

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่า
ลูกน้ำยุงชนิดไบนารีจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*

Role of aromatic residues in toxicity of binary toxin from
Lysinibacillus sphaericus

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร.ชลธิดา ตั้งทรงเจริญ

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

รหัสโครงการ AHS8/2562

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.กนกพร ศรีสุจริตพานิช

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. 2562

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)

การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารีจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus*

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ)

Role of aromatic residues in toxicity of binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.ชลธิตา ตั้งทรงเจริญ

หน่วยงาน สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

บทคัดย่อ

BinA และ BinB เป็น binary toxin ที่ผลิตจาก *Lysinibacillus sphaericus* สามารถทำงานร่วมกันในการฆ่าลูกน้ำยุง โดยจับกับ receptor บริเวณเยื่อบุกระเพาะของลูกน้ำยุงทำให้ลูกน้ำยุงตายได้ ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน BinB พบว่าบริเวณปลาย N-terminal มีโครงสร้างที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate binding protein) และทางด้านปลาย C-terminal พบว่ามีโครงสร้างคล้าย toxin อีกชนิดหนึ่งซึ่งมีชื่อว่า aerolysin ซึ่งสามารถทำให้เซลล์เกิดเป็นรูรั่วได้ (pore forming toxins) จากโครงสร้างของ binary toxin ที่มีความคล้ายกับ toxin หลายชนิดที่ทำให้เซลล์ของเม็ดเลือดแดงเกิดการแตกได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ binary toxin ต่อเซลล์อื่นๆ โดยทำกับเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์ของแบคทีเรีย พบว่า binary toxin ไม่มีผลทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์แตก และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรียได้ จากฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงโดยการจับกับ receptor บนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของลูกน้ำ และจากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน BinB คาดว่าปลาย N-terminal น่าจะเป็นโครงสร้างสำคัญในการฆ่าลูกน้ำยุงโดยการจับกับ receptor บนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของลูกน้ำ เพราะมีโครงสร้างเป็น carbohydrate binding protein จึงได้มีการหาตำแหน่งจำเพาะในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยการแทนที่กรดอะมิโน tyrosine ของโปรตีน BinB ที่ตำแหน่ง Y53, Y72, Y76, Y94 and Y111 ด้วย alanine และจากการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง (Larvicidal activity) พบว่าตำแหน่งที่ Y53, Y72 และ Y111 สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ลดลง และเมื่อนำมาทดสอบยืนยันด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าตำแหน่งที่ Y53, Y72 และ Y111 น่าจะมีความสำคัญต่อการจับกับ receptor บนเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารของลูกน้ำ

คำสำคัญ โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารีทอกซิน, การจับกับตัวตอบรับ, ความเป็นพิษ

ABSTRACT

Binary toxin produced by *Lysinibacillus sphaericus* is a larvicidal toxin that consists of BinA (42 kDa) and BinB (51 kDa) proteins. BinA and BinB proteins are function together which are highly toxic to *Culex* and *Anopheles* mosquito larvae. BinA is proposed to function as a toxic subunit while BinB is responsible for a receptor binding and translocation domain. N-terminal domain is carbohydrate binding protein and C-terminal domain is similar to aerolysin which is pore-forming toxin. This study aims to clarify the cytotoxicity of Binary toxin on several types of cells such as human red blood cells, bacterial cells. Both BinA and BinB showed no hemolytic on human red blood cells and anti-bacterial activity with gram positive and negative bacteria. Moreover, this study investigated the role of tyrosine and phenylalanine which were replaced with alanine using site-directed mutagenesis. BinB mutants Y53A, Y72A และ Y111A showed reduced toxicity when compared with wild type protein. Also, the receptor binding assay was performed by immunohistochemistry assay. BinB mutants Y53A, Y72A และ Y111A reduced receptor binding signal on microvilli of midgult larvae. Thus, this is possible that tyrosine at the position of 53, 72 and 111 are important for receptor binding.

Keywords: *Lysinibacillus sphaericus*; Binary toxin; receptor binding, toxicity

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่า
ลูกน้ำยุงชนิดไบนารีจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับโอกาส
จากคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทั้งนี้ต้องขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้
การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๒ ในการทำวิจัยครั้งนี้ และยังอำนวยความสะดวก
สะดวกเครื่องมือและสถานที่ห้องปฏิบัติการมาเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.กนกพร ศรีสุจริตพานิช ผู้ร่วมวิจัย ที่ช่วยเหลือและร่วมทำงานวิจัยนี้ด้วยจนสำเร็จ
ได้ด้วยดี

ดร. ชลธิดา ตั้งทรงเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 นิยามศัพท์.....	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	4
2.1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	4
2.1.2 โปรตีนสารพิษชนิดไบนารี Binary toxin.....	5
2.1.3 กลไกการออกฤทธิ์ของ Binary toxin.....	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	8
3.1 การสกัด plasmid โดยใช้ชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit.....	8
3.2 การสร้าง BinB กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Site-directed mutagenesis PCR.....	8
3.3 การนำ mutant plasmid เข้าสู่ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ JM109 (transformation) โดยวิธี heat shock	9
3.4 การวัดความเข้มข้นของ DNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ 260 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer.....	10
3.5 การตรวจสอบโคลนกลายพันธุ์ (mutant screening) ที่อยู่ใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ JM109.....	10
3.6 การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ใน <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS ด้วยการทำให้ small scale expression.....	10
3.7 การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ใน <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS ด้วยการทำให้ large scale expression.....	11
3.8 Protein purification.....	11
3.9 Mosquito-larvicidal activity assay.....	11
3.10 การทดสอบ Receptor binding assay.....	12
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล	14
4.1 ผลการวิจัย.....	14

4.1.1	เปรียบเทียบโครงสร้างเพื่อคัดเลือกตำแหน่งที่จะดำเนินงานวิจัยและออกแบบไพรเมอร์.....	14
4.1.2	PCR site-directed mutagenesis.....	15
4.1.3	การเหนี่ยวนำ mutant plasmids เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน <i>E.coli</i> DH5 α competent cells ด้วยวิธี Heat shock method.....	19
4.1.4	DNA sequencing ของ pET28b-BinB_ F147A, F149A.....	19
4.1.5	การแสดงออกของโปรตีน binary toxin ต้นแบบและกลายพันธุ์ ใน <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	21
4.1.6	การออกฤทธิ์ของโปรตีน binary toxin ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ <i>Culex quinquefasciatus</i>	25
4.1.7	ทดสอบความสามารถของโปรตีน BinB ในการจับกับเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุงด้วยเทคนิคการย้อม Immunohistochemistry	26
4.1.8	ทดสอบความเป็นพิษของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์ต่าง ๆ นอกจากเซลล์เป้าหมาย.....	27
4.2	อภิปรายผล.....	27
บทที่ 5	สรุปและข้อเสนอแนะ	30
5.1	สรุปผลการวิจัย.....	30
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	30
	บรรณานุกรม.....	31
	ภาคผนวก.....	33

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 : แสดงองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ BinB กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Site-directed mutagenesis PCR	9
ตารางที่ 3.2 : PCR profile	9
ตารางที่ 4.1 : Primers ที่ออกแบบสำหรับ PCR site-directed mutagenesis	14
ตารางที่ 4.2 : แสดงผลการออกฤทธิ์ของโปรตีนกลายพันธุ์ต่อการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ	25
ตารางที่ 4.3 : แสดงเปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดง	28

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 : ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของแบคทีเรีย <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	5
ภาพที่ 2.2 : โครงสร้างของโปรตีน BinA และ BinB	6
ภาพที่ 4.1 : รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-BinB (wild type)	15
ภาพที่ 4.2 : PCR product F147A, F149A จากการทำให้ site-directed mutagenesis	16
ภาพที่ 4.3 : PCR product F147/F149A จากการทำให้ site-directed mutagenesis	17
ภาพที่ 4.4 : PCR product Y53A, Y72A, Y76A, Y94A, Y111A จากการทำให้ site-directed mutagenesis	18
ภาพที่ 4.5 : ผล DNA sequencing F147A, F149A	20
ภาพที่ 4.6 : ผล DNA sequencing Y53A, Y72A, Y76A, Y94A, Y111A	21
ภาพที่ 4.7 : ผลของโปรตีน BinA wild-type, BinB wild-type และ BinB กลายพันธุ์ Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A	22
ภาพที่ 4.8 : ผลของการแสดงออกและ protein purification ของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ F147A	23
ภาพที่ 4.9 : ผลของการแสดงออกและ protein purification ของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ F149A	24
ภาพที่ 4.10 : ผลการย้อม Immunohistochemistry	26
ภาพที่ 4.11 : การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์แบคทีเรีย	27

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยุง (Mosquitoes) เป็นแมลงขนาดเล็กที่จัดอยู่สกุล Diptera ในวงศ์ Culicidae ทั่วโลกมียุงอยู่ประมาณ 3,450 ชนิด สามารถพบได้ทั่วโลกแต่จะพบมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น และพบในประเทศไทยประมาณ 412 ชนิด ยุงที่รู้จักและมีความสำคัญทางการแพทย์โดยส่วนใหญ่ มี 4 สายพันธุ์ เนื่องจากยุงสายพันธุ์เหล่านี้เป็นพาหะนำโรคติดต่อมาสู่คน ได้แก่ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะสำคัญนำโรคไข้ป่าหรือโรคไข้มาลาเรีย (Malaria) ยุงลาย (*Aedes* spp.) เป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก (Dengue Haemorrhagic Fever) และชิคุนคุนยา (Chikungunya) ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) เป็นพาหะสำคัญนำโรคไขสมองอักเสบ (Encephalitis) และยุงลายเสือ (*Mansonia*) เป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (Filariasis) เนื่องจากประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ซึ่งเหมาะสมต่อการแพร่พันธุ์ของยุง ทำให้มีประชากรของยุงที่ชุกชุม และอัตราการแพร่กระจายของยุงมีปริมาณมาก ปัจจุบันประเทศไทยพบปัญหาของการเกิดโรคที่มาจากยุงเป็นพาหะ เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศ นอกจากนี้ยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขของโลกอีกด้วย จึงมีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อใช้ในการควบคุมประชากรยุงและลดการแพร่กระจายของพาหะนำโรค โดยมักนิยมใช้สารเคมี เช่น dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), gamma-xane, malathion และ chlordane เนื่องจากออกฤทธิ์ได้เร็วและเห็นผลทันทีแต่ถ้าใช้สารเคมีในระยะยาวจะส่งผลเสียให้เกิดการดื้อยาของยุงต่อสารเคมี พบว่าสารเคมีดังกล่าวสะสมอยู่ในธรรมชาติซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้ โดยเกิดการสะสมในห่วงโซ่อาหาร ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการนำสารชีวภาพ (Biological compounds) ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้มาใช้ทดแทน ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาการนำโปรตีนของแบคทีเรียที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้อย่างจำเพาะ โดยออกฤทธิ์กำจัดต้นตอของพาหะก็คือลูกน้ำยุง ที่พบได้ตามแหล่งน้ำขังทั่วไป ซึ่งเป็นการตัดวงจรชีวิตของยุงตั้งแต่เริ่มต้น โดยการใส่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างโปรตีนที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *Lysinibacillus sphaericus* ซึ่งมีการใช้กันอย่างกว้างขวางโดยไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาโปรตีนสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง (rod shape) สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์ที่สร้างขึ้นจะอยู่ที่ปลายสุดของเซลล์ เรียกว่า terminal spore ซึ่งทนต่ออุณหภูมิสูง สารเคมีและแสงอัลตราไวโอเล็ต และสามารถคงอยู่ได้เป็นเวลานาน ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลและดำรงชีวิตได้โดยอาศัยออกซิเจน (Aerobic bacteria) ระยะสร้างสปอร์ (sporulation phase) นี้จะมีการสร้างผลึกโปรตีน Binary toxin (Bin) เพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพการใช้สารชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ในการควบคุมประชากรยุงและกำจัดลูกน้ำยุงได้อย่างจำเพาะ โดยมีฤทธิ์จำเพาะในการฆ่าลูกน้ำยุงสายพันธุ์ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) โปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกันคือโปรตีน BinA มีขนาด 42 kDa เป็นส่วนตอบสนองต่อความเป็นพิษ (Toxin subunit) และ

BinB มีขนาด 51 kDa เป็นส่วนที่ตอบสนองต่อการจับจำเพาะกับตัวตอรับของเซลล์เป้าหมาย (Specific receptor) บนผิวเซลล์กระเพาะของลูกน้ำยุง (midgut epithelial membrane) ปัจจุบันจึงได้มีการนำโปรตีนสารพิษนี้มาพัฒนาประสิทธิภาพในการกำจัดลูกน้ำยุง เพื่อลดจำนวนประชากรยุง เนื่องจากโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้งานซึ่งมีความคงทนได้ระยะเวลาสั้น ทำให้ออกฤทธิ์ได้ในระยะสั้นและเนื่องจากการออกฤทธิ์ต่อสายพันธุ์ของยุงอย่างจำเพาะทำให้พบการดื้อยาต่อการใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดนี้ได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้โปรตีนสารพิษยังไม่แพร่หลายมากนักเนื่องจากการใช้โปรตีนสารพิษไม่เห็นผลรวดเร็วเหมือนสารฉีดพ่นด้วยสารเคมี ดังนั้นเพื่อให้เกิดการพัฒนาประสิทธิภาพและการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษให้ดียิ่งขึ้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาถึงการทำงานของโปรตีน Binary toxin โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลทางด้านโครงสร้างและความปลอดภัยต่อเซลล์อื่นๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาโปรตีนสารพิษ ทำให้สามารถพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์สำหรับการควบคุมประชากรยุงได้

จากการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำงานของโปรตีนสารพิษชนิดไบนารีจากข้อมูลเชิงโครงสร้างสามมิติของโปรตีน BinA และ BinB ซึ่งโครงสร้างของทั้งสองโปรตีนมีความคล้ายคลึงกันแต่อย่างไรก็ตามการทำหน้าที่ในบริเวณที่มีความสำคัญยังไม่มีข้อมูลมากนัก การศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้ส่วนที่คาดว่าจะมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยศึกษาดำแหน่งกรดอะมิโนที่คาดว่าจะมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง เช่น การจับกับ receptor บนผิวเซลล์ลูกน้ำยุง เพื่อสามารถนำความรู้ไปใช้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ซึ่งสามารถนำความรู้นี้ช่วยแก้ปัญหาการดื้อยาที่เกิดขึ้นจากการใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดนี้เป็นเวลานานได้และสามารถใช้พัฒนาโปรตีนสารพิษโดยอาจนำไปรวมกับ toxin ตัวอื่นให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้นำโปรตีนสารพิษนี้ทดสอบทางด้านความปลอดภัยหรือความเป็นพิษต่อเซลล์อื่นๆ ที่ไม่ใช่เซลล์เป้าหมายอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก tyrosine ของโปรตีนสารพิษ BinB ต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง *Culex quinquefasciatus* โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

- 1) เพื่อสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก
- 2) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์ต่าง ๆ นอกจากเซลล์เป้าหมาย
- 3) เพื่อศึกษาความสามารถในการจับกับตัวตอรับบนผิวเซลล์ลูกน้ำยุง *Culex quinquefasciatus*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถยืนยันการทำหน้าที่ของโปรตีน BinB ที่บริเวณ N-terminal binding domain ได้
2. สามารถพัฒนาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์โปรตีนสารพิษ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันของ BinA และ BinB และช่วยป้องกันการดื้อยาของลูกน้ำยุงจากการใช้โปรตีนสารพิษต่อไปได้
3. สามารถยืนยันผลกระทบต่อเซลล์อื่นๆ ที่ไม่ใช่เซลล์เป้าหมายได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกในโครงสร้างของโปรตีน BinB โดยการสร้างโปรตีนกลายพันธุ์โดยวิธี site-directed mutagenesis เพื่อเข้าใจการทำงานของโปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำยุง binary toxin ต่อการจับจำเพาะบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงรำคาญ และยังศึกษาด้านความเป็นพิษต่อเซลล์อื่นๆ ที่ไม่ใช่เซลล์เป้าหมายด้วย

1.5 นิยามศัพท์

Binary toxin โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารีทอกซิน

Receptor ตัวตอบรับ

Toxicity ความเป็นพิษ

บทที่ 2

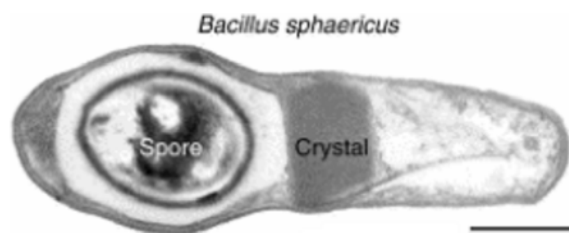
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Lysinibacillus sphaericus*

2.1.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับ *Lysinibacillus sphaericus*

Lysinibacillus sphaericus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน (rod shape) สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์ที่สร้างขึ้นจะอยู่ที่ปลายสุดของเซลล์ เรียกว่า terminal spore สามารถพบได้ทั่วไปในดิน และตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ไม่สามารถย่อยน้ำตาลได้และดำรงชีวิตโดยอาศัยออกซิเจน (Aerobic bacteria) แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ทั่วไปในดินและน้ำ เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตสารพิษในรูปของโปรตีนที่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ Mosquitocidal toxins หรือโปรตีน Mtx อาจแบ่งได้ 3 ชนิดคือ Mtx1, Mtx2 และ Mtx3 (Shi et al., 2003) ผลิตในระยะการเจริญ (vegetative phase) แต่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเข้าสู่ระยะสร้างสปอร์ (sporulation phase) กลุ่มที่ 2 คือ Binary toxin (Bin) เป็นผลึกโปรตีนที่ผลิตขึ้นในระยะสร้างสปอร์ (sporulation phase) แสดงในภาพที่ 2.1 (Charles et al., 1996) โดยโปรตีนทั้งสองชนิดออกฤทธิ์จำเพาะต่อยุงสายพันธุ์ต่างชนิดกัน *Lysinibacillus sphaericus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นสารชีวภาพในการกำจัดแมลงที่เป็นพาหะนำโรคต่าง ๆ ในเขตร้อนชื้น เช่น โรคมาลาเรีย โรคเท้าช้าง โรคไข้เลือดออก เพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพการใช้สารชีวภาพที่ได้จากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ในการควบคุมประชากรยุงและกำจัดลูกน้ำยุงได้อย่างจำเพาะ ในปี ค.ศ. 2006 ที่ผ่านมามีองค์การอนามัยโลกให้คำแนะนำว่า *Lysinibacillus sphaericus* สามารถนำไปใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง *Culex quinquefasciatus* ในแหล่งน้ำขังที่เป็นน้ำสกปรกหรือน้ำเน่าเสียได้เป็นอย่างดี

การวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาโปรตีนสารพิษ Binary toxin เนื่องจากเป็นผลึกโปรตีนที่มีความทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า โปรตีน Binary toxin มีฤทธิ์จำเพาะในการฆ่าลูกน้ำยุงสายพันธุ์ยุงรำคาญ (*Culex* spp.) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) โปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดที่ทำงานร่วมกันคือ โปรตีน BinA มีขนาด 42 kDa เป็นส่วนตอบสนองต่อความเป็นพิษ (Toxin subunit) และ BinB มีขนาด 51 kDa เป็นส่วนที่ตอบสนองต่อการจับจำเพาะกับตัวตอบรับของเซลล์เป้าหมาย (Specific receptor) บนผิวเซลล์กระเพาะของลูกน้ำยุง (midgut epithelial membrane) (Porter et al., 1993)



ภาพที่ 2.1 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy) ของแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ที่มีการสร้างผลึกโปรตีน (crystal) ในระยะที่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งภายในบรรจุด้วยโปรตีนที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง

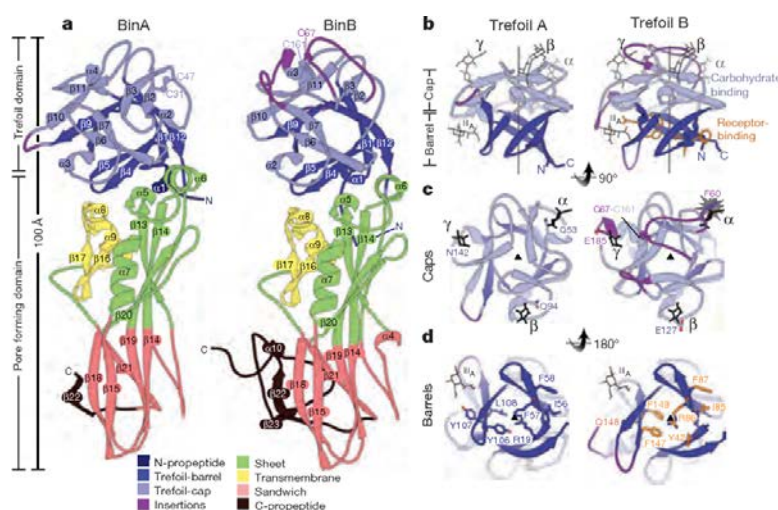
2.1.2 โปรตีนสารพิษชนิดไบนารี Binary toxin

จากการศึกษาโครงสร้างโปรตีน Binary toxin พบว่ามีความยาวประมาณ 100 Å และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25-30 Å (Porter et al., 1993) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน binary ด้วยเทคนิคชีวฟิสิกส์ (biophysical techniques) พบว่าโปรตีน binary toxin มีลักษณะเป็นเฮเทอโรเตตราเมอร์ (heterotetramer) ประกอบด้วย BinA 2 โมเลกุล และ BinB 2 โมเลกุล (Smith et al., 2005) โดย BinA ประกอบด้วย 2 โดเมนคือ N-terminal domain (NTD) ซึ่งน่าจะเป็นส่วนที่สามารถเข้าจับกับ BinB และ C-terminal domain (CTD) มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง (toxic action) โดย CTD แบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ β -Sheet, Transmembrane และ β -sandwich ดังแสดงในภาพที่ 2.2 (Yuan et al., 2001) และจากการวิเคราะห์โครงสร้างของ BinA ด้วยเทคนิค X-ray crystallography ในผลึกร่วมกับ BinB พบว่าโปรตีน BinA ประกอบด้วย β -strand 49.3% และ α -helix 3.1% (Hire et al., 2009) ในโปรตีน BinB ประกอบด้วย 37% β -sheet ซึ่งมากกว่า α -helix ที่มีอยู่เพียง 7% (Tangsongcharoen et al., 2011) โปรตีน BinB แบ่งออกเป็น 2 domain คือ N-terminal domain (NTD) และ C-terminal domain (CTD) โดย NTD เริ่มจากกรดอะมิโน Threonine 19 (Thr19) จนถึง Alanine 200 (Ala200) ที่ประกอบโครงสร้างเป็นรูปทรงกลม มีลักษณะเป็น β -trefoil fold ที่ประกอบไปด้วย 3 motif ได้แก่ Alpha (α), Beta (β) และ Gamma (γ) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 บริเวณ N-terminal domain (NTD) ของ BinB มีความสำคัญในการจับกับตัวตอบรับบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุง ส่วนบริเวณด้านบนของโครงสร้างโปรตีน BinB จะประกอบไปด้วย พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide-bridge) ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโน Cysteine 67 และ Cysteine 161 ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์นี้มีหน้าที่ในการรักษาโครงสร้างให้มีความแข็งแรง และยังมีส่วนช่วยให้โปรตีน BinB ทำงานร่วมกับ BinA ในการแสดงความเป็นพิษอีกด้วย (ศรีสุจรีตพานิช, 2018) โครงสร้างสามมิติของโปรตีน BinA และ BinB มีความคล้ายคลึงกันแต่มีหน้าที่ต่างกัน โดยโปรตีน BinB จะทำหน้าที่จับอย่างจำเพาะกับตัวตอบรับบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุง (Receptor binding subunit) ส่วน BinA ทำหน้าที่เกี่ยวกับความเป็นพิษ (toxic subunit) ดังนั้นเพื่อการทำงานอย่างมีประสิทธิภาพจะใช้ BinA และ BinB ทำหน้าที่ร่วมกันในสัดส่วนที่เท่ากันในการออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุง (Charles et al., 1996)

จากโครงสร้างของโปรตีน BinB ส่วน N-terminal domain มีลำดับกรดอะมิโนกลุ่ม Aromatic ซึ่งมีกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่ Tyrosine, Phenylalanine และ Tryptophan มีอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีความสำคัญในการจับกับกับตัวตอรับอย่างจำเพาะบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุง เนื่องจากกรดอะมิโนที่มี Aromatic ring จะทำการแทงผ่าน lipid membrane ทำให้เกิดเป็นรูรั่ว (Pore formation) ที่เยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุง และนำไปสู่การตายของของลูกน้ำยุง (Singkhamanan et al., 2009)

N-terminal domain ปกคลุมไปด้วยกรดอะมิโน Threonine 19 (Thr19) – Alanine 200 (Ala200) ที่ประกอบโครงสร้างเป็นรูปทรงกลม โดย N-terminal domain นั้นมีลักษณะเป็น β -trefoil fold ที่ประกอบไปด้วย 3 motif ได้แก่ Alpha (α), Beta (β) และ Gamma (γ) ส่วนบริเวณด้านบนจะประกอบไปด้วย พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bridge) ที่เชื่อมระหว่างกรดอะมิโน Cysteine 67 (Cys67) และ Cysteine 161 (Cys161) ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์นี้ถูกเสนอว่ามีหน้าที่ในการรักษาโครงสร้างให้มีความแข็งแรง และยังพบในโครงสร้างของโปรตีนสารพิษชนิด Aerolysin ด้วย นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่ากรดอะมิโน Cysteine มีส่วนช่วยให้โปรตีน BinB ทำงานในการแสดงความเป็นพิษอีกด้วย

C-terminal domain มีรูปร่างยาวภายในประกอบไปด้วยกรดอะมิโน Proline 226 (Pro226) – Threonine 407 (Thr407) โดยรวมของโครงสร้างประกอบไปด้วยสาย β ประมาณ 39% ซึ่งหลายสายมีลักษณะยาวและบิดเข้าไปข้างใน นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยกลุ่มของอะโรมาติกเชื่อมต่อยู่ระหว่าง β -sheet และ Amphipathic loop รวมทั้งพบกรดอะมิโน serine และ threonine อย่างเด่นชัดบนผิวของ domain ซึ่งลักษณะที่พบดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ในโปรตีนสารพิษ Aerolysin β -PFTs (Pore forming toxins) (Srisucharitpanit K., et al., 2014;)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของโปรตีน BinA และ BinB ประกอบไปด้วย 2 โดเมน ได้แก่ N-terminal domain (NTD) และ C-terminal domain (CTD) โดย CTD แบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ β -Sheet (สีเขียว) บริเวณ Transmembrane (สีเหลือง) และ β -sandwich (สีแดง) และ NTD โครงสร้างเป็นรูปทรงกลม มีลักษณะเป็น β -trefoil fold ที่ประกอบไปด้วย 3 motif ได้แก่ Alpha (α), Beta (β) และ Gamma (γ)

2.1.3 กลไกการออกฤทธิ์ของ Binary toxin

โปรตีน BinA และ BinB ที่ถูกสร้างขึ้นใน *L. sphaericus* อยู่ในรูปที่ยังไม่พร้อมทำงานซึ่งมีขนาดประมาณ 42 และ 51 kDa ตามลำดับ จากการทดลองกระตุ้นให้โปรตีนสารพิษอยู่ในรูปที่ทำงานได้ในหลอดทดลองด้วยเอนไซม์จากกระเพาะลูกน้ำยุงพบว่า BinA และ BinB ในสภาพที่พร้อมทำงานจะมีขนาดประมาณ 39 และ 43 kDa ตามลำดับ (Baumann et al., 1987; Nielsen-Leroux and Charles, 1992) หลังจาก BinA และ BinB อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงานแล้ว BinB จะไปจับกับ receptor แล้วจึงเกิดการ internalize นำ BinA และ/หรือ BinB เข้าสู่ midgut cells โดย receptor-mediated endocytosis (Davidson, 1988) และจากศึกษาทางด้าน immunohistochemistry พบว่าทั้ง BinA และ BinB สามารถเข้าสู่ epithelium gut cells ของ *C. quinquefasciatus* ได้ (Silva-Filha and Peixoto, 2003) มีหลักฐานชี้ชัดว่า alpha-glucosidase ในกระเพาะลูกน้ำยุงเป็น receptor ของ binary toxin ได้แก่ *Culex pipiens* (Cpm1), *C. quinquefasciatus* (Cqm1) และ *Anopheles gambiae* (Agm3) จากนั้นมีการศึกษาโดยการโคลน receptor Cpm1 ใน Madin-Darby Canino Kidney (MDCK) และเติม binary toxin พบว่าสามารถทำให้เซลล์เกิดการ permeability ของ plasma membrane และคาดว่าเกิดจากการสร้างรูรั่ว จากนั้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นภายในเซลล์ (Cokmus et al., 1997; Opota et al., 2011; Pauchet et al., 2005) นอกจากนี้ binary toxin ยังสามารถทำให้เกิดรูบน planar lipid bilayer และ large unilamellar phospholipid vesicles (LUVs) โดยไม่ต้องอาศัย receptor (Schwartz et al., 2001) การศึกษาต่อมายังพบว่า BinB มีความสามารถในการแทรกผ่าน lipid membrane แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนทั้ง BinA และ BinB ใน lipid membrane (Boonserm et al., 2006; Surya et al., 2016) จากเหตุการณ์ทั้งหมดจึงคาดว่า binary toxin น่าจะสร้างรูรั่วบนผิว membrane ได้ แต่ไม่มีหลักฐานปรากฏชัดว่าเกิดรูรั่วทำให้เซลล์แตก จึงเชื่อได้ว่า การเกิดรูรั่วเป็นเพื่อเป็นการนำ toxic subunit หรือ BinA เข้าสู่เซลล์ สอดคล้องกับโครงสร้างของโปรตีน BinA และ BinB ที่คล้ายโปรตีนสร้างรูรั่วกลุ่ม Aerolysin หลังจากนั้นเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง เช่น เกิด vacuoles ใน cytoplasm, mitochondria swelling และ เกิดการทำลาย microvilli จนนำไปสู่กระบวนการ apoptosis (Silva-Filha and Peixoto, 2003) แต่ยังไม่มียังข้อมูลสนับสนุนว่า BinA และ/หรือ BinB เข้าไปทำรบกวนเปลี่ยนแปลงหรือยับยั้งกระบวนการในระดับเซลล์จนนำไปสู่การตายของเซลล์ จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าขั้นตอนการออกฤทธิ์ของ binary toxin เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด เนื่องจากโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันของโปรตีน BinAB กับ aerolysin แสดงให้เห็นว่าอาจสร้างรูรั่วในกลไกที่คล้ายกัน

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การสกัด plasmid โดยใช้ชุด GeneJET Plasmid MiniprepKit

นำ single colony จาก master plate มาเลี้ยงใน LB Broth ที่มี 50 µg kanamycin ปริมาตร 4 ml บ่มเชื้อที่ incubator shaker 37°C 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกต LB Broth มีความขุ่น แสดงถึงการมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แบ่งเชื้อแบคทีเรียปริมาตรครั้งละ 1 ml ลงใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บ pellet ไว้ แล้วทิ้ง supernatant จนหมด จากนั้นเติม P1 buffer (Resuspend solution) ที่ผสม RNase แล้ว ปริมาตร 250 µl และนำไป vortex หรือ pipetting เติม P2 buffer (Lysis solution) 250 µl และทำการ mix โดย inverting 4-6 ครั้ง เติม N3 buffer (Neutralize solution) 350 µl และทำการ mix โดย inverting 4-6 ครั้ง (ห้าม vortex เด็ดขาด) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 5 นาที ถ่ายประมาณ 700 µl ของ supernatant ลงใน column และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube (หลอดด้านล่างสุด) เติม Wash Solution 500 µl และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งของเหลวไป เติม Wash solution 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที และทิ้งของเหลวไป (ทำ 2 ครั้ง) ปั่นเหวี่ยงซ้ำที่ 12,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นถอด collection tube (หลอดด้านล่างสุด) ทิ้งไป และเปลี่ยนเอา microcentrifuge tube มาใส่แทน เติมน้ำกลั่น 50 µl ลงใน column ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 2 นาที เก็บพลาสมิดได้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.2 การสร้าง BinB กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Site-directed mutagenesis PCR

ในขั้นตอนนี้จะต้องใช้พลาสมิด pET28b-BinB (wild type) เป็น DNA template และคู่ Primers ที่ออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ต้องการ โดยในขั้นตอนนี้แรกพลาสมิด DNA สายคู่ที่เป็น DNA template (pET28b-BinB (wild type)) จะถูกทำให้แยกออกจากกัน ด้วยความร้อน จากนั้น Primer ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ออกแบบไว้ จะเข้ามาจับกับ DNA template ณ ตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สม ซึ่งตำแหน่งเบสที่มีเปลี่ยนแปลงจะไม่จับกับ DNA template หลังจากนั้นเอนไซม์ High-Fidelity DNA polymerase (Phusion) จะทำการสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่จนครบทั้งพลาสมิด ซึ่งเปลี่ยน wild type plasmid เป็น mutant plasmid ส่วนประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยามีดังแสดงในตารางที่ 3.1 และ 3.2 จากนั้นนำไปทดสอบโดย 1% agarose gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 25 นาที เพื่อตรวจสอบขนาด PCR product

หลังจากนั้นจะคัดเลือกเฉพาะ DNA สายที่สังเคราะห์ใหม่ ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ โดยใช้เอนไซม์ *DpnI* จะทำหน้าที่ย่อยนิวคลีโอไทด์ที่ถูก methylation ของ DNA template ซึ่ง DNA สายใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นจะไม่มีกระบวนการ methylation จึงทำให้เหลือเพียง DNA สายใหม่ ที่มีบริเวณ Mutation ที่ต้องการ

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ BinB กลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Site-directed mutagenesis PCR

องค์ประกอบของสาร	ปริมาณ (µl)
DNA template	50-100 ng
10 mM dNTP mix	1 µl
DMSO	1.5 µl
Forward primer	10 pmole
Reverse primer	10 pmole
5x <i>Phusion</i> GC buffer	10 µl
High-Fidelity DNA polymerase (<i>Phusion</i>)	0.5 µl
Sterile DW	up to 50 µl

ตารางที่ 3.2 PCR profile

Cycle step	Temperature	Time (minute)	Number of cycle
Initial Denaturation	98°C	1:00	1 cycle
Denaturation	98°C	0:10	30 cycles
Annealing	40-55°C	0:30	
Extension	72°C	3:30	
Extension	72°C	5:00	1 cycle

3.3 การนำ mutant plasmid เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 (transformation) โดยวิธี heat shock

นำพลาสมิดที่ถูกตัดด้วย *DpnI* แล้ว 5 µl มาผสมกับ 100 µl ของ *E. coli* JM109 competent cell ที่อยู่ใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการ heat shock เป็นเวลา 90 วินาที ที่ water bath 42°C และรีบจุ่มหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม LB broth ปริมาตร 900 µl และนำไปบ่มที่ 37°C 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 rpm นาน 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง 900 µl เหลือ 100 µl ผสมให้เข้ากันกับตะกอนโดยดูดขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำมา spread ลงบน LB agar plate ที่มี 50 µg kanamycin และบ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.4 การวัดความเข้มข้นของ DNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ 260 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยสารละลาย TE buffer (1X) ในอัตราส่วน 1:100 (DNA 5 μ l :TAE buffer (1X) 495 μ l) และนำไปวัดค่า OD ที่ช่วงความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 nm โดยความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตรดังต่อไปนี้ คือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอค่า $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$ โดยค่า OD_{260} คือค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงแสง 260 nm ของสารละลายดีเอ็นเอ และ 50 $\mu\text{g/ml}$ คือความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอสายคู่ที่ OD_{260} ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 ส่วน dilution factor คืออัตราส่วนที่ใช้ในการเจือจางสำหรับการประเมินคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} และ OD_{280} โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะต้องมีค่าประมาณ 1.8

3.5 การตรวจสอบโคลนกลายพันธุ์ (mutant screening) ที่อยู่ใน *E. coli* สายพันธุ์ JM109

นำโคโลนีที่ขึ้นบน LB agar plate ที่มี 50 μg kanamycin (ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.3) มาทำ master plate จำนวน 5 โคโลนี บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีจาก master plate มาเลี้ยงใน LB broth 4 ml ที่มี 50 μg kanamycin บ่มเชื้อที่ shaker incubator 37°C 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุด GeneJET Plasmid MiniprepKit(ตามขั้นตอนที่ 3.1) จากนั้นตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ตามขั้นตอนที่ 3.2) ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 V เวลา 25 นาที การตรวจหาโคลนกลายพันธุ์ด้วยการทำ DNA sequencing โดยบริษัท Macrogen Inc. ใช้ T7 promoter และ T7 terminator primers เป็นตัวเริ่มต้นการคัดลอกสายดีเอ็นเอเมื่อสิ้นสุดปฏิบัติการ DNA sequencing ที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่เป็น wild type

3.6 การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ใน *E. coli* BL21(DE3)pLysS ด้วยการทำให้ small scale expression

นำ recombination plasmid ที่ได้ transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS มาคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ recombination plasmid ด้วยการทำให้ small scale expression โดยการคัดเลือกโคลนที่มี recombination plasmid นั้นแบคทีเรียจะสามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin ในขั้นตอนแรกทำการเลี้ยงเซลล์ใน LB broth 4 ml ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin 4 μ l และ chloramphenicol 4 μ l โดยทำการบ่มที่ 37°C ด้วยความเร็วรอบ 250 rpm เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเข้าสู่ระยะ mid-Log phase นั่นก็คือวัดได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 จากนั้นจึงได้ทำการเติมสาร 1M IPTG ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียมีการเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน BinB กลายพันธุ์ บ่มเชื้อที่ 37°C ข้ามคืน หลังจากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้ได้ค่า 0.2-0.7 จากนั้นปั่นด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 นาที และ

นำมาผสมกับ 4X sample buffer เตรียมโปรตีนเพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3.7 การศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ใน *E. coli* BL21(DE3)pLysS ด้วยการทำให้ Large scale expression

ภายหลังจากการเตรียมแบคทีเรียตัวเริ่มต้น (starter) โดยการเลือก single colony ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่มี recombinant plasmid ที่มีการเจริญใน LB broth ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin และ chloramphenicol โดยคัดเลือกโคลนที่พบว่าเมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG มีการแสดงออกของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที (rpm) หลังจากนั้นนำแบคทีเรียตัวเริ่มต้น 1% starter เลี้ยงใน LB broth 700 ml ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin 700 µl และ chloramphenicol 700 µl บ่มที่ 37°C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเข้าสู่ระยะ mid-log phase นั่นก็คือวัดได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6 จากนั้นจึงได้ทำการเติมสาร 0.2 mM IPTG ลงไปเพื่อเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน BinB กลายพันธุ์ บ่มที่ 18 °C เป็นเวลาประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นปั่นด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 10 นาที เก็บเซลล์ส่วน pellet ไว้ที่ -80 °C เพื่อนำไปใช้ในการสกัดแยกโปรตีน BinB กลายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ HiTrap™ Ni column

3.8 Protein purification

นำส่วน pellet ของ *E. coli* ที่เก็บไว้ที่ -80 °C มาเติม lysis buffer แล้วนำไปทบททำให้เซลล์แตกโดยเครื่อง ultrasonicator จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วน supernatant มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการ histidine affinity chromatography โดยใช้ 25 mM-250mM imidazole ที่มีความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมากตามลำดับ เก็บส่วน elution fraction ที่มีโปรตีน BinB อยู่ ทบทหลังจากนั้นตรวจสอบโปรตีนโดย SDS-PAGE และกำจัดเกลือในโปรตีนออกโดยการทำให้บริสุทธิ์อีกรอบโดยใช้ desalting column หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์มาวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ A₂₈₀ และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย SDS-PAGE อีกครั้ง

3.9 Mosquito-larvicidal activity assay

Toxicity ของโปรตีนจะถูกทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญระยะที่ 2 (second-instar *Culex quinquefasciatus* larvae) โดยโปรตีน BinA และ BinB จะถูกผสมกันในอัตราส่วน 1:1 molar ratio และทำ 2-fold dilution ด้วยน้ำกลั่น ทำให้เป็นความเข้มข้นต่างๆ กัน (4 µg/ml – 0.002 µg/ml) จากนั้นนำ toxin 1 ml แต่ละความเข้มข้นใส่ใน 24-well tissue culture plate ที่มีลูกน้ำยุงหุ้มละ 10 ตัวอยู่ในน้ำ 1 ml โดย BinB wide-type อย่างเดียว ใช้เป็น negative control จากนั้นนับลูกน้ำยุงตัวตายและบันทึกหลังจากให้ toxin เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณค่า % mortality

3.10 การทดสอบ Receptor binding assay

3.10.1 การเตรียมลูกน้ำยุงเพื่อย้อม immunohistochemistry

เตรียมลูกน้ำเพื่อนำมาทดสอบ BinB ว่ามีประสิทธิภาพในการจับกับ receptor ในกระเพาะลูกน้ำยุง โดยทำการย้อม immunohistochemistry และย้อมยีนผลเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีการทำคือนับจำนวนลูกน้ำยุงราคาอายุ 10 ตัวในระยะที่ 3 ในน้ำกลั่น 1 ml ใส่ลงในหลุมของ 24 well plate จากนั้นทดสอบกับโปรตีน BinB wide type และ BinB mutants ลงใน plate ตามลำดับ ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นย้ายลูกน้ำที่ทดสอบกับโปรตีนแล้ว แยกมาใส่ใน eppendrop โดยแยกตามชนิดของโปรตีน และ negative control คือลูกน้ำยุงที่ไม่ได้ทดสอบกับโปรตีน (untreated larvae) อีก 10 ตัวต่อน้ำกลั่น 1 ml ใส่ลงใน eppendrop แล้วนำไป fix ด้วย 4% Paraformaldehyde และแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 1xPBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และสุดท้ายเก็บใน 1xPBS ที่อุณหภูมิ 4°C

3.10.2 กระบวนการ Tissue processing

เป็นขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุงที่ผ่านการ fixed มาแล้วไปผ่านกระบวนการ tissue processing เพื่อให้ชิ้นเนื้อเยื่อนั้นมีความแข็งพอที่จะตัดออกเป็นชิ้นบางๆ (paraffin section) ได้ง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น การทำให้ตัวกลางที่เป็นน้ำยาเคมีต่างๆ แทรกซึมเข้าไปในส่วนประกอบต่างๆ ของชิ้นเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากนำเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุงมาห่อด้วยกระดาษบางและใส่ใน cassette ลงใน jar เพื่อดึงน้ำออก (dehydration) โดยแช่ในสารละลาย 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol และ 100% ethanol อย่างละ 30 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นแช่ใน xylene ผสมกับ melted paraplast ที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ melted paraplast ที่อุณหภูมิ 56°C อีก 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุงมา embedding ต่อไป

3.10.3 กระบวนการ Embedding และ Sectioning

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการ Process แล้วมาวางเรียงลงใน mold ที่มี melted paraplast แล้วทำเป็น block จน paraffin เริ่มแข็งก็นำมาใส่ melted paraplast จนเต็ม mold แล้วนำ ring มาประกบไว้ จากนั้นนำไปวางบนแท่นเย็นเพื่อรอให้ block แข็งจึงถอดออกมาจาก mold ได้ โดยทำ 1ตัว/1mold (ต้อง labeled ลงบน ring ให้ชัดเจน) จากนั้นนำไป section ออกมาเป็น ribbon โดยใช้เครื่อง microtome แล้วนำลงไป water bath เพื่อให้ ribbon ยืดจนสุด ไม่มีรอยยับ จากนั้นนำสไลด์ที่ coat ด้วย silane มาซ้อนเพื่อให้ paraffin section อยู่บนสไลด์ แล้ววางไว้บนแท่นอบที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้เนื้อเยื่อติดสไลด์ดีขึ้น

3.10.4 การย้อม immunohistochem

เพื่อศึกษาความสามารถในการจับกันของโปรตีน BinB กับ receptor บนเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุง และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำสไลด์ที่ได้ไป rehydrate ก่อนโดยแช่ในสารละลาย 100% ethanol, 95% ethanol, 90% ethanol, 80% ethanol และ 70% ethanol อย่างละ 30 นาที

ตามลำดับ จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการย้อมโดยการย้อมด้วย endogenous peroxidase ด้วย 3% H₂O₂ หยดลงบนสไลด์จนท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างออกด้วย T-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำการย้อมด้วย non-specific binding ด้วย goat serum (1:200) ลงบนสไลด์จนท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 45 นาที แล้วล้างออกด้วย T-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นโปรตีน BinB wild-type หรือ BinB mutants ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น LC₅₀ หยดลงบนสไลด์จนท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 45 นาที แล้วล้างออกด้วย T-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำการลง primary antibody โดยใช้ anti-BinB (1:10000) บนสไลด์จนท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 45 นาที แล้วล้างออกด้วย T-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นลง secondary antibody โดยใช้ biotin-goat anti-rabbit IgG (1:200) บนสไลด์จนท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 45 นาที แล้วล้างออกด้วย T-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นลง horseradish peroxidase labeled streptavidin (1:500) บนสไลด์จนท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ 45 นาที แล้วล้างออกด้วย T-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วทำการหยด DAB (ทำในที่มืดเท่านั้น) ซึ่งเป็น Chromogen จะปรากฏสีน้ำตาลตรงตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่มีแอนติบอดีไปจับอยู่กับแอนติเจน หยดทิ้งไว้ 5-7 นาที แล้วนำไปล้างน้ำกลั่น 3 รอบ รอบละ 5 นาที แล้ว clear ด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที สุดท้ายทำการ permount และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 เปรียบเทียบโครงสร้างเพื่อคัดเลือกตำแหน่งที่จะดำเนินงานวิจัยและออกแบบไพรเมอร์

โครงสร้างของโปรตีน BinB ในส่วน N-terminal domain ที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับโมเลกุลของน้ำตาล (some sugar binding proteins) ซึ่งเต็มไปด้วยกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (aromatic rich domain) จำนวน 22 ตัว โดยผู้วิจัยสนใจเลือกศึกษากรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกที่หมุนด้าน side chain ออกด้านนอก ซึ่งเปรียบเทียบจากโครงสร้างสามมิติของโปรตีน BinB และผู้วิจัยทำการกลายพันธุ์กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนในโปรตีน BinB ได้แก่ตำแหน่ง F147, F149 และ F147/149 ของโปรตีนสารพิษ BinB และกรดอะมิโนไทโรซีนในโปรตีน BinB ได้แก่ตำแหน่ง Y53, Y72, Y76, Y94 และ Y111 โดยเปลี่ยนรหัส codon ของตำแหน่งดังกล่าวให้เป็นรหัส codon ของกรดอะมิโนอะลานีน ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 Primers ที่ออกแบบสำหรับ PCR site-directed mutagenesis

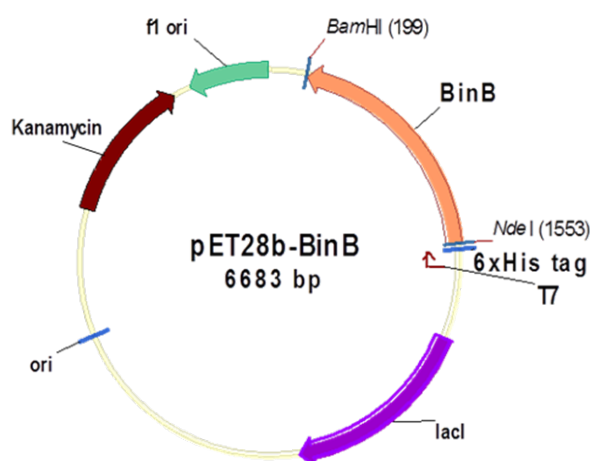
Mutagenic primers	Sequences	Tm (°C)
F147A_forward	5'- G GGA GAG CAA TTT GCC CAA TTC TAT ACA -3'	64
F147A_reverse	5'- T TCA TCC ACG AAG TAG ACG TTG AAG AGG -3'	64
F149A_forward	5'- A GAG CAA TTT TTT CAA GCG TAT ACA CA -3'	61
F149A_reverse	5'- A AAC ACA TAT GCG AAC TTT TTT AAC GA -3'	61
F147/149A_forward	5'- A GAG CAA TTT GCG CAA GCT TAT ACA CAA -3'	61
F147/149A_reverse	5'- CAA AAC ACA TAT TCG AAC GCG TTT AAC GA -3'	61
Y53A_forward	5'-CACGG AATGGTGCAGGTTTATCAAAAACC-3'	60
Y53A_reverse	5'-GGTTTTTGATAAACCTGCACCATTCCGTG-3'	60
Y72A_forward	5'-CCCATCTAACGAAGCTTCAATAATGTATGA-3'	57
Y72A_reverse	5'-TCATACATTATTGAAGCTTCGTTAGATGGG-3'	57
Y76A_forward	5'-CGAATATTCAATAATGGCCGATAATAAAGATC-3'	57
Y76A_reverse	5'-GATCTTTATTATCGGCCATTATTGAATATTCG-3'	57
Y94A_forward	5'-GATGATGGTAGAGCTATTATTGCAGATAGAG-3'	59

Y94A_reverse	5'-CTCTATCTGCAATAATAGCTCTACCATCATC-3'	59
Y111A_forward	5'-GCACCTACTGCATTGGATAATAACAATCACC-3'	60
Y111A_reverse	5'-GGTGATTGTTATTATCCAATGCAGTAGGTGC-3'	60

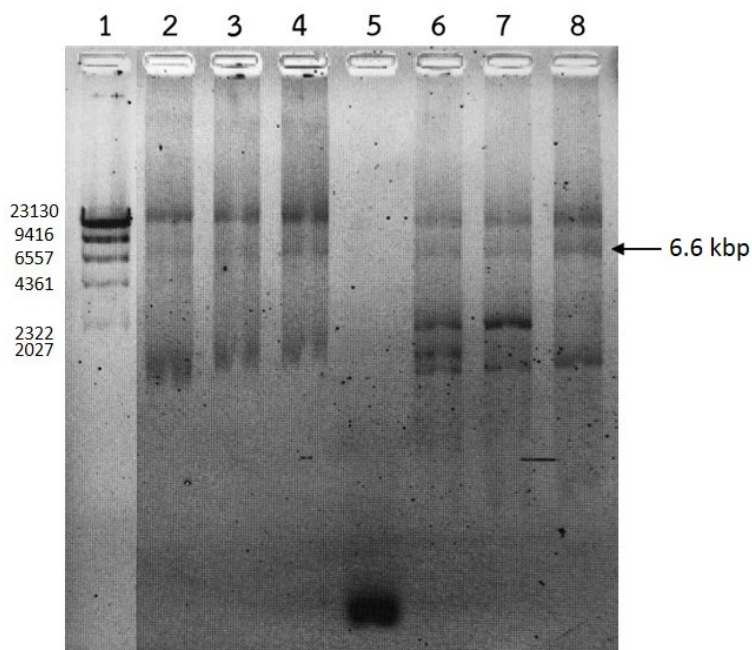
หมายเหตุ ตำแหน่งที่ทำการกลายพันธุ์ระบุเป็นตัวอักษรหนา

4.1.2 PCR site-directed mutagenesis

ในการทำ PCR based site-directed mutagenesis เพื่อสร้าง mutant plasmids จะต้องใช้พลาสมิด pET28b-BinB (wild type) เป็น DNA template ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.1 และคู่ของ mutagenic primers ที่ออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ต้องการที่ออกแบบไว้ (ตารางที่ 4.1) ในการทำ PCR นี้จะใช้ Phusion DNA polymerase และองค์ประกอบของ PCR แสดงในตารางที่ 3.1 สำหรับ PCR profile แสดงในตารางที่ 3.2 โดยผลการทดลองพบว่ามี PCR product เกิดขึ้นที่ขนาดประมาณ 6.6 Kbp ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.2-4.4 จากปริมาณ PCR products ที่ annealing temperature ต่างๆ แสดงให้เห็นว่า annealing temperature ที่เหมาะสมของ pET28b-BinB_F147A, pET28b-BinB_F149A และ pET28b-BinB_F147/149A คือ 50°C ,50°C และ 45°C ตามลำดับ สำหรับ PCR products ของ pET28b-BinB_Y53A, pET28b-BinB_Y72A, pET28b-BinB_Y76A, pET28b-BinB_Y94A และ pET28b-BinB_Y111A มี annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 50°C หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR based site-directed mutagenesis แล้วต้องกำจัด DNA template ด้วยเอนไซม์ DpnI



รูปภาพที่ 4.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28b-BinB (wild type)



รูปภาพที่ 4.2 PCR product F147A, F149A จากการทำ site-directed mutagenesis แสดงบน 1% agarose gel electrophoresis

Lane 1: Lamda/*Hind*III DNA marker

Lane 2: pET28b-BinB_F147A, annealing temperature 40°C

Lane 3: pET28b-BinB_F147A, annealing temperature 45°C

Lane 4: pET28b-BinB_F147A, annealing temperature 50°C

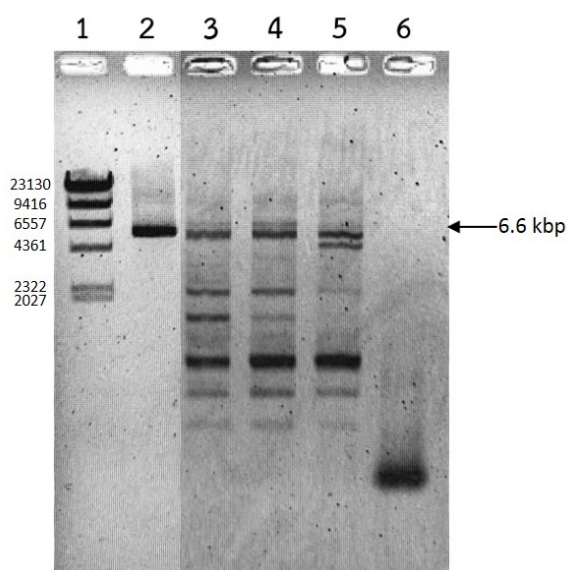
Lane 5: negative control สำหรับ pET28b-BinB_F147A

Lane 6: pET28b-BinB_F149A, annealing temperature 40°C

Lane 7: pET28b-BinB_F149A, annealing temperature 45°C

Lane 8: pET28b-BinB_F149A, annealing temperature 50°C

Lane 9: negative control สำหรับ pET28b-BinB_F149A



รูปภาพที่ 4.3 PCR product F147/149A จากการทำ site-directed mutagenesis แสดงบน 1% agarose gel electrophoresis

Lane 1: Lamda/*Hind*III DNA marker

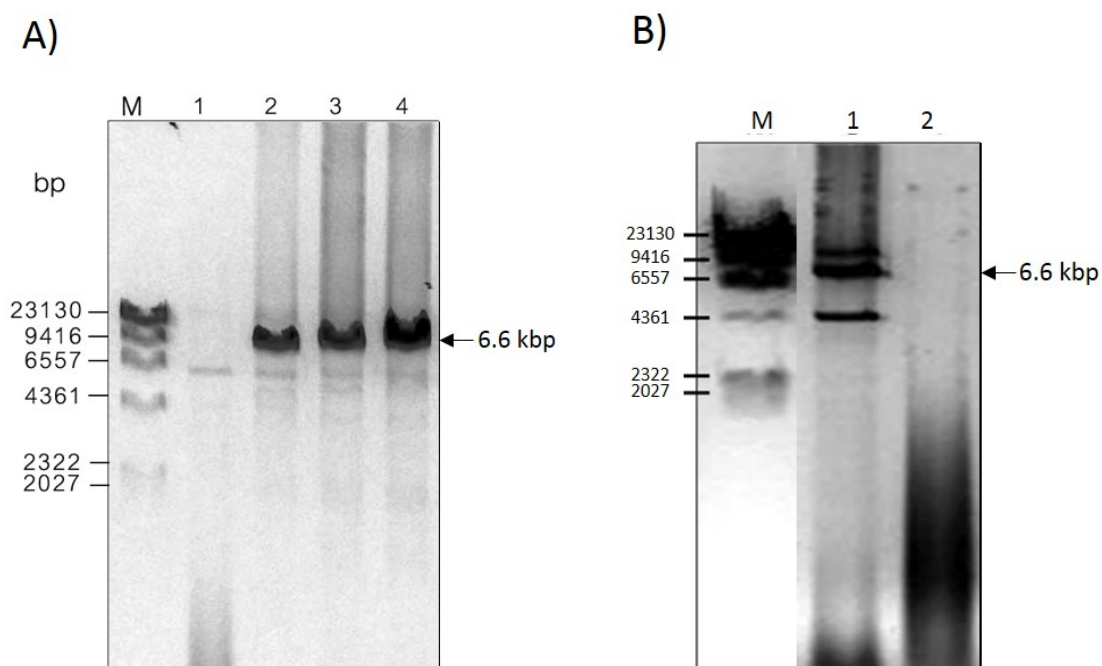
Lane 2: pET28b-BinB wild-type

Lane 3: pET28b-BinB_F147/149A, annealing temperature 40°C

Lane 4: pET28b-BinB_F147/149A, annealing temperature 45°C

Lane 5: pET28b-BinB_F147/149A, annealing temperature 50°C

Lane 6: negative control สำหรับ pET28b-BinB_F147/149A



รูปภาพที่ 4.4 PCR product Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A จากการทำ site-directed mutagenesis แสดงบน 1% agarose gel electrophoresis

A) PCR product ของ Y53A, Y76A, Y94A และ Y111A

Lane M: Lamda/*Hind*III DNA marker

Lane 1: pET28b-BinB Y53A, annealing temperature 55°C

Lane 2: pET28b-BinB_Y76A, annealing temperature 55°C

Lane 3: pET28b-BinB_Y94A, annealing temperature 55°C

Lane 4: pET28b-BinB_Y111A, annealing temperature 55°C

B) PCR product ของ Y72A

Lane M: Lamda/*Hind*III DNA marker

Lane 1: pET28b-BinB Y72A, annealing temperature 55°C

Lane 2: negative control (without DNA template)

4.1.3 การเหนี่ยวนำ mutant plasmids เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* DH5 α competent cells ด้วยวิธี Heat shock method

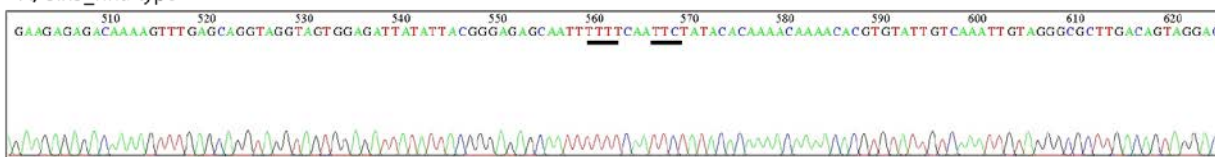
หลังจากทำการกำจัด DNA template ด้วยเอนไซม์ *DpnI* แล้วนำปฏิกิริยานั้นไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α competent cells โดยนำปฏิกิริยาที่ถูกตัดด้วย *DpnI* แล้ว 5 μ l มาผสมกับ *E. coli* DH5 α competent cells ผสมให้เข้ากันเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำการ heat shock ที่ 42 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นรีบแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม LB broth ปริมาตร 900 μ l และนำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C ใน shaker incubator 250 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 rpm นาน 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง 900 μ l เหลือ 100 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมา spread ลงบน LB agar plate ที่มี 50 μ g/ml kanamycin และบ่มเชื้อที่ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

หลังจากนั้นเลือกโคโลนีที่ขึ้นบน LB agar plate ที่มี 50 μ g/ml kanamycin มาทำ master plate จำนวน 5 โคโลนี บ่มที่ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และโคโลนีจาก master plate มาเลี้ยงใน LB broth ที่มี 50 μ g/ml kanamycin ปริมาตร 5 ml บ่มเชื้อที่ 37 $^{\circ}$ C ใน shaker incubator 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุด GeneJET Plasmid Miniprep Kit เพื่อนำพลาสมิดจากแต่ละโคลนมาตรวจสอบด้วยวิธี DNA sequencing

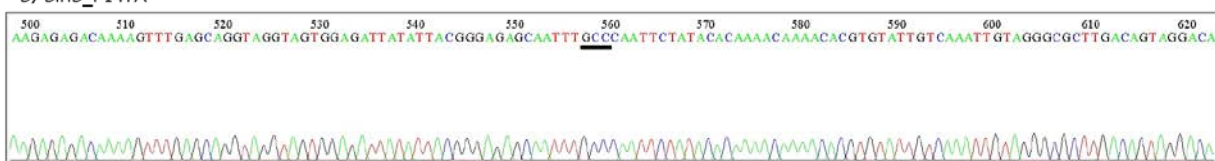
4.1.4 DNA sequencing ของ pET28b-BinB_ F147A, F149A

จากผล DNA sequencing ของพลาสมิดจากโคลนพบว่าลำดับ DNA sequence ของ mutant plasmids ของ pET28b_BinB F147A และ pET28b_BinB F149A ได้ถูกต้องตามทีออกแบบ mutagenic primer ไว้ให้สามารถเปลี่ยนเป็น mutant plasmid ได้ (รูปภาพที่ 4.5) และลำดับ DNA sequence ของ mutant plasmids ของ pET28b_BinB Y53A, pET28b_BinB Y72A, pET28b_BinB Y76A, pET28b_BinB Y94A และ pET28b_BinB Y111A พบว่าลำดับ DNA ถูกต้องตามลำดับ codon ของอะลานีน (รูปภาพที่ 4.6) หลังจากนั้นนำ mutant plasmids ไปผลิตโปรตีนในขั้นตอนต่อไป แต่ลำดับ DNA sequence ของ pET28b_BinB F147/149A ยังไม่ใช่ mutant plasmid ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการแก้ไขต่อไป

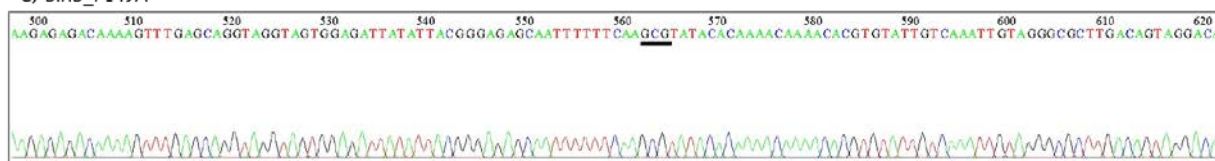
A) BinB_wild type



B) BinB_F147A



C) BinB_F149A



รูปภาพที่ 4.5 ผล DNA sequencing โดยลำดับ DNA ของกรดอะมิโนตำแหน่ง F147 และ F149 ระบุด้วยการขีดเส้นใต้สีดำ

- A) DNA sequence ของ pET28b_BinB wild-type
- B) DNA sequence ของ pET28b_BinB F147A
- C) DNA sequence ของ pET28b_BinB F149A

			261	270	280	
A) Y53A	BinB_Y53A (261)		TCACGGAATGGT	GCA	GGTTTATCAA	
	BinB_WT (145)		TCACGGAATGGT	TAT	GGTTTATCAA	
			326	340	350	
B) Y72A	BinB_Y72A (324)		TCTAACGAA	GCTTCAATAATG	TATGAT	
	BinB_WT (205)		TCTAACGAA	TATTCAATAATG	TATGAT	
			326	340	350	
C) Y76A	BinB_Y76A (320)		TCTAACGAA	TATTCAATAATG	GCCGATA	
	BinB_WT (205)		TCTAACGAA	TATTCAATAATG	TATGATA	
			391	400	410	
D) Y94A	BinB_Y94A (388)		TGATGGTAGA	GCTATTATT	TGCAGA	
	BinB_WT (270)		TGATGGTAGA	TATATTATT	TGCAGA	
			430	440	455	
E) Y111A	BinB_Y111A (389)		AGTTTTTGATGAAGCACCTACT	GCA	T	
	BinB_WT (270)		AGTTTTTGATGAAGCACCTACT	TAT	T	

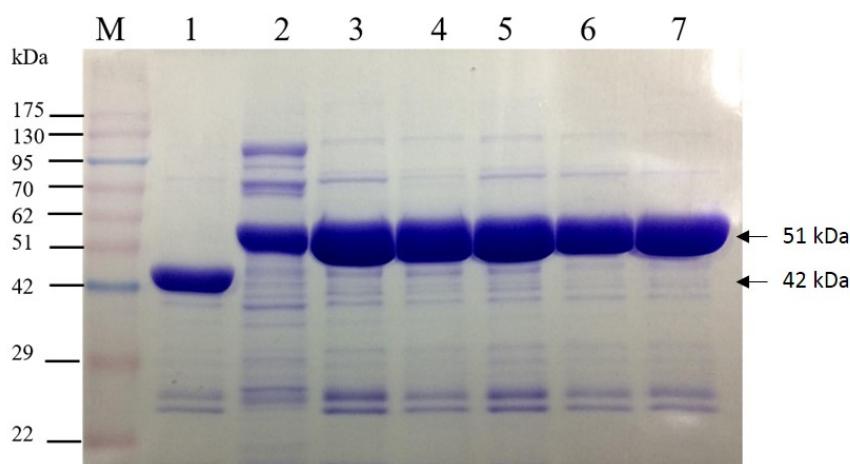
รูปภาพที่ 4.6 ผล DNA sequencing โดยลำดับ DNA ของกรดอะมิโนตำแหน่ง Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A ระบุด้วยการขีดเส้นใต้สีดำ

- A) DNA sequence ของ pET28b_BinB Y53A
- B) DNA sequence ของ pET28b_BinB Y72A
- C) DNA sequence ของ pET28b_BinB Y76A
- D) DNA sequence ของ pET28b_BinB Y94A
- E) DNA sequence ของ pET28b_BinB Y111A

4.1.5 การแสดงออกของโปรตีน binary toxin ต้นแบบ และโปรตีนกลายพันธุ์ ใน *E.coli* BL21(DE3)pLysS

หลังจากการตรวจสอบลำดับ DNA แล้ว เลือกโคลนที่มี recombinant plasmid ที่ลำดับ DNA ถูกต้องมา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) เพื่อให้ผลิตโปรตีน (expression protein) และคัดเลือกโคลนที่ได้รับ recombinant plasmid จากความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญบน LB agar plate ที่ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะ kanamycin และ chloramphenicol ได้ นอกจากนี้คัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตโปรตีนกลายพันธุ์ได้ ด้วยการทำ small scale expression จากการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีน หลังจากเลือกโคลนที่สามารถผลิตโปรตีนได้แล้วนั้น นำมาทำ large scale expression หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปปั่นตกเก็บเซลล์เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอีกครั้งด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate- polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และนำเซลล์ที่ปั่นเก็บไว้ไปคัดแยกให้ได้แต่โปรตีน BinB หรือ BinA ด้วยเทคนิค protein purification โดยใช้หลักการ histidine

affinity chromatography ผลจากการวิเคราะห์พบว่า *E. coli* BL21(DE3)pLysS ที่มี recombinant plasmid ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG จะมีการแสดงออกของโปรตีน BinB ทั้ง wild-type และ mutant ที่มีขนาดประมาณ 51 kDa โดยจะพบแถบของโปรตีน BinB กลายพันธุ์บน SDS-PAGE gel และโปรตีน BinA wild-type มีขนาดประมาณ 42 kDa และโปรตีนเหล่านี้ทั้งหมดถูกผลิตออกมาในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ (soluble form) (รูปภาพที่ 4.7-4.9)



รูปภาพที่ 4.7 ผลของโปรตีน BinA wild-type, BinB wild-type และ BinB กลายพันธุ์ Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A

Lane M: Marker

Lane 1: BinA wild-type (42 kDa)

Lane 2: BinB wild-type (51 kDa)

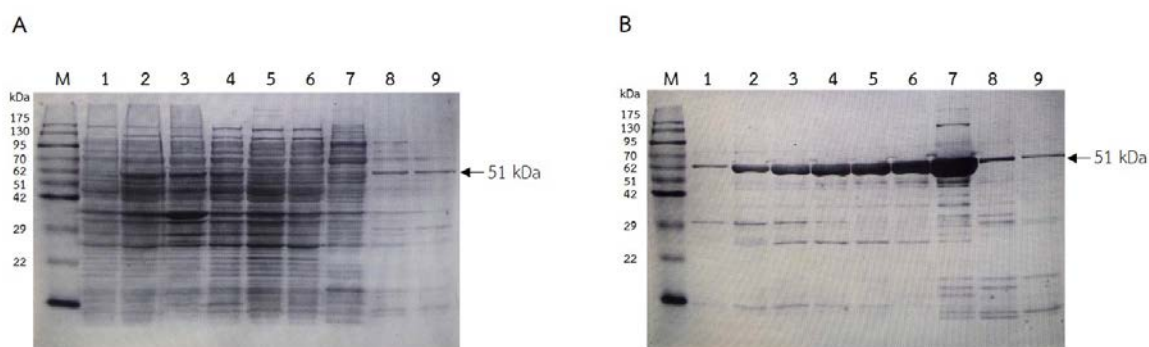
Lane 3: BinB Y53A

Lane 4: BinB Y72A

Lane 5: BinB Y76A

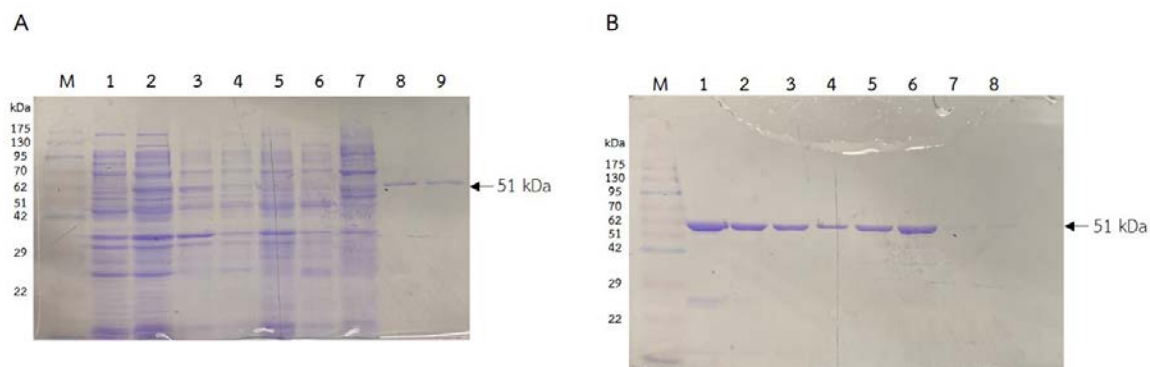
Lane 6: BinB Y94A

Lane 7: BinB Y111A



รูปภาพที่ 4.8 ผลของการแสดงออกและ protein purification ของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ F147A

- A) Lane M: Marker
 Lane 1: Non-induction
 Lane 2: Induction with 0.2mM IPTG
 Lane 3: Pellet fraction
 Lane 4: Supernatant fraction
 Lane 5: Flow through
 Lane 6: Wash with lysis buffer
 Lane 7: Wash with 25 mM imidazole
 Lane 8: Wash with 50 mM imidazole
 Lane 9: Wash with 100 mM imidazole fraction 1
- B) Lane M: Marker
 Lane 1: Wash with 100 mM imidazole fraction 2
 Lane 2: Wash with 100 mM imidazole fraction 3
 Lane 3: Wash with 100 mM imidazole fraction 4
 Lane 4: Wash with 100 mM imidazole fraction 5
 Lane 5: Wash with 250 mM imidazole fraction 1
 Lane 6: Wash with 250 mM imidazole fraction 2
 Lane 7: Wash with 250 mM imidazole fraction 3
 Lane 8: Wash with 250 mM imidazole fraction 4
 Lane 9: Wash with 250 mM imidazole fraction 5



รูปภาพที่ 4.9 ผลของการแสดงออกและ protein purification ของโปรตีน BinB กลายพันธุ์ F149A

- A) Lane M: Marker
 Lane 1: Non-induction
 Lane 2: Induction with 0.2mM IPTG
 Lane 3: Pellet fraction
 Lane 4: Supernatant fraction
 Lane 5: Flow through
 Lane 6: Wash with lysis buffer
 Lane 7: Wash with 25 mM imidazole
 Lane 8: Wash with 50 mM imidazole
 Lane 9: Wash with 100 mM imidazole fraction 1
- B) Lane M: Marker
 Lane 1: Wash with 100 mM imidazole fraction 2
 Lane 2: Wash with 100 mM imidazole fraction 3
 Lane 3: Wash with 100 mM imidazole fraction 4
 Lane 4: Wash with 100 mM imidazole fraction 5
 Lane 5: Wash with 250 mM imidazole fraction 1
 Lane 6: Wash with 250 mM imidazole fraction 2
 Lane 7: Wash with 250 mM imidazole fraction 3
 Lane 8: Wash with 250 mM imidazole fraction 4

4.1.6 การออกฤทธิ์ของโปรตีน binary toxin ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus*

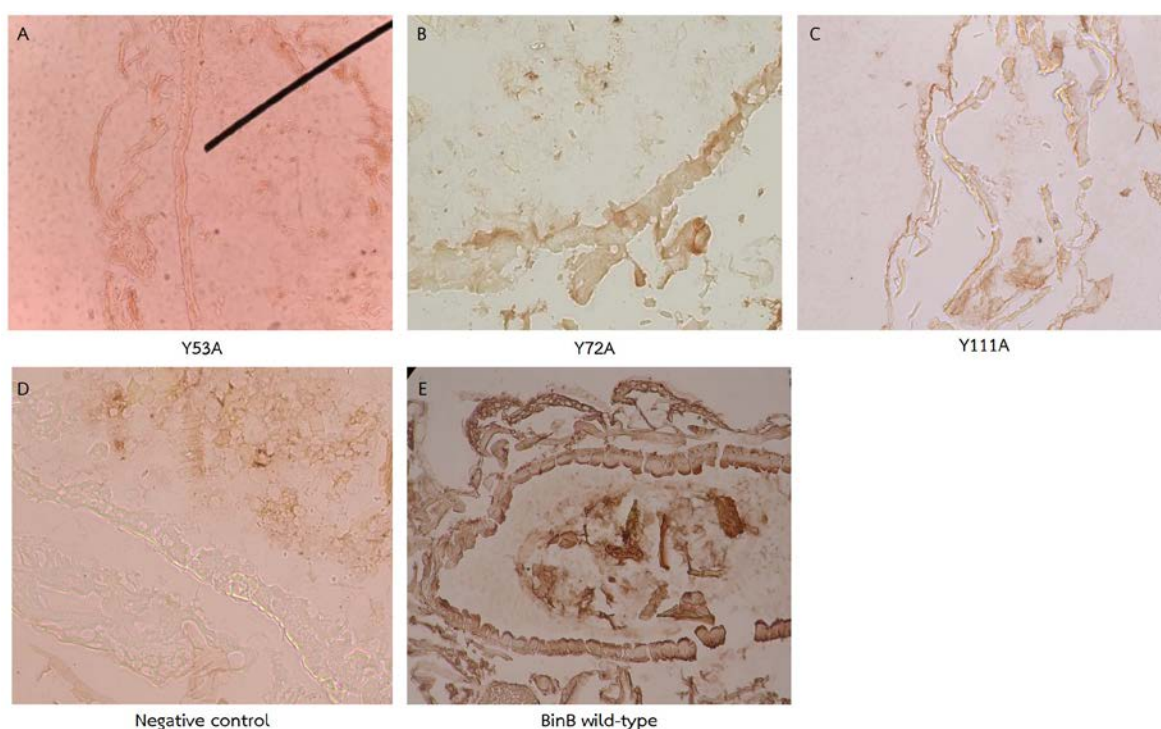
นำโปรตีน BinB กลายพันธุ์ Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A แต่ละชนิดผสมกับ BinA wild-type ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 µg/ml – 0.002 µg/ml ซึ่งเจือจาง 2 เท่า และนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex quinquefasciatus* ระยะที่ 2 หลังจากนั้นนับลูกน้ำที่ตายและคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ลูกน้ำยุงตายครึ่งหนึ่ง (LC₅₀) จากผลการทดลองพบว่า โปรตีนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y53A, Y72A และ Y111A มีความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงได้ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนต้นแบบ wild-type (ตารางที่ 4.2) ผู้วิจัยจึงคาดว่า tyrosine ที่ตำแหน่ง Y53A, Y72A และ Y111A น่าจะเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อความเป็นพิษของโปรตีน

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการออกฤทธิ์ของโปรตีนกลายพันธุ์ต่อการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ

โปรตีน	LC ₅₀ (ng/ml)
BinB (negative control)	NA
BinA + BinB wild-type (positive control)	25.12
BinA + BinB Y53A	26.32
BinA + BinB Y72A	26.90
BinA + BinB Y76A	24.83
BinA + BinB Y94A	15.45
BinA + BinB Y111A	28.50

4.1.7 ทดสอบความสามารถของโปรตีน BinB ในการจับกับเนื้อเยื่อกระเพาะลูกน้ำยุง (Receptor binding assay) ด้วยเทคนิคการย้อม Immunohistochemistry

จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ในลูกน้ำยุง ผู้วิจัยเลือกโปรตีนกลายพันธุ์ที่มีความสำคัญที่แสดงความเป็นพิษลดลงมาศึกษาการจับกันของโปรตีน BinB Y53A, Y72A และ Y111A จับกับ receptor บน microvilli ในกระเพาะลูกน้ำยุง โดยทำการเตรียมลูกน้ำยุงและดูการจับกันด้วยการย้อม Immunohistochemistry จะพบว่า microvilli ในกระเพาะลูกน้ำยุงที่ทดสอบกับโปรตีน BinB Y53A, Y72A และ Y111A จะติดสีน้ำตาลแต่สีจางกว่า BinB wild-type ในขณะที่กระเพาะลูกน้ำยุงที่ทดสอบกับ Tris buffer (negative control) จะไม่เกิดสีน้ำตาลที่ microvilli เป็นไปได้ว่าที่ตำแหน่ง Y53A, Y72A และ Y111A อาจจะมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการจับกับ receptor บนผิวกระเพาะลูกน้ำยุง จึงทำให้ความเป็นพิษลดลง ดังแสดงในรูปภาพที่ 4.10



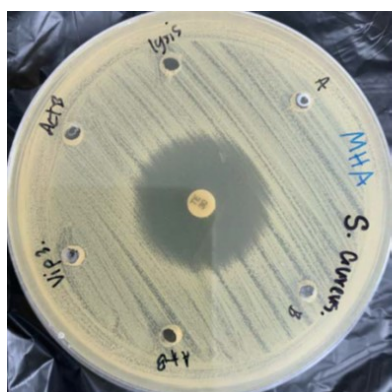
รูปภาพที่ 4.10 ผลการย้อม Immunohistochemistry

- A: โปรตีน BinB Y53A
- B: โปรตีน BinB Y72A
- C: โปรตีน BinB Y111A
- D: Tris buffer (Negative control)
- E: โปรตีน BinB wild-type (Positive control)

4.1.8 ทดสอบความเป็นพิษของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์ต่างๆ นอกจากเซลล์เป้าหมาย

1) ทดสอบฤทธิ์ของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์แบคทีเรีย

นำโปรตีน binary toxin ได้แก่ BinA อย่างเดียว, BinB อย่างเดียว, BinA ผสมกับ BinB, Activated BinB เป็นโปรตีนที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ trypsin เพื่อจำลองให้เหมือนในกระเพาะอาหารลูกน้ำยุง นอกจากนี้ยังใช้โปรตีน Vip3Aa ซึ่งเป็นโปรตีนชีวภาพที่มีฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้ที่เป็นศัตรูพืช นำมาทดสอบ antibacterial activity เปรียบเทียบด้วย โดยเตรียมอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ Gram-positive bacteria; *Staphylococcus aureus* และ Gram-negative bacteria; *Escherichia coli* โดยบ่มเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปรับให้ได้ 0.5 McFarland และนำเชื้อไป spread บนอาหาร MHA แล้วเจาะรูอาหาร MHA 6 รู เพื่อหยอดโปรตีนที่ความเข้มข้น 15 mg/ml ได้แก่ BinA, BinB, BinA+BinB, Act B, Vip3 และ lysis buffer (Negative control) 5 μ l พร้อมทั้งวาง disk ยา tetracycline ตรงกลางเพลท นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าโปรตีน binary toxin และ Vip3Aa ไม่ทำให้เกิด inhibition zone ขั้รอบหลุมที่หยอดโปรตีน (รูปภาพที่ 4.11) ซึ่งเหมือนกับผลของ lysis buffer แสดงว่าโปรตีน binary toxin ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในขณะที่ผลของยา tetracycline ต่อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เกิด inhibition zone 26 nm (Susceptible) และต่อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เกิด inhibition zone 22 nm (Susceptible)



Gram-positive bacteria



Gram-negative bacteria

รูปภาพที่ 4.11 การทดสอบฤทธิ์ของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์แบคทีเรีย

แบคทีเรีย Gram-positive bacteria; *Staphylococcus aureus* และ Gram-negative bacteria; *Escherichia coli*

2) ทดสอบฤทธิ์ของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

นำโปรตีน binary toxin ได้แก่ BinA อย่างเดียว, BinB อย่างเดียว, BinA ผสมกับ BinB และ PBS buffer (Negative control) มาทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยใช้ TBS ในการเจือจางเม็ดเลือดแดง ในอัตราส่วน 1:1 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm เพื่อประเมินหาการแตกของเม็ดเลือดแดง จากผลการทดลองพบว่าการแตกของเม็ดเลือดแดงของโปรตีน binary toxin มีค่า 1-2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเมื่อเปรียบเทียบกับ Triton-X (Positive control) (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การแตกของเม็ดเลือดแดง

Sample	% Hemolysis
BinA only	1%
BinB only	1%
BinA + BinB	2%
10% TritonX 100	100%
PBS	0%

4.2 อภิปรายผล

ในการศึกษาครั้งนี้ได้สังเคราะห์โปรตีนกลายพันธุ์ BinB โดยคัดเลือกตำแหน่งกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ ซึ่งเปลี่ยนกรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) มาเป็นอะลานีน (Alanine) นอกจากนี้ยังสังเคราะห์โปรตีนกลายพันธุ์ BinB โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) มาเป็นอะลานีน (Alanine) อีกด้วย เพื่อใช้ทำการทดสอบหน้าที่ของโปรตีนกลายพันธุ์นี้ในงานวิจัยอื่นต่อไป นำโปรตีนกลายพันธุ์ BinB Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A ที่ได้นำมาประเมินประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus* larvae) เพื่อให้เข้าใจกลไกที่สำคัญในการออกฤทธิ์ต่อไป ผลการทดลองพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ Y53A, Y72A และ Y111A ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีน wild-type แสดงว่าในตำแหน่งกรดอะมิโนนี้น่าจะมีความสำคัญต่อความสามารถในการเกิดออกฤทธิ์ต่อการตายของลูกน้ำยุงรำคาญ ในทำนองเดียวกันผลการทดสอบความสามารถในการจับกันของโปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าวต่อ receptor บนผิวกระเพาะลูกน้ำยุง พบว่าตำแหน่ง Y53A, Y72A และ Y111A แสดงผลการจับกันของโปรตีนกับผิวกระเพาะลูกน้ำยุงลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีน wild-type แสดงว่าบทบาทสำคัญที่ทำให้โปรตีนกลายพันธุ์ Y53A, Y72A และ Y111A มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลดลง อาจเกิดจากขั้นตอนของการจับกับ receptor บนผิวกระเพาะลูกน้ำยุง ดังนั้น

เป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนไทโรซีนที่ตำแหน่ง Y53, Y72 และ Y111 น่าจะมีความสำคัญต่อการจับกับ receptor บนผิวกระเพาะลูกน้ำยุง

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังศึกษาความเป็นพิษของโปรตีน binary toxin ต่อเซลล์อื่นๆ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์แบคทีเรีย ที่ไม่ใช่เซลล์เป้าหมายอีกด้วย ผลการทดลองพบว่าโปรตีน BinA, BinB และ Binary toxin ไม่ได้มีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ดังนั้นโปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำยุง binary toxin (wild-type) มีความปลอดภัยไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดมนุษย์ และแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งแบคทีเรียสองชนิดนี้พบได้เป็นเชื้อประจำถิ่นของร่างกายมนุษย์

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. โปรตีนกลายพันธุ์ BinB ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีน Y53A, Y72A, Y76A, Y94A และ Y111A และกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน F147A, F149A สามารถสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมดได้ออกมาในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ soluble form ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบเพื่อศึกษาหน้าที่ที่สำคัญของตำแหน่งกรดอะมิโนนั้นๆต่อไปได้

2. โปรตีน BinB ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีน Y53, Y72 และ Y111 น่าจะมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยอาจเกิดจากขั้นตอนของการจับกับ receptor บนผิวกระเพาะลูกน้ำยุงรำคาญ

3. โปรตีนสารพิษ BinA, BinB และ Binary toxin (wild-type) มีความปลอดภัยไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์แตก และไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ที่สามารถพบได้เป็นเชื้อประจำถิ่นของร่างกายมนุษย์

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาโปรตีนสารพิษต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ต้องมีการเลี้ยงยุง แต่เนื่องจากคณะสหเวชศาสตร์ ม.บูรพา ไม่สามารถดำเนินการได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องนำตัวอย่างลูกน้ำยุงมาจากที่อื่นและอาจรอนาน จึงทำให้งานวิจัยล่าช้า

2. โปรตีน BinB ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไทโรซีนที่พบว่ามีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญนั้น ควรมีการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนกลายพันธุ์เหล่านั้นด้วย เพื่อยืนยันว่าไม่ได้เป็นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน

บรรณานุกรม

1. Baumann, P., Baumann, L., Bowditch, R. D., and Broadwell, A. H. (1987). Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 23 6 2: evidence for a family of related sequences. *J Bacteriol* 169, 4061-7.
2. Boonserm, P., Moonsom, S., Boonchoy, C., Promdonkoy, B., Parthasarathy, K., and Torres, J. (2006). Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1273-8.
3. Charles, J. F., Nielsen-LeRoux, C., and Delcluse, A. (1996). *BACILLUS SPHAERICUS* TOXINS: Molecular Biology and Mode of Action. *Annual Reviews* 41, 451-472.
4. Cokmus, C., Davidson, E. W., and Cooper, K. (1997). Electrophysiological effects of *Bacillus sphaericus* binary toxin on cultured mosquito cells. *J Invertebr Pathol* 69, 197-204.
5. Davidson, E. W. (1988). Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. *J Med Entomol* 25, 151-7.
6. Hire, S., Hadapad, A. B., Dongre, T. K., and Kumar, V. (2009). Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein. *J Invertebr Pathol* 101, 106-111.
7. Nielsen-Leroux, C., and Charles, J. F. (1992). Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur J Biochem* 210, 585-90.
8. Opota, O., Gauthier, N. C., Doye, A., Berry, C., Gounon, P., Lemichez, E., and Pauron, D. (2011). *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. *PLoS One* 6, e14682.
9. Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, J. F., Romey, G., and Pauron, D. (2005). Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell Microbiol* 7, 1335-44.
10. Porter, A. G., E.W., D., and J.W., a. L. (1993). Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol Rev* 57, 838-861.
11. Schwartz, J. L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J. F., Berry, C., Humphreys, M. J., Jones, A. F., Bernhart, I., Dalla Serra, M., and Menestrina, G. (2001). Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. *J. Membr. Biol.* 184, 171-83.
12. Shi, Y. X., Zheng, D. S., and Yuan, Z. M. (2003). Toxicity of *Bacillus sphaericus* LP1-G against susceptible and resistant *Culex quinquefasciatus* and the cloning of the mosquitocidal toxin gene. *Curr Microbiol* 47, 226-230.
13. Silva-Filha, M. H., and Peixoto, C. A. (2003). Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) larvae midgut. *Pesticide Biochem Physiol* 77, 138-46.

14. Singkhamanan, K., Promdonkoy, B., Chaisri, U., and Boonserm, P. (2009). Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin.
15. Smith, A. W., Camara, A., Brune, D. C., and Allen, J. P. (2005). Implications of high molecular-weight oligomers of the binary toxin from *Bacillus sphaericus*. *J Invertebr Pathol.* 88, 27– 33.
16. Surya, W., Chooduang, S., Choong, Y. K., Torres, J., and Boonserm, P. (2016). Binary Toxin Subunits of *Lysinibacillus sphaericus* Are Monomeric and Form Heterodimers after In Vitro Activation. *PLoS One* 11, e0158356.
17. Tangsongcharoen, C., Boonserm, P., and Promdonkoy, B. (2011). Functional characterization of truncated fragments of *Bacillus sphaericus* binary toxin BinB. *J Invertebr Pathol* 106, 230-235.
18. Yuan, Z. M., Rang, C., Maroun, R. C., Juafrez-Pefrez, V., Frutos, F., Pasteur, N., Vendrely, C., Charles, J. F., and Nielsen-LeRoux, C. (2001). Identification and molecularstructural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. *Eur J Biochem.* 268, 2751–2760.
19. ศรีสุจริตพานิช, ก. (2018). โครงสร้างและการประยุกต์ใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดไบนารีจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* Mosquito Larvicidal Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus*: Structure and Application. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 23.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัย/วิชาการ ตีพิมพ์ระดับชาติ 1 เรื่อง ในวารสารเทคนิคการแพทย์ สมาคมเทคนิคการแพทย์ (TCI กลุ่มที่ 1) (ซึ่งอยู่ในระหว่างการพิมพ์ลงวารสาร)

Kanokporn Srisucahritpanit, Woraphan Rojtiranan, Chirapond Chonanan, **Chontida Tangsongcharoen**, Panadda Boonserm (2020). Biological and Anti-cancer activity of Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. Journal of the Medical Technologist Association of Thailand.

Biological and Anti-cancer Activity of Binary Toxin from *Lysinibacillus sphaericus*

Kanokporn Srisucharitpanit^{1*}, Worapan Rojanatiranan¹, Chirapond Chonanant¹, Chontida Tangsongcharoen¹ and Panadda Boonserm²

¹ Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand 20131

² Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand 73170

Abstract

Binary toxin produced by *Lysinibacillus sphaericus* (*Ls*) is highly active against mosquito larvae of important insect vector. The binary toxin shows a homology structure to pore forming-aerolysin family, a toxicity of which has been discovered against several cancer cell lines. To date, a cytotoxic data of Bin toxin is unavailable for mammalian cells including cancer cells. Herein, the binary toxin was tested for its biological activity on several cell types. Two components of the binary toxin, BinA and BinB were produced separately in *Escherichia coli* host cell. The biological tests of BinA and BinB mixture revealed high toxicity to *Culex quinquefasciatus* larvae, while no activity was detected for a human-hemolysis. Interestingly, the binary toxin showed cytotoxicity towards cancer cells, melanoma SK-MEL-28 cell (ATCC HTB-72) and papilloma carcinoma KB cell (ATCC CCL-17), but it was inactive against the normal human cell, fibroblast Hs68 cell. These findings promise a possibility of bacterial toxin being a candidate for anti-cancer substance. In the future, the anticancer activity of the binary toxin will be investigated in several other cancer cells.

Keywords: Binary toxin, *Lysinibacillus sphaericus*, Anti-cancer, Larvicidal toxin

*Corresponding author E-mail address: kanokporn@go.buu.ac.th

ฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของโปรตีนสารพิษไบนารีจากแบคทีเรีย *Lysinibacillus*
sphaericus

กนกพร ศรีสุจริตพานิช^{1*} วรพรรณ โรจนดิรนนท์¹ จิราพร จรอนันต์¹ ชลธิดา ตั้งทรงเจริญ¹

และ ปณิตดา บุญเสริม²

¹คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี ประเทศไทย 20131

²สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม ประเทศไทย 73170

บทคัดย่อ

โปรตีนสารพิษไบนารีที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงที่เป็นแมลงพาหะที่สำคัญ โครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกับโปรตีนสร้างรูรั่วในกลุ่มแอโรไลซิน ซึ่งมีการค้นพบว่าโปรตีนในกลุ่มนี้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด แต่จนถึงปัจจุบันแทบจะไม่มีข้อมูลใดเลยเกี่ยวกับความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษไบนารีต่อเซลล์ชนิดอื่น ๆ นอกจากลูกน้ำยุง การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของโปรตีนสารพิษไบนารีที่มีต่อเซลล์ชนิดต่าง ๆ โดยเริ่มจากการผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด BinA และ BinB ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่วนผสมของ BinA และ BinB มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงรำคาญชนิด *Culex quinquefasciatus* แต่ทั้ง BinA และ BinB ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษไบนารีแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72) และ papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มนุษย์ปกติชนิดไฟโบรบลาสต์ (Hs68 cell) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารพิษจากแบคทีเรียอาจเป็นตัวเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเป็นสารต่อต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งในอนาคตจะทดสอบความเป็นพิษของสารพิษไบนารีกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ๆ ต่อไป

คำสำคัญ: โปรตีนสารพิษชนิดไบนารี แบคทีเรีย *Lysinibacillus sphaericus* ฤทธิ์ต้านมะเร็ง โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kanokporn@go.buu.ac.th

Introduction

Presently, it is possible to say that more people around the world would have died from infectious diseases transmitted by mosquitoes such as malaria, dengue hemorrhagic fever, Japanese encephalitis and lymphatic filariasis. Mosquitoes of genus *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* serve as primary vectors for transmission of these diseases. Among the three mosquitoes genera, *Culex* is the most genetically various due to its expanded geographical distribution (1). *Lysinibacillus sphaericus* (*Ls*) is a Gram-positive spore-forming bacterium which can produce larvicidal crystal proteins. A binary toxin or Bin toxin is one of the active proteins among those toxins. According to its name, two homologous proteins designated as BinA and BinB are required together to exert a larvicidal activity. Bin toxin is highly pathogenic to *Culex* and *Anopheles* mosquito larvae, important primary vectors for disease transmissions. Biological insecticides, including the binary toxin have been chosen to control these mosquito populations and disease transmission because of their high specificity, environmental safe and no adverse effects on human (2).

Previous studies demonstrated that BinB showed specific binding to glycoprotein receptors, a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored α -glucosidase on larval epithelial cells (3, 4). Upon the receptor binding of BinB, the complex of binary toxin is internalized into the target cells, eventually causing larval death. In turn, BinA has been proposed to be a toxic component. The cytopathological changes of Bin-treated *Culex* larvae were observed in the cytoplasmic organelles, disruption of nucleus, mitochondrial swelling and endoplasmic reticulum breakdown. Bin toxin was shown to induce mitochondria-mediated apoptosis in *Culex* larvae, leading to larval death (5). Likewise, a similar mechanism was previously reported for the intoxication process of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) δ -endotoxin in *Culex pipiens* larval cells (6).

The molecules of the binary toxin reveal their high homology structure. Moreover, the conformational structure of the binary toxin belongs to aerolysin β -type pore forming toxins (PFTs) (7, 8). PFTs mediate actions through cell surface receptors leading to cell death. Recent studies provided the evidences that *Bt*-PFT parasporin could induce cytotoxicity and apoptosis in human cancer cells (9, 10). Consequently, the binary toxin has been proposed to share the action with this protein family. Currently, no data has been available for the cytotoxicity of binary toxin on a variety of cells. Therefore, information about its cytotoxicity on other target cells (such as human cancer cells and bacterial cells) will be useful for medical applications.

The present study revealed that binary toxin can kill human cancer cells; melanoma SK-MEL-28 and papilloma carcinoma KB. On the contrary, the absence of cytotoxicity against normal human fibroblast Hs68 and non-hemolytic activity of the binary toxin would be essential for the development of a potential candidate for cancer therapy in the future.

Materials and methods

Binary toxin expression and purification

The binary toxin was expressed as recombinant BinA and BinB proteins separately. *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells harboring pRSETC-BinA or pET28b-BinB were grown in Luria–Bertani (LB) medium containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol for BinA and 50 µg/mL kanamycin and 34 µg/mL chloramphenicol for BinB. The culture cells were induced with 0.2 mM isopropyl β-D thiogalactopyranoside (IPTG) and continued growing at 18°C for 5 hrs. Both proteins were purified using histidine affinity chromatography. The supernatant fraction was loaded into a HiTrap™ Chelating HP 5-mL column prepacked with a precharged Ni²⁺ (GE Healthcare Life Sciences). The bound (His)₆-tagged BinA and BinB were eluted with wash buffer containing 100-250 mM imidazole. Then, imidazole was removed by desalting column (GE Healthcare Life Sciences). The proteins were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide (SDS) gel. The concentration of protein was determined by spectrophotometry at 280 nm absorbance.

Mosquito-larvicidal activity assay

Larvicidal activity assay of the binary toxin was performed against the second-instar *C. quinquefasciatus* larvae obtained from Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Purified BinA and BinB were mixed at 1:1 M ratio, followed by two-fold serially diluted with distilled water in different concentrations. Then, 1 mL of each protein dilution was added to each well of a 24-well tissue culture plate containing 10 larvae/well in 1 mL water. The BinB protein was used as a negative control. Mortality was recorded after incubation at room temperature for 48 hrs. Median lethal concentration (LC50) was calculated from three independent experiments using Probit analysis (11).

Cell Lines and culture conditions

Human cancer cells, melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72) and papilloma carcinoma KB (ATCC CCL-17) as well as normal human fibroblast Hs68 (ATCC CRL-1635) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). All cell types were grown in an incubator at 37°C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium with a high glucose concentration (DMEM–HG; Gibco, Grand Island, NY, United States) containing 100 µg/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco) and 10% fetal bovine serum (HyClone, Cramlington, UK). Medium was changed every 3 days, when they reached 80% confluence.

Cell viability assay

Viable cell was assessed using MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide) assay (Sigma). In brief, cells were washed 3 times with PBS and detached with 0.25% trypsin-EDTA. Viable cell density was counted by trypan blue exclusion and diluted with DMEM–HG to make concentration of 5×10^4 cells/mL. The cells were plated 24 hrs prior to testing in 96-well plates at a density of 5,000 cells/well in 100 µL of the medium. Each protein toxin was dissolved in medium to produce 8 concentrations of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 15 and 7 µg/mL, respectively. After 24 hrs the cells were treated with the bacterial toxin by adding 100 µL/well of each concentration in 3 replicates, then cells were further incubated for 24 hrs before determining the cell viability by MTT assay. Human fibroblast, KB and melanoma cell lines were washed three times in PBS and then incubated with 50 µL of MTT solution (5 mg/mL MTT in PBS). After 45 min, the unreacted solution was aspirated, and the insoluble intracellular formazan product was solubilized and released from cells by adding 100 µL of iso-propanol and incubated for 10 min. The absorbance at 570 nm was then measured using a plate reader spectrophotometer (VersaMax). Blank growth medium and protein buffer were used as negative controls.

Hemolytic activity assay

Hemolytic activity assay was performed using human red blood cells (RBCs). RBCs were washed several times in PBS by centrifugation for 3 min at 3,000 g until the supernatant was clear. Then, RBC were diluted to 3-5% cells and mixed with purified BinA and BinB protein at the concentration of 1 mg/mL. The reactions were incubated at 37°C for 30 min. The

reaction was stopped by centrifugation and the supernatant was removed. Hemoglobin were measured using spectrophotometry at 541 nm. The 10% Triton X-100 was used as a positive control and PBS was used as a negative control (blank). The relative absorbance compared to that of the suspension treated with 10% Triton X-100 was calculated as the percentage of hemolysis.

Results

Binary toxin expression and purification

The recombinant BinA and BinB proteins (pRSET C-BinA and pET28b-BinB, respectively) were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Both histidine tagged BinA and BinB proteins were produced as soluble proteins under IPTG (0.2 mM) induction after incubation at 18°C for 5 hrs. The proteins were purified by histidine affinity chromatography. Non-specifically bound proteins were washed twice with wash buffer containing 25 mM imidazole and 50 mM imidazole, respectively. The bound (His)₆-tagged BinA and BinB were eluted with elution buffer containing 100 mM and 250 mM imidazole, respectively. The imidazole was removed by desalting column. The (His)₆-tagged BinA and (His)₆-tagged BinB proteins appeared as major bands of 42 and 51 kDa, respectively. The purified proteins are shown in Fig 1. The high purity of the binary toxin was achieved with an approximate 95% purity indicating the efficient protein purification.

Mosquito larvicidal activity of binary toxin

The mosquito larvicidal activity of the binary toxin was tested against the 2nd-instar *Culex quinquefasciatus* larvae. The mortality was recorded after feeding toxins for 48 hrs. The median lethal concentration or LC₅₀ was calculated by using the probit analysis. The BinB protein was used as a negative control. High toxicity was achieved when BinA and BinB were combined at 1:1 molar ratio (**Table 1**). Neither BinA nor BinB alone was significantly toxic to mosquito larvae although high protein concentration up to 1 mg/mL was applied.

Anti-cancer activity of binary toxin

The cytotoxicity of the binary toxin was also tested on other target cells including human cancer cells and normal human cells. Upon binary toxin treatment, BinA and BinB proteins were evaluated for anti-cancer activity. The effects of binary toxin on several types of cancer cells including human papilloma KB cells and melanoma SK-MEL-28 cells showed the apparent induction of cell swelling and bursting of target cells (Fig. 2A). Whereas normal human fibroblast cells treated with the binary toxin showed intact cells as spindle-shaped. The killing efficacy of Bin toxin against these human cancer cells and normal human fibroblast cells was also studied using MTT assay. The binary toxin was found to have consistent cytotoxic activity against both human cancer cells at a dose of 1 mg/mL (**Fig. 2B**). There were the dramatically significant decreases in cell viability compared to untreated cells. Binary toxin (BinA+BinB) exhibited higher cytotoxicity to human melanoma than to human papilloma cancer cells whereas BinB protein exhibited higher cytotoxicity towards human papilloma than to human melanoma while BinA protein showed comparable toxicity towards both human papilloma and melanoma cancer cells (**Fig. 2B**). However the binary toxin, BinA alone and BinB alone showed no cytotoxic activity towards normal human fibroblast cells that remain similar to untreated cells.

Hemolytic activity of binary toxin

Hemolytic activity assay was performed by using human red blood cells (RBCs). The three samples of binary toxin, BinA, BinB and BinA+BinB mixture were incubated with RBCs at 37°C for 30 minutes. The hemolytic activity was assessed by measuring hemoglobin released in the supernatant. In comparison, BinA and BinB alone did not show the hemolytic activity when compared to TritonX-100. The increasing of hemolysis was observed for the mixture of BinA+BinB toxin, but it is insignificant comparing to TritonX-100 (**Table 2**). The result suggested that Bin toxin did not have the ability to lyse human red blood cells.

Discussion and Conclusion

Despite mosquito larvicidal actions of *L. sphaericus* binary toxin inside the *Culex* midgut cells as the primary target have been widely reported, there are no evidences of the effects of binary toxin on other non-target cells including cancer cells and red blood cells. In this study, the biological activity, cytotoxicity on cancer cells and hemolytic capacity of binary toxin have been determined. Naturally, binary toxin is produced as a crystal toxin inside *L. sphaericus* during sporulation phase. Here, binary toxin was produced as soluble recombinant

proteins by *E. coli* BL21(DE3)pLysS. The larvicidal activity on target cells of these soluble recombinant binary toxin is shown by high toxicity to *C. quinquefasciatus* larvae with LC₅₀ about 17 ng/mL that is in the range of a previous report (12). Thus, the binary toxin have been used as one of the biological insecticides. The reason for using biological insecticides instead of chemical insecticides is not only to avoid the negative effects of chemical insecticides but also that biological insecticides have no adverse effects on human (2). In addition to the toxicity to target insects, the cytotoxic action of binary toxin on cancer cells and hemolytic activity on red blood cells were simultaneously investigated. Interestingly, upon binary toxin treatment in human papilloma and melanoma cancer cells, both binary toxin subunits, BinA alone and BinB alone induced alterations in cell morphology, with either cell swelling or bursting, and subsequent cell lysis. Moreover, the binary toxin can kill human cancer cells; melanoma SK-MEL-28 and papilloma carcinoma KB as a result of the marked reduction of cell viability via the measurement of MTT assay. An advantage of the binary toxin is that no cytotoxic effects appeared on the normal human cells. Previous study has provided evidence that the binary toxin causes the decrease in mitochondrial energy production and metabolism as shown by down-regulated NADH dehydrogenases and protein transporters (13). The binary toxin also induces apoptosis through intrinsic pathway in *Culex* larval cells, leading to larval death (5). Notably, the cytotoxic effects of *Aeromonas hydrophila* aerolysin type β -pore forming toxins which is similar to BinB structure can induce apoptosis by perturbing host membrane permeability and allowing the leakage of cellular components via pore formation (7, 14, 15). In addition, the concentration of binary toxin (1 mg/mL) for anti-cancer activity is higher than that of larvicidal activity (LC₅₀ = 17 ng/mL). Thus, it is likely that binary toxin could exert its activity via pore forming action on cancer cells, probably causing the disruption of membrane integrity and increasing permeability. Together with the role of apoptosis in the inhibitory effects in cancer cells, it is possible that the pore forming action of binary toxin could kill human papilloma and melanoma cancer cells through the pathway of apoptosis. In addition, the hemolytic activity test was carried out concerning its cytotoxicity. The result revealed that binary toxin could not lyse the human red blood cell. This would promise the safety of binary toxin as a cancer-treatment drug. It has been reported that bacterial toxin can selectively recognize lipid on susceptible cell membrane (16). The direct interaction with membrane lipids is also possible to take place for binary toxin (17). Accordingly, the susceptibility of cancer cells might be supported by different composition of membrane lipids on the cell surface. Transmembrane of cancer cells facilitate the lipid membrane flipping from inside to outside. However, the specific

protein receptor of cancer cells cannot be excluded from the activity of binary toxin. The findings promise a possibility of bacterial toxin as a candidate for anti-cancer substance that focuses on damaging cancer cell membranes instead of binding to specific receptor. Alternatively, the proposed pore forming action of binary toxin could facilitate the entry of other chemotherapeutic drugs into cancer cells.

In summary, this report is the first to identify a binary toxin from *L. sphaericus* exhibiting cytotoxic activities against human cancer cells. However, the anticancer activity and specificity of the binary toxin still necessitates further investigation for more cancer cells. For the future work, lipid membrane interaction of binary toxin will be performed for model lipid bilayer specific to cancer cells and normal cells. In addition, the mechanism of action also needs to be clarified.

Acknowledgement

The authors would like to thanks Monruadee Srisaisap (Mahidol University) for kind technical assistance. This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF, MRG5980076) and the faculty of Allied Health Sciences, Burapha University.

Figure legends

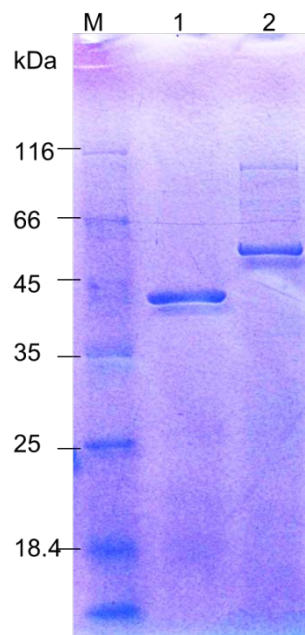
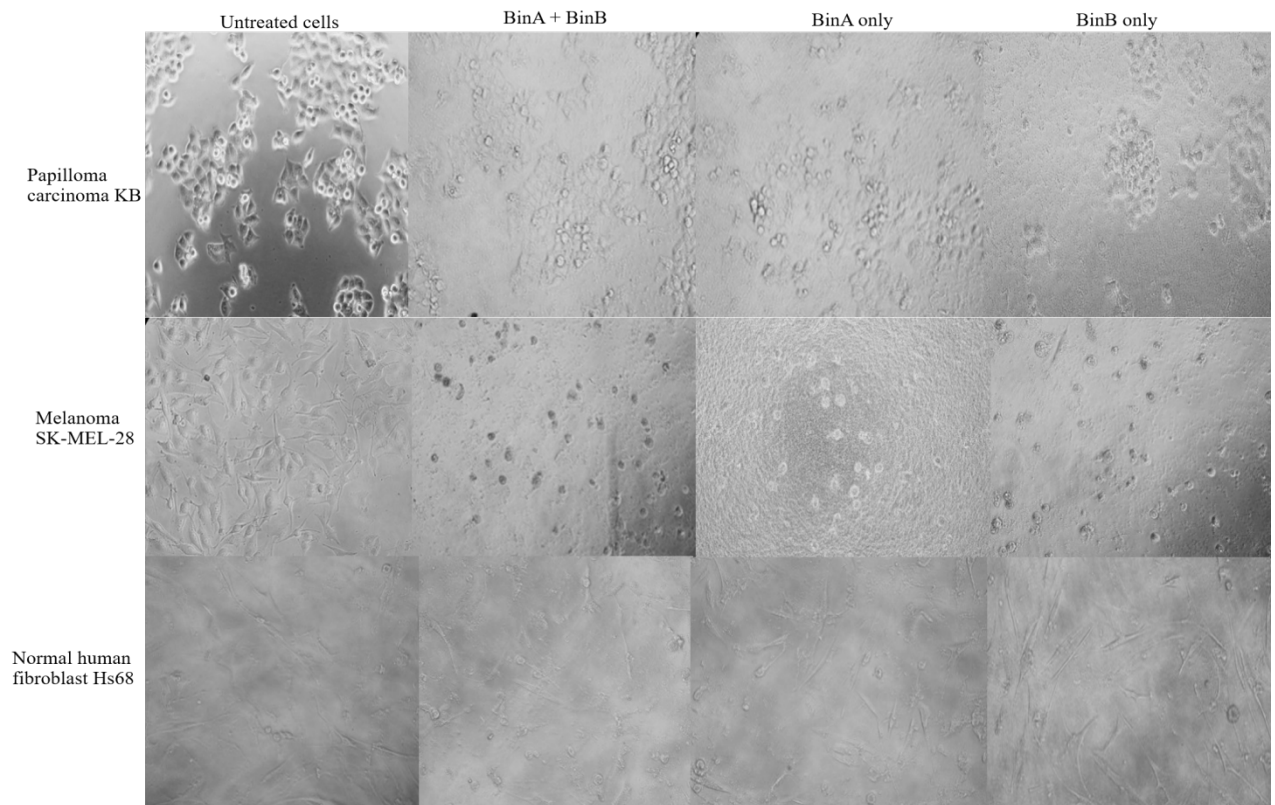


Fig. 1 12% SDS PAGE analysis of purified binary toxin proteins

Lane 1 Purified BinA protein (42 kDa)

Lane 2 Purified BinB protein (51 kDa)

(A)



(B)

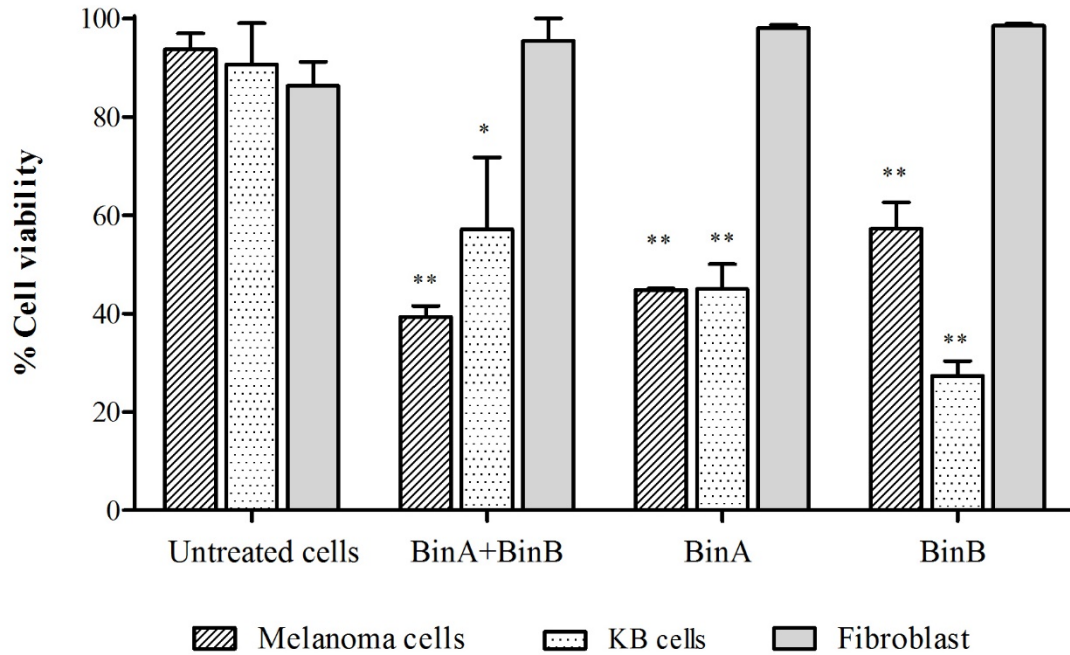


Fig. 2 Cytocidal activity of binary toxin on human papilloma KB cells, melanoma SK-MEL-28 cancer cells and normal human fibroblast Hs96. Untreated cells were used as negative control. A total of 5×10^4 cells/mL was pre-incubated at 37 °C for 24 h and then treated with BinA+BinB, BinA or BinB (final concentration, 1 mg/mL) for 24 h at 37 °C. (A) Morphological alterations of cells induced by binary toxin (BinA+BinB), BinA or BinB. (B) % Cell viability of Bin against cultured cancer cell lines and normal cells was determined using the MTT assay. Means \pm SEM are shown. Each error bar represents the standard error of the mean (SEM) from triplicate experiments by One-Way ANOVA. Statistically significant differences between untreated control and toxin treatment group are indicated by asterisks (* p value $<$.05 and ** p value $<$.001).

Table 1 Mosquito-larvicidal activity of the purified BinA and BinB against *Culex quinquefasciatus* larvae. The mortality was recorded after feeding the toxin for 48 hours.

Sample	LC ₅₀ *
BinA	>1000 ng/mL
BinB	>1000 ng/mL
BinA + BinB	17 ng/mL

* The LC₅₀ (median lethal concentration) was calculated from three independent experiments by using Probit analysis at 95% confidence.

Table 2 Hemolytic activity of 1 mg/mL Bin toxin. Human red blood cells (RBCs) were incubated at 37°C for 30 minutes. Values are mean±SEM of three independent experiments.

Sample	% Hemolysis
BinA	1 ± 0.64
BinB	1 ± 0.30
BinA + BinB	2 ± 0.19
10% TritonX 100	100 ± 0.01
PBS	0 ± 0.01

References

1. Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, *et al.* Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*. 2010;330(6000):86-8.
2. Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc*. 2007;23(2 Suppl):133-63.
3. Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol*. 1999;29(8):711-21.
4. Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001;31(10):981-90.
5. Tangsongcharoen C, Chomanee N, Promdonkoy B, Boonserm P. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. *J Invertebr Pathol*. 2015;128:57-63.
6. Ying TH, Chen CW, Hsiao YP, Hung SJ, Chung JG, Yang JH. Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase- and mitochondrial-dependent signaling pathways. *Anticancer Res*. 2013;33(10):4411-20.
7. Srisucharitpanit K, Yao M, Promdonkoy B, Chimnaronk S, Tanaka I, Boonserm P. Crystal structure of BinB: a receptor binding component of the binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. *Proteins*. 2014;82(10):2703-12.
8. Colletier JP, Sawaya MR, Gingery M, *et al.* De novo phasing with X-ray laser reveals mosquito larvicide BinAB structure. *Nature*. 2016;539(7627):43-7.
9. Chan KK, Wong RS, Mohamed SM, Ibrahim TA, Abdullah M, Nadarajah VD. *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins induce cell-cycle arrest and caspase-dependant apoptotic cell death in leukemic cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2012;31(1):75-86.
10. Beena V, Ramnath V, Sreekumar KP, Karthiayini K, Philomina PT, Girija D. Crystal protein of a novel *Bacillus thuringiensis* strain inducing cell cycle arrest and apoptotic cell death in human leukemic cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):9661.
11. Finney DJ, *Probit analysis* 3rd ed. Cambridge University Press, 1971.
12. Srisucharitpanit K, Inchana P, Rungrod A, Promdonkoy B, Boonserm P. Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. *Protein Expr Purif*. 2012;82(2):368-72.

13. Tangsongcharoen C, Jupatanakul N, Promdonkoy B, Dimopoulos G, Boonserm P. Molecular analysis of *Culex quinquefasciatus* larvae responses to *Lysinibacillus sphaericus* Bin toxin. PLoS One. 2017;12(4):e0175473.
14. Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol. 1999;53:155-87.
15. Parker MW, Buckley JT, Postma JP, *et al.* Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. Nature. 1994;367(6460):292-5.
16. Thomas WE, Ellar DJ. *Bacillus thuringiensis var israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J Cell Sci. 1983;60:181-97.
17. Kunthic T, Promdonkoy B, Srihirin T, Boonserm P. Essential role of tryptophan residues in toxicity of binary toxin from *Bacillus sphaericus*. BMB Rep. 2011;44(10):674-9.