

ผลของฟอสเฟตต่อระบบเหี่ยวน้ำสีน้ำตาลแบบสององค์ประกอบในไซยาโนแบคทีเรีย

Synechocystis sp. PCC 6803



นางสาววราภรณ์ จันทร์จำนงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
ศูนย์วิทยุโทรพัทธศาสตร์

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-2138-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 220 3786X

EFFECT OF PHOSPHATE ON TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION
SYSTEM IN THE CYANOBACTERIUM, *Synechocystis* sp. PCC 6803



Miss Waraporn Juntarajumnong

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry

Department of Biochemistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-2138-9

Thesis Title EFFECT OF PHOSPHATE ON TWO-COMPONENT SIGNAL
TRANSDUCTION SYSTEM IN THE CYANOBACTERIUM,
Synechocystis sp. PCC 6803

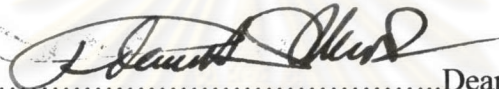
By Waraporn Juntarajumnong

Field of study Biochemistry


Thesis Advisor Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.

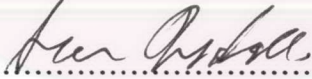
Thesis Co-advisor Julian J. Eaton-Rye, Ph.D.

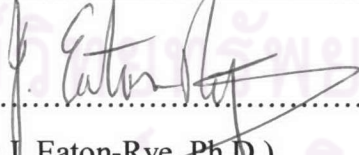
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree



.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

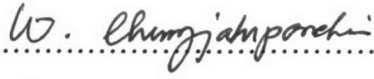
THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)


.....Thesis Co-advisor
(Julian J. Eaton-Rye, Ph.D.)


.....Member
(Teerapong Buaboocha, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Wipa Chungjatupornchai, Ph.D.)

นางสาววารภรณ์ จันทร์จำนงค์ : ผลของฟอสเฟตต่อระบบเหนี่ยวนำสัญญาณแบบสององค์ประกอบในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechocystis* sp. PCC 6803 (EFFECT OF PHOSPHATE ON TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION SYSTEM IN THE CYANOBACTERIUM, *Synechocystis* sp. PCC 6803) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อรุณี อินเจริญศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : Julian J. Eaton-Rye, Ph.D. 160 หน้า. ISBN 974-53-2138-9

แบคทีเรียใช้ระบบการเหนี่ยวนำสัญญาณแบบสององค์ประกอบที่โดยทั่วไปประกอบด้วยฮิสทีดีนไคเนสและโปรตีนควบคุมการตอบสนองในการรับรู้ต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ฮิสทีดีนไคเนส SII0337, โปรตีนควบคุมการตอบสนอง Slr0081 และโปรตีนควบคุมการตอบสนองในแง่ลบ PhoU มีส่วนในการตอบสนองต่อสภาวะขาดฟอสเฟตใน *Synechocystis* sp. PCC 6803 ในงานวิจัยนี้ได้กลายพันธุ์กรดอะมิโนทรีโอนีนที่ตำแหน่ง 214 ในบริเวณอนุรักษ์ของโดเมนส่งผ่านสัญญาณของ SII0337 และแอสพาร์เทตที่ตำแหน่ง 88 ในโดเมนรับสัญญาณของ Slr0081 เพื่อตรวจสอบหน้าที่ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าว นอกจากนี้ยังสร้างพันธุ์กลายที่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเหล่านี้และไม่มีโปรตีน PhoU ผลกระทบที่เกิดจากการกลายพันธุ์ทำได้โดยการวัดกิจกรรมของอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส จากการทดลองพบว่าพันธุ์กลายที่เปลี่ยนกรดอะมิโนทรีโอนีนที่ตำแหน่ง 214 แสดงกิจกรรมของอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสเพิ่มขึ้นทั้งในสภาวะที่มีฟอสเฟตเพียงพอและขาดฟอสเฟต ยกเว้นพันธุ์กลาย T214R อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบกิจกรรมของอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสของพันธุ์กลายทรีโอนีนที่ไม่มีโปรตีน PhoU พบว่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสยังคงแสดงกิจกรรมเพิ่มขึ้น ยกเว้นพันธุ์กลาย T214N และ T214R และเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนแอสพาร์เทตที่ตำแหน่ง 88 อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสไม่แสดงกิจกรรม แสดงว่าแอสพาร์เทตที่ตำแหน่ง 88 ในโดเมนรับสัญญาณของ Slr0081 เป็นบริเวณที่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต

สารประกอบฟอสเฟตบางชนิดสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนควบคุมการตอบสนองได้ในกรณีที่ไม่มีฮิสทีดีนไคเนส ดังนั้นจึงตรวจสอบความสามารถของอะเซทิลฟอสเฟตภายในเซลล์ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ Slr0081 พบว่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเทสไม่แสดงกิจกรรม แม้ว่าจะมีอะเซทิลฟอสเฟตภายในเซลล์ ผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าอะเซทิลฟอสเฟตภายในเซลล์ไม่สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้ Slr0081 ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอะเซทิลฟอสเฟตภายนอกเซลล์สามารถใช้เป็นแหล่งฟอสเฟตเพื่อเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ถึงแม้ว่าในเซลล์จะไม่มีอะซิเตตไคเนสและฟอสโฟทรานสอะเซทิลเลสที่เกี่ยวข้องกับการสลายอะเซทิลฟอสเฟตเพื่อผลิตอะเซทิลโคเอก็ตาม

จากการทำรีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ชี้ให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอของอะซิเตตไคเนสและฟอสโฟทรานสอะเซทิลเลสเพิ่มมากขึ้นภายใต้สภาวะที่เซลล์ขาดฟอสเฟต ผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสำคัญต่อเมแทบอลิซึมในการผลิตพลังงานเพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะขาดฟอสเฟต

ในการทดลองทำเอนไซม์อะซิเตตไคเนสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30% และผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี phenyl-sepharose พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและให้ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2.46 ไมโครโมล นาที⁻¹ มิลลิกรัมโปรตีน⁻¹ เมื่อตรวจสอบมวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยการทำให้ SDS-PAGE พบว่าขนาด 48 กิโลดาลตัน เอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 40 องศาเซลเซียสในช่วงพีเอช 6.5-8.5 ค่า K_m สำหรับอะซิเตตและเอทีพี เท่ากับ 20 และ 0.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเอนไซม์มีความจำเพาะกับอะซิเตตและเอทีพีมากที่สุด

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....*วารภรณ์ จันทร์จำนงค์*
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Julian J. Eaton-Rye*
ปีการศึกษา.....2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*Aruni Incharoen*

9745321389 : MAJOR Biochemistry

KEY WORD : HISTIDINE KINASE / RESPONSE REGULATOR / PhoU / ACETATE KINASE / PHOSPHOTRANSACETYLASE / *Synechocystis* sp. PCC 6803

WARAPORN JUNTARAJUMNONG : EFFECT OF PHOSPHATE ON TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION SYSTEM IN THE CYANOBACTERIUM, *Synechocystis* sp. PCC 6803. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : JULIAN J. EATON-RYE, Ph.D., 160 pp. ISBN: 974-53-2138-9

The two-component signal transduction, which typically consists of a histidine kinase and response regulator, is used by bacterial cells to sense changes in their environment. The histidine kinase SII0337 and its cognate response regulator Slr0081, together with the negative regulator PhoU, are involved in the response to phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. In this research, mutations have been introduced into Thr-214 in the conserved motif of the transmitter domain of SII0337 and Asp-88 in the receiver domain of Slr0081 to examine the function of these specific amino acids. In addition, a PhoU deletion strain was constructed to determine the effect of the absence of this regulator when combined with Thr-214 histidine kinase and Asp-88 response regulator mutants. The measurement of alkaline phosphatase activity was carried out to monitor the effect of the mutations. The results showed that mutations of Thr-214 in the SII0337, except T214R mutant, resulted in up-regulation of alkaline phosphatase activity in both phosphate-sufficient and phosphate-limiting conditions. However, removal of PhoU still retained the up-regulated of alkaline phosphatase activity in these Thr-214 mutants except T214N and T214R. The abolished alkaline phosphatase activity caused by Asp-88 mutation suggested that Asp-88 in the receiver domain of Slr0081 is the site of phosphorylation.

Some response regulator proteins have been shown to be phosphorylated by low molecular weight phosphorylated compounds in the absence of the cognate histidine kinase. Therefore, phosphorylation of Slr0081 by endogenous acetyl phosphate was also investigated. It was found that in the absence of SII0337, the alkaline phosphatase activity could not be induced even when an endogenous acetyl phosphate was available. The results suggested that acetyl phosphate could not phosphorylate Slr0081. In addition, the exogenous acetyl phosphate can provide a source of phosphate to produce the energy for the cells even though acetate kinase and phosphotransacetylase, which are involved in acetyl-CoA production, are absent.

Reverse transcription PCR demonstrated that the mRNA expression of acetate kinase and phosphotransacetylase genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is up-regulated in response to phosphate limitation. It is suggested that these enzymes are important for energy metabolism allowing the cells to survive under phosphate stress.

Acetate kinase was partially purified by 30% ammonium sulfate and phenyl-sepharose column chromatography. A partially purified enzyme was obtained with a specific activity of 2.46 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. The subunit molecular weight determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was 48 kDa. The enzyme showed optimum activity at 40°C, with pH 6.5-8.5. The apparent K_m values for acetate and ATP were 20 mM and 0.7 mM, respectively. The enzyme showed high specificity toward the substrates acetate and ATP.

Department.....Biochemistry.....Student's signature.....Waraporn Juntarajumnong
 Field of study.....Biochemistry.....Advisor's signature.....
 Academic year.....2004.....Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi and my co-advisor, Dr. Julian J. Eaton-Rye, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Dr. Tipaporn Limpaseni, Associate Professor Dr. Wipa Chungjatupornchai and Dr. Teerepong Buaboocha for serving as thesis committee, for their available comments and also useful suggestions.

My appreciation is also expressed to lab 308, Biochemistry Department, University of Otago, Dunedin, New Zealand, Jackie Shand, Dr. Tina Summerfield, Regan Winter, Claire Martin, Matthew Woods, Ariel Hung, Lux Selvanelson, Fiona Bentley, Dr. Shannon Clarke, Ron Manulevu, Prae Plansangkate, Dr. Tony Ooi and Dr. Somruetai Winichayakul for their friendship and warm welcome to make me have a great time during my stay in New Zealand. Especially I thank Jackie for introducing me to everything about molecular biology techniques.

Sincere thanks are also extended to all staff members and friends of Biochemistry Department, Chulalongkorn University especially the members in room 617 for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my family for their support, understanding, unlimited love and listening to my lab stories.

The Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0038/2544) supported this work.

CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Two-component signal transduction.....	1
1.2 Phosphate uptake.....	7
1.3 Phosphate sensing.....	8
1.4 Cross regulation.....	9
1.5 Acetyl phosphate metabolism.....	11
1.6 Cyanobacterial phosphate sensing.....	15
1.7 Oligonucleotide-directed mutagenesis.....	17
1.8 Rapid amplification of cDNA ends.....	20
1.9 <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	20
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	23
2.1 Materials.....	23
2.1.1 Chemicals.....	23
2.1.2 Equipments.....	26

	PAGE
2.1.3 Enzymes.....	26
2.1.4 Antibiotics.....	27
2.1.5 Supplies.....	27
2.1.6 Kit.....	27
2.1.7 Organisms.....	28
2.1.8 Plasmids.....	28
2.1.9 Oligonucleotides.....	29
2.2 Method for <i>Escherichia coli</i> strains.....	32
2.2.1 General molecular biology methods.....	32
2.2.1.1 Restriction digests.....	32
2.2.1.2 Gel electrophoresis.....	32
2.2.2 Molecular biology methods.....	32
2.2.2.1 Preparation of competent cells.....	32
2.2.2.2 Heat-shock transformation.....	33
2.2.2.3 Ligations.....	33
2.2.2.4 Oligonucleotide-directed mutagenesis.....	33
2.2.2.5 Alkaline lysis minipreparation.....	36
2.2.2.6 Sequencing minipreparation.....	37
2.3 Method for <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	38
2.3.1 General methods.....	38
2.3.1.1 Growth conditions.....	38
2.3.1.2 Photoautotrophic growth curve measurements.....	39
2.3.1.3 Absorption spectra.....	39

	PAGE
2.3.1.4 Alkaline phosphatase assay.....	39
2.3.2 Molecular biology methods.....	40
2.3.2.1 Transformations.....	40
2.3.2.2 DNA extraction.....	41
2.3.2.3 Southern analysis.....	42
2.3.2.4 RNA extraction.....	43
2.3.2.5 First-strand cDNA synthesis.....	44
2.3.2.6 Rapid Amplification of 5' cDNA Ends.....	45
2.3.2.7 Reverse transcription (RT-PCR).....	45
2.3.3 Partail purification of acetate kinase and its properties.....	46
2.3.3.1 Acetate kinase assay.....	46
2.3.3.2 Cell extraction.....	46
2.3.3.3 Phenyl-sepharose Column Chromatography.....	47
2.3.3.4 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.....	47
2.3.3.5 Staining of acetate kinase activity.....	48
2.3.3.6 The properties of acetate kinase.....	48
CHAPTER III RESULTS.....	50
3.1 Characterization of Sll0337 and Slr0081 using oligonucleotide- Directed mutagenesis.....	50
3.1.1 Identification of the start condon of <i>sll0337</i>	50
3.1.2 Construction of the PhoR and PhoB strain for mutagenesis.....	52

	PAGE
3.1.3 Thr-214 mutation involved in the regulation of Alkaline phosphatase activity.....	63
3.1.4 Effect of the removal of PhoU from Thr-214 mutants.....	65
3.1.5 Mutation Asp-88 in the receiver domain of Slr0081.....	71
3.1.6 Construction of the PhoU interruption plasmid.....	78
3.1.7 Dilution effect on alkaline phosphatase assay.....	80
3.2 Function of acetyl phosphate in Slr0081 response regulator.....	88
3.2.1 Construction of the <i>slr1299</i> interruption plasmid.....	92
3.2.2 Construction of the <i>slr2132</i> interruption plasmid.....	92
3.2.3 Cross regulation of Slr0081 by acetyl phosphate.....	95
3.2.4 Acetyl phosphate as a phosphate source of the <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	99
3.3 Acetate kinase and phosphotransacetylase genes are up-regulated under phosphate stress.....	101
3.4 Purification of acetate kinase and its properties.....	103
CHAPTER IV DISCUSSION.....	116
CHAPTER V CONCLUSION.....	129
REFERENCES.....	130
APPENDICES.....	139
BIOGRAPHY.....	160

LIST OF TABLES

	PAGE
Table 1 Plasmid used in this study.....	29
Table 2 Mutagenesis primer are designed to create amino acid substitutions in the histidine kinase.....	30
Table 3 Mutagenesis primer are designed to create amino acid substitutions in the response regulator.....	30
Table 4 PCR primer for genomic PCR.....	30
Table 5 PCR primer for 5'-RACE and reverse transcription PCR.....	31
Table 6 PCR primer for sequencing.....	31
Table 7 Purification of acetate kinase from <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	107
Table 8 Substrate specificity of the acetate kinase.....	115


 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

	PAGE
Figure 1 Typical domain organisation of the proteins involved in two-component signalling.....	2
Figure 2 Proposed model of the EnvZ dimer.....	5
Figure 3 Small-molecule phosphodonors.....	10
Figure 4 Acetate kinase and phosphotransacetylase pathway.....	12
Figure 5 Steps involved in <i>in vitro</i> mutagenesis using oligonucleotide-directed mutagenesis.....	19
Figure 6 Determination of the 5' end of mRNA using 5' RACE.....	21
Figure 7 Nucleotide sequence of <i>sll0337</i>	51
Figure 8 PCR product from 5'-RACE.....	53
Figure 9 Nucleotide sequence of PCR product from 5'-RACE.....	54
Figure 10 The pTZsll0337-kan ^R plasmid.....	56
Figure 11 PCR demonstrating Δ sll0337-cam ^R strain.....	57
Figure 12 The pTZslr0081-cam ^R plasmid.....	58
Figure 13 PCR demonstrating Δ slr0081-spec ^R strain.....	59
Figure 14 Confirmation of the Sll0337 mutants and their phototrophic growth.....	61
Figure 15 Confirmation of the Slr0081 mutants and their phototrophic growth.....	62
Figure 16 PCR demonstrating full segregation of sll0337:control.....	64
Figure 17 Measurement of alkaline phosphatase activity in strains carrying mutations at Thr-214 in Sll0337	66
Figure 18 Whole-cell absorption spectrum of wild type and T214R.....	67

PAGE

Figure 19	The p Δ PhoU mutant plasmid.....	69
Figure 20	PCR demonstrating full segregation of the gene encoding the interrupted copy of <i>phoU</i> in the histidine kinase mutants	70
Figure 21	Measurement of alkaline phosphatase activity in strains carrying mutations at Thr-214 in the absence of PhoU	72
Figure 22	Whole-cell absorption spectrum of wild type and T214R: Δ PhoU.....	73
Figure 23	PCR demonstrating full segregation of <i>slr0081:control</i>	75
Figure 24	Measurement of alkaline phosphatase activity in the wild type and D88N strains	76
Figure 25	Whole-cell absorption spectrum of wild type and D88N.....	77
Figure 26	The p Δ PhoU2 mutant plasmid.....	79
Figure 27	PCR demonstrating full segregation of the <i>phoU</i> gene interrupted with a kanamycin-resistance cassette	81
Figure 28	Measurement of alkaline phosphatase activity in strains carrying mutations at D88N in the absence of PhoU	82
Figure 29	Reaction catalyzed by alkaline phosphatase.....	83
Figure 30	Effect of the dilution factor on absorbance at 400 nm of the supernatant from alkaline phosphatase reaction mixture.....	85
Figure 31	Absorption spectrum of the supernatant from alkaline phosphatase reaction mixture.....	86
Figure 32	Dilution effect on the absorbance of the supernatant from alkaline phosphatase reaction mixture at difference wavelength.....	87

PAGE

Figure 33 Dilution effect on the absorbance of the supernatant from alkaline phosphatase reaction mixture at difference buffer and wavelength.....	89
Figure 34 Measurement of alkaline phosphatase activity in strains carrying mutations at Thr-214 in Sll0337	90
Figure 35 Measurement of alkaline phosphatase activity in strains carrying mutations at Thr-214 in the absence of PhoU	91
Figure 36 The p Δ sll1299 mutant plasmid.....	93
Figure 37 The p Δ slr2132 mutant plasmid.....	94
Figure 38 PCR demonstrating full segregation of the interrupted sll1299 genes containing antibiotic-resistance cassettes	96
Figure 39 PCR demonstrating full segregation of the interrupted slr2132 genes containing antibiotic-resistance cassettes.....	97
Figure 40 PCR demonstrating full segregation of the interrupted genes containing antibiotic-resistance cassettes.....	98
Figure 41 Measurement of alkaline phosphatase activity in Δ Sll1299/ Δ Sll0337.....	100
Figure 42 Photoautotrophic growth of wild type and Δ Sll1299/ Δ Slr2132/ Δ Sll0337 mutant.....	102
Figure 43 RT-PCR analysis of the <i>ack</i> and <i>pta</i> genes expression of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	105
Figure 44 Phenyl-sepharose chromatography of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Acetate kinase.....	106

PAGE

Figure 45 Acetate kinase from <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 was analyzed by SDS-PAGE.....	108
Figure 46 Acetate kinase activity stain.....	109
Figure 47 Effect of temperature on acetate kinase activity.....	110
Figure 48 Effect of pH on acetate kinase activity.....	111
Figure 49 Effect of the Mg^{2+} concentration on the activity of acetate kinase.....	112
Figure 50 Double reciprocal plot of activity of partially purified acetate kinase as a function of the concentration of the substrate, acetate.....	113
Figure 51 Double reciprocal plot of activity of partially purified acetate kinase as a function of the concentration of the substrate, ATP.....	114

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBEVIATIONS

OD	Optical Density
Thr	Threonine
Asp	Aspartic
S	Serine
A	Alanine
R	Arginine
Q	Glutamine
G	Glutamic acid
N	Asparagine
D	Aspartic acid
Ack	Acetate kinase
Pta	Phosphotransacetylase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
g	Gram
l	Liter
μ l	Microliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M	Molar
PCR	Polymerase Chain Reaction