

**EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS AT Asn 89 AND
Thr 148 OF CYT2Aa2 TOXIN FROM *Bacillus thuringiensis***



**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

ผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งของ Asn 89 และ Thr 148 ของ โปรตีน Cyt2Aa2 จาก *Bacillus thuringiensis*
(EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS AT Asn 89 AND Thr 148 OF CYT2Aa2 TOXIN FROM *Bacillus thuringiensis*)

บุญสุวรรค์ ประเสริฐกุลชัย 4837269 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชาตชาย กฤตชัย, Ph.D. บุญเสียง พรหมดอนกอย, Ph.D.,
ปนัดดา บุญเสริม, Ph.D.

บทคัดย่อ

Cyt2Aa2 เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงซึ่งผลิตมาจาก *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *darmstadiensis* โปรตีนชนิดนี้มีจำเพาะต่อลูกน้ำยุงลายและทำให้เชื้อหุ้มของเซลล์หลายชนิดแตกได้ในหลอดทดลอง งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแทนที่ของกรดอะมิโน Asn 89 และกรดอะมิโน Thr 148 ด้วยกรดอะมิโน Lys โดยวิธีก่อกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะ ผลจากการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ N89K และ T148K ยังคงมีความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงเท่ากับโปรตีนต้นแบบ ในการทดสอบความสามารถในการรวมตัวกันของโปรตีนในเชื้อหุ้มเซลล์สังเคราะห์ และการทำให้มีสีแดงแตกในหลอดทดลองพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ N89K ไม่มีความแตกต่างจากโปรตีนดั้งเดิม ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ T148K มีความสามารถเหล่านี้ลดลงมาก และเมื่อทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์นี้ได้สูญเสียความเป็นพิษต่อเซลล์เหล่านั้นด้วย ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน Asn 89 มีได้มีบทบาทสำคัญในการรักษาโครงสร้างและเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของโปรตีน Cyt2Aa2 ในทางตรงกันข้ามกรดอะมิโน Thr 148 น่าจะมีบทบาทที่เกี่ยวข้องในการยึดเกาะของโปรตีนกับเชื้อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอย่างจำเพาะ โดยความรู้ที่ได้นี้จะนำไปสู่การพัฒนาและปรับปรุงโปรตีน Cyt2Aa2 ให้มีความจำเพาะต่อเซลล์ของลูกน้ำยุงมากขึ้นและเป็นพิษต่อเซลล์อื่นๆน้อยลง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์เพื่อใช้ในการควบคุมยุงพาหะของโรคต่อไปในอนาคต

76 หน้า

EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS AT Asn 89 AND Thr 148 OF
CYT2Aa2 TOXIN FROM *Bacillus thuringiensis*

BOONSAN PRASERTKULCHAI 4837269 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D.,
BOONHIANG PROMDONKOY, Ph.D., PANADDA BOONSERM, Ph.D.

ABSTRACT

The cytolytic toxin, Cyt2Aa2, is produced from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* during the sporulation stage. It is toxic to *dipteran* larvae *in vivo*, whilst it has a broad-range cytolytic activity *in vitro*. The N89K and T148K mutant toxins were constructed by site-directed mutagenesis, introducing positively charged residue into position 89 after α B and position 148 between α D and β 4. The results show that mutagenesis at residue Asn 89 does not affect the structural and functional activities of the toxin. Although mutagenesis on Thr 148 does not change the tertiary structure and larvicidal activity of Cyt2Aa2 toxin, it has an effect on structural stability. The T148K mutant shows a decrease in both solubility of the toxin in carbonate buffer and *in vitro* activities, i.e., oligomerization and hemolytic activity. The data suggest that Asn 89 is not a key residue involved in the structure and function of the toxin molecule. On the other hand, Thr 148 may take part in the membrane recognition of Cyt2Aa2. Moreover, the Lys substitution at residue 148 may interrupt the dimer formation of protoxin. These results demonstrate that the substitution of Thr with Lys at position 148 can help increase specificity of Cyt2Aa2, by maintaining *in vivo* activity and reducing *in vitro* toxicity. It provides improved knowledge of the cytolytic toxin with possible benefits for biotechnological applications.

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis* / LOOP α D AND β 4 / CYTOLYTIC
PROTEIN / CYT2Aa2/ LYSINE SUBSTITUTION /
/MOSQUITOCIDAL TOXIN

76 pp.