

**STUDY OF LYSOGENY OF BACTERIOPHAGE VHS1
IN
*VIBRIO HARVEYI***

KRIT KHEMAYAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

ISBN 974-04-4853-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาไลโซเจนีของแบคทีริโอฟาจ VHS1 ในเชื้อ *Vibrio harveyi*
(STUDY OF LYSOGENY OF BACTERIOPHAGE VHS1 IN *VIBRIO HARVEYI*)

กฤติ เขมณฺฑา 4536536 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., ธีระศักดิ์ พัชรวิภาส,
Ph.D., บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, MD., Ph.D.

บทคัดย่อ

การสัมผัสกันระหว่างแบคทีเรียและเพิ่มเพอเรต (temperate) แบคทีริโอฟาจในสารละลาย ส่งผลให้เกิดการแตกของหลายเซลล์และเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงแบบไลโซจีนิกคือบางเซลล์มีโพรฟาจในรูปพลาสมิดหรือในรูปการแทรกสารพันธุกรรมเข้าไปในโครโมโซมของแบคทีเรีย ผลของการเกิดกระบวนการนี้มีความหลากหลายทางความคงทนซึ่งอาจมีการแสดงออกจากการได้มาของยีนส์จากโพรฟาจ ในการศึกษาครั้งนี้ ไลโซเจนิคจากแบคทีริโอฟาจ VHS1 เกิดขึ้นค่อนข้างน้อยและไม่คงทน ความไม่คงทนของโคลนที่ได้ให้ทั้งโคลนที่คิดเชื้อ (lysogenic) และที่ไม่คิดเชื้อ (non-lysogenic) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน โคลนที่ไม่คิดเชื้อค่อนข้างมีความอยู่ตัวและเกิดพลาแก (plaque) แบบไม่ชัดเจนในการทำทาสต์ด้วย VHS1 อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่แสดงออกแตกต่างจากเชื้อเริ่มต้น บ่งบอกมีการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ VHS1 ส่งผลให้เปลี่ยนแปลงอย่างถาวรที่พันธุกรรม นอกจากนี้โคลนที่ได้ไม่สามารถที่จะตรวจสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอไฮบริดเซชันและพีซีอาร์ว่ามี VHS1 อยู่ บ่งบอกว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่จีโนม ซึ่งอาจเรียกโคลนที่ได้ว่าซูโดไลโซเจนิค (pseudolysogenic) เพราะว่ามี การแสดงออกลักษณะบางอย่างแบบไลโซเจนิคแต่ไม่มีการปรากฏของฟาจยีนส์ สิ่งที่ปรากฏให้เห็นนี้ไม่เคยมีการรายงานและก็ยังไม่ทราบถึงกลไกที่เกิดมาก่อน ผลการทดลองพบว่า *V. harveyi* โคลนเกิดการไลโซเจนิค (lysogenize) โดย VHS1 ซึ่งอยู่ในรูป episome ซึ่งไม่เกิดการแทรกตัวเข้าไปในโครโมโซมของเจ้าบ้าน VHS1 สามารถตรวจสอบด้วยวิธีดีเอ็นเอไฮบริดเซชันและพีซีอาร์ เหตุการณ์นี้สามารถอธิบายปรากฏการณ์การหายไปอย่างรวดเร็วของการเกิดพิษของไลโซเจนิคที่มาจากการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องในห้องทดลอง

105 หน้า ISBN 974-04-4853-4

STUDY OF LYSOGENY OF BACTERIOPHAGE VHS1 IN *VIBRIO HARVEYI*

KRIT KHEMAYAN 4536536 SCBT/M

M.Sc.(BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS : TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., TIRASAK

PASHARAWIPAS, Ph.D., BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, MD.,

Ph.D.

ABSTRACT

Exposure of a bacterial suspension to a temperate bacteriophage will result in lysis of many cells and lysogenic conversion of some that contain a prophage plasmid or prophage element integrated into the host bacterial chromosome. The result is a bacterial clone of variable stability that may express genes from the acquired prophage. In this study, the lysogenic bacteriophage VHS1 produced very few, relatively unstable lysogenic clones of *V. harveyi*. These unstable clones produced both infected (lysogenic) and uninfected (non-lysogenic) progeny clones in the same culture. The uninfected clones were very stable and showed no lytic plaques when lawns were challenged with VHS1. However, they did show turbid plaques in dot plaque assays. Thus, they differed phenotypically from the original parental isolate, suggesting that interaction with VHS1 resulted in permanent genetic change. Despite this, the clones failed to show evidence of genetic material from VHS1 by southern blot hybridization and PCR assay, suggesting that the change had occurred in the host genome. Such clones may be called pseudolysogenic since they show some phenotypic characteristics of lysogenic clones but do not contain phage genes. This phenomenon has not been previously reported and the mechanism for it is unknown. Experiments revealed that *V. harveyi* clones lysogenized by VHS1 carried the prophage as an episome that did not integrate into the host chromosome. The VHS1 prophage could be detected by both southern blot hybridization and by polymerase chain reaction (PCR) assay. This situation explained the rapid loss of virulence of lysogenic isolates on continuous subculture in the laboratory.

KEY WORDS : BACTERIOPHAGE/VHS1/ *VIBRIO HARVEYI*

105 pp. ISBN 974-04-4853-4