รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพิสูจน์เอกลักษณ์และการหาบริเวณที่จับ (epitope) ของตัวจับจำเพาะของโปรตีนสารพิษ *Bacillus thuringiensis* ชนิด Cry4Ba จาก peritrophic membrane ของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti*

โดย ดร. สมภพ ลีตะชีวะ
สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

14 พฤษภาคม 2562

สัญญาเลขที่ RSA5880026

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพิสูจน์เอกลักษณ์และการหาบริเวณที่จับ (epitope) ของตัวจับจำเพาะของโปรตีนสารพิษ *Bacillus thuringiensis* ชนิด Cry4Ba จาก peritrophic membrane ของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti*

ดร. สมภพ ลีตะชีวะ
สังกัดสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และมหาวิทยาลัยมหิดลไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ในโครงการวิจัยเรื่อง การพิสูจน์เอกลักษณ์และการหาบริเวณที่จับ (epitope) ของตัวจับจำเพาะของโปรตีนสารพิษ *Bacillus thuringiensis* ชนิด Cry4Ba จาก peritrophic membrane ของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยหลัก ผศ.ดร.แสงเดือน มูลสม ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้คำปรึกษาและความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ นักวิจัยและนักศึกษาในห้องปฏิบัติการของภาควิชาพยาธิโปรโตซัว คณะเวชศาสตร์เขตร้อน และสถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล ที่เป็นกำลังสำคัญในการดำเนินการวิจัย และเจ้าหน้าที่ฝ่ายสนับสนุนของสถาบันฯ ที่ได้ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการดำเนินการวิจัยมาโดยตลอด

ผู้วิจัยโครงการ

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code: RSA5880026
(รหัสโครงการ)

Project Title: Identification and epitope mapping of a specific binding protein of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin from the *Aedes aegypti* larval peritrophic membrane
(ชื่อโครงการ) การพิสูจน์เอกลักษณ์และการหาบริเวณที่จับ (epitope) ของตัวจับจำเพาะของโปรตีนสารพิษ *Bacillus thuringiensis* ชนิด Cry4Ba จาก peritrophic membrane ของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti*

Investigator: Dr.Somphob Leetachewa, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University
(ชื่อนักวิจัย) ดร.สมภพ ลีตะชีวะ สถาบันวิจัยชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: somphob.lee@mahidol.ac.th

Project Period: 3 ปี (กรกฎาคม 2558 ถึง มิถุนายน 2561)
(ระยะเวลาโครงการ)

Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins has been contributed by loss of receptor binding and lytic pore formation at insect gut epithelium. Here, we found that calcofluor, which binds to the *Aedes aegypti* mosquito larvae peritrophic membrane (PM), expressed an extremely enhancing effect when co-fed with Cry4Ba toxin and appeared to have a reversible binding manner on the larval PM. Calcofluor also showed an utmost enhancing effect on the inactive Cry4Ba mutant E417A/Y455A implying the involvement of these amino acids for the PM binding. The destruction of PM by calcofluor and the toxin was also clearly observed. Interestingly, the enhancing effect of calcofluor on Cry4Ba toxin susceptibility was found for the non-susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae; however, calcofluor alone or in combination with the toxin showed no mortality effect on fresh-water fleas; *Moina macrocopa*. Shotgun liquid chromatography tandem mass spectrometry approach was applied to investigate its protein composition of PM, showing chitinase could be a significant protein for PM permeability alteration. Quantitative analysis of chitinase mRNA showed expression level of chitinase is in the same manner of mass analysis. Protein overlaying assay of Cry4Ba binding protein from PM demonstrated no specific binding protein of Cry4Ba on the PM protein. In summary, our current results strongly suggested the PM as a possible factor that contributing to the insect resistance of Cry4Ba toxin. The PM-

permeability alternating calcofluor might be a promising candidate for enhancing insect susceptibility, which will consequently improve Cry4Ba efficacy in field settings in the future.

ความต้านทานของแมลงต่อโปรตีนสารพิษ *Bacillus thuringiensis* Cry เนื่องมาจากการที่ Cry สูญเสียความสามารถในการจับกับตัวจับจำเพาะและไม่สามารถก่อให้เกิดรูรั่วขึ้นที่เซลล์กระเพาะอาหาร ในการศึกษาวิจัยโครงการนี้พบว่า calcofluor ซึ่งจับได้กับ PM ของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* สามารถเพิ่มความเป็นพิษให้กับโปรตีนสารพิษ Cry4Ba และดูเหมือนว่าจะมีคุณลักษณะของ reversible binding ได้กับ PM สาร calcofluor ช่วยสนับสนุนโดยเพิ่มความเป็นพิษให้กับ Cry4Ba กลายพันธุ์ชนิด Cry4Ba-E417A/Y455A (EY) ที่เดิมมีพิษต่ำต่อลูกน้ำยุง การทำให้ PM เสียสภาพด้วย calcofluor กับลูกน้ำยุงรำคาญซึ่งตอบสนองต่ำต่อโปรตีน Cry4Ba มีอัตราการตายที่สูงขึ้น รวมทั้งไม่ทำให้เกิดพิษต่อสัตว์น้ำเล็กอย่างเช่น ไรน้ำ *Moina macrocopa* ซึ่งไม่ใช่สัตว์ที่เป็นเป้าหมายของ Cry4Ba การวิเคราะห์ mass ของโปรตีนจาก PM พบโปรตีน chitinase ซึ่งอาจเป็นกุญแจสำคัญของการในการทำให้ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM เปลี่ยนไป ซึ่งข้อมูลนี้สนับสนุนด้วยการวิเคราะห์เชิงปริมาณของการสร้าง chitinase ด้วย real-time PCR ที่ปริมาณของ chitinase mRNA เพิ่มมากขึ้นในลูกน้ำยุงที่แช่ calcofluor อย่างไรก็ดี ไม่พบ binding protein ของ Cry4Ba ที่จำเพาะจากโปรตีนของ PM โดยสรุป ในงานวิจัยปัจจุบันสนับสนุนสมมติฐานที่ว่า PM เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้แมลงเกิดความต้านทานต่อโปรตีนสารพิษ Cry4Ba เท่ากันกับเป็นเป้าหมายใหม่ที่จะนำไปสู่การปรับปรุงประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Cry4Ba ในประยุกต์ใช้ในภาคสนามต่อไป

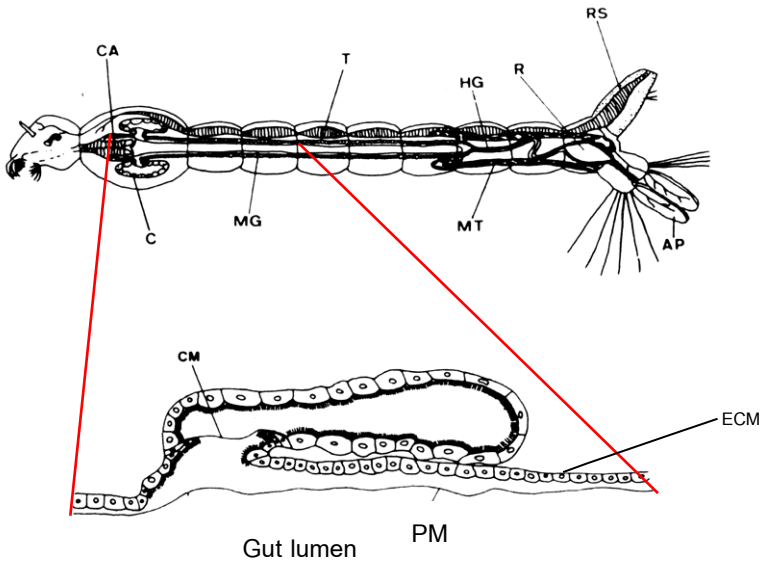
Keywords : *Bacillus thuringiensis*, Calcofluor, Peritrophic membrane, Permeability, Insect susceptibility

(คำหลัก)

บทนำ

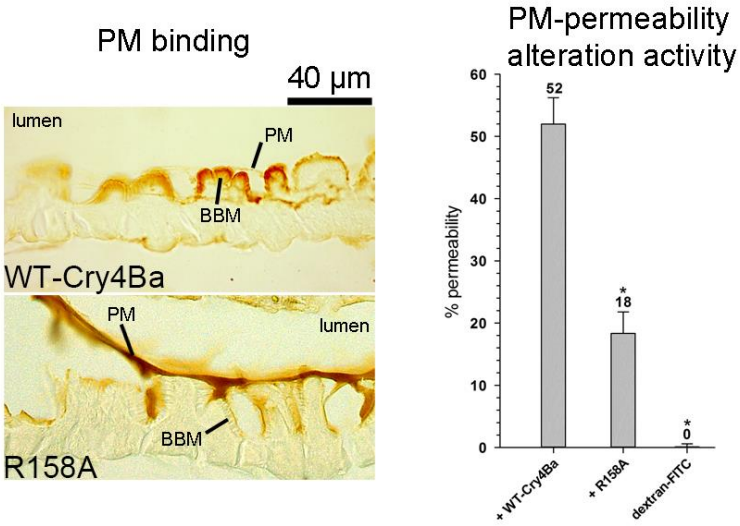
โปรตีนสารพิษ Cry toxins ผลิตจากแบคทีเรียชนิด *Bacillus thuringiensis* (Bt) ได้ถูกนำมาใช้กันทั่วโลกในฐานะเป็นสารฆ่าแมลงชีวภาพที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมายเท่านั้น ซึ่งปลอดภัยต่อคน สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม จากการใช้โปรตีนสารพิษ Cry toxin และการตัดต่อยีนเข้าสู่พืชพันธุ์สร้างเป็นพืช Bt กันอย่างแพร่หลาย(Zhang et al., 2011) ดูเหมือนว่าเป็นการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโปรตีนสารพิษ Cry toxins เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และนำไปสู่ความเสียหายต่อพืชพันธุ์ (Tetreau et al., 2012; Zhang et al., 2012) จากปัญหานี้จึงนำไปสู่ความพยายามที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพของ Cry toxins โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรม การปรับเปลี่ยนส่วนโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ Cry toxins

กลไกการเข้าทำลายของ Cry toxins เกี่ยวข้องกับกระบวนการหลายขั้นตอน ได้แก่ การละลายของ protoxin การกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น toxin ที่ทำงานได้ ด้วยน้ำย่อยภายในกระเพาะของแมลง (Angsuthanasombat et al., 2004; Hofte et al., 1986) จากนั้นจะผ่านชั้น peritrophic membrane (PM) ไปจับกับตัวจับจำเพาะบนผนังของเซลล์เยื่อบุ เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของ toxin และการแทรกเข้าสู่ผนังของเนื้อเยื่อบุเพื่อสร้างรูรั่ว เป็นผลให้เกิดภาวะสมดุลความดัน osmotic เปลี่ยนแปลง สารภายนอกและภายในเข้าออกเซลล์เยื่อบุได้อย่างอิสระ ส่งผลทำให้เซลล์เยื่อบุตายและตัวอ่อนของแมลงตายในที่สุด (Knowles, 1994; Whalon and Wingerd, 2003) PM เรียงตัวอยู่เป็นแนวระหว่างเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหารและช่องอาหารของยุง ทำหน้าที่คอยปกป้องอันตรายจากชิ้นส่วนอาหารที่กินเข้าไป เป็นตัวกรองสารอาหารและสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าถึงเยื่อบุกระเพาะอาหารซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ของ receptor ของโปรตีน Cry (Tellam et al., 1999, Rees et al., 2009)



ภาพที่ 1 ภาพลายเส้นแสดง PM ในกระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงลาย *A. aegypti* (ดัดแปลงจาก Peters, 1992) ภาพบนแสดงส่วนประกอบภายในกระเพาะอาหาร ประกอบไปด้วย cardia (CA), caeca (C), midgut (MG), trachea (T), hindgut (HG), malpighian tubules (MG), rectal pad (R), respiratory siphon (RS), anal papillae (AP). ภาพล่างแสดงภาพขยายของ PM วางตัวอยู่ระหว่างช่องอาหารและเยื่อหุ้มเซลล์ของกระเพาะอาหาร.

PM วางตัวอยู่ระหว่างช่องว่างกระเพาะอาหารและเยื่อบุเซลล์กระเพาะอาหาร (ภาพที่ 1) ใช้เป็นตัวกรองอนุภาคเล็ก ๆ ของอาหารให้ดูดซึมไปใช้ในการเติบโตของแมลงตัวอ่อน (Edwards and Jacobs-Lorena, 2000) และยังเป็นด่านสำคัญที่จะไม่ให้เชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสเข้าถึงเยื่อบุเซลล์ได้ง่าย (Fang et al., 2009; Rao et al., 2004) การสร้าง PM ไม่ได้เกิดขึ้นตลอดเวลา แต่เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยอาหารที่ลูกน้ำยุงกินเข้าไป ประกอบไปด้วย chitin ซึ่งเป็นสารประกอบหลักสร้างจากเซลล์กระเพาะอาหารสานกันเป็นตาข่ายที่มีความพรุนโดยมีโปรตีนที่หลั่งออกมาจาก micro-apocrine ซึ่งจับได้กับ chitin มาร่วมอยู่ด้วย (peritrophin) นอกจากนั้นยังมีโปรตีนสารพิษ Cry ที่สามารถจับกับ brush border membrane receptors (Hernandez-Rodriguez et al., 2008; Moonsom, 2007) อีกด้วย เช่น Cry4Ba และ Cry1A โปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีรายงานว่าจับได้กับ PM (Leetachewa et al., 2014; Rees et al., 2009) มีรายงานว่า arginine ตำแหน่ง 158 ของโปรตีน Cry4Ba อาจเป็นบริเวณสำคัญในการจับกับ PM ที่เกี่ยวข้องกับการ oligomerization ซึ่งส่งผลให้หน้าที่ในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM เปลี่ยนไป ยอมให้ Cry4Ba ผ่านไปถึงผนังเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงแล้วทำให้เกิดรูรั่วของผนังได้ จากการที่โปรตีนกลายพันธุ์ Cry4Ba-R158A ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (ภาพที่ 2) ทำให้ไม่สามารถผ่าน PM เข้าไปได้นั้น ส่งผลโดยตรงถึงความเป็นพิษของโปรตีนต่อลูกน้ำยุงลาย (Leetachewa et al., 2014) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าตำแหน่งบางตำแหน่งของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba เป็นส่วนหนึ่งของกลไกของความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายและตัว PM เองจึงน่าจะเป็นเป้าหมายสำคัญอีกตำแหน่งหนึ่งในการที่จะปรับปรุงความเป็นพิษของโปรตีน Cry



ภาพที่ 2 แสดงการจับของโปรตีนสารพิษที่บริเวณ PM และการเสียสภาพความเป็นเยื่อเลือกผ่านหลังจากกินโปรตีนสารพิษกลายพันธุ์ Cry4Ba-R158A เทียบกับ Cry4Ba-wildtype (Leetachewa et al., 2014). ภาพซ้ายแสดงบริเวณที่จับของโปรตีนสารพิษกลายพันธุ์และ wildtype (สีน้ำตาลเข้ม) หลังจากให้กินโปรตีนสารพิษเข้าไป 1 ชั่วโมง จากนั้นติดตามโปรตีนด้วยวิธีอิมมูนโนโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cry4Ba ภาพขวาแสดงการให้ลูกน้ำกินโปรตีนสารพิษร่วมกับอนุภาพ 2000-kDa dextran-FITC และนับจำนวนลูกน้ำที่พบสารเรืองแสง FITC บริเวณนอกกระเพาะอาหารแล้วคำนวณออกเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของการเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน PM is peritrophic membrane and BBM is brush border membrane.

Chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสาร chitin อาจเป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เปลี่ยนความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM มีรายงานว่าการสร้างโปรตีนสารพิษ Cry1AC ร่วมกับเอนไซม์ chitinase ในเชื้อ Bt ส่งผลกระทบต่อความเป็นพิษของ Cry1Ac ต่อหนอนกระทู้ผักชนิด *Spodoptera exigua* และหนอนเจาะสมอฝ้ายชนิด *Helicoverpa armigera* (Hu et al., 2009) งานวิจัยที่ศึกษาถึงสารเคมีที่ส่งผลต่อ PM มีมากขึ้นทุกขณะโดยวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงประสิทธิภาพของโปรตีนสารพิษ Cry ในงานวิจัยเหล่านี้ calcofluor ซึ่งเป็นสารเรืองแสงชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากัน โดยสารนี้สามารถยับยั้งการสร้าง chitin และสามารถละลาย peritrophin ได้ (Kingsbury et al., 2012, Wang and Granados, 2000) ตัวอ่อนของหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* ที่กิน calcofluor เข้าไปพบว่าเพิ่มการติดเชื้อ baculovirus (Wang and Granados, 2000)

ในรายงานก่อนหน้านี้โปรตีนสารพิษชนิด Cry4Ba สามารถจับกับและเปลี่ยนความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM ทำให้โปรตีนสารพิษดังกล่าวผ่านเข้าไปจนถึงเซลล์เยื่อบุ (ภาพที่ 2, Leetachewa et al., 2014) ในการทดลองเบื้องต้นได้แสดงให้เห็นว่า Cry4Ba ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงในการที่จะทำให้ลูกน้ำยุงลายที่กินโปรตีนนี้เข้าไปตายไป 5% ขณะที่การกินโปรตีนสารพิษร่วมกับสารเรืองแสงชนิด calcofluor ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถละลายโปรตีนที่จับได้กับ chitin เพิ่มความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงลายเป็น 60% ในเวลา 3 ชั่วโมงเท่ากัน จากข้อมูลเบื้องต้นนี้ทำให้สันนิฐานได้ว่าโปรตีนสารพิษจับกับโปรตีนบน PM อาจทำหน้าที่ชะลอความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นกับลูกน้ำยุงลาย ดังนั้นถ้าสามารถนำโปรตีนบน PM ออกไปได้ด้วยสารเคมีบางชนิดอย่างเช่น calcofluor และ chitinase หรือการทำให้เสียสภาพการจับตัวกันระหว่างโปรตีนสารพิษกับโปรตีนบน PM ได้น่าจะทำให้การผ่านเข้าของโปรตีนสารพิษไปถึงเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารได้ดีขึ้น ซึ่งเท่ากับว่าเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Cry4Ba ที่มีต่อลูกน้ำยุงลายไปด้วย อีกทั้งมีรายงานว่าสาร calcofluor มีความเป็นพิษต่อปลา สัตว์เลือดอุ่น และมนุษย์ต่ำมากและไม่พบความสามารถในการเป็นสารก่อมะเร็งหรือสารก่อการกลายพันธุ์ในมนุษย์ (The Center for Research Information, 2004) อย่างไรก็ดีความปลอดภัยที่จะใช้ calcofluor ควบคู่ไปกับโปรตีนสารพิษชนิด Cry ยังคงต้องมีการวิจัยต่อไปในระยะยาว ในโครงการวิจัยนี้เน้นในการจำแนกชนิดของโปรตีนบน PM ที่สามารถจับกับโปรตีนสารพิษชนิด Cry4Ba และหาบริเวณจับกันระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิด ข้อมูลที่ได้อาจถูกนำไปใช้ประโยชนในอนาคนเพื่อทำการปรับปรุงประสิทธิภาพความเป็นพิษของ Cry4Ba ให้ดีขึ้นหรืออาจออกแบบสารชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการทำลายความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM ที่ปลอดภัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้

วัตถุประสงค์

โครงการนี้มีวัตุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาการเสริมฤทธิ์ของ calcofluor ทางชีวภาพของโปรตีนสารพิษชนิด Cry4Ba
2. จำแนกบริเวณที่จับกันของโปรตีนสารพิษชนิด Cry4Ba กับโปรตีนที่อยู่บน PM

วิธีการ

การทดสอบความเป็นพิษของ Cry4Ba

Cry4Ba ผลิตจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่มียีนที่สามารถสร้างโปรตีน Cry4Ba ได้ในรูปของ inclusion body ซึ่งจะถูกล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและวัดความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford's assay และ

ยืนยันการเป็นโปรตีน Cry4Ba ด้วยการแยกบน 12%-gel SDS-PAGE ทดสอบความเป็นพิษโดยลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) ระยะ 4 ด้วยโปรตีนสารพิษทั้งสองประเภทด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.125 ถึง 200 µg/ml หรือให้ร่วมกับ 0.1% calcofluor การทดสอบทำในถาดชนิด 6 หลุม ที่มีลูกน้ำหลุมละ 25 ตัว รวมทั้งหมด 100 ตัวต่อ 1 การทดสอบ ความเป็นพิษจะถูกบันทึกหลังจาก 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นจะถูกนำมาคำนวณค่าความเป็นพิษ LC_{50} และ LC_{90} ซึ่งถูกประมาณค่าด้วยวิธี probit analysis

ในการหาเวลาที่น้อยที่สุดของของการสัมผัส calcofluor และทำให้เกิดการตายที่ 90% นั้น ลูกน้ำระยะ 4 จะถูกแช่อยู่ใน 0.1% calcofluor เป็นเวลา 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง หลังจากการแช่แล้วลูกน้ำจะถูกเปลี่ยนนำไปใส่ในสารละลายของโปรตีนสารพิษที่ความเข้มข้นของ LC_{90} ทำการบันทึกผลการตายของลูกน้ำหลังจาก 24 ชั่วโมง จากนั้นเวลาที่น้อยที่สุดของการสัมผัส calcofluor และมีการตาย 90% จะถูกคำนวณ

การประมาณค่าการตายของลูกน้ำที่เวลาต่าง ๆ กันหลังสัมผัส calcofluor ทำโดยนำลูกน้ำไปสัมผัส 0.1% calcofluor เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นสารละลายโปรตีนสารพิษที่ความเข้มข้นของ LC_{90} จากนั้นบันทึกการตายของลูกน้ำยุงที่ 3, 4, 6 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ ทุกการทดลองข้างต้นถูกทำ 3 ซ้ำ

การทดสอบความเป็นพิษของ calcofluor และ Cry4Ba ที่มีต่อไรน้ำจืด

วิธีเลี้ยงไรน้ำจืดชนิด *Moina macrocopa* ถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Rottmann (Rottmann et al., 2017) โดยนำตัวอ่อนของไรน้ำอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง จำนวน 30 ตัว ใส่ในอ่าง (20 x 15 x 15 เซนติเมตร ที่มีน้ำอยู่ 3 ลิตร สาหร่ายชนิด *Chorella vulgaris* ปริมาณ 2×10^7 เซลล์ต่อลิตร จะถูกใช้เป็นอาหารของไรน้ำ โดยจะให้ทุก ๆ 48 ชั่วโมง การเลี้ยงทำที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C มีช่วงแสง 16 ชั่วโมง และให้ออกซิเจนแก่น้ำเบา ๆ

การทดสอบความเป็นพิษของ Cry4Ba ที่มีต่อไรน้ำทำโดยแช่ไรน้ำในสารละลาย 0.1% calcofluor หรือโปรตีนสารพิษที่ความเข้มข้นของ LC_{90} หรือร่วมกันทั้งสองแบบ การทดสอบทำในสภาพแวดล้อมเดียวกับการเลี้ยงไรน้ำโดยเทียบกับกลุ่มควบคุม ใช้ไรน้ำ 100 ตัวต่อการทดสอบ 1 แบบ ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรที่มีสารละลายที่ทดสอบ 50 มิลลิลิตร ทุกการทดสอบทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปอร์เซ็นต์การตายจะถูกบันทึกหลัง 24 ชั่วโมง

ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM และการติดตามโปรตีนสารพิษในตัวลูกน้ำยุงด้วยวิธีอิมมูนโน

ลูกน้ำยุงลายระยะ 4 จะได้รับอนุภาค 2000 kDa FITC-dextran อย่างเดียวหรือร่วมกับโปรตีนสารพิษ Cry4Ba-wildtype หรือ Cry4Ba-R158A ที่ความเข้มข้นของ LC_{90} เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM ที่เปลี่ยนไป ดูจากการเรืองแสงของ 2000 kDa FITC-dextran ที่บริเวณนอกกระเพาะลูกน้ำยุงด้วยการดูใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง การสังเกตผลของ calcofluor ที่มีต่อความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM จะทำร่วมกับการแช่ลูกน้ำในสารละลาย 0.1% calcofluor วิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติ Student's t-test ที่ p-values น้อยกว่า 0.05 จะถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ในการตรวจสอบการจับกันของโปรตีนสารพิษแท้หรือกลายพันธุ์ทำโดยให้สารที่ความเข้มข้นของ LC_{90} กินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง การติดตามด้วยวิธีอิมมูนโนใช้ แอนติบอดี้ติดฉลาก HRP ต่อแอนติบอดีจำเพาะ

ของ Cry4Ba ตรวจสอบการด้วยการดูสีน้ำตาลเข้มของ 3,3'-diaminobenzidine วิธีการใช้งานใช้ตามข้อกำหนดของบริษัทผู้ผลิต (Sigma Aldrich) ภาพที่ได้จะถูกถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การย้อมเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงด้วย hematoxylin และ eosin

ลูกน้ำยุงที่ถูกแช่ในสารละลาย 0.1% calcofluor เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยโปรตีนสารพิษที่ความเข้มข้นของ LC_{90} อีก 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกหัวและหางบริเวณ segment ที่ 8 ออก และ fix ในสารละลาย PBS, pH 7.4 ที่มี 4% paraformaldehyde และ 4% sucrose นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเป็นเป็นสารละลายชนิดเดิมแต่มี 10% sucrose แทน นานข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นชิ้นส่วนตัวอย่างจะถูกนำน้ำออกโดยแช่ในลำดับของสารละลายที่มีเปอร์เซ็นต์ของ ethanol เพิ่มขึ้น 30% 50%70% และ 95% ตามลำดับ และท้ายที่สุดจะล้างใน absolute ethanol อีก 2 ครั้งก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร xylene อีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้เวลา 30 นาที จากนั้นตัวอย่างเนื้อเยื่อจะถูกแช่ในสาร xylene-paraffin (1:1 v/v) 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง และท้ายที่สุดจะอยู่ใน 100% paraffin เหลว เมื่อก้อน paraffin เย็นตัวลงจะถูก sliced ด้วยเป็นแผ่นบาง วางอยู่บนกระจก slide และนำไปใส่ในตู้อบ 37 °C นานข้ามคืน แผ่นเนื้อเยื่อบนกระจก slide จะถูกนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยแช่ใน PBS นาน 30 นาทีก่อนที่จะถูกย้อมด้วยสารละลาย hematoxylin และ eosin เนื้อเยื่อที่ถูกย้อมจะถูกล้างสีส่วนเกินออกด้วย PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ส่วนของกระเพาะและ PM จะถูกถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนลูกน้ำยุงที่กินโปรตีนสารพิษอย่างเดียวหรือไม่ได้กินจะถูกใช้เป็น positive และ negative control ตามลำดับ

การตรวจสอบพื้นผิวของ PM ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิดส่องกราด

ลูกน้ำยุงลายที่ถูกแช่อยู่ใน 0.1% calcofluor อย่างเดียว กับโปรตีนสารพิษอย่างเดียว หรือร่วมกัน ทั้งสองอย่างจะถูกแยกเอาส่วนของลำไส้ออก และ fix ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) กับ 5% glucose (fixing solution) ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากล้างอีก 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที ใน fixing solution เนื้อเยื่อกระเพาะตัวอย่างจะถูกดึงน้ำออกด้วยลำดับของ ethanol ที่มีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นและถูกทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drying ตัวอย่างที่แห้งแล้วจะถูกติดบน aluminum stub และถูกเคลือบด้วยทองก่อนที่จะนำไปฉายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิดส่องกราดที่กำลัง 10 kV

การวิเคราะห์ mass ของโปรตีน profile ของ PM จากลูกน้ำที่ถูก treat ด้วย calcofluor

ลูกน้ำยุงลายที่ไม่ถูกแช่และถูกแช่อยู่ใน 0.1% calcofluor นาน 1 ชั่วโมง จะถูกแยกเอาส่วนของ PM ออกและนำมาใส่ในสารละลาย 2x Laemmli sample buffer จากนั้นนำไป sonicate ใน sonicated bath นาน 2 นาที ก่อนที่จะถูกนำไปต้มที่ 95 °C นาน 5 นาที ทำวิเคราะห์ profile โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ 10% เจล ทำการเปรียบเทียบ pattern ของโปรตีนด้วยวิธีถ่ายภาพแล้วจึงนำมาวิเคราะห์ความแตกต่าง จากนั้นจึงตัดโปรตีนจากเจลโดยเทียบเคียงในระนาบเดียวกันระหว่าง treatment 2 แบบ ไปทำการวิเคราะห์ mass ด้วยวิธี LC-MS/MS (ESI-QUAD-TOF)

การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

RNA ถูกสกัดจากลำไส้ลูกน้ำยุงลายที่แช่และไม่แช่อยู่ใน 0.1% calcofluor โดยใช้ RNAqueouse™ kit (Life Technologies, USA) ด้วยวิธีที่บริษัทแนะนำ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่างจะถูกทำความสะอาดด้วยการวิธีตกตะกอนใน 3 M sodium acetate และ 100% isopropanol RNAที่ได้จะถูกล้างด้วย 70% ethanol และละลายด้วยน้ำที่ปลอด RNase ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA จะถูกวัดค่าด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-100 โดยค่าอัตราส่วน A260/280 และ A260/230 จะอยู่ระหว่าง 1.9 และ 2.5 ตามลำดับ RNA ที่บริสุทธิ์จะถูกกำจัด DNA ด้วยการ treated ด้วย TURBO DNA-free™ kit (Life Technologies, USA) จากนั้นจึงทำ reverse transcribed ด้วยวิธีที่บริษัทแนะนำ cDNA ที่ได้จะถูกเจือจาก 10 เท่าก่อนนำไปใช้วิเคราะห์ในขั้นถัดไป

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี real-time PCR

NCBI protein blast ถูกใช้ในการหา coding sequences สำหรับยีน chitinase โดย primer ที่จำเพาะ ต่อchitinase (forward primer: 5'-AGGGGAAGCCATTCTCTTGC-3' และ reverse primer: 5'-GAGGAGGGTGCGCAAGTTAT-3' จะถูกออกแบบโดยใช้ Primer3Plus online (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) และถูกวิเคราะห์ประสิทธิภาพโดยใช้ OligoAnalyzer 3.1 (https://eu.idtdna.com/calc/analyzer) ส่วน reference gene ใช้ actin gene ประสิทธิภาพของ primer จะถูกวัดค่าโดยการทำ series dilution ของตัวอย่างที่มีปริมาณ cDNA ที่เท่ากัน การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย real-time PCR ถูกทำใน 96-well plate ในหนึ่ง amplification reaction จะมี 2 ul ของ cDNA ที่ dilute แล้ว forward และ reverse primer (100 nM), Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) และน้ำบริสุทธิ์โดยปริมาตรสุทธิคือ 10 ul condition ของ PCR มีดังนี้ 1) เริ่มต้น denaturation 20 วินาที ที่ 95 °C 2) จำนวนรอบ 40 รอบ ของ denaturation (3 วินาที ที่ 95 °C) annealing และ elongation (30 วินาที ที่ 60 °C) ในขั้นตอนสุดท้ายทำการวิเคราะห์ melting curve เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของ amplification reaction

Pull down assay เพื่อหาคู่จับจำเพาะของ Cry4Ba และโปรตีนบน PM

pull-down assay จะถูกทำใน 96-well plate โดยการ coat anti-mouse antibody ไว้ชั้นล่างสุดของหลุม ตามด้วย mouse antibody ที่จำเพาะกับ Cry4Ba และชั้นบนสุด coat ด้วยโปรตีน Cry4Ba ตามลำดับ หลังจากล้างโปรตีนส่วนเกินออกหมดแล้วจึงทำการ overlay ด้วยโปรตีนจาก PM เป็นลำดับชั้นสุดท้ายและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างโปรตีนส่วนเกินออกอีกรอบและ elute protein ทั้งหมดด้วย 2X protein sample buffer โปรตีนที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และวิเคราะห์ mass ของโปรตีนต่อไป

Toxin overlay assay ของโปรตีน PM จากลูกน้ำยุงลาย

โปรตีนของ PM จะถูกวิเคราะห์บน 10% gel SDS-PAGE จากนั้นจะถูก transfer ลงบนแผ่น nitrocellulose ด้วยวิธี electroblotting และจะถูกนำมาแช่ใน blocking solution (5% skim milk) ข้ามคืน โปรตีน Cry4Ba 1 µg จะถูกนำมา overlay บนแผ่น membrane นาน 1 ชั่วโมง ที่ 4 °C แล้วจึงล้างโปรตีนส่วนเกินออก และติดตามโปรตีน Cry4Ba ด้วยวิธีอิมมูนโนใช้แอนติบอดี้ติดฉลาก HRP ต่อ specific antibody ต่อ Cry4Ba และดูผลด้วยวิธี enhanced chemiluminescence ส่วนวิธีการติดตาม Cry4Ba วิธี

ตรงทำได้โดยการแยกเอา PM ของลูกน้ำยุงลายออกมาล้างด้วย 1x PBS (pH 7.4) แล้วจึง overlay ด้วยโปรตีน Cry4Ba 1 µg 1 ชั่วโมง ที่ 4 °C แล้วจึงล้างโปรตีนส่วนเกินออก และติดตามโปรตีน Cry4Ba ด้วยวิธีอิมมูนโนใช้แอนติบอดี้ติดฉลาก FITC ต่อ specific antibody ต่อ Cry4Ba และดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence

ผลการทดลอง

Calcofluor ช่วยลดค่า lethal concentration และเวลาการสัมผัสของ Cry4Ba-wildtype

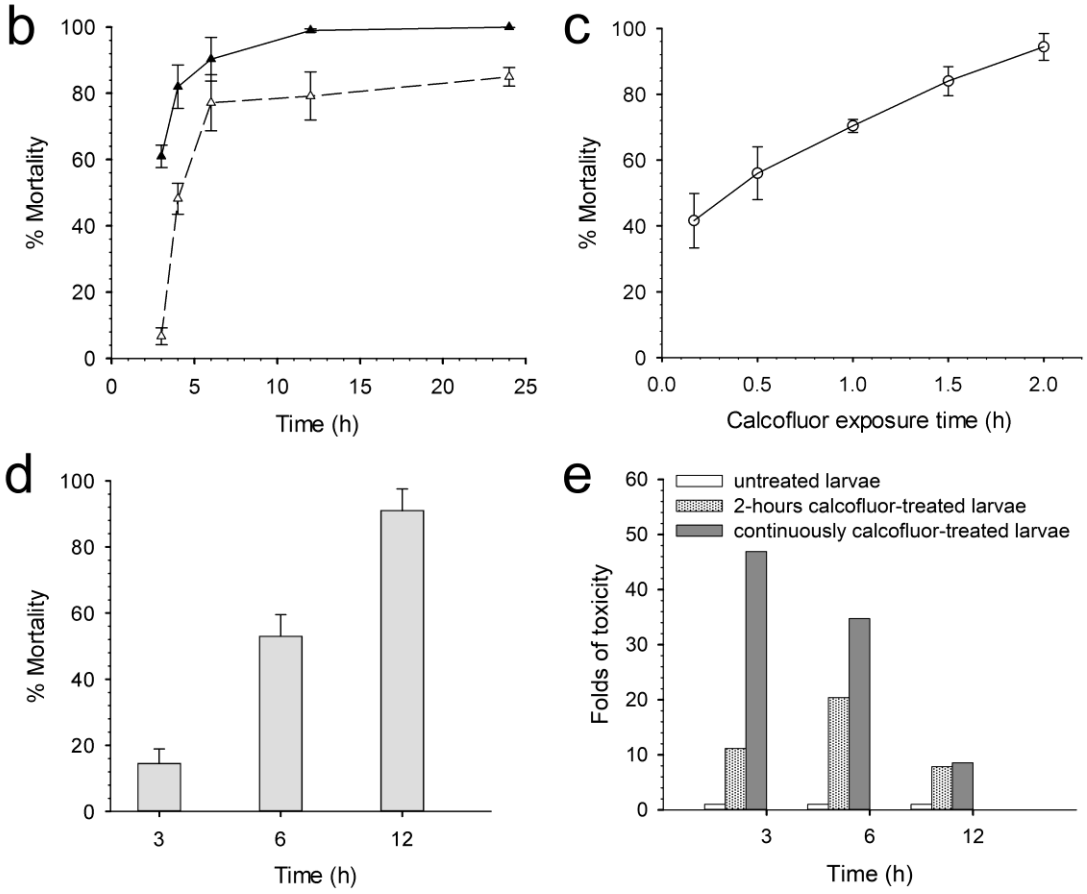
ผลกระทบของ calcofluor ที่มีต่อความเป็นพิษของ Cry4Ba ถูกวัดค่าโดยการให้ Cry4Ba หรือ calcofluor หรือทั้งสองอย่างร่วมกันกับลูกน้ำยุงลายระยะ 4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มี calcofluor ผลคือในกลุ่มที่ได้รับโปรตีนสารพิษร่วมกับ calcofluor ลดค่า LC_{50} ลงได้ประมาณ 20 เท่า (จาก 6.27 ± 0.66 µg/ml เป็น 0.29 ± 0.03 µg/ml) และ ลดค่า LC_{90} ลงได้ประมาณ 50 เท่า (จาก 57.71 ± 11.63 µg/ml เป็น 1.78 ± 0.24 µg/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 3a) calcofluor สามารถลดเวลาในการสร้างความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายของโปรตีน Cry4Ba โดยใช้ความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษที่ค่า LC_{50} และ LC_{90} ร่วมกับ calcofluor เมื่อให้ Cry4Ba อย่างเดียวหรือร่วมกับ calcofluor ที่เวลา 3, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3b) เมื่อให้ Cry4Ba อย่างเดียวการตายของลูกน้ำยุงลายที่ 3 ชั่วโมงเพิ่มจาก 7% เป็น 60% และภายในเวลา 12 ชั่วโมง การตายเพิ่มจาก 80% เป็น 100% ตามลำดับ ลูกน้ำยุงลายที่แช่อยู่ในสารละลาย 0.1% calcofluor ที่เวลาต่าง ๆ กัน 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายออกไปให้กิน Cry4Ba ที่ความเข้มข้นของค่า LC_{90} พบการตายที่การแช่ 1 และ 2 ชั่วโมง สูงสุดคือ 80 และ 90% ตามลำดับ(ภาพที่ 3c) ดังนั้นการแช่ calcofluor ก่อนที่ 2 ชั่วโมงจึงถูกเลือกไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3, 6, และ 12 ชั่วโมง พบการตายเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปสูงสุดคือตาย 90% ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3d) นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแช่ลูกน้ำในสารละลาย 0.1% calcofluor อย่างต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง (แช่ 2 ชั่วโมง) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมากที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง คือที่แช่ไม่ต่อเนื่องต่ำกว่า 14 เท่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3e)

calcofluor ช่วยกู้คืนความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba กลายพันธุ์ (Cry4Ba-E417A/Y455A, EY)

ขณะที่ไม่มี calcofluor ความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายของ Cry4Ba-wildtype เป็น 47%, 74%, 97% และ 74% เมื่อให้กินโปรตีนที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 µg/ml และ 10^8 ของ *E. coli* ที่สร้างโปรตีนสารพิษนี้ตามลำดับ ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ EY มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายต่ำกว่ามาก (ภาพที่ 4a) คือทำให้ความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM เสียไป 50% เมื่อเทียบกับพันธุ์ wildtype และเมื่อให้โปรตีนร่วมกับสารละลาย 0.1% calcofluor ความสามารถในการทำให้เสียความเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM เพิ่มมากขึ้น เป็น 95% และ 77% ใน wildtype และ EY ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความสามารถในการจับกับ brush border membrane /microvilli (BBMV)ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 4 b และ c) และเมื่อคำนวณหาค่า LC_{50} และ LC_{90} ของโปรตีน EY เมื่อให้คู่กับ calcofluor จะได้ผลดังภาพที่ 4d คือ ค่า LC_{50} และ LC_{90} ต่ำลงเป็น 1 และ 5 µg/ml ตามลำดับ

a

	(-) calcofluor		(+) calcofluor	
	LC_{50}	LC_{90}	LC_{50}	LC_{90}
Cry4Ba-WT	6.27 ± 0.66	57.71 ± 11.63	0.29 ± 0.03	1.78 ± 0.24



ภาพที่ 3 การเพิ่มประสิทธิภาพความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba ของ calcofluor ต่อลูกน้ำยุงลาย *Ae. aegypti*

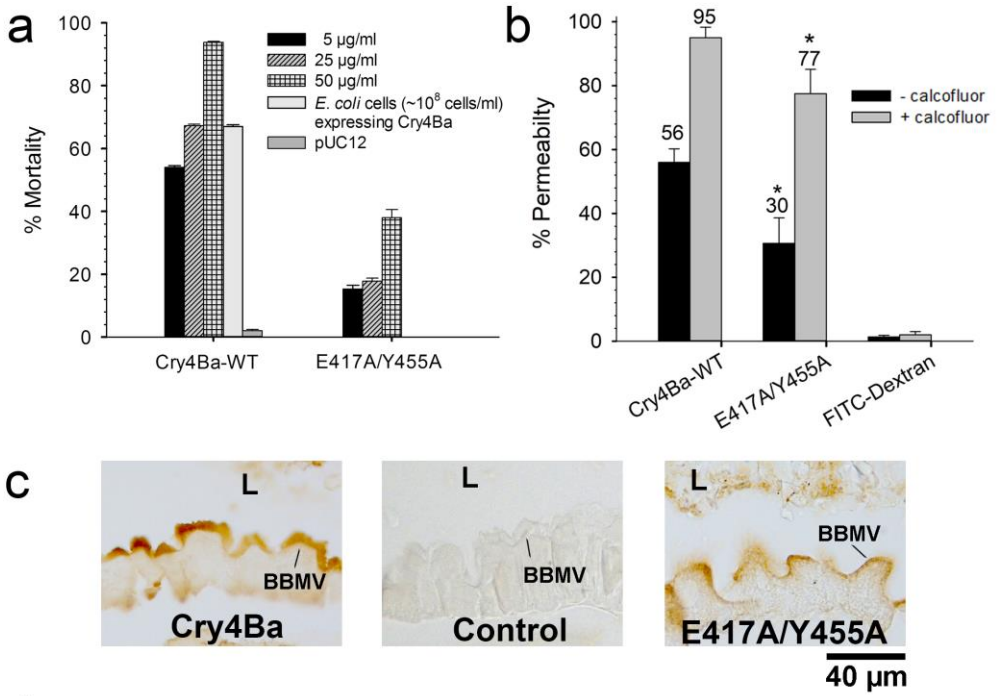
(a) ให้ Cry4Ba กับลูกน้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในสภาวะที่มีหรือไม่มี calcofluor นาน 24 ชั่วโมง และประเมินค่า LC_{50} และ LC_{90}

(b) ลูกน้ำกิน Cry4Ba ที่ความเข้มข้นระดับ LC_{90} (เส้นประ) และ Cry4Ba ร่วมกับ calcofluor (เส้นทึบ) บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง

(c) แช่ลูกน้ำใน 0.1% calcofluor นาน 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง แล้วจึงให้ Cry4Ba ที่ความเข้มข้นระดับ LC_{90} บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายหลังจาก 24 ชั่วโมง

(d) แช่ลูกน้ำใน 0.1% calcofluor นาน 2 ชั่วโมง แล้วย้ายไปใส่ในน้ำที่มี Cry4Ba ที่ความเข้มข้นระดับ LC_{90} บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายที่ 3, 6 และ 12 ชั่วโมง

(e) เปรียบเทียบจำนวนเท่าของความเป็นพิษของ Cry4Ba ต่อลูกน้ำยุงในกลุ่มตัวอย่างที่แช่ calcofluor อย่างต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่อง



d

	(-) calcofluor		(+) calcofluor	
	LC_{50}	LC_{90}	LC_{50}	LC_{90}
E417A / Y455A	>200	ND	1.04 ± 0.08	5.93 ± 0.81

ภาพที่ 4 ความเป็นพิษและผลกระทบทางชีววิทยาของโปรตีน Cry4Ba กลายพันธุ์ EY ในสภาพที่มีหรือไม่มี calcofluor

(a) ให้ลูกน้ำยุงลายกิน Cry4Ba และ EY ที่ความเข้มข้น 5, 25, 50 µg/ml และ 10^8 เซลล์ ของ *E. coli* ที่สร้าง Cry4Ba โดยมี *E. coli* ที่มีพลาสมิด pUC12 เป็นกลุ่มควบคุม

(b) การรบกวนระบบ PM ของ Cry4Ba เทียบกับ EY โดยการกินอนุภาคเรืองแสง dextran ขนาด 2000 kDa ร่วมกับโปรตีนสารพิษที่ความเข้มข้นของ LC_{90} ในสภาพที่มีหรือไม่มี calcofluor เปอร์เซ็นต์ PM permeability แทนด้วยการรั่วของสารเรืองแสงออกนอกกระเพาะอาหาร

(c) section ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ถูกย้อมด้วยวิธีอิมมูนโน mouse anti-Cry4Ba และ HRP-linked anti-mouse immunoglobulins

(d) LC_{50} และ LC_{90} ของโปรตีน Cry4Ba กลายพันธุ์ EY ถูกประเมินหลังได้รับโปรตีนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีหรือไม่มี calcofluor

calcofluor ทำให้สัณฐานวิทยาของ PM เปลี่ยนแปลง

เพื่อที่จะศึกษาสัณฐานวิทยาของ PM ของลูกน้ำยุงลายที่ได้รับโปรตีนสารพิษ Cry4Ba หรือจากการแช่ในสารละลาย 0.1% calcofluor หรือร่วมกันทั้งสองอย่าง กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนชนิดส่องกราดจึงถูกนำมาใช้เพื่อดูพื้นผิวของ PM ที่เปลี่ยนไปโดยเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารใด ๆ (ภาพที่ 5a) ใน PM ปกติการจัดเรียงตัวของ micro-fibril มีความเป็นระเบียบดังเห็นได้จากเส้นหนาที่ลากผ่านเป็นแนว พบรอยแตกเล็กน้อยในกลุ่มที่ได้รับโปรตีนสารพิษหรือ 0.1% calcofluor อย่างเดียว รอยแตกเหล่านี้เห็นได้ชัดเป็นแนวตามทางยาวของแนวเส้นหนา การย้อม H&E บนเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุงลายพบกลุ่ม BBMV ของกระเพาะที่ลูกน้ำถูกแช่ใน 0.1% calcofluor ยังคงมีสภาพสมบูรณ์เหมือนกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 5b) ขณะที่ BBMV ของลูกน้ำที่กินโปรตีนสารพิษอย่างเดียวและกินร่วมกับการแช่ calcofluor พบเยื่อบุกระเพาะอาหารบวมฐานเซลล์มีรอยแยกหรือบางจุดบวมแตก อย่างไรก็ดี โดยรวมแล้วภาพสัณฐานวิทยาอย่างหยาบของ PM ไม่ได้บอกความแตกต่างอะไรมากนัก

calcofluor ช่วยเพิ่มความเป็นพิษของ Cry4Ba ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* อย่างมีนัยสำคัญ

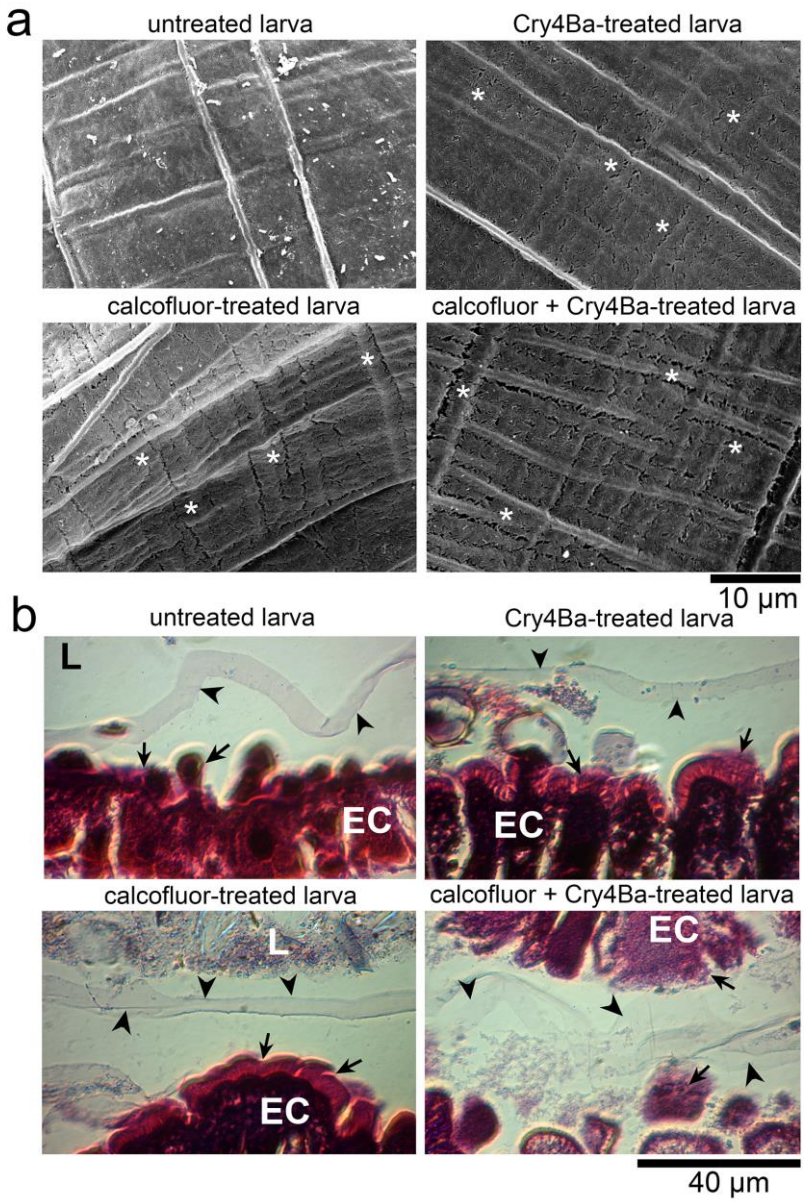
ควบคู่ไปกับการทดสอบความเป็นพิษของ Cry4Ba ต่อยุงลาย ได้มีการทดสอบความเป็นพิษต่อยุงรำคาญ และสัตว์น้ำอื่นได้แก่ ไรน้ำ ซึ่งไม่ใช่สัตว์น้ำที่อ่อนแอต่อ Cry4Ba โดยใช้ความเข้มข้นที่ LC90 หรือ calcofluor หรือร่วมกันทั้งสองอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การตายของยุงรำคาญคือ 2.5% และ 13% เมื่อแช่ใน 0.1% calcofluor หรือ Cry4Ba อย่างเดียว ตามลำดับ (ภาพที่ 6) ในกลุ่มที่ให้สารเคมีทั้งสองอย่างพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของลูกน้ำยุงรำคาญเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดคือ 70% อย่างไรก็ตามไม่พบการตายของไรน้ำเมื่อได้รับสารเคมีเหมือนๆ กับที่ยุงรำคาญได้รับ

โปรตีน profile และการวิเคราะห์ mass ของ PM หลังจากลูกน้ำยุงลายแช่อยู่ใน calcofluor

เพื่อที่จะทราบถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มของลูกน้ำที่แช่ใน 0.1% calcofluor และกลุ่มควบคุม โปรตีนจาก PM ของลูกน้ำยุงจึงถูกวิเคราะห์บน 10% gel SDS-PAGE พบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอยู่ในช่วง 50-130 kDa (ภาพที่ 7) แต่ละ band ของโปรตีนที่อยู่ในแนวเดียวกัน (ลูกศรสีแดง) ของโปรตีนจาก treatment ทั้งสองแบบถูกนำไปวิเคราะห์มวลด้วยเครื่อง mass spectrometer (ESI-QUAD-TOF) พบกลุ่มโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ chitinase, transcription factor, transmembrane protein (ตาราง 1) ซึ่งโปรตีนที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM คือ chitinase โดยพบว่า ในกลุ่มของลูกน้ำยุงที่แช่ใน calcofluor มีค่า protein score สูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 2 เท่า

ระดับการ expression ของ chitinase ของยุงลายเมื่อสัมผัส calcofluor

เพื่อศึกษาปริมาณการ expression ของ chitinase ของลูกน้ำยุงลายกลุ่มที่แช่ใน calcofluor และกลุ่มควบคุม qRT-PCR ถูกนำมาใช้ในการหาระดับของ transcription ของ chitinase ในลูกน้ำยุง ผลพบว่าระดับการ expression ของ chitinase ในลูกน้ำยุงลายในกลุ่มที่ treat ด้วย calcofluor สูงกว่ากลุ่มควบคุม 1.25 เท่า อย่างไรก็ตาม chitinase mRNA ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.01$) (ภาพที่ 8)

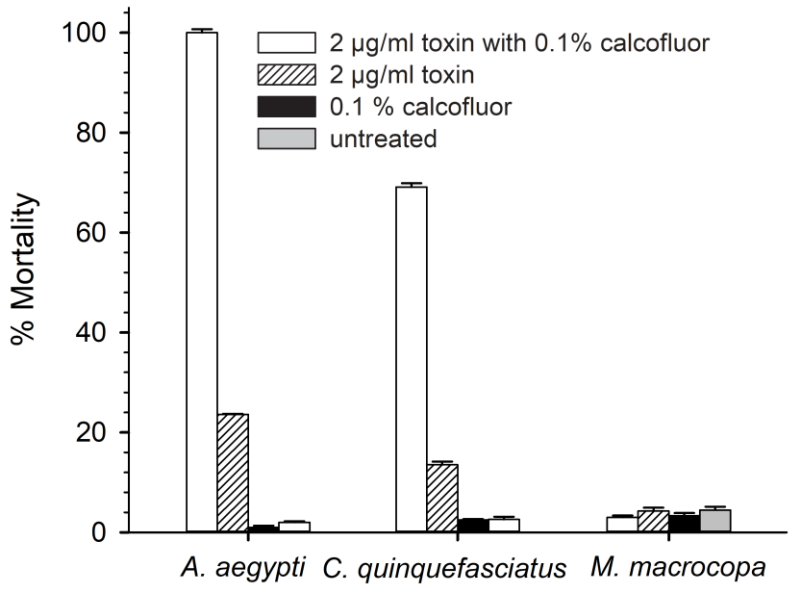


ภาพที่ 5 ภาพ topographies ของลูกน้ำยุงลายที่แช่หรือไม่แช่สารละลาย calcofluor

(a) แยก PM ออกจากลูกน้ำกลุ่มควบคุม กลุ่มแช่ calcofluor กลุ่มกิน Cry4Ba และกลุ่มทั้งแช่ calcofluor และกิน Cry4Ba และวิเคราะห์ด้วย SEM

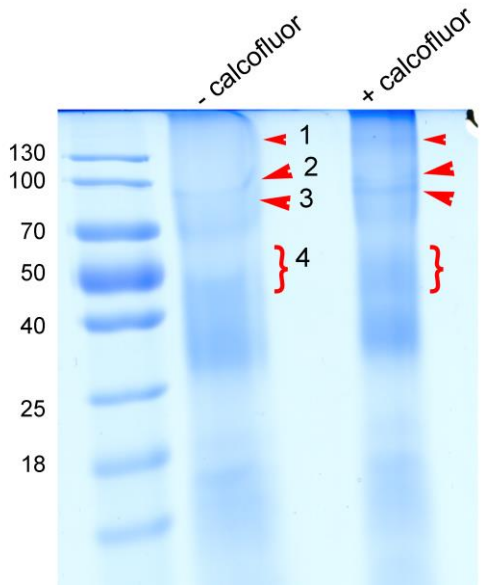
(b) sections ของเนื้อเยื่อกระเพาะที่ถูก treat แบบเดียวกัน แล้วย้อมด้วย H&E และวิเคราะห์ใต้กล้องจุลทรรศน์

ลูกศรชี้ microvilli ของกระเพาะลูกน้ำยุงลาย หัวลูกศรชี้ PM หลังจากย้อมด้วย H&E



ภาพที่ 6 ความเป็นพิษของ Cry4Ba ต่อลูกน้ำยุงลาย ยุงรำคาญ และไรน้ำ ในขณะที่มีหรือไม่มี calcofluor

ให้โปรตีน Cry4Ba อย่างเดียว หรือ calcofluor อย่างเดียว หรือ ร่วมกันทั้งสองอย่าง กับลูกน้ำยุงแล้วตรวจเปอร์เซ็นต์การตายหลังจาก 24 ชั่วโมงโดยเทียบกับกลุ่มควบคุม



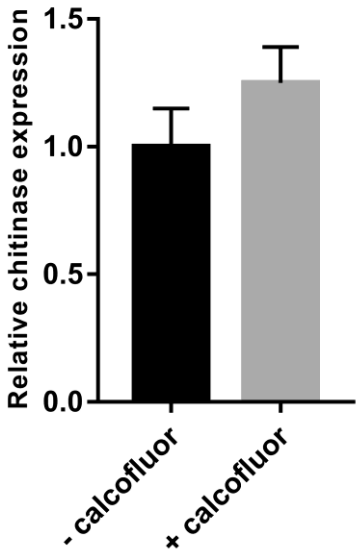
ภาพที่ 7 protein profiles ของ PM ที่ได้รับและไม่ได้รับสาร calcofluor

แช่ลูกน้ำในสารละลาย 0.1% calcofluor เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยก PM ออกจากลูกน้ำยุงลายนำใส่ใน 2x Laemmli sample buffer นำมาวิเคราะห์บน 10% gel SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie blue โดยเทียบกับกลุ่ม control แถบโปรตีนที่แตกต่างกันในสองกลุ่มถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วย mass spectroscopy

ลูกศรแดง แสดงแถบโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม

ตารางที่ 1 แสดงโปรตีนจาก PM ของลูกน้ำยุงที่ treat ด้วย calcofluor และวิเคราะห์ด้วย ESI-QUAD-TOF

Accession	Description	Scores (%)	Sequence coverage/ Identity (%)
PM proteins of calcofluor-treated larvae			
XP_001653248.2	probable chitinase 10	68	100/100
XP_001651644.2	transcription factor SOX-3	28	100/100
XP_001648667.1	thioredoxin-related transmembrane protein 1 isoform X1	26	100/100
XP_001657247.2	hexamerin-1.1	22	78/86
XP_021697332.1	arginine kinase isoform X1	22	100/100
PM proteins of non-treated larvae			
XP_021704129.1	dynein heavy chain 3, axonemal isoform X1	30	83/100
XP_001653248.2	probable chitinase 10	26	100/100
XP_001653662.2	spermine oxidase	26	100/89
XP_021706153.1	protein msta isoform X1	24	93/57
XP_021702999.1	protein Wnt-1	22	100/91
XP_021707687.1	transcription elongation factor SPT6 isoform X1	21	91/100



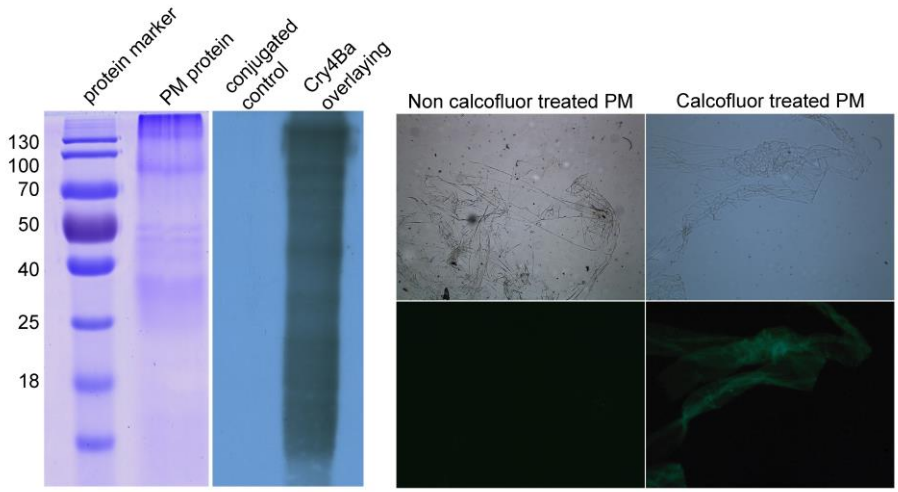
ภาพที่ 8 ผลของ calcofluor ที่มีต่อ expression level ของโปรตีน chitinase

ไม่พบโปรตีนจาก PM ของลูกน้ำยุงที่มีนัยสำคัญในการเป็นคู่จับจำเพาะของ Cry4Ba

ผล pull-down assay สำหรับหาโปรตีนคู่จับจำเพาะจาก PM ของ Cry4Ba พบโปรตีนที่คาดว่าเป็นคู่จับประมาณ 4 โปรตีน โดยมีขนาดอยู่ในช่วง 30-80 kDa จากการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี mass analysis เพื่อยืนยันชนิดของโปรตีนผลปรากฏว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่วิเคราะห์ได้คือ trypsin

Cry4Ba จับกับโปรตีน PM อย่างไม่จำเพาะ

การหาคู่จับจำเพาะโปรตีนของ PM และโปรตีน Cry4Ba วิธี toxin overlaying assay ถูกนำมาใช้ในการหาคู่จับดังกล่าว ผลปรากฏว่าโปรตีน Cry4Ba สามารถจับกับโปรตีนของ PM บน nitrocellulose membrane อย่างไม่จำเพาะเจาะจง กล่าวคือ Cry4Ba สามารถจับได้กับโปรตีน PM ขนาด 25 kDa ไปจนถึง 130 kDa (ภาพที่ 9 ซ้าย) เพื่อเป็นการยืนยันความไม่จำเพาะนี้ direct toxin binding assay กับ PM ของลูกน้ำยุงถูกนำมาใช้ในการศึกษา จากการยืนยันจากภาพที่ได้จากการถ่ายใต้กล้อง fluorescence microscope พบ signal ของ Cry4Ba ได้ทั่วไปบนพื้นผิวของ PM (ภาพที่ 9 ขวา)



ภาพที่ 10 การจับกันระหว่างโปรตีน Cry4ba และโปรตีนบน PM

ภาพซ้าย Western blot analysis ของโปรตีนบน PM ที่สามารถจับได้กับโปรตีน Cry4Ba ซึ่งติดตามด้วยวิธีอิมมูนโนโดยใช้ mouse anti-Cry4Ba (1:1000) และ HRP-linked anti-mouse immunoglobulin (1:6000) ดู signal ด้วย chemiluminescence

ภาพขวา toxin overlaying assay ของ PM ของลูกน้ำยุงลาย PM ถูกแยกออกจากกระเพาะลูกน้ำยุงและถูก overlay ด้วย 1 µg Cry4Ba ซึ่งถูกติดตาม specific antibody ต่อ Cry4Ba และ FITC-linked anti-mouse immunoglobulin และดูผลใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence

บทวิจารณ์

PM ของแมลงประกอบด้วยโปรตีน proteoglycans และ chitin network ซึ่งใช้ปกป้องกระเพาะอาหารจากสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น อนุภาคของอาหาร เท่ากันกับใช้เป็นส่วนที่คัดกรองสารอาหารส่งผ่านน้ำย่อยเข้าในกระเพาะอาหารและสารละลายอื่น ๆ (Terra W.R., 2001) เมื่อให้โปรตีนสารพิษ Cry4Ba กับลูกน้ำยุงลาย โปรตีนจะค่อย ๆ ปลดปล่อยความเป็นพิษแก่ลูกน้ำยุงลายอย่างรวดเร็วภายในเวลา 3 ชั่วโมง และจะค่อย ๆ ช้าลงเมื่อเวลา 6 ชั่วโมงไปแล้วหลังจากการกิน ในการวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า Cry1Ac และ Cry4Ba สามารถจับได้กับ PM ของตัวอ่อนแมลง (Rees et al., 2009, Leetachewa et al., 2014) การ form complex ของ Cry4Ba-PM อาจกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองขั้นถัดไปของหรืออาจเกิด signaling transduction ซึ่งเคยถูกเสนอไว้ในรายงานเรื่องกลไกการเข้าทำลายของ Cry toxin (Zang et al., 2005, Jurat-Fuentes & Adang, 2006) ซึ่งจะทำให้เกิดการยืดระยะเวลาความเป็นพิษออกไป สำหรับ Cry4Ba ซึ่งได้แสดงให้เห็นก่อนหน้านี้ว่าสามารถเปลี่ยนความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ PM ที่จะคอยส่งผ่านโปรตีนสารพิษนี้เข้าไปสู่เซลล์กระเพาะอาหารลูกน้ำยุงลาย (Leetachewa et al., 2014) ในแง่มุมอื่น การยืดระยะเวลาความเป็นพิษของโปรตีนออกไปอาจถูกกำหนดโดยระดับความสามารถของ PM เองในการที่จะชะลอความเป็นพิษของ Cry4Ba ออกไป การทำลายโครงสร้างของ PM และองค์ประกอบที่อยู่บน PM ด้วยเอนไซม์ chitinase (Rao et at., 2004) และ bel protein ที่สร้างจาก Bt นั้นพบว่าช่วยส่งเสริมความเป็นพิษให้แก่ Cry1A ที่มีต่อหนอนศัตรูพืช ในการวิจัยครั้งนี้ เมื่อใช้ calcofluor เป็นตัวช่วยเสริมฤทธิ์ของ Cry4Ba ให้เพิ่มมากขึ้นถึง 50 เท่า จากการที่ไปลดค่า LC_{90} ผลการทดลองนี้ไปด้วยกันกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ calcofluor มีผลในเชิงบวกกับ Cry1Ca ซึ่งเป็นพิษกับหนอนกระหล่ำใหญ่ *Mamestra brassicae* (Rees et al., 2009) และการ infect ของ baculovirus ในหนอนคืบกระหล่ำ *Trichoplusia ni* (Wang & Granados, 2000, Martinez & Caballero, 2004, Zhu et al., 2007) การตายของลูกน้ำยุงลายมีมากถึง 60% และ 90% เมื่อให้ Cry4Ba ร่วมกับ calcofluor ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น LC_{90} ของ Cry4Ba ผลนี้ยังบอกถึงระดับการจับของ calcofluor บน PM ซึ่งสามารถทำให้ลูกน้ำตายได้ในเวลา 3 ชั่วโมง ในการสัมผัส calcofluor ชั่วคราวอย่างน้อย 15 นาทีก่อนที่จะได้รับโปรตีน Cry4Ba ก็เพียงพอที่จะเพิ่มความเป็นพิษให้ Cry4Ba อย่างไรก็ตามการสัมผัส calcofluor อย่างต่อเนื่องอาจทำให้ความเป็นพิษสูงกว่า ซึ่งเป็นไปได้ว่า calcofluor อาจจับกับ PM แบบกึ่งไม่ย้อนกลับ ในรายงานก่อนหน้านี้ PM ของหนอนผีเสื้อถูกทำลายและแตกออกเป็นชิ้นด้วยการ treat ด้วย calcofluor และกลับคืนสู่สภาพปกติเมื่อย้ายออกจากการสัมผัส (Wang & Granados, 2000, Rees et al., 2009) แม้ว่าปริมาณของ calcofluor และเวลาในการสัมผัสจะน้อยกว่าที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้กับหนอนผีเสื้อ จึงเป็นประเด็นที่ต้องทำการศึกษาต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้บอกถึงขบวนการทาง thermodynamic ของ calcofluor ที่มีต่อตัวอ่อนแมลงกลุ่ม dipteran ว่าแตกต่างจากพวกหนอนผีเสื้อ นอกจากการเพิ่มประสิทธิภาพของความเป็นพิษแล้วการใช้ calcofluor ร่วมกับ Cry1Ac หรือ Cry1Ca พบว่ายับยั้งความเป็นพิษต่อหนอนยาสูบ *Manduca sexta* (Rees et al., 2009) ในองค์ประกอบของ PM ซึ่งมี โปรตีนและ glycoproteins ฝังอยู่ที่ chitin network (37 38) อย่างไรก็ตามสัดส่วนของโปรตีนและ chitin ต่างกันไปตามชนิดของแมลง ดังนั้นความแตกต่างในเรื่องโครงสร้างของ PM เท่า ๆ กันกับด้านกลไกการเข้าทำลายแมลงของ Cry toxin ที่ทำให้ระดับของ calcofluor ที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ Cry toxin นั้นแตกต่างกัน.

กรดอะมิโน E417 และ Y455 ใน Cry4Ba ส่วน domain II ถูกเสนอว่าเกี่ยวข้องกับการจับของ BBMV ในกระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงลาย ขณะที่ R158 ซึ่งอยู่ใน domain I รับผิดชอบในการสอดแทรกโมเลกุลของ Cry4Ba เข้าในผิวเซลล์ (Khaokhiew et al., 2009, Leetachewa et al., 2014) เทียบกับ

Cry4Ba-wildtype ตัวโปรตีนกลายพันธุ์ EY มีข้อบกพร่องในการทำให้ PM สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านทำให้เกือบจะเสียความสามารถในความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย แต่เมื่อให้ EY ร่วมกับ calcofluor กลับสามารถทำให้ความเป็นพิษกลับคืนมาได้ ซึ่งเห็นได้จากการที่มีการเรืองแสงของอนุภาค dextran ที่ลูกน้ำยุงกินเข้าไปรั่วออกนอนกระเพาะอาหาร ดังนั้นผลการทดลองขณะนี้บอกถึงหน้าที่อื่นที่เพิ่มขึ้นมาของ E417 และ Y455 ของ Cry4Ba ในการทำให้ PM สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน

ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเพิ่มความเป็นพิษของ calcofluor จากการที่สัณฐานวิทยาของ PM เปลี่ยนแปลงไป แค่การให้ calcofluor อย่างเดียวกับลูกน้ำยุงก็สามารถทำให้ chitin network เริ่ม degenerate การทดสอบนี้ตรงกันกับการทดลองกับหนอนผีเสื้อที่ว่า PM เสียสภาพหลังจาก incubate ร่วมกับ calcofluor รูปแบบที่สมบูรณ์ของ PM ดูได้จากการที่มี electron-dense knots และ streak เชื่อมต่อกันกับส่วนที่เป็น electron-lucent สานกันเป็นตาข่ายคล้ายรวงผึ้ง (Peters, 1979) ส่วนของ electron-dense (เส้นหนาในภาพของ SEM) มีส่วนประกอบของ proteoglycan ขณะที่ส่วน electron-lucent เชื่อว่าเป็นส่วนของ chitin microfibrils (Richards & Richards, 1971) ภาพจากกล้อง SEM แสดงให้เห็นว่า PM ที่สัมผัส calcofluor ถูกทำลายในบริเวณที่เป็นชั้นบาง (electron-lucent) การถูกทำลายที่รุนแรงขึ้นเกิดกับ treatment ที่มี Cry4Ba ร่วมอยู่ด้วย รายงานนี้นับเป็นครั้งแรกที่บอกให้ทราบว่า calcofluor สามารถทำลาย chitin fibril ของ PM ลูกน้ำยุงลาย เนื่องจากการจับกันอย่างจำเพาะของ calcofluor กับ cellulose และ chitin การจับนี้อาจช่วยส่งเสริมให้ chitin fibril ถูกย่อยโดย chitinase ในกระเพาะอาหารหรือทำให้โมเลกุลของ peritrophin ย้ายตำแหน่ง หรืออาจเป็นจากองค์ประกอบอื่น ๆ ของ chitin-binding proteins ก็ได้ อีกประการที่สำคัญการสัมผัส calcofluor ช่วยกระตุ้นให้ลูกน้ำยุงลายสร้าง chitinase มากขึ้นแม้จะไม่มากนักก็ตาม ด้วยเหตุนี้อาจนำไปสู่การเพิ่มความสามารถในการส่งผ่าน Cry4Ba ขณะที่ Cry4Ba ก็สามารถก่อให้เกิดการเสียหายต่อ PM และเซลล์กระเพาะอาหาร และช่วยเหลือให้ลูกน้ำยุงตายในที่สุด

ข้อดีของ Cry toxin คือมีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของแมลงที่แน่นอนอย่างเช่นที่ Cry4Ba มีความจำเพาะต่อลูกน้ำยุงลายและยุงก้นปล่อง และสามารถฆ่ายุงรำคาญได้บางส่วน ในงานวิจัยก่อนนี้พบว่า D454 ที่อยู่บน ß10-ß11 loop ของ Cry4Ba domain II ด้วยการสลับประจุจากลบเป็นบวก โดยเปลี่ยนเป็น K หรือ R พบว่าทำให้ Cry4Ba สามารถฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญได้ดีขึ้น (Visitsattapongse et al., 2014) ในการทดลองครั้งนี้การให้ลูกน้ำยุงรำคาญกิน Cry4Ba ร่วมกับ calcofluor ทำให้การเข้าทำลายของ Cry4Ba ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่าการให้ Cry4Ba อย่างเดียว อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของ Cry4Ba ที่มีต่อลูกน้ำยุงรำคาญค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับลูกน้ำยุงลาย มีการค้นพบว่าส่วน electron-dense ในด้าน lumen ของ PM ของลูกน้ำยุง *Culex pipiens* มีการทำลายอย่างไม่ต่อเนื่องด้วยการพบรูที่พื้นผิวขณะที่ในลูกน้ำยุงลายเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องคือมีรอยแยกอย่างชัดเจน แม้ว่าส่วนของ electron-lucent ของ *Culex pipiens* จะมีการจัดเรียงตัวเป็นเหลี่ยมมุมคล้ายกับยุงลายแต่ก็มีขนาดที่มากกว่าที่พบในยุงลายมากนัก ความแตกต่างที่พบได้จากการมองภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนอาจส่งผลให้ลูกน้ำยุงลายอ่อนแอต่อ Cry4Ba มากกว่ายุงรำคาญได้ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจพบ binding protein บน PM ที่จำเพาะต่อ Cry4Ba ซึ่งสนับสนุนข้อมูลเก่าว่าตัวจับจำเพาะของ Cry4Ba อยู่ที่ผิวของเซลล์กระเพาะอาหาร ในการเพิ่มความเป็นพิษให้กับ Cry4Ba ของ calcofluor นั้น ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ที่อยู่ในน้ำ อย่างเช่น ไรน้ำ (*Moina macrocopa*) ซึ่งจัดเป็น zooplankton ที่เป็น food chain ขั้นพื้นฐานในระบบนิเวศวิทยา (Sarma et al., 2006, Engert et al., 2013, Suhett et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีพิษต่ำต่อ ปลา สัตว์เลือดอุ่น และมนุษย์ ทั้งยังไม่พบว่าเป็นสารก่อมะเร็งหรือสารก่อการกลายพันธุ์ในมนุษย์ (Miller et al., 2004)

บทสรุป

calcofluor สามารถทำหน้าที่ในการเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นพิษของ Cry4Ba ที่มีต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ ผลการทดลองนี้ทำให้สามารถลดปริมาณของการใช้ Cry4Ba ลงได้มากรวมทั้งระยะเวลาการสัมผัสที่ลดลงอาจส่งผลให้ปัญหาที่ว่า Cry toxin ไม่สามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นานนักอีกทั้งสารนี้ไม่ปรากฏว่ามีอันตรายต่อไรน้ำซึ่งไม่ใช่สัตว์เป้าหมายของโปรตีนสารพิษ Cry4Ba ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้อาจมีส่วนช่วยให้เกิดการพัฒนาการประยุกต์ใช้ Cry4Ba ร่วมกันกับ calcofluor ในการใช้เป็นสารชีวภาพในการกำจัดลูกน้ำยุงที่เป็นพาหะนำโรคในอนาคต

References

1. Angsuthanasombat C., Uawithya P., Leetachewa S., Pornwiroon W., Ounjai P., Kerdcharoen T., Katzenmeier G.R., Panyim S., 2004, J Biochem Mol Biol, 37, 304
2. Edwards M.J., Jacobs-Lorena M., 2000, J Insect Physiol, 46, 1313
3. Engert A., et al., 2013, Chemosphere, 90, 2136
4. Fang S., Wang L., Guo W., Zhang X., Peng D., Luo C., Yu Z., Sun M., 2009, Appl Environ Microbiol, 75, 5237
5. Hernandez-Rodriguez C.S., Van Vliet A., Bautsoens N., Van Rie J., Ferre J., 2008, Appl Environ Microbiol, 74, 7654
6. Hofte H., et al., 1986, Eur J Biochem / FEBS, 161, 273
7. Hu S.B., Liu P., Ding X.Z., Yan L., Sun Y.J., Zhang Y.M., Li W.P., Xia L.Q., 2009, Appl Microbiol Biotechnol, 82, 1157
8. Jurat-Fuentes J.L., Adang M.J., 2006, 92, 166
9. Khaokhiew T., Angsuthanasombat C., Promptmas C., 2009, FEMS Microbiol Lett, 300 139
10. Kingsbury J.M., Heitman J., Pinnell S.R., 2012, PloS one, 7, e39405
11. Knowles B.H., 1994, in: Evans P.D. ed., Advances in Insect Physiology. Academic Press, p. 275
12. Leetachewa S., Moonsom S., Chaisri U., Khomkhum N., Yoonim N., Wang P., Angsuthanasombat C., 2014, BMB reports,47, 546
13. Martinez A.M., et al., 2004, J Econ Entomol, 97, 1202
14. Miller V., Sasala K., Hogan M., 2004, Silver Spring: Institute of Medicine, the National Academies
15. Moonsom S., 2007, Doctor of Philosophy, Mahidol University
16. Peters W., 1979, Entomol Gen, 5, 289
17. Peters W., 1992, in: Bradshaw S.D., et al. ed., Zoophysiology. New York Springer
18. Rao R., et al., 2004, Insect Biochem Mol Biol, 34, 1205
19. Rees J.S., Jarrett P., Ellar D.J., 2009, J Invert Pathol, 100, 139
20. Rottmann R.W., et al., 2017, https//edis.ifas.ufl.edu/fa024
21. Richards A.G., Richards P.A., 1977, Annu Rev Entomol, 22, 219
22. Sarma S.S., Nandini S., 2006, J Environ Sci Health B, 41, 1417
23. Suhett A.L. et al., 2015, Acta Limnol Brasiliensia, 27, 145
24. Tellam R.L., Wijffels G., Willadsen P., 1999, Insect Biochem Mol Biol, 29, 87
25. Terra W.R., 2001, Arch Insect Biochem Physiol, 47, 47
26. Tetreau G., Alessi M., Veyrenc S., Perigon S., David J.P., Reynaud S., Despres L., 2012, Appl Environ Microbiol, 78, 8362
27. The Center for Research Information I., 2004. Silver Spring, MD,
28. Wisitsattapongse S., Sakdee S., Leetachewa S., Angsuthanasombat C., 2014, Biochem Biophys Res Commun, 450, 948
29. Wang P., Granados R.R., 2000, Insect Biochem Mol Biol, 30, 135
30. Whalon M.E., Wingerd B.A., 2003, Arch Insect Biochem Physiol, 54, 200
31. Zang X., et al., 2005, Cell Death Differ, 12, 1407
32. Zhang C., Xia L., Ding X., Huang F., Li H., Sun Y., Yin J., 2011, Curr Microbiol, 62, 968
33. Zhang W., et al., 2012, J Invert Pathol, 109, 217
34. Zhu R., Liu K., Peng J., Yang H., Hong H., 2007, Pest Manag Sci, 63, 296

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

   Somphob Leetachewa, Narumol Khomkhum, Somsri Sakdee, Ping Wang and Saengduen Moonsom. Enhancement of insect susceptibility and larvicidal efficacy of Cry4Ba toxin by calcofluor. Parasites & Vectors (2018) 11:515

   สถานะ: ตีพิมพ์แล้ว

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

   - เชิงวิชาการ

     มีการพัฒนาการเรียนการสอนโดย Prof. Matthew Rouhier, Department of Chemistry, 200 N. College Rd., Gambier, Ohio, 43022. USA. ได้ขออนุญาตนำผลงานตีพิมพ์ไปใช้ประโยชน์ในการเรียนการสอนรายวิชา CHEM371, Advanced Biochemistry Laboratory โดยมีการทำสัญญาส่งตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มี gene สำหรับผลิตโปรตีนสารพิษ Cry4Ba

ภาคผนวก

Leetachewa et al. Parasites & Vectors (2018) 11:515
https://doi.org/10.1186/s13071-018-3110-3

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Enhancement of insect susceptibility and larvicidal efficacy of Cry4Ba toxin by calcofluor

Somphob Leetachewa[1], Narumol Khomkhum[2], Somsri Sakdee[1], Ping Wang[3] and Saengduen Moonsom[2*]

Abstract

Background: Mosquitoes transmit many vector-borne infectious diseases including malaria, dengue, chikungunya, yellow fever, filariasis, and Japanese encephalitis. The insecticidal δ-endotoxins Cry4, Cry11, and Cyt produced from *Bacillus thuringiensis* have been used for bio-control of mosquito larvae. Cry δ-endotoxins are synthesised as inactive protoxins in the form of crystalline inclusions in which they are processed to active toxins in larval midgut lumen. Previously, we demonstrated that the activated Cry4Ba toxin has to alter the permeability of the peritrophic membrane (PM), allowing toxin passage across PM to reach specific receptors on microvilli of larval midgut epithelial cells, where the toxin undergoes conformational changes, followed by membrane insertion and pore formation, resulting in larval death. A peritrophic membrane (PM)-binding calcofluor has been proposed to inhibit chitin formation and enhance baculovirus infection of lepidopteran *Trichoplusia ni*.

Methods: In this study, *Aedes aegypti* larvae were fed with the calcofluor and Cry4Ba toxin to investigate the effect of this agent on the toxicity of the Cry4Ba toxin.

Results: Calcofluor displayed an enhancing effect when co-fed with the Cry4Ba wild-type toxin. The agent could restore the killing activity of the partially active Cry4Ba mutant E417A/Y455A toward *Ae. aegypti* larvae. PM destruction was observed after larval challenge with calcofluor together with the toxin. Interestingly, calcofluor increased Cry4Ba toxin susceptibility toward semi-susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. However, calcofluor alone or in combination with the toxin showed no mortality effect on non-susceptible fresh-water fleas, *Moina macrocopa*.

Conclusions: Our results suggest that PM may contribute to the resistance of the mosquito larvae to Cry4Ba toxin. The PM-permeability alternating calcofluor might be a promising candidate for enhancing insect susceptibility, which will consequently improve Cry4Ba efficacy in field settings in the future.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Calcofluor, Peritrophic membrane, Permeability, Insect susceptibility

Background

Cry toxins have been used worldwide as bio-insecticide and genetically modified crops because of their environment-friendly properties and killing specificity toward a narrow spectrum of insect larvae. For example, Cry1A and Cry2A are toxic to lepidopterans, Cry3 is noxious to coleopterans, whereas Cry4 and Cry11 are specifically lethal to *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae in the family Culicidae [1]. These toxins are produced as parasporal inclusions of 130-kDa protoxins in *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria. The protoxins are processed by midgut proteases of insect larvae, resulting in active toxins [2, 3]. The active toxins, comprising of three structural domains, pass through the peritrophic membrane (PM), bind to their receptor on the midgut epithelial cell membranes of susceptible insect *via* domain II, oligomerize, and insert domain I into the membrane to create lytic pores, resulting in death of insect larvae by osmotic cell lysis [4–6].

Due to increased planting of Bt transgenic crops around the world [7], insect resistance to Cry toxins has increased, leading to insufficient toxicity of the Cry

* Correspondence: saengduen.moo@mahidol.ac.th
[2]Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Ratchadewee, Bangkok 10400, Thailand
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

toxins in the field [8, 9]. Attempts to improve the efficacy of the Cry toxins have been made by toxin combination, genetic modification, and protein engineering [10, 11]. Mutagenesis in the receptor binding domains of Cry1Ab and Cry3A has resulted in significant increase in their toxicities toward lepidopteran and coleopteran insect larvae [12, 13]. Attempts to enhance the toxicity of Cry toxins by focusing on the insect host have been investigated in several insect species. For instance, the introduction of Cry1Ab together with a fragment of the cadherin receptor, CR12-MPED peptide, was found to improve Cry1Ab toxicity toward tobacco hornworm larvae, *Maduca sexta* [14]. Likewise, a 28-kDa APN fragment, AgAPN2tb, showed significant enhancement effect on Cry11Ba toxicity to *Anopheles gambiae* [15].

The PM lining between the midgut epithelial membrane and lumen serves as a protective barrier of the insect larvae from invaders such as bacteria and viruses [16, 17]. Chitin, the major PM component, is secreted by midgut cells to form fibre networks linked by PM proteins secreted from microapocrines [18–20]. Pathogens able to overcome protection of the PM barrier or digest the PM proteins were found to invade the insect hosts successfully. For instance, *Plasmodium gallinaceum* ookinetes produce chitinase enzymes to penetrate the PM to infect midgut cell membrane of *Ae. aegypti* [21]. Combinational treatment of Cry1C toxin and *Serratia marcescens* endochitinase was reported to enhance the activity of the toxin toward *Spodoptera littoralis* larvae [22]. Constitutive expression of chitinase in the Cry1AC producing Bt cells showed an enhancing effect of the Cry1Ac insecticidal activity toward *Sp. exigua* and *Helicoverpa armigera* larvae [23]. The brightening agent, calcofluor, has been utilized for solubilization of proteins from PMs [24]. This chemical has also been shown to inhibit chitin formation and is proposed as an anti-fungal agent [25, 26]. *In vivo*, calcofluor was found to enhance baculovirus infection in *T. ni* [24]. However, there was no synergistic effect of calcofluor on the biological activity of Cry1Ac toward susceptible lepidopteran larvae [27].

We previously reported that PM permeability alteration by Cry4Ba was required for toxin passage across PM of *Ae. aegypti* larvae [28]. Here, we report the enhancing effect of PM solubilizing agent, calcofluor, on Cry4Ba efficacy toward larvae of the susceptible *Ae. aegypti* and the semi-susceptible *Cx. quinquefasciatus*. Our results demonstrated that calcofluor not only increased PM permeability to Cry4Ba toxin but also altered the gross morphology of the PM. However, no mortality effect was observed when calcofluor was tested against non-susceptible insect, water fleas (*Moina macrocopa*). Thus, PM-permeability alteration capability appears to be a critical factor for Cry4Ba toxicity, and calcofluor could be a potential agent to improve the efficacy of Cry4Ba toxin for bio-control of mosquito larvae, which in turn aids to the prevention of vector-borne diseases in the future.

Methods

Cry4Ba larvicidal activity assays

Cry4Ba was expressed as previously described [29]. Toxin inclusions were harvested from *Escherichia coli* expressing Cry4Ba. The inclusions were washed, protein concentrations were determined using Bradford's assays and confirmed by 12%-gel sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The larvicidal activity was determined by feeding fourth-instar larvae of *Ae. aegypti* or *Cx. quinquefasciatus* with 0.125–200 μg/ml of wild-type or mutant Cry4B-toxin inclusions alone or together with 0.1% calcofluor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The assay was performed in a 6-well flat bottom plate containing 25 larvae per well, with 100 larvae/assay. The mortality was recorded after a 24 h incubation period at 25 °C. Larvicidal activity of Cry4Ba was represented as either percent mortality or 50% (LC_{50}) and 90% (LC_{90}) lethal concentrations. The LC_{50} and LC_{90} were estimated by Probit analysis [30].

To determine the minimum exposure time of calcofluor that caused 90% mortality, the fourth-instar larvae of *Ae. aegypti* were pre-incubated with 0.1% calcofluor for 0.25 h, 0.5 h, 1 h, 1.5 h and 2 h. After pre-incubation, the solution was replaced by the toxin solution at LC_{90}. Larval death was recorded after 24 h of toxin incubation. Likewise, the minimal incubation time for LC_{90} toxin after larval pre-treatment with calcofluor was also examined. Larvae were incubated with 0.1% calcofluor for 2 h, and then the solution was replaced with the toxin at LC_{90}. Larval mortality was recorded at 3 h, 4 h, 6 h and 12 h after toxin incubation. All of the biological assays were performed in triplicates.

Toxicity testing of calcofluor and Cry4Ba toxin with *M. macrocopa*

Moina macrocopa were reared in the laboratory using the modified batch method as described elsewhere [31]. In brief, 30 neonate *M. macrocopa*, which are less than 24 hours-old, were put in an aquarium tank (20 × 15 × 15 cm) containing 3 l of aged tap water. The water fleas were fed with algae suspension (*Chlorella vulgaris*) of 2×10^7 cells per 1 l of water every 48 h. The culture was carried out at room temperature (25 ± 1 °C) with a 16 h photoperiod and gentle aeration of the oxygenated pool water in climatic chamber conditions.

To determine the toxicity of Cry4Ba, the water fleas were tested with 0.1% calcofluor, LC_{90} of Cry4Ba, or in a combination of 0.1% calcofluor and Cry4Ba at LC_{90} in aged tap water containing algae suspension at the same condition as the culture, and compared to untreated

fleas. One hundred fleas were used for each condition in a 100 ml beaker containing 50 ml of the treatment solution. The experiment was performed in triplicate and percent mortality was recorded after 24 h.

PM permeability and immunohistochemistry assays of toxin fed larvae

The fourth-instar larvae of *Ae. aegypti* were fed with 2000 kDa FITC-dextran particles alone or together with wild-type or mutant Cry4Ba toxins at their LC_{90} for 1 h. The PM-permeability alteration by the toxin was measured and indicated by the appearance of 2000 kDa FITC-dextrans, the PM impermeable particles, outside the gut lumen of mosquito larvae, and observed under the fluorescent microscope [28, 32]. To observe the effect of calcofluor on PM permeability, the experiment was performed in the presence of 0.1% calcofluor. Results were analyzed using Student's t-test and *P*-values less than 0.05 were considered significant.

To determine the binding ability of the mutant toxin, larvae were fed with wild-type or mutant Cry4Ba at LC_{90} for 1 h. Immunohistochemistry assay was performed using HRP-labeled anti-Cry4Ba monoclonal antibody. Colourimetric detection observed signal with 3,3′-diaminobenzidine (DAB) substrate, following manufacturer's instructions (Sigma Aldrich). The pictures were recorded using a light microscope.

Hematoxylin and eosin staining of the *Ae. aegypti* larval gut

Larvae were pre-treated with 0.1% calcofluor for 2 h followed by incubation with LC_{90} of the toxin for 1 h. Head and eighth segment were removed from larvae. The dissected larvae were fixed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde and 4% sucrose for 1 h, and then placed in 4% paraformaldehyde solution containing 10% sucrose overnight at 4 °C. Next, larvae were incubated in a series of ethanol at room temperature for 20 min each; 30%, 50%, 70%, 95%, and twice in absolute ethanol. The section was placed twice in xylene solution for 30 min/each and incubated twice in xylene-paraffin (1:1 v/v) for 1 h/each, before being changed to 100% paraffin (2 × 1 h). The paraffinized section was horizontally sliced, embedded onto a glass slide, and incubated at 37 °C overnight. The tissue slide was rehydrated in PBS for 30 min, before staining with hematoxylin and eosin. The tissue section was washed with PBS 3 times (30 min each). The whole gut and the peritrophic membrane were observed and imaged using a light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) or fluorescent microscopes (Carl Zeiss, Jena, Germany). Larvae fed with toxin alone and of the untreated larvae were used as positive and negative controls, respectively.

Determination of larval PM structure using scanning electron microscopy (SEM)

Aedes aegypti larvae were fed for 1 h with 0.1% calcofluor alone, LC_{90} of Cry4Ba inclusions, and the combination of toxin and calcofluor. Fifty of the dissected PMs were washed in distilled water. The PMs were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing 5% glucose (fixing solution) at 4 °C for 2 h. After three washes (10 min each) in fixing solution, the PM samples were dehydrated in a series of ethanol concentrations and finally dried by a critical point drying using Hitachi HCP-2 dryer (Hitachi Koki, Ibaraki, Japan). The dried samples were mounted onto the aluminium stubs, coated with gold particles using an ion coater (K 500, Emitech Ltd., England), and observed at 10 kV on the electron microscopy (JSM-6610LV, JELO Ltd., Japan).

Results

Calcofluor reduced the lethal concentrations and exposure time of wild-type Cry4Ba toxin

The effect of calcofluor on Cry4Ba toxicity was determined by feeding the fourth-instar larvae of *Ae. aegypti* with Cry4Ba-toxin inclusions alone or in combination with calcofluor for 24 h. Compared to those without calcofluor, the co-feeding of wild-type toxin with calcofluor reduced toxin concentrations needed for LC_{50} by 6 folds (from 6.27 ± 0.66 μg/ml to 0.29 ± 0.03 μg/ml) and concentration required for LC_{90} by 50 folds (from 57.71 ± 11.63 μg/ml to 1.78 ± 0.24 μg/ml), respectively. The effect of calcofluor was further determined as the function of time by feeding the larvae with calcofluor and Cry4Ba-toxin inclusions at *c.*2 μg/ml or toxin alone at ca. 60 μg/ml according to the LC_{90} of calcofluor-treated and untreated conditions in Fig. 1a. Larvae fed with toxin alone for 3 h, 4 h, 6 h and 12 h demonstrated mortality as mean ± SD of 6.7 ± 2.5%, 48.2 ± 4.6%, 77.2 ± 8.5% and 79.2 ± 7.3%, and nearly 90% after 24 h, respectively (Fig. 1b, dashed line). By co-feeding with 0.1% calcofluor, larval mortality was 61.0 ± 8.4% within 3 h, increased sharply to 82.0 ± 6.6% and 90.3 ± 6.6% after 4 h and 6 h, respectively, and gradually rose to 99.5 ± 0.5% within 12 h (Fig. 1b, solid line). Larvae were pre-challenged with calcofluor at various time points before the toxin feeding at LC_{90}. Larvae pre-challenged with calcofluor for 0.25 h, 0.5 h, 1 h, 1.5 h and 2 h, showed mortality of 41.6 ± 8.2%, 56.0 ± 8.0%, 70.4 ± 2.0%, 84.0 ± 4.4% and 94.4 ± 4.1% after 24 h of toxin feeding, respectively (Fig. 1c). Larvae pre-challenged with calcofluor for 2 h and then fed with LC_{90} of Cry4Ba for 3 h, 6 h and 12 h showed mortality of 16.0 ± 3.0%, 54.0 ± 6.6% and 90.0 ± 6.6%, respectively (Fig. 1d). Enhancement of Cry4Ba toxicity by calcofluor was investigated further in untreated larvae in comparison to those temporarily exposed with the calcofluor for 2 h before toxin

a

	(-) calcofluor		(+) calcofluor	
	LC_{50}	LC_{90}	LC_{50}	LC_{90}
Cry4Ba-WT	6.27 ± 0.66	57.71 ± 11.63	0.29 ± 0.03	1.78 ± 0.24

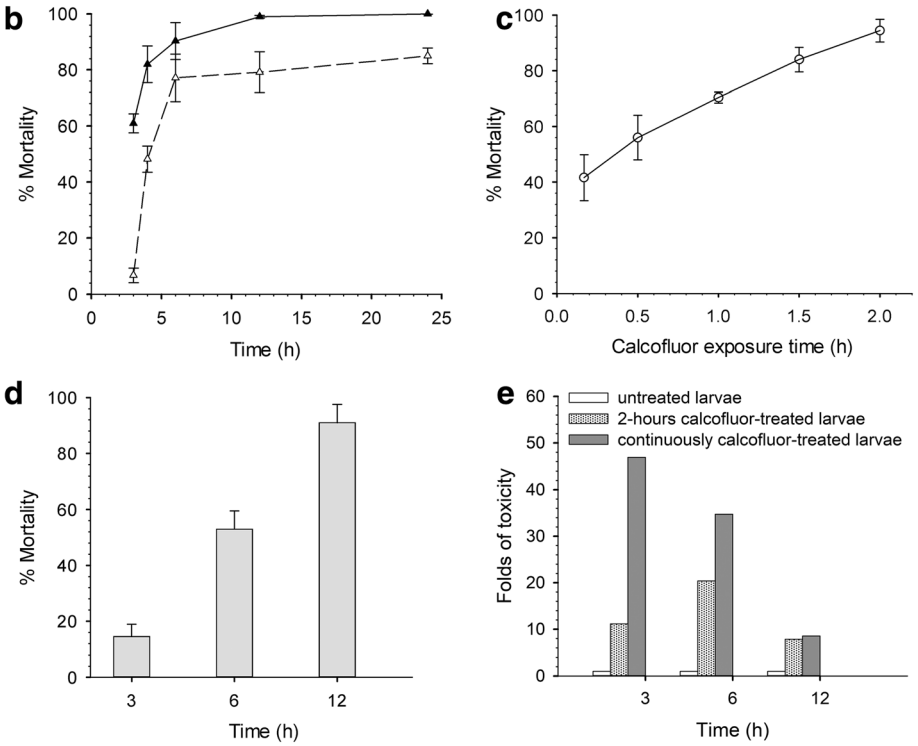
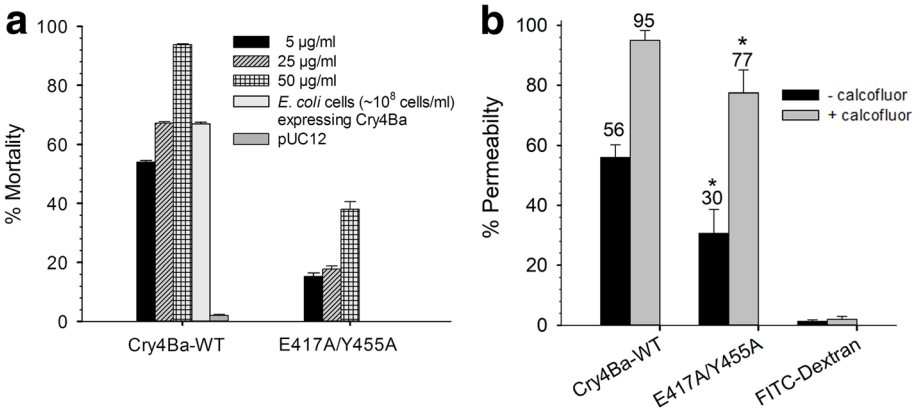


Fig. 1 Enhancing effect of calcofluor on the toxicity of wild-type Cry4Ba toward *Ae. aegypti* larvae. Larvae were fed with various concentrations of wild-type Cry4Ba toxin in the presence (+) or absence (-) of calcofluor for 24 h, LC_{50} and LC_{90} were estimated (**a**). The larvae were fed with toxin at LC_{90} alone (dash line), and toxin with calcofluor (solid line) and percent mortality was recorded after 3 h, 4 h, 6 h, 12 h and 24 h incubation period (**b**). Larvae were pre-incubated with 0.1% calcofluor for 0.25 h, 0.5 h, 1 h, 1.5 h and 2 h before 24 h feeding with toxin at LC_{90}, and percent mortality was then recorded (**c**). Larvae were pre-exposed with 0.1% calcofluor for 2 h, and then the solution was replaced with toxin inclusion at LC_{90}. Percent mortality was recorded after 3 h, 6 h and 12 h and presented as percent mortality + SEM (as T-bars) (**d**). Comparison of toxicity of Cry4Ba toxin toward larvae, which were 2 h pre-exposed with 0.1% calcofluor and continuously fed with the calcofluor together with LC_{90} of the toxin for 3 h, 6 h, and 12 h, and represented as folds of toxicity compared to calcofluor untreated larvae (**e**). *Abbreviations*: SEM, standard error of the mean

feeding, and continuously treated with calcofluor and toxin (Fig. 1e). After 3 h of toxin treatment, the continuously calcofluor-treated and the 2 h calcofluor-exposed larvae exhibited 46- and 12-fold higher mortality than the calcofluor untreated group, respectively. At 6 h of toxin incubation, mortality of the 2 h calcofluor exposed larvae was 21-fold higher than the calcofluor untreated larvae. However, this mortality was 14-fold lower than the larvae that were continuously fed with the combination of calcofluor and toxin. At 12 h of toxin treatment, mortality of 2 h calcofluor exposed larvae were close to those continuously fed with calcofluor and toxin, but 8- and 9-fold higher than non-treated larvae, respectively.

Calcofluor restored the toxicity of the partially active E417A/Y455A (EY)-mutant Cry4Ba toxin

In the absence of calcofluor, *Ae. aegypti* larvae exhibited mortality of about 47%, 74%, 97% and 74% upon feeding with wild-type Cry4Ba at concentrations 5, 25, and 50 μg/ml, and 10^8 of toxin-expressing *E. coli* cells, respectively (Fig. 2a). EY mutant toxin showed very low toxicity to the larvae compared to wild-type Cry4Ba (Fig. 2a). The mutant toxin also exhibited approximately 50% in perturbation ability of PM permeability compared to wild-type Cry4Ba (Fig. 2b). However, it exhibited the similar binding ability to the brush border membrane of the larval midgut as the wild-type Cry4Ba (Fig. 2c). When co-fed with calcofluor, PM perturbation ability of



d

	(-) calcofluor		(+) calcofluor	
	LC_{50}	LC_{90}	LC_{50}	LC_{90}
E417A / Y455A	>200	ND	1.04 ± 0.08	5.93 ± 0.81

Fig. 2 Toxicity and biological activities of EY mutant toxin in the presence and absence of calcofluor. Larvae were fed with toxin inclusion bodies of wild-type Cry4Ba and EY mutant toxin at 5, 25 and 50 µg/ml, *E. coli* cells expressing Cry4Ba, and *E. coli* cells harbouring expressing plasmid pUC12. Percent mortality was represented as the mean + SEM (**a**). PM perturbation ability of Cry4Ba toxin was evaluated by feeding the larvae with PM impermeable 2000 kDa dextran (conjugated with FITC) alone or in combination with wild-type Cry4Ba and EY mutant toxin at their LC_{90} concentrations. Percent PM permeability was represented as % of larvae with fluorescent signal outside the gut lumen after one h treatment (**b**). The tissue sections of treated larvae were immuno-stained with mouse anti-Cry4Ba monoclonal antibody and HRP-linked anti-mouse immunoglobulins (**c**). LC_{50} and LC_{90} of EY mutant toxin were determined after 24 h treatment in the presence or absence of calcofluor and presented as µg/ml ± SEM (**d**). The lines point out the BBMV that are positively stained with wild-type Cry4Ba and EY mutant toxins. Control is untreated larval gut tissue. *Abbreviations*: L, lumen; BBMV, brush border microvilli

the EY mutant and wild-type Cry4Ba rose to 95% and 77%, respectively (Fig. 2b). Furthermore, the LC_{50} and LC_{90} of the EY mutant toxin were significantly decreased from > 200 µg/ml to 1.04 ± 0.08 µg/ml (t-test: $t_{(4)} = 9.127$, $P = 0.0004$) and 5.93 ± 0.81 µg/ml, respectively (Fig. 2d).

Calcofluor induced morphological changes of PM

The scanning electron microscopy (SEM) demonstrated smooth surface of the PM with well-organised micro-fibril observed as thick lines in untreated larva (Fig. 3a). Slight cracks were observed in the PM of larvae treated with calcofluor or with Cry4Ba alone. These cracks were visible along a thick-line component of the PM in larvae treated with toxin together with calcofluor (Fig. 3a). The H&E stained gut tissues showed that gross morphology of the midgut-brush border microvilli (BBMV) of calcofluor-treated larvae remained intact as of untreated larvae (Fig. 3b), whereas BBMVs of the larvae treated with toxin alone, and toxin together with calcofluor presented mild (epithelial cells and BBBV were swollen and basolateral cell junctions were separated) to severe (epithelial cells and BBMV were disrupted entirely) damage of the BBMVs and midgut cells, respectively (Fig. 3b). However, gross morphology of the PMs was not different among H&E stained tissue samples.

Calcofluor significantly improved susceptibility of *Cx. quinquefasciatus* larvae to the Cry4Ba toxin

Along with *Ae. aegypti* larvae, the fourth-instar larvae of *Cx. quinquefasciatus* and the non-susceptible water flea *M. macrocopa* were fed with Cry4Ba toxin at LC_{90}, calcofluor and LC_{90} of the Cry4Ba toxin together with calcofluor for 24 h. The percent mortality of *Cx. quinquefasciatus* larvae were 2.5 ± 0.14% and 13.5 ± 0.62% when fed 0.1%

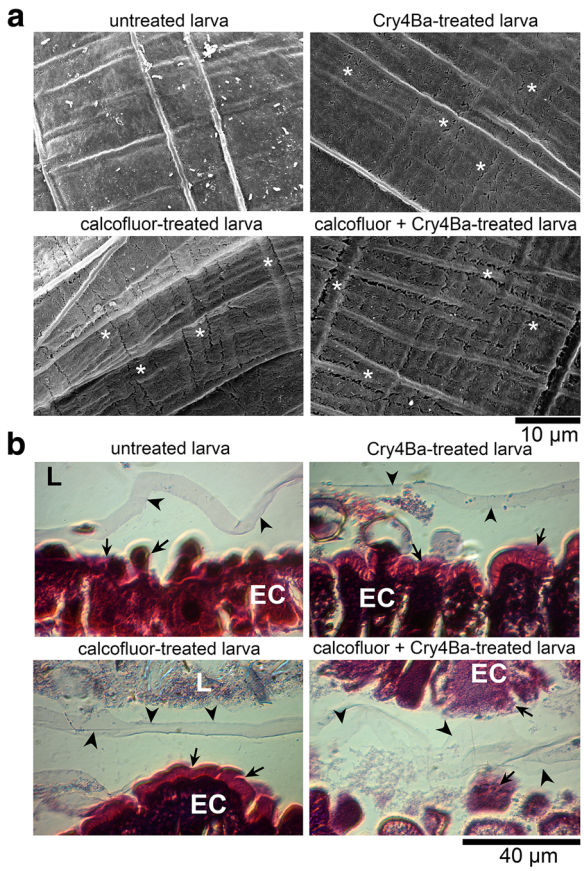


Fig. 3 PM topographies of calcofluor and non-calcofluor treated *Ae. aegypti* larvae. PMs isolated from untreated larvae, calcofluor-treated larvae, Cry4Ba-treated larvae, and toxin and calcofluor co-fed larvae were analyzed with SEM (**a**). Tissue sections of treated larvae were stained with H&E and examined under a light microscope (**b**). Asterisks mark cracks along thick lines of PMs. Arrows indicate microvilli of the midgut epithelial cells and arrowheads present PM after staining with H&E. *Abbreviations*: L, lumen; EC, epithelial cells of the midgut

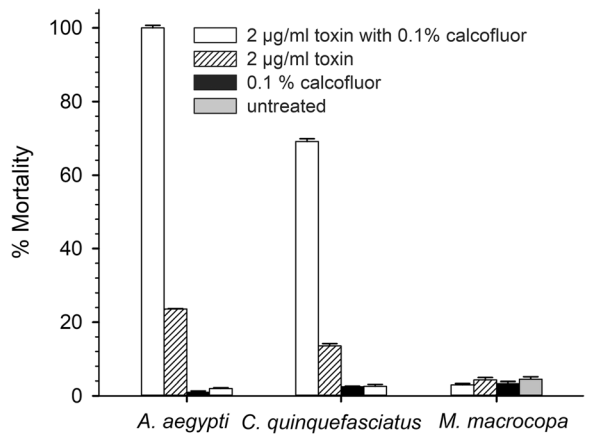


Fig. 4 Cry4Ba activity toward *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* and *M. macrocopa* in the presence and absence of calcofluor. The larvae were fed with 0.1% calcofluor, Cry4Ba toxin at LC_{90} and the toxin in combination with calcofluor. Percent mortality of mosquito larvae was observed after 24 h and compared to untreated larvae. Results are shown as percent mortality + SEM (T- bars) from triplicate experiments

calcofluor and with toxin alone, respectively (Fig. 4). In the toxin combination with calcofluor, there was a sharp increase in mortality of *Cx. quinquefasciatus* larvae to 69.1 ± 0.78%. However, there was no mortality effect of calcofluor and the calcofluor-Cry4Ba toxin combination to non-susceptible water fleas (Fig. 4).

Discussion

The insect PM is comprised of proteins, proteoglycans, and a chitin network that serves as a protective barrier for physical damage by food particles, as well as compartmentalization and permeability of insect-gut digestive enzymes and other solutes [20]. When fed to *Ae. aegypti* larvae, Cry4Ba gradually expressed its toxicity in a sigmoidal shape three hours after feeding and plateaued after six. Previously, Cry1Ac and Cry4Ba were reported to be associated with larval PM [27, 28]. This Cry4Ba-PM association might trigger secondary host response or signaling transduction as proposed by the toxicity mechanism of lepidopteran-specific Cry toxins [33, 34], leading to delayed toxicity. Cry4Ba toxin was previously shown to alter PM permeability to cross over PM and bind to the midgut membrane for its toxicity toward *Ae. aegypti* larvae [28]. Alternatively, the delayed toxicity might be due to the protective threshold of the larval PM for Cry4Ba toxin. Destruction of PM structure and components by chitinase [16] and bel protein produced from Bt [17] were found to promote toxicity of Cry1A protein toward susceptible insect larvae. In this study, when calcofluor was administered, the toxicity of Cry4Ba was enhanced, as shown by a 50-fold decrease in toxin dosage to achieve its LC_{90}. This result is consistent with the positive effect of calcofluor on Cry1Ca toward *Mamestra brassicae* larvae [30] and baculovirus infections in *T. ni* [24, 35, 36]. *Aedes aegypti* larval mortality was reached 60% and 90% three and 12 hours after calcofluor co-treatment with LC_{90} of Cry4Ba, respectively. The result also revealed the binding threshold of calcofluor on PM, which can be overcome in around three hours to set out the toxin enhancing effect. Temporary exposure of larvae with calcofluor, for at least 15 min (0.25 h) before toxin incubation, was also able to enhance Cry4Ba toxicity. However, Cry4Ba toxin continuously co-fed with calcofluor exhibited significantly higher toxicity than the brief exposure, suggesting that calcofluor might bind to larval PM in a semi-irreversible manner. In previous reports, PMs of lepidopteran larvae were disrupted and fragmented upon treatment with calcofluor, and completely recovered after removal of the chemical [24, 27]. Although the amount of calcofluor and toxin exposure time applied for *Ae. aegypti* larvae in

the current study were much lower than in previous reports with lepidopteran larvae, the enhancing effect of calcofluor on Cry4Ba toxicity remained observable. Therefore, this study reveals the thermodynamic process of calcofluor action in dipteran larvae (semi-irreversible), which differs from lepidopteran larvae (reversible). Beside the enhancing effect, a combination of calcofluor with Cry1Ac or Cry1Ca was found to inhibit their toxicities toward *M. sexta* larvae [27]. It is important to note that PM is composed of proteins and glycoproteins embedded in the chitin network [37, 38]. However, the proportion of protein and chitin components varies in different insect species [20, 39, 40]. Therefore, the difference in PM structure and components, as well as the toxic mechanism of the Cry toxins, possibly result in different degree of calcofluor effect on the toxicity of Cry toxins toward insect larvae.

Amino acids at positions Glu417(E) and Tyr455 (Y) of Cry4Ba domain II were proposed to be involved in toxin binding to BBMV of *Ae. aegypti* larval midgut [41], while residue Arg158 of domain I was shown to be responsible for toxin insertion into PM and midgut membrane [28]. Compared to the wild-type Cry4Ba, the mutant EY was defective in PM permeability alteration, resulting in near loss of toxicity toward *Ae. aegypti* larvae. When administered with calcofluor, the mutant EY was able to recover its toxicity, and all of the treated larvae were permeable to the supposedly non-permeable 2000 kDa dextran particles. Thus, current results revealed the additional function of amino acids Glu417 and Tyr455 of the Cry4Ba toxin in permeability alteration of *Ae. aegypti* larval PM.

We investigated further whether the increased toxicity was due to changes in PM's gross morphology by calcofluor. It was found that calcofluor alone caused the degeneration of PM network than the epithelial membrane of the larval midgut. This is consistent with the finding in lepidopteran larvae, where PM was not intact after calcofluor incubation [27]. Fully formed PM of *Ae. aegypti* larvae were assembled by electron-dense knots and streaks connected by one to two electron-lucent layers formed in honeycomb-like holes [42]. The electron-dense layers (thick lines in SEM) are at least composed of proteoglycans [42], while the electron-lucent layers (thin lines in SEM) are believed to contain chitin microfibrils [43]. Electron micrographs of calcofluor-treated larvae demonstrated the destruction of the PM at areas of thin lines. Severe damage was observed in PMs of larvae treated with calcofluor in combination with Cry4Ba toxin. It was first presented here that calcofluor was able to destroy chitin fibrils of mosquito larval PM. Due to binding specificity of calcofluor to cellulose and chitin components of insect PM [38], its binding might promote accessibility of chitin fibril for digestion by gut residing chitinases or deposition of the peritrophins and other chitin-binding proteins. These events might lead to the increase in PM permeability to Cry4Ba [28], while performing capability of Cry4Ba, and cause severe damage to PM and midgut epithelium, contributing to the death of calcofluor-toxin-treated larvae.

A hallmark of Cry toxins is their killing specificity toward a narrow spectrum of insect hosts. Cry4Ba toxin is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* [44] and partially harmful to *Culex* mosquito larvae. Previous substitution of amino acid Asp 454 on β10- β11 loops of Cry4Ba domain II with Lys or Arg (D454K and D454R) was found to increase Cry4Ba toxicity toward *Cx. quinquefasciatus* larvae [45]. In this study, treatment of *Cx. quinquefasciatus* larvae with wild-type Cry4Ba with calcofluor significantly improved larval susceptibility to the toxin and expressed higher mortality than those treated with toxin alone. However, the toxicity of Cry4Ba toward *Cx. quinquefasciatus* larvae were relatively low compared to that of *Ae. aegypti* larvae. Peters [46] found that electron-dense layers at the lumen side of *Cx. pipiens* larval PM is discontinuously interrupted with fine pores, whereas those of *Ae. aegypti* are continuous with a granular appearance at the midgut membrane side. Although the chitin fibrils in electron-lucent layers of *Cx. pipiens* larval PM is arranged in an orthogonal texture similar to *Ae. aegypti*, those portions are much larger than the PM of *Ae. aegypti* [46]. These differences in PM ultra-structures may attribute to the degrees of larval susceptibility to Cry4Ba toxin between these two closely related mosquito species. Despite the enhancing effect of calcofluor on Cry4Ba, it showed no mortality toward water fleas (*M. macrocopa*). This result demonstrated that calcofluor is safe for a zooplankton *M. macrocopa*, which is known as an environmental parameter as the primary level of the food chain in the ecosystem [47–49]. Also, calcofluor has relatively low toxicity to fish, mammals and humans and has not been found to be carcinogenic or mutagenic to humans [50].

Conclusions

Calcofluor can function as an enhancing agent for Cry4Ba toxicity by increasing the susceptibility of *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae, resulting in a reduction of both toxin concentration and exposure time. This chemical exhibited no toxicity toward non-susceptible water fleas. Thus, this study suggested the possible field application of Cry4Ba-toxicity enhancing calcofluor to improve the efficacy of bio-control of mosquito vectors soon.

Abbreviations

BBMV: Brush border microvilli; Bt: *Bacillus thuringiensis*; CR12-MPED: 12 cadherin repeats-membrane proximal extracellular domain; DAB: 3,3′-diaminobenzidine; FITC: Fluorescein isothiocyanate; H&E: Hematoxylin and eosin; LC_{50}: Lethal concentration required to kill 50% of the population; LC_{90}: Lethal concentration required to kill 90% of the population; PBS: Phosphate-buffered saline; PM: Peritrophic membrane; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SEM: Scanning electron microscope

Acknowledgements
We would like to thank Associate Professor Urai Chaisri, Department of Tropical Pathology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for her technical support in H & E staining and microscopic analysis of larval tissue sections. We would like to acknowledge Mr Irwin F. Chavez, Department of Tropical Hygiene, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University for his editorial and English proof.

Funding
This work was supported by the grant from the Thailand Research Fund (Grant No. RSA5880026).

Availability of data and materials
The data supporting the conclusions of this article are included within the article.

Authors' contributions
SL and SM designed and planned the experiments. SL and NK conducted the laboratory experiments and data analysis. SS worked with insect rearing. SL, NK and SM constructed the manuscript. SL, NK, PW and SM revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate
Not applicable.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details
[1]Bacterial Protein Toxin Research Cluster, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakorn-Pathom 73170, Thailand. [2]Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Ratchadewee, Bangkok 10400, Thailand. [3]Department of Entomology, New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, NY 14456, USA.

Received: 10 July 2018 Accepted: 11 September 2018
Published online: 20 September 2018

References

1. Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodriguez-Almazan C, Pardo L, et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microb Biotechnol. 2013;6:17–26.
2. Hofte H, de Greve H, Seurinck J, Jansens S, Mahillon J, Ampe C, et al. Structural and functional analysis of a cloned δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915. Eur J Biochem. 1986;161:273–80.
3. Angsuthanasombat C, Uawithya P, Leetachewa S, Pornwiroon W, Ounjai P, Kerdcharoen T, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: homology-based 3D model and implications for toxin activity. J Biochem Mol Biol. 2004;37:304–13.
4. Knowles BH. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. Adv In Insect Phys. 1994;24:275–308.
5. Whalon ME, Wingerd BA. Bt: mode of action and use. Arch Insect Biochem Physiol. 2003;54:200–11.
6. Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. J Bacteriol. 2006;188:3391–401.
7. Zhang H, Yin W, Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu S, et al. Early warning of cotton bollworm resistance associated with the intensive planting of Bt cotton in China. PLoS One. 2011;6:e22874.
8. Tetreau G, Stalinski R, Kersusan D, Veyrenc S, David JP, Reynaud S, et al. Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. Appl Environ Microbiol. 2012;78:5189–95.
9. Zhang H, Tian W, Zhao J, Jin L, Yang J, Liu C, et al. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:10275–80.
10. Abdullah MA, Moussa S, Taylor MD, Adang MJ. *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. Pest Manag Sci. 2009;65:1097–103.
11. Pardo-Lopez L, Munoz-Garay C, Porta H, Rodriguez-Almazan C, Soberon M, Bravo A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Peptides. 2009;30:589–95.
12. Rajamohan F, Alzate O, Cotrill JA, Curtiss A, Dean DH. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:14338–43.
13. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A d-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. FEBS Lett. 2000;473:227–32.
14. Chen J, Hua G, Jurat-Fuentes JL, Abdullah MA, Adang MJ. Synergism of *Bacillus thuringiensis* toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:13901–6.
15. Zhang R, Hua G, Urbauer JL, Adang MJ. Synergistic and inhibitory effects of aminopeptidase peptides on *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxicity in the mosquito *Anopheles gambiae*. Biochemistry. 2010;49:8512–9.
16. Rao R, Fiandra L, Giordana B, de Eguileor M, Congiu T, Burlini N, et al. AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34:1205–13.
17. Fang S, Wang L, Guo W, Zhang X, Peng D, Luo C, et al. *Bacillus thuringiensis* bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. Appl Environ Microbiol. 2009;75:5237–43.
18. Richards AG, Richards PA. The peritrophic membranes of insects. Annu Rev Entomol. 1977;22:219–40.
19. Bolognesi R, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilisation and recycling digestive enzymes. Arch Insect Biochem Physiol. 2001;47:62–75.
20. Terra WR. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch Insect Biochem Physiol. 2001;47:47–61.
21. Huber M, Cabib E, Miller LH. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:2807–10.
22. Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, et al. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. Appl Environ Microbiol. 1996;62:3581–6.
23. Hu SB, Liu P, Ding XZ, Yan L, Sun YJ, Zhang YM, et al. Efficient constitutive expression of chitinase in the mother cell of *Bacillus thuringiensis* and its potential to enhance the toxicity of Cry1Ac protoxin. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;82:1157–67.
24. Wang P, Granados RR. Calcofluor disrupts the midgut defence system in insects. Insect Biochem Mol Biol. 2000;30:135–43.
25. Brasch J, Kreiselmaier I, Christophers E. Inhibition of dermatophytes by optical brighteners. Mycoses. 2003;46:120–5.
26. Kingsbury JM, Heitman J, Pinnell SR. Calcofluor white combination antifungal treatments for *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. PLoS One. 2012;7:e39405.
27. Rees JS, Jarrett P, Ellar DJ. Peritrophic membrane contribution to Bt Cry d-endotoxin susceptibility in *Lepidoptera* and the effect of calcofluor. J Invertebr Pathol. 2009;100:139–46.
28. Leetachewa S, Moonsom S, Chaisri U, Khomkhum N, Yoonim N, Wang P, et al. Functional characterisations of residues Arg-158 and Tyr-170 of the mosquito-larvicidal *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba. BMB Rep. 2014;47:546–51.
29. Leetachewa S, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. Novel preparation and characterisation of the α4-loop-α5 membrane-perturbing peptide from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba δ-endotoxin. J Biochem Mol Biol. 2006;39:270–7.
30. Finney DJ. Probit Analysis. J Pharm Sci. 1971;60:1432.
31. Rottmann RW, Graves JS, Watson C, Yanong RPE. Culture Techniques of *Moina*: the ideal *Daphnia* for feeding freshwater fish fry. USA: University of Florida (UF) and The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS); 2017. https://edis.ifas.ufl.edu/fa024
32. Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. J Insect Physiol. 2000;46:1313–20.
33. Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla LA Jr. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. Cell Death Differ. 2005;12:1407–16.

34. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. J Invertebr Pathol. 2006;92:166–71.
35. Martinez AM, Caballero P, Villanueva M, Miralles N, San Martin I, Lopez E, et al. Formulation with an optical brightener does not increase probability of developing resistance to *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus in the laboratory. J Econ Entomol. 2004;97:1202–8.
36. Zhu R, Liu K, Peng J, Yang H, Hong H. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Pest Manag Sci. 2007;63:296–300.
37. Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. Annu Rev Entomol. 1997;42:525–50.
38. Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins. Insect Biochem Mol Biol. 1999;29:87–101.
39. Merzendorfer H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. Eur J Cell Biol. 2011;90:759–69.
40. Tetreau G, Dittmer NT, Cao X, Agrawal S, Chen YR, Muthukrishnan S, et al. Analysis of chitin-binding proteins from *Manduca sexta* provides new insights into evolution of peritrophin A-type chitin-binding domains in insects. Insect Biochem Mol Biol. 2015;62:127–41.
41. Khaokhiew T, Angsuthanasombat C, Promptmas C. Correlative effect on the toxicity of three surface-exposed loops in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. FEMS Microbiol Lett. 2009;300:139–45.
42. Peters W. The fine structure of peritrophic membranes of mosquito and blackfly larvae of the genera *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, and *Odagmia* (Diptera: Culicidae/Simuliidae). Entomol Gen. 1979;5:289–99.
43. Richards AG, Richards PA. Origin and composition of the peritrophic membrane of the mosquito, *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 1971;17:2253–75.
44. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins. 2014;6:1222.
45. Visitsattapongse S, Sakdee S, Leetacheewa S, Angsuthanasombat C. Single-reversal charge in the β10-β11 receptor-binding loop of *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba toxins reflects their different toxicity against *Culex* spp. larvae. Biochem Biophys Res Commun. 2014;450:948–52.
46. Peters W. Peritrophic Membranes. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
47. Sarma SS, Nandini S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. J Environ Sci Health B. 2006;41:1417–30.
48. Engert A, Chakrabarti S, Saul N, Bittner M, Menzel R, Steinberg CE. Interaction of temperature and an environmental stressor: *Moina macrocopa* responds with increased body size, increased lifespan, and increased offspring numbers slightly above its temperature optimum. Chemosphere. 2013;90:2136–41.
49. Suhett AL, Santangelo JM, Bozelli RL, Steinberg CEW, Farjalla VF. An overview of the contribution of studies with cladocerans to environmental stress research. Acta Limnol Brasiliensia. 2015;27:145–59.
50. Miller V, Sasala K, Hogan M. Health effects of project SHAD chemical agent: Calcofluor. Silver Spring: Institute of Medicine, the National Academies; 2004.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions