230914

บทคัดย่อ: ในช่วงที่โปรตีนสารพิษของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ชนิด Cry4Ba ถูก activated ให้พร้อมทำงาน และขณะที่มีการจับกับโปรตีนจำเพาะบนผนังเซลล์ของกระเพาะลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) นั้นนับเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดของกลไกการเข้าทำลาย การ activated ในหลอดทดลอง Cry4Ba ในสภาพ inactive ขนาด 130 kDa จะถูกตัดจนได้เป็นโปรตีนสองชิ้นที่ติดอยู่ด้วยกันขนาด 20 kDa (ส่วนที่เป็นกลุ่มก้อนของเกลียวอัลฟาใน domain I) และ 47 kDa (ส่วนที่เป็นแผ่นบีต้าใน domain II และ domain III) อย่างไรก็ดี การ activate ที่เกิดขึ้นในกระเพาะอาหารของลูกน้ำเรายังไม่ทราบในรายละเอียดอย่างแน่ชัด ในรายงานนี้ ได้ทำการผลิต antibody ในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย activated toxin หรือชิ้นแยกส่วนแต่ละชิ้น และสามารถแยกและตรวจสอบความจำเพาะของ antibody ที่แยกได้โดยวิธี affinity chromatography เพื่อใช้ในการติดตาม activation ที่เกิดขึ้นในกระเพาะลูกน้ำ ด้วยวิธี immunohistochem ical staining ผลการติดตามทำให้ทราบว่า activated toxin มีการกระจายอยู่ทั่วไปในระบบทางเดินอาหาร ตั้งแต่ peritrophic matrix (PM), gastric caeca (GC) และ ผนังกระเพาะอาหารตอนกลางของลูกน้ำยุงได้ ในขณะที่ mutant toxin (R158A) ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ระบบดังกล่าวได้ทั้งที่มีคุณลักษณะทางกายภาพและชีวภาพคล้ายคลึงกับ wild-type toxin จากการใช้ antibody จำเพาะที่แยกได้จาก serum ของหนู ทำให้เราทราบว่าความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงที่เกิดขึ้นหรือสูญเสียไป อาจเกี่ยวข้องกับ toxin-PM interactions เพื่อที่จะผ่านเข้าจับกับโปรตีนจำเพาะที่ผนังเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุง และได้เสนอสมมติฐานจากหลักฐานที่พบไว้ว่า PM อาจเป็นเป้าหมายแรกที่ Cry4Ba toxin เข้ากระทำเพื่อใช้ทำลายลูกน้ำยุง

230914

Abstract: Toxin activation and receptor biding are crucial steps for mosquito larvicidity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba protein. *In vitro* proteolytic processing of the 130-kDa protoxin by trypsin always yields the 65-kDa active toxin comprising the 20-kDa and the 47-kDa fragments. These fragments are mapped to an α-helical bundle of domain I and a β-sheet in domain II linked to domain III in the Cry4Ba crystal structure, respectively. However, its *in vivo* activation is still doubtful. Herein, polyclonal antibodies were produced in mice by immunizing with the 65-kDa toxin or its individual domain. Monospecific antibodies (MSAbs) were selected by toxin-affinity chromatography and their specificities were verified by Western blot analysis. *Aedes aegypti* larvae were fed with the wild-type Cry4Ba protoxin or its inactive mutant (R158A) followed by *in situ* toxin-binding analysis *via* immunohistochemical staining. Larvae treated with the wild-type Cry4Ba showed toxin distribution throughout the gut compartments comprising the peritrophic matrix (PM), gastric caeca and midgut epithelial membrane. Dissimilarly, the mutant toxin (R158A) treated larvae showed toxin accumulation restricted to the endo-peritrophic matrix, implicating a role of the arginine 158 in helix 4 of domain I in selectivity for toxin passage through the PM. Utilizing MSAbs as a tool, we report that toxin-PM interactions are required for toxin passage through the PM, a gut protective barrier. Since the inability of the R158A mutant to cross the PM is consistent with its loss of toxicity, we propose that the PM may serve as a primary target for the Cry4Ba action against the mosq uito larvae.