การโคลนและการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Bacillus lentus*

นางสาวมยุรา ทองช่วง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

CLONING AND EXPRESSION OF PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM *Bacillus lentus*

Miss Mayura Thongchuang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Thesis Title	CLONING AND EXPRESSION OF PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM *Bacillus lentus*
By	Miss Mayura Thongchuang
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.

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

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

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

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

..... Member
(Assistant Professor Supachitra Chadchawan, Ph.D.)

มยุรา ทองช่วง : การโคลนและการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Bacillus lentus*. (CLONING AND EXPRESSION OF PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM *Bacillus lentus*) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, 181 หน้า.

ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนส (EC 1.4.1.20) เร่งปฏิกิริยาการดึงหมู่อะมิโนจากแอล-ฟีนิลอะลานีนให้ผลิตภัณฑ์เป็นฟีนิลไพรูเวทและแอมโมเนีย ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้และใช้ไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ กลุ่มวิจัยของเราได้ศึกษาฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Bacillus lentus* และพบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะสูงต่อแอล-พีนิลอะลานีนซึ่งเป็นซับสเตรตในปฏิกิริยา oxidative deamination และฟีนิลไพรูเวทซึ่งเป็นซับสเตรตในปฏิกิริยา reductive amination นอกจากนั้นยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงโดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเมื่อบ่มเอนไซม์ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและเอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันนี้เป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำลำดับกรดอะมิโนบางส่วนภายในสายเอนไซม์จำนวน 3 สายมาใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นยีนส่วนในของฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนทั้งชิ้นด้วยเทคนิค inverse PCR จากนั้นโคลนยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *B. lentus* เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) โดยใช้ expression vector (pET-17b) เมื่อวิเคราะห์สารละลายเอนไซม์หยาบที่ได้จากรีคอมบีแนนท์โคลนพบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์จาก *B. lentus* 92.0 เท่า ภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสคือ การเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง การทดสอบความเสถียรของการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสโดยการเพาะเชื้อต่อช่วงรีคอมบิแนนท์โคลน 50 ครั้ง พบว่าการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสยังคงเหลือถึง 57.7 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อเริ่มต้น เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต คอลัมน์ดีอีเออีโทโยเพิร์ล และคอลัมน์บิวทิลโทโยเพิร์ล พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีคงเหลือ 31.0 เปอร์เซ็นต์และมีความบริสุทธิ์ขึ้น 2.11 เท่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 340,000 ดาลตันประกอบด้วย 8 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา oxidative deamination และ reductive amination คือ 10.7 และ 7.8 ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 7.0 ถึง 11.0 เอนไซม์มีค่า K_m ต่อแอล-ฟีนิลอะลานีน NAD^+ ฟีนิลไพรูเวท แอมโมเนีย และ NADH เท่ากับ 0.45, 0.40, 0.15, 48 และ 0.15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต .....มยุรา ทองช่วง.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

477 24240 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : PHENYLALANINE DEHYDROGENASE/ *Bacillus lentus*/ CLONING/ EXPRESSION

MAYURA THONGCHUANG : CLONING AND EXPRESSION OF PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM *Bacillus lentus*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D., 181 pp.

NAD^+-dependent phenylalanine dehydrogenase (EC 1.4.1.20) catalyzes the reversible oxidative deamination of L-phenylalanine to form ammonia, phenylpyruvate and NADH. Our research group has studied phenylalanine dehydrogenase from *Bacillus lentus* and found that the enzyme had high substrate specificity in the oxidative deamination on L-phenylalanine and the reductive amination on phenylpyruvate. No loss of the enzyme activity was observed upon incubation at 50°C for 4 hours. The enzyme retained 50% of the activity after incubation at the same temperature for 3 days. Therefore, in this research, the amino acid sequence of 3 internal peptide fragments of phenylalanine dehydrogenase were determined and used for degenerated primer design. The nucleotide sequencing of phenylalanine dehydrogenase gene (*phedh*) was investigated by inverse PCR and then the whole gene was cloned and expressed in *E. coli* BL21(DE3) using expression vector, pET-17b. The specific activity of crude recombinant enzyme was 92.0 fold higher than that of the enzyme from *B. lentus*. The optimum condition for *phedh* gene expression was induction with 0.2 mM IPTG for 8 hours. In spite of daily subculture for 50 days, the *phedh* gene expression in *E. coli* BL21(DE3) remained 57.7% of that of the parent. Recombinant enzyme was purified 2.11 fold with a 31.0% yield by procedure involving 40-50% ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl and Butyl-Toyopearl column chromatography. The enzyme had a molecular mass about 340 kDa and consisted of 8 identical subunits. The optimum pHs for the oxidative deamination and the reductive amination were 10.7 and 7.8, respectively and optimum temperatures were 45°C and 50°C, respectively. The enzyme was stable over a broad pH range from 7.0 to 11.0. The apparent K_m values for L-phenylalanine, NAD^+, phenylpyruvate, NH_4Cl and NADH were 0.45, 0.40, 0.15, 48 and 0.15 mM, respectively.

Field of study.....Biotechnology..... Student's signature....Mayura....Thongchuang

Academic year.....2006..... Advisor's signature.....Kanoktip Packdibamrung

ACKNOWLEDGEMENTS

I am cordially delighted to express my terrific appreciation to my admirable advisor, Assist. Prof. Dr. Kanoktip Packdibamrung, for her great understanding, excellent counsel, encouragement, guidance and supporting throughout this thesis.

In addition, I also would like to thank Assoc. Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed and Assist. Prof. Dr. Supachitra Chadchawan, serving as the members of the master committees, for their helpful suggestions and comments.

My thankfulness is also expressed to Professor Haruo Misano, Laboratory of Applied Microbiology, Department of Bioresources Science and Research Institute of Molecular Genetics, Kochi University, Japan for amino acid sequence analysis, molecular weight determination and many chemical reagents.

For all friends of the Biochemistry and Biotechnology department, I am pleased to tell that I thank for their assistance and friendships.

Eventually, the big gratitude is expressed to my family for their understanding, helping, supporting whereas I have spent a lot of time with this thesis rather than with them.

This work was supported in part by the Grant from Graduate School.

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Page

Page

ABBREVIATIONS

A	absorbance, 2′-deoxyadenosine (in a DNA sequence)
ADP	adenine dinucleotide phosphate
AlaDH	alanine dehydrogenase
AspDH	aspartic dehydrogenase
bp	base pairs
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	bovine serum albumin
C	2′-deoxycytidine (in a DNA sequence)
°C	degree Celsius
Da	Dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2′-deoxynucleoside 5′-triphosphate
DTT	dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
G	2′-deoxyguanosine (in a DNA sequence)
GluDH	glutamate dehydrogenase
GlyDH	glycine dehydrogenase
HPLC	high-performance liquid chromatography
HCl	hydrochloric acid
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid, kilobases in single-standed nucleic acid
KCl	potassium chloride
kDa	kiloDalton
K_m	Michaelis constant
KOH	potassium hydroxide
l	liter
LB	Luria-Bertani

LeuDH	leucine dehydrogenase
μg	microgram
μl	microliter
μM	micromolar
M	mole per liter (molar)
mA	milliampere
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
M_r	relative molecular mass
MW	molecular weight
N	normal
NAD^+	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
$NADP^+$	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
ng	nanogram
nm	nanometer
NH_4Cl	ammonium chloride
$(NH_4)_2SO_4$	ammonium sulfate
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
phedh	phenylalanine dehydrogenase gene
PheDH	phenylalanine dehydrogenase
pI	isoelectric point
pmol	picomole
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
SerDH	serine dehydrogenase

T	2′-deoxythymidine (in a DNA sequence)
TB	Tris-borate buffer
TE	Tris-EDTA buffer
TEMED	*N, N, N′, N′*-tetramethyl ethylene diamine
TLC	thin-layer liquid chromatography
T_m	melting temperature, melting point
TrpDH	tryptophan dehydrogenase
UV	ultraviolet
V	voltage
ValDH	valine dehydrogenase
v/v	volume by volume
w/w	weight by weight