

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(1)
กิตติกรรมประกาศ.....	(3)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพประกอบ.....	(9)
 บทที่	
1. บทนำ.....	1
1. ที่มาและความสำคัญ.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. ยุง.....	4
1.1 ลักษณะทั่วไปของยุง.....	4
1.2 การควบคุมประชากรยุง.....	5
2. แบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
3. โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
3.1 Crystal toxin.....	10
3.2 Cytolytic toxin.....	14
4. การออกฤทธิ์เสริมกันของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง.....	16
5. Surface plasmon resonance (SPR)	17

5.1 หลักการของ Surface plasmon resonance.....	17
5.2 เครื่องเอสพีอาร์ (SPR instrument)	19
5.2.1 เครื่องเอสพีอาร์แบบมุมคงที่ (Fixed angle)	20
5.2.2 เครื่องเอสพีอาร์แบบสแกนมุม (Angle scanning)	20
5.2.3 เครื่องเอสพีอาร์แบบภาพ (SPR imaging)	21
6. การใช้เครื่องวัด SPR ในการศึกษาโปรตีนสารพิษ.....	22
 3. วิธีการวิจัย.....	24
1. วัสดุ.....	24
1.1 แบบที่เรีที่ใช้ในการผลิตโปรตีนสารพิษ.....	24
1.2 ชิปเซนเซอร์.....	24
2. วิธีทดลอง.....	26
2.1 การผลิตโปรตีนสารพิษ.....	26
2.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	27
2.3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (non-denaturing-PAGE).	28
2.4 การทำให้โปรตีนสารพิษพร้อมจะแสดงความเป็นพิษ (toxin activation).....	28
2.5 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba....	28
2.5.1 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่าง Cyt2Aa กับ Cry4Ba โดย ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง (mosquito-larvicidal assay)	30
2.5.2 การทดสอบการออกฤทธิ์เสริมกันของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba โดยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity assay)	31
2.5.3 การคำนวณระดับของการออกฤทธิ์เสริมกัน.....	31
2.6 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วย เทคนิคทางชีวเคมี.....	32
2.6.1 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่ในสารละลาย.....	32
2.6.2 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์.....	33

2.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน.....	33
2.7.1 การเตรียมผิวทอง.....	34
2.7.2 การวัดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ.....	35
4. ผลของการวิจัย.....	36
1. การผลิตโปรตีนสารพิษ.....	36
2. การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง Cyt2Aa และ Cry4Ba.....	38
2.1 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันด้วยทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง (mosquito-larvicidal assay)	38
2.2 การศึกษาการออกฤทธิ์เสริมกันโดยวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity assay)	41
2.3 การศึกษาความสามารถในการจับกับไลโปโซมของโปรตีน Cyt2Aa กลาย.....	45
3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคซีวเคมี.....	46
3.1 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่ในสารละลาย.....	46
3.1.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค native-PAGE.....	47
3.1.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี.....	47
3.2 ช่วงที่โปรตีนสารพิษอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์.....	50
3.2.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	50
3.2.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี.....	51
4. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน.....	54
4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมผิวทอง.....	54
4.2 การตรวจวัดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษด้วยเทคนิคคลื่นผิวพลาสมอน...	56
5. วิจารณ์ผลการวิจัย.....	61
1. การศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง Cyt2Aa และ Cry4Ba.....	61

2. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba	
ด้วยเทคนิคซีวเคมี.....	61
3. การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa กับ Cry4Ba ด้วยเทคนิค	
คลื่นผิวพลาสมอน.....	62
4. กลไกการเสริมฤทธิ์กันของโปรตีน Cyt2Aa และ Cry4Ba.....	63
 6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	66
 รายการอ้างอิง.....	67
 ภาคผนวก	
ก เครื่องมือ สารเคมีและการเตรียมสารเคมี.....	72
ข ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa และ Cry4Ba.....	81
 ประวัติการศึกษา.....	87