LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

- 5 SEP 1996

GENETICALLY ENGINEERING AN ACTIVE HYBRID MOSQUITO-LARVICIDAL TOXIN

PANADDA BOONSERM

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

With compliments
of
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
P187g
1996

36103

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสร้างโปรตีนสารพิษลูกผสมที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงโดยวิธีพันธุวิศวกรรม

ผู้วิจัย ปนัดดา บุญเสริม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph D

ชนันท์ อังศุธนสมบัติ, Ph D

Gerd Katzenmeier, Ph D

วันที่สำเร็จการศึกษา ๑๖ เมษายน พ.ศ. ๒๕๓๙

บทคัดย่อ

Bacillus thuringiensis สายพันธุ์ *israelensis* (*Bti*) และ *Bacillus sphaericus* (*Bs*) เป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษในรูปของผลึกโปรตีนในระหว่างการสร้างสปอร์ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยโปรตีนสารพิษของ *Bs* มีความจำเพาะต่อลูกน้ำยุงสายพันธุ์ *Culex* มากที่สุด ในขณะที่ผลึกโปรตีนสารพิษจาก *Bti* ประกอบด้วยโปรตีน CryIVA, CryIVB, CryIVD และ CytA ที่ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงสายพันธุ์ *Aedes* ได้ดีกว่า ดังนั้นการสร้างโปรตีนสารพิษลูกผสม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงได้หลายสายพันธุ์

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เชื่อมส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนสารพิษของ *cryIVB-Bti* เข้ากับยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนสารพิษขนาด 51 และหรือ 42 กิโลดาลตัน ของ *Bs* โดยใช้เทคนิค SOE ซึ่งอาศัยหลักการทาง PCR ร่วมกับการใช้เอนไซม์ Vent DNA polymerase และได้ผลิตผลตามต้องการ คือ 3.7 และ 3.3 กิโลเบส จากนั้นได้นำมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ (pMEx8) และใช้ชื่อพลาสมิดลูกผสมว่า pIVB-7051 และ pIVB-7042 โดยพบว่า

Copyright by Mahidol University

พลาสมิดลูกผสมทั้ง pIVB-7042 และ pIVB-7051 สามารถแสดงออกได้ใน *E coli* ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter และให้ผลิตผลในรูปของผลึกโปรตีน จากการตรวจสอบ Western blot พบว่าผลึกโปรตีนสารพิษจากพลาสมิดลูกผสม pIVB-7042 สามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับแอนติบอดี้และได้แถบโปรตีนขนาด 110 กิโลดาลตัน ในขณะที่พลาสมิดลูกผสม pIVB-7051ไม่ให้ผลิตผลตามต้องการ จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุงพบว่า พลาสมิดลูกผสม pIVB-7042 ที่แสดงออกใน *E. coli* สามารถฆ่าลูกน้ำยุงเฉพาะสายพันธุ์ *Aedes aegypti* ได้ แต่ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงสายพันธุ์ *Culex quinquefasciatus* ในขณะที่พลาสมิดลูกผสม pIVB-7051 ที่แสดงออกใน *E. coli* ไม่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Genetically Engineering an Active Hybrid Mosquito-larvicidal Toxin
Name	Panadda Boonserm
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	
	Sakol Panyim, Ph D
	Chanan Angsuthanasombat, Ph D
	Gerd Katzenmeier, Ph D
Date of Graduation	16 April B E 2539 (1996)

Abstract

During sporulation, *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* (*Bti*) and *Bacillus sphaericus* (*Bs*) produce toxin inclusions which are specifically toxic to mosquito larvae Whilst *Bs* toxins are toxic mainly to *Culex* larvae, *Bti* inclusions containing four major toxins, CryIVA, CryIVB, CryIVD and CytA, are much more active against *Aedes* species An attempt was made to construct an active hybrid toxin with a broader range of toxicity

By using Vent DNA polymerase in a PCR based reaction known as SOE (gene splicing by overlap extension), fusion genes were obtained in which the truncated *cryIVB* gene segment was attached to either of the *Bs* toxin genes These fusion gene fragments of 3 7 and 3 3 kb were subsequently cloned into the pMEx8 vector yielding recombinant plasmids designated as pIVB-7051 and pIVB-7042 When these recombinant plasmids were expressed in *E coli* under the regulation of *tac* promoter, fusion proteins were apparently produced as sedimentable inclusions

Western blot analysis revealed that the sedimented protein fractions from *E. coli* clone IVB-7042 contained a major immunoreactive band of 110 kDa, but no hybrid product was observed in those prepared from clone IVB-7051 In toxicity assays, *E coli* cells harbouring pIVB-7042 was toxic to *Aedes aegypti* larvae but had no effect to *Culex quinquefasciatus* larvae However, *E coli* cells containing pIVB-7051 showed no mosquito-larvicidal activity against either of the larvae

Copyright by Mahidol University