4 พ.ย. 2537

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CLONING AND EXPRESSION OF *CRYIVB* GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS* (*BTI*) IN LOCALLY ISOLATED CYANOBACTERIA

อภินันทนาการ
จาก
"บัณฑิตวิทยาลัย, มหิดล"

RACHADA KIATFUENGFOO

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1994

Copyright by Mahidol University

28547

ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลน และ การสร้างโปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำยุงจากยีน *cryIVB* ในบักเตรีสังเคราะห์แสง

ผู้วิจัย รัชฎา เกียรติเฟื่องฟู

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.
ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.
อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 10 สิงหาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีผู้นิยมใช้ cyanobacteria ซึ่งเป็นบักเตรีสังเคราะห์แสงที่พบได้ในแหล่งน้ำทั่วไปมาใช้ในการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยากันอย่างกว้างขวาง ในวิทยานิพนธ์นี้ต้องการที่จะศึกษาการใช้บักเตรีชนิดนี้ในการเป็น host เพื่อผลิตสารพิษฆ่าลูกน้ำยุงจาก gene *cryIVB* ของ *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* (*Bti*) เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปสู่การแก้ปัญหาของการใช้ *Bti* ในการควบคุมปริมาณของลูกน้ำยุงในธรรมชาติ

จาก 176 ตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากแหล่งน้ำต่างๆ ในกรุงเทพมหานคร และเขตปริมณฑล พบเชื้อ cyanobacteria 151 isolates, ในจำนวนนี้ 5 isolates ได้รับการ identify เพื่อแยกชนิดจากสถาบัน Pasteur Institut ในประเทศฝรั่งเศส ให้เป็น

Copyright by Mahidol University

Synechocystis PCC9001, PCC9002 และ *Synechococcus* PCC9003, PCC9004 และ PCC9005

ในการศึกษาได้นำวิธี M13-DNA fingerprinting technique มาใช้ในการจำแนกชนิดของ local strains ของ cyanobacteria จำนวน 40 isolates เทียบกับ 3 strains ของ reference strains โดยการตัด DNA ของเชื้อเหล่านี้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* และตรวจด้วยตัวติดตาม ^{32}P-labelled M13 probe พบว่า DNA fingerprinting patterns (DFP) ที่ได้ สามารถถูกจัดแบ่งออกได้เป็น 37 แบบ, ไม่มี local strains ตัวใดให้ DFP ที่เหมือนกับ DFP ของ reference strains และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง local strains ด้วยกันเอง พบว่า เชื้อบางตัวที่ได้มาจากแหล่งน้ำที่ต่างกันให้ DFP ที่เหมือนกัน แสดงว่าเชื้อที่ให้ DFP ที่เหมือนกันน่าจะเป็น isolates เดียวกัน ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าวิธีของ M13-DNA fingerprinting สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ cyanobacteria ได้

ในการพยายามที่จะนำ *cryIVB* gene เข้าสู่ local strains ของ cyanobacteria โดยการสร้าง shuttle vectors จาก endogenous plasmids ปรากฏว่า ไม่สามารถจะนำ *cryIVB* gene เข้าสู่ cyanobacteria ที่ทดลองได้

โดยวิธีของ plasmid mobilization, สามารถทำการ mobilize plasmid pKT210 (broad- host-range plasmid) เข้าสู่ local strains ของ cyanobacteria PCC9003, PCC9004 และ CNRS2 ได้, จึงได้ทำการตัดต่อ gene *cryIVB* เข้ากับ pKT210 plasmid ได้ plasmid ที่ชื่อว่า pKT210.388 และทำการ mobilize เข้าสู่ PCC9003 และ CNRS2 จากการตรวจสอบโดย Southern blot hybridization และ rescue เข้าสู่ *E.coli* พบว่ามี plasmid pKT210.388 อยู่ใน cyanobacteria 2 isolates นั้นจริง และยังสามารถตรวจพบโปรตีนขนาด 128 kDa จากเชื้อทั้ง 2 ได้ แต่ปริมาณที่ได้ค่อนข้างต่ำ, จึงได้พยายามปรับปรุงการสร้างโปรตีนขนาด 128 kDa จาก *cryIVB* gene นี้โดยการสร้าง plasmid pKT210.388.T7.pol ซึ่งประกอบด้วย T7 promoter อยู่ upstream จาก

cryIVB gene และ T7 RNA polymerase gene รวมทั้ง regulatory genes ทั้งชุด ใน *E coli* พบว่าหลังจาก heat induction มีการสร้างโปรตีนขนาด 128 kDa จาก *cryIVB* gene ใน plasmid ตัวใหม่นี้ในปริมาณที่สูงมาก และ cells พวกนี้สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม, ใน cyanobacteria การสร้างโปรตีนขนาด 128 kDa จาก *cryIVB* gene จาก plasmid เดียวกันนี้ไม่สามารถถูกกระตุ้นให้เพิ่มปริมาณได้โดย heat induction แม้ว่าสามารถตรวจสอบได้ว่ามี pKT210.388.T7.pol อยู่ใน cyanobacteria จริง การที่ตรวจพบโปรตีนขนาด 128 kDa ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำนั้น อาจจะเนื่องมาจากจำนวน (copy number) ของ pKT210 plasmid ใน cyanobacteria มีน้อยมาก ทำให้ผลผลิตของ *cryIVB* gene ที่ได้น้อยไปด้วย

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการนำ *cryIVB* gene เข้าสู่ local strain ของ cyanobacteria รวมถึงความสามารถในการสร้างโปรตีนขนาด 128 kDa ใน cyanobacteria นั้นๆ ด้วย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Cloning and Expression of *cryIVB* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* (*Bti*) in Locally Isolated Cyanobacteria

Name Rachada Kiatfuengfoo

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Sakol Panyim, Ph D.

Prapon Wilairat, Ph D.

Amaret Bhumiratana, Ph D

Date of Graduation 10 August B E. 2537 (1994)

ABSTRACT

The cyanobacteria are organisms those are capable of oxygenic photosynthesis. They have become an increasing popular model system for many fields of investigation via genetic and molecular biological techniques. Many attempts to manipulate the mosquito-larvicidal genes of both *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) and *B. sphearicus* to be expressed in these group of organisms have proven unsatisfactory. Since all previous studies were done on the reference or laboratory strains, it is more promissing to use the strain(s) which inhabit the same place with mosquito larvae or to use the locally isolated cyanobacteria.

Copyright by Mahidol University

151 isolates of cyanobacteria were obtained from 176 water samples collected from various places in Bangkok and nearby provinces. Five isolates were sent for identification at the Pasteur Institut, France, and found to be *Synechocystis* PCC9001 and PCC9002 and *Synechococcus* PCC9003, PCC9004 and PCC9005. Due to the complication and time-consumption of conventional methods to identify cyanobacteria, identification of bacteria by DNA fingerprinting was applied to differentiate some of those local isolates. DNA from 40 isolates and 3 reference strains from the Pasteur Culture Collection (PCC) were digested with *Pst*I and probed with ^{32}P-labelled M13 bacteriophage DNA to produce characteristic DNA fingerprinting patterns (DFP). 37 DFP were obtained. None of the local isolates gave a similar pattern to those of the reference strains. Six isolates collected from different places gave 3 pairs of identical DFP, and three isolates collected from the same place also gave identical DFP, suggesting that the ones those having identical DFP belonged to the same isolate. 31 isolates gave different patterns suggesting that cyanobacteria were highly heterogeneous.

To introduce the *cryIVB* gene of *Bti* into local cyanobacteria, a shuttle vector was constructed. However transformation by natural uptake or electroporation were not successful.

Using the technique of plasmid mobilization, the broad-host-range plasmid, pKT210, was able to mobilize from *E.coli* (habouring the helper plasmid, pRK2013) into 3 out of 11 isolates of local cyanobacteria. pKT210.388, containing the *cryIVB* gene was mobilized into PCC9002 and CNRS2. The existence of the plasmid in

Copyright by Mahidol University

cyanobacteria was demonstrated by Southern blot hybridization and rescue of plasmid in *E coli*. The 128 kDa protein product from these cyanobacterial transconjugants were demonstrated by immunoblotting assays, although the amounts of products were quite low. However, the results indicated that the *cryIVB* gene of *Bti* was able to be introduced and expressed in locally isolated cyanobacteria.

In an attempt to improve the expression of *cryIVB* gene in local cyanobacteria, pKT210.388.T7.pol which contained T7 promoter upstream to the *cryIVB* gene, T7 RNA polymerase gene and the whole set of its regulatory genes was constructed. In *E.coli* the *cryIVB* gene in this plasmid was shown to be expressed very well after heat induction. The cells were also highly toxic to mosquito larvae. However, expression in cyanobacteria using the same system was not higher than the expression under its own promoter . It was demonstrated by rescue of plasmids in *E.coli* that the *cryIVB* gene in plasmids from cyanobacteria had not been changed within the cyanobacterial cells as the gene was able to express in the rescued *E.coli* to a similar extent as in cells that harboring the original plasmid . The low expression might be due to the low copy number of the broad host range plasmid, pKT210, in cyanobacteria.

Copyright by Mahidol University