18 JUN 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CONSTRUCTION OF *Burkholderia pseudomallei* AND *B. thailandensis* MUTANTS DEFICIENT IN THE SYNTHESIS OF NON-HEMOLYTIC PHOSPHOLIPASE C ENZYME

JUTTURONG CKUMDEE

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1621-7

COPYRIGHT OF MAHODOL UNIVERSITY

TH
J96C
2002
C.2

Copyright by Mahidol University

4136531 SIIM/M : MAJOR : IMMUNOLOGY ; M.Sc (IMMUNOLOGY)
KEY WORDS : *Burkholderia pseudomallei* / MELIOIDOSIS / PlcN / SINGLE HOMOLOGOUS RECOMBINATION

JUTTURONG CKUMDEE : CONSTRUCTION OF *Burkholderia pseudomallei* AND *B. thailandensis* MUTANTS DEFICIENT IN THE SYNTHESIS OF NON-HEMOLYTIC PHOSPHOLIPASE C ENZYME. THESIS ADVISORS : SUNEE KORBSRISATE, Ph.D., PAIBOON VATTANAVIBOON, Ph.D., AMORNRUT LEELAPORN, Ph.D. 123 P. ISBN 974-04-1621-7

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. Different lines of evidence currently available suggest that *B. pseudomallei* behaves as a facultative intracellular organism. Phospholipase C (PLC), enzyme which hydrolyses phospholipids to yield diacylglycerol and phosphate head group, is secreted from *B. pseudomallei*. It has been suggested that this enzyme may be a key virulence factor in several infectious diseases.

This study was intended to construct *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* with a deficiency in the synthesis of non-hemolytic PLC (PlcN) enzyme. The *plcN* gene knock out mutants were construced by insertion inactivation. A *plcN* DNA fragment was cloned into a suicide vector, mobilized into *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* by conjugation process and subsequently integrated into the chromosome by single homologous recombination. The putative *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* knock out mutants which was verified for *plc-N* inactivation by polymerase chain reaction and southern blot hybridization.

B. pseudomallei and *B. thailandensis* mutants deficient of PlcN enzyme were successfully constructed. Enzymological study of the mutants demonstrated the deficiency in phosphatidylcholine-hydrolysing PLC activity. Studies on other phenotypic characteristics of both *B. pseudomallei* and *B. thailandensis plcN* knock out mutants revealed that their growth rates were not different from those of the parental wild-type strains. The constructed mutants have the potential to be useful for further investigation into the role of PlcN in intracellular survival of *B. pseudomallei*.

Copyright by Mahidol University

4136531 SIIM/M : สาขาวิชา : วิทยาภูมิคุ้มกัน : วท.ม. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

จัตุรงค์ ขำดี : การสร้างเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และ *B. thailandensis* กลายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ฟอสโฟไลเปสซี ชนิดที่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (CONSTRUCTION OF *Burkholderia pseudomallei* AND *B. thailandensis* MUTANTS DEFICIENT IN THE SYNTHESIS OF NON-HEMOLYTIC PHOSPHOLIPASE C ENZYME). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุนีย์ กอรปศรีเศรษฐ์, Ph.D., อมรรัตน์ ลีลาภรณ์, Ph.D., ไพบูลย์ วัฒนวิบูลย์, Ph.D. 123 หน้า. ISBN 974-04-1621-7

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างและหลั่งเอ็นไซม์ฟอสโฟไลเปสซีออกจากเซลล์ได้ คุณสมบัติของเอ็นไซม์ชนิดนี้คือสามารถย่อยฟอสโฟไลปิดได้เป็น diacylglycerol และ phosphate head group ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาว่าเอ็นไซม์ฟอสโฟไลเปสซีเป็น virulence factor ที่สำคัญในการก่อโรคของแบคทีเรียหลายชนิด แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาความสำคัญของเอ็นไซม์ชนิดนี้ใน *B. pseudomallei*

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาสร้างเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* กลายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ฟอสโฟไลเปสซี ชนิดที่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (PlcN) โดยการสร้าง recombinant plasmid ที่มี *plcN* DNA อยู่ภายใน จากนั้นทำให้ recombinant plasmid เข้าสู่เชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* โดยอาศัยการ conjugation ระหว่างแบคทีเรีย เพื่อให้ recombinant plasmid แทรก (integrated) เข้าสู่ยีโนมของ *Burkholderia* เมื่อมีการแทรกตัวของ recombinant DNA สู่ยีน *plcN* จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์และสูญเสียการทำหน้าที่ของ PlcN (insertion inactivation) จากนั้นทดสอบยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์โดยอาศัยเทคนิค PCR และ southern blot hybridization

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถสร้างเชื้อกลายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ฟอสโฟไลเปสซี ทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรค *B. pseudomallei* และไม่ก่อโรค *B. thailandensis* และพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ที่ได้มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากเชื้อ *B. pseudomallei* ปกติ ประโยชน์ของงานวิจัยนี้คือสามารถใช้เชื้อกลายพันธุ์ที่ได้เพื่อศึกษาความสำคัญของเอ็นไซม์ฟอสโฟไลเปสซีในกลไกการเกิดโรคเมลิออยโดสิสต่อไป

Copyright by Mahidol University