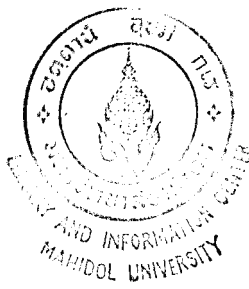


6 AUG 2001



**MUTAGENESIS STUDIES OF STRUCTURE-FUNCTION  
RELATIONSHIPS OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry11A TOXIN**

**SIRIPORN KEERATICHAMROEN**

✓

อธิบดีมหาวิทยาลัย  
จาก  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(MOLECU LR GENETICS and GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2001**

**ISBN 974-665-987-1**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH

ST19m

2001

Copyright by Mahidol University

4237015 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING; M.Sc (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

KEY WORDS : DELTA-ENDOTOXIN, Cry11A, *Bacillus thuringiensis*, MUTAGENESIS

SIRIPORN KEEREATCHAMROEN: MUTAGENESIS STUDIES OF STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry11A TOXIN. THESIS ADVISORS: CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D. 182 p. ISBN 974-665-987-1

In this study, the recombinant plasmid harboring the *Bacillus thuringiensis* cry11A gene under control of the *tac* promoter together with the 5' upstream (UT) of the *cry4B* gene was constructed for highly expressing the toxin in *Escherichia coli*. Western blot analysis revealed that the expressed proteins from the recombinant cry11A clone containing the *cry4B*-5' -UT showed a higher level of expression than that of the clone without the 5' -UT, although more protein degradation was found. Based on the currently proposed toxicity mechanism for the Cry toxins, their pore-forming activity is involved with an insertion of the  $\alpha 4$ - $\alpha 5$  helical hairpin into the target midgut epithelial cell membrane. In this study, a number of polar or charged residues in helix 4 within domain I of the 65-kDa dipteran-active Cry11A toxin, Lys-123, Tyr-125, Asn-128, Ser-130, Gln-135, Arg-136, Gln-139 and Glu-141, were initially substituted with alanine by using a PCR-based directed mutagenesis. All mutant toxins were expressed as a cytoplasmic inclusion in *E. coli* strain JM109 upon induction with IPTG. Similar to that of the wild type protoxin inclusion, the solubility levels of each mutant inclusion in carbonate buffer, pH 9.0, is relatively low. When *E. coli* cells expressing each of the mutant proteins were tested for toxicity against *Aedes aegypti* mosquito-larvae, completely abolished toxicity was observed for the alanine substitution of arginine at position 136 while mutations to alanine at the other positions still retained a high level of larvicidal activity. Interestingly, further investigation of this critical arginine residue showed that conversions of the arginine-136 to aspartate, glutamine or even to the most conserved residue-lysine also abolished the larvicidal activity. The results of this study reveal an important determinant in toxin function for the positively charged side chain of arginine-136 in helix 4 of the Cry11A toxin.

4237015 MBMG/M : สาขาวิชา: อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์: วท.ม.  
(อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

ศิริพร กิรติจำเริญ: การเปลี่ยนแปลงยีนเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนสารพิษ Cry11A จาก แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (MUTAGENESIS STUDIES OF STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS OF THE *Bacillus thuringiensis* Cry11A TOXIN) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชนันท์ อังศุชนสมบัติ, Ph.D., ชาดิชาย กฤตณัย, Ph.D., กุศล ภูวนกิจ, Ph.D. 182 หน้า. ISBN 974-665-987-1

ในการศึกษานี้ได้สร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งมียีน *cry11A* ภายใต้การควบคุมของ *tac* promoter และส่วน 5'-upstream (UT) ของยีน *cry4B* เพื่อเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนสาร Cry11A ใน *Escherichia coli* ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ได้ผลิตมาจากพลาสมิดลูกผสมดังกล่าวมีระดับการแสดงออกสูงกว่าโปรตีนที่ผลิตมาจากพลาสมิดลูกผสมที่ไม่มีส่วน 5'-UT ของยีน *cry4B* แต่พบว่าโปรตีนที่สร้างได้นี้ถูกตัดย่อยมากกว่าจากแบบจำลองแสดงกลไกการเกิดความเป็นพิษที่เสนอว่าการเกิดรูบนเนื้อเยื่อนั้นเกี่ยวข้องกับการสอดแทรกของเกลียวอัลฟาที่ 4 และ 5 เข้าไปในเนื้อเยื่อ ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญในเกลียวอัลฟาที่ 4 ของโปรตีนสารพิษ Cry11A ว่ามีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการฆ่าลูกน้ำหรือไม่ โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนหลายตำแหน่งให้เป็นอะลานีนด้วยวิธีการเปลี่ยนแปลงยีนเฉพาะที่ซึ่งโปรตีนกลายพันธุ์ที่สร้างขึ้นใหม่ 8 ชนิด ได้แก่ K123A, Y125A, N128A, S130A, Q135A, R136A, Q139A และ E141A สามารถถูกสร้างในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 โดยอยู่ในรูปของผลึกโปรตีน ซึ่งโปรตีนกลายพันธุ์ทั้ง 8 ชนิดมีความสามารถในการละลายในสารละลายคาร์บอนเตตระอามมากเหมือนกับโปรตีนต้นแบบ (wild type) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด R136A สูญเสียความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) โดยสิ้นเชิงในขณะที่โปรตีนกลายพันธุ์ชนิดอื่น ๆ ยังคงความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้การเปลี่ยนกรดอะมิโนอาร์จินีนตำแหน่ง 136 นี้ให้เป็นไลซีน แอสปาดเตต หรือกลูตามีน ก็ยังคงสูญเสียความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงลายด้วยเหมือนกัน ผลงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า side chain ที่มีประจุบวกของกรดอะมิโนอาร์จินีนที่ตำแหน่ง 136 มีบทบาทที่สำคัญต่อความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงของโปรตีนสารพิษ Cry11A