22 JAN 2001

REGULATION OF A FLAGELLIN GENE IN *BURKHOLDERIA MALLEI* (A NON-MOTILE SPECIES)

ATCHARA PAEMANEE

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2000

ISBN 974-665-115-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
Ag139re
2000

3936092 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : *B. MALLEI* / FLAGELLIN GENE

ATCHARA PAEMANEE : REGULATION OF A FLAGELLIN GENE IN *BURKHOLDERIA MALLEI* (A NON-MOTILE SPECIES). THESIS ADVISORS : SUMALEE TUNGPRADABKUL, Ph.D., WILAI NOONPAKDEE, Ph.D. 120 p. ISBN 974-665-115-3

Burkholderia mallei is a gram negative rod-shape bacteria and it is a sole species in genus *Burkholderia* which is non-motile. *B. mallei* is considered to be the parasite on equines, in which it causes glanders and the infection can be transmissible to a large variety of animals. *B. mallei* is genetically related with *B. pseudomallei*, a causative agent of melioidosis, due to 16S rRNA sequence showing 100% homology. Although the motility property can be used to distinguish the two species, the genetic markers might be a rapid and simple method for accurate identification of the species. We therefore attempted to search for a genetic difference between the two species. Based on motility property, specific primers for amplification of flagellin gene from *B. pseudomallei* were used. A 1.1 kb of PCR product was obtained. Surprisingly, sequencing analysis of the 1.1 kb product showed a 99% nucleotide sequence homology or 100% amino acid sequence identity to *B. pseudomallei*. Thus, we tried to investigate the regulation of the gene expression in transcription and translation level in *B. mallei* compared with *B. pseudomallei*. The results suggested that mRNA was not transcribed and we were not able to detect flagellin protein from *B. mallei* by Western blot analysis. The 5'upstream sequence of *B. mallei* flagellin gene, which is nearly the same as the regulatory region of *B. pseudomallei* strains reported by Neubauer et al. Southern blot hybridization was performed to determine GATC methylation of 5' untranslated sequence. The methylated upstream region of flagellin gene in both *B. mallei* and *B. pseudomallei* sequence show the same pattern. In addition, chemotaxis protein CheW gene and Chemotaxis response regulator CheY gene were able to be isolated from chromosomal DNA of *B. mallei* by PCR. The sequence analysis of both genes is also identical to CheW and CheY of *B. pseudomallei* respectively. Existence of the same methylation pattern on upstream region of flagellin gene and the appearance of both chemotaxis involving genes lead one to believe that expression of *B. mallei* flagellin gene is under control of upper operon in flagellar hierarchy. In addition, *Sau*3AI and *Mbo*I restriction patterns of *B. mallei* and *B. pseudomallei* are different, especially DNA fragment of above 1.2 kb. As no sequence data have been available, these patterns are worthy to elucidate the genetic dissimilarities among this two *Burkholderia* species.

Copyright by Mahidol University

3936092 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

อัจฉรา แพมณี : กลไกการควบคุมยีนแฟลกจิลินของเชื้อ *Burkholderia mallei* (REGULATION OF A FLAGELLIN GENE IN *BURKHOLDERIA MALLEI* (A NON-MOTILE SPECIES)). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D., วิไล หนุนภักดี, Ph.D. 119 หน้า. ISBN 974-665-115-3

Burkholderia mallei เป็นสปีชีส์เดียวในจีนัส *Burkholderia* ที่เคลื่อนที่ไม่ได้และเป็นสาเหตุของโรคมองคล่อพิษในสัตว์หลายชนิดโดยเฉพาะสัตว์จำพวกม้า ลำดับเบสของ 16S rRNA ที่เหมือนกันร้อยเปอร์เซ็นต์แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *B. pseudomallei* ที่ก่อโรคเมลิออยโดสิสในคน ความแตกต่างทางความสามารถในการเคลื่อนที่ถูกนำมาใช้เป็นแนวทางการแยกเชื้อทั้งสองชนิดโดยคุณสมบัติทางพันธุกรรมบนสมมุติฐานที่ว่า *B. mallei* ซึ่งไม่เคลื่อนที่ควรจะขาดยีนแฟลกจิลินที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ แต่จากการศึกษาโดยวิธีพีซีอาร์พบว่า *B. mallei* มียีนที่เป็นรหัสของโปรตีนแฟลกจิลินที่มีขนาดและลำดับกรดอะมิโนเท่ากับที่พบใน *B. pseudomallei* งานวิจัยนี้จึงทำการสำรวจการควบคุมการแสดงออกของยีนแฟลกจิลินของ *B. mallei* โดยวิธี Westhern blot immunoassay ศึกษาการแปลรหัสของยีนเป็นผลผลิตโปรตีนและตรวจหา mRNA ในระดับการถอดรหัสโดยวิธี RNA dot blot hybridization แต่ไม่ให้ผลบวกในการศึกษาดังกล่าว จากผลที่ได้แสดงว่าแฟลกจิลินใน *B. mallei* ถูกควบคุมในระดับการถอดรหัส จึงพิจารณาจากการรายงานลำดับเบสด้านปลาย 5′ของยีนแฟลกจิลิน *B. mallei* ของ Neubauer และคณะ ที่ตรงกับบริเวณควบคุมของยีนแฟลกจิลินใน *B. pseudomallei* เป็นแนวทางนำไปสู่การศึกษา GATC methylation ในบริเวณดังกล่าวโดยเทคนิค Southern hybridization พบว่าให้แบบแผนที่เหมือนกันทั้ง *B. mallei* และ *B. pseudomallei* แสดงว่า methylation ไม่มีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของยีนแฟลกจิลินดังกล่าว เพื่อทดสอบว่ายังมียีนที่เกี่ยวข้องในขบวนการเคลื่อนที่เพื่อตอบสนองต่อภาวะแวดล้อมใน *B. mallei* เทียบกับ *B. pseudomallei* งานวิจัยนี้จึงทดลองแยกยีน chemotaxis response regulator CheY และ chemotaxis protein CheW โดยวิธีพีซีอาร์ และพบว่า *B. mallei* มียีนทั้งสองเช่นเดียวกับที่พบใน *B. pseudomallei* แสดงว่าการแสดงออกของยีนแฟลกจิลินของเชื้อนี้อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ในโอเปอรอนที่สูงขึ้นไป แม้ว่าการตัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมด้วย *Mbo*I และ *Sau*3AI ของ *B. mallei* ให้ชิ้นดีเอ็นเอย่อยๆไม่ต่างกัน แต่รูปแบบของดีเอ็นเอดังกล่าวแตกต่างกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก *B. pseudomallei* อย่างชัดเจน โดยเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 1.2 กิโลเบส ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในเชิงพันธุกรรมระหว่างเชื้อทั้งสองได้เป็นอย่างดี

Copyright by Mahidol University