IDENTIFICATION OF CADHERIN-LIKE PROTEIN IN *Aedes aegypti* LARVAE

MONGKHON PANYOT

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
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนและการจำแนกยีนสร้างโปรตีนตัวเหมือนแคดฮีรีนในลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*)

(IDENTIFICATION OF CADHERIN-LIKE PROTEIN IN *Aedes aegypti* LAVAE)

มงคล ปันยศ 4737246 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์พันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคมวิทยานิพนธ์ : กุศล ภูธนกิจ Ph.D. บุญเฮียง พรมดอนกอย Ph.D.
ชนันท์ อังศุธนสมบัติ Ph.D. เฉลิมพร องศ์วรโสภณ Ph.D.

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถผลิตโปรตีนสารพิษที่เป็นพิษจำเพาะต่อตัวอ่อนของแมลง โดยโปรตีนสารพิษนี้จะจับอย่างจำเพาะต่อตัวตอบรับซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหารส่วนกลางของตัวอ่อน และเป็นสาเหตุการตายของตัวอ่อนแมลงดังกล่าว เนื่องจากการศึกษาในแมลงหลายชนิดพบว่า Cadherin-like protein (CadLP) น่าจะเป็นตัวตอบรับจำเพาะต่อโปรตีน Cry แต่อย่างไรก็ตามตัวตอบรับจำเพาะต่อโปรตีน Cry4Ba ซึ่งมีพิษจำเพาะต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ยังไม่มีการพิสูจน์แต่อย่างไร ในการศึกษานี้จึงต้องการที่จะโคลนและแยกยีน CadLP นี้จากกระเพาะอาหารส่วนกลางของลูกน้ำยุงลายโดยวิธี RT-PCR, 5´- และ 3´ RACEs จากผลการศึกษาพบว่า cDNA ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนด้านปลาย 3´ ของ CadLP ที่ได้ขณะนี้คือ 1,498 ตัว เมื่อเปรียบเทียบในฐานข้อมูล cDNA พบว่ามีลำดับอะมิโนที่คล้ายกับ CadLP จากยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae* 57% ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำเทคนิค RNA interference มาใช้เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ CadLP ในลูกน้ำยุงด้วยสองวิธีคือ การให้ลูกน้ำยุงลายกิน *E. coli* ซึ่งสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) ที่จำเพาะต่อการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีน CadLP ในลูกน้ำและการแช่ลูกน้ำยุงลายลงในสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน CadLP ในลูกน้ำยุง หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน CadLP ด้วยวิธี RT-PCR ผลการทดสอบพบว่าเพียงวิธีแช่ลูกน้ำลงในสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่พบยับยั้งการแสดงออกของยีน CadLP ได้และพบว่าเป็นการยับยั้งแบบจำเพาะเจาะจง หลังจากการแช่ลูกน้ำยุงลายลงในสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน GFP และไม่พบการลดลงของการแสดงออกของยีน CadLP การศึกษาการตายของยุงลายหลังการแช่ลูกน้ำยุงลายในสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่ที่จำเพาะต่อการกำจัดเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน CadLP เป็นเวลา 12, 24 และ 36 ชั่วโมง แล้วจึงให้ลูกน้ำยุงกิน *E.coli* ซึ่งสร้างโปรตีน Cry4Ba ผลการทดสอบพบว่าเปอร์เซ็นการตายของลูกน้ำยุงไม่ลดลงเมื่อเทียบกับลูกน้ำยุงที่ไม่ได้ยับยั้งการแสดงออกของยีน CadLP อีกทั้งไม่พบการยับยั้งการแสดงออกของยีน CadLP ด้วย ดังนั้นผลการทดสอบในส่วนการศึกษาการตายของยุงและการแช่ลูกน้ำยุงลงในสารละลายอาร์เอ็นเอสายคู่จึงยังไม่สามารถสรุปได้

113 หน้า

IDENTIFICATION OF CADHERIN-LIKE PROTEIN IN *Aedes aegypti* LARVAE

MONGKHON PANYOT 4737246 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

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

ABSTRACT

The insecticidal crystal proteins, produced from bacterium *Bacillus thuringiensis*, bind to specific receptors on the midgut epithelial cells of susceptible insect larvae, leading to pore formation and death of the larvae. Cadherin-like protein (CadLP) is considered a receptor to Cry toxins in many insect species but its expression in the gut of *Aedes aegypti* larvae is unknown. This study identified and cloned CadLP from the midgut of *Ae. aegypti* larvae using RT-PCR, 5´ and 3´ RACEs. 1,498 nucleotides located at the 3´ end of CadLP cDNA from *Ae. aegypti* larval midgut were obtained. The obtained partial sequence has 57% amino acid sequence similarity to *An. gambiae* CadLP. Moreover, RNAi technique was employed to specifically knock down the CadLP expression to determine if this protein is necessary for Cry4Ba toxin larvicidal activity against *Ae. aegypti*. Two ways for introducing the dsCadLP RNA into the larvae were employed. One, feeding the larvae with *E. coli* expressing dsCadLP RNA. Two, soaking the larvae in dsCadLP RNA solution. Semi-quantitative RT-PCR was employed to monitor the expression of CadLP transcripts. The results showed that the soaking method showed reduction of CadLP transcripts. The silencing of the CadLP gene by soaking is sequence specific as soaking the larvae in dsGFP RNA did not result in reduction of CadLP transcripts. The mosquito larvicidal assay was performed after 12, 24 or 36 hours of soaking in dsCadLP RNA. The results did not show reduction of larval mortality and there was no reduction of CadLP transcript as expected. Therefore, the experiments as well as the soaking experiment are inconclusive.

KEY WORDS : CADHERIN-LIKE PROTEIN/ *Ae. aegypti* LAVAE/ RNA INTERFERENCE/ CRY4Ba TOXIN.

113 P