Abstract

Vegetative insecticidal proteins (Vip3A) produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt) is highly toxic to some Lepidopteran insect larvae that are serious agricultural pests. We have identified and isolated a new Vip3A toxin from local strain of *B. thuringiensis*. The toxin is highly produced and secreted into the culture medium and shows high toxicity against *Spodoptera exigua* and *Spodoptera litura* that are important insect pests in Thailand. In this project we have tried to identify Vip3Aa receptors from susceptible larvae *S. exigua*, a major pest for several vegetable and fruit crops in Thailand. The *vip3Aa* gene was cloned in *E. coli* to be expressed as a 6xHis-tag fusion protein. This protein was used in ligand blot to fishing out its receptor from brush broader membrane extracted from midguts of *S. exigua* larvae. An interesting spot was identified from 2-dimensional gel electrophoresis couple with immunoblot detection. Molecular weight of this spot is about 170 kDa with pI approximately 7. Unfortunately, the identity of this spot has not been resolved since it could not be distinguished from other proteins in the surrounding area. The putative receptor binding motif in Vip3A has been predicted from its amino acid sequence. This region is located at the C-terminal part consisting of amino acid around positions 530-690. This region should adopt 3D structure similar to a carbohydrate binding module (CBM) of other protein that can bind to a sugar residue of a glycoprotein that should acts as a Vip3A receptor. Amino acid substitutions in this region such as W552L, D616A and W684L affected the toxin activity suggested that these changes may interfere their binding to a receptor on the gut cell membrane. Feeding the *S. litura* larvae with a mixture of the full-length Vip3A and its C-terminal fragment resulted in a reduction of larvicidal activity indicated that the C-terminal part containing a CBM completes for the receptor binding thus rendering the toxin activity. Different Vip3A proteins such as Vip3Aa, Vip3Ad and Vip3Af show a highly conserved amino acid sequences at the N-terminal part but highly variable in the C-terminal part thus these toxins exhibit different specificity to different insects. These data indicated that the receptor binding motif of Vip3A is located in the C-terminal region. In addition, the Tyr-776 play a crucial role in maintaining the toxin stability upon long term storage.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal protein, receptor, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, Vip3A

บทคัดย่อ

โปรตีน Vip3A ที่ผลิตจากแบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*) สามารถออกฤทธิ์ต่อหนอนแมลงศัตรูพืชจำพวกหนอนผีเสื้อได้ดี เราได้ทำการค้นพบโปรตีน Vip3A จากแบคทีเรียบีทีสายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้ในประเทศไทย โดยพบว่าโปรตีนตัวนี้สร้างและหลั่งออกมาปริมาณมากละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถออกฤทธิ์ได้ดีต่อหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทย เราได้ทำการโคลนยีนเพื่อสร้างโปรตีนนี้ใน *E. coli* โดยสามารถผลิตและแยกบริสุทธิ์ได้ปริมาณสูงในรูปที่ต่อเชื่อมกับ 6x-His tag เมื่อทำการวิเคราะห์หาโปรตีนตัวรับจำเพาะของ Vip3A จากเยื่อหุ้มเซลล์ของหนอนกระทู้หอมโดยใช้เทคนิค ligand blot จากโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ทางเดินอาหารของหนอนกระทู้หอมโดยใช้เทคนิค 2D-gel พบสัญญาณการจับของ Vip3A กับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 170 kDa และมีค่า pI ประมาณ 7 แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนนี้ได้เนื่องจากยังไม่สามารถแยกจุดของโปรตีนนี้ออกจากโปรตีนอื่นที่อยู่บริเวณเดียวกันและมีจำนวนมากได้ จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าโปรตีน Vip3A น่าจะใช้กรดอะมิโนประมาณตำแหน่งที่ 530-690 ที่อยู่ส่วนปลาย C-terminal จับกับตัวรับเนื่องจากส่วนนี้มีลักษณะคล้ายกับ carbohydrate binding module (CBM) ของโปรตีนอื่นที่ทราบโครงสร้างและหน้าที่แล้ว เราจึงได้ทำการแทนที่กรดอะมิโนในบริเวณนี้ และพบว่าโปรตีนกลาย W552L, D616A และ W684L ไม่สามารถฆ่าหนอนได้ ซึ่งอาจเกิดจากการที่โปรตีนกลายไม่สามารถเข้าจับกับตัวรับจำเพาะบนเยื่อหุ้มเซลล์ของหนอน เมื่อให้หนอนกระทู้ผักกินโปรตีนที่เป็นส่วนผสมระหว่าง full-length Vip3A และ ชิ้นส่วน CBM ของ Vip3A ที่มีขนาด 22 kDa พบว่าชิ้นส่วนนี้สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ Vip3A ซึ่งชี้ให้เห็นว่าชิ้นส่วน CBM สามารถเข้าแย่งจับกับตัวรับจำเพาะทำให้ Vip3A เข้าจับได้น้อยลง เมื่อทำการสำรวจ Vip3A จากบีทีสายพันธุ์ท้องถิ่นอื่นๆที่คัดแยกได้ในประเทศไทย พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N-terminal ที่คล้ายกันมาก แต่มีกรดอะมิโนด้าน C-terminal แตกต่างกัน และมีความสามารถในการฆ่าหนอนแมลงแตกต่างกัน เช่น Vip3Aa, Vip3Ad และ Vip3Af ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนที่อยู่ด้าน C-terminal มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อแมลงแต่ละชนิด นอกจากนี้เรายังพบว่ากรดอะมิโน Tyrosine ที่ตำแหน่ง 776 มีความสำคัญต่อการรักษาโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของโปรตีน Vip3A โดยเฉพาะเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลานาน

คำสำคัญ แบคทีเรียบีที โปรตีนฆ่าหนอนแมลง ตัวรับจำเพาะ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก โปรตีน Vip3A