LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

5 JUN 1999

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* *FUR* HOMOLOGUE

RATIBOOT SALLABHAN

With compliments
of
.....

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

ISBN 974-661-993-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
R296i
1999
c.2

310238 e.2

3836469 SCBT/M MAJOR BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS *Xp* / Fur / FERRIC UPTAKE REGULATOR

RATIBOOT SALLABHAN IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI FUR* HOMOLOGUE THESIS ADVISORS. SKORN MONGKOLSUK Ph D , WATANALAI PANBANGRED Dr.Eng , CHUENCHIT BOONCHIRD Ph D 140 p ISBN 974-661-993-4

Subcloning of pJII to localize region involved in organic peroxide resistance phenotype and complementation analysis showed that the 1 7 kb of *Eco*RI-*Cla*I fragment could confer t-BOOH resistance DNA sequencing analysis of this gene showed an ORF with 60.3 % homology to *E. coli fur* gene Expression of the gene and subsequent analysis by blotting against *E. coli* anti-Fur antibody and the gene ability to repress *fur* regulated gene in an *E. coli* Fur mutant confirm that the cloned gene was a functional *fur* gene Southern blot analysis also showed that the gene was derived from *Xp* and highly conserved among *Xanthomonas* spp Results from Northern analysis revealed the gene was monocistronically transcribed with size corresponded to the predicted *fur* from DNA sequence analysis Furthermore, *Xp fur* mutant was isolated by select for $MnCl_2$ resistance These mutants have abnormal siderophore production and altered resistance to oxidative stress Three mutants of interest, XPM6, XPM7, XPM8 were selected for further study. All mutants showed higher sensitivity to t-BOOH killing by a disc inhibition zone assay. The phenotype can be complemented by expression of a functional *fur* on an expression vector Sequencing analysis of the mutant XPM7 *fur* gene, showed single point mutation at the amino acid residue 72 that changed amino acid Phe. to Cys This mutation renders the Fur inactive and could not complement *Xp* for t-BOOH hypersensitive phenotype The study of *Xp fur* gene and its phenotype confer resistant to oxidative stress still on progress

Copyright by Mahidol University

3836469 SCBT/M สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ , วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ)

รติบุตร สัลละพันธ์ การแยกและศึกษายีนคล้าย *fur* ในเชื้อ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV *PHASEOLI* (IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV *PHASEOLI FUR* HOMOLOGUE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ศกรณ์ มงคลสุข, Ph D , วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr.Eng , ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph D
140 หน้า ISBN 974-661-993-4

ผลจากการศึกษายีน *fur* บนพลาสมิด pJII โดย Southern blot analysis แสดงว่ายีนดังกล่าวมาจากเชื้อ *Xp* และมีความคล้ายกับยีน *fur* ใน *Xanthomonas* สายพันธุ์อื่นๆ จากการศึกษาโปรตีนด้วย Western blot analysis ของยีนนี้ใน *E. coli* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *fur* ร่วมกับความสามารถของโปรตีน Fur ในการยับยั้งการแสดงออกของ Reporter gene ชี้ว่ายีนที่แยกได้มาเป็นยีน *fur* จริง และจากการใช้เทคนิค Northern blot analysis พบว่ายีนนี้มีการถอดรหัสเป็นยีนเดี่ยว จากการแปลผลการหาลำดับเบสและถอดรหัสดีเอ็นเอ เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่า Fur จาก *Xp* ที่แยกได้มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากของแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น แต่มีความคล้ายกับโปรตีนนี้จาก *Pseudomanas aeruginosa* กล่าวคือ ที่บริเวณสำคัญในการจับ Fe^{2+} ของโปรตีน Fur ในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นจะประกอบด้วย กรดอะมิโน Cysteine 4 ตำแหน่ง แต่ Fur จาก *Xp* กรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวเปลี่ยนเป็น Aspartic, Threonine, Lysine และ Arginine ตามลำดับ แต่จากผลการทดสอบ พบว่า Fur จาก *Xp*ที่แยกได้สามารถทำหน้าที่ได้ปกติ และเพื่อจะทำการศึกษาความสำคัญของยีนได้กลายพันธุ์ยีน *fur* โดยการคัดเลือกเชื้อ *Xp* ที่สามารถเจริญได้บน $MnCl_2$ และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ Chromeazurol S (CAS) เพื่อศึกษาความสามารถในการควบคุมการดึงเหล็กออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า บางโคโลนี แสดง บริเวณใสสีส้มรอบโคโลนีกว้างกว่าเชื้อ *Xp* ปกติ *Xp*กลายพันธุ์ ดังกล่าวถูกคัดเลือกมาศึกษาจำนวน 3 สายพันธุ์ (XPM6, XPM7, XPM8) โดยที่ทั้งสามสายพันธุ์แสดงลักษณะไวต่อ t-BOOH และเมื่อทำการทดสอบโดยใส่ ยีน *fur* ที่ปกติเข้าไปใน XPM7 เพื่อทดแทนส่วนที่กลายพันธุ์ พบว่า ทำให้เชื้อกลับมามีความสามารถดื้อต่อสาร t-BOOH ได้ และจากการศึกษาหาลำดับเบสของยีน *fur* ในXPM7 พบว่ามีความแตกต่างจากรหัส ดีเอ็นเอ ของ *Xp* ปกติเพียง 1 เบส ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนลำดับที่ 72 จาก Phenylalanine เป็น Cysteine ผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *fur* กับ Oxidative stress response

Copyright by Mahidol University