



4036154 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS-GENETIC  
ENGINEERING ; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS-  
GENETIC ENGINEERING)

KEY WORDS : MARINE BACTERIA/ *PSEUDOALTEROMONAS* SP. S91  
/SECRETION MECHANISM / TYPE 1-FIMBRIAE

NOPPAKUN MOOLSIN: CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF A  
PUTATIVE GENE RELATED TO PROTEASE SECRETION IN MARINE  
BACTERIUM *PSEUDOALTEROMONAS* SP. STRAIN S91 THESIS ADVISORS:  
SAKOL PANYIM, Ph.D., SOMCHAI PONGPATTANAKITSHOTE, Ph.D. 126 p.  
ISBN 974-663-649-9

*Pseudoalteromonas* sp. strain S91 is a Gram-negative marine bacterium which is able to survive in an oligotrophic environment. Extracellular enzyme secretion is an important mechanism that marine bacteria such as S91 use to survive in a limited nutrient habitat. Research into the area of extracellular enzyme secretion is scanty especially in non-pathogenic bacteria. In this study S91 mutant strains, P2.6 and P4.15, which were defective in protease activity as a result of mini-Tn10:*lac:kan* insertion were cloned and sequenced. One recombinant plasmid derived from P4.15 was designated pMO1 and the other one derived from P2.6 was designated pMO2. These two clones were verified by restriction endonuclease analysis. pMO1 and pMO2 contained a 15.7 and 8.8 kb of insert of genomic DNA. Since both recombinant clones from plasmid vector did not contain the full-length of putative gene, to obtain a complete gene, plaque lift hybridization of S91 wild type library was conducted. The DNA probe of approximately 400 bp from a recombinant clone was generated using DIG-dUTP incorporated during PCR reaction. A positive plaque was excised from Lambda phage by coinfecting with Exassist helper phage. The entire nucleotide sequences flanking the transposon were combined and analyzed. The nucleotide sequence of the putative gene interrupted by mini-Tn10:*lac:kan* contained an open reading frame of 546 bp and was deduced to 183 amino acid residues. Comparison of DNA and amino acid sequences revealed that the putative gene was homologous to FimH subunit of type I pili. Complementation of the protease reduced strains demonstrated that no restoration of a protease activity was observed in both P4.15 and P2.6. Likewise, no distinct difference in pattern of protein band was detected when supernatant and cell lysates of both mutants and wild type were separated on a SDS-PAGE gel.

In conclusion, the putative genes involved in protease secretion from S91 mutants were successfully cloned and sequenced. These findings suggest ORF2 may function as a molecular chaperone playing an important role in the secretion of exoprotease.

4036150 MBMG/M : สาขาวิชา : อนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ; วท.ม.

(อนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์)

นพคุณ มูลสิน : การโคลนและการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสในแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. strain S91 (Cloning and sequence analysis of a putative gene related to protease secretion in marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain S91.). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สมชาย พงศ์พัฒนกิจ โชติ, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., Ph.D. 126 หน้า. ISBN 974-663-649-9

แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudoalteromonas* sp. Strain S91. :ซึ่งสามารถมีชีวิตอยู่รอดในสภาพ Oligotrophic environment การหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์เป็นกลไกสำคัญซึ่งแบคทีเรียใช้เมื่อภาวะอาหารจำกัด ปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเอนไซม์ในแบคทีเรียมีอยู่จำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเล การศึกษาครั้งนี้แบคทีเรียกลายพันธุ์สองสายพันธุ์คือ P2.6 และ P4.15 ซึ่งมีความผิดปกติจากแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติในการหลั่งเอนไซม์สาเหตุเนื่องมาจากการเข้าร่วมตัวของหน่วยพันธุกรรมสังเคราะห์ได้ถูกโคลนและหาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้พลาสมิดลูกผสมสองชนิดคือ pMO1 และ pMO2 ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจาก P4.15 และ P2.6 ตามลำดับ พบว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอบนพลาสมิดลูกผสมทั้งสองมีขนาด 15.7 กิโลเบส และ 8.8 กิโลเบสเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสจากชิ้นดีเอ็นเอบนพลาสมิดลูกผสมทั้งสองชนิดพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งโปรตีเอสบางส่วนขาดหายไป ดังนั้นเพื่อที่จะหาลำดับเบสส่วนที่เป็นยีนให้ครบสมบูรณ์ เทคนิค Plaque hybridization และ ห้องสมุดยีนได้ถูกนำมาใช้ เริ่มต้นด้วยการสร้างดีเอ็นเอตัวติดตามขนาด 400 กิโลเบสโดยอาศัยปฏิกิริยาถูกโซ่ (PCR) พบว่าหนึ่งโคลนที่ให้ผลบวกต่อดีเอ็นเอตัวติดตามโดยที่โคลนนี้ถูกตัดออกจากแซนไวรัสแลมปีดาฟาจซึ่งต้องอาศัยฟาจผู้ช่วย เมื่อได้นิวคลีโอไทป์หรือลำดับเบสที่คาดว่าป็นยีนครบสมบูรณ์แล้ว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทป์ประกอบไปด้วย Open reading frame (ORF) ขนาด 546 เบสหรือประมาณ 183 กรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของยีนพบว่า ORF ขนาด 546 เบสมีความคล้ายกับยีน *FimH* ใน Pili type1 นอกจากนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนโดยศึกษาการคอมพลีเมนต์และการวิเคราะห์โปรตีนบน SDS-PAGE เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียกลายพันธุ์และแบคทีเรียสายพันธุ์ปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนที่สังเกตได้

โดยสรุปการวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสโดยทำการโคลนและวิเคราะห์หาลำดับเบสจากแบคทีเรียกลายพันธุ์ S91 คณะผู้วิจัยได้เสนอว่ายีน ORF2 น่าจะทำหน้าที่เป็นโปรตีน chaperon ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอส