LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

11 MAY 1992

CLONING OF *recA* GENE
FROM *Xanthomonas oryzae isolate 8707*

SIRITIDA RABIBHADANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

18826

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษายีน *recA* ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* isolate 8707

ผู้วิจัย ศิริธิดา รพีพัฒน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ศุภรัฒ มงคลสุข, Ph.D.

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D.

อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 24 กันยายน พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

ยีน *recA* เป็นยีนซึ่งมีส่วนสำคัญในการจับคู่ของ DNA (homologous recombination) และในระบบ SOS ซึ่งเป็นระบบสำคัญที่กระตุ้นเมื่อ DNA ถูกทำลายโดยแสง UV หรือ สารเคมีต่าง ๆ เช่น methylmethane sulfonate (MMS) หรือ mitomycin C ยีน *recA* จากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* isolate 8707 ได้ถูกแยกจาก DNA library ในพลาสมิด pBR322 โดยวิธี complementation โดยใช้เชื้อ *E.coli recA*$^-$ เป็นเซลล์เจ้าบ้านและคัดเลือกจากโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา ampicillin และสาร mitomycin C 4โคลน จาก 6,000 โคโลนีที่ได้จากคัดเลือกวิธีนี้ถูกนำกลับไป transform เข้าเชื้อ *E.coli* DH5α,BW368 และ HB101 อีกครั้ง และนำไปทดสอบคุณสมบัติการดื้อสาร mitomicin C และ MMS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อีกครั้ง หลังจากที่ตรวจสอบพบว่าพลาสมิดที่มาจาก โคลนทั้งสี่นี้มีขนาด insert ที่เท่ากัน และมีแบบที่เหมือนกันเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ SalI หรือ EcoRI-SalI จากการทดลองนี้จึงเลือก 1 ใน 4 โคลนมาทำการศึกษาต่อโดยให้ชื่อว่า pSM-A1

Copyright by Mahidol University

จากผลการทดลองเมื่อทำ Southern blot กับโครโมโซมของ *Xanthomonas oryzae* isolate 8707, *Xanthomonas* species อื่น และ *E.coli* โดยใช้ส่วน insert ของ pSM-A1 เป็นตัวตรวจสอบ ทำให้พิสูจน์ได้ว่าส่วน insert ของโคลนนี้มาจาก *Xanthomonas oryzae* isolate 8707 และเมื่อทำ Western blot โดยใช้ antibody ต่อโปรตีน RecA ของ *E.coli* พบว่าโคลนนี้สามารถสร้างโปรตีน RecA ที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน RecA ของ *Xanthomonas oryzae isolate 8707* และของ *E.coli* ซึ่งมีขนาดประมาณ 40 kDa ผลการทดลองทั้งหมดจึงทำให้สรุปได้ว่า pSM-A1 นี้มียีน *recA* ของ *Xanthomonas oryzae* isolate 8707 นอกจากนี้ pSM-A1 ได้ถูกนำมาตรวจสอบคุณสมบัติของยีน *recA* ต่อโดยตรวจสอบคุณสมบัติการเป็น protease โดยดูจากการ complementation การซ่อมแซม DNA ใน *E.coli* และคุณสมบัติการ recombination โดยศึกษาจากการ complementation ยีนที่ช่วยในการสร้าง plaque ของ bacteriophage lambda (*red*$^-$ *gam*$^-$)

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Cloning of *recA* gene from *Xanthomonas oryzae isolate 8707*
Name	Siritida Rabibhadana
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	Skorn Mongkolsuk, Ph.D. Somsak Pantuwatana, Ph.D. Amaret Bhumiratana, Ph.D.
Date of Graduation	24 September B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

RecA-like gene of *Xanthomonas oryzae isolate 8707* chromosomal DNA have been cloned by using rationale of complementation *E. coli recA*- mutation and selected for mitomycin C resistant phenotype. Four transformants from six thousand colonies were retransformed into *E. coli DH5a, HB101 and BW368* and checked for MMS and mitomycin C resistant.

Result from Southern blot analysis of one of these transformants named *pSM-A1* confirmed that the insert portion of this clone derived from *Xanthomonas oryzae isolate 8707* chromosomal DNA. Significantly, from immunological analysis antiserum raised against *E. coli* RecA protein cross-reacted with *Xanthomonas phaseolin, Xanthomonas oryzae 8707, Xanthomonas campestris pv campestris.* Furthermore, it also cross-reacted with cell lysate from *E. coli BW368* harboring pSM-A1 but it did not react with cell lysate from *E. coli BW368* RecA protein. A single band detected from pSM-A1 cell lysate with an apparent molecular weight nearly equal to a single

Copyright by Mahidol University

band detected from *Xanthomonas oryzae isolate 8707* cell lysate and a protein band molecular weight 40,000 *E. coli* protein. These results indicated that pSM-A1 clone contains *Xanthomonas oryzae isolate 8707 recA*-like gene.

Copyright by Mahidol University