

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(2)
กิตติกรรมประกาศ.....	(4)
สารบัญ	(5)
สารบัญตาราง.....	(11)
สารบัญภาพประกอบ.....	(12)
 บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของเรื่องที่ศึกษา.....	1
1.1.1 การควบคุมประชากรยุง.....	1
1.1.1.1 การควบคุมประชากรยุงโดยการควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์ยุง	1
1.1.1.2 การควบคุมประชากรยุงโดยใช้สารเคมี (Chemical control)	1
1.1.1.3 การควบคุมประชากรยุงด้วยกระบวนการทางชีววิธี (Biological control)	2
1.1.2 การใช้แบคทีเรียในฐานะตัวควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol agent) สำหรับควบคุมประชากรยุง.....	2
1.1.3 กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนกำจัดลูกน้ำยุง	5
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	6
1.3 ขอบเขตของการศึกษา	7

2. ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่นๆที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1 แบคทีเรีย <i>Bacillus sphaericus</i> และ โปรตีนสารพิษจาก	
<i>Bacillus sphaericus</i>	9
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย <i>Bacillus sphaericus</i>	9
2.1.2 โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย <i>Bacillus sphaericus</i>	10
2.1.2.1 โปรตีนสารพิษ Binary toxin.....	10
2.1.2.2 โปรตีนสารพิษในกลุ่ม Mosquitocidal toxins (Mtxs) ..	10
2.1.2.3 โปรตีนสารพิษ Sphaericolysin	12
2.2 โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน	
สารพิษ Mtx2	13
2.2.1 โปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13
2.2.2 โปรตีนสารพิษ E-toxin จากแบคทีเรีย	
<i>Clostridium perfringens</i>	16
2.2.3 โปรตีนสารพิษ Parasporin-2 จากแบคทีเรีย	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	19
2.3 Brush Border Membrane บริเวณเป้าหมายสำหรับโปรตีนสารพิษ	
จากแบคทีเรีย	22
2.4 ตัวอย่างการศึกษาการหาโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษจาก	
แบคทีเรีย	23
2.4.1 Identification of the receptor for <i>Bacillus sphaericus</i>	
crystal toxin in the brush border membrane of the	
mosquito <i>Culex pipiens</i> (Diptera: Culicidae)	
(Silva-Filha et al, 1999)	23
2.4.2 Proteomic identification of <i>Bacillus thuringiensis</i>	
subsp. <i>israelensis</i> toxin Cry4Ba binding proteins in	
midgut membranes from <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	

Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae (Bayyareddy et al, 2009).....	25
3. เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และ วิธีการทดลอง	27
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	27
3.1.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2	27
3.1.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)	28
3.1.3 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง ลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36	29
3.1.4 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วย เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	29
3.1.5 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วย เทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE)	30
3.1.6 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการติดตามโปรตีนด้วย เทคนิค Western blot.....	31
3.1.7 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเปปไทด์ หมายด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	31
3.2 วิธีการทดลอง.....	32
3.2.1 การผลิตโปรตีนสารพิษ Mtx2.....	32
3.2.1.1 การแสดงออกของแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> JM109 +pGEX-tMtx2	32
3.2.1.2 การสกัดแยกโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์	34
3.2.1.3 การวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างจากขั้นตอนการสกัดแยก โปรตีน GST-tMtx2 และโปรตีน tMtx2 บริสุทธิ์ ด้วย เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide	

Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	36
3.2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน GST-tMt ₂ และโปรตีน tMt ₂	38
3.2.2 การเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)	39
3.2.2.1 การฟักไข่และการเลี้ยงลูกน้ำยุง.....	39
3.2.2.2 ขั้นตอนการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF)	40
3.2.3 การวิเคราะห์โปรตีนจาก Brush Border Membrane Fraction (BBMF) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่ มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt ₂ ด้วยเทคนิค Western blot	43
3.2.4 การเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 .	47
3.2.5 การวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt ₂ ด้วยเทคนิค Western blot.....	48
3.2.6 การวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำ ยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความ สามารถในการจับกับโปรตีน tMt ₂ ด้วยเทคนิค Western blot	49
3.2.7 การวิเคราะห์โปรตีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	52
4. ผลการทดลอง.....	55
4.1 การผลิตโปรตีนสารพิษ Mt ₂	55

4.1.1 ผลการวิเคราะห์การชักนำให้แบคทีเรีย <i>E. coli</i> JM109 มีการแสดงออกของโปรตีน GST-tMt2 โดยสาร Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	55
4.1.2 ผลการวิเคราะห์การสกัดแยกโปรตีน GST-tMt2 บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	57
4.1.3 ผลการวิเคราะห์การย่อยโปรตีน GST-tMt2 ด้วยเอนไซม์ ทรอมบิน (Thrombin) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	59
4.1.4 ผลการวิเคราะห์การสกัดแยกโปรตีน tMt2 บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	61
4.2 การวิเคราะห์โปรตีนจาก Brush Border Membrane Fraction (BBMF) ของลูกน้ำยุง.....	63
4.2.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนตัวอย่างจากขั้นตอนการเตรียม Brush Border Membrane Fraction (BBMF) ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	63
4.2.2 การตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt2 ด้วยเทคนิค Western blot.....	65
4.3 การวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36.....	69
4.3.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	69
4.3.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) จากเซลล์เพาะ	

เลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt _x 2 ด้วยเทคนิค Western blot.....	71
4.3.3 ผลการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (total protein) โปรตีนจากองค์ประกอบภายในเซลล์ (cytosolic protein) และโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt _x 2 ด้วยเทคนิค Western blot.....	73
4.3.4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt _x 2 ด้วยเทคนิค Western blot	75
4.3.5 การตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt _x 2 ด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) และ Western blot	79
4.3.6 การวิเคราะห์ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลูกน้ำยุง <i>Aedes albopictus</i> C6/36 ด้วยเทคนิค 2-Dimensional gel Electrophoresis (2-DE) และการตรวจหาโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt _x 2 ด้วยเทคนิค Western blot ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum.....	81
4.4 การวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMt _x 2 ด้วยเทคนิค Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	83
4.4.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน	

tMtx2 ด้วยเทคนิค Matrix- Assisted Laser Desorption/ Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) และการวิเคราะห์ผลเพื่อจัดจำแนกชนิด ของโปรตีน	83
4.4.2 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน tMtx2 ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-Mass Spectrometry (LC/MS-MS) และการ วิเคราะห์ผลเพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีน	87
5. สรุปผลการทดลอง.....	95
6. วิจัยรณัผลการทดลอง	97
รายการอ้างอิง.....	105
ภาคผนวก	
ประวัติการศึกษา	