CLONING AND EXPRESSION OF THE OXYGENASE COMPONENT OF PARA-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE

KITTISAK THOTSAPORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

ISBN 974-04-4128-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนและการแสดงออกของยีนออกซิเจนเนสของเอนไซม์พาราไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตตไฮดรอกซีเลส (CLONING AND EXPRESSION OF THE OXYGENASE COMPONENT OF PARA-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE)

กิตติศักดิ์ ทศพร 4336158 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D.(BIOLOGICAL CHEMISTRY)
พรพิมล รงค์นพรัตน์, Ph.D.(MOLECULAR BIOLOGY)

บทคัดย่อ

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า *p*-Hydroxyphenylacetate Hydroxylase (HPAH) ที่พบในเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter baumannii* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มโมโนออกซีจีเนส ที่สามารถย่อยสลายสาร *p*-hydroxyphenylacetate (HPA) แล้วได้ 3,4-dihydroxyphenylacetate (DHPA) เป็นผลิตภัณฑ์ เอนไซม์ตัวนี้ประกอบไปด้วยโปรตีน 2 ส่วน (two-component monooxygenase enzyme) คือ ส่วนที่เร่งปฏิกิริยารีดักชั่น (reductase component; C_1) และส่วนที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชั่น (hydroxylase component; C_2) การศึกษาในงานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำการโคลนยีน และทำการแสดงออกของยีนในส่วนที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชันของเอนไซม์นี้จากเชื้อ *A. baumannii* จากการทดลองได้สร้าง genomic library ของเชื้อ *A. baumannii* และทำการคัดเลือกยีนของเอนไซม์ด้วย probe ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N-terminus ของ C_2 พบว่าได้ยีนที่แสดงออก C_2 เพียง 674 คู่เบส และจากข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนของ C_1 และจากการทำ PCR พบว่า ยีน C_2 จะวางตัวอยู่เหนือขึ้น (upstream) ไปจากยีน C_1 ดังนั้น ส่วนที่เหลือของยีน C_2 ได้ทำการคัดเลือกใหม่โดยใช้ probe ที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบจากลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N-terminus ของ C_1 จากการทำ library screening พบว่าได้ส่วนที่เหลือของยีน C_2 จำนวน 595 คู่เบส จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน C_2 ทั้งหมด พบว่ายีน C_2 มีขนาด 1446 คู่เบส สำหรับสร้างกรดอะมิโนจำนวน 422 ตัว เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีแตกต่างกับเอนไซม์ตัวอื่นๆในตระกูลเดียวกัน จากนั้นได้ทำการแสดงออกของยีน C_2 ใน *E.coli* ใต้สภาวะที่จำเพาะ โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C ในสภาวะที่มีสารกระตุ้นการแสดงออกของยีน เอนไซม์ที่ได้ถูกแยกทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์เหมือนกับเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *A. baumannii.*

82 หน้า ISBN 974-04-4128-9

CLONING AND EXPRESSION OF THE OXYGENASE COMPONENT OF PARA-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE

KITTISAK THOTSAPORN 4336158 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: PIMCHAI CHAIYEN Ph.D.,(BIOLOGICAL CHEMISTRY), PORNPIMOL RONGNOPARUT Ph.D.,(MOLECULAR BIOLOGY)

ABSTRACT

p-Hydroxyphenylacetate Hydroxylase (HPAH) found in *Acinetobacter baumannii* has been reported as a two-component monooxygenase enzyme that catalyzes the conversion of *p*-hydroxyphenylacetate (HPA) to 3,4-dihydroxyphenylacetate (DHPA). A Previous study has shown that a reductase (Component 1; C_1) supplied the reduced flavin to an oxygenase (Component 2; C_2) and C_2 hydroxylated HPA by using reduced flavin and oxygen. In this study, the gene encoding C_2 component of HPAH from *A. baumannii* was identified, cloned, and expressed. A 102 base-pair DNA fragment corresponding to the N-terminal sequence of C_2 was used as a probe to screen the genomic DNA library of *A. baumannii* for *C_2-hpah* gene. We obtained a DNA fragment of 4.8 kilo-base containing 627 bp, which was identified as part of the *C_2-hpah* gene. Using the N-terminal sequence of C_1 to design PCR primers, results of PCR reactions demonstrated that *C_2-hpah* gene was upstream of the *C_1-hpah* gene. The rest of the *C_2-hpah* gene was identified by using the other probe corresponding to the N-terminal sequence of C_1 protein. The deduced amino acid sequence of the C_2 demonstrated that its structure was quite distinct from the enzyme in the same class of two-component aromatic flavorotein hydroxylase. The *C_2-hpah* gene was overexpressed as a soluble protein in *E.coli* upon induction with 1 mM IPTG at 25 °C and purified to homogeneity. Properties including subunit molecular mass, specific activity, and kinetic constants showed that the properties of the recombinant enzyme were same as those of the native one.

KEY WORDS: GENE CLONING, OXYGENASE COMPONENT, *p*-HYDROXYPHENYLACETATE HYDROXYLASE, FLAVOPROTEIN

82 P. ISBN 974-04-4128-9