การโคลนและศึกษาลักษณะของยีนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่แสดงออกในผู้ป่วยเมลิออยโดซีสที่มีเชื้อในกระแสโลหิต

นายศิโรช จิตต์สุรงค์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN : 974-17-3844-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำเนาของ
สกุณา จึงเจริญจิตต์กุล
i 22072564

CLONING AND CHARACTERIZATION OF *IN VIVO* EXPRESSED GENES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* IN BACTEREMIC MELIOIDOSIS PATIENTS

Mr. Siroj Jitsurong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN : 974-17-3844-7

Thesis Title	CLONING AND CHARACTERIZATION OF *IN VIVO* EXPRESSED GENES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* IN BACTEREMIC MELIOIDOSIS PATIENTS
By	Mr.Siroj Jitsurong
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Dr.Somying Tumwasorn
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Dr.Chintana Chirathaworn

---

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Anan Chongthaleong, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.)

.....Member

(Kanitha Patarakul, M.D, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Sunee Korbsrisate, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศิโรช จิตต์สุรงค์ : การโคลนและศึกษาลักษณะของยีนของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่แสดงออกในผู้ป่วยเมลิออยโดซีสที่มีเชื้อในกระแสโลหิต(CLONING AND CHARACTERIZATION OF *IN VIVO* EXPRESSED GENES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* IN BACTEREMIC MELIOIDOSIS PATIENTS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมหญิง ธัมวาสร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.จินตนา จิรถาวร, 190 หน้า. ISBN 974-17-3844-7.

เมลิออยโดซีสเป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแท่งที่อาศัยอยู่ในดินคือ *Burkholderia pseudomallei* แหล่งระบาดของโรคพบได้บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และภาคเหนือของทวีปออสเตรเลีย มีรายงานผู้ป่วยเมลิออยโดซีสจากทุกภาคของประเทศไทย โดยพบว่าภาคอีสานมีรายงานสูงสุด กลไกในการทำให้เกิดโรคของเมลิออยโดซีสยังไม่ทราบแน่ชัด ในปัจจุบันการศึกษากลไกในการทำให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรียมุ่งไปที่การตรวจหายีนของเชื้อแบคทีเรียที่แสดงออกในร่างกายการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจหายีนของแบคทีเรียที่แสดงออกในผู้ป่วยเมลิออยโดซีส ที่มีเชื้อ *B.pseudomallei* ในกระแสเลือด โดยวิธี immunoscreening ใน 2 แนวทาง แนวทางแรกใช้เทคนิค *In vivo* induced antigen technology (IVIAT) นำตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดซีสมารวมกัน แล้วทำการดูดซับด้วย 3 ขั้นตอนคือ ตัวเชื้อแบคทีเรีย (*B.pseudomallei*), ตัวเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้แตก (lysate), ตัวเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้แตกและทำให้สารโปรตีนกลายสภาพ (denature) ตัวอย่างซีรั่มที่ผ่านการดูดซับมีระดับของแอนติ้บอดี้ต่อเซลที่แตกลดลงมากกว่า 1,000 เท่า นำตัวอย่างซีรั่มที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับ expressed genomic library ของเชื้อ *B.pseudomallei* ที่สร้างในพลาสมิค pET30a ตรวจวัดปฏิกิริยาด้วย ECL-chemiluminescence พบว่ามี 31 โคลนที่ให้ผลบวกจากการทดสอบทั้งหมด 13,000 โคลน มีเพียง 8 โคลนที่สามารถทำการ sequence ได้ จากการวิเคราะห์ DNA sequence เฉพาะบริเวณด้าน s-tag primer โดยใช้โปรแกรม BLAST และ GeneMark พบว่า DNA sequence ที่ได้ทั้งหมดมีความคล้ายกันมากกับโปรตีนในกลุ่ม hypothetical protein เมื่อทำการสุ่มเอาโคลนที่ให้ผลบวกมา 19 clones ทำการทดสอบ western blot กับตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วย melioidosis, คนปกติ และ s-tag พบว่าทุกโคลนให้ผลบวกต่อทุกซีรั่มที่ทดสอบ เมื่อทำการแยกเอา inclusion body จากโคลนที่ 23 มาทำการทดสอบ western blot กับตัวอย่างซีรั่มเมลิออยโดซีส (16 ราย) และซีรั่มคนปกติ (16 ราย) พบว่าโปรตีนที่แยกได้ทำปฏิกิริยากับทุกตัวอย่างซีรั่มที่ทดสอบ แนวทางที่สอง นำตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดซีส มารวมกัน แล้วดูดซับด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ที่เป็นเจ้าบ้านของ library ที่สร้างขึ้น นำซีรั่มที่ได้ไปทดสอบกับ λ ZAP II expressed genomic library ของเชื้อ *B.pseudomallei* ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย protein A-CDP star chemiluminescence พบว่าได้ 14 โคลนที่ให้ผลบวก จากการทดสอบโคลนทั้งหมดทำปฏิกิริยาเฉพาะซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออยโดซีส ไม่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มของคนปกติ โดยวิธี plaque dot blot การวิเคราะห์หายีนที่แสดงออกใช้วิธีร่วมกันของการทำ immunoscreening, bioinformatic และ molecular biology พบว่าอย่างน้อย 6 ยีน ที่ตรวจพบโดยวิธีนี้ 2 ยีนแรกเป็นยีนที่ทราบกันดีว่ามีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค คือ *gmhA* (a capsule biosynthetic gene) และ *bipD* (type three secretion protein) อีก 2 ยีน เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (conserved hypothetical protein) สองยีนสุดท้ายได้แก่ *groEL* (chaperonine protein) และ transmembrane protien ทุกยีนที่แยกได้มีแนวโน้มสูงที่จะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดซีส เมื่อทำการขยายยีน *gmhA* จาก genome ของเชื้อ *B.pseudomallei* โดยวิธี PCR นำโปรตีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน *gmhA* ไปทำการทดสอบ western blot กับซีรั่มของผู้ป่วยเมลิออย-โดซีส พบว่าให้ผลลบ แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของ antigenicity ในโปรตีนที่ควบคุมการสร้างโดยยีน *gmhA* อาจจะเป็นแบบ conformational ที่สูญเสีย antigenicity ไประหว่างขั้นตอนการทำ denature ของการทดลอง SDS-PAGE

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยา
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

417 54292 30 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : MELIOIDOSIS / IMMUNOSCREENING / *IN VIVO* EXPRESSED GENE / *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* .

SIROJ JITSURONG : CLONING AND CHARACTERIZATION OF *IN VIVO* EXPRESSED GENES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* IN BACTEREMIC MELIOIDOSIS PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. DR. SOMYING TUMWASORN, THESIS CO- ADVISOR : ASST. PROF. DR.CHINTANA CHIRATHAWORN, 190 pp.ISBN 974-17-3844-7.

Melioidosis is an infectious disease caused by a soil saprophyte gram negative bacterium, *Burkholderia pseudomallei.* The known major endemic areas of this disease are Southeast Asia and Northern Australia. Melioidosis cases have been reported from every parts of Thailand, with highest incidence rate in the northeastern part of the country. The pathogenesis of melioidosis remains unknown. Currently, the bacterial pathogenesis study is focused on *in vivo* expressed genes detection. Two approaches were performed to detect *in vivo* expressed genes by using the immunoscreening experiment. The first experiment, In vivo induced antigen technology (IVIAT) approach, the pooled melioidosis sera were extensively absorbed with *in vitro* grown cells, whole cell lysate, whole cell lysate and denature of *B.pseudomallei.* The antibody titre against the whole cell lysate in the absorbed serum has been demonstrated to be decreased more than 1,000 times. The expressed genomic library in plasmid pET 30a was screened with the absorbed serum and the signal was detected using ECL chemiluminescence. Thirty one positive clones were isolated from screening of 13,000 library clones. Only 8 clones could be successfully sequenced and DNA sequence analysis of the insert DNA at the S tag primer of all 8 clones by using BLAST and Macvector programn revealed similarity with hypothetical protein. Western blot was performed with expressed protein from 19 positive clones randomly selected from the 31 positive clones, all expressed protein reacted with the melioidosis, S-tag and normal serum. The inclusion body preparation was isolated from the clone number 23 and western blot was performed with 16 normal sera and 16 melioidosis sera. The protein reacted with all of the tested sera. The second approach, the λ ZAPII expressed genomic library of *B.pseudomallei* was screened with pooled melioidosis serum preabsorbed with *E.coli* host cell. The positive clones were detected by using protein A-CDP star chemiluminescence. All of 14 positive clones reacted with only the pooled absorbed melioidosis serum and not the pooled absorbed normal serum when tested with the plaque dot blot analysis. The expressed genes were detected by using a combination of immunoscreening, bioinformatics and molecular biology. At least 6 in vivo genes were identified by this approach. Two were well known virulent genes, *gmhA* (a capsule biosynthetic gene) and *bipD* (type three secretion protein). Another two were coded for conserved hypothetical proteins. The last two isolated genes were *groEL* (a chaperonine protein) and a transmembrane protein. All of the isolated genes are potentially useful as diagnostic for melioidosis. The *gmhA* gene was amplified from the *B.pseudomallei* genome using PCR and expressed in pRSETA vector. The expressed protein band of *gmhA* gene did not react with the pooled absorbed melioidosis serum in western blot experiment. The nature of antigenicity of protein encoded by *gmhA* may be conformational antigenicity that lost the antigeniciy during SDS-PAGE denature process.

Inter-department Microbiology — Student's signature S. Jitsurong

Field of study Medical Microbiology — Advisor's signature Somying Tumwasorn

Academic year 2003 — Co-advisor's signature Chintana CH

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to my advisor, Associate Professor Dr.Somying Tumwasorn, for her valuable advice, expert guidance, support and encouragement throughout. I am greatly indebted to my thesis co-advisor Assistant Professor Dr.Chintana Chirathaworn, Professor Dr.Ifor Beacham and Professor Dr.Jeffrey D Hillman for their valuable suggestion, support and encouragement for the completeness of this thesis. I am also very grateful to Dr.Anan Chongthaleong Head of Department of Microbiology, Dr.Kanitha Patarakul and Associate Professor Dr.Sunee Korbsrisate for their constructive comments and kindness in serving as the superviory comittees.

My sincere gratitude is extended to Dr.Nat F Brown for his valuable advice. I also wish to thank Professor Dr.Ann Progulske-Fox for her helpful suggestions.

I am particularly indebted to the Royal Golden Jubilee Ph.D. program, Thailand Research Fund, which enabled me to undertake this study successfully. Inaddition, I would like to thank the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital for supporting equipment and other utilities.

Finally, I would like to express my infinite grateful to my parents and every member of my family, my dear friends for their unlimited love, understanding and attention all the time

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS

	Page
Abstract (Thai).....	IV
Abstract (English).....	V
Acknowledgement.....	VI
Table of contents.....	VII
List of Tables.....	VIII
List of Figures.....	VIIII
List of Abbreviation.....	XII
Chapter	
I. Introduction.....	1
II. Review of related literatures.....	8
III. An approach to isolating in vivo expressed gene of *Burkholderia pseudomallei* using IVIAT.....	31
Materials and Methods.....	31
Results.....	45
Discussion.....	60
IV. Searching for virulent *Burkholderia pseudomallei* genes by immunoscreening the ZAPII expressed genomic library.....	65
Materials and Methods.....	65
Results.....	83
Discussion.....	135
V. Summary and Conclusion.....	146
References	148
Appendices	
Appendix A.....	161
Appendix B.....	165
Biography.	178

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Melioidosis sera data.....	33
2	ELISA titers of sera against French-pressed whole cells of *Burkholderia pseudomallei*	48
3	ELISA titer of pooled melioidosis serum after absorption process.....	49
4	List of isolated IVIAT clones.....	50
5	Sequence of oligonucleotide primer used to amplify the *gmhA* and *wcb*M genes from *Burkholderia pseudomallei* genome.....	82
6	List of suspected *in vivo* expressed genes isolated from the immunoscreening experiment.....	84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Shematic representation of auxotrophic IVET selection.....	21
2	Shematic representation of STM strategy.....	24
3	Schematic representation of DFI strategy.....	27
4	ELISA assay of representative patients' and control sera.....	51
5	Serum absorption assay of pooled melioidosis serum.....	52
6	Generation of DNA fragments by using hydroshea.....	53
7	Immunoscreening plate.....	54
8	Colony dot blot analysis.....	55
9	SDS-PAGE analysis of representative positive clones.....	56
10	Western blot analysis of representative posititive clones.....	57
11	SDS-PAGE analysis of inclusion body of clone Bp 23.....	58
12	Western blot analysis of inclusion body of clone Bp 23.....	59
13	Schematic representative of pBK-CMV.....	69
14	Schematic representative of pRSETA.....	81
15	Recombinant phagemid pBK-CMV isolated from mass excision....	85
16	Restriction analysis of recombinant phagemid pBK-CMV isolated from mass excision.....	86
17	Plaque dot blot analysis.....	87
18	Restriction endonuclease analysis of Bp 3, 5, 6 and 7 clones.....	88
19	Restriction endonuclease analysis of clone Bp1.....	91
20	Immunorescreening of clone Bp1.....	92
21	ORF analysis of clone Bp1.....	93

Figure Page

22 Gene arrangement of clone Bp1..... 94
23 Conserved Protein domain of *gmhA* protein..... 95
24 The Hopp and Woods hydropathy profiles of 6 suspected *in vivo* expressed gene..... 96
25 Chou Fasman secondary structure of gmhA protein..... 97
26 Immunorescreening of Bp 6..... 100
27 Experession of recombinant phagemid pBK-CMV in *E.coli* XL1 Blue MRF′..... 101
28 Arrangement of genes in Bp 6 using GeneMark program..... 102
29 Chou Fasman secondary structure of bipD protein..... 103
30 Immunorescreening of clone Bp 7..... 106
31 Arrangement of genes in Bp 7 clone by using GeneMark program..... 107
32 Kyte/Doolittle hydrophobicity ; Hopp/Woods antigenicity analysis of transmembrane protein clone Bp 7..... 108
33 Chou Fasman secondary structure of transmembrane protein..... 109
34 Argos Helix transmembrane and Von Heijne of transmembrane protein of Bp 7..... 110
35 Immunorescreening of Bp 3..... 113
36 ORF analysis of Bp 3 inserted DNA using Macvector programn V 7.01. 114
37 Arrangement of genes in Bp 3 clone using GeneMark Program..... 115
38 Chou Fasman secondary structure of conserved hypothetical protein 1 of Bp 3 clone..... 116

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure Page

39 Chou Fasman secondary structure of conserved hypothetical signal peptide protein of Bp 3 clone..... 117
40 Immunorescreening of Bp 9 clone..... 119
41 Chou Fasman secondary structure of groEL protein of Bp 9..... 120
42 Immunorescreening of Bp 5..... 122
43 ORF analysis inserted DNA of clone Bp 5 using Macvector programn V 1.01..... 123
44 Arrangement of genes in clone Bp 5 using GeneMark program.... 124
45 Multiple alignment analysis of the aminoacid sequence of *gmhA* protein..... 126
46 Phylogenetic tree constuction of gmhA protein..... 128
47 PCR amplication of *gmhA* and *wcbM* genes from the *B.pseudomallei* genome..... 130
48 Restriction endonuclease analysis of PCR products of *gmhA* gene and *wcbM* genes..... 131
49 Recombinant clones of *gmhA* and *wcbM*..... 132
50 Restriction endonuclease analysis of recombinant clones of *gmhA* and *wcbM*..... 133
51 SDS-PAGE analysis of *gmhA* , *wcbM* and BP 1 clones..... 134

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATION

bp	=	base pairs
CAT	=	chloramphenicol acetyltransferase
C-terminal	=	carboxy-terminal
^{o}C	=	degrees celsius
C	=	cytosine
DMSO	=	dimethyleneglycol
ddNTP	=	2,3′ - dideoxynucleotide-5′-triphosphate
G	=	guanine
IPTG	=	Isopropylthio-β-D-galactoside
ml	=	milliliters
NaOAc	=	sodium acetate
OD	=	optical density
PEG	=	polyethylene glycol
w/v	=	weight per volume
PCR	=	polymerase chain reaction
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย