

การศึกษาเชิงโมเลกุลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนสารพิษ Cry4Ba และ Cyt2Aa2 จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (MOLECULAR STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN Cry4Ba AND Cyt2Aa2 TOXINS FROM *Bacillus thuringiensis*)

อุทัยพร ไก่แก้ว 5138364 MTMT/D

ปร.ค. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชนันท อังศุชนสมบัติ, Ph.D., จำรัส พร้อมมาศ, Ph.D., สภพ ลีตะชีวะ, Ph.D., เฉลิมพล กาญจนวรินทร์, Ph.D.

บทคัดย่อ

ความสำคัญเชิงหน้าที่ของ β_2 - β_3 และ β_4 - β_5 hairpin-loops ในโดเมนจับตัวรับของโปรตีนฆ่าลูกน้ำ ยุงลาย Cry4Ba จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* ถูกบ่งชี้อย่างชัดเจน loop ที่สำคัญยิ่งสอง loop ที่ปรากฏบนผิวของโปรตีน สารพิษ Cry4Ba นี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ที่เสริมกันกับโปรตีน สารพิษ Cyt2Aa2 จาก *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* ในการศึกษา Thr³²⁸ และ Thr³⁶⁹ ซึ่งอยู่บนสาย β_2 และ β_5 ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำ ยุงลาย Cry4Ba ตามลำดับ ได้ถูกศึกษาถึงบทบาทที่สำคัญต่อการสร้างพันธะไฮโดรเจนที่สำคัญต่อเสถียรภาพของ β_2 - β_3 และ β_4 - β_5 hairpin การแทนที่ด้วยกรดอะมิโน alanine ถูกนำมาใช้เพื่อสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ T328A-RQ และ T369A-RQ โดยใช้โปรตีน Cry4Ba-RQ เป็นต้นแบบ เมื่อทดสอบความเป็นพิษพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองตัวไม่แสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำ ยุงลาย *Aedes aegypti* นอกจากนี้การทดสอบการจับกันด้วย ELISA แสดงให้เห็นว่า โปรตีนกลายพันธุ์ T328A-RQ และ T369A-RQ ไม่สามารถจับกับโปรตีน Cyt2Aa2 ได้ ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าทั้ง Thr³²⁸ และ Thr³⁶⁹ เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน สารพิษ Cry4Ba และ Cyt2Aa2 นอกจากนี้ การวิเคราะห์โครงสร้างได้แสดงให้เห็น พันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโซ่ข้างของ Thr³²⁸ และ Thr³⁶⁹ ซึ่งมีความสำคัญยิ่งต่อเสถียรภาพของ β_2 - β_3 และ β_4 - β_5 hairpin ของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba ในทางตรงกันข้าม โปรตีนกลายพันธุ์ E417A/Y455A-RQ ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ β_6 - β_7 และ β_8 - β_9 loop แสดงการลดลงของการเกิดพิษเพียงบางส่วนต่อลูกน้ำ ยุงลาย *A. aegypti* นอกจากนี้โปรตีนกลายพันธุ์ E417A/Y455A-RQ ยังคงรักษาสัมพรรคภาพของการจับกับโปรตีน Cyt2Aa2 และการศึกษาการกีดกันความเป็นพิษเมื่อรวมกันกับโปรตีน Cyt2Aa2 ในปริมาณที่ไม่ก่อพิษเผยให้เห็นว่าโปรตีนกลายพันธุ์ E417A/Y455A-RQ แสดงระดับการเกิดพิษที่สูงขึ้นอย่างยิ่งยวดต่อลูกน้ำ ยุงลาย *A. aegypti* ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า loop β_6 - β_7 และ β_8 - β_9 มีความเกี่ยวข้องกับการจับกับโปรตีนตัวรับของ *Aedes* แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Cyt2Aa2 นอกจากนี้แล้ว โปรตีน Cyt2Aa2 ยังเป็นตัวรับทางเลือกอีกตัวหนึ่งสำหรับโปรตีนฆ่าลูกน้ำ ยุงลาย Cry4Ba และ โปรตีนทั้งสองสามารถแสดงปรากฏการณ์การเสริมกันในการเกิดพิษต่อลูกน้ำ ยุงลาย *A. aegypti*