รายงานฉบับสมบูรณ์ (ร่าง) (1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556)

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนในโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa2 จาก *Bacillus thuringiensis* ที่มีความสำคัญต่อการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์

Investigation of membrane binding sites of *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa2 toxin

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.อัญชณี คูเบอร่า

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

โปรตีน Cyt2Aa2 เป็นโปรตีนสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย Bacillus thuringiensis subsp. darmstadiensis โปรตีนชนิดนี้เป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera และเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง กลไกการทำงานของโปรตีนนี้คือจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เกิดรูรั่วโดยการเกิดโครงสร้างที่เป็น oligomerization และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาบทบาทที่สำคัญของกรดอะมิโนบางตำแหน่ง (I139, S159, L160, S161, A162, D209 and V215) ของโปรตีน Cyt2Aa2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกันของโปรตีนชนิดนี้กับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวเป็นกรดอะมิโน alanine ด้วยวิธี site-directed mutagenesis หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดกลายพันธุ์เข้าสู่ E.coli เพื่อให้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ พบว่า โปรตีนกลายพันธุ์เกือบทุกตัวมีการแสดงออกในรูปของ inclusion body ยกเว้นโปรตีน I139A มีการแสดงออกที่ต่ำมาก เมื่อนำโปรตีนกลายพันธุ์ที่แสดงออกได้มาละลายใน 50 mM carbonate buffer pH 10.5 พบว่า โปรตีน V215A ไม่ละลายในบัฟเฟอร์ดังกล่าว โปรตีน S159A, L160A, S161A, A162V, D209N สามารถละลายได้ในบัฟเฟอร์และถูกตัดด้วย proteinase K ได้เป็น activated toxin จากการทดลองการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายและการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่า S159A, L160A และ S161A ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้และออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายในระดับที่รุนแรงน้อยกว่า wild type ผลการทดลองการจับกันของโปรตีนกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่า S159A, L160A และ S161A สามารถเกิดโครงสร้างแบบ oligomerization และจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดแดงได้ ในขณะที่ A162V, D209N ไม่เกิดโครงสร้างดังกล่าว จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ loop ระหว่าง β-4 และ β-5 และ β-7 มีความสำคัญต่อการจับของโปรตีนกับเยื่อหุ้มเซลล์ และการเกิด oligomerization ของโปรตีนนี้ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งในบริเวณดังกล่าว มีผลทำให้การทำงานและโครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

Abstract

Cyt2Aa2 is a cytolytic toxin produced from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. It is specifically toxic against Dipteran larvae *in vivo*, and also active to several cell types such as erythrocytes**.** The active toxin is proposed to bind to cell membrane, leading to the

formation of membrane pore by toxin oligomerization and eventually cell lysis. This study aimed to characterize the role of expected lipid binding residues (I139, S159, L160, S161, A162, D209 and V215) of Cyt2Aa2. Alanine scanning mutants were constructed by site-directed mutagenesis and expressed in *E. coli*. These mutants were expressed as inclusion bodies which were solubilized in 50 mM carbonate buffer pH 10.5. All mutants, except I139A and V215A could retain as activated toxins after proteinase K cleavage. Three mutants, S159A, L160A and S161A showed high hemolytic activity but low toxicity against *A. aegypti*. Membrane interaction assays showed that these mutants bound and formed complexes on rat red blood cells. Substitution by valine at A162 and asparagine at D209 could interfere membrane binding and oligomerization of the toxin. These mutants could not completely break RBC even at high concentration and showed no hemolytic activity. The mutant A162V showed no toxicity against *A. aegypti*, but D209N showed low toxicity against *A. aegypti*. Our data suggested that amino acids on loop between β4, β5 and β7 of Cyt2Aa2 toxin were involved in membrane binding as well as complex formation. Substitution of amino acids in these regions altered the biological activity. Selectivity of the toxin to certain target cells might be improved by amino acid replacement in these regions.

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Bacillus thuringiensis (Bt หรือ บีที) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปแท่ง ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยแบคทีเรียนี้สามารถผลิตโปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลงได้หลายชนิด หนึ่งในโปรตีนที่เป็นพิษที่ *B. thurigiensis* ผลิตได้คือ กลุ่ม Cytolytic toxin (Cyt) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการสร้างขึ้นในขณะที่ *B. thurigiensis* มีการสร้าง endospore [1] โปรตีนนี้เมื่อถูกย่อยบางส่วนจะได้สารพิษเข้าทำลายเยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลาง ของแมลงทำให้เกิดรูรั่ว และตายในที่สุด [2, 3] บีทีจะทำลายแมลงเฉพาะระยะตัวอ่อนและจะออกฤทธิ์ได้ต่อเมื่อแมลงกินบีทีเข้าไป ในกระเพาะอาหารส่วนกลางแล้ว บีทีต่างสายพันธุ์จะมีฤทธิ์ทำลายแมลงต่างชนิดกันไป โปรตีน Cyt2Aa2 เป็น cytolytic toxin ที่สร้างจาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* จะออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับ Diptera (*Culex* sp, *Stegomyia* sp.) และออกฤทธิ์ในเซลล์หลายชนิดเช่น erythrocytes และ fibroblasts [4] เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนนี้ เหมือนกับ Cyt2Aa1 จาก *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* ดังนั้นโปรตีน Cyt2Aa2 จึงน่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ Cyt2Aa1 ซึ่งประกอบด้วย 6 α-helices และ 7 β-sheets [5, 6] ซึ่ง beta -sheets มีตำแหน่งอยู่ภายในห่อด้วย helices αA, αB, αC และ αD พบว่าความยาวของ helices นี้ไม่เพียงพอที่จะสร้างรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ความยาวของ beta-sheets มีความเหมาะสมมากกว่า [3] พบว่าส่วน alpha-helices จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ และหลังจากนั้นจะแทรกส่วน beta-sheets เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์โดย พบว่าโปรตีน Cyt นี้สามารถเกิดกระบวนการ oligomerization ได้ โครงสร้างที่เกิดขึ้นนี้อาจมีผลทำให้เกิดการผิดปกติของเซลล์ และส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด [7, 8] ซึ่ง Cyt toxin มีโครงสร้างคล้ายกับ volvatoxin A2 (VVA) toxin [9] และ Evf toxin จาก *Erwinia carotovora* [10] จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า C209 ของ Evf toxin เกี่ยวข้องกับ pamitate binding site โดยการ

เกิดพันธะ thioester linkage [10] การทำ mapping ระหว่าง Cyt toxin และ Evf toxin พบว่า lipid binding cavity ของ Cyt toxin อาจมีตำแหน่งบน αC (M110), αD (I139), loop ระหว่าง αD และ β-4 ที่ residues T142, T144, N145, L146 และ β-7 (V215) นอกจากนี้มีการเสนอว่า residues V150, N159, L160, D209 และ T221 ใน Cyt เกี่ยวข้องกับ lipid binding pocket [11] งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนบางตัวใน Cyt2Aa2 ที่มีความสำคัญกับการจับเยื่อหุ้มเซลล์ และกิจกรรมของโปรตีน Cyt ผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเพิ่มเติมของการจับที่เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรตีน Cyt ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจกลไกของโปรตีนชนิดนี้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโน (S159, L160, S161, A162, I139, D209 and V215) ใน โปรตีน Cyt2Aa2 ต่อการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ (Mutant construction)

สร้างโปรตีน Cyt toxin กลายพันธุ์ด้วยวิธี site-directed mutagenesis โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโน S159, L160, S161, I139 และ V215 ให้เป็น alanine ทั้งนี้ได้เปลี่ยน A162 ให้เป็น valine เพื่อดูผลกระทบของขนาดของ side chain ที่ใหญ่ขึ้น เปลี่ยน D209 ให้เป็น asparagine เพื่อทดสอบความสำคัญของประจุลบ ว่าหากไม่มีประจุลบในตำแหน่งนี้ โปรตีนจะมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ซึ่งการเปลี่ยนให้ได้กรดอะมิโนตามต้องการ ผู้วิจัยต้องออกแบบ primer ให้สอดคล้องกับกรดอะมิโนที่ต้องการ หลังจากนั้นทำ PCR เพื่อสร้างพลาสมิด mutant และนำพลาสมิดที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* และตรวจสอบ DNA sequence ของ mutant ที่ได้

2. การเตรียมโปรตีน Cyt toxin และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ระหว่างโปรตีน Cyt toxin ชนิด wild type และ mutant

โปรตีน Cyt toxin ชนิด wild type และ mutant จะทำให้มีการแสดงออกใน *E.coli* โดยมี IPTG เป็นตัวชักนำ โปรตีนสารพิษที่ผลิตได้จะทดสอบการละลายใน 50mM carbonate buffer pH 9.8 และจะย่อยบางส่วนของโปรตีนด้วย proteinase K เพื่อทำให้ protoxin เป็น activated toxin ตรวจสอบการละลายในบัฟเฟอร์และการถูกย่อยให้เป็น activated toxin โดยใช้ 12% SDS-PAGE

3. การทดสอบความเป็นพิษของ Cyt toxin

3.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย

นำ Cyt toxin ชนิด wild type และ mutant ที่ความเข้มข้น 0.49 ug/ml – 250 ug/ml มาให้ลูกน้ำยุงลายอายุ 2 วันกิน โดยแต่ละความเข้มข้นจะให้ลูกน้ำ 10 ตัว/หลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับตัวตาย และนำผลที่ได้มาหาค่า IC_{50} ทำ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

นำ activated Cyt toxin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.12 ug/ml – 250 ug/ml ผสมกับ 2% เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผล end point ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ Cyt

toxin น้อยที่สุดที่ยังทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และบันทึกผลของ hemoglobin release โดยนำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

4. การทดสอบการจับกันของ Cyt toxin กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู

นำ activated Cyt toxin ที่ความเข้มข้ม 5ug/ml มาผสมกับ 2% เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่มี activated Cyt toxin เกาะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ วิเคราะห์ผลของตัวอย่างที่ได้ด้วย 12% SDS-PAGE และตรวจสอบ Cyt toxin ที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์บนเจลโดยใช้วิธี western blotting

ผลการทดลอง

1. การสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ (Mutant construction)

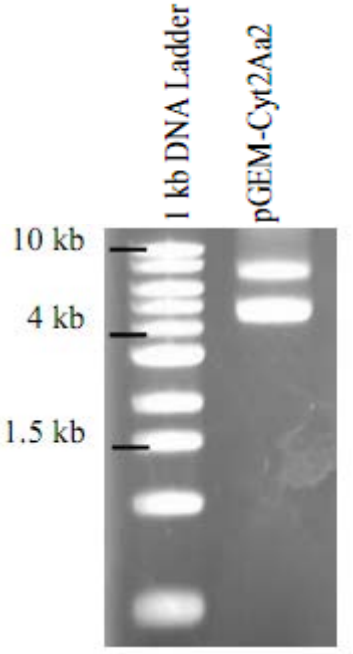
ทำการสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ด้วยวิธี site-directed mutagenesis โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโน I139, S159, L160, S161, และ V215 ให้เป็น alanine เปลี่ยน A162 ให้เป็น valine และเปลี่ยน D209 ให้เป็น asparagine โดยออกแบบ primer ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนต่างๆ ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Mutagenic primers for site-directed mutagenesis

Primer	Sequence (5’⟶ 3’)
I139AF	5' GAAGCTACAGCTAAAGGCACATTTAC 3'
I139AR	5' GTAAATGTGCCTTTAGCTGTAGCTTC 3'
S159AF	5' GGATTTTTTGGCATGCTTTATCCGCCC 3'
S159AR	5' GGGCGGATAAAGCATGCCAAAAAATCC 3'
L160AF	5' GGCATAGTGCATCCGCCCACAATACAA 3'
L160AR	5' TTGTATTGTGGGCGGATGCACTATGCC 3'
S161AF	5' GGCATAGTTTAGCCGCCCACAATACAAG 3'
S161AR	5' GTTGTATTGTGGGCGGCTAAACTATGCC 3'
A162VF	5' GGCATAGTTTATCCGTACACAATACAAG 3'
A162VR	5' CTTGTATTGTGTACGGATAAACTATGCC 3'

D209NF	5' CAATAAAAAATAGTGCACGATATGAAG 3'
D209NR	5' CTTCATATCGTGCACTATTTTTTATTG 3'
V215AF	5' GTGCACGATATGAAGCTAAAATGAAAGC 3'
V215AR	5' GCTTTCATTTTAGCTTCATATCGTGCAC 3'

ทำการสกัดพลาสมิดที่มียีน *cyt2Aa2* (pGEM-Cyt2Aa2) เพื่อนำมาใช้เป็น template สำหรับการทำ site-directed mutagenesis โดยพลาสมิดที่มียีน *cyt2Aa2* (pGEM-Cyt2Aa2) มีขนาดประมาณ 3.8 kb ดังรูปที่ 1



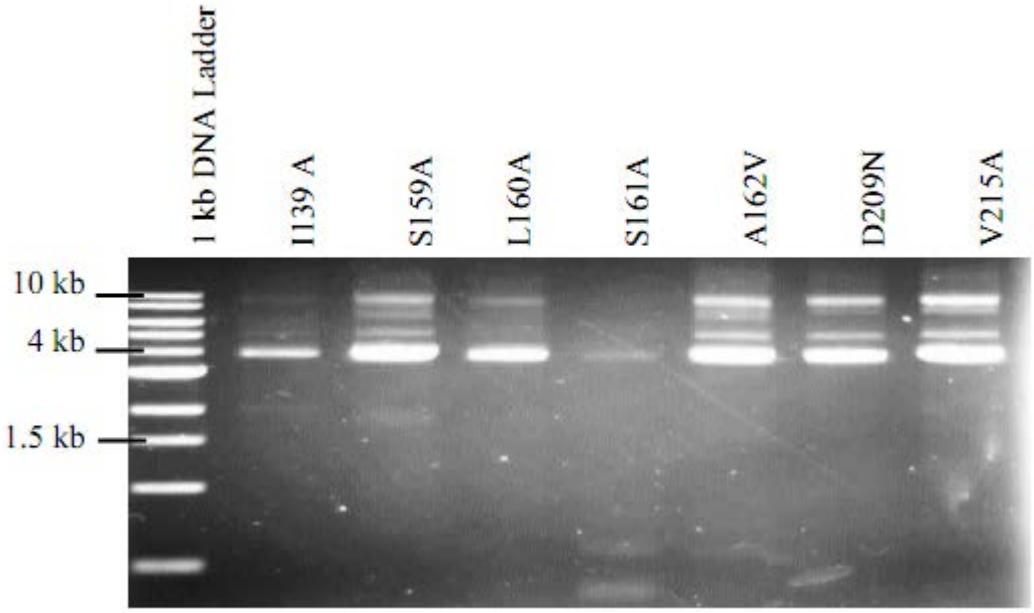
รูปที่ 1 พลาสมิดที่มียีน *cyt2Aa2* (pGEM-Cyt2Aa2) มีขนาดประมาณ 3.8 kb

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาใช้เป็น template ในการทำ site-directed mutagenesis โดยใช้ primer ตามตารางที่ 1 โดยมีขั้นตอนการทำ PCR ดังนี้

Denature	95°C	1 นาที
Denature	95°C	30 วินาที

Annealing 55°C	30 วินาที	25 รอบ
Extension 72°C	3 นาที	
Final extension 72°C	5 นาที	

นำผล PCR ที่ได้มาตรวจสอบใน 0.8% agarose gel ได้ผลดังรูปที่ 2



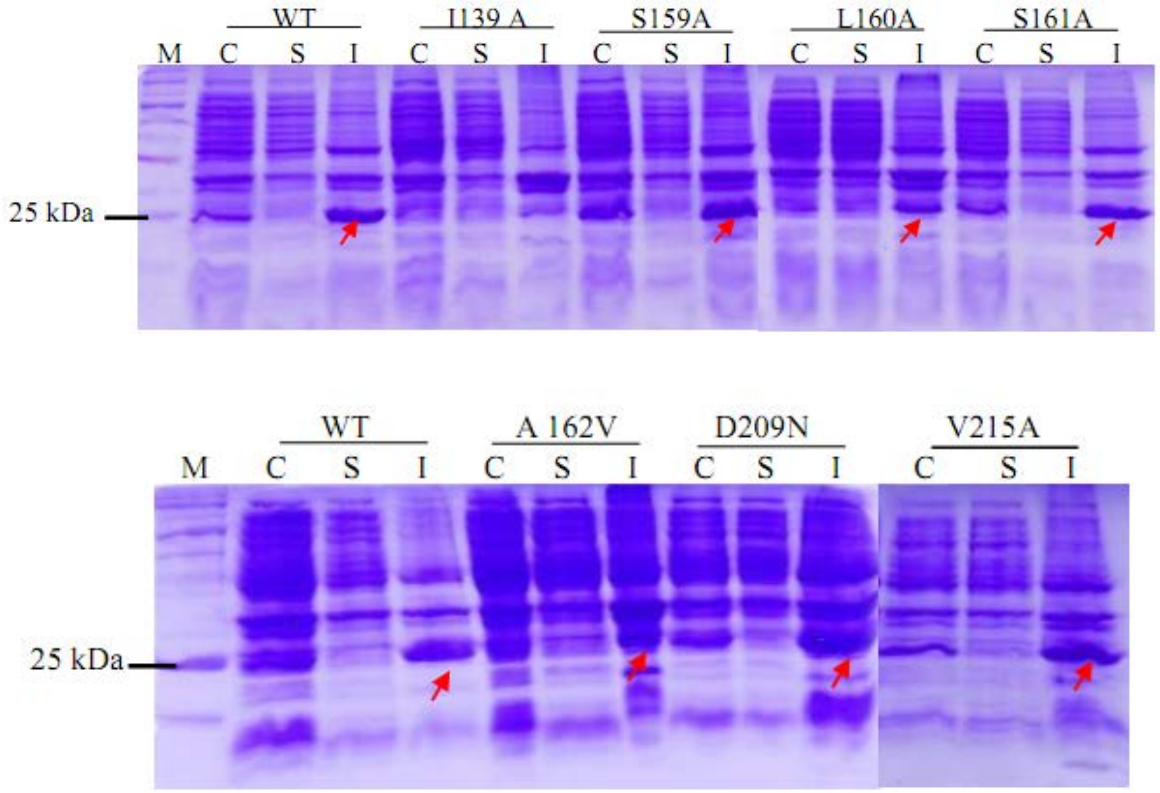
รูปที่ 2 PCR product ของพลาสมิดกลายพันธุ์ (I139A, S159A, L160A, S161A, A162V, D209N, V215A) ที่ทำด้วยวิธี site-directed mutagenesis

นำพลาสมิดกลายพันธุ์ที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* และนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cyt2Aa2* เพื่อยืนยันความถูกต้องว่าได้พลาสมิดกลายพันธุ์ จากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกพลาสมิดกลายพันธุ์ พบว่าสามารถสร้างพลาสมิดกลายพันธุ์ทุกตัวได้ถูกต้อง

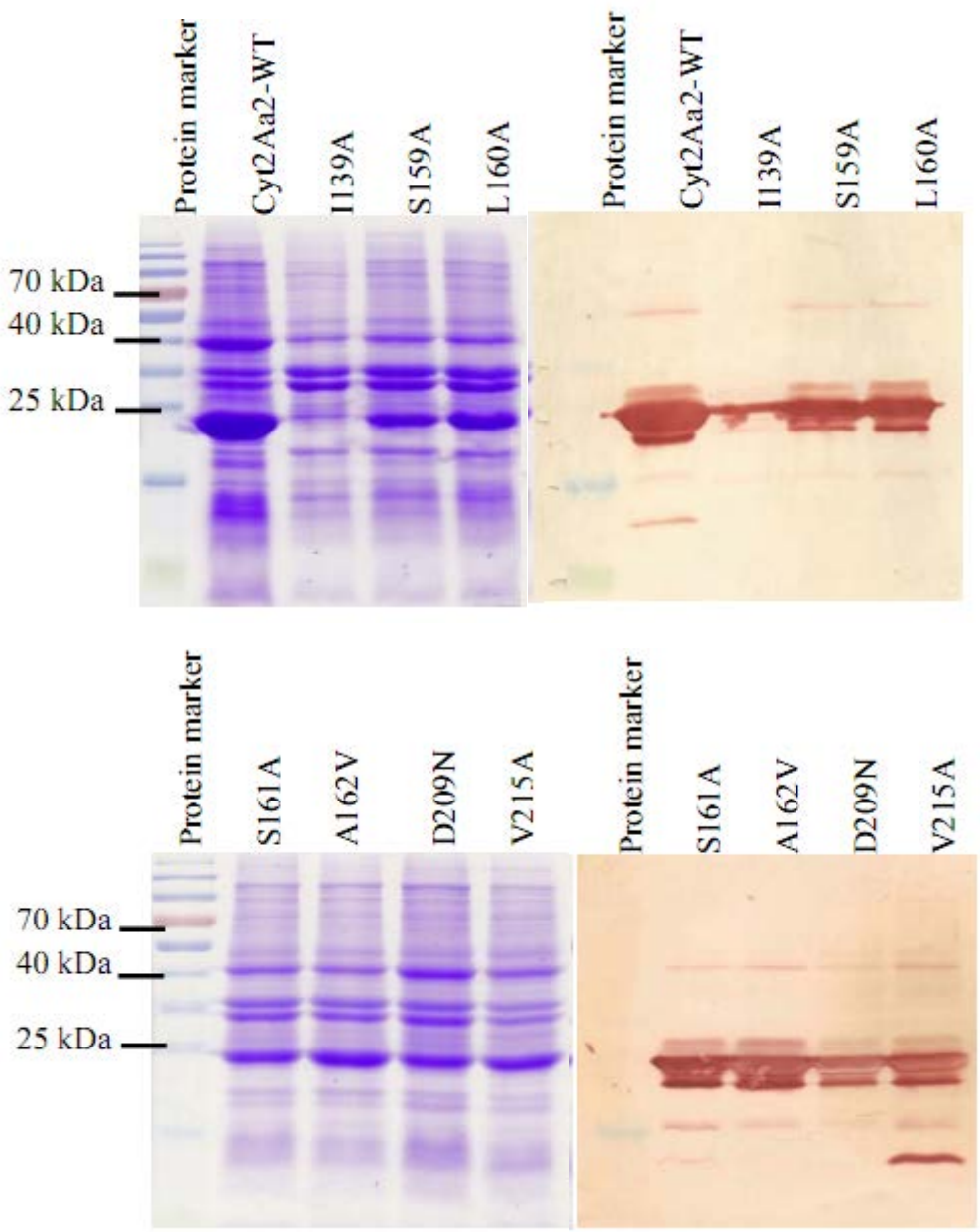
2. การเตรียมโปรตีน Cyt toxin และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ระหว่างโปรตีน Cyt toxin ชนิด wild type และ mutant

โปรตีน Cyt toxin ชนิด wild type และ mutant จะทำให้มีการแสดงออกใน *E.coli* โดยมี IPTG เป็นตัวชักนำ จากผลการทดลอง พบว่า เกือบทุก mutant สามารถถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนได้ ยกเว้น I139A มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต่ำมาก ดังรูปที่ 3 โปรตีน Cyt2Aa2 มีขนาดประมาณ 29 kDa โดยจะมีการแสดงออกใน *E.coli* ในรูปของ inclusion body (I) หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการยืนยันว่ามีการแสดงออกของโปรตีน Cyt2Aa2 ทั้ง wild type และ mutant ด้วยวิธี Western blotting ดังแสดงในรูปที่ 4 โปรตีนสารพิษที่ผลิตได้จะทดสอบการละลายใน 50mM carbonate buffer pH 9.8 และจะย่อยบางส่วนของโปรตีนด้วย proteinase K เพื่อทำให้ protoxin เป็น activated toxin ตรวจสอบการละลายในบัฟเฟอร์ และการถูก

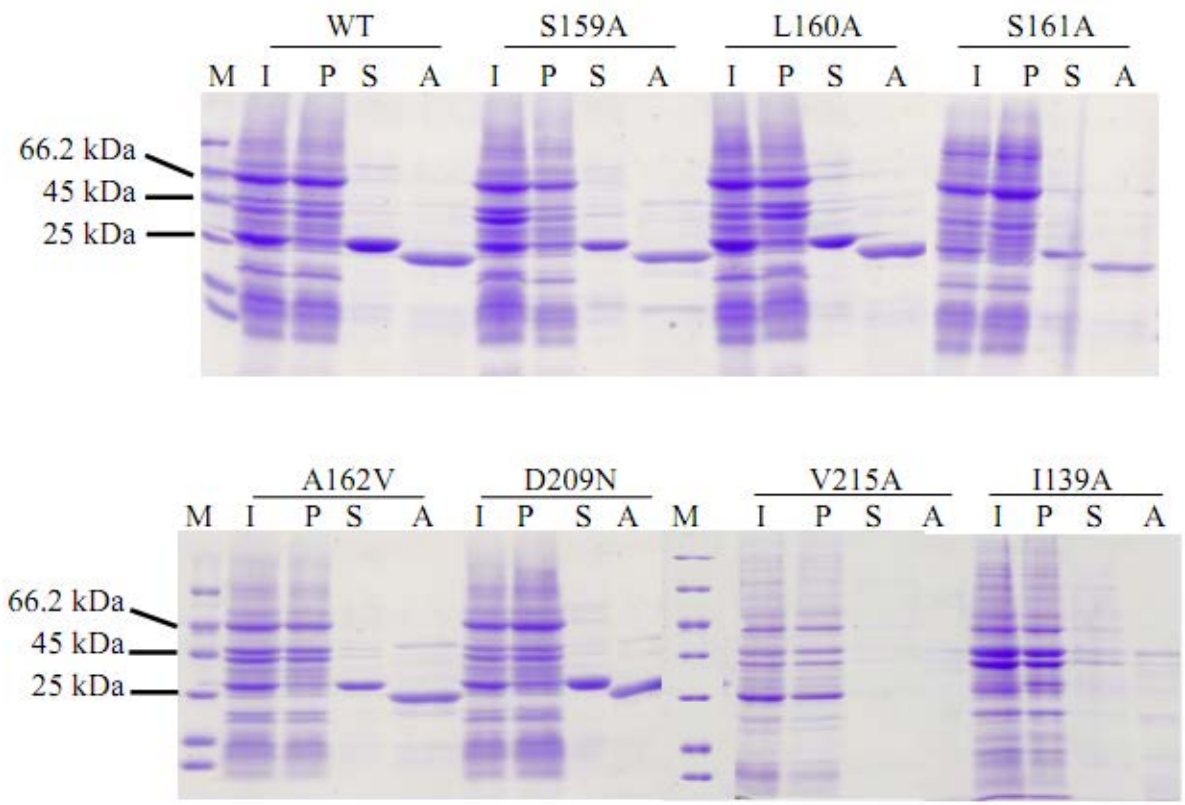
ย่อยให้เป็น activated toxin โดยใช้ 12% SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่า เกือบทุก mutant ที่มีการแสดงออกของโปรตีน สามารถละลายได้ใน 50mM carbonate buffer และถูกย่อยด้วย proteinase K ได้ activated toxin ที่มีขนาดประมาณ 25 kDa ยกเว้น mutant V215A ไม่ละลายใน 50mM carbonate buffer



รูปที่ 3 การแสดงออกของโปรตีน Cyt2Aa2 ที่เป็น wild type และ mutant; M = Protein marker, C = cell lysate, S = soluble fraction, I = pellet fraction (inclusion body) โดยลูกศรสีแดง แสดงถึงโปรตีน Cyt2Aa2 ที่แสดงออก



รูปที่ 4 ผลการยืนยันว่าโปรตีนที่แสดงออกเป็น Cyt2Aa2 wild type และ mutant ด้วยวิธี Western blotting โดยใช้ Anti-Cyt antibody เป็น Primary antibody



รูปที่ 5 การทดสอบการละลายของโปรตีน Cyt2Aa2 wild type และ mutant; M = Protein marker, I = inclusion body, P = pellet fraction หลังจากละลายใน 50mM carbonate buffer, S = soluble fraction หลังจากละลายใน 50mM carbonate buffer, A = activated toxin

3. การทดสอบความเป็นพิษของ Cyt toxin

3.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย

นำ Cyt toxin ชนิด wild type และ mutant ที่ความเข้มข้น 0.49 ug/ml – 250 ug/ml มาให้ลูกน้ำยุงลายอายุ 2 วันกิน โดยแต่ละความเข้มข้นจะให้ลูกน้ำ 10 ตัว/หลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับตัวตาย และนำผลที่ได้มาหาค่า IC_{50} ทำ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ พบว่า wild type สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} 0.6 µg/ml ส่วน mutant S159A, L160A, S161A และ D209N มีฤทธิ์น้อยกว่า wild type ส่วน mutant I139A, A162V, V215A ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนสูงถึง 250 µg/ml ผลตามตารางที่ 2

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

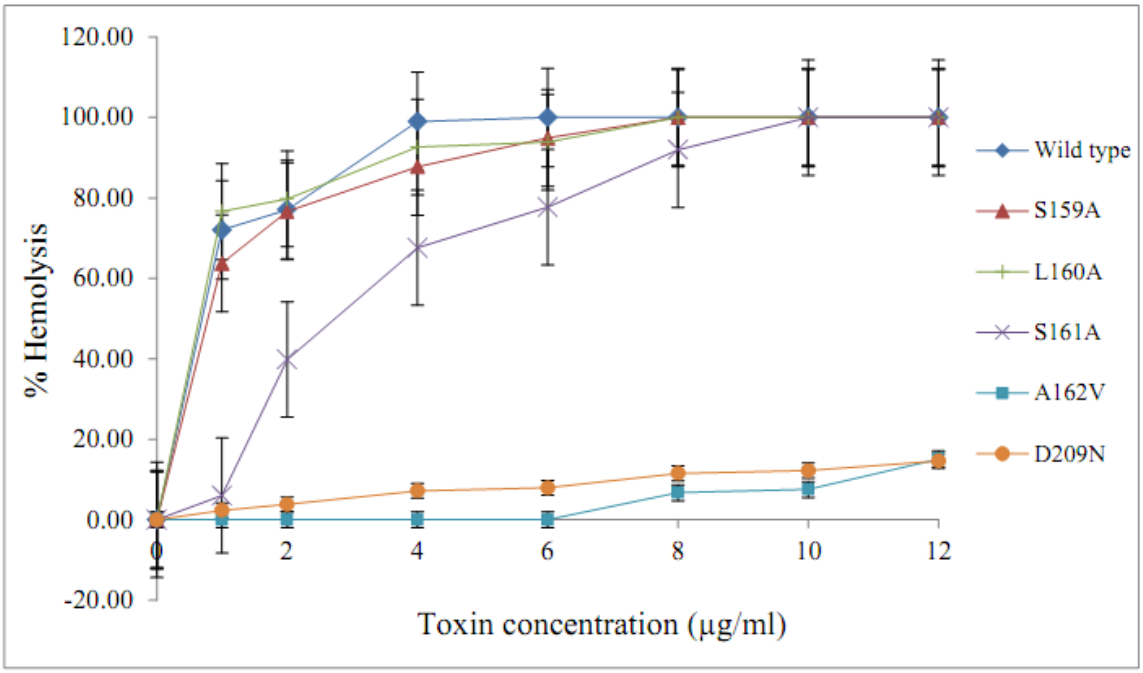
นำ activated Cyt toxin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.12 ug/ml – 250 ug/ml ผสมกับ 2% เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผล end point ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ Cyt toxin น้อยที่สุดที่ยังทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากผลการทดลอง พบว่า Cyt2Aa2 wild type สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ดีที่สุด รองลงมาคือ mutant S159A, L160A, S161A ส่วน mutant I139A,

A162V, D209N, V215A ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ผลตามตารางที่ 2 และบันทึกผลของ hemoglobin release โดยนำสารละลายส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm พบว่า S159A, L160A ให้ผล %hemolysis ใกล้เคียงกับ wild type ส่วน mutant S161A สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้ แต่ใช้เวลาที่นานกว่า wild type ส่วน mutant A162V และ D209N ให้ผล %hemolysis ไม่เกิน 10% เมื่อเทียบกับ wild type ดังแสดงในรูปที่ 6

ตารางที่ 2 คุณสมบัติการแสดงออกของโปรตีน การละลาย การถูกย่อยด้วย proteinase K Hemolytic end point และค่า LC_{50} Larvacidal activity

Toxin	Protein Expression	Solubility	Activation	Hemolytic end-point (µg/ml)	Larvicidal activity LC_{50} (µg/ml)
WT	Yes	+++	Yes	0.05-0.1	0.6 (0.5-0.7)
I139A	Low	_	nd	nd	Non toxic
S159A	Yes	+++	Yes	0.1-0.2	1.3(1.0-1.6)
L160A	Yes	+++	Yes	0.1-0.2	1.3 (1.0-1.6)
S161A	Yes	+++	Yes	0.2-0.4	1.7 (1.2-2.2)
A162V	Yes	+++	Yes	No lysis	Non toxic
D209N	Yes	+++	Yes	No lysis	1.3 (0.9-1.7)
V215A	Yes	_	nd	nd	Non toxic

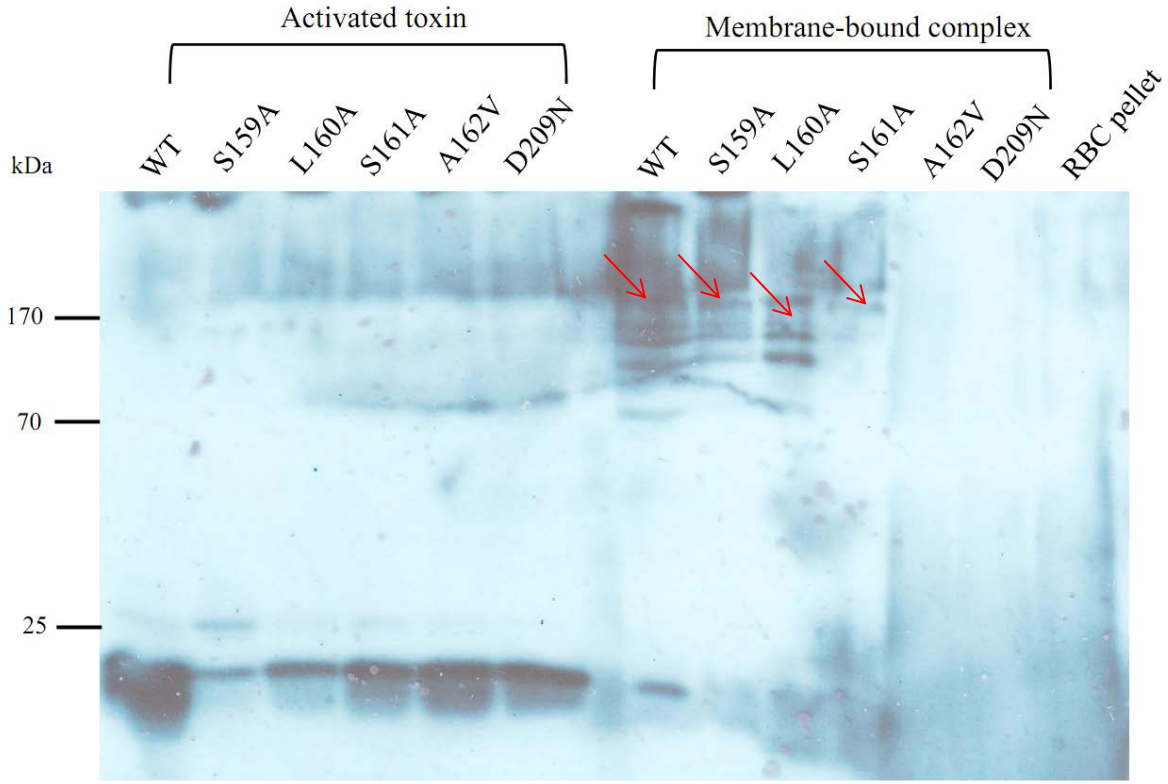
*nd, not determined because there was no activated toxin for the assay.



รูปที่ 6 คุณสมบัติของโปรตีน Cyt2Aa2 wild type และ mutant ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้

4. การทดสอบการจับกันของ Cyt toxin กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู

นำ activated Cyt toxin ที่ความเข้มข้ม 5ug/ml มาผสมกับ 2% เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่มี activated Cyt toxin เกาะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ วิเคราะห์ผลของตัวอย่างที่ได้ด้วย 12% SDS-PAGE และตรวจสอบ Cyt toxin ที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์บนเจลโดยใช้วิธี western blotting พบว่า โปรตีน Cyt2Aa2 wild type และ mutant S159A, L160A และ S161A สามารถประกอบโครงสร้างเป็น oligomer ที่มีหลายขนาด และจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ (ตามลูกศรชี้) ส่วน mutant A162V และ D209N ไม่สามารถจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การทดสอบการจับกันของโปรตีน Cyt2Aa2 wild type และ mutant กับเซลล์เม็ดเลือดแดง ตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาบทบาทของกรดอะมิโน S159, L160, S161, A162 ที่อยู่ที่ loop ระหว่าง β-4 และ β-5 กรดอะมิโน I139 ที่เส้น α-D กรดอะมิโน D209 และ V215 ที่ β-7 ว่ามีความสำคัญต่อการจับกันของโปรตีน Cyt2Aa2 กับเยื่อหุ้มเซลล์หรือไม่ จากการทดลองโดยการสร้าง mutant พบว่า mutant I139A ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน นั่นแสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนตำแหน่งนี้ อาจจะมีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนและการเกิดโครงสร้างของโปรตีนที่ถูกต้องใน *E.coli* ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่มีโปรตีน mutant I139A เพื่อการทดลองต่อไป สำหรับ mutant ตัวอื่น พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนในรูปของ inclusion body ซึ่งเป็นโปรตีนที่ตกตะกอนในเซลล์ ในขั้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบการละลายของโปรตีนใน 50mM carbonate buffer พบว่า mutant V215A ไม่ละลายในบัฟเฟอร์ดังกล่าว นั่นหมายถึงว่าโครงสร้างของโปรตีน V215A ไม่สามารถเกิด interaction กับบัฟเฟอร์ได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากโครงสร้างของโปรตีนเกิดการม้วนพับที่ไม่เหมาะสม แต่สำหรับ mutant ที่เหลือ คือ S159A, L160A, S161A, A162V และ D209N สามารถละลายได้ใน 50mM carbonate buffer และถูกตัดด้วย proteinase K ได้เป็น activated toxin ได้ เมื่อนำ mutant เหล่านี้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย และความสามารถที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่า A162V ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลาย และไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เมื่อตรวจสอบการ binding ของ A162V พบผลที่สอดคล้องกันว่า mutant ตัวนี้ไม่สามารถ form ตัวเป็น oligomer และไม่จับกับเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วน

D209N สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ เมื่อทดสอบการ binding ของ mutant ตัวนี้ พบว่า ไม่เกิดการ form oligomer และไม่จับกับเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่ mutant ตัวอื่น คือ S159A, L160A, S161A สามารถฆ่าลูกน้ำยุงลายและทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ แต่มีฤทธิ์ที่รุนแรงน้อยกว่า wild type เมื่อทดสอบการ binding ของ mutant เหล่านี้ ให้ผลว่า mutant สามารถ form oligomer และจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ loop ระหว่าง β-4 และ β-5 และ β-7 มีความสำคัญต่อการจับของโปรตีนกับเยื่อหุ้มเซลล์ และการเกิด oligomerization ของโปรตีนนี้ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งในบริเวณดังกล่าว มีผลทำให้การทำงานและโครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Schnepf E, Crickmore N, Rie JV, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, and Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

2. Knowles BH, and Ellar DJ. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin with different specificity. Biochem. Biophys. Acta 924:509-518.

3. Li J, Koni PA, and Ellar DJ. 1996. Structure of the Mosquitocidal d-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. J. Mol. Biol. 257:129-152.

4. Promdonkoy B, Chewawiwat N, Tanapongpipat S, Luxananil P, and Panyim S. 2003. Cloning and characterization of a cytolytic and mosquito larvicidal δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. Current Microbiology. 46:94-98.

5. P.A. Koni, D.J. Ellar. 1993. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. J. Mol. Biol. 229:319–327.

6. Promdonkoy B, Pathaichindachote W, Krittanai C, Audtho M, Chewawiwat N and Panyim S. 2004. Trp132, Trp154, and Trp157 are essential for folding and activity of a Cyt toxin from *Bacillus thuringiensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 317:744–748.

7. Promdonkoy B, Ellar DJ. 2005. Structure-function relationships of a membrane pore forming toxin by reversion mutagenesis. Molecular Membrane Biology. 22(4):327-337.

8. Promdonkoy B, Ellar DJ. 2000. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. Biochem J. 350 Pt 1:275-82.

9. Lin SC, Lo YC, Lin JY, Liaw YC. 2004. Crystal structure and electron micrographs of fungal volvatoxin A2. J. Mol. Biol. 343(2):477-91.

10. Quevillon-Cheruel S, Leulliot N, Muniz CA, Vincent M, Gallay J, Argentini M, Cornu D, Boccard F, Lemaître B, van Tilbeurgh H. 2009. Evf, a virulence factor produced by the Drosophila pathogen *Erwinia carotovora*, is an S-palmitoylated protein with a new fold that binds to lipid vesicles. J. Biol. Chem. 284(6):3552-3562.

11. Rigden DJ. 2009. Does distant homology with Evf reveal a lipid binding site in *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins? FEBS Lett. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.038.

12. Palma L, Munoz D, Berry C, Murillo J, Cacallero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. Toxin *6*(12), 3296-3325.

13. Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2415–2422.