LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
30 JAN 1991

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF MOSQUITO TOXIN GENE FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENSIS* IN *ESCHERICHIA COLI* AND *BACILLUS SPHAERICUS* STRAINS 1593 AND 2362

MAYUREE TRISRISOOK

อภินันทนาการ
จาก

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

16467

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายยีนควบคุมการสร้างสารพิษจาก *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis ใน *Escherichia coli* และ *Bacillus sphaericus* สายพันธุ์ 1593 และ 2362

ผู้วิจัย มยุรี ไตรศรีสุข

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr.Eng.
สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D.
อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.
สกล พันธุยิ้ม, Ph.D.

วันสำเร็จการศึกษา 27 มีนาคม พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

เมื่อนำ XbaI DNA fragment ขนาด 3.7 kb ซึ่งควบคุมการสร้างสารพิษฆ่าลูกน้ำยุงจากพลาสมิดขนาด 110 kb ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*B.t.i.*) มาต่อกับพลาสมิดพาหะคือ pUC12 (ดื้อยา Ampicillin) ได้พลาสมิดสายผสมให้ชื่อว่า pBT8 จากนั้น นำเข้า *E. coli* ทำให้ *E. coli* transformants สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) ได้ เมื่อนำพลาสมิด pBT8 (6.4 kb) ต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะสำหรับ *Bacillus* คือ pBC16 (ดื้อยา Tetracycline) ได้พลาสมิดสายผสมให้ชื่อว่า pBT24 (10.8 kb) พลาสมิด pBT24 หรือพลาสมิด pBTC1 (8.1 kb) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สร้างโดยการเอา SmaI-SalI fragment ของ pUC12 ออกจาก pBT24 สามารถ transform *Bacillus sphaericus* สายพันธุ์ 1593 และ 2362 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*Anopheles sp.*) และยุงรำคาญ (*Culex sp.*) โดยวิธี protoplast transformation จากการวิเคราะห์พลาสมิดจาก transformant ที่ได้ พบว่ามี plasmid pBTC1 จากการศึกษาโดยวิธี Southern hybridization พบว่า บน plasmid pBT8 และ pBT24 ของ *E. coli* transformant และ

Copyright by Mahidol University

บนพลาสมิด pBTC1 ของ *B. sphaericus* transformant มีชิ้นส่วนของ 3.7 kb XbaI fragment ของ *B.t.i.* นอกจากนั้น การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Western blot analysis โดยการใช้ Anti 130 kDa ของ *B.t.i.* ยังพิสูจน์ว่า *B. sphaericus* transformant สามารถสร้างสารพิษขนาด 130 kDa ของ ของ *B.t.i.* ได้ และจากการศึกษาความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุง พบว่า *B. sphaericus* transformant มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีเท่ากับเชื้อ *B.t.i.* โดยมี LC_{50} เท่ากับ 5.75×10^2 cells/ml และ 2.71×10^2 cells/ml สำหรับสายพันธุ์ 1593 และ 2362 ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังคงมีคุณสมบัติเด่น คือฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex sp.*) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles sp.*) ได้ ในการศึกษาการดำรงอยู่ของพลาสมิดสายผสมใน transformant พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่ได้ใส่ยา tetracycline และมีการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ไม่ได้ใส่ยาทุกวัน ไม่มีผลต่อการคงอยู่ของพลาสมิดในเซลล์ แม้เมื่อเลี้ยงเซลล์ติดต่อกันในสภาพดังกล่าว เป็นเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Molecular Cloning and Expression of Mosquito Toxin Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Escherichia coli* and *Bacillus sphaericus* strains 1593 and 2362.

Name Mayuree Trisrisook

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Watanalai Panbangred, Dr.Eng.
Somsak Pantuwatana, Ph.D.
Amaret Bhumiratana, Ph.D.
Sakol Panyim, Ph.D.

Date of Graduation 27 March B.E. 2533 (1990)

ABSTRACT

A 3.7 kb XbaI fragment encoding a 130 kilodalton (kDa) mosquitocidal toxin from a 110 kb plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*B.t.i.*) strain 4Q2-72 was cloned into pUC12 and transformed into *E. coli*. The clone with a recombinant plasmid (designated pBT8) was toxic to *Aedes aegypti* larvae. pBT8 (6.4 kb) was ligated into pBC16 (Tetracycline resistance, Tc^r) and transferred into *E. coli*. The new recombinant plasmid was designated pBT24. pBT24 or its deleted plasmid, pBTC1 which was constructed by deleting SmaI-SalI fragment of pUC12 were transformed by the method of protoplast transformation into *Bacillus sphaericus* strains 1593 and 2362 which were highly toxic to *Anopheles* and *Culex* mosquito larvae but less toxic to *Aedes* larvae. After cell

Copyright by Mahidol University

regeneration on regeneration medium, the Tc^r plasmids from transformants (pBTC1) of both strains of *B. sphaericus* were prepared and analysed. The 3.7 kb XbaI fragments from *E. coli* and *B. sphaericus* transformants were shown to be present by agarose gel electrophoresis and Southern blot hybridization. In addition, *B. sphaericus* transformants produced a 130 kDa mosquitocidal toxin which was detected by Western blot analysis with antibody prepared against *B.t.i.* 130 kDa mosquitocidal toxin. The LC_{50} of the transformants of strains 1593 and 2362 against *Ae. aegypti* larvae were 5.75×10^2 and 2.71×10^2 cells/ml respectively. This level of toxicity was comparable to the LC_{50} of *B.t.i.* but much higher than that of *B. sphaericus* 1593 and 2362 (4.7×10^4 cells/ml) against *Ae. aegypti* larvae. The transformants also retained high toxicity against mosquito larvae of *Anopheles* and *Culex*. Finally, the recombinant plasmids were highly stable upon daily subculture for at least 4 weeks in medium without tetracycline.

Copyright by Mahidol University