LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

P 9 ... 1996

CHARACTERIZATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF A XANTHOMONAS ORYZAE pv. ORYZAE recA OPERON

SIRITIDA RABIBHADANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

อภินันทนาการ
จาก
.....

TH
ร๖๑๙.๔๓
๑๙๖

36550

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีน *recA* จากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

ผู้วิจัย ศิริธิดา รพีพัฒน์

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ศกรณ์ มงคลสุข, Ph D

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph D

ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, M D.

ศันสนีย์ ไชยโรจน์, Ph.D

วันที่สำเร็จการศึกษา 6 มิถุนายน พ.ศ 2539

บทคัดย่อ

พลาสมิด pSM-A1 ที่มียีน *recA* ซึ่งถูกทำการแยกจากห้องสมุด DNA ของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae (Xoo)* โดยวิธีการ complement การซ่อมแซม DNA ของเชื้อ *E coli recA* ได้ถูกนำมาศึกษาต่อในวิทยานิพนธ์นี้ โดยเริ่มจากการหาลำดับเบสของชิ้นส่วน DNA ขนาด 2 2 kb ภายในพลาสมิด pSM-A1 ทำให้พบ *rec* operon ซึ่งประกอบด้วยยีนสองยีนคือ *recA* และยีน *recX* อยู่ด้วยกัน โดยที่ยีน *recX* จะมีลำดับต่อจากยีน *recA* จากการศึกษาโดยวิธี Northern blot พบว่า ยีนทั้งสองนี้ถูกควบคุมและถูก transcribe มาด้วยกันทำให้ได้ mRNA ขนาด 1 8 kb และถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสาร H_2O_2, MMS แต่จะไม่ถูกเหนี่ยวนำด้วย paraquat นอกจากนี้การศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University

โดยวิธี Western blot ที่ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน RecA ของเชื้อ *Escherichia coli* เป็นตัวตรวจสอบ แสดงให้เห็นได้ว่า การสร้างโปรตีน RecA จะถูกเหนี่ยวนำด้วย peroxide และ mutagen ต่างๆ แต่ สารที่สร้าง superoxide เช่น paraquat กับอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปจะไม่มีผลต่อการสร้างโปรตีนนี้ และ การควบคุมยีน *recA* ยังไม่ขึ้นกับสภาวะการขาดอาหารหรือตัวควบคุมที่เกี่ยวข้องกับระยะการเจริญ เติบโตของเซลล์ เมื่อเชื้อ *Xoo* ถูกทำลายยีน *recA* โดยวิธี insertion inactivation พบว่ามีการเพิ่ม sensitivity ต่อสาร mutagen และสาร peroxide และยังมีความผิดปกติเกี่ยวกับการแบ่งเซลล์อีกด้วย ถ้ามีการเติมสาร H_2O_2 ในสภาวะที่มีจำนวนเซลล์น้อยจะพบว่าเซลล์ที่ถูกทำลายยีน *recA* มี sensitivity เพิ่มมากขึ้น แต่ในสภาวะที่มีจำนวนเซลล์หนาแน่นกลับพบว่า sensitivity ต่อ H_2O_2 ของ เซลล์ปกติกับเซลล์ที่ยีน *recA* ถูกทำลายนั้นไม่ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าการเหนี่ยวนำยีน *recA* โดยการเติมสาร H_2O_2 นี้ เนื่องมาจากการสร้าง hydroxyl radicals โดยปฏิกิริยา Fenton ดังนั้นเมื่อ เติมสารที่จับ hydroxyl radicals เช่น glycerol การเหนี่ยวนำนี้จะถูกยับยั้งไว้ จากการศึกษาเชื้อที่ยีน *recX* ถูกทำลายไม่พบว่าเชื้อนี้มีความผิดปกติเกี่ยวกับการแบ่งเซลล์ หรือมี sensitivity ต่อ stress ต่างๆแตกต่างไปจากเซลล์ปกติ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Characterization and Expression analysis of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae recA* operon

Name Siritida Rabibhadana

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Skorn Mongkolsuk, Ph.D.

Somsak Pantuwatana, Ph D.

Prasit Palitapolkanpim, M.D.

Sansanee Chaiyaroj, Ph.D.

Date of Graduation 6 June B.E.2539 (1996)

ABSTRACT

A plasmid pSM-A1 containing the *recA* gene isolated from *Xoo* library by complementation of DNA repair defects of *Escherichia coli recA* mutants has been further characterized. DNA sequencing of the 2.2 kb inserted fragment of pSM-A1 revealed a *rec* operon that contained two bicistronic genes, *recA* and *recX* The *recX* was located downstream of the *recA* gene. From Northern blot analysis, it was found that both *recA* and *recX* were cotranscribed and produced 1.8 kb transcripts. The genes were also coregulated and were induced by H_2O_2, MMS but not by paraquat treatments. From Western blot

Copyright© by Chulalongkorn University

analysis using anti *E coli* RecA antibody showed that RecA was induced by mutagens and peroxide treatments but not by heat shock or superoxide generators. In *Xoo*, *recA* transcription regulation was not under growth phase regulation or starvation response. An insertion inactivation of the *recA* gene was performed and a resultant *recA* mutant showed increased sensitivity to peroxides, mutagens killings. The mutant was also defected in cell division. The increase sensitivity to H_2O_2 killing was observed at low cell density while at high cell density there was little difference in sensitivity between a wild type and a *recA* mutant. The H_2O_2 induction of *recA* resulted from hydroxyl radicals production via the Fenton reaction and can be blocked by an hydroxyl radicals absorber. The mutation in the *recX* gene did not show increase sensitivity toward stresses nor it showed any effects on cell division.

Copyright by Mahidol University