

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4980005

ชื่อโครงการ : การสร้างเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่ขาดยีน sigma N และการศึกษา phenotype ของเชื้อที่ขาดยีนดังกล่าว

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ผศ. ดร. มณีวรรณ สุขสมทิพย์ ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Maneewan.S@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

ยีน sigma N มีหน้าที่แตกต่างกันอย่างกว้างขวางซึ่งรวมถึงบทบาทเกี่ยวกับการก่อโรคและการเกิดความรุนแรงของโรคในแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการวิเคราะห์หาบริเวณของ ORF ในจีโนมของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* พบยีนดังกล่าวถึง 2 ชุด ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการหาบทบาทหน้าที่ของยีนดังกล่าวด้วยการสร้างเชื้อที่ขาดยีน sigma N โดยใช้วิธี unmarked homologous recombination ซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อดีคือไม่ทำให้เกิด polar effect รวมถึงไม่ทำให้ยีนที่อยู่ข้างเคียงเสียหายในจีโนมของเชื้อ วิธีดังกล่าวจะใช้พลาสมิด pEX18GM เป็น cloning vector เพื่อนำมาสร้าง mutant construct ตามที่ต้องการแล้วนำเข้าเซลล์ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งพบว่าการเลือก transformant ต้องใช้ยาเจนดามัยซินในขนาดความเข้มข้นสูงมากถึง 500 µg/ml แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวดื้อต่อยาเจนดามัยซิน ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยน cloning vector ใหม่เป็น pEX18Tc โดยทำการตัดลำดับเบสที่สร้างเป็น mutant construct เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pEX18Tc แล้วนำเข้าเซลล์ *Burkholderia pseudomallei* ด้วยวิธีเหนี่ยวนำด้วยกระแสไฟฟ้า หลังจากทำการคัดกรองเพื่อเลือกหา clone ที่เกิดการกลายพันธุ์โดยการสูญเสียยีน sigma N ปรากฏว่าไม่พบสายพันธุ์ดังกล่าวเลย ดังนั้นการใช้วิธี unmarked homologous recombination เพื่อกำจัดยีน sigma N ออกจากโครโมโซมของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จึงไม่สามารถทำได้ ทั้งนี้เหตุผลประการหนึ่งอาจเนื่องมาจากยีนดังกล่าวมีความจำเป็นต่อการอยู่รอดของเชื้อดังกล่าว การใช้วิธี unmarked homologous recombination ซึ่งจะทำให้การตัดเอาลำดับเบสทุกเบสของยีนดังกล่าวออกจากโครโมโซมของเชื้ออาจทำให้เป็นอันตรายต่อความอยู่รอดของเชื้อนี้ อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะยืนยันถึงความสำคัญของยีนนี้ต่อความอยู่รอดของเชื้อดังกล่าวควรจะได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้วิธีอื่นที่ก่อให้เกิดผลที่ไม่ต้องการน้อยมาทำการกำจัดยีนดังกล่าวต่อไป

คำหลัก : *Burkholderia pseudomallei* , sigma N, unmarked homologous recombination, pEX18GM

Abstract

Project Code : MRG4980005

Project Title : Construction of sigma N mutant in *Burkholderia pseudomallei* and study the phenotype of sigma N mutant strain.

Investigator : Assist. Prof. Dr. Maneewan Suksomtip

Department of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University

E-mail Address : Maneewan.S@chula.ac.th

Project Period : 2 years

Sigma N has a wide range of different function including an important role in virulence and pathogenesis in a variety of bacterial pathogen. By searching the *Burkholderia pseudomallei* genome sequence for potential open reading frame (ORF), two candidate genes could be identified. In this study the roles of these sigma N genes were investigated by generating sigma N deletion mutant. An unmarked homologous recombination with no polar effect and no introduction of antibiotic – resistant gene into genome of bacterial pathogen was employed. The plasmid pEX18Gm was used as cloning vector to create desired mutant construct. After transformation of *Burkholderia pseudomallei* with this construct, the unusual high concentration of up to 500 µg/ml of gentamicin have to be used for selection of transformant. The result suggested that *Burkholderia pseudomallei* was resistant to gentamicin. In this regard, the desired mutant sequence was subcloned into pEX18Tc, a new replacement vector which was further used to transform the competent *Burkholderia pseudomallei* by electroporation. However, the attempt to delete sigma N gene with unmarked homologous recombination method did not succeed. One possible explanation for this result is that sigma N gene may be essential for the survival of *Burkholderia pseudomallei*. Deletion of the whole sequence of this gene by unmarked homologous recombination will be harmful to this organism. Other method with less unwanted effect to generate sigma N mutant in *Burkholderia pseudomallei* need further investigation.

Keywords : *Burkholderia pseudomallei* , sigma N, unmarked homologous recombination, pEX18GM