LIBRARY AND INFORMATION
MAHIDOL UNIVERSITY

REGULATION OF XANTHOMONAS CATALASE GENE IN ESCHERICHIA COLI AND XANTHOMONAS ORYZAE

CHANINCHON CHANVANICHAYACHAI

With compliments
of
Faculty of Graduate Studies, Mahidol Univ.

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1995

TH
C456 ร
1995

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การควบคุมของยีน catalase จากเชื้อ *Xanthomonas* ในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

ผู้วิจัย ชนินทร์ชร ชาญวณิชยชัย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ศกรณ์ มงคลสุข, Ph D

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D

ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, M.D

จรัญญา ณรงคะชวนะ, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

การศึกษาการแสดงออกของยีน catalase จากเชื้อ *Xanthomonas* ในเชื้อ *Escherichia coli* พบว่า พลาสมิด pKSkatX ที่มียีน catalase สามารถทำให้เชื้อ *E. coli* UM255 ซึ่งไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase กลับมาสร้างเอนไซม์นี้ได้ พบว่า การแสดงออกของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อ (growth phase) และอุณหภูมิที่เชื้อเจริญเติบโต โดยพบว่าปริมาณของเอนไซม์จะมีระดับสูงสุดเมื่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อช้าลง (late log phase) ที่อุณหภูมิ 28 °C ขณะที่อุณหภูมิ 37 °C ไม่มีการสร้างเอนไซม์นี้ การไม่แสดงออกของยีน catalase ที่อุณหภูมิ 37 °C นี้ ไม่ได้เกิดจากการที่เอนไซม์ถูกทำลายเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่อาจจะเกิดจากผลของอุณหภูมิต่อการสร้างเอนไซม์นี้

Copyright by Mahidol University

สำหรับการแสดงออกของยีนนี้ในเชื้อ *Xanthomonas* ชนิดต่างๆ พบว่าระดับของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น และการที่มีระดับเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นนี้ทำให้เชื้อสามารถปกป้องตนเองจากการทำลายโดย hydrogen peroxide ได้ แต่ไม่สามารถที่จะป้องกันตนเองจากการทำลายโดยสาร *tert*-butylhydroperoxide และ menadione จากการศึกษา transcription ของยีนนี้โดยใช้ chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) fusion พบว่าการแสดงออกของยีนนี้ ไม่มีความแตกต่างกันทั้งที่อุณหภูมิ 28 °C และ 37 °C และในทุกระยะเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อ จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า การควบคุมการแสดงออกของยีน catalase อาจอยู่ที่ระดับ posttranscription นอกจากนี้ยังพบว่ามี transcription terminator อยู่ระหว่างบริเวณ *Cla*I และ *Pst*I ของยีน catalase จากการศึกษา promoter ของยีนนี้ พบว่าไม่มี functional promoter แต่ใช้ *lacZ* Promoter ในการแสดงออกในเชื้อ *E. coli* และ *Xoo* ได้ทำการวิเคราะห์การควบคุมการแสดงออกในยีนนี้ โดยใช้ Tn*5-gusA* transcriptional and translational transposons ในเชื้อ *E. coli* จากผลของ Tn*5-gusA* transcriptional fusion transposon สนับสนุนผลการทดลองข้างต้นที่ว่าการควบคุมการแสดงออกอยู่ที่ระดับ posttranscription และปริมาณของ GusA activity มีความสัมพันธ์กับ transcription terminator สำหรับTn*5-gusA* translational fusion transposon พบว่าระดับ GusA fusion protein เพิ่มขึ้นเมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อช้าลง (late log phase)และที่อุณหภูมิ 28 °C จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการควบคุมการแสดงออกที่ระดับ translation เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ catalase

จากการศึกษายีน catalase ในเชื้อ *Xoo* พบว่า GusA fusion protein ถูกตรวจพบที่ระยะระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ (mid log phase) ชี้ให้เห็นว่า การควบคุมของยีน catalase ภายใต้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ พบเฉพาะในเชื้อ *E. coli* แต่ไม่พบในเชื้อ *Xanthomonas*.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Regulation of *Xanthomonas* Catalase Gene in *Escherichia coli* and *Xanthomonas oryzae*
Name	Chaninchon Chanvanichayachai
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	
	Skorn Monkolsuk, Ph.D.
	Somsak Pantuwatana, Ph.D.
	Prasit Palitapolkanpim, M.D.
	Jaranya Narongajavana, Ph.D.
Date of Graduation	31 July, B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Regulation of *Xanthomonas catalase* gene was studied in *Escherichai coli* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. pKSkatX contained a functional *katX* could restore catalase production in *E.coli* catalase mutants. (UM255, UM2, UM258) only at 28°C. At 37°C, no Kat activity was observed. At 28°C, UM255 harbouring *katX*, Kat activities were highest during late logarithmic phase and declined as growth progressed. Temperature dependent expression of *katX* gene at 37°C was not due to temperature sensitive enzyme but likely to be due to the effect

Copyright by Mahidol University

of temperature on Kat synthesis. For *katX* expression in *Xanthomonas* spp., increase expression was observed in *Xanthomonas* harbouring the cloned *katX* gene. This increase expression confered protection to *Xanthomonas* from the killing effect of H_2O_2. No protection against *tert*-butylhydroperoxide or menodione was observed. Transcription regulation analysis by chloramphenicol acetyltransferase gene (*cat*) fusion was studied. At all stages of growth phase and at 28°C or 37°C, Cat activity revealed no difference in level of expression which indicated that the *katX* regulation in *E. coli* was at posttranscription level. The transcription terminator in the coding portion between the *Cla*I-*Pst*I region of *katX* gene was observed and studied. The terminator activity was monitored by using *cat* or *gus* gene fusions. *katX* gene did not have a functional promoter but instead used the *lacZ* promoter for expression both in *E.coli* and *Xoo*. Analysis of regulation of *katX* expression using Tn*5-gusA* transposons were performed. In *E.coli*, transcriptional and translational *gusA* fusions were studies. Transcriptional *gusA* fusion transposon supported previous results that there was no transcription regulation of *katX* and the regulation is likely to be at posttranscriptional level. Also, the quantity of blue colour of GusA activity was used to analysed transcription terminator activity. For translational gusA fusion transposon, 136 kDa GusA fusion protein was observed at 28°C and at late logarithmic phase. This confirmed the previous results that *katX* expressed only at 28°C and at late

Copyright by Mahidol University

logarithmic phase. This suggested that translational regulation may be involved in Kat synthesis.

In *Xoo*, the 136 kDa GusA fusion protein from Kat translational fusion was also detected at mid logarithmic phase. Indicating that the growth phase regulation was only observed in *E. coli* and not in *Xanthomonas*.

Copyright by Mahidol University