

**FEASIBILITY STUDY ON SURFACE EXPRESSION OF  
ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE USING  
CYANOBACTERIAL SomA SYSTEM**

**CHUTIRAT ASSAWATHEP**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2007**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ศึกษาความเป็นไปได้ในการแสดงออกของเอ็นไซม์ออร์กาโนฟอสฟอรัสไฮโดรเลสบนผิวเซลล์ โดยใช้ระบบ SomA ของไซยาโนแบคทีเรีย (FEASIBILITY STUDY ON SURFACE EXPRESSION OF ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE USING CYANOBACTERIAL SomA SYSTEM)

ชุตีรัตน์ อัสวเทพ 4737244 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิชา จีงจตุพรชัย, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D.,  
อภิรักษ์ อุดมกิจ, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

การแสดง heterologous protein บนผิวเซลล์จุลชีพได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับการแสดงออกที่ผิวเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรียมีอย่างจำกัด ไซยาโนแบคทีเรียเป็น prokaryote ที่สามารถสังเคราะห์แสงซึ่งเป็นที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นเจ้าบ้านในการแสดงออกของ heterologous gene ด้วยต้นทุนการผลิตต่ำ เป็นที่ยอมรับกันว่าการใช้ activated cyanobacteria-reactor ในการบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือนและอุตสาหกรรมเป็นวิธีที่ประหยัด Organophosphorus (OP) เป็นสารเคมีที่เป็นพิษต่อระบบประสาทและเป็นยาฆ่าแมลงที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เอ็นไซม์ organophosphorus hydrolase (OPH) ซึ่งสร้างจากยีน *opd* ของ *Flavobacterium* sp. ATCC27551 สามารถย่อยสลาย OP ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการแสดงออกของ OPH บนผิวเซลล์ไซยาโนแบคทีเรียอาจเป็นทางเลือกเพื่อใช้ขจัดความเป็นพิษของ OP ในการศึกษาได้ใช้ SomA (*Synechococcus* outer membrane) ซึ่งเป็น porin ใน outer membrane เป็น anchoring motif สำหรับแสดงออก OPH บนผิวเซลล์ของ *Synechococcus* PCC7942 ซึ่งเป็นไซยาโนแบคทีเรียเซลล์เดี่ยว ได้โคลนยีน *somA* ของ *Synechococcus* PCC7942 และสร้าง *somA-opd* gene cassette ซึ่งถอดรหัสเป็น truncated SomA ซึ่ง fused in frame กับ OPH ได้สร้าง shuttle plasmid pKT-Psom-opd และ pKT-Tsom-opd ซึ่งมี *somA-opd* gene cassette ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *somA* และ tRNA<sup>Pro</sup> ตามลำดับ แล้วนำไป transform เข้าสู่ *Synechococcus* PCC7942 ผลการทดลองพบว่าค่า OPH activity ของ freeze-thaw whole cells ที่มี pKT-Psom-opd ( $6.26 \pm 0.34 \mu\text{M}/\text{min}/\text{OD}_{730}$ ) มีค่าสูงกว่าที่ได้จากเซลล์ที่มี pKT-Tsom-opd ( $1.09 \pm 0.14 \mu\text{M}/\text{min}/\text{OD}_{730}$ ) ถึง 5 เท่า ดังนั้นโปรโมเตอร์ของยีน *somA* จึงแข็งแกร่งกว่าของยีน tRNA<sup>Pro</sup> ได้ใช้ proteinase K accessibility assay เพื่อตรวจสอบ OPH ที่ผิวเซลล์ ผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถสรุปผลที่แน่ชัด

FEASIBILITY STUDY ON SURFACE EXPRESSION OF  
ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE USING CYANOBACTERIAL SomA  
SYSTEM

CHUTIRAT ASSAWATHEP 4737244 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETICS ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: WIPA CHUNGJATUPORNCHAI, Ph.D.,  
KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., APINUNT UDOMKIT, Ph.D.

ABSTRACT

Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms is becoming increasingly used in various applications in microbiology and biotechnology. The current knowledge concerning the surface display of cyanobacteria is still limited. Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes that have become hosts of interest for expression of heterologous genes with low cost production. The activated cyanobacteria-reactor has been recognized as an economical method for treating both domestic and industrial wastewater. Organophosphorus (OP) compounds are neurotoxic chemicals and used extensively as pesticides. Organophosphorus hydrolase (OPH) encoded from *opd* gene of *Flavobacterium* sp. ATCC27551 has been shown to detoxify OP effectively. Therefore, expression of OPH on the cyanobacterial surface could be an alternative for detoxification of OP. In this study, SomA (*Synechococcus* outer membrane), a porin in the outer membrane, was used as an anchoring motif for expression of OPH on the surface of unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. The *somA* gene of *Synechococcus* PCC7942 was cloned. The *somA-opd* gene cassette encoding the truncated SomA protein fused in frame with OPH was constructed. The shuttle plasmids pKT-Psom-opd and pKT-Tsom-opd containing *somA-opd* gene cassette under the control of *somA* promoter and tRNA<sup>pro</sup> promoter, respectively, were transformed into *Synechococcus* PCC7942. Results showed that the OPH activity of freeze-thaw whole cells harboring pKT-Psom-opd ( $6.26 \pm 0.34 \mu\text{M}/\text{min}/\text{OD}_{730}$ ) was 5-fold higher than that of cells harboring pKT-Tsom-opd ( $1.09 \pm 0.14 \mu\text{M}/\text{min}/\text{OD}_{730}$ ). Thus, the *somA* promoter is stronger than tRNA<sup>pro</sup> promoter. The surface location of OPH was investigated using proteinase K accessibility assay. The results were not conclusive.

KEY WORDS: CYANOBACTERIA/ *SYNECHOCOCCUS* PCC7942/  
SURFACE EXPRESSION/  
ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE/ *somA* GENE

103 pp.