บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้ทำการแยกยีน katA ของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ซึ่งเป็นยีนที่ code เอ็นไซม์ monofunctional catalase โดยใช้วิธี reverse genetic ด้วยการออกแบบ degenerate primers จากลำดับกรดอะมิโนที่ conserved และได้ใช้ primers ดังกล่าวทำ PCR โดยใช้ genomic DNA ของแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *phaseoli* เป็นต้นแบบ จากการPCR ทำให้ได้ DNA fragment ขนาด 344 bp ซึ่งต่อมาได้นำเอา DNA fragment นี้มาเป็น probe โดยการติดฉลากด้วยสารรังสี ^{32}P เพื่อนำไปใช้ในการหายีน katA จากห้องสมุด DNA ของ *X. campestris* pv. *phaseoli* ที่สร้างขึ้นใน λ-ZipLox phages จากการ screen โดยใช้ plague hybridization ทำให้ได้พลาสมิด pKat29 ที่มี *katA* เต็มยีน เมื่อวิเคราะห์จากลำดับเบสของยีน *katA* พบว่ายีนนี้มีขนาด 1521 bp สำหรับสร้างโปรตีนขนาด 56 kDa เมื่อนำโปรตีน KatA ที่ purified จากแบคทีเรียกลายพันธ์ที่สร้าง KatA ในปริมาณสูงมาทำการวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่ามีค่า apparent Km and Vmax values เท่ากับ 39 mM of H_2O_2 and 2.3 x 10^5 μmol/min/mg protein ตามลำดับ มีค่า k_{cat} at Vmax point is 2.132 x 10^5 sec^{-1} และมีความไวต่อสาร 3 Amino-1,2,4 Triazole เหมือนกับ typical catalase ทั่วไป จากการสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของ catalase จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ใน database พบว่า KatA จัดอยู่ในประเภท bacteria group I เพื่อศึกษาถึงบทบาทของ KatA ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีอนุมูลอิสระออกซิเจนสูง คณะผู้วิจัยจึงได้สร้างแบคทีเรียกลายพันธ์ที่ไม่สามารถสร้าง KatA ได้โดยใช้วิธี insertional inactivation จากชิ้นส่วนของยีน*katA* ที่อยู่ในพลาสมิดที่ไม่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ใน *X. campestris* pv. *phaseoli* เมื่อนำ *katA* mutant ไปศึกษาพบว่าระดับของ total catalase activity ลดลงอย่างมากในช่วง log phase เมื่อนำไปทดสอบการต้านทานต่อสาร peroxide ต่างๆพบว่า *katA* mutant ไวต่อสาร H_2O_2 อย่างมากแสดงให้เห็นว่า KatA มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียในสภาวะที่มี H_2O_2 ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *katA* โดยใช้วิธี Northern blot hybridization พบว่าการแสดงออกของยีนนี้สามารถถูกเหนี่ยวนำได้เมื่อแบคทีเรียสัมผัสต่อสารประเภท oxidants เช่น H_2O_2, organic hydroperoxide และ menadione โดยการแสดงออกนี้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *oxyR* ซึ่งเป็น a global peroxide sensor and transcription regulator นอกจากนี้ยังพบว่า katA ถูก transcribed เป็น polycistronic RNA ร่วมกับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ใกล้เคียงที่มีชื่อว่า ankyrin like protein และ

CHAPTER I

KatA: Monofunctional catalase in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*

ABSTRACT

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli katA*, the gene for major monofunctional catalase was cloned using the reverse genetic technique. Two degenerated primers were designed from a partial amino acid sequences of KatA in *Xp* and from the conserved region of monofunctional catalases. The PCR using degenerate primers and *Xp* genomic DNA was done and giving 344 bp-PCR product that was used as a DNA probe to screen a full length *katA* gene from *Xp* genomic library λ-ZipLox phages by plaque hybridization. A complete positive clone was named pKat29 containing complete sequence of *katA*. An open reading frame of 1,521 bp, encoding a protein of 507 amino acids with theoretical molecular weight about 56 kDa. The apparent Km and Vmax values are about 39 mM of H_2O_2 and 2.3 x 10^5 μmol/min/mg protein, respectively. The k_{cat} at Vmax point is 2.132 x 10^5 sec^{-1}. Both KatA from *Xp*w/t and *Xp*HR were sensitive to 3 Amino-1,2,4 Triazole. They are unusual catalase in several respects, including the apparent of narrower pH optimal and less heat stable than normal tetrameric catalase. The *Xp* KatA is classified in the bacteria group I from the results of amino acid sequences similarity to all principal monofunctional catalase. To examine the *Xp katA*' s role against oxidative strass, *katA* mutant was constructed by insertional inactivation using a piece of *katA* inserted into non-replicated plasmid. *Xp katA* mutant was ascertained by Southern analysis and catalase activity gel staining. The mutant produced significantly decreased level of total catalase activity at log phase of growth, and became extremely sensitive to H_2O_2 killing comparing with the wild type strain. Thus, all results suggest the *katA* played an important role in *Xp* against oxidative stress by detoxification of exogenous H_2O_2. Expression analyses by Northern blot hybridization revealed that katA was transcribed as a polycistronic RNA with the adjacent protein called ankyrin like protein. The expression of katA could be induced by exposure to oxidants including H_2O_2, organic hydroperoxide and particularly menadione and was mediated by *oxyR*, a global peroxide sensor and transcription regulator.