A NOVEL LUCIFERASE FROM *Vibrio cambellii*: ISOLATION, CLONING, EXPRESSION, AND REACTION KINETICS

CHUTINTORN SUADEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7713-5
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การแยกให้บริสุทธิ์, การโคลนและแสดงออกของยีน, และการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากแบคทีเรีย วิบริโอ แคมเบลลิอาย (A NOVEL LUCIFERASE FROM Vibrio Cambellii: ISOLATION, CLONING, EXPRESSION, AND REACTION KINETICS)

ชุตินธร เสือดี 4437580 SCBC/ D
ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D., (MOLECULAR BIOLOGICAL), พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D., (BIOLOGICAL CHEMISTRY), DAVID P. BALLOU, Ph.D., (BIOLOGICAL CHEMISTRY)

บทคัดย่อ

เอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Lux) จากเชื้อแบคทีเรียเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชัน (oxidation) ของอ๊อกซิเจน สารรีดิวซ์ฟลาวิน ($FMNH^-$), และอัลดีไฮด์ (aldehyde) ทำให้ได้มาซึ่งสารผลิตภัณฑ์กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid), ออกซิไดซ์ฟลาวิน (FMN), น้ำ และเปล่งแสงออกมาในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 490 นาโนเมตร ในอดีตได้มีคนเคยศึกษากลไกการทำงานและโครงสร้างทางโปรตีนของเอนไซม์มาแล้ว หากแต่ยังคงมีอีกหลายขั้นตอนทั้งในส่วนของการเกิดปฏิกิริยาเคมีและการจับตัวกันของเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่ยังไม่เป็นที่เข้าใจและไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน เราได้ทำการคัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ลูซิเฟอเรสจากบริเวณชายฝั่งทะเลทางตอนใต้ของประเทศไทย และได้แบคทีเรีย วิบริโอ แคมเบลลิอาย (*Vibrio cambellii*) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ลูซิเฟอเรสได้ และยังไม่เคยมีรายงานหรือเอกสารอ้างอิงถึงการค้นพบดังกล่าวมาก่อน เราจึงได้โคลน (cloning) และทำการแสดงออกของยีน (expression) Lux จากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ใน *E. coli* การวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนพบว่า Lux จาก *Vibrio cambellii* (Lux_Vc) ประกอบไปด้วยโปรตีนสองส่วน คือ ส่วนอัลฟา (α) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 40 กิโลดาลตัน และส่วนเบต้า (β) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 36.4 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ Lux_Vc มีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ Lux จาก *Vibrio harveyi* (Lux_Vh) อยู่ถึง 98.8 % โดยมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันอยู่เพียง 8 ตัว การศึกษาการจับกันของเอนไซม์กับสารตั้งต้น $FMNH^-$ พบว่า Lux_Vc มีความสามารถในการจับกับ $FMNH^-$ (K_d = 3.1 μM)ได้แน่นกว่า Lux_Vh (K_d = 7.2 μM) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่แตกต่างกันนี้น่าจะมีหน้าที่สำคัญในการจับกันของ Lux กับ $FMNH^-$ จากการเปรียบเทียบการเร่งปฏิกิริยาการเปล่งแสงของ Lux_Vc กับ Lux_Vh พบว่าเอนไซม์ทั้งสองตัวมีความสามารถในการเปล่งแสงที่เสถียรเหมือนกัน การศึกษาทางด้านจลนพลศาสตร์และสเปกตรัมเปิดเผยให้เห็นว่า Lux_Vc ที่จับกับ $FMNH^-$ (Lux_Vc:$FMNH^-$) สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอย่างรวดเร็วได้สารตัวกลางที่เสถียรคือ flavin-C(4a)-peroxide ทั้งนี้ภายใต้สภาวะของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ที่ 4 °C พบว่ามีสารตัวกลางดังกล่าวเกิดขึ้นอย่างน้อย 3 ชนิดและมีการเปล่งแสงในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังตรวจพบสารตัวกลาง flavin-C(4a)-hydroxide เกิดขึ้นในการเร่งปฏิกิริยาของ Lux_Vc:$FMNH^-$ ที่มีสารตั้งต้นอัลดีไฮด์ชนิดโดเดคานาล (dodecanal) ซึ่งคาดว่าสารตัวกลางนี้จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดแสงในปฏิกิริยาของ Lux ดังเช่นเคยมีรายงานการค้นพบมาก่อน ผลจากการติดตามการเปล่งแสงของปฏิกิริยาดังกล่าวพบว่าแสงจะถูกเปล่งออกมาสองช่วง โดยแสงช่วงแรกเกิดขึ้นระหว่าง 0.1-5 วินาที และมีปริมาณของแสงเพียง 1-2 % เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของแสงทั้งหมด แสดงว่าอาจมีสารตัวกลางอย่างน้อยสองชนิดที่เป็นตัวทำให้เกิดแสงในปฏิกิริยา หรือ การมีอยู่ของ Lux ที่แตกต่างกันสองชนิด โดยที่ชนิดหนึ่งไม่สามารถที่จะคงสภาวะของการเป็นตัวกลางในการเปล่งแสงได้นานกว่าอีกชนิดหนึ่ง

147 หน้า ISBN 974-04-7713-5

A NOVEL LUCIFERASE FROM Vibrio Cambellii: ISOLATION, CLONING, EXPRESSION, AND REACTION KINETICS.

CHUTINTORN SUADEE 4437580 SCBC/D
Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D. (MOLECULAR BIOLOGY), PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY), DAVID P. BALLOU, Ph.D. (BIOLOGICAL CHEMISTRY)

ABSTRACT

Bacterial luciferase (Lux) is monooxygenase that catalyzes oxidation of O_2, $FMNH^-$ and aliphatic aldehyde to yield carboxylic acid, FMN, and coincidently blue-green light emission. Although the catalytic mechanism and structure of Luxs have been extensively studied, several details of the reaction steps and definitive area for substrate binding remain sparse. Here, we have successfully isolated a novel Lux from *Vibrio cambellii* (Lux_Vc) from the Southern seashore of Thailand by using artificial seawater medium (ASW). Lux_Vc gene has been cloned and overexpressed in *E. coli* system yielding α and β subunits with MW of 40 and 36.4 kDa, respectively. Analysis has shown that sequences of Lux_Vc and Lux from *V. harveyi* (Lux_Vh) are very similar with only 8 amino acids difference. These differences affect the binding of Lux_Vc to reduced flavin substrate ($FMNH^-$) with K_d of 3.1 μM which the binding is tighter than that observed from Lux_Vh (K_d of 7.2 μM). Therefore, these amino acids may play an important role for the binding of Lux to $FMNH^-$. Pre-steady-state kinetic studies reveal Lux_Vc showing slow kinetics of light decay similar to the reaction of Lux_Vh. Complex of $FMNH^-$ bound to the Lux_Vc reacts with oxygen very fast to form a stable flavin-C(4a)-peroxide. With 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, at 4 °C, some mechanistic details were found which had never been reported before. At least 3 flavin-C(4a)-peroxides were observed in the reaction without aldehyde which appears to generate a very low light. In the presence of dodecanal, flavin-C(4a)-hydroxide was found to be a light emitter as previously reported. Interestingly, Lux_Vc exhibits a spike of light emission (1 to 2 % of the total emission) in the first five seconds before the main light emission that occurs over 1000 seconds. This is evidence of the existence of another light specie or a small population of Lux that does not stabilize the precursor to light emission.

KEY WORDS: BACTERIAL LUCIFERASE/ LUX/ LUCIFERASE/ Vibrio cambellii/ A NOVEL LUCIFERASE

147 P. ISBN 974-04-7713-5