

**EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF THE CLONED
DOMAIN II AND II-III FRAGMENTS OF THE *BACILLUS
THURINGIENSIS* CRY4Ba LARVICIDAL PROTEIN**

SEANGDEUN MOONSOM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-4733-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การแสดงออกและศึกษาคุณสมบัติของชิ้นส่วนโปรตีน DOMAIN II และ II-III ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง
ชนิด CRY4Ba จากเชื้อแบคทีเรีย *BACILLUS THURINGIENSIS*
(EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF THE CLONED DOMAIN II AND II-III
FRAGMENTS OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4Ba LARVICIDAL PROTEIN)

แสงเดือน มุลสม 4536679 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชนันท อังสุชนสมบัติ, Ph.D., GERD KATZENMEIER,
Ph.D., ปนัดดา บุญเสริม, Ph. D.

บทคัดย่อ

โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ชนิด Cry4Ba ที่ถูกกระตุ้นแล้วจะมีขนาด 65 กิโลดัลตัน ซึ่งประกอบด้วย 3 domains คือ DI DII และ DIII โดย DI เป็นส่วนเกลียวที่รับผิดชอบต่อการสร้างรูรั่ว DII เป็นส่วนที่จับกับโปรตีนตัวรับจำเพาะ (receptor) และ DIII มีลักษณะเป็น β -sandwich ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและแสดงออกของชิ้นส่วน DII และ DII-III ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง และเพื่อศึกษาคุณสมบัติของชิ้นส่วนโปรตีนดังกล่าว รวมถึงเพื่อผลิตและศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแต่ละ domain ของโปรตีน Cry4Ba โดยชิ้นส่วนยีนที่สร้าง DII และ DII-III ได้ถูกสังเคราะห์โดยวิธี PCR และทำให้แสดงออกในเชื้อ *E. coli* ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter ซึ่งชิ้นส่วนทั้งสองได้ถูกสร้างในรูปของผลึกโปรตีน (inclusions) และเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG และจากการวิเคราะห์ผลึกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ชิ้นส่วน DII และ DII-III มีขนาดประมาณ 26 และ 44 kDa ตามลำดับ สำหรับการผลิตและศึกษาวิเคราะห์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Cry4Ba โปรตีนนั้น พบว่ามีเพียง 2F-1H2 ที่สามารถจับอย่างจำเพาะกับ DIII ของโปรตีน Cry4Ba ได้ นอกจากนี้ พบว่าผลึกโปรตีนของชิ้นส่วนทั้งสอง สามารถละลายได้ในคาร์บอนดิออกไซด์ที่มียูเรียความเข้มข้น 4 M เท่านั้น ซึ่งต่างจาก ซึ่งเป็นผลึกโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงตั้งต้นที่มีขนาด 130-kDa และเมื่อทำการม้วนพับกลับ (refolding) ด้วยวิธี stepwise-dialysis พบว่ามากกว่า 70% ของชิ้นส่วนทั้งสองสามารถถูกม้วนพับกลับได้ และจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Circular dichroism spectroscopy พบว่าโปรตีนที่ม้วนพับกลับได้นี้ ประกอบด้วย β -sheet อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนทั้งสองไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ทั้งในรูปของผลึกโปรตีนหรือในรูป *E. coli* ที่แสดงออก ชิ้นส่วน DII และ DII-III นอกจากนี้ ผลของ immunohistochemical staining พบว่า ชิ้นส่วน DII-III ที่ม้วนพับกลับนี้ สามารถจับกับชิ้นเนื้อเยื่อกระเพาะส่วนกลางของลูกน้ำยุงได้อย่างชัดเจน ซึ่งผลครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าส่วน DII-III ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba นั้นเกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนตัวรับจำเพาะ และสามารถที่จะถูกแยกเป็นชิ้นส่วนเฉพาะที่ยังคงรักษาความสามารถในการทำงานได้

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF THE CLONED DOMAIN II AND II-III FRAGMENTS OF THE *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY4Ba LARVICIDAL PROTEIN

SEANGDEUN MOONSOM 4536679 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D.

ABSTRACT

The 65-kDa *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba active toxin is composed of three functional domains: a pore-forming helical domain (DI), a receptor-binding domain (DII) and a β -sandwich domain (DIII). This study aimed to clone and induce protein expression of the DII fragment and the fragment composed of both DII and DIII, to functionally characterize each of these, and to produce and characterize the monoclonal antibodies specific to each of the three domains.

In the procedure used, the *cry4Ba* gene segments encoding DII and DII-III were amplified by polymerase chain reaction and cloned into the pMEx8 vector. Under control of the *tac* promoter, DII and DII-III were expressed in *Escherichia coli*. Both of the cloned fragments were produced as inclusion bodies upon IPTG induction. SDS-PAGE analysis of partially purified inclusions of the DII and DII-III revealed the expected bands of approximately 26 and 44 kDa, respectively. In attempts to produce and characterize anti-Cry4Ba monoclonal antibodies (MAbs), only one MAb (2F-1H2) was found to bind specifically with the DIII fragment of Cry4Ba. Unlike the 130-kDa protoxin inclusions, both DII and DII-III inclusions could only be solubilized when the 50 mM Na₂CO₃ buffer (pH 10.0) was supplemented with urea at 4 M. Refolding through stepwise dialysis resulted in greater than 70% yields of these refolded proteins. Circular dichroism spectroscopy indicated that both refolded fragments have β -sheet contents. When both protein inclusions and *E. coli* cells expressing the cloned DII or DII-III fragments were bio-assayed against *Aedes aegypti* larvae, no larvicidal activity was observed. Immunohistochemical staining revealed that the refolded DII-III protein strongly binds to *A. aegypti* larval midgut sections. These results indicate that the DII-III part of the Cry4Ba toxin is involved in receptor binding interactions and could be separated as a discrete fragment that conserves at least part of its functionality.

KEY WORDS : *AEDES AEGYPTI* LARVAE / *BACILLUS THURINGIENSIS* / δ -ENDOTOXIN / IMMUNOHISTOCHEMISTRY

133 pp. ISBN 974-04-4733-3