GENETICALLY ENGINEERING A 130-kDa *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa TOXIN EXPRESSED IN *Escherichia coli*

AUTAIPORN KAIKAEW

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
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การสร้างโปรตีนสารพิษ Cry11Aa ขนาด 130 กิโลดาลตัลจาก *Bacillus thuringiensis* ใน *Escherichia coli* โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ (GENETICALLY ENGINEERING A 130-kDa *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa TOXIN EXPRESSED IN *Escherichia coli*)

อุทัยพร ไก่แก้ว 4837265 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ Ph.D. ปนัดดา บุญเสริม Ph.D.
กุศล ภูธนกิจ Ph.D. Gerd Katzenmeier Ph.D.

บทคัดย่อ

เนื่องจากผลึกโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry11Aa ที่มีขนาด 65 กิโลดาลตัลมีการละลายในสารละลายคาร์บอเนตต่ำมาก ทั้งโปรตีนต้นแบบ (wild type) และโปรตีนกลายพันธุ์ การศึกษาถึงคุณสมบัติของหน่วยกรดอะมิโนที่มีความสำคัญจึงยังคงไม่สามารถจัดทำได้ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba ซึ่งมีขนาด 130 กิโลดาลตัลและได้ถูกศึกษาไปมากแล้วพบว่าโปรตีนชนิดนี้ซึ่งมีโปรตีนส่วนเสริมขนาด 65 กิโลดาลตัลออกมาจากปลายคาร์บอกซีมีการละลายในสารละลายคาร์บอเนตได้สูง ดังนั้นโปรตีนส่วนเสริมจากปลายคาร์บอกซีน่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้โมเลกุลโปรตีนเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบและไม่จับกันเป็นก้อนแน่นแล้วจึงมีการละลายที่สูงขึ้น ในงานวิจัยนี้ พลาสมิดลูกผสมซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนลูกผสม Cry11Aa ขนาด 130 kDaได้ถูกสร้างขึ้นมาโดยการเชื่อมต่อยีนส่วนที่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีนส่วนเสริมจากปลายคาร์บอกซีของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba กับยีนของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry11Aa การหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการต่อส่วนของยีนทั้งสองเข้าด้วยกันอาศัยการเทียบสายลำดับกรดอะมิโน (sequence alignment) ของโปรตีน Cry11Aa และ Cry4Ba เมื่อโปรตีนลูกผสมถูกสร้างใน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ภายใต้การชักนำโดย IPTG โปรตีนชนิดนี้จะถูกสร้างในรูปของผลึกโปรตีน โปรตีนลูกผสม Cry11Aa ซึ่งมีขนาด 130 kDa มีระดับการสร้างต่ำไม่แตกต่างกับโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงต้นแบบ Cry11Aa จากการทำ Western blot พบแถบโปรตีนที่มีขนาด 130 กิโลดาลตัล อย่างไรก็ตามมีการพบแถบโปรตีนขนาดเล็กซึ่งเกิดจากการถูกตัดย่อยโดยเอนไซม์ ผลึกของโปรตีนลูกผสมมีการละลายในสารละลายคาร์บอเนตในระดับต่ำเหมือนกับโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงต้นแบบ Cry11Aa การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงชนิด *Aedes aegypi* พบว่าโปรตีนลูกผสมยังคงมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงในระดับที่ใกล้เคียงกับโปรตีนต้นแบบ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนส่วนเสริมจากโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry4Ba ไม่ได้มีผลกระทบต่อความเป็นพิษของโปรตีนลูกผสม อย่างไรก็ตามโปรตีนส่วนเสริมจากโปรตีนฆ่าลุกน้ำยุง Cry4Ba ไม่สามารถช่วยในการละลายของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry11Aa เมื่อถูกสร้างใน *E. coli* ซึ่งอาจเป็นการบ่งชี้ว่าโปรตีนส่วนเสริมจากปลายคาร์บอกซีไม่มีความจำเป็นสำหรับการสร้างรูปผลึกสำหรับโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง Cry11Aa

74 หน้า

Copyright by Mahidol University

GENETICALLY ENGINEERING A 130-kDa *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa TOXIN EXPRESSED IN *Escherichia coli*

AUTAIPORN KAIKAEW 4837265 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

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

ABSTRACT

Since the 65-kDa toxin inclusions of both wild-type Cry11Aa and its mutants are poorly solubilized in a carbonate buffer, further characterization of structure-function relationships can not be performed. Unlike the 65-kDa Cry11Aa toxin, the related 130-kDa Cry4Ba protoxin containing the 65-kDa C-terminal extension has been extensively investigated and displays high solubility in a carbonate buffer. The C-terminal extension is probably a key for systematically forming of protein inclusions and preventing aggregation. In this study, the recombinant plasmid encoding the 130-kDa Cry11Aa hybrid toxin was constructed by fusing the part of the gene encoding for the C-terminal extension of the *cry4Ba* gene to the *cry11Aa* gene. **A** suitable location to fuse the two gene fragments together was considered based upon multiple sequence alignment of the Cry11Aa and the Cry4Ba. The 130-kDa hybrid toxin was expressed mainly as a cytoplasmic sedimentable inclusion in the *E.coli* strain JM109 upon induction with IPTG. The expression level of the 130-kDa hybrid Cry11Aa toxin was as low as the 65-kDa wild-type Cry11Aa toxin. Western blot analysis revealed the immunoreactive band corresponding to the size of 130-kDa. However, there were some immunologically detected bands of lower molecular weights which were likely to be proteolytic degradation products. When protein inclusions of the hybrid Cry11Aa toxin were tested for solubility in carbonate buffer pH 9.0, it was found that the solubility of the hybrid toxin was relatively low, similar to that of the wild-type Cry11Aa toxin. Bioassays against *Aedes aegypti* mosquito-larvae revealed larvicidal activity of the hybrid toxin at a high level close to the wild-type Cry11Aa toxin. This suggested that the C-terminal extension of the Cry4Ba toxin did not disturb the toxicity of the hybrid toxin. However, the C-terminal extension of the Cry4Ba toxin could not improve the solubility of the Cry11Aa toxin expressed in *E. coli*. This might indicate that the C-terminal extension is not nesessary for crystalline formation of Cry11Aa toxin.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*/ C-TERMINAL HALF / CRY11Aa TOXIN / HYBRID PROTEIN/ SOLUBILITY

74 pp.

Copyright by Mahidol University