



**SITE-DIRECTED MUTAGENESIS AND STABILITY  
CHARACTERIZATION OF SELECTED RESIDUES  
IN CRY4B DOMAIN I**

**APICHAJ BOURCHOOKARN**

**With compliments  
of  
.....บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.....**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2003**

**ISBN 974-04-3082-1**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
A6424  
2003  
C.2

**SITE-DIRECTED MUTAGENESIS AND STABILITY CHARACTERIZATION OF  
SELECTED RESIDUES IN CRY4B DOMAIN I****APICHAI BOURCHOOKARN 4336302 MBMG/M****M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)****THESIS ADVISORS : CHARTCHAI KRITTANAI, Ph.D.,  
CHANAN ANGSUTHANASOMBAT, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D.****ABSTRACT**

We have conducted specific mutations on the conserved hydrophobic residues, Leu-175 and Ile-189 in  $\alpha 5$  of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin. A 65-kDa active fragment with the removal of an internal cleavage at Arg-203 was used as a template for this study. The generated mutants, L175V and I189L, were found to maintain the native-like properties including expression level, inclusion solubility, trypsin digestion and larvicidal activity. Spectroscopic analysis by circular dichroism and emission fluorescence demonstrated native-like structure of the mutants in comparison with the template. Unfolding experiments by guanidine hydrochloride denaturation showed a decrease in conformational stability for L175V, but was unchanged for I189L. The destabilization effect of L175V was 10.48 kcal/mol relative to its template. Unfolding kinetic experiments were also performed for the mutants and template. The data revealed a minimal effect on the activation energy for unfolding of the toxins. These results suggested that the perturbation of hydrophobic residue at position 175 can significantly affect the thermodynamic stabilization of the Cry4B toxin.

**KEY WORDS: SITE-DIRECTED MUTAGENESIS /  $\delta$ -ENDOTOXIN /  
*Bacillus thuringiensis* / CIRCULAR DICHROISM /  
INTRINSIC FLUORESCENCE / PROTEIN FOLDING /  
PROTEIN STABILITY**

125 P. ISBN 974-04-3082-1

การศึกษาเสถียรภาพของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิด CRY4B โดยวิธีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน  
(SITE-DIRECTED MUTAGENESIS AND STABILITY CHARACTERIZATION OF  
SELECTED RESIDUES IN CRY4B DOMAIN I)

อภิชัย บัวชูก้าน 4336302 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชาติชาย กฤตนิย, Ph.D., ชนันท อังสุชนสมบัติ, Ph.D.,  
GERD KATZENMEIER, Ph.D.

บทคัดย่อ

Cry4B เป็นโปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน ผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *israelensis* มีพิษจำเพาะต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) โดยปกติโมเลกุลของโปรตีนจะผ่านกระบวนการตัดย่อยโดยเอนไซม์โปรตีเอสภายในกระเพาะลูกน้ำยุง เพื่อให้ได้โปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ ในงานวิจัยนี้ได้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน L-175 และ I-189 ที่มีอยู่ในเกลียวอัลฟาที่ 5 ขึ้น เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆ เปรียบเทียบกับโปรตีนแม่แบบ (template) ซึ่งพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ L175V และ I189L ที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการละลาย การถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง เทียบเท่ากับโปรตีนแม่แบบ จากการทดสอบการคลายสภาพโครงสร้าง (unfolding) โดยใช้ GuHCl พบว่า L175V มีเสถียรภาพของโครงสร้างโมเลกุลลดต่ำกว่าโปรตีนแม่แบบ ในขณะที่การกลายพันธุ์ของ I189L ไม่มีผลกระทบต่อเสถียรภาพของโปรตีนแต่อย่างใด นอกจากนี้เมื่อศึกษาเชิงจลนศาสตร์ของโปรตีนเหล่านี้ พบว่าค่าพลังงานกระตุ้น (activation energy) ของการคลายโครงสร้างที่คำนวณได้ของทั้งโปรตีนแม่แบบและโปรตีนกลายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการอนุรักษ์ของกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำที่ตำแหน่ง 175 มีผลโดยตรงต่อการรักษาเสถียรภาพเชิงโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนสารพิษชนิด Cry4B

125 หน้า. ISBN 974-04-3082-1