LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

4 FEB 1993

CLONING OF SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE (SHMT) FROM *PLASMODIUM FALCIPARUM* AND *PLASMODIUM CHABAUDI*

AUNCHANA MAHUNTAPIBAL

หนังสือทางวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1992

Copyright by Mahidol University

21188

ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลนเอ็นไซม์เซอรีนไฮดรอกซีเมทิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium falciparum* และ *Plasmodium chabaudi*)

ผู้วิจัย อัญชนา มหันตาภิบาล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ,Ph.D.

วรชาติ สิรวราภรณ์ ,Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 5 พฤศจิกายน พ.ศ.2535

บทคัดย่อ

เอนไซม์ เซอรีนไฮดรอกซีเมทิลทรานสเฟอเรส (SHMT) เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีเมตาบอลิซึมของกรดฟอริกของเชื้อพลาสโมเดียม เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ได้ถูกนำมาใช้เพิ่มชิ้นดีเอนเอบางส่วนของยีนของเอนไซม์ SHMT นี้ จากเชื้อพลาสโมเดียมในคน (*P.falciparum*) และในหนู (*P.chabaudi*) ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ทำ PCR ได้ถูกออกแบบและสร้างขึ้นโดยมีพื้นฐานจากส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบางช่วงของเอนไซม์ SHMT ของเชื้ออีโคไล (*E.coli*) และเอนไซม์จากส่วนไมโตคอนเดรียและไซโตซอลของตับของกระต่าย ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีน SHMT จากเชื้อพลาสโมเดียมในคนและในหนูที่มีขนาดประมาณ 500,400 และ 900 คู่เบส ได้ถูกนำมาเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคทาง PCR แต่ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 500 คู่เบสเท่านั้นที่สามารถถูกเพิ่มจำนวนได้ และได้ถูกนำมาโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหนะ (pBluescript SK$^+$ vector) เพื่อนำไปหาลำดับเบส ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคทาง PCR ของเชื้อพลาสโมเดียมทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีขนาด 519 คู่เบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูง (ประมาณ 80 %) และยังคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีน SHMT ใน *E.coli* (ประมาณ 65 %), *Salmonella typhimurium* (ประมาณ 60 %) และ *Bradyrhizobium japonicum* (ประมาณ 54 %) นอกจากนี้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส ยังสามารถพบได้จากเทคนิคทาง PCR ในหนู

Copyright by Mahidol University

และพบได้จากเทคนิคทาง PCR ในเชื้อพลาสโมเดียมของหนู (เนื่องจากมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของหนูในดีเอ็นเอของเชื้อพลาสโมเดียมในหนู) ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอของหนูซึ่งมีขนาด 540 คู่เบส มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของเชื้อพลาสโมเดียมทั้ง 2 ประมาณ 49 % และคล้ายคลึงกับลำดับเบสจากยีน SHMT ของแบคทีเรียทั้ง 3 แหล่ง ประมาณ 40 %

นอกจากนี้ลำดับเบสทั้งหมดของดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคทาง PCR ได้ถูกนำมาเปลี่ยนเป็นลำดับของกรดอะมิโน เพื่อเปรียบเทียบกัน และเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนจาก 5 แหล่ง พบว่า ลำดับกรดอะมิโนจากเชื้อพลาสโมเดียมทั้ง 2 ชนิด มีความคล้ายกันสูง (ประมาณ 90 %) และคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (ประมาณ 65 %) มากกว่าลำดับกรดอะมิโนจากหนู (ประมาณ 38 %) และจากไซโตซอลและไมโตคอนเดรียจากตับของกระต่าย (ประมาณ 47 %) ส่วนลำดับกรดอะมิโนจากหนูมีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของ SHMT จากตับของกระต่ายทั้ง 2 แหล่ง (ประมาณ 53 %) มากกว่าลำดับกรดอะมิโนจาก SHMT ของแบคทีเรียทั้ง 3 แหล่ง (ประมาณ 40 %) ดังนั้นจากความคล้ายคลึงดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR เป็นชิ้นส่วนของยีน SHMT และชิ้นส่วนของยีน SHMT จากเชื้อพลาสโมเดียมทั้ง 2 แหล่งมีความคล้ายคลึงกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากยีน SHMT ของแบคทีเรียมากกว่าของหนูและกระต่าย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Cloning of Serine Hydroxymethyltransferase (SHMT) from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium chabaudi*

Name Aunchana Mahuntapibal

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Yongyuth Yuthavong ,Ph.D.

Worachart Sirawaraporn ,Ph.D.

Date of Graduation 5 November B.E. 2535 (1992)

Abstract

The gene of serine hydroxymethyltransferase (SHMT) is studied in parasites since the SHMT is an important enzyme in *Plasmodium* metabolism. In order to clone SHMT gene from *P.falciparum* and *P.chabaudi*, polymerase chain reaction (PCR) technique has been used,employing degenerate primers. The degenerate PCR primers used in the reaction were designed and synthesized based on the highly conserved of amino acid sequences of SHMT from *E.coli*, rabbit liver cytosol and rabbit liver mitochondria.

Three parts of the SHMT gene, about 500,400 and 900 bp in length were amplified by PCR technique but only the 500 bp PCR product could be found in both parasites. After both PCR products were cloned into pBluescript SK^+ vector and sequenced by double strand sequencing method, their nucleotide sequences showed 516 bp and had high sequence identity with each other (about 80 %) and with the corresponding nucleotide sequences from *glyA* gene of *E.coli* (about 65 %), *Salmonella typhimurium* (about 60 %) and *Bradyrhizobium*

Copyright by Mahidol University

japonicum (about 54 %). In addition,the 500 bp mice PCR product could be found in the mouse DNA, and due to the host DNA contamination in *P.chabaudi* DNA, the product was also found in *P.chabaudi* DNA. The nucleotide sequence of mouse PCR product contained 540 bp and showed sequence identity with the 2 parasite sequences (about 49 %) and the 3 bacterial sequences (about 44 %).

Moreover, the amino acid sequences proposed from 3 sources of PCR products were compared with one another and with the deduced amino acid sequences from the 3 bacterial *glyA* genes and from the rabbit liver cytosol and rabbit liver mitochondria. The two parasite sequences showed high sequence identity with one another (about 90 %) and with the three bacterial SHMT sequences (about 65 %). However, they both showed less sequence identity with mouse sequence (about 38 %) and with the two rabbit liver isoenzyme sequences (about 47 %). The mouse sequence had higher sequence identity with the two rabbit liver sequences (about 53 %) than the three bacterial sequences (about 40 %). All of the similarity mentioned above showed that the PCR products from 2 parasites and mice may be a part of SHMT gene. The parasite SHMT genes were more similar with bacterial SHMT genes than the mammalian SHMT genes.

Copyright by Mahidol University