ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การโคลนและการแสดงออกของยีน *D7-related 1* และ *D7-related 2* ของยุงก้นปล่องชนิด *Anopheles cracens*

ผู้เขียน นางสาวมนต์สุดา สุวรรณมาลี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปรสิตวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. นริศรา จริยะพันธุ์	ประธานกรรมการ
รศ. เวช ชูโชติ	กรรมการ
รศ.ดร. อัจฉรียา จิตต์ภักดี	กรรมการ

บทคัดย่อ

โปรตีน D7-related ถูกค้นพบในต่อมน้ำลายกลุ่มยุงก้นปล่องและกลุ่มยุงคิวลิสินี ยุงก้นปล่อง *Anopheles cracens* (ชื่อเดิม *An. dirus* สปีชีส์ B) เป็นพาหะสำคัญของมาลาเรียของคนในแถบภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับโปรตีน D7 ที่พบในยุง *An. cracens* ยังมีน้อย ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์สายสมบูรณ์ของ *D7-related 1* และ *D7-related 2* จาก cDNA library ที่ได้จากต่อมน้ำลายยุงเพศเมียด้วยวิธี DIG hybridization ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสมบูรณ์ของ *D7-related 1* ประกอบด้วย 613 คู่เบส ซึ่งมีบางส่วนถูกถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 166 ตัว (498 คู่เบส) โดยกรดอะมิโนเหล่านี้ประกอบด้วยบริเวณที่เป็น signal peptide ที่อยู่ด้านปลาย 5′ จำนวน 20 ตัว และบริเวณโปรตีนสมบูรณ์ 146 ตัว ซึ่งมีค่าน้ำหนักมวลโมเลกุลที่ทำนายได้ 16.3 กิโลดาลตัน (ค่า pI เท่ากับ 9.02) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์สายสมบูรณ์ของ *D7-related 2* ประกอบด้วย 589 คู่เบส ซึ่งสามารถถูกถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 169 ตัว (507 คู่เบส) โดยส่วนนี้ประกอบด้วยบริเวณ signal peptide จำนวน 20 ตัวและโปรตีนสมบูรณ์ 149 ตัว ซึ่งมีน้ำหนักมวลโมเลกุลที่ทำนายได้ 16.4 กิโลดาลตัน (ค่า pI เท่ากับ 4.9) โครงสร้างการจัดเรียงตัวของยีน *D7-related 1* และ *D7-related 2* ประกอบด้วย exon 3 ส่วนซึ่งถูกคั่นด้วย intron 2 ส่วนและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีบริเวณปลาย 5′ และปลาย 3′ ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัสอยู่ที่ส่วนหัวและท้ายของยีน การวิเคราะห์ด้วยแผนผัง Cladogram แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองนี้จัดอยู่ในแฟมิลี่ D7 นอกจากนี้ โปรตีนทั้งสองยังแสดงลักษณะที่เห็นได้เด่นชัดของการเป็นโปรตีนจับกลิ่นที่ไม่อยู่ในหนวด โดยมีตำแหน่งกรดอะมิโน cysteine อยู่ 4 ตำแหน่ง การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า *D7-related 1* และ *D7-related 2* ถูกถอดรหัสที่ต่อมน้ำลายแต่ไม่พบในเนื้อเยื่อบริเวณอื่นๆ ยกเว้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *D7-related 2* ที่มีการแสดงออกที่ระยะดักแด้ หน้าที่ที่แท้จริงของโปรตีน D7-related 1 และ D7-related 2 ยังไม่ทราบ ข้อมูลเหล่านี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี RNA interference ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Cloning and Expression of *D7-related 1* and *D7-related 2* Genes of *Anopheles cracens*
Author	Miss Monsuda Suwanmalee
Degree	Master of Science (Parasitology)
Thesis Advisory Committee	Assist. Prof. Dr. Narissara Jariyapan — Chairperson Assoc. Prof. Wej Choochote — Member Assoc. Prof. Dr. Atchariya Jitpakdi — Member

Abstract

D7-related proteins are found in salivary glands anophelines and culicines mosquitoes. *Anopheles cracens* (formerly *An. dirus* species B) is an important vector of human malaria in Southeast Asia. However, little is known about D7-related proteins of *An. cracens*. In this study, complete cDNAs encoding *D7-related 1* and *D7-related 2* were isolated by screening an adult female salivary gland cDNA library using DIG hybridization. The *D7-related 1* full-length cDNA consisted of 613 base pairs (bp). It exhibited an open reading frame (ORF) coding for 166 amino acids (498 bp), which consisted of a signal peptide of 20 amino acids at the 5′-end and mature protein of 146 amino acids with calculated molecular mass of 16.3 kilodaltons (pI 9.02). The *D7-related 2* full-length cDNA consisted of 589 bp, with ORF of 169 amino acids (507 bp), comprising a signal peptide of 20 amino acids and a mature protein of 149 amino acids with 16.4 kilodaton (pI 4.9). The structural organization gDNAs of *D7-related 1* and *D7-related 2* contained 3 exons that are separated by 2 introns, and flanked by 5′- and 3′-UTRs. Cladogram analysis indicated that D7-related 1 and D7-related 2 were members of D7 family. Furthermore,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

both showed the hallmark of the non-antennal members of odorant binding proteins, the four cysteine residues at conserved position. RT-PCR analysis indicated that the transcripts of *D7-related 1* and *D7-related 2* were detected in salivary glands of females mosquitoes but not with other tissues except *D7-related 2* cDNA which expressed in pupa stage. The precise function of D7-related 1 and D7-related 2 proteins remains unknown. These preliminary data would lead for further study in their function by RNA interference method.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved