



BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

GENOME MAPPING

BY

FLUORESCENT FINGERPRINTING

PHOLASIT CHAMOD

อธิปัทนการ

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**

2001

ISBN 974-04-0181-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

P574B

2001

4136179 SIBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

KEY WORDS : *Burkholderia pseudomallei* / GENOME / PHYSICAL MAP /
CONTIG MAP / FLUORESCENT FINGERPRINTING

PHOLASIT CHAMOD: *Burkholderia pseudomallei* GENOME MAPPING
BY FLUORESCENT FINGERPRINTING. THESIS ADVISORS: PATCHAREE
WICHYANUWAT, M.D., Ph.D., SIRIRURG SONGSIVILAI, M.D., Ph.D., ADISAK
WONGKAJORN SILP, M.D., Ph.D. 100 P. ISBN 974-04-0181-3

Burkholderia pseudomallei is a gram-negative bacterium which causes the disease known as melioidosis, a disease increasingly recognized as an important cause of morbidity and mortality in many regions of the world. This pathogen is endemic in Southeast Asia and Northern Australia and particularly problematic in the northeastern part of Thailand. The *Burkholderia pseudomallei* genome sequence will provide useful genetic data to understand this bacteria leading to the development of a vaccine and drugs for the improved treatment of melioidosis.

In this study, a physical (contig) map of the *Burkholderia pseudomallei* (Arabinose negative biotype) genome type-strain K96243 was constructed using the fluorescent fingerprinting method from 2,122 bacterial clones of the cosmid DNA library. The method utilized three distinct fluorescently tagged dideoxy ATPs to specifically label the *Hind*III termini in *Hind*III and *Sau*3AI restriction digests of the bacterial clones. The sets of fingerprinted bacterial clones were multiplexed prior to electrophoresis and the data was collected and analysed by the fingerprinted contig (FPC) assembly program to produce a contig map. The percent of clone selection for contig production from the fingerprint band edition was 77.99 % or 1,655 clones from 2,122 clones. The average number of fingerprinted bands was 14.9 bands per clone. Only one uninterrupted contig map was produced which was 5,691 kb in length or approximately 87.02 % of the 6.54 Mb genome size of *Burkholderia pseudomallei*. The next step of the study is selection of clone in the contig map to sequencing with the confirmation of the regions that have a tendency to be separated into new contig by using the 5' end sequencing methodology.

4136179 SIBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

พลสิทธิ์ ชะมด : การสร้างแผนที่จีโนมของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยวิธีฟลูออเรสเซนต์ ฟิงเกอร์ ปลิ้นดิง (*Burkholderia pseudomallei* GENOME MAPPING BY FLUORESCENT FINGERPRINTING) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พัชรีย์ วิชาญวดี, พ.บ., Ph.D., สิริฤกษ์ ทรงศิริวไล, พ.บ., Ph.D., อติศักดิ์ วงศ์จรศิลป์, พ.บ., Ph.D. 100 หน้า. ISBN 974-04-0181-3

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียประเภท gram-negative ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค melioidosis, ในหลายประเทศของโลก โรคนี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิตของประชากรที่ได้รับการติดเชื้อ โรคนี้มีการระบาดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย โดยในประเทศไทยพบว่ามี ปัญหาการระบาดอย่างมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การศึกษารหัสพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* จะสามารถนำไปสู่ความเข้าใจลักษณะของเชื้อสายพันธุ์นี้ได้ดียิ่งขึ้น รวมถึง การพัฒนาการรักษา และยารักษาด้วย โครงการวิจัยนี้เป็นการจัดทำแผนที่ทางกายภาพของจีโนมของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* (สายพันธุ์ที่ไม่สามารถดูดซึม อะราบิโนส) สายพันธุ์ K96243 โดยอาศัยวิธีการทาง ฟลูออเรสเซนต์ ฟิงเกอร์ปลิ้นดิงกับสมาชิกของกลุ่มคอสมิก-ดีเอ็นเอในห้องสมุดจีโนมของเชื้อนี้จำนวน 2,122 โคลน วิธีการนี้เป็นการใช้สารเรืองแสง 3 ชนิดที่มีช่วงดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน สังเคราะห์ติดกับสารไดออกซี-เอทีพี เพื่อติดฉลากกับด้านปลายของสายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* จากสายดีเอ็นเอจากโคลนแบคทีเรีย ซึ่งถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *Sau3AI* ต่อจากนั้นแถบดีเอ็นเอที่ได้จะถูกนำไปแยกโดยวิธีการ อาศัยกระแสไฟฟ้า ผลการทดลองถูกนำไปการประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม FPC ในการสร้างแผนที่ทางกายภาพของจีโนม เปอร์เซ็นต์ในการคัดเลือกโคลนแบคทีเรียมาใช้ในการสร้างแผนที่ ทางกายภาพของจีโนมเท่ากับ 77.99% หรือ 1,655 โคลนจาก 2,122 โคลน โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนแถบดีเอ็นเอ ในการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าต่อหนึ่งโคลนคือ 14.9 แถบ ด้วยลักษณะดังกล่าวนี้แผนที่ทางกายภาพของจีโนม เพียงหนึ่งเดียวถูกสร้างขึ้น โดยมีขนาดครอบคลุม 5,691 กิโลเบส หรือประมาณ 87.02 เปอร์เซ็นต์ของขนาด จีโนมทั้งหมด คือ 6.54 เมกะเบสของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*.