

**CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba-  
BINDING PROTEINS FROM MIDGUT EPITHELIUM AND  
PERITROPHIC MEMBRANE OF *Aedes aegypti* LARVAE**

**SEANGDEUN MOONSOM**

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

**2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่จับจำเพาะกับโปรตีน Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ได้จาก MIDGUT EPITHELIUM และ PERITROPHIC MEMBRANE ของลูกน้ำยุงลาย (CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba-BINDING PROTEINS FROM MIDGUT EPITHELIUM AND PERITROPHIC MEMBRANE OF *Aedes aegypti* LARVAE)

แสงเดือน มุลสม 4738056 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนนท์ อังสุรนสมบัติ Ph.D. กุศล ภูรณกิจ Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D. GERD KATZENMEIER Ph.D. ปนัดดา บุญเสริม Ph.D.

#### บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษ Cry4Ba ที่สร้างจาก *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *israelensis* ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงลายได้สูง โดยเชื่อว่า brush-border membrane ของ midgut epithelium เป็นเป้าหมายแรกของโปรตีนในกลุ่ม Cry และการจับของโปรตีนสารพิษกับตัวจับจำเพาะนี้ จะเป็นขั้นตอนสำคัญที่กำหนดความจำเพาะของแมลงที่ฆ่า ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า โปรตีนสารพิษ Cry4Ba จับได้ทั้ง peritrophic membrane (PM) และ midgut epithelium ของลูกน้ำยุงลาย เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Far Western พบว่า โปรตีนขนาด 60 40 และ 30 กิโลดัลตันจาก brush-border membrane vesicles (BBMV) และโปรตีนขนาด 21, 24 และ 25 กิโลดัลตัน จาก PM น่าจะเป็นตัวจับจำเพาะของโปรตีน Cry4Ba ซึ่งการจับของโปรตีน Cry4Ba กับ BBMV ได้ส่งผลให้มีการตัดย่อยทางด้าน C-terminus ของชิ้นส่วนขนาด 47 กิโลดัลตัน ของ activated Cry4Ba และพบว่า permeability ของ liposomes มีต่อผลของโปรตีน Cry4Ba นั้น เพิ่มขึ้นเมื่อเป็นแบบ BBMV reconstituted liposomes นอกจากนี้ จากการสังเกตภายในตัวของลูกน้ำยุงลาย เมื่อได้รับโปรตีน Cry4Ba พบว่า PM และ caecal membrane จะมีเริ่มมีการยอมให้ dextrans ขนาด 2000 กิโลดัลตัน ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงผ่านได้ ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของโปรตีน Cry4Ba มีต่อทั้ง PM และ midgut epithelium ในลูกน้ำยุง

199 หน้า.

CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba-BINDING PROTEINS FROM MIDGUT EPITHELIUM AND PERITROPHIC MEMBRANE OF *Aedes aegypti* LARVAE

SEANGDEUN MOONSOM 4738056 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D.

ABSTRACT

The Cry4Ba toxin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* shows high toxicity to *Aedes* mosquito larvae. The larval midgut brush-border membrane is thought to be the primary target site for Cry toxins, and toxin binding to a midgut receptor is a key step for insect specificity. In the midgut, the peritrophic membrane (PM), which lies between the gut epithelium and the gut lumen, serves as a protective barrier against pathogens. In this study, Cry4Ba was determined to bind to both *Aedes aegypti* larval PM and midgut epithelium. The 60-, 40- and 30-kDa proteins of brush border membrane vesicles (BBMV) and the 21-, 24- and 25-kDa proteins of PM were identified as putative Cry4Ba-binding proteins by Far Western analysis. The Cry4Ba-BBMV protein interaction resulted in C-terminal processing of the 47-kDa fragment of the activated Cry4Ba toxin. Increased permeability of liposomes treated with Cry4Ba was observed when the liposomes were reconstituted with BBMV. *In vivo* observations on the PM and the caecal membrane in mosquito larvae fed with FITC-dextran (MW. 2000 kDa) indicated that the PM and caecal membrane became permeable to the FITC-dextran in the larvae treated with Cry4Ba. Altogether, these findings suggest that the Cry4Ba toxin acts on both the PM and the midgut epithelium in mosquito larvae.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*/ *Aedes aegypti*/ MIDGUT EPITHELIUM/ PERITROPHIC MEMBRANE/ RECEPTORS/ PERMEABILITY

199 pp.