

11 DEC 1989



CHARACTERIZATION OF 130 KDA
MOSQUITO - LARVICIDAL ENDOTOXIN RELATING GENES
OF BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP.
ISRAELENSIS STRAIN 4Q272

WICHET LEELAMANIT

2

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1988

Copyright by Mahidol University

อภินันทนาการ

๑๓

Faculty of Graduate studies

13534

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาลักษณะของยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนสร้างโปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงในเชื้อ Bacillus thuringiensis subsp. israelensis strain 4Q272.

ผู้วิจัย นายวิเชษฐ์ ลีลามานิตย์
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

1. ดร. สกล พันธุ์ยิ้ม
2. ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์
3. ดร. อมเรศ กุมิรัตน์
4. ดร. บุรชัย สนธิยานนท์

วันที่สำเร็จการศึกษา

23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2531

บทคัดย่อ

เชื้อ Bacillus thuringiensis subsp. israelensis (Bti) ในช่วงที่มีการสร้างสปอร์จะผลิตผลึกสารพิษซึ่งมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง ผลึกสารพิษนี้ประกอบด้วยโปรตีนขนาด 27,65 และ 130 กิโลดาลตันเป็นส่วนใหญ่ ยีนสร้างสารพิษ 4 ประเภท ได้รับการนำเข้าสู่เชื้อ E.coli โดยวิธีการพันธุวิศวกรรม ประเภทแรก ; พลาสมิดลูกผสม pMU388 ได้ถูกคัดเลือกและศึกษาวิจัยโดยกลุ่มของ นาย ชันท์ อังศุณสมบัติ (Mol.Gen.Genet., 1987) พบว่าประกอบด้วยยีนสร้างสารพิษขนาด 3.8 กิโลเบส และสามารถสร้างโปรตีนสารพิษขนาด 130 กิโลดาลตัน สารพิษนี้มีความเป็นพิษอย่างสูงต่อลูกน้ำยุงลาย (Aedes aegypti) แต่ไม่ค่อยเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงรำคาญ (Culex quinquefasciatus) ประเภทที่สอง ; พลาสมิด ลูกผสม pMU500 ซึ่งได้รับการคัดเลือกมาพร้อม ๆ กับประเภทแรก พบว่าอนุพันธ์ของมันคือ pMU500-2 ซึ่งประกอบด้วยยีนสร้างสารพิษขนาด 3.8 กิโลเบสสามารถสร้างโปรตีนสารพิษขนาด 125 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความเป็นพิษทั้งลูกน้ำยุงลายและลูกน้ำยุงรำคาญเท่า ๆ กัน สองประเภทสุดท้าย คือ พลาสมิดลูกผสม pMUEX3.6' และ pMUPX3.8 ประกอบด้วยยีนสร้างสารพิษขนาด 3.6 และ

3.8 กิโลเบส ตามลำดับ ชื่อ E.coli ที่มี pMUEX3.6 สามารถผลิตโปรตีนสารพิษขนาด 58 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายอย่างมีนัยสำคัญเท่านั้น ชื่อ E.coli ที่มี pMUPX 3.8 สามารถผลิตโปรตีนสารพิษขนาด 65 กิโลดาลตัน แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงชนิดใด ส่วนผสมของโปรตีนสารพิษทุกชนิดยกเว้นที่มีส่วนผสมของโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน เพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงมากกว่าใช้โปรตีนสารพิษชนิดหนึ่งชนิดใดเพียงชนิดเดียว การสำรวจความสัมพันธ์ของพลาสมิดในเชื้อ Bt. subsp. morrisoni สายพันธุ์ PG14 ด้วยยีนสร้างสารพิษ 3 ประเภทจากเชื้อ Bti แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดในสายพันธุ์ PG14 ประกอบด้วยยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนสร้างสารพิษในเชื้อ Bti.

Thesis Title CHARACTERIZATION OF 130 KDA MOSQUITO -
LARVICIDAL ENDOTOXIN RELATING GENES OF
BACILLUS THURINGIENSIS SUBSP. ISRAELENIS
STRAIN 4Q272

Name Mr. Wichet Leelamanit

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

1. Dr. Sakol Panyim
2. Dr. Praon Wilairat
3. Dr. Amaret Bhumiratana
4. Dr. Burachai Sonthayanon

Date of Graduation

November 23, 1988

Abstract

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*), during sporulation, produces a protein crystal that is highly toxic to mosquito larvae. The *Bti* crystal contains three major proteins of 27 kDa, 65 kDa and a doublet of 130 kDa. Four types of *Bti* toxin genes have been cloned in *E.coli* host. First ; pMU388 was cloned and characterized by Angsuthanasombat *et al.* (Mol. Gen. Genet.,1987). It contains 3.8 kb XbaI fragment of the *Bti* toxin gene and expresses the 130 kDa protein that is highly toxic to larvae of *Aedes aegypti*, but lowly toxic to larvae of *Culex quinquefasciatus*. Second ; pMU500 was obtained from the same DNA library of pMU388. Its derivative, called pMU500-2, consists of the 3.8 kb EcoRI-XbaI fragment of the *Bti* toxin

gene. *E.coli*/pMU500-2 produces the 125 kDa protein that is equally toxic to larvae of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*. The two other clones, pMUEX3.6' and pMUPX3.8, contain a 3.6 kb XbaI-EcoRI and 3.8 kb PstI-XbaI fragments of the *Bti* toxin gene, respectively. These two toxin genes were cloned and screened by using 3' terminal of the pMU388 insert (corresponding to the carboxy half of the 130 kDa protein). *E.coli*/pMUEX3.6' produced a 58 kDa protein that showed significantly toxicity against larvae of *A. aegypti*, but insignificantly killed larvae of *C. quinquefasciatus*. *E.coli*/pMUPX 3.8 expressed a 65 kDa protein but did not exhibit mosquito larvicidal activity. A combination of two toxins, except that containing 65 kDa protein, showed synergistic toxicity. Probing plasmids of *Bt. subsp. morrisoni* strain PG14 with three of *Bti* toxin genes indicated that the plasmids of strain PG14 contained toxin genes related to those of *Bti*.