LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CLONING OF CATALASE GENE (*kat*) FROM *Xanthomonas oryzae* PV. *oryzae* ISOLATE 8736

NIWAT SUPSAMRAN

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

With compliments
of
Faculty of Graduate Studies, Mahidol Univ.

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1994

Copyright by Mahidol University

TH
N735c
1994

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกศึกษายีน Catalase (kat) ของเชื้อ Xanthomonas oryzae pv oryzae isolate 8736

ผู้วิจัย นิวัต ทรัพย์สำราญ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ศกรณ์ มงคลสุข, Ph.D.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng

บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D.

ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 9 ธันวาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

Catalase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญของเชื้อ Xanthomonas oryzae pv oryzae ที่ใช้ในการบุกรุก เป็นสาเหตุเริ่มต้นในการทำให้เกิดโรคในข้าว การศึกษาแยกยีน Catalase เป็นก้าวแรกที่จะนำไปสู่การศึกษาคุณสมบัติทั่ว ๆ ไป เพื่อหาคำตอบของความสัมพันธ์ของการเกิดโรคดังกล่าว

ยีน Catalase แยกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สายคู่ DNA เริ่มต้นจากกรดอามิโนที่คล้ายคลึงกันของยีน Catalase ระหว่างแบคทีเรีย พืช สัตว์ รวมทั้งมนุษย์ บนตำแหน่งที่ 117 ถึง 126 และ 327 ถึง 381 เมื่อใช้สาย DNA จำเพาะติดตามหายีน Catalase ที่สมบูรณ์จากห้องสมุดยีนของเชื้อ Xanthomonas ในพาหะ Lambda GEM11 พบว่าอยู่บนสาย DNA ขนาด 7.2 กิโลคู่เบสซึ่งไม่สามารถแสดงการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ ในเชื้อ E. coli บนพลาสมิดพาหะ pKS (pKSKA 7.2) แต่กลับแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้เมื่อตัดทอนให้เล็กลงเหลือขนาด 3.4 กิโลคู่เบส (pKSKA 3.4) ในเชื้อ E. coli ที่เจริญในภาวะ 28 องศาเซลเซียสเท่านั้น ปริมาณเอนไซม์ถูกสร้างสูงสุดในระยะการเจริญเข้าสู่ Stationary phase และเมื่อทำ EXO III /S1 deletion พบว่าส่วนที่สำคัญต่อการแสดงออกของยีน มีขนาด 2.9 กิโลคู่เบส ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันในกลุ่มเชื้อ Xanthomonas แต่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่น

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Cloning of Catalase Gene (*kat*) from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Isolate 8736
Name	Niwat Supsamran
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	Skorn Mongkolsuk, Ph.D. Watanalai Panbangred, Dr.Eng. Burachai Sonthayanon, Ph.D. Chuenchit Booncherd, Ph.D.
Date of Graduation	9 December B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* isolate 8736, a rice pathogen, is exposed to oxidative stress during interactions with plants. The stress has to be detoxified to prevent damages to cellular and genetics components. Catalase is the most important defense against H_2O_2 toxicity. Genes isolation are the first step towards elucidation of the physiological role of the enzymes in oxidative stress response. The *Xanthomonas kat* gene was isolated using the *Xoo kat* specific PCR product as a probe to screen the lambda genomic library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolate 8736. The *Xoo kat* specific PCR product was made by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolate 8736 genomic DNA and a set of primers corresponding to the KAT conserved amino acid sequences derived from the alignment of *kat* coding sequences of bacteria, plant, animals and human at the positions 117 to 126 and 372 to 381. The isolated *Xoo kat* gene was characterized by restriction mapping and expression in a

Copyright by Mahidol University

heterologous host. The location of the gene was determined by sequential deletion technique and restriction endonuclease mapping. The present of a functional *Xoo kat* gene was confirmed by the detection of KAT activity in *E. coli kat* mutants (devoids of endogenous KAT) harboring the isolated *Xoo kat* cloned in expression vector (pKSKA3.4). The expression of *Xoo kat* in *E. coli* was temperature sensitive, the KAT activity was detectable only when *E. coli* harboring pKSKA3.4 plasmid was grown at 28°C. At 37°C no KAT activity was detected. Furthermore, we have shown that the *Xoo kat* expression was also growth phase dependent, the KAT activity was detectable only during late log growth phase. Deletion analysis of pKSKA3.4 suggests that the 2.9 kb of cloned *kat* fragment is essential for the KAT activity. As expected, *Xoo kat* gene is closely related to other *Xanthomonas* spp. but not to unrelated bacteria and other organisms. The gene would provide useful initial steps toward studying regulation of *Xoo kat*.

Copyright by Mahidol University