

223

ลำดับเบสและผลผลิตของยีนของ *Pseudomonas pseudomallei*
ใน *Escherichia coli* ที่แสดงคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดง

นางสาวเสาวนีย์ ขวัญเลิศจิตต์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำรงหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ. ศ. 2539

ISBN 974-633-567-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17338980

NUCLEOTIDE SEQUENCE AND THE GENE PRODUCT OF
Pseudomonas pseudomallei GENOME IN
HEMOLYSIN-EXPRESSING *Escherichia coli*

MISS SAOWANEE KWANLERTJIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL

1996

ISBN 974-633-567-7

Thesis Title Nucleotide sequence and the gene product of
 Pseudomonas pseudomallei genome in hemolysin-
 expressing *Escherichia coli*
By Miss Saowanee Kwanlertjit
Inter-department Medical Microbiology
Thesis advisor Assistant Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for Master's Degree.

Santi Thoongsuwan
.....Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee :

Somjai Reinprayoon
.....Chairman
(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

Somying Tumwasorn
.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

Siriporn Sittipraneed
.....Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

เสาวนีย์ ขวัญเลิศจิตต์ : ลำดับเบสและผลผลิตของยีนของ Pseudomonas pseudomallei ใน Escherichia coli ที่แสดงคุณสมบัติสลายเม็ดเลือดแดง

(NUCLEOTIDE SEQUENCE AND THE GENE PRODUCT OF Pseudomonas pseudomallei GENOME IN HEMOLYSIN-EXPRESSING Escherichia coli)

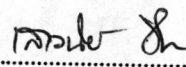
อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. สมหญิง ธีมาสาร, 74 หน้า. ISBN 974-633-567-7

Pseudomonas pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุของโรคmelioidosis ในบรรดาปัจจัยที่มีศักยภาพในการก่อโรค อาทิเช่น exotoxin, protease และ endotoxin hemolysin ก็เป็นปัจจัยที่คาดว่าจะมีบทบาทสำคัญเช่นกัน เพื่อที่จะศึกษาบทบาทในระดับโมเลกุลของ hemolysin ในการก่อโรค จึงเลือก E. coli JM109 ที่มี P. pseudomallei DNA ใน pUC18 และให้ hemolytic activity เท่ากับ 2 hemolytic units/ml มาหาลำดับเบสของ insert DNA ด้วยวิธี dideoxy chain termination พบว่า insert DNA มีขนาด 1,188 bps ให้ truncated polypeptide ขนาด 43.5 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนที่เชื่อมระหว่างผลผลิตของ insert DNA กับส่วน C-terminus ของ β -galactocidase (α fragment) การแสดงออกของยีนอยู่ภายใต้การควบคุมของ lac promoter Predicted isoelectric point (pI) ของโปรตีนนี้เท่ากับ 5.65 และที่ N-terminus ของโปรตีนมีกรดอะมิโนขนาด 31 amino acid ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับ secretory signal peptide พบ ปริมาณ G+C เท่ากับ 66.6% ใน insert DNA เมื่อทำ in vitro gene expression ตรวจพบโปรตีนขนาด 45 kDa นอกจากนี้ ลำดับเบสและกรดอะมิโนไม่มี homology กับ hemolysin ของแบคทีเรียอื่นๆ

ยีนนี้เป็นยีนแรกของ P. pseudomallei ที่ทำการหาลำดับเบส ข้อมูลที่ได้จะช่วยให้การศึกษาดำเนินไปถึงคุณลักษณะที่สมบูรณ์ของ hemolysin และบทบาทในระดับโมเลกุลของ hemolysin ในการก่อโรค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา น.น.น. ธีมาสาร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

##C645513 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: NUCLEOTIDE SEQUENCE /GENE PRODUCT/Pseudomonas pseudomallei/HEMOLYSIN GENE

SAOWANEE KWANLERTJIT : NUCLEOTIDE SEQUENCE AND THE GENE PRODUCT OF Pseudomonas pseudomallei GENOME IN HEMOLYSIN-EXPRESSING Escherichia coli THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D. 74 pp. ISBN 974-633-567-7

Pseudomonas pseudomallei is a gram negative-bacterium which is the causative agent of melioidosis. Among several potential virulence factors, which include exotoxin, protease, and endotoxin, hemolysin is also implicated as a virulence determinant in contributing to pathogenesis. In order to study the role of hemolysin in molecular pathogenesis of melioidosis, the E. coli JM109 carrying P. pseudomallei DNA in pUC18 that expresses hemolytic activity of 2 hemolytic units/ml was studied. The nucleotide sequence of insert DNA was determined by dideoxy chain termination method. It revealed that this insert DNA was of 1,188 bp and encoded a truncated polypeptide of 43.5 kDa which was a fusion protein with C-terminus of β -galactocidase (α fragment). The expression of the cloned gene was under the control of lac promoter. The predicted isoelectric point (pI) of protein product is 5.65 and the N-terminal signal peptides of 31 amino acid was found. The G+C content of this insert DNA is 66.6%. For in vitro gene expression, a protein of 45 kDa was detected. The nucleotide and amino acid sequence were demonstrated to have no homology to any known hemolysin.

This is the first gene of P. pseudomallei to be sequenced. The available data will assist in the further study of complete characterization and the role of hemolysin at the molecular level in pathogenesis.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would never have been successful without the valuable helps and understanding of the following persons whom I would like to express my deep gratitude to :

Assistant Professor Dr. Somying Tumwasorn, my advisor, for her valuable advices and indispensable help in supervising this thesis.

Associate Professor Dr. Somjai Reinprayoon, the chairman of thesis committee and the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, the member of thesis committee for their constructive criticisms.

Assistant Professor Dr. Somchai Jongwutiwes, Assistant Professor Dr. Ariya Chindamporn, Dr. Apiwat Mutirangura for their kindness, discussion, and technical assistances.

The committee of Molecular biology research unit , Faculty of Medicine , Chulalongkorn University, for the research grant to support this study. The staffs of the Department of Microbiology and the fellow students for providing facilities and encouragement.

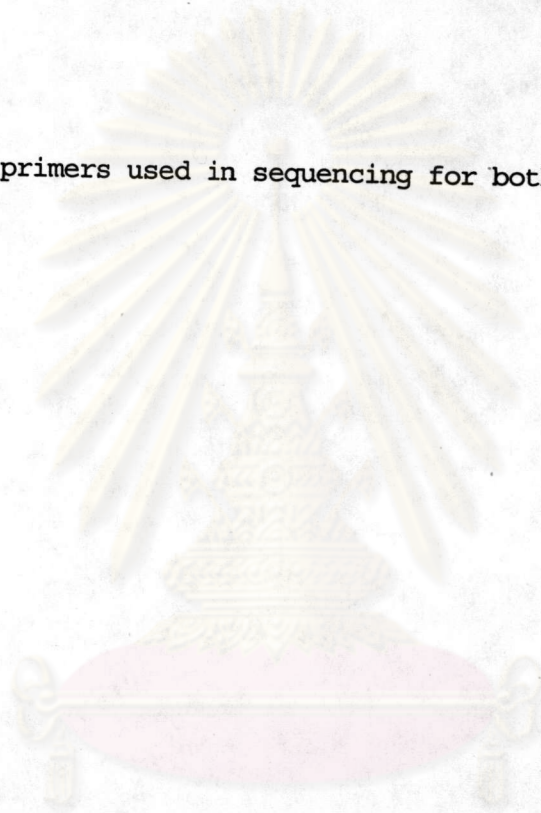
Finally, I am deeply indebted to my parents for their love, concern, help, encouragement and understanding.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLE.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
ABBREVIATIONS.....	x
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS	
CHARACTERISTICS OF <i>P. pseudomallei</i>	4
PATHOGENESIS AND VIRULENCE.....	4
HEMOLYSIN.....	6
ROLE OF HEMOLYSIN IN PATHOGENESIS.....	9
MOLECULAR STUDY OF BACTERIAL HEMOLYSINS.....	11
III MATERIALS AND METHODS.....	15
IV RESULTS.....	25
V DISCUSSION.....	40
VI CONCLUSION.....	44
REFERENCES.....	45
APPENDIX I.....	55
APPENDIX II.....	57
APPENDIX III.....	60
BIOGRAPHY.....	63

LIST OF TABLE

Table	Page
I List of primers used in sequencing for both strands.....	29



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

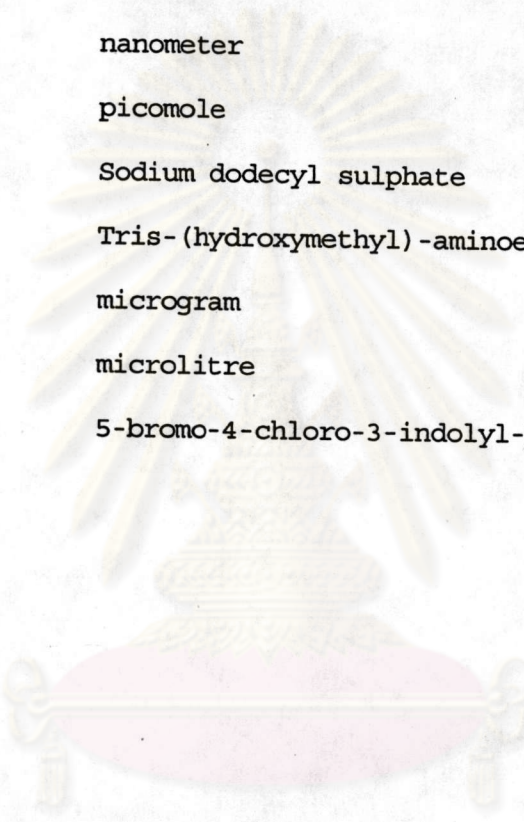
LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Partial restriction map of the <i>Pst</i> I insert of pWC3.....	26
2. Sequencing strategy of pWC3.....	30
3. Example of sequence gel autoradiography of <i>Pst</i> I insert.....	31
4. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the <i>Pst</i> I insert.....	32
5. Autoradiography of SDS-PAGE of L- ³⁵ S-methionine-labeled <i>in</i> <i>vitro</i> transcription/translation polypeptide products.....	35
6. Estimation of the molecular weight of pWC3-encoded protein by 12% SDS-PAGE.....	36
7. Autoradiography of SDS-PAGE of L- ³⁵ S-methionine-labeled <i>in</i> <i>vitro</i> transcription/translation polypeptide products.....	39

ABBREVIATIONS

bp	base pair
°c	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
ddATP	dideoxyadenosine 5'-triphosphate
ddCTP	dideoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	dideoxyguanosine 5'-triphosphate
ddTTP	dideoxythymidine 5'-triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
dITP	deoxyinosine 5'-triphosphate
DNA	deoxynucleic acid
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
hr	hour
HU	hemolytic unit
IPTG	Isopropyl-thio- -D-galactoside
kb	kilobase
kDa	kilodalton
mA	milliampere
MgCl ₂	Magnesium chloride
min	minute
ml	millilitre
mm	millimetre

mM	millimolar
MW	Molecular weight
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
ng	nanogram
nm	nanometer
pmol	picomole
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
μ g	microgram
μ l	microlitre
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactopyranoside



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย