SILENCING OF AMINOPEPTIDASE N GENE IN *Stegomyia aegypti* LARVAE

PLAIPOL DEDVISITSAKUL

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
2006

ISBN 974-04-7210-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การยับยั้งการแสดงออกของยีนอะมิโนเปปติเดสเอ็นในลูกน้ำยุงลาย
(SILENCING OF AMINOPEPTIDASE N GENE IN *Stegomyia aegypti* LARVAE)

พลายพล เดชวิศิษฎ์สกุล 4636863 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กุศล ภูธนกิจ, Ph.D., ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., เฉลิมพร องศ์วรโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

เนื่องจากการศึกษาในแมลงหลายชนิดพบว่า Aminopeptidase N (APN) น่าจะเป็นตัวรับจำเพาะต่อโปรตีน Cry แต่อย่างไรก็ตาม ตัวรับจำเพาะต่อโปรตีน Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ซึ่งมีพิษจำเพาะต่อลูกน้ำยุงลาย *(Stegomyia aegypti*) ยังไม่มีการพิสูจน์แต่อย่างใด ดังนั้นเพื่อต้องการศึกษาว่า APN ในลูกน้ำยุงลายเป็นตัวรับที่จำเพาะต่อโปรตีน Cry4Ba ด้วยหรือไม่ ในการทดลองนี้จึงได้นำเทคนิค RNA interference มาใช้เพื่อที่จะยับยั้งการแสดงออกของ APN ในลูกน้ำยุง ด้วยสองวิธีการคือ การให้ลูกน้ำยุงกิน *E. coli* ซึ่งสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่จำเพาะต่อการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน APN ในลูกน้ำยุงและการแช่ลูกน้ำยุงลายลงในสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน APN ยีนในลูกน้ำยุง หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน APN ด้วยวิธี RT-PCR ผลการทดลองพบว่าวิธีการแช่ลูกน้ำยุงลายลงในสายละลายอาร์เอ็นสายคู่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน APN ในลูกน้ำยุงได้ชัดเจน ในขณะที่วิธีให้ลูกน้ำยุงลายกิน *E .coli* ซึ่งสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน APN ได้ เพื่อตรวจสอบว่า APN ในลูกน้ำยุงเป็นตัวรับต่อโปรตีน Cry4Ba หรือไม่ หลังจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน APN ด้วยอาร์เอ็นเอสายคู่แล้วได้ให้ลูกน้ำยุงกิน *E. coli* ซึ่งสร้างโปรตีน Cry4Ba ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำยุงไม่ลดลงเมื่อเทียบกับลูกน้ำยุงที่ไม่ได้ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน APN ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า APN ไม่มีความสำคัญต่อกระบวนการเป็นพิษของโปรตีน Cry4Ba ต่อลูกน้ำยุงลาย

90 หน้า. ISBN 974-04-7210-9

SILENCING OF AMINOPEPTIDASE N GENE IN *Stegomyia aegypti* LARVAE

PLAIPOL DEDVISITSAKUL 4636863 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D.

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis* synthesizes toxins which bind to specific receptor(s) located on the midgut epithelial cells of the susceptible insect larvae, leading to pore formation and eventual death. In various insect species, aminopeptidase N (APN) is considered to be a receptor of Cry toxins. However, in *Stegomyia aegypti*, the receptor has not yet been identified. Here, RNA interference technique was employed to specifically knockdown the APN expression to determine if APN is important for Cry4Ba toxin larvicidal activity against *S. aegypti* to indicate the functional role of APN as a receptor to Cry4Ba toxin. Two methods were used to deliver dsAPN RNA into the *S. aegypt*i larvae to initiate RNAi. The first method was by feeding the larvae dsAPN RNA producing *E. coli*. The second method was by soaking the larvae in dsAPN RNA solution. The suppression of APN was monitored by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that only the introduction of dsAPN RNA by the soaking method is able to inhibit the expression of APN. This knockdown of APN was sequence specific as soaking the larvae in dsGFP RNA did not show APN reduction. Then, Cry4Ba toxicity test was performed after 24 and 36 hours of soaking in dsAPN RNA. The results did not show reduction in larval mortalities, suggesting that this APN isoform is not important for Cry4Ba toxin larvicidal activity against *S. aegypti*.

KEY WORDS: AMINOPEPTIDASE N /CRY4BA TOXIN/*Stegomyia aegypti* LARVAE/RNA INTERFERENCE.

90 P. ISBN 974-04-7210-9