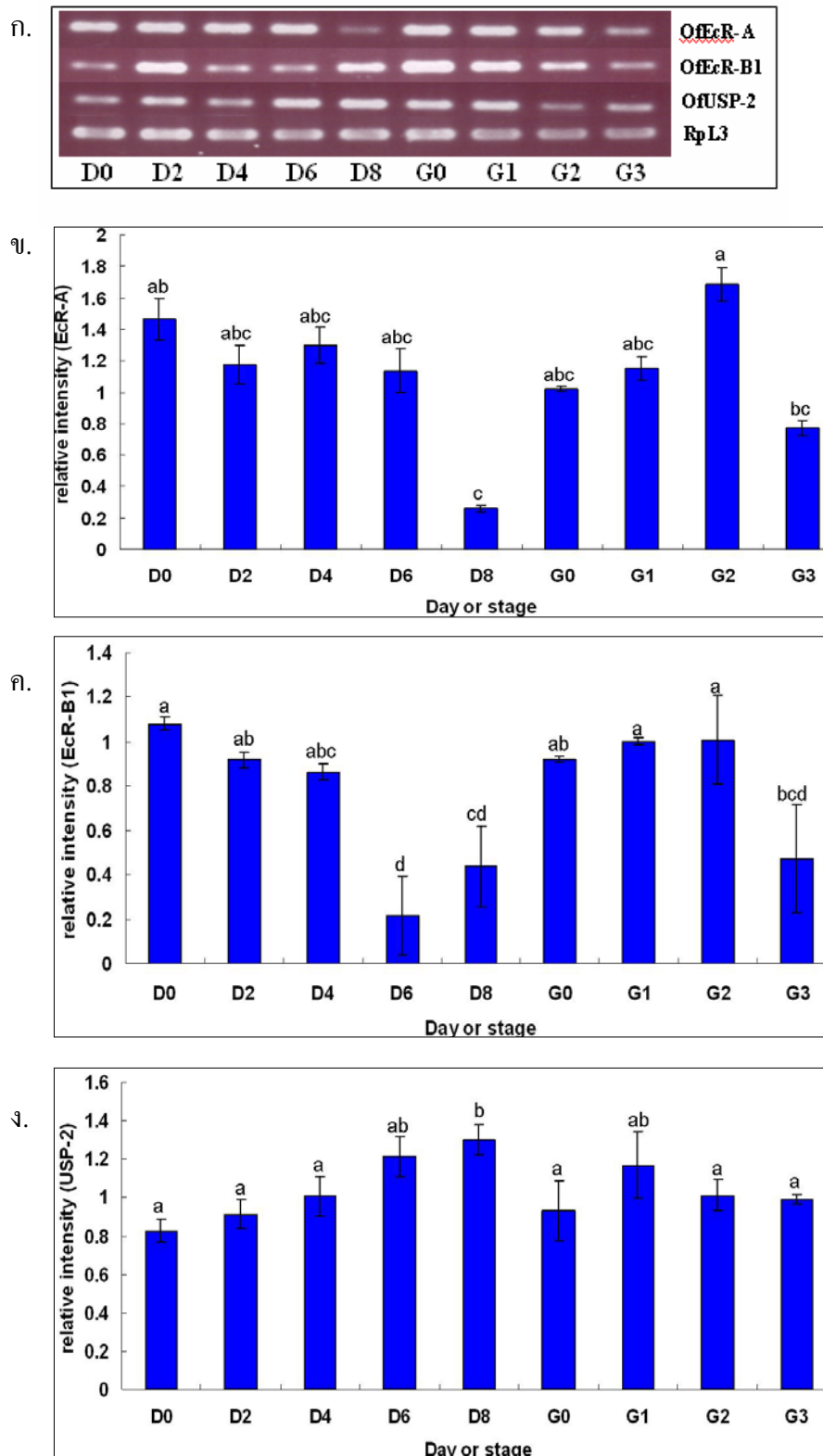
2.1 ผลของฮอร์โมน JHA ต่อการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP-2* mRNA ในต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ในสถานะ *in vivo*

เมื่อทำการ amplify *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP-2* mRNA ของแต่ละยีนแล้วนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR analysis โดยนำแถบแบนที่ได้จากการทำ PCR (ภาพ 4ก) ในแต่ละครั้งมาทำการหา intensity จากนั้นหาค่าเฉลี่ยแล้วเทียบกับ *OfRpL3* แล้วนำค่าทุกค่าเทียบกับ D0 เพื่อให้ได้ relative intensity ผลการทดลองพบว่า *OfEcR-A* mRNA จะค่อยๆ ลดลงในวันที่ 2 หลังจากได้รับฮอร์โมน และลดลงต่ำสุดในวันที่ 8 จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงระยะ G0 จนถึงระยะ G2 โดยมีปริมาณสูงที่สุดในระยะ G2 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงอีกครั้งในระยะ G3 (ภาพ 4ข)

ส่วนการแสดงออกของ *OfEcR-B1* mRNA นั้นพบว่าจะค่อยๆ ลดลงในวันที่ 2 เช่นเดียวกัน และลดลงต่ำสุดในวันที่ 6 จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 8 จนถึงระยะ G2 โดยในระยะ G1 และ G2 จะอยู่ในระดับเดียวกันหรือใกล้เคียงกัน แต่จะลดลงอีกครั้งในระยะ G3 (ภาพ 4ค) สำหรับการแสดงออกของ *OfUSP-2* mRNA จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 6 ของการได้รับฮอร์โมน และค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 8 และจะลดลงในช่วงระยะ G0 แต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะ G1 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงอีกครั้งในช่วงระยะ G2 และ G3 (ภาพ 4ง)

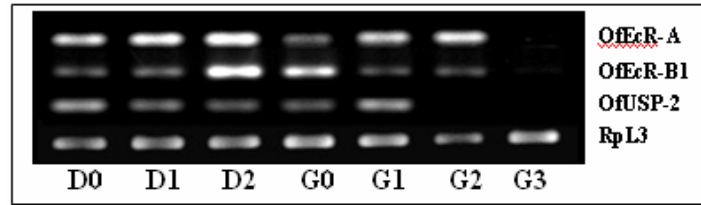
2.2 ผลของฮอร์โมน 20E ต่อการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP-2* mRNA ในต่อมไทรอยด์ของหนอนเยื่อไผ่ในสถานะ *in vivo*

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ *OfEcR-A* mRNA หลังจากที่ได้รับฮอร์โมน 20E พบว่าการแสดงออกของ *OfEcR-A* mRNA (ภาพที่ 5ข) จะเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 จนถึงวันที่ 2 จากนั้นจะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะ G0 แต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระยะ G1 จนถึงระยะ G2 โดยเพิ่มสูงสุดในระยะ G2 แต่จะลดลงอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะ G3 และจากการวิเคราะห์การแสดงออกของ *OfEcR-B1* mRNA (ภาพที่ 5ค) พบว่าค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 หลังจากได้รับฮอร์โมน และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงตั้งแต่ระยะ G0 จนถึงระยะ G3 ซึ่งในระยะ G3 จะลดลงต่ำสุด สำหรับการแสดงออกของ *OfUSP-2* mRNA จะค่อยๆ ลดลงในวันที่ 1 จนถึงระยะ G0 แต่จะเพิ่มขึ้นในระยะ G1 และค่อยๆ ลดลงอีกครั้งเมื่อเข้าสู่ระยะ G2 และ G3 (ภาพที่ 5ง)

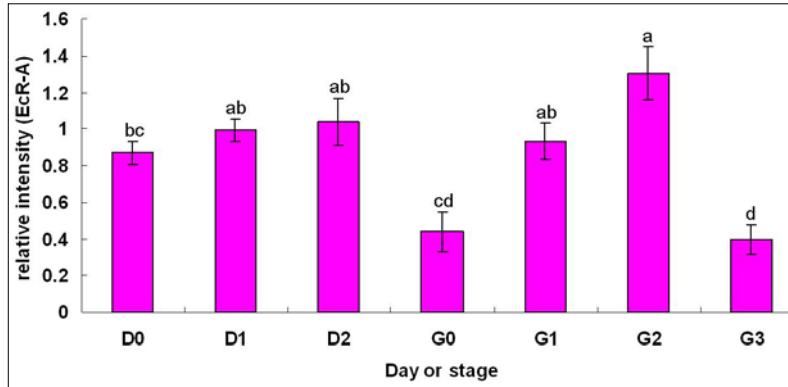


ภาพที่ 4 แสดงแถบแบน (ก) และค่า relative intensity ที่วิเคราะห์ได้จากแถบแบนของ *OfEcR-A* (ข), *OfEcR-B1* (ค) และ *OfUSP-2* (ง) ในต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 1. ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรอะซิโตน โดยแต่ละจุดคือค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. (n=3) และตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

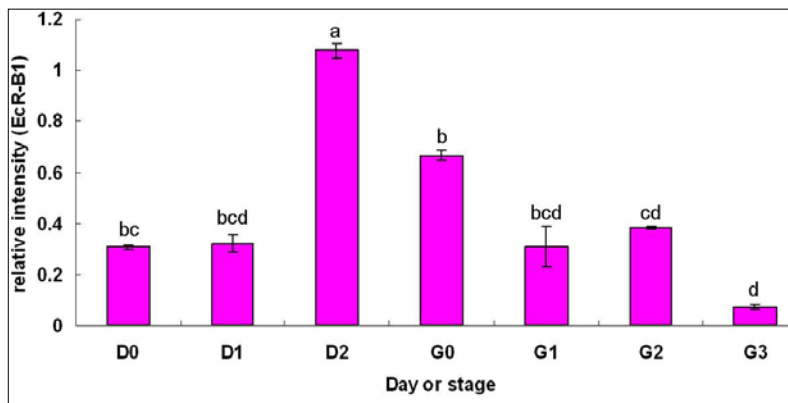
ก.



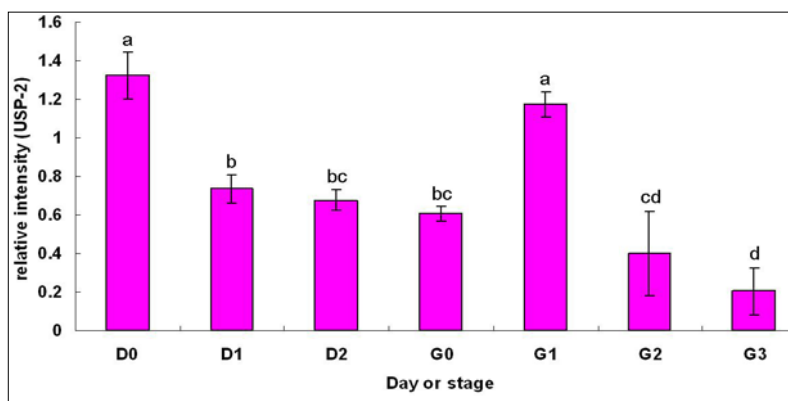
ข.



ค.



ง.



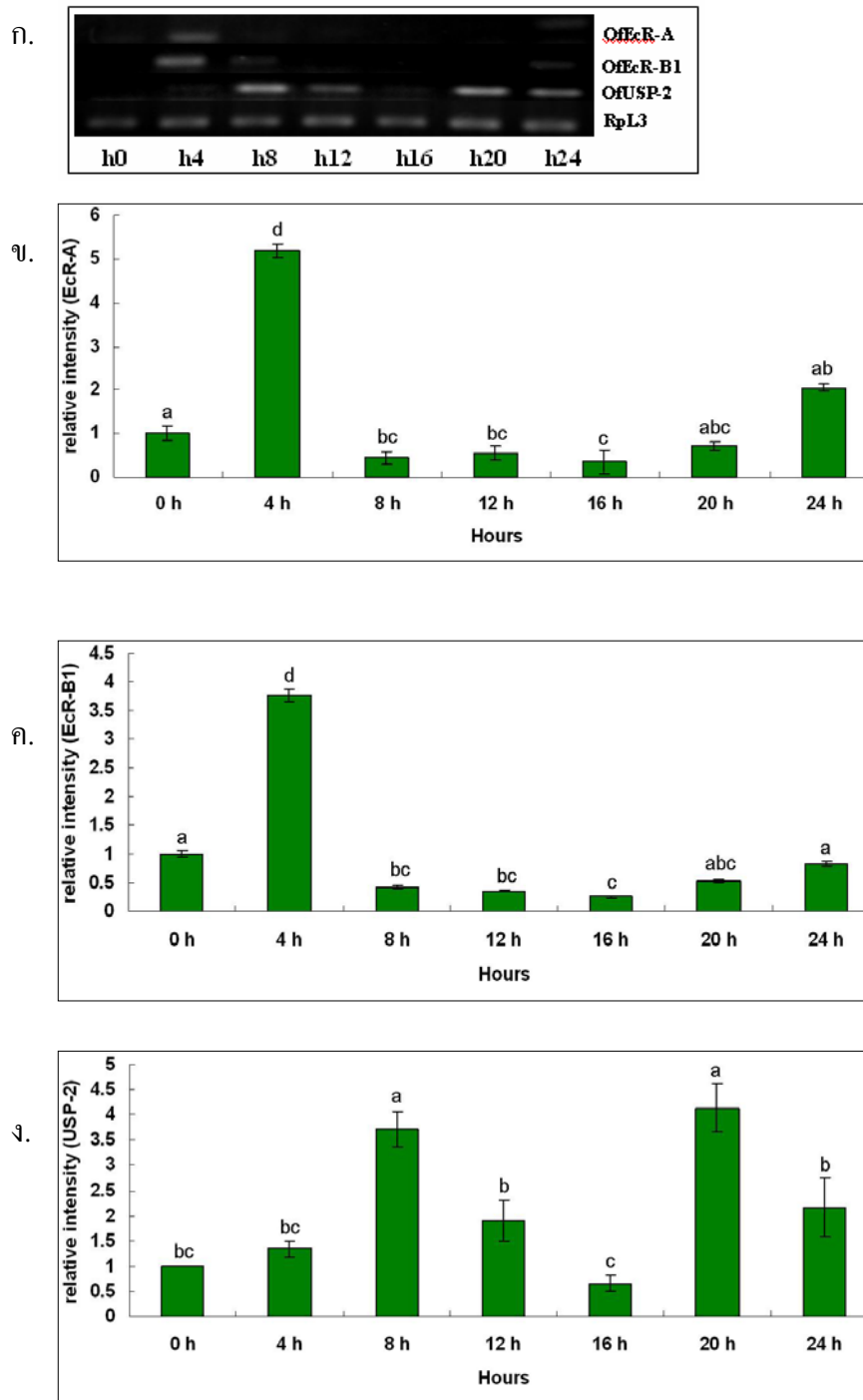
ภาพ ที่ 5 แสดงแถบแบน (ก) และค่า relative intensity ที่วิเคราะห์ได้จากแถบแบนของ *OfEcR-A* (ข), *OfEcR-B1* (ค) และ *OfUSP-2* (ง) ในต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ที่ได้รับฮอร์โมน 20E ความเข้มข้น 1.0

ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตรอะซิโตน โดยแต่ละจุดคือค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. (n=3) และตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

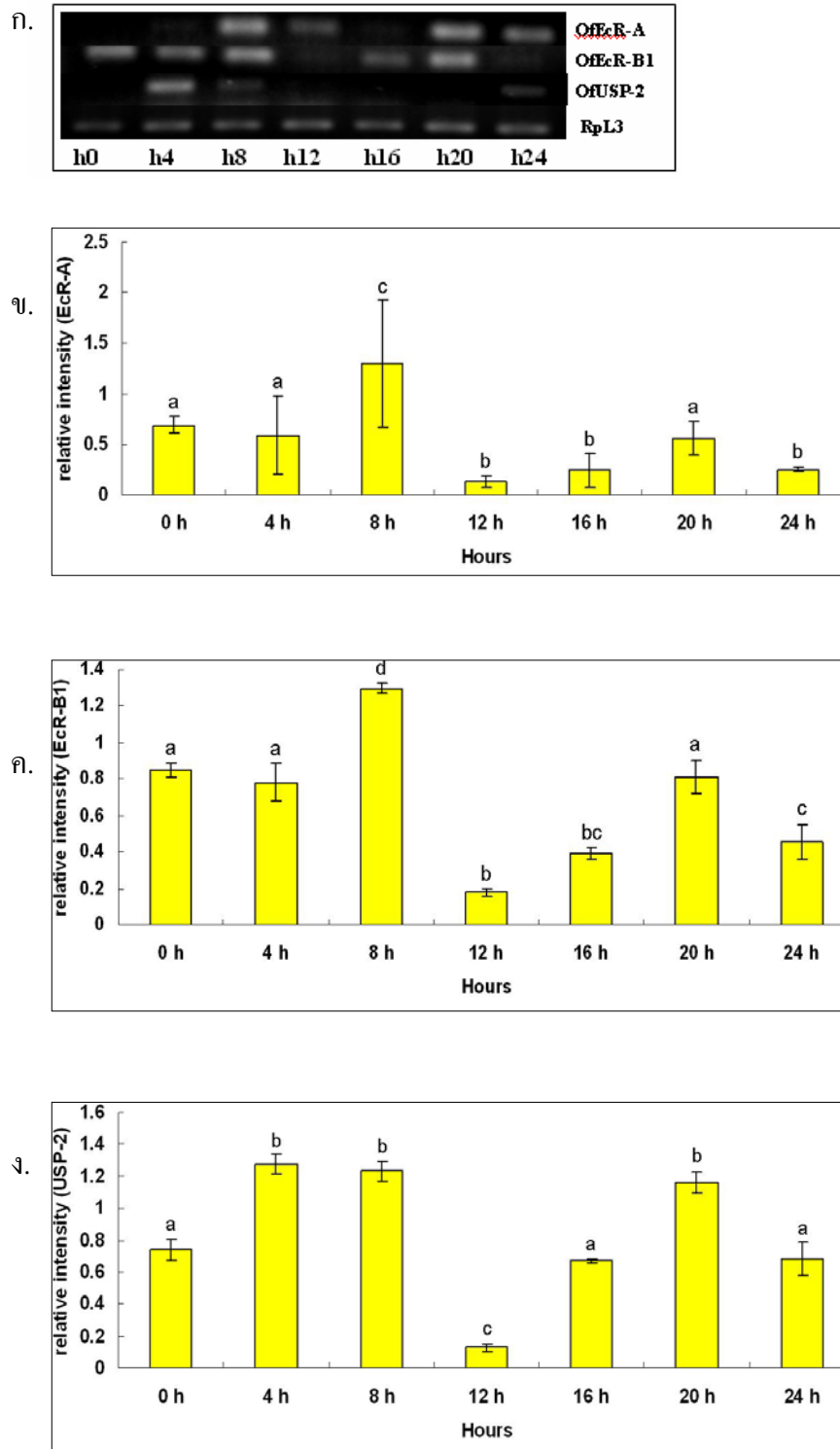
3. ผลของ JHA และ 20E ต่อการแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP-2* mRNA ในต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ในสถานะ *in vitro*

การทดลองนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อไผ่ใน Grace's insect medium ที่เติมฮอร์โมน JHA และ 20E ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นสกัด total RNA จากต่อมโปรทอแรคซิกที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ *OfEcR-A*, *OfEcR-B1* และ *OfUSP-2* mRNA โดยผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิกที่เติม 20E ลงไป ปริมาณของ *OfEcR-A* mRNA (ภาพที่ 6ข) จะเพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 4 จากนั้นจะลดลงในช่วงโม่งที่ 8 จนถึงช่วงโม่งที่ 20 และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงโม่งที่ 24 เช่นเดียวกับการแสดงออกของ *OfEcR-B1* mRNA (ภาพที่ 6ค) จะเพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 4 เหมือนกับ *OfEcR-A* mRNA และจะค่อยๆ ลดลงตั้งแต่ช่วงโม่งที่ 8 จนถึงช่วงโม่งที่ 20 และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงโม่งที่ 24 เช่นกัน ส่วนปริมาณการแสดงออกของ *OfUSP-2* mRNA จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 4 ถึงช่วงโม่งที่ 8 และค่อยๆ ลดลงในช่วงโม่งที่ 12 ถึงช่วงโม่งที่ 16 จากนั้นจะเพิ่มสูงอีกครั้งในช่วงโม่งที่ 20 และลดลงในช่วงโม่งที่ 24 (ภาพที่ 6ง)

สำหรับกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงต่อมโปรทอแรคซิกที่เติม JHA ลงไป พบว่าปริมาณของ *OfEcR-A* mRNA (ภาพที่ 7ข) จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 8 จากนั้นจะลดลงในช่วงโม่งที่ 12 จนถึงช่วงโม่งที่ 24 ซึ่งคล้ายกับการแสดงออกของ *OfEcR-B1* mRNA (ภาพที่ 7ค) ที่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 8 เช่นเดียวกัน แต่จะค่อยๆ ลดลงในช่วงโม่งที่ 12 แต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 16 ถึงช่วงโม่งที่ 20 จากนั้นจะลดลงอีกครั้งในช่วงโม่งที่ 24 ส่วนการแสดงออกของ *OfUSP-2* mRNA (ภาพที่ 7ง) จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงโม่งที่ 8 และ 12 จากนั้นจะลดลงในช่วงโม่งที่ 16 และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงช่วงโม่งที่ 20 และลดลงอีกครั้งในช่วงโม่งที่ 24



ภาพที่ 6 แสดงแถบแบน (ก) และค่า relative intensity ที่วิเคราะห์ได้จากแถบแบนของ *OfEcR-A* (ข), *OfEcR-B1* (ค) และ *OfUSP-2* (ง) ในต่อมโปรทอเรกซ์ของหนอนเชื้อไฟในอาหารที่เติมฮอร์โมน 20E ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละจุดคือค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. (n=3) และตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 7 แสดงแถบแบน (ก) และค่า relative intensity ที่วิเคราะห์ได้จากแถบแบนของ *OfEcR-A* (ข), *OfEcR-B1* (ค) และ *OfUSP-2* (ง) ในต่อมโปรทอแรคซิกของหนอนเยื่อใยในอาหารที่เติมฮอร์โมน JHA ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแต่ละจุดคือค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. (n=3) และตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทวิจารณ์

การลอกคราบและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงถูกควบคุมโดย molting hormone หรือ ecdysone ซึ่งมีการศึกษากลไกของฮอร์โมนนี้ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) (Riddiford and Pelham 1987; Koelle *et al.*, 1991, Yoa *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993) 20E จะจับกับ heterodimer ของ ecdysone receptor(EcR) และ ultraspiracle protein(USP) โดยควบคุมการ transcription ของยีนเป้าหมายโดยการจับกับ ecdysone response elements (EcREs) ทั้ง EcR และ USP จัดอยู่ใน nuclear receptor superfamily ซึ่งประกอบด้วย 5 domains คือ A/B, C, D(DNA binding), D, E (ligand binding) และ F region ใน *Omphisa fuscidentalis* USP-2 (OfUSP-2) ยีนประกอบด้วย 2005bp หรือ 409 aa (กรดอะมิโน) ซึ่งในกลุ่ม Lepidoptera USP โดย OfUSP-2 จะมีความเหมือนสูงสุดเมื่อเทียบกับ *Chilo suppressalis* (81%) และ มีความเหมือนต่ำสุดเมื่อเทียบกับ *D. melanogaster* (71%)

ในการวัดการแสดงออกของยีนโดยวัดจากปริมาณของ OfUSP-2, OfEcR-A และ OfEcR-B1 mRNA ของต่อมโปรทอแรคซิก โดยเทคนิค semi-quantitative PCR หลังจากการให้ฮอร์โมน 20E พบว่าระดับของ OfUSP-2 mRNA ลดลงในช่วง D1-G0 แต่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระยะ G1 และลดลงในระยะ G2-G3 ส่วนระดับของ OfEcR-A mRNA หลังจากให้ 20-hydroxyecdysone เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงวันที่ 1(D1) และ 2(D2) และลดลงที่ระยะ G0 และลดลงอย่างรวดเร็วอีกครั้งที่ระยะ G1 และ G2 ในทางตรงกันข้ามระดับของ OfEcR-B1 mRNA จะเพิ่มสูงสุด(peak) ในวันที่ 2(D2) หลังจากให้ฮอร์โมน

ผลงานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของ OfEcRs mRNA ใน ต่อมโปรทอแรคซิก จะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ ecdysteroid ในอีโมลิฟของระยะ prepupal stage และการ molting ในการให้ฮอร์โมน 20E จะกระตุ้นกิจกรรมของต่อมโปรทอแรคซิก ในการสังเคราะห์และหลั่ง ecdysteroid ในอีโมลิฟ และเพิ่มการแสดงออกของ OfEcRs และ OfUSP-2 mRNA ดังนั้นในการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณ ecdysteroid และ ecdysone receptor complex มีผลต่อกิจกรรมการหลั่งโดยผ่านทางกลไกการควบคุมย้อนกลับ

เอกสารอ้างอิง

- Beydon, P. and Lafont, R. 1983. Feedback inhibition of ecdysone production by 20-hydroxyecdysone in *Pieris brassicae* pupae. *J. Insect Physiol.*, 29 : 529-533.
- Bollenbacher, W.E., Katahira, E.J., O'Brien, M., Gilbert, L.I., Thomas, M.K., Agui, N. and Baumhover, A.H. 1984. Insect prothoracicotropic hormone: Evidence for two molecular forms. *Science*, 244 : 1243-1245.
- Bruning, E. and Lanzrein R. 1987. Function of juvenile hormone III in embryonic development of the cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Int. J. Insect Reprod. Dev.*, 12 : 29-44.
- Chippendale, G.M. and Yin, C.M. 1976. Endocrine interactions controlling the larval diapause of the Southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *J. Insect Physiol.*, 22 : 989-995.
- Chippendale, G.M. and Yin, C.M. 1979. Larval diapause of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* : further experiments examining its hormonal control. *J. Insect Physiol.*, 25 : 53-58.
- Dean, R.L., Bollenbacher, W.E., Locke, M., Smith, S.L. and Gilbert, L.I. 1980. Haemolymph ecdysteroid levels and cellular events in the intermonth/moult sequence of *Calpodes ethlius*. *J. Insect Physiol.*, 26 : 267-280.
- Fujiwara, H., Jindra, M., Newitt R., Palli S.R. and Riddiford, L.M. 1995. Cloning of ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 25 : 845-856.
- Gilbert, L.I., Song, Q. and Rybczynski. 1997. Control of ecdysteroidogenesis : Activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invert. Neurosci.*, 3 : 205-216.
- Hiruma, K., Hardie, J. and Riddiford L.M. 1991. Hormonal regulation of epidermal metamorphosis *in vitro* : control of expression of larval-specific cuticle gene. *Dev. Biol.*, 144 : 369-378.
- Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujishita, M., Moriya, I., O'oka, H., Kataoka, H., Isogai, A., Nagasawa, H., Tamura, S. and Suzuki, A. 1983. Species specificity of the insect prothoracicotropic hormone (PTTH) : the presence of Bombyx- and Samia-specific PTTHs in the brain of *Bombyx mori*. *Dev. Grow. Diff.*, 25 : 593-600.
- Ishizaki, H. and Suzuki, A. 1984. Prothoracicotropic hormone of *Bombyx mori*. In J. Hoffmann and M. Profect (Eds.), *Biosynthesis Metabolism and mode of action of Invertebrate Hormones* (pp. 63-77), Springer-Verlag, Berlin.
- Jindra, M., Malone, F., Hiruma, K. and Riddiford, L.M. 1996. Developmental profile and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology.*, 180 : 258-272.

- Kamimura, M., Tomita, S. and Fujiwara, H., 1996. Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. *Biochem. Physiol. Mol. Biol.*, 113 : 341-347.
- Kamimura, M., Tomita, S., Kiuchi, M. and Fujiwara, H. 1997. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms ecdysteroid-dependent transcription in culture anterior silk glands. *Eur. J. Biochem.*, 148 : 786-793.
- Kiguchi, K. and Riddiford L.M. 1978. The role of juvenile hormone in pupal development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, 24 : 673-680.
- Kothapalli R., Palli S.R., Ladd T.R., Sohi S.S., Cress, D., Dhadialla, T.S., Tzertzinis, G. and Retnakaran A. 1995. Cloning and developmental expression of the ecdysone receptor gene from the spruce budworm, *choristoneura fumiferana*. *Dev. Genet.*, 17 : 319-330.
- Nijhout, H.F and Wheeler D.E. 1982. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quart. Rev. Biol.*, 57 : 109-133.
- Nijhout, H.F. 1994. Diapause. In *Insect hormones*, (pp. 168) Princeton, Princeton University Press.
- Riddiford, L.M. 1980. Progress in Ecdysone Research. In Hoffmann (Ed.), (pp. 403-430) *Hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm*, Amsterdam, Elsevier North-Holland Biomedical Press.
- Riddiford L.M. 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor*, 3(3), 203-209.
- Sakurai, S. and Imokawa, H. 1988. Developmental arrest induce by juvenile hormone in larvae of *Bombyx mori*. *Arch. Insect biochem. Physiol.*, 8 : 219-228.
- Sakurai, S. and Williams, C.M. 1989. Short-loop negative and positive feedback on ecdysone secretion by prothoracic gland in the toba, Y.C.cco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. comp. Endocrinnol.*, 75 : 204-216.
- Sakurai, S., Warren, J.T. and Gilbert, L.I. 1991. Ecdysteroid synthesis and molting by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, in the absence of prothoracic glands. *Arch. Insect Physiol.*, 21 : 873-887.
- Sakurai, S., Kaya, M. and Satake, S.H. 1998. Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid dependent developmental events in the last larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori* : role of low ecdysteroid titer in larval pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. *J. Insect Physiol.*, 44 : 867-881.
- Siew, Y.C. and Gilbert, L.I. 1971. Effects of molting hormone and juvenile hormone on insect endocrine gland activity. *J. Biol. Chem.*, 278 : 732-738.

- Singtripop, T., Wanichacheewa, S., Tsuzuki, S. and Sakurai, S. 1999. Larval growth and diapause in a tropical moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson. *Zoological science*, 16 : 725-733.
- Singtripop, T., Wanichacheewa, S. and Sakurai, S. 2000. Juvenile hormone-mediated of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis* Hampson. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 30 : 847-854.
- Slama, K. 1995. The present status of the mode of action of insect juvenile hormone. *J. Zool.*, 45 : 71-78.
- Smith, S.L. 1985. Regulation of ecdysteroid titer: Synthesis. in G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Phamacology*, vol. 7 (pp.295-341), New York : Pergamon Press.
- Song, Q. and Gilbert, L.I. 1998. Alterations in ultraspiracle (USP) content and phosphorylation state accompany feedback regulation of ecdysone synthesis in the insect prothoracic gland. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 : 849-860.
- Spark, T.C., Hammock, B.D. and Riddiford, L.M. 1983. The haemolymph juvenile hormone esterase of *Manduca sexta* (L.)-inhibition and regulation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 27(11) : 973-982.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A. and Masaki, S. 1986. Seasonal adaptation of insects.(pp. 67-110). Oxford, Oxford University Press.
- Venkataraman, V., O' Mahony P.J., Manczak M. and Jones G. 1994. Regulation of juvenile hormone esterase gene transcription by juvenile hormone. *Dev. Genet.*, 15 : 391-400.
- Wigglesworth, V.B. 1934. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling molting and metamorphosis. *Q.J. Microsc. Sci.*, 77 : 121-122.
- Winggleworth, V.B. 1972. The principle of insect physiology, 7 Ed. (pp. 61-145) Cambridge : Cambridge University Press.
- Wiggleworth, V.B. 1976. Juvenile hormone and pattern formation. in P.A. Lawrence (Ed.), *Insect Development* (pp. 186-202), *Symp. T. Entomol. Soc. London*, Wiley & sons.
- Williams, C.M. 1952. Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the *Cercopia silkworm*. *Biol. Bull.*, 103 : 120-138.
- Williams, C.M. 1956. The juvenile hormone of insects. *Nature*, 178 : 212-213.
- Yagi, S. and Fukaya, M. 1974. Juvenile hormone as a key factor regulating larval diapause of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera : pyralidae). *Appl. Ent. Zool.*, 9 : 247-255.

Output จากโครงการวิจัย

- Singtripop, T.**, Manaboon, M., Tatun , N., Kaneko, Y. and Sakurai, S. 2008. Hormonal mechanism underlying the break of larval diapause by juvenile hormone in the bamboo borer, *Omphisca fuscidentalis*. Journal of Insect Physiology. 54:62-76. **Impact factor 2.294**
- Singtripop, T., Panjad, P. and Sakurai, S. 2010.** Juvenile hormone analog and 20- hydroxyecdysone induction of the *EcR* mRNA and ultraspiracle(USP) expression in the larval diapause of bamboo borer, *Omphisca fuscidentalis*. Journal of Insect Physiology. In preparation.
Impact factor 2.294
- Singtripop, T.**, Panjad, P. and Sakurai, S. 2008. Molecular cloning and expression analysis of ultraspiracle (USP) in the bamboo borer *Omphisca fuscidentalis* , Thailand Research Fund Meeting, 16- 18 October, Holiday Inn Resort Regent Beach Hotel, Cha-um , Petchaburi, Thailand
- Singtripop, T., Sereewattanachai, P. and Sakurai, S. 2008. Juvenile hormone analog and 20- hydroxyecdysone induction of the wing disc development and *EcR* mRNA expression in the larval diapause of bamboo borer, *Omphisca fuscidentalis*. The Ecdysone Workshop, July 21- 24, ULM, Germany
- Singtripop, T.**, Panjad, P. and Sakurai, S. 2009. Molecular cloning and expression analysis of ultraspiracle (USP) in the bamboo borer *Omphisca fuscidentalis* , Thailand Research Fund Meeting, 16- 18 October, Holiday Inn Resort Regent Beach Hotel, Cha-um, Petchaburi, Thailand
- Tatun, N., **Singtripop, T.** and Sakurai, S. 2008. Dual control of midgut trehalase activity by 20- hydroxyecdysone and an inhibitory factor in the bamboo borer, *Omphisca fuscidentalis* Hampson. Journal of Insect Physiology. 54:351-357. **Impact factor 2.294**
- Tatun, N., **Singtripop, T.**, Tungjitwitayakul, J. and Sakurai, S. 2008. Regulation of soluble and membrane -bound trehalase activity and expression of the enzyme in the larval midgut of the bamboo borer, *Omphisca fuscidentalis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. **38:788-795. Impact factor 2.83**

ภาคผนวก

