

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580170

ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณสมบัติเชิงโมเลกุลของโปรตีน Alkaline Phosphatase ที่เป็นตัวรับจำเพาะต่อโปรตีนสารพิษ Cry4A และ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในผนังหุ้มเซลล์บุผิวกระเพาะของลูกน้ำยุงรำคาญ

ชื่อนักวิจัย : ดร. มณสิวี เตชกล้า

อีเมลล์ : yuikamaiw@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

บทคัดย่อ:

การออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ Cry4 จาก *Bacillus thuringiensis* เกี่ยวข้องกับการจับกับโปรตีนตัวรับจำเพาะ (Receptor) ที่ผนังหุ้มเซลล์บุผิวกระเพาะของแมลงตัวอ่อน และทำให้เกิดรูรับนเซลล์บุผิวกระเพาะซึ่งสามารถทำลายแมลงตัวอ่อนได้ การศึกษาวิจัยนี้เป็นการโคลนยีน Alkaline phosphatase (ALP) ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่อยู่บนผนังเซลล์ (Membrane-bound protein) และเป็นตัวรับจำเพาะของโปรตีนสารพิษชนิด Cry4 ในลูกน้ำยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus*) โดยใช้ mRNA ซึ่งสกัดจากเซลล์บุผิวกระเพาะลูกน้ำยุงในการสังเคราะห์ขึ้น cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบจากลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน ALP ที่มีความคล้ายคลึงกันในลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) ขึ้นของ cDNA ที่สร้างโปรตีน ALP ของลูกน้ำยุงรำคาญทั้งหมด 3 ชนิด (*Cq-mALP/1263/1264/1265*) ได้ถูกสร้างและแสดงออกในเซลล์เพาะเลี้ยงแมลงหนอนกระทู้ (*Sf9* cell) และพบว่าโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ถูกแสดงออกบนผนังหุ้มเซลล์ของเซลล์ดังกล่าวได้ เมื่อทดสอบการจับของโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ กับโปรตีนสารพิษ Cry4Aa และ Cry4Ba พบว่า เซลล์ที่สร้างโปรตีน *Cq-mALP/1264* มีสภาพความเป็นพิษเกิดขึ้น หลังจากได้รับโปรตีนสารพิษ Cry4Aa โดยมีผลสอดคล้องกับการตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยการย้อมสี (Trypan blue exclusion assay) และการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability assay) ซึ่งพบว่าเซลล์ที่รอดชีวิตมีจำนวนลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ชุดควบคุม รวมทั้งเมื่อศึกษาโดยใช้วิธีทางอิมมูโนวิทยา (Immunofluorescence) พบว่า โปรตีน Cry4Aa ยังสามารถจับกับโปรตีน ALP ที่ผนังหุ้มเซลล์ของเซลล์แมลงหนอนกระทู้ได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีข้อสรุปว่า โปรตีน ALP ที่แสดงออกบนผิวกระเพาะของลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cq-mALP/1264*) สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะที่สามารถจับกับโปรตีนสารพิษ Cry4Aa และมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ Cry4Aa และทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงหนอนกระทู้ได้ ในขณะที่โปรตีน ALP ที่แสดงออกบนผิวกระเพาะของลูกน้ำยุงรำคาญอีก 2 ชนิด คือ *Cq-mALP/1263* และ *Cq-mALP/1265* สามารถจับกับโปรตีนสารพิษทั้งชนิด Cry4Aa และ Cry4Ba ได้ แต่ไม่มีความสำคัญต่อการทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงหนอนกระทู้ดังกล่าว

คำหลัก: แบคทีเรียสารพิษ / โปรตีนสารพิษชนิด Cry4 / โปรตีน Alkaline phosphatase / ลูกน้ำยุงรำคาญ / เซลล์เพาะเลี้ยงแมลงหนอนกระทู้ / ความเป็นพิษต่อเซลล์ / อิมมูโนวิทยา

Abstract

Project Code : MRG5580170

Project Title : Molecular characterization of membrane-bound alkaline phosphatases from *Culex quinquefasciatus* midgut larvae : a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba toxins

Investigator : Dr. Manussawee Dechkla

E-mail Address : yuikamaiw@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract :

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) has been widely used as biological control agents for many insect species including several human disease vectors, for example, *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* species. The bacterium produces at least two major insecticidal crystal (Cry) proteins which are Cry4Aa and Cry4Ba toxins. The binding of Cry toxins to their specific receptors in the midgut of susceptible insect larvae is one of the critical steps in Cry toxin activity. Based on the sequence identity to Aa-mALP Cry4Ba toxin receptor, three homolog sequences of the putative membrane-bound alkaline phosphatase (ALP) from *Culex quinquefasciatus* larval midgut (Cq-mALP/1263/1264/1265) were amplified by RT-PCR and used to transiently expressed in an insect cell line, *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. The interaction between Cq-mALPs and Cry toxins was investigated by cytotoxicity and immunolocalization assays. The result showed that the 61 kDa of Cq-mALP/1264-expressed cells were sensitively susceptible to the Cry4Aa toxin. Moreover, Cry4Aa was able to bind specifically to membrane surface of Cq-mALP/1264-expressed cells by immunofluorescence staining method. In conclusion, Cq-mALP/1264 may serve as a receptor for Cry4Aa toxin by mediating toxicity in Sf9 cells. By contrast, the other two Cq-mALPs, 57-kDa Cq-mALP/1263 and 63-kDa Cq-mALP/1265, are necessary for Cry toxin binding and might be possessed the function as a potential alternative receptor for Cry4Ba toxin.

Keywords : *Bacillus thuringiensis* / Cry4 toxins / membrane-bound alkaline phosphatase / *Culex quinquefasciatus* / *Spodoptera frugiperda* / cytotoxicity / immunolocalization assays