



## การควบคุมลูกน้ำยุงโดยใช้แบคทีเรีย

### Control of Mosquito Larvae by Bacteria

บุญศรี จงเสรีจิตต์<sup>1\*</sup> และ วชิราภรณ์ ญูปาอ่าง<sup>1</sup>

#### บทคัดย่อ

ยุงเป็นสาเหตุก่อโรคหลายชนิดต่อมนุษย์ซึ่งการกำจัดยุงในอดีตมักนิยมใช้สารเคมีที่ออกฤทธิ์ต่อยุงได้รวดเร็ว เห็นผลชัดเจน แต่พบว่าสารเคมีเหล่านี้กลับก่อให้เกิดผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการกำจัดยุงโดยใช้วิธีซึ่งไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ โดยการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตผลึกโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อลูกน้ำยุงและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น โดยผลึกโปรตีนเหล่านี้จะละลายในสภาวะที่เป็นต่างในกระเพาะของลูกน้ำยุง และจะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์โปรติเอสภายในกระเพาะลูกน้ำยุงทำให้โปรตีนที่สามารถออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงได้ และโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงนี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ แต่การใช้แบคทีเรียเหล่านี้พบว่ายังมีข้อจำกัดคือไม่สามารถทนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน ไม่ทนต่อแสงและอุณหภูมิ จึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง รวมถึงการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น หรือให้มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงสูงขึ้น

<sup>1</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

\*Corresponding Author, E-mail: boonsri.su@gmail.com

## ABSTRACT

Mosquitos cause of the human disease. In the past, to control mosquito often uses chemical insecticides that eliminated mosquito rapidly. However, these chemicals have affected to human and environment. Therefore, biological insecticides have been developed by using bacterium that produced crystal protein toxins specifically to mosquito larvae and have no affect to non-target species. The crystal protein toxins will dissolve in the alkaline condition of mosquito larvae guts and activated by gut protease. The active toxin will be released to kill mosquito larvae and have no affect to human. However, these bacteria still have limitation that they persist in the environment in short time and sensitivity to UV light and temperature. Development of protein production and protein structure should be considered in order to improve production level and toxicity of mosquito-larvicidal proteins.

**คำสำคัญ:** แบคทีเรียฆ่าลูกน้ำยุง บาซิลลัส ผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง

**Keywords:** *Bacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis*, mosquito-larvicidal proteins

## บทนำ

ยุงเป็นแมลงที่พบได้ทั่วโลก มักอาศัยในพื้นที่เขตร้อนและเขตร้อนชื้น ยกเว้นในพื้นที่เขตหนาว ในสภาพอากาศที่อบอุ่นจะทำให้ยุงสามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้อย่างรวดเร็ว ยุงแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ Toxorhynchitinae, Anophelinae และ Culicinae (Clements, 1992) โดยส่วนมากยุงในกลุ่ม Anophelinae และ Culicidae จะเป็นพาหะนำโรค เช่น ยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Anophelinae เป็นพาหะของโรคมาลาเรีย (malaria) และโรคเท้าช้าง (filariasis) (Service, 1986) ส่วนยุงในกลุ่มของ Culicidae ที่สำคัญเช่น *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* และ *Annigeres* พบว่า *Culex quinquefasciatus* เป็นพาหะของโรคเท้าช้าง (filariasis) และ *Culex tritaeniorhynchus* เป็นพาหะนำโรคไขสมองอักเสบ (Japanese ncephalitis) ส่วน *Aedes* เป็นพาหะนำโรคไข้เหลือง (yellow fever) และโรคไข้เลือดออก (dengue viruses) ซึ่งใน

อดีตการควบคุมยุงมักนิยมใช้สารเคมี (chemical pesticides) เช่น dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), gamma-xane, malathion และ chlordane แต่การใช้สารเคมีเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ก่อให้เกิดการดื้อยาและเกิดการสะสมในห่วงโซ่อาหารและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการกำจัดยุงแบบชีววิธีมาใช้ในการกำจัดลูกน้ำยุง (Moffat, 1991) เป็นการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่ออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงได้อย่างจำเพาะมี 2 ชนิดคือ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *Bacillus sphearicus* ซึ่งมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (Schnepf et al., 1998; Charles et al., 1996; Crickmore et al., 1998) แต่การใช้แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีข้อจำกัดคือ มีความคงทนน้อย อยู่บนผิวน้ำได้ในระยะเวลาสั้น (Porter et al., 1993) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงทั้งในด้านของการพัฒนาอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียหรือ

การใช้เทคนิคการตัดต่อพันธุกรรมและการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงเพื่อปรับปรุงปริมาณการผลิตและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง

**แบคทีเรียผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง**  
แบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *Bacillus sphaericus* มีรายละเอียดที่น่าสนใจดังนี้

***Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis***

*B. thuringiensis* subsp. *israelensis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ค้นพบในปี ค.ศ. 1976 โดย Goldberg and Margalit (1997) ในทะเลทรายเนกฟ (Negev) ประเทศอิสราเอล (Goldberg and Margalit, 1997) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* สามารถผลิตผลึกโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง (crystal protein toxins) ที่เรียกว่า  $\delta$ -endotoxins ได้ในระยะสร้างสปอร์ (sporulation phase) ซึ่งจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มคือ โปรตีน Cry มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย และโปรตีน Cyt มีผลต่อการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) (Bravo and Soberon, 2007) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* สามารถผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้ 4 ชนิดหลักคือ Cry4Aa (125kDa), Cry4Ba (135kDa), Cry11Aa (68kDa) และ Cyt1Aa (28kDa) โปรตีนเหล่านี้จะรวมตัวกันอยู่ภายในเยื่อหุ้มเอกโซสปอร์เรียม (exosporium membrane) (Li et al., 2000) หรืออยู่ด้านนอกเยื่อหุ้มเอกโซสปอร์เรียม (Federici et al., 2006) มีความเป็นพิษสูงต่อลูกน้ำยุงลาย (*Aedes*) และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex*) แต่มีความเป็นพิษต่ำต่อลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) (Li et al., 2000) และยังพบว่ามีความจำเพาะสูงต่อสิ่งมีชีวิตเป้าหมายเท่านั้น ไม่

มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) และพืช (Bravo and Soberof, 2005)

***Bacillus sphaericus***

*B. sphaericus* เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุง แบคทีเรียชนิดนี้พบได้ทั่วไปในดินและน้ำ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการผลิตผลึกโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อลูกน้ำยุงรำคาญ และลูกน้ำยุงก้นปล่อง (Silapanuntakul et al., 1983) *B. sphaericus* สามารถผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้ 2 กลุ่มคือโปรตีน binary (binary toxin) เป็นผลึกโปรตีนที่ผลิตขึ้นในระยะสร้างสปอร์ (Charles et al., 1996) ประกอบด้วยโปรตีน 2 ขนาดคือ 42 กิโลดาลตัน เรียกว่า BinA และ 51 กิโลดาลตัน เรียกว่า BinB (Porter et al., 1993) กลุ่มที่ 2 คือ mosquitocidal toxins หรือโปรตีน Mtx อาจแบ่งได้ 3 ชนิดคือ Mtx1, Mtx2 และ Mtx3 (Shi et al., 2003) ผลิตในระยะการเจริญ (vegetative growth) แต่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเข้าสู่ระยะสร้างสปอร์ (Charles et al., 1996)

**โครงสร้างของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง**

โครงสร้างของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงมีบทบาทต่อการปรับปรุงการผลิตและการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตำแหน่งของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจะส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้จากการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน Cry ที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* พบว่าประกอบด้วย 3 โดเมน (domains) คือ โดเมนที่ 1 (domain I) ประกอบด้วย 7  $\alpha$ -helices เป็นส่วนที่ทำให้เกิดช่องในเยื่อไมโครวิลไล (microvillar membrane) โดเมนที่ 2 (domain II)

ประกอบด้วย 3  $\beta$ -antiparallelsheets มีลักษณะเป็นห่วง (loop) ทำหน้าที่ในการจดจำและจับอย่างจำเพาะกับบริเวณจับไกลโคโพรตีน (glycoprotein receptors) หรือ บริเวณจับไกลโคลิปิด (glycolipid receptors) และโดเมนที่ 3 (domain III) มีลักษณะเป็น  $\beta$ -sandwich ช่วยในการรักษาโครงสร้างของโพรตีนและยังประกอบด้วยส่วนที่ตอบสนองต่อการจับกับบริเวณจับบนกระเพาะ (midgut receptor) (Crickmore et al., 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าที่บริเวณ C-terminal ของโพรตีนมีโดเมนที่ตอบสนองต่อการเกิดผลึกของโพรตีนฆ่าลูกน้ำยุง (Aronson, 1993; Bietlot et al., 1990) ซึ่งหากไม่มีบริเวณ C-terminal นี้ โพรตีนจะไม่สามารถเกิดผลึกได้ (Park and Federici, 2000; Thomas and Ellar, 1983) โดยที่บริเวณ C-terminal จะมีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) จำนวนมากและมีพันธะ disulfide (disulfide bonds) อยู่ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีนเหล่านี้ ช่วยในการเกิดผลึกและช่วยให้ผลึกโพรตีนมีความเสถียร และจากการศึกษาตัวอย่างโครงสร้าง 3 มิติของโพรตีน Cry1Ab17 จะพบส่วนที่มีลักษณะเหมือนกับโพรตีน Cry1Aa ซึ่งเป็นโดเมนที่มีความจำเพาะในการเกิดรูและการจับกับบริเวณจับ แต่ทั้งสองโพรตีนนี้จะมีความยาวของห่วงที่ต่างกัน โครงสร้างของโพรตีน Cry1Ab17 ที่พบจะไม่มีส่วนของ  $\alpha$ 7b,  $\alpha$  10a,  $\alpha$  10b,  $\alpha$  12a,  $\beta$  19 และ  $\beta$  20 แต่พบส่วนของ  $\beta$  0,  $\beta$  1b และ  $\beta$  9b และองค์ประกอบอื่นบางส่วนเช่น  $\alpha$  8a,  $\alpha$  8b,  $\alpha$  9a,  $\alpha$  9b และ  $\alpha$  11a ในตำแหน่งต่าง ๆ ซึ่งการศึกษาโครงสร้าง 3 มิตินี้จะช่วยในการออกแบบโดเมนเพื่อปรับปรุงโพรตีนฆ่าลูกน้ำยุงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Kashyap et al., 2010)

สำหรับโครงสร้างของโพรตีน Cyt เป็นผลึกโพรตีนที่มีขนาด 25 กิโลดาลตัน ลักษณะเป็น single  $\alpha\beta$  domain มี  $\alpha$ -helix ล้อมรอบ  $\beta$ -sheets (Bravo and Soberof, 2005) จากการศึกษาโครงสร้างของโพรตีน Cyt จะพบส่วนที่เป็น  $\beta$ 5,  $\beta$ 6 และ  $\beta$ 7 (Promdonkoy and Ellar, 2000) ที่น่าจะเป็นส่วนที่แทรกเข้าไปในเยื่อหุ้ม (membrane) (Li et al., 2001) และยังพบว่าโพรตีน Cyt จาก *B. thuringiensis* ต่างสายพันธุ์กันจะมีลำดับของกรดอะมิโนที่คล้ายกันมาก (Guerchicoff et al., 2001) ตัวอย่างเช่นโพรตีน Cyt2Aa2 ที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน 259 ชนิด มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกันกับโพรตีน Cyt2Aa1 (Koni and Ellar, 1993; Promdonkoy and Ellar, 2003) โพรตีน Cyt2Aa2 เป็นโดเมนเดี่ยว (single domain) ที่ประกอบด้วย  $\beta$ -sheets ที่ถูกขนานด้วย  $\alpha$ -helices 4 กลุ่ม โดยโพรตีน Cyt จะทำให้เกิดรู (oligomeric pore) บนเยื่อหุ้มแต่จำนวนโมเลกุลที่ใช้ยังไม่ทราบชัดเจน (Chow et al., 1989; Promdonkoy and Ellar, 2000) ซึ่งขนาดของรูจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 นาโนเมตร (Drobniewski and Ellar, 1988) เมื่อเกิดกระบวนการโอลิโกเมอไรเซชัน (oligomerization) แล้ว โพรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจะแทรกเข้าไปทำให้เกิดรูขึ้นที่เยื่อหุ้ม (Du et al., 1999; Promdonkoy et al., 2003) โดยส่วนที่เป็น  $\alpha$ -helices จะเป็นตัวจับเพื่อเปิดเยื่อหุ้มและ  $\beta$ -sheets จะเป็นส่วนที่แทรกเข้าไปในเยื่อหุ้ม จากโครงสร้างของโพรตีน Cyt2Ba ที่ถูกกระตุ้นด้วย proteolytic จะพบว่าประกอบด้วย 1 domain มีส่วนที่เป็น  $\beta$ -sheet ( $\beta$ 1- $\beta$ 6) โดย  $\beta$ 2- $\beta$ 5 เป็นส่วนที่ยาวที่สุดจะอยู่ตรงกลางซึ่งเป็นส่วนที่สามารถดัดแปลงโครงสร้างได้และถูกล้อมรอบด้วย  $\alpha$ -helical คือ  $\alpha$ 1 และ  $\alpha$ 2 ที่ด้านหนึ่ง และ  $\alpha$ 3 และ  $\alpha$ 5 อีกด้านหนึ่ง (Cohen et al., 2008)

เมื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนต่างๆในโปรตีนฆ่า  
ลูกน้ำยุง พบว่าโปรตีน Cyt2Aa2 ที่ผลิตจาก *B.*  
*thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*  
ประกอบด้วย ทริปโตเฟน (tryptophan) 3 โมเลกุล ใน  
ตำแหน่ง 132, 154 และ 157 เมื่อทริปโตเฟนเหล่านี้  
ถูกแทนที่ด้วยฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และ  
กรดอะมิโนตัวอื่นๆ พบว่าการแทนที่ทริปโตเฟน ที่  
ตำแหน่ง 157 ด้วยฟีนิลอะลานีนทำให้ความเป็นพิษต่อ  
ลูกน้ำยุงลายและลูกน้ำยุงรำคาญเทียบเท่ากับตัวปกติ  
(wild type) แต่เมื่อถูกแทนที่ด้วยวาเลิน (valine)  
พบว่าทำให้สูญเสียความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงและการ  
แทนที่ทริปโตเฟนที่ตำแหน่ง 132 และ 154 ด้วย  
ฟีนิลอะลานีน และกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ก็พบว่าทำให้  
สูญเสียความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า  
สารประกอบอะโรมาติกมีความจำเป็นสำหรับตำแหน่ง  
ที่ 157 และพบว่าฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 132 และ  
154 มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างและหน้าที่ของ  
โปรตีนซึ่งไม่สามารถแทนที่ด้วยกรดอะมิโนตัวอื่นได้  
(Promdonkoy et al., 2004) และจากการศึกษา  
บทบาทของตำแหน่ง  $\alpha A$  และ  $\alpha C$  ในโปรตีน  
Cyt2Aa2 ที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* subsp.  
*darmstadiensis* ต่อความเป็นพิษกับลูกน้ำยุง โดยการ  
แทนที่ด้วยกรดอะมิโนตัวอื่นทำให้ได้สายพันธุ์กลาย  
(mutants) 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ซึ่งแทนที่อะลานีน  
(alanine) ตำแหน่งที่ 61 ด้วยซิสตีอีน (cysteine)  
(A61C), สายพันธุ์ซึ่งแทนที่ซีรีน (serine) ตำแหน่งที่  
108 ด้วยซิสตีอีน (cysteine) (S108C) และสายพันธุ์ซึ่ง  
แทนที่วาเลิน (valine) ตำแหน่งที่ 109 ด้วยอะลานีน  
(V109A) พบว่าอะลานีนที่ตำแหน่ง 61(A61) มี  
ความสำคัญต่อการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง แต่ไม่มีผล  
ต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีน Cyt2Aa2 และวาเลินที่  
ตำแหน่ง 109 (V109) มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์

ของโปรตีน Cyt2Aa2 แต่ไม่มีผลต่อการแตกตัวของเม็ด  
เลือดแดง ขณะที่ซีรีนที่ตำแหน่ง 108 (S108) มี  
ความสำคัญทั้งต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนและการแตก  
ตัวของเม็ดเลือดแดง ซึ่งจากผลที่ได้พบว่าตำแหน่ง  $\alpha A$   
และ  $\alpha C$  ของโปรตีน Cyt อาจจะเป็นส่วนที่จับกับไกล  
โคโปรตีน (glycoproteins) และลิโปโปรตีน  
(lipoproteins) ที่เยื่อหุ้มของกระเพาะลูกน้ำยุง  
(Promdonkoy et al., 2008)

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างของ  
โปรตีน binary ด้วยเทคนิคชีวฟิสิกส์ (biophysical  
techniques) พบว่าโปรตีน binary มีลักษณะเป็น  
เฮเทอโรเตตราเมอร์ (heterotetramer)  
ประกอบด้วย BinA 2 โมเลกุล และ BinB 2 โมเลกุล  
(Smith et al., 2005) โดย BinA ประกอบด้วย 2  
โดเมนคือ โดเมน N-terminal ซึ่งน่าจะเป็นส่วนที่เข้า  
จับ (interact) กับ BinB และโดเมน C-terminal  
อาจจะเป็นส่วนที่ตอบสนองต่อความเป็นพิษ (toxic  
action) (Yuan et al., 2001) ซึ่งพบว่าตำแหน่งที่  
BinA จับกับ BinB คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 93 และ  
104 (Berry et al., 1993; Yuan et al., 2001) แต่  
โครงสร้างสามมิติของโปรตีน binary ยังไม่ทราบชัดเจน  
และลำดับกรดอะมิโนมีความสัมพันธ์กับโปรตีนชนิดอื่น  
ในฐานข้อมูลน้อย โมเลกุลของ BinA และ BinB มี  
กรดอะมิโนที่ตรงกัน 25% และตรงกับโปรตีนตัวอื่นใน  
ฐานข้อมูล 40% โดยคาดว่าโครงสร้างสามมิติของ  
โปรตีนทั้ง 2 ชนิดจะมีความคล้ายกัน (Promdonkoy  
et al., 2008) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ BinA  
พบว่าประกอบด้วย  $\beta$ -strand 49.3% และ  $\alpha$ -helix  
3.1% (Hire et al., 2009) แต่ในโปรตีน BinB  
ประกอบด้วย  $\alpha$ -helix เพียง 8% (Tangsongcharoen  
et al., 2011) ซึ่งจากการศึกษาของ  
Tangsongcharoen et al. (2011) พบว่าส่วนของ N-

terminal และ C-terminal ของโปรตีน BinB ต่างก็สามารถจับกับเยื่อผิวของกระเพาะลูกน้ำยุงและจับกับโปรตีน BinA ได้อย่างอิสระ จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีส่วนของโครงสร้าง N-terminal และ C-terminal ที่คล้ายคลึงกัน แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงยังคงต้องการทั้งส่วนของ N-terminal และ C-terminal ในการทำงานร่วมกัน (Tangsongcharoen et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 147-150 ของ BinB โดยการแทนที่ 147FQFY150 ด้วยอะลานีน (alanine) ได้ F147A, Q148A, F149A และ Y150A ถึงแม้ว่า BinB สายพันธุ์กลาย (BinB mutants) จะสามารถจับกับ BinA ได้ แต่ก็สูญเสียความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงรำคาญ โดยเฉพาะในตำแหน่ง F149A และ Y150A พบว่าสูญเสียความสามารถในการเกิดพิษทั้งหมด ซึ่งบริเวณอะโรมาติกของ F149 และ Y150 น่าจะเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อความสามารถในการเกิดพิษ อาจเป็นไปได้ว่าจะมีผลในการจับกับบริเวณจับบนเยื่อผิว (Singkhamanan et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Romao et al. (2011) ที่พบว่ากรดอะมิโนในตำแหน่ง 33-158 ของ BinB มีความสำคัญต่อการจับกับบริเวณจับโดยเฉพาะในตำแหน่ง 147-149 (Romao et al., 2011) และเมื่อศึกษาบทบาทของซิสเตอีนในโปรตีน BinB ตำแหน่งที่ 67, 161 และ 241 พบว่าเมื่อแทนที่ด้วยอะลานีนหรือซีรีน จะไม่มีผลต่อการผลิตโปรตีน BinB และซิสเตอีนเหล่านี้ไม่อยู่ในส่วนของพันธะ disulfide ในโมเลกุลของ Bin B แต่เมื่อทดสอบความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงพบว่าที่ตำแหน่ง C67 และ C161 มีความสำคัญต่อการเกิดพิษ ทำให้การจับของ BinB กับ BinA (BinA-BinB interaction) ลดลง จึงทำให้สูญเสียความเป็นพิษแสดงให้เห็นว่าที่ตำแหน่ง C67 และ C161 อาจมี

บทบาทในระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือการจับของโปรตีน binary กับบริเวณจับที่เยื่อผิว (Boonyos et al., 2009)

การศึกษารูปแบบของกรดอะมิโนใน BinA ซึ่งมีซิสเตอีน 3 ตำแหน่งคือ Cys31, Cys47 และ Cys195 พบว่าซิสเตอีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีน binary และไม่สามารถแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนหรือซีรีนได้ โดยคาดว่าที่ซิสเตอีนทั้ง 3 ตำแหน่งนี้อาจจะมีบทบาทต่อกระบวนการโอลิโกเมโรเซชันหรือการจับกันของ BinA และ BinB เพื่อที่จะออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง (Promdonkoy et al., 2008) จากการศึกษาของ Sanitt et al. (2008) โดยการแทนที่กรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) ที่ตำแหน่ง 97 (R97), กลูตาเมต (glutamate) ที่ตำแหน่ง 98 (E98), อาร์จินีน (arginine) ที่ตำแหน่ง 101 (R101), และ กลูตาเมต (glutamate) ที่ตำแหน่ง 114 (E114) ของ BinA ด้วยอะลานีน พบว่าการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงเหมือนกับตัวปกติ แต่การแทนที่ในตำแหน่ง R97 จะทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง ขณะที่การแทนที่ในตำแหน่ง E98, R101 และ E114 ทำให้มีการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญลดลง ซึ่งการแทนที่อะลานีนที่ตำแหน่งต่างๆเหล่านี้ไม่มีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงและไม่มีผลต่อการจับกันของ BinA-BinB แต่จะมีผลต่อความเป็นพิษของโปรตีน BinA (Sanitt et al., 2008)

สำหรับโครงสร้างของโปรตีน Mtx ยังไม่ทราบชัดเจน แต่พบว่าประกอบด้วย โดเมน N-terminal ขนาด 27 กิโลดาลตัน ซึ่งมี ADP-ribosylase activity และโดเมน C-terminal ขนาด 70 กิโลดาลตัน มีลักษณะคล้ายกับ carbohydrate-binding protein (Reinert et al., 2006)

## การออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง

โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจะอยู่ในรูปของผลึกโปรตีน ทำให้เกิดความเสถียรของโปรตีน ซึ่งหากอยู่ในรูปของสารละลาย โปรตีนจะถูกย่อยได้ง่ายด้วยเอนไซม์โปรติเอสภายในเซลล์ในระยะสร้างสปอร์ หรือเมื่อโปรตีนถูกขับออกนอกเซลล์หลังจากที่เซลล์แตก โปรตีนก็อาจถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากแมลงหรือจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งความเสถียรของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง โดยกลไกในการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงในช่วงต้นจะคล้ายกัน คือ หลังจากลูกน้ำยุงกินผลึกโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงเข้าไป ผลึกโปรตีนนี้จะละลายในสถานะที่เป็นต่างในกระเพาะของลูกน้ำยุง จากนั้นจะถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งจะตัดบริเวณปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ทำให้ได้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่สามารถออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงได้ (Federici et al., 2006) ส่วนการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงที่เป็นผลให้ลูกน้ำยุงตายนั้นจะมีกลไกที่ต่างกันตามแต่ชนิดของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงดังนี้

1) กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน Cry และโปรตีน Cyt ที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* subsp. *islaelensis* โดยกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน Cry พบว่าหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์โปรติเอสแล้วจะเข้าจับอย่างจำเพาะกับบริเวณจับเช่น โกลโคโปรตีนหรือ โกลโคลิปิด จากนั้นโปรตีนจึงแทรกเข้าไปในเยื่อไมโครวิลไล (microvillar membrane) ทำให้เกิดการสร้างโอลิโกเมอร์ (oligomerization) ในเยื่อผิวกลายเป็น cation-selective channels ส่งผลให้เกิดการไหลทะลักเข้ามา (influx) ของไอออนบวก (cation) เช่น โพแทสเซียม (potassium) ซึ่งจะนำไปสู่การไหลทะลักเข้าของน้ำเป็นผลให้เกิดแรงดันออสโมติกและทำ

ให้เซลล์แตกในที่สุด ลูกน้ำยุงจะเป็นอัมพาตและเมื่อสารละลายต่าง (alkaline midgut juice) ไหลเข้าภายในโพรงร่างกายจะทำให้ค่า pH ของเลือดเพิ่มขึ้นและขัดขวางการสื่อสารประสาท (nerve conductance) หลังจากนั้นลูกน้ำยุงจะตายภายในเวลาไม่กี่วัน (Federici et al., 2006) ดังรูปที่ 1 จากการศึกษาบริเวณจับของโปรตีน Cry4Ba บนกระเพาะลูกน้ำยุง โดยการเพิ่มปริมาณ cDNA ที่ถอดรหัส membrane-bound alkaline phosphatase จากกระเพาะของลูกน้ำยุงลาย (Aa-mALP) ด้วยเทคนิค RT-PCR และให้มีการแสดงออกในเซลล์แมลง (insect cell) *Spodoptera frugiperda* (Sf9) พบว่าได้โปรตีนขนาด 58 กิโลดาลตัน ทำการตรวจสอบโปรตีนโดยการย่อยด้วย phosphatidylinositol-specific phospholipase C และวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS จากการศึกษาวิเคราะห์โปรตีน พบว่าโปรตีน Cry4Ba สามารถจับกับ Sf9 ที่ผลิต Aa-mALP (Sf9 cells-expressing Aa-mALP) ได้ และเซลล์ที่ทดสอบกับโปรตีน Cry4Ba มีอัตราการตายเพิ่มขึ้น จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า Aa-mALP สามารถตอบสนองต่อโปรตีน Cry4Ba ในการกำจัดเซลล์ Sf9 ได้ แสดงว่า Aa-mALP มีบทบาทเป็นบริเวณจับของโปรตีน Cry4Ba ในลูกน้ำยุงลาย (Dechklar et al., 2011) นอกจากนี้โปรตีน Cry4Ba ยังสามารถจับกับ glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N (GPI-APN) บนเยื่อผิวของกระเพาะลูกน้ำยุงลายได้อีกด้วย โดยเมื่อเปรียบเทียบ GPI-APN 3 รูปแบบ (isoform) คือ APN2778, APN2783 และ APN5808 ที่ถูกทำให้กลายเป็นพันธู์พบว่า APN2783 มีความไวต่อโปรตีน Cry4Ba น้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่า APN2783 มีบทบาทในการเป็นบริเวณจับของโปรตีน Cry4Ba บนเยื่อผิวของกระเพาะลูกน้ำยุงลาย (Saengwiman et al., 2011)

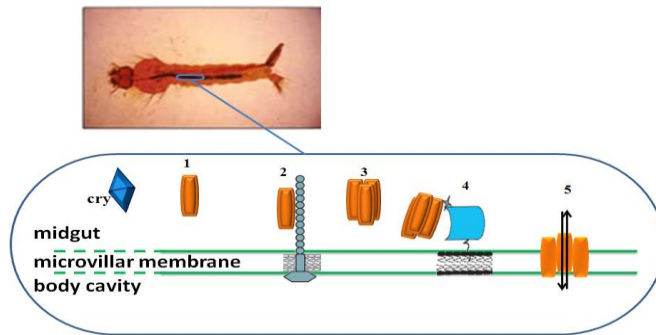
แต่สำหรับโปรตีน Cyt กลไกการออกฤทธิ์จะต่างจากโปรตีน Cry โดยโปรตีน Cyt ไม่ต้องการบริเวณจับที่จำเพาะแต่โปรตีน Cyt จะแทรกเข้าไปในชั้นไขมันในเยื่อไมโครวิลไล (microvillar membrane lipids) ซึ่งการออกฤทธิ์ของโปรตีน Cyt ต่อลูกน้ำยุงมี 2 สมมติฐาน คือ 1) ลักษณะการออกฤทธิ์เหมือนกับโปรตีน Cry คือมีการสร้างช่องในเยื่อไมโครวิลไล (Li et al., 1996) หรือ 2) ไม่มีการสร้างช่องในเยื่อไมโครวิลไล แต่โปรตีน Cyt จะมีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (detergent) เป็นสาเหตุให้ไขมันในเยื่อไมโครวิลไลเสียหาย (Butko, 2003)

2) กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน binary ที่ผลิตได้จาก *B. sphaericus* พบว่าจะแตกต่างจากโปรตีน Cry และโปรตีน Cyt ของ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* กล่าวคือโปรตีน binary ต้องการโปรตีน 2 ชนิดคือ BinA และ BinB ในการทำงานร่วมกันและในสัดส่วนที่เท่ากันเพื่อออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง (Charles et al., 1996; Baumann et al., 1991) โดย BinB จะตอบสนองต่อการจดจำการจับที่บริเวณจับจำเพาะ (specific receptor) ขณะที่ BinA เป็นส่วนที่ตอบสนองต่อความเป็นพิษ (Charles and Nielson, 2000) กลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน binary ต่อลูกน้ำยุงนั้นยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน แต่พบว่าโปรตีน BinB เป็นโปรตีนที่จะจับกับบริเวณจับบนเยื่อผิวและจับโดยตรงกับโปรตีน BinA (Oei et al., 1992) ซึ่งจากการทดลองของ Boonserm et al. (2006) แสดงให้เห็นว่า BinA และ BinB มีการจับกันในสารละลาย (solution) ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ BinA และ BinB จากนั้น สารประกอบ BinA และ BinB (BinA/BinB complex) จึงเข้าจับบนเยื่อผิว และจะมีเพียงส่วนของ BinB เท่านั้นที่จะแทรกเข้าไปในเยื่อผิว นอกจากนี้ยังพบว่า BinA หรือ BinB หรือสารประกอบ

BinA และ BinB เมื่อเข้าจับที่เยื่อผิวแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ BinA หรือ BinB จะแตกต่างจากสารประกอบ BinA และ BinB ซึ่งการขดพับ (folding) ที่ถูกต้องเหมาะสมขึ้นอยู่กับกรณีหน่วยคู่สมกันของโปรตีน (complementary subunit) (Boonserm et al., 2006)

นอกจากนี้การออกฤทธิ์ของโปรตีน binary ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการจับกับบริเวณจับบนเยื่อของกระเพาะของลูกน้ำยุง จากการทดสอบโปรตีน binary ในการกำจัดลูกน้ำยุง พบว่าลูกน้ำยุงลายคือต่อโปรตีน binary เพราะโปรตีนไม่สามารถจับกับเยื่อผิวบนกระเพาะของลูกน้ำยุงลายได้ ขณะที่เมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญ พบว่ามีความไวต่อโปรตีน binary สูง โดยบริเวณจับบนเยื่อผิวกระเพาะ (brush border membranes (BBMF)) ของลูกน้ำยุงรำคาญจะจับอย่างจำเพาะกับโปรตีน BinB ที่บริเวณ Cpm1/Cqm1 ดังนั้นจึงทำการจำแนกยีนที่ถอดรหัสคล้ายกับ Cpm1/Cqm1 จากกระเพาะของลูกน้ำยุงลาย ให้ชื่อว่า Aam1 มีขนาด 73 กิโลดาลตัน ซึ่งจดจำได้ด้วย anti-Cqm1 โดย Aam1 มีลักษณะเป็น  $\alpha$ -glucosidase อยู่ในเยื่อของกระเพาะลูกน้ำยุงลาย ซึ่งจับอยู่กับ GPI ได้ลักษณะที่มีความคล้ายกันกับ Cpm1/Cqm1 แต่จากผลการทดลองไม่พบการจับของ Aam1 กับโปรตีน BinB เมื่อทดสอบ Cqm1 และ Aam1 ด้วยเอนไซม์ endoglycosidase พบว่า Aam1 เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใน Cqm1 แสดงให้เห็นว่า Aam1 มีลักษณะเป็น glycosylate และการที่ไม่มีบริเวณจับที่จำเพาะกับโปรตีน binary ทำให้ลูกน้ำยุงลายสามารถต้านทานต่อโปรตีนได้ (Ferreira et al., 2010)





**รูปที่ 1** แผนภาพจำลองลักษณะการทำงานของโปรตีน Cry 5 ขั้นตอน 1) โปรตีน Cry ละลายในสภาวะที่เป็นต่าง และถูกกระตุ้นให้สามารถทำงานได้ 2) โปรตีนเข้าจับที่บริเวณจับตัวแรก (cadherin-like protein, CADR หรือ GCR) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและ  $\alpha$ -helix1 ถูกตัดออก 3) โปรตีน Cry เปลี่ยนแปลงเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer formation) 4) โอลิโกเมอร์เข้าจับที่บริเวณจับตัวที่สอง (Glycophosphatidylinositol-Aminopeptidase, GPI-APN หรือ Glycophosphatidylinositol - Alkaline phosphatase, GPI-ALP) และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 5) โอลิโกเมอร์แทรกเข้าไปในเยื่อบุผิวและเกิดการสร้างรูบนเยื่อบุผิว (ดัดแปลงจาก Bravo and Soberon, 2007)

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน Mtx ที่ผลิตจาก *B. sphaericus* ยังไม่ทราบกลไกในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงแต่พบว่าโปรตีน Mtx1 มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงสูงสุดในกลุ่มของโปรตีน Mtx และโปรตีน Mtx2 และ Mtx3 นั้นมีความเหมือน (homology) กับโปรตีนที่มีความสามารถในการสร้างรูเช่น epsilon และ aerolysin แสดงให้เห็นว่าโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงเหล่านี้ออกฤทธิ์ได้โดยการสร้างรูบนเยื่อบุผิว (Liu et al., 1996; Thanabalu and Porter, 1995) ซึ่งโปรตีน Mtx1 จะออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ (*C. quinquefasciatus*) มากกว่าลูกน้ำยุงลาย (*A. aegypti*) (Promdonkoy et al., 2004) ขณะที่โปรตีน Mtx2 ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงทั้งสองชนิดได้น้อยกว่าโปรตีน Mtx1 (Chan et al., 1996) และเมื่อเปรียบเทียบโปรตีน Mtx กับโปรตีน binary พบว่าโปรตีน Mtx1 สามารถแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงได้โดยไม่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกับโปรตีนอื่นร่วมด้วย (Thanabalu et al., 1993) ในขณะที่โปรตีน binary

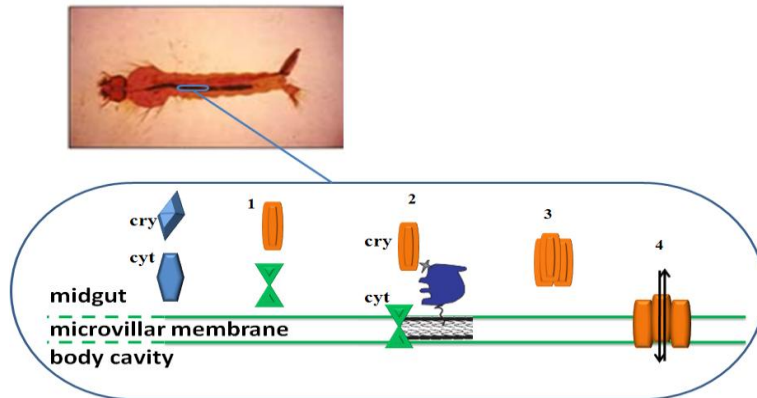
ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีน 2 ชนิดคือ BinA และ BinB (Charles et al., 1996; Baumann et al., 1991) แต่เนื่องจากโปรตีน Mtx ผลิตได้ในปริมาณน้อยเมื่ออยู่ในช่วงที่เซลล์แบ่งตัววิจิจำนวน (exponential phase) และจะถูกย่อยได้ง่ายเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญคงที่ (stationary phase) ดังนั้นโปรตีน Mtx จึงมีบทบาทในกำจัดลูกน้ำยุงน้อยกว่าโปรตีน binary (Shi et al., 2003)

3.) กลไกการใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดต่าง ๆ ร่วมกันเพื่อเสริมความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง จากการทดลองของ Park et al. (2005) พบว่าการใช้โปรตีน Cyt ที่ผลิตได้จาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* หรือ *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* (Btk) สามารถเสริมการออกฤทธิ์ของโปรตีน Cry ได้ (Park et al., 2005) เมื่อโปรตีน Cry และ Cyt ละลายในสภาวะที่เป็นต่างในกระเพาะของลูกน้ำยุงและถูกตัดปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิลด้วยเอนไซม์โปรติเอสให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้

โปรตีน Cyt จะแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้ม จากนั้นโปรตีน Cry จึงเข้าจับที่บริเวณจับ (Alkaline phosphatase, ALP หรือโปรตีน Cyt) ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มของกระเพาะลูกน้ำยุง จากนั้นโปรตีน Cry จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโอลิโกเมอร์ แทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเป็นผลให้เกิดรูในเยื่อหุ้มกระเพาะลูกน้ำยุง (Bravo and Soberon, 2007) ดังรูปที่ 2 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้โปรตีน Cyt1Aa ในการเสริมการออกฤทธิ์กับโปรตีน Cry11Aa ในการกำจัดลูกน้ำยุงรำคาญ (Chang et al., 1993; Khasdan et al., 2001) หรือเสริมการออกฤทธิ์กับโปรตีน Cry4Ba ในการกำจัดลูกน้ำยุงลาย (Crickmore et al., 1995) จากการทดลองของ Promdonkoy et al. (2005) พบว่าเมื่อให้มีการแสดงออกแยกกันของโปรตีน Cry4Ba ที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และโปรตีน Cyt2Aa2 ที่ผลิตจาก *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* ใน *Escherichia coli* พบว่าโปรตีน Cry4Ba มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลาย ซึ่งให้ค่า LC50 เท่ากับ 140 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงรำคาญ ในขณะที่โปรตีน Cyt2Aa2 มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญซึ่งให้ค่า LC50 เท่ากับ 350 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แต่เมื่อให้มีการแสดงออกร่วมกันของโปรตีน Cry4Ba และโปรตีน Cyt2Aa2 ใน *E. coli* พบว่าสามารถเพิ่มความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญได้โดยให้ค่า LC50 เท่ากับ 7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Cry4Ba และโปรตีน Cyt2Aa2 สามารถทำงานร่วมกันในการเสริมการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญได้ (Promdonkoy et al., 2005) และในการทดลองของ Tianyong Li et al. (2000) พบว่าเมื่อให้มีการ

แสดงออกของยีน *cyt1Aa* จาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และยีน *binary* จาก *B. sphaericus* C3-41 ร่วมกันจะสามารถผลิตโปรตีน Cyt1Aa และโปรตีน *binary* ร่วมกันที่ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญมากกว่าการใช้โปรตีน Cyt1Aa หรือโปรตีน *binary* เพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าการใช้โปรตีน Cyt1Aa และโปรตีน *binary* ร่วมกันสามารถเสริมการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงได้ (Tianyong et al., 2000)

จากการศึกษาของ Woo-Park et al. (2011) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีน Cry2Aa ที่ผลิตได้จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 ในการออกฤทธิ์เสริมกับโปรตีนอื่น โดยสร้างพลาสมิดที่ประกอบด้วย *cry2Aa* operon และถ่ายโอนเข้าสู่ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ที่สามารถผลิตผลึกโปรตีน (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa และ Cyt1Aa) และไม่ผลิตผลึกโปรตีน จากนั้นจึงทดสอบความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงลาย ลูกน้ำยุงรำคาญ และลูกน้ำยุงก้นปล่อง พบว่าโปรตีน Cry2Aa ไม่สามารถเสริมการออกฤทธิ์กับโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงใน *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ได้ (Woo-Park et al., 2011) นอกจากนี้จะมีการใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงต่างๆ ร่วมกันแล้วยังมีการใช้ตัวเซลล์ของ *B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* ร่วมกันในการออกฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงในสัดส่วนต่าง ๆ พบว่าเมื่อใช้สัดส่วนของ *Bt* ต่อ *Bs* เท่ากับ 3:2 และ 1:3 สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญได้ ตามลำดับ (Sreshty et al., 2011) ดังนั้นจะเห็นว่าการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงชนิดต่าง ๆ ร่วมกันอาจจะทำให้สามารถเพิ่มหรือลดการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงได้ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่ใช้ร่วมกัน แต่กลไกการออกฤทธิ์เสริมกันหรือหักล้างกันยังไม่ทราบชัดเจน



**รูปที่ 2** แผนภาพจำลองแสดงกลไกการทำงานร่วมกันของโปรตีน Cry และโปรตีน Cyt ดังขั้นตอน 1) โปรตีน Cry และ Cyt ละลายในสถานะที่เป็นต่างในกระเพาะของลูกน้ำยุงและถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์โปรติเอส 2) โปรตีน Cyt แทรกเข้าไปในเยื่อบุผิว จากนั้นโปรตีน Cry จึงเข้าจับที่บริเวณจับซึ่งอยู่บนเยื่อบุผิว (Alkaline phosphatase, ALP หรือโปรตีน Cyt) 3) โปรตีน Cry เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโอลิโกเมอร์ 4) โอลิโกเมอร์ แทรกเข้าไปในเยื่อบุผิวเป็นผลให้เกิดรูในเยื่อบุผิวกระเพาะลูกน้ำยุง (ดัดแปลงจาก Bravo and Soberof, 2005)

### การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจากแบคทีเรีย

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* ในระดับอุตสาหกรรมมีราคาแพง จึงมีความพยายามที่จะใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกแต่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์และความเป็นพิษสูง จากการศึกษาเพื่อปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* พบว่ามีการใช้วัตถุดิบต่างๆ ได้แก่ น้ำข้าวโพด น้ำมะพร้าว รำข้าวและกากน้ำตาล (Kumar et al., 2000; Saalma et al., 1983; Lee and Seleena, 1991; Desai and Shethna, 1991) ตลอดจนการใช้ hydrolyzed liquor (HDL) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by-product) จากการผลิตผงชูรส (monosodium glutamate) พบว่าอาหาร H4 medium (0.05%  $K_2HPO_4$  และ 4% HDL) มีความเหมาะสมสำหรับการผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ  $2.5 \times 10^8$

เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $10^{-7.2}$  และในอาหาร H7 medium (0.05%  $K_2HPO_4$ , and 7% HDL) พบว่ามีความเหมาะสมสำหรับการผลิต *B. sphaericus* ให้ปริมาณเซลล์  $1.4 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และให้ค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $10^{-7.8}$  ขณะที่ในอาหาร nutrient broth ที่มีเกลือและกลูโคส (NBSG medium) ให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ  $1.6 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ  $10^{-6.8}$  จากผลการทดลองพบว่าการใช้อาหารที่มี HDL จะได้ปริมาณเซลล์มากกว่าและโปรตีนที่ได้มีความเป็นพิษสูงกว่าการใช้อาหาร NBSG medium (Saovaneet et al., 1985) นอกจากนี้ยังมีการใช้มันฝรั่งในการผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* สามารถผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่กำจัดลูกน้ำยุงราคาถูกลงได้ โดยโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงให้ค่า  $LC_{50}$  เท่ากับ 0.89 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมง (Poopathi et al., 2002) หรือการใช้กากของเสียจากการบำบัดน้ำเสีย (sewage sludge) ในการผลิต *B.*

*thuringiensis* subsp. *israelensis* ในระดับอุตสาหกรรม (Tyagi et al., 2002) ซึ่งจากการทดลองของ Zhuang et al. (2011) มีการใช้กากของเสียในการหมักแบบต่อเนื่อง (sequential fermentation) เพื่อผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *B. sphaericus* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าได้จำนวน  $2.1 \times 10^9$  และ  $6.8 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กากของเสียนี้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการเจริญ การสร้างสปอร์ และสังเคราะห์โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง การหมักแบบต่อเนื่องจะช่วยประหยัดสารตั้งต้น และพลังงานได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับ การหมักแบบสายพันธุ์เดียว (single strain) โดยการหมักแบบต่อเนื่องนี้จะไม่มีผลกระทบต่อ การเจริญ การสร้างสปอร์ ความสามารถในการก่อพิษ และการต้านทานต่อลูกน้ำยุง การใช้กากของเสียในการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิต (Zhuang et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการใช้ขี้มูลสัตว์ เป้งถั่วและรำข้าวสาลีในการผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ได้อีกด้วย จากการศึกษาของ Prabakaran and Balaraman (2006) มีการใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบในการผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* พบว่าให้ความเป็นพิษสูง (LC50 เท่ากับ 8.89 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถต่อต้านลูกน้ำยุงรำคาญ) ให้ปริมาณสปอร์เท่ากับ  $0.48 \times 10^{11}$  c.f.u.ต่อมิลลิลิตร และปริมาณเซลล์ (biomass) เท่ากับ 7.8 กรัมต่อลิตร (Prabakaran และ Balaraman, 2006) ในปี 2008 Prabakaran et al. (2008) ได้ศึกษาการผลิต *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* โดยใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมะพร้าว (coconut broth) ประกอบด้วย 1% ของ stock salt solution (stock salt solution:  $MgCl_2$

20.3 g;  $CaCl_2$  10.2 g;  $MnCl_2$  1.0 g) ในน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์มาก ทำการเปรียบเทียบปริมาณของมวลเซลล์ (cell mass) การสร้างสปอร์ และความเป็นพิษ (mosquito larvicidal activity) ต่อลูกน้ำยุงลายกับอาหาร Nutrient Yeast Salt Medium (NYSM medium) พบว่าได้ผลเทียบเท่ากับ NYSM medium (Prabakaran et al., 2008) ต่อมา Magda et al. (2008) ได้ศึกษาการใช้หางนมในการผลิต *B. sphaericus* 2362 และ *B. sphaericus* 14N1 โดยทำการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation) พบว่าแบคทีเรียสามารถออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญได้ และ *B. sphaericus* 2362 สามารถกำจัดลูกน้ำยุงได้ 50–100% ในขณะที่ *B. sphaericus* 14N1 กำจัดลูกน้ำยุงได้ 25–70% (Magda et al., 2008)

นอกจากการศึกษาและปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงแล้ว ได้มีการศึกษาเพื่อพัฒนาผลผลิตและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง โดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ด้วยการสร้างดีเอ็นเอลูกผสมของ *cry4A*, *cry4B* และ *cry11A* จาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และยีน *binary* จาก *B. sphaericus* โดยยีน *cry* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *cry4B* และโปรตีน *binary* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *binary* พบว่าดีเอ็นเอลูกผสมนี้สามารถกำจัดลูกน้ำยุงลาย ยุงรำคาญ และยุงก้นปล่องได้ (Tanapongpipat et al., 2003) และการสร้างลูกผสมของยีน *cry11Aa* และ *p20* จาก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ในแบคทีเรียแกรมลบ *Asticcacaulis excentricus* พบว่ายีน *cry11Aa* สามารถออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลาย ได้โดยให้ค่า LC50 เท่ากับ  $6.83 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Armengol et al., 2005) สำหรับการ

ปรับปรุงการผลิตโปรตีน binary พบว่า Luxanil et al. (2003) ได้นำยีน *binary* จาก *B. sphaericus* 2297 ถ่ายโอนเข้าสู่ *B. cereus* สายพันธุ์ Ae10 และ Cx5 ที่แยกได้จากกระเพาะของลูกน้ำยุง พบว่าสามารถผลิตโปรตีน Bin B ขนาด 51 กิโลดาลตันได้ทั้งใน *B. cereus* สายพันธุ์ Ae10 และ Cx5 ซึ่งออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญสูง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. cereus* สายพันธุ์ Ae10 มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงสูงกว่า *B. sphaericus* 2297 ที่เป็นแบคทีเรียผลิตโปรตีน binary ตามธรรมชาติถึง 4 เท่าและ *B. cereus* สายพันธุ์ Cx5 มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงสูงกว่า *B. sphaericus* 2297 ถึง 28 เท่า ระดับความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงที่ต่างกันนี้เนื่องมาจากระดับการผลิตโปรตีน binary ที่ต่างกัน (Luxanil et al., 2003) และจากความสามารถในการละลายของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่แตกต่างกัน (Promdonkoy and Ellar, 2003) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการปรับปรุงการละลายของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงโดยการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีความสามารถในการละลายสูง เช่น glutathione S-transferase (GST) (Huang and Chen, 2005) และ T7 tag (Heo et al., 2006) โดย Promdonkoy et al. (2003) ได้ศึกษาการนำ BinA (42 กิโลดาลตัน) และ BinB (51 กิโลดาลตัน) จาก *B. sphaericus* strain 2297 ทำการโคลนและให้มีการแสดงออกใน *E. coli* โดยเชื่อมต่อกับ T7 tag (fusion) เปรียบเทียบกับการไม่เชื่อมต่อกับ T7 tag (non-fusion) พบว่าระดับการแสดงออกของ T7-BinB และ non-fusion BinB ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ non-fusion BinA มีความเสถียรน้อยกว่า T7-BinA และการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจาก BinA และ BinB ที่มีการแสดงออกแยกกันจะให้ปริมาณโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงที่สูงกว่าการแสดงออกของ BinA และ BinB ร่วมกัน และเมื่อทดสอบการออกฤทธิ์

ต่อลูกน้ำยุงรำคาญ พบว่าการใช้ BinA หรือ BinB เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อลูกน้ำยุง แต่การใช้ BinA และ BinB ร่วมกันจะทำให้ความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงสูงขึ้น โดย T7 tag จะเชื่อมต่อทาง N-terminus ของทั้ง BinA และ BinB และจะไม่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีน แต่จะช่วยให้ Bin A มีความเสถียรขึ้น (Promdonkoy et al., 2003) การใช้ BinA และ BinB ในปริมาณที่เท่ากันจะทำให้ความเป็นพิษสูงและเมื่อทำการเชื่อมต่อกับ BinA และ BinB กับ glutathione S-transferase (GST) โดยมีการแสดงออกเป็น GST-fusion protein (GST-BinA และ GST-BinB) พบว่าสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงให้สูงขึ้นและสามารถออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงรำคาญได้ โดยคาดว่า GST จะช่วยเพิ่มการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงและช่วยในการละลายของโปรตีนในกระเพาะของลูกน้ำยุงได้ดีขึ้น ทำให้ fusion protein มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงสูงกว่า non-fusion protein (Promdonkoy et al., 2008) อย่างไรก็ตามการใช้ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *B. sphaericus* ยังคงมีข้อจำกัดคือ ไวต่อแสงแดดและอุณหภูมิ ตกตะกอนจากผิวน้ำได้อย่างรวดเร็ว จึงมีการศึกษาเพื่อแก้ปัญหานี้โดยการนำแบคทีเรียที่สามารถลอยตัวบนผิวน้ำได้นานกว่ามาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ตัวอย่างเช่น *Enterobacter amnigenus* An 11 ซึ่งแยกได้จากกระเพาะของลูกน้ำยุงก้นปล่อง (Khampang et al., 1999) พบว่า *E. amnigenus* An 11 สามารถผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้แต่มีปริมาณน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้โปรโมเตอร์ที่ไม่เหมาะสม เพราะเป็นการใช้โปรโมเตอร์ของ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. sphaericus* และ *E. coli* ในการผลิตของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงใน *E. amnigenus* An 11 (Khampang et al., 1999; Khampang et al.,

2001; Promdonkoy et al., 2004) ดังนั้นในงานวิจัยของ Toopaang et al. (2011) จึงได้ศึกษาหาโปรโมเตอร์ที่เหมาะสมจาก *E. amnigenus* An11 ซึ่งพบว่าโปรโมเตอร์ที่ได้คล้ายกับโปรโมเตอร์ของโปรคาริโอต และเมื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ภายใต้โปรโมเตอร์นี้ใน *E. amnigenus* An11 พบว่าสามารถผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงได้โดยไม่มีการใช้ตัวกระตุ้น (inducer) และมีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงลายสูงกว่า *E. coli* ที่มีพลาสมิดชนิดเดียวกัน (Toopaang et al., 2011)

## สรุป

ยุงเป็นพาหะนำโรคหลายชนิดที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ การใช้โปรตีนกำจัดลูกน้ำยุง เป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม การศึกษาโครงสร้าง บทบาทของกรดอะมิโนในโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง มีส่วนสำคัญในการทำความเข้าใจความสำคัญของโครงสร้างที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง การศึกษาการใช้โปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงต่าง ๆ ร่วมกันเพื่อช่วยเสริมการออกฤทธิ์ การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม หรือการปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ล้วนมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงประสิทธิภาพ และปริมาณการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุง ซึ่งจะส่งผลให้การใช้โปรตีนในการกำจัดลูกน้ำยุงมีประสิทธิภาพมากขึ้นตามไปด้วย

## เอกสารอ้างอิง

Armengol, G., Guevara, O.E., Orduz, S. and Crickmore, N. (2005). Expression of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry11Aa in the aquatic bacterium *Asticcacaulis excentricus*. *Curr Microbiol.* 51: 430–433.

- Aronson, A.I. (1993). Two faces of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol Microbiol.* 7: 489–496.
- Baumann, P., Clark, M.A., Baumann, L. and Broadwell, A.H. (1991). *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: Properties of the organism and its toxins. *Microbiol Rev.* 55: 425–436.
- Berry, C., Hindley, J., Ehrhardt, A.F., Grounds, T., Souza, I. and Davidson, E.W. (1993). Genetic determinants of host ranges of *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxins. *J Bacteriol.* 175: 510–518.
- Bietlot, H.P., Vishnubhatla, I., Carey, PR., Pozsgay, M. and Kaplan, H. (1990). Characterization of the cysteine residues and disulfide linkages in the protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J.* 267: 309–316.
- 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 Com.* 342: 1273–1278.
- Boonyos, P., Soonsanga, S., Boonserm, P. and Promdonkoy, B. (2009). Role of cysteine at positions 67, 161 and 241 of a *Bacillus sphaericus* binary toxin BinB. *BMB reports.* 43: 23–28.
- Bravo, A., Gill, S.S. and Soberof, M. (2005). *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. *Comprehensive Molecular Insect Science* Elsevier BV. 175–206.
- Bravo, A., Gill, S. and Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49: 423–435.

- Butko, P. (2003). Cytolytic toxin of Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol.* 69: 2415–2422.
- Chan, S.W., Thanabalu, T., Wee, B.Y. and Porter, A.G. (1996). Unusual amino acid determinants of host range in the Mtx2 family of mosquitoicidal toxins. *J Biol Chem.* 271: 14183–14187.
- Chang, C., Yu, Y.M., Dai, S.M., Law, S.K. and Gill, S.S. (1993). High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpression gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl Environ Microbiol.* 59: 815–821.
- Charles, J.F., Nielson, C. and Delecluse, A. (1996). *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu Rev Entomol.* 41: 451–472.
- Charles, J.F. and Nielsen, L. (2000). Mosquitoicidal bacterial toxins: Diversity, mode of action and resistance phenomena. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95: 201–220.
- Chow, E., Singh, F.J.P. and Gill, S.S. (1989). Binding and aggregation of the 25 kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to insect cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Appl Environ Microbiol.* 55: 2779–2788.
- Clements, A.N. (1992). *The biology of mosquitos.* New York: CABI Publishing. xiv-xxii.
- Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M. and Zaritsky, A. (2008). High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Mol Biol.* 380: 820–827.
- Crickmore, N., Bone, E.J., Williams, J.A. and Ellar, D.J. (1995). Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitoicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 131: 249–254.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, H.D. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 807–813.
- Dechklar, M., Tiwesi, K., Angsuthanasombat, C. and Pootanakit, K. (2011). Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: A *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochem Mol Biol.* 41: 159–166.
- Desai, S.Y. and Shethna, Y.I. (1991). Production and formulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *B. sphaericus* 1593. *Indian J Med Res.* 93: 318–323.
- Drobniewski, F.A. and Ellar, D.J. (1988). Investigation of the membrane lesion induced *in vitro* by two mosquitoicidal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol.* 16: 195–199.
- Du, J., Knowles, B.H., Li, J. and Ellar, D.J. (1999). Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. *Biochem J.* 338: 185–193.
- Federici, B.A., Park, H.W. and Sakano, Y. (2006). Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Monogr.* 1: 195–236.

- Ferreira, L., Romao, T., Pompilio, O. and Silva, M. (2010). The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored  $\alpha$ -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. *Insect Biochem Mol Biol.* 40: 604-610.
- Goldberg, L.J. and Margalit, J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq News.* 37: 317-324.
- Guerchicoff, A., Delecluse, A. and Rubinstein, C.P. (2001). The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl Environ Microbiol.* 67: 1090-1096.
- Heo, M.A., Kim, S.H. and Kim, S.Y. (2006). Functional expression of single-chain variable fragment antibody against c-Met in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 47: 203-209.
- 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.
- Huang, C.J. and Chen, C.Y. (2005). High-level expression and characterization of two chitinases, ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res.* 327: 8-17.
- Kashyap, S., Singh, B.D. and Amla, D.V. (2010). Homology modelling deduced 3-D structure of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab17 toxin. *Science Asia.* 36: 280-285.
- Khampang, P., Chungjatupornchai, W., Luxananil, P. and Panyim, S. (1999). Efficient expression of mosquito-larvicidal proteins in a gram-negative bacterium capable of recolonization in the guts of *Anopheles dirus* larva. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 79-84.
- Khampang, P., Luxananil, P., Tanapongpipat, S., Chungjatupornchai, W. and Panyim, W. (2001). Recombinant *Enterobacter amnigenus* highly toxic to *Anopheles dirus* mosquito Larvae. *Curr Microbiol.* 43: 448-451.
- Khasdan, V., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Boussiba, S. and Zaritsky, A. (2001). Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Environ Microbiol.* 3: 798-806.
- Koni, P.A. and Ellar, D.J. (1993). Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. *J Mol Biol.* 229: 319-327.
- Kumar, A., Sra, K., Sangodkar, U.M.X. and Sharma, V.P. (2000). Advances in the bio-control of mosquito vectors utilizing *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Proc Natl Acad Sci. India LXX:* 1-20.
- Lee, H.L. and Seleena, P. (1991). Fermentation of a Malaysian *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 isolate, a mosquito microbial control agent utilizing local wastes. *Southeast Asian J Trop Med public health.* 22: 108-112.
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B. and Ellar, D.J. (2001). Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem Soc Trans.* 29: 571-577.
- Li, J., Koni, P.A. and Ellar, D.J. (1996). Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from



- Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol.* 257: 129–152.
- Li, T., Yuan, Z., Zhang, Y., Yu, J. and Pang, Y. (2000). Coexpression of *cyt1Aa* of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Bacillus sphaericus* binary toxin gene in acrySTALLIFEROUS strain of *B. thuringiensis*. *Curr Microbiol.* 40: 322–326.
- Liu, J.W., Porter, A.G., Wee, B.Y. and Thanabalu, T. (1996). New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8- kilodalton mosquitocidal toxins. *Appl Environ Microbiol* 62 : 2174–2176.
- Liu, J.W., Yap, W.H., Thanabalu, T. and Porter, A.G. (1996). Efficient synthesis of mosquitocidal toxins in *Asticcacaulis excentricus* demonstrates potential of gram-negative bacteria in mosquito control. *Nat Biotechnol.* 14: 343-347.
- Luxananil, P., Tanapongpipat, S., Promdonkoy, B., Atomi, H., Imanaka, T. and Panyim, S. (2003). Expression of binary toxin genes in the mosquito-colonizable bacteria, *Bacillus cereus*, leads to high toxicity against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Curr Microbiol.* 47: 372–375.
- Magda, A.E., Maysa, E.M. and Foda, M.S. (2008). Efficient mosquitocidal toxin production by *Bacillus sphaericus* using cheese whey permeate under both submerged and solid state fermentations. *J Invertebr Pathol.* 98: 46–53.
- Moffat, A.S. (1991). Research on biological pest control moves ahead. *Science.* 252: 211-212.
- Oei, C., Hindley, J. and Berry, C. (1992). Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinquefasciatus* gut: elucidation of functional binding domains. *J Gen Microbiol.* 138: 1515–1526.
- Park, H.W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., Johnson, J.J., Walton, W.E. and Federici, B.A. (2005). Recombinant larvicidal bacteria with markedly improved efficacy against *Culex* vectors of West Nile Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 72: 732–738.
- Park, H.W. and Federici, B.A. (2000). Domain I plays an important role in the crystallization of Cry3A in *Bacillus thuringiensis*. *Mol biotechnol.* 16: 97–107.
- Poopathi, S., Anup-Kumar, K., Kabilan, L. and Vaithilingam, S. (2002). Development of low cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*. *World J Microbiol Biotechnol.* 18: 209–216.
- Porter, A.G., Davidson E.W. and Liu J.W. (1993). Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol Rev.* 57: 838–861.
- Prabakaran, G. and Balaraman, K. (2006). Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biol Control.* 36: 288–292.
- Prabakaran, G., Hoti, S.L., Manonmani, A.M. and Balaraman, K. (2008). Coconut water as a cheap source for the production of  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, a mosquito control agent. *Acta Trop.* 105: 35–38.
- Promdonkoy, B. and Ellar, D.J. (2000). Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from

- Bacillus thuringiensis*. *Biochem J.* 350: 275–282.
- Promdonkoy, B. and Ellar, D.J. (2003). Investigation of the pore forming mechanism of a Cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J.* 374: 255–259.
- Promdonkoy, B., Chewawiwat, N., Tanapongpipat, S., Luxananil, P. and Panyim, S. (2003). Cloning and characterization of a cytolytic and mosquito larvicidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. *Curr Microbiol.* 46: 94–98.
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P. and Panyim, S. (2005). Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *FEMS Microbiol Lett.* 252: 121–126.
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P. and Panyim, S. (2008). High-level expression in *Escherichia coli*, purification and mosquito-larvicidal activity of the binary toxin from *Bacillus sphaericus*. *Curr Microbiol.* 57: 626–630.
- Promdonkoy, B., Pathaichindachote, W., Krittanai, C., Audtho, M., Chewawiwat, N. and Panyim, S. (2004). Trp132, Trp154, and Trp157 are essential for folding and activity of a Cyt toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 317: 744–748.
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., Tanapongpipat, S., Luxananil, P., Chewawiwat, N., Audtho, M. and Panyim, S. (2004). Cloning and characterization of a mosquito larvicidal toxin produced during vegetative stage of *Bacillus sphaericus* 2297. *Curr Microbiol.* 49: 84–88.
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P., Wongtawan, B., Boonserm, P. and Panyim, S. (2008). Cys31, Cys47, and Cys195 in BinA are Essential for Toxicity of a Binary Toxin from *Bacillus sphaericus*. *Curr Microbiol.* 56: 334–338.
- Promdonkoy, B., Rungrod, A., Promdonkoy, P., Pathaichindachote, W., Krittanai, C. and Panyim, S. (2008). Amino acid substitutions in  $\alpha A$  and  $\alpha C$  of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquito-larvicidal specificity. *J Biotechnol.* 133: 287–293.
- Reinert, D.J., Carpusca, I., Aktories, K. and Schulz, G.E. (2006). Structure of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus*. *J Mol Biol.* 357: 1226–1236.
- Romao, T.P., Melo, O.P. and Silva, M.H. (2011). The N-terminal third of the BinB subunit from *Bacillus sphaericus* binary toxin is sufficient for its interaction with midgut receptors in *Culex quinquefasciatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 321: 167–174.
- Saalma, H.S., Foda, M.S., Dulmage, H.T. and Sharaby, E.L. (1983). Novel fermentation medium for production of delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.* 41: 8–19.
- Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, C. and Pootanakit, K. (2011). In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem Biophys Res Commun.* 407: 708–713.
- Sanitt, P., Promdonkoy, B. and Boonserm, P. (2008). Targeted mutagenesis at charged residues in *Bacillus sphaericus* BinA toxin affects

- mosquito-larvicidal activity. *Curr Microbiol.* 57: 230–234.
- Saovane, C.D., Pantuwatana, S. and Bhumiratana, A. (1985). Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a byproduct from a monosodium glutamate factory. *J Invertebr Pathol.* 46: 231–238.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van, R.J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 775–806.
- 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.
- Silapanuntakul, S., Pantuwatana, S., Bhumiratana, A. and Charoensiri, K. (1983). The comparative persistence of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae in different kinds of environments. *J Invertebr Pathol.* 42: 387–392.
- Singhmanan, K., Promdonkoy, B., Chaisri, U. and Boonserm, P. (2010). Identification of amino acids required for receptor binding and toxicity of the *Bacillus sphaericus* binary toxin. *FEMS Microbiol Lett.* 303: 84–91.
- 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.
- Sreshtym, M., Kumar, P. and Murty, N. (2011). Synergism between wild-type *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. sphaericus* strains: A study based on isobolographic analysis and histopathology. *Acta Tropica.* 118: 14–20.
- Tanapongpipat, S., Luxananil, P., Promdonkoy, B., Chewawiwat, N., Audtho, M. and Panyim, S. (2003). A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 228: 259–263.
- 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.
- Thanabalu, T., Berry, C. and Hindley, J. (1993). Cytotoxicity and ADP-ribosylating activity of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1: possible roles of the 27- and 70-kilodalton peptides. *J Bacteriol.* 175: 2314–2320.
- Thanabalu, T. and Porter, A.G. (1995). Efficient Expression of a 100-kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 61: 4031–4036.
- Tianyong, L., Fan, S., Zhiming, Y., Yongmei, Z., Jianxiu, Y. and Yi, P. (2000). Coexpression of Cyt1Aa of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* with *Bacillus sphaericus* binary toxin gene in acrySTALLIFEROUS strain of *B. thuringiensis*. *Curr Microbiol.* 40: 322–326.
- Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin. *FEBS Lett.* 154: 362–368.

- Toopaang, W., Jongsareejit, B., Soonsanga, S. and Promdonkoy B. (2011). Isolation of a strong promoter from *Enterobacter amnigenus* An11; a mosquito larval gut colonizing bacteria. International conference : The 3rd Biochemistry and Molecular Biology Conference. Chiangmai University, Thailand.
- Tyagi, R.D., Sikati, F.V., Barnabe, S., Vidyarthi, A.S., Valero, J.R. and Surampalli, R.Y. (2002). Simultaneous production of biopesticide and alkaline proteases by *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as a raw material. Water Sci Technol. 46: 247–254.
- Woo-Park, H., Devera, J., Prins, B. and Bideshi, D. (2011). The dual-activity insecticidal protein, Cry2Aa, does not enhance the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J Asia Pacific Entomol. 14: 429–431.
- 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 molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. Eur J Biochem. 268: 2751–2760.
- Zhuang, L., Zhou, S., Wang, Y. and Chang, M. (2011). Mosquito biolarvicide production by sequential fermentation with dual strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* using sewage sludge. Biores Tech. 102: 1574–1580.

