TRANSCRIPTION OF THE LARVICIDAL *cry4Ba* GENE FROM *Bacillus thuringiensis* IN THE GREEN ALGAL *Chlamydomonas reinhardtii* CHLOROPLAST

THANATE JUNTADECH

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
2013

Copyright © by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TRANSCRIPTION OF THE LARVICIDAL *cry4Ba* GENE FROM *Bacillus thuringiensis* IN THE GREEN ALGAL *Chlamydomonas reinhardtii* CHLOROPLAST

THANATE JUNTADECH 4837260 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D., SITHICHOKE TANGPHATSORNRUANG, Ph.D., YUN-KIAM YAP, Ph.D.

ABSTRACT

The well-known single cell green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has been recognized as a potential platform for expression of recombinant proteins due to its potential for large scale production as well as low maintenance costs. In this study, transcription of the 3.4-kb mosquito-larvicidal *cry4Ba* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in transgenic chloroplasts of *C. reinhardtii* under control of the promoter and 5′-UTR of photosynthetic *psbA* gene was achieved. Inverted repeats in a chloroplast genome of the host strain with deleted photosynthetic *psbA* genes were selected as recombination targets. Three transformant lines showing stable and site-specific integration of intact *cry4Ba* and *psbA* genes into *C. reinhardtii* chloroplast genomes were obtained by means of dual-phenotypic screening *via* exhibition of resistance to spectinomycin and restoration of the photosynthetic activity. Achievement in co-transcription of recombinant *cry4Ba* and *psbA* transgenes in all stable lines revealed by RT-PCR and Northern blot analyses demonstrates the sufficiency of this system's transcription machinery, offering further innovation for *Bt*-insecticidal protein production.

KEY WORDS: *Chlamydomonas*/ CHLOROPLAST TRANSFORMATION/ INVERTED REPEAT/ *Bti-cry4Ba* TRANSCRIPT/ *psbA* PROMOTER

125 pages

Copyright by Mahidol University

การถอดรหัสของยีนโปรตีนสารพิษ *cry4Ba* จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii*

TRANSCRIPTION OF THE LARVICIDAL *cry4Ba* GENE FROM *Bacillus thuringiensis* IN THE GREEN ALGAL *Chlamydomonas reinhardtii* CHLOROPLAST

ธเนศ จันทเดช 4837260 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph.D., กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D., สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง, Ph.D., Yun-Kiam Yap, Ph.D.

บทคัดย่อ

Chlamydomonas reinhardtii เป็นสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นต้นแบบที่มีศักยภาพสำหรับการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม (recombinant proteins) เนื่องด้วยเป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนได้ปริมาณสูงและมีค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาต่ำ ในการศึกษานี้ได้ประสบความสำเร็จในการถอดรหัสหรือการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของยีนที่สร้างโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง *cry4Ba* ที่มีขนาด 3.4 กิโลเบส จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *israelensis* ในคลอโรพลาสต์ของสาหร่าย *C. reinhardtii* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์และ 5'UTR (บริเวณที่ไม่มีการสร้างโปรตีน) ที่ได้จากยีนสังเคราะห์แสง *psbA* ในการนี้ตำแหน่งที่บรรจุยีน (recombination targets) ได้ถูกเลือกให้อยู่บริเวณที่เป็น inverted repeats ภายในคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสายพันธุ์ซึ่งไม่มียีน *psbA* จากการศึกษาพบว่าได้สาหร่ายลูกผสม 3 ตัวอย่างซึ่งสามารถแสดงการมีอยู่อย่างจำเพาะและถาวรของยีน *cry4Ba* และ *psbA* ภายในจีโนมคลอโรพลาสต์ของ *C. reinhardtii* โดยได้มาจากการคัดเลือกแบบลักษณะของการแสดงออกทั้ง 2 วิธี อันได้แก่การแสดงออกของความต้านทานยาปฏิชีวนะ spectinomycin และการคืนความสามารถของกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยที่ความสำเร็จในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของยีนลูกผสม *cry4Ba* และ *psbA* ในทุกตัวอย่างของสาหร่ายลูกผสมนั้นได้ผลมาจากการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR และ Northern blot ซึ่งได้แสดงถึงความเพียงพอของทรัพยากรที่ใช้ในการถอดรหัสดีเอ็นเอของระบบนี้นำพาไปสู่นวัตกรรมก้าวหน้าสำหรับการผลิตโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt* ในอนาคตต่อไป

125 หน้า

Copyright by Mahidol University