LIBRARY AND INFORMATION CENTER MAHIDOL UNIVERSITY
- 5 SEP 1996

MANIPULATION AND ANALYSIS OF *CRYIVB* GENE IN *BACILLUS SPHAERICUS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS*

SUCHART PUNJAISEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1995

TH
S942m
1996

36049

ชื่อวิทยานิพนธ์ เรื่อง การศึกษาและวิเคราะห์ยีน *cryIVB* ใน *Bacillus sphaericus* และ *Bacillus thuringiensis.*

ผู้วิจัย สุชาติ ปันจัยสีห์

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D Eng
อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.
สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 20 ตุลาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

เมื่อนำโปรโมเตอร์ของยีน *cat-86* (P_{cat-86}, เป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกในระยะที่เซลล์สร้างสปอร์) หรือของยีน *bgaB* (P_{bgaB}, เป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกในระยะเซลล์เจริญเติบโต) มาต่อกับชิ้นส่วน *Xba* I ขนาด 3.7 kb ซึ่งมียีน *cryIVB* ที่สร้างโปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำยุงและมีน้ำหนักโมเลกุล 130 kDa ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* และต่อเข้ากับพาหะ pBC16 ได้พลาสมิดลูกผสมที่ชื่อว่า pBTC3 และ pBTC6 ตามลำดับซึ่งจะเป็นพลาสมิดที่ยีน *cryIVB* ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 2 ชนิด นอกจากนี้ยังได้สร้างพลาสมิด pBTC35 และ pBTC20 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ได้ตัดส่วนโปรโมเตอร์ออกไปจนได้ truncated *cryIVB* gene ซึ่งเป็นยีนที่มีเพียง 35 nucleotide และ 20 nucleotide นับจากจุด start codon ขึ้นไปตามลำดับ จากนั้นนำไปต่อเข้าทางด้าน downstream ของโปรโมเตอร์ P_{cat-86} หรือ P_{bgaB} ได้พลาสมิดลูกผสมใหม่คือ pBTC35L และ pBTC20L (Truncated gene ควบคุมด้วย P_{cat-86}) หรือ pBTC35F และ pBTC20F (truncated gene ควบคุมด้วย P_{bgaB})ตามลำดับ นำพลาสมิดที่สร้างใหม่ทั้งหมดดังกล่าวมานี้ใส่เข้าไปใน *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* c4Q2-72 และ *B sphaericus* 2362 โดยวิธี electroporation และ protoplast transformation ตามลำดับ จากผลของ restriction pattern และ Southern blot hybridization สามารถยืนยันได้ว่ามีพลาสมิดดังกล่าวอยู่จริงใน *Bacillus* host ทั้งสองชนิด ผลจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่มีพลาสมิด pBTC6 ซึ่งมีโปรโมเตอร์ P_{bgaB} อยู่ข้าง

หน้าโปรโมเตอร์ของยีน *cryIVB* สามารถสร้างโปรตีนขนาดน้ำหนัก 130 kDa ได้ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโต (5 ชั่วโมง) ในขณะที่เซลล์ที่มีโปรโมเตอร์ P_{cat-86} ควบคุมอยู่หน้า *cryIVB* โปรโมเตอร์นั้นจะสร้างโปรตีนน้ำหนัก 130 kDa ได้หลังจากเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง (อยู่ในระยะเป็นสปอร์) เท่านั้น จากการเปรียบเทียบค่า LC_{50} กับลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) พบว่า *B.t.i.* c4Q2-72 และ *B. sphaericus* 2362 host ที่มีพลาสมิด pBTC6 จะให้ค่า LC_{50} ต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ต่ำ (ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดี) คือได้ค่า LC_{50} สำหรับ *B.t.i.* c4Q2-72 เท่ากับ (5.6±3.6)x10^{2} CFU/ml และ *B. sphaericus* 2362 เท่ากับ (5.4±2.5)x10^{2} CFU/ml ซึ่งค่า LC_{50} นี้จะต่ำกว่าค่า LC_{50} ของ *B.t.i.* c4Q2-72 (pBTC3) และ *B. sphaericus* 2362 (pBTC3) ซึ่ง pBTC3 มี P_{cat-86} ร่วมกับ P_{cryIVB} ในการควบคุมยีน *cryIVB* และมีค่า LC_{50} เท่ากับ (6.8±1.3)x10^{4} และ (3.5±0.8) x10^{4} CFU/ml ตามลำดับโดยต่ำกว่าประมาณ 100 เท่า สำหรับเซลล์ที่ได้รับยีน truncated *cryIVB* ที่ถูกควบคุมด้วย P_{bgaB} หรือ P_{cat-86} นี้จะแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงต่ำ ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ nucleotide sequence ในส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีน *cryIVB* ที่ถูกตัดออกไปและเมื่อตรวจหาโปรตีนขนาด 130 kDa โดยวิธี Western blot ก็ไม่สามารถตรวจหาโปรตีนได้ซึ่งเป็นผลสอดคล้องกับค่าความเป็นพิษที่ต่ำ นอกจากนี้ความแตกต่างของความแรงของ P_{bgaB} ร่วมกับ P_{cryIVB}, P_{cat-86} ร่วมกับ P_{cryIVB} หรือ P_{cryIVB} อย่างเดียว ยังได้รับการยืนยันโดยการเชื่อมชิ้นส่วนของโปรโมเตอร์เข้ากับ reporter gene ที่ชื่อ *cat-86* ในพลาสมิด pPL703 ซึ่งเป็น promoter cloning vector จากนั้นก็นำไปใส่เข้าใน *B.t.i.* c4Q2-72 เพื่อตรวจวัดและเปรียบเทียบค่า specific chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ที่ 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่มีพลาสมิด pBTPF6 (P_{bgaB} ร่วมกับ P_{cryIVB}) สามารถผลิต CAT ได้มากกว่าเซลล์ที่มี pBTP603 (P_{cat-86} ร่วมกับ P_{cryIVB}) และ pPLC1 (P_{cryIVB} อย่างเดียว) อยู่ถึง 60-200 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าพลาสมิด pBTPF6 สามารถผลิต CAT ได้สูงในระยะช่วงต้นของการเจริญเติบโต (15.91 U/mg โปรตีนที่ 6 ชั่วโมง) ในขณะที่ pBTP603 และ pPLC1 ผลิต CAT ได้น้อยจากระยะแรกจนถึงระยะการสร้างสปอร์ (0.07-0.15 U/mg โปรตีน) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของค่า LC_{50} อย่างไรก็ตามพบว่าพลาสมิด pBTC6 ไม่สามารถคงอยู่ใน host *B.t.i.* c4Q2-72 หรือ *B. sphaericus* 2362 ได้ในขณะที่ pBTC3 จะคงอยู่ใน host ทั้งสองได้นานอย่างน้อยที่สุด 4 สัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเตตราซัยคลิน การไม่คงตัวของ plasmid นี้อาจเกิดจากการแสดงออกที่มากเกินไปของยีนตั้งแต่ช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามพลาสมิด pBTC20F pBTC20L pBTC35F และ pBTC35L ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีการแสดงออกต่ำก็ไม่สามารถคงอยู่ใน host ได้นาน ซึ่งอาจเนื่องมาจากขบวนการ recombination จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลล์ *B.t.i.* c4Q2-72 ที่มีพลาสมิดลูกผสมดังกล่าว ปรากฏว่าไม่พบผลึกโปรตีนในเซลล์ใดเลยไม่ว่าจะศึกษาในระยะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตหรือกำลังสร้างสปอร์ แสดงว่าโปรตีน CryIVB อย่างเดียวไม่สามารถรวมตัวเป็นผลึก (crystal) ได้ แม้ว่าจะถูกสร้างในปริมาณมาก

Thesis Title	Manipulation and Analysis of *cryIVB* gene in
Bacillus sphaericus and *Bacillus thuringiensis*
Name	Suchart Punjaisee
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee
Watanalai Panbangred, D Eng.
Amaret Bhumiratana, Ph D.
Somsak Pantuwatana, Ph.D.
Date of Graduation	20 October B.E 2538 (1995)

ABSTRACT

A 3.7 kb *Xba* I fragment harbouring the *cryIVB* gene which encoded the 130 kDa mosquito larvicidal protein from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* was placed downstream to either the *cat-86* gene promoter ($P_{cat\text{-}86}$, a spore stage specific expression promoter) or the *bgaB* gene promoter (P_{bgaB}, a vegetative stage specific expression promoter). These two constructs were then subcloned into pBC16 to obtain pBTC3 and pBTC6, respectively. Alternatively, the promoter region of the *cryIVB* gene was deleted and truncated genes with 35 and 20 nucleotides upstream from the start codon were obtained and were transcriptional fusion downstream to $P_{cat\text{-}86}$ or P_{bgaB} yielding pBTC35L and pBTC20L or pBTC35F and pBTC20F, respectively All plasmids constructed were successfully transferred into *B thuringiensis* subsp *israelensis* c4Q2-72 and *B. sphaericus* 2362 by electroporation and protoplast transformation technique, respectively The presence of these plasmids in both hosts was confirmed by enzyme restriction patterns on agarose gel electrophoresis and Southern blot hybridization. Results from Western blot analysis showed that plasmids with P_{bgaB} in front of P_{cryIVB} enabled cells to produce a 130 kDa protein from the vegetative stage (5 hr) whereas those with $P_{cat\text{-}86}$ produced the 130 kDa crystal protein only at 24 hr (spore stage). The strong activity of P_{bgaB} and P_{cryIVB} within pBTC6 in both hosts was also shown by toxicity assays against *Aedes aegypti* larvae [*B.t.i.* c4Q2-72, (5.6±3.6) x10^2 CFU/ml, *B. sphaericus* 2362, (5.4±2.5)x10^2 CFU/ml]. This larval toxicity of clones harbouring pBTC6 was 100 folds more toxic to such larvae when compared to the same host strains with pBTC3 ($P_{cat\text{-}86}$ together with P_{cryIVB}). The LC_{50s} for *B.t.i.* c4Q2-72 (pBTC3) and *B. sphaericus* 2362 (pBTC3) were (6.8±1.3)x10^4 and (3.5±0.8)x10^4 CFU/ml, respectively The low toxicity against mosquito larvae was obtained from cells which contained truncated *cryIVB* gene under control of P_{bgaB} or $P_{cat\text{-}86}$. This observation suggested the significant effect of the deleted endogenous *cryIVB* gene promoter region In accordance to the low toxic activity, the results from Western blot analysis also showed negative detection of 130 kDa crystal protein from these latter constructs. The difference in promoter strength of double promoters or P_{cryIVB} alone in controlling *cryIVB* gene was also confirmed by transcriptional fusion with *cat-86* reporter gene in promoter cloning vector, pPL703, and transformed into *B.t.i.* c4Q2-72. The specific chloramphenicol acetyltransferase (CAT) at 6, 12, 24, 36 and 48 hr of growth was then compared It was found that clone harbouring pBTPF6 which contained P_{bgaB} together with P_{cryIVB} could produce CAT much higher (60-200 fold) than pBTP603 ($P_{cat\text{-}86}$ with P_{cryIVB}) and pPLC1 (P_{cryIVB} alone). pBTPF6 produced high CAT activity at early stage of growth (15 91 U/mg protein at 6 hr) whereas pBTP603 and pPLC1 produced less amount of CAT at early to sporulating stage (0.07-0.15 U/mg protein) Despite of its strong promoter, however, the recombinant plasmid, pBTC6 was not stably maintained in either *B.t.i.* c4Q2-72 or *B.*

host, while pBTC3 seemed to be stable in both hosts for at least 4 weeks upon daily subculture in media without tetracycline. This result suggests the drastic effect on plasmid stability occurred by overexpression of the gene from early stage of growth. The instability of the low expression plasmids pBTC20F, pBTC20L, pBTC35F and pBTC35L was also observed which may cause by recombination process. None of the *B.t.i.* c4Q2-72 transformants containing either one of the above recombinant plasmids can produce the observable crystal structure in the cell when observed under the electron microscope either at vegetative or sporulating stage This finding indicated that CryIVB protein alone could not form crystal eventhough it was synthesized in large quantity