20 SEP 1999

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE cDNA ENCODING RICE DNA METHYLTRANSFERASE

NOPMANEE WIRIYAWUTIKORN

With compliments
of
มหาวิทยาลัย มหิดล

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

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1999

ISBN 974-662-311-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
N891C
1999

042874 c.2

3936481SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : DNA METHYLATION / DNA METHYLTRANSFERASE / RICE (*Oryza sativa)*

NOPMANEE WIRIYAWUTIKORN : CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE cDNA ENCODING RICE DNA METHYLTRANSFERASE. THESIS ADVISORS : JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc., SKORN MONGKOLSUK, Ph.D., KANYARATT SUPAIBULWATANA, Ph.D. 202 p. ISBN 974-662-311-7

DNA methylation is a specific post-replicative modification of DNA. The methylated DNA is found in diverse organisms. Especially in higher eukaryotes, it has been implicated in the regulation of a number of cellular processes in both vertebrates and plants. The most abundant modified base in DNA of higher eukaryotes is 5-methylcytosine. The level of methylated cytosine in plants can be as high as 30% of total cytosine residues. This important phenomenon is catalyzed by C-5 cytosine methyltransferase (C-5 DNA MTase). We have attempted to isolate and characterize the cDNA encoding this enzyme from rice (*Oryza sativa* ssp. *indica* cv. RD 23), a monocotyledonous plant. C-5 DNA MTase activity was previously reported by our laboratory to be greatest at 10 days in shoots of rice seedlings. The cDNA library was prepared from shoots of 10-day-old seedlings using λ ZAP II. The degenerated primers were designed in the conserved regions of C-5 DNA MTase from *Arabidopsis thaliana*, and PCR was performed using rice cDNA as template. The 274 bp-PCR product was used as a probe to screen for the full length cDNA clone. Three positive clones were excised from λ ZAP II and further sequenced. One putative clone, named pRM1, showed the sequence homology to eukaryotic C-5 DNA MTase cDNA. The 4,985 bp assembled nucleic acid sequence contains an open reading frame of 4,503 bp encoding a protein of 1,501 amino acids, with molecular weight of 167 kDa. Like other eukaryotic C-5 DNA MTases, the inferred protein of rice C-5 DNA MTase has a presumed regulatory N-terminal region linked to a catalytic C-terminal domain by Lysine-Glycine linker. The C-terminal domain has eight conserved motifs found in other C-5 DNA MTase. Using the pRM1 as a probe, we identified a transcript of 4.98 kb. Southern blot analysis of rice genomic DNA with the above probe indicated the presence of a single gene. Northern blot analysis was performed to study the expression of C-5 DNA MTase in rice. The transcripts of C-5 DNA MTase gene was found to be developmental specific and tissue specific. The knowledge gained about the molecular basis of DNA methyltransferase will allow further study of the function and regulation of this gene in rice.

Copyright by Mahidol University

3936481 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

นพมณี วิริยะวุฒิกรณ์ : การโคลนและการศึกษาคุณสมบัติของคอมพลิเมนทารี ดีเอ็นเอ ของดีเอ็นเอ เมทิลทรานสเฟอเรส ในข้าว (CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE cDNA ENCODING RICE DNA METHYLTRANSFERASE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จรัญญา ณรงคะชวนะ D.Agr.Sc., ศกรณ์ มงคลสุข Ph.D., กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน Ph.D. 202 หน้า. ISBN 974-662-311-7

ดีเอ็นเอ เมทิลเลชั่น เป็นกระบวนการหนึ่งซึ่งควบคุมการทำงานและการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเซลล์เดียวที่ไม่ซับซ้อน จนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชจะพบระดับของเมทิเลชั่นที่เบสไซโตซีน (cytosine) สูงถึง 30% ของเบสไซโตซีนทั้งหมดในสายดีเอ็นเอ ซึ่งกลไกที่สำคัญนี้เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA MTase) ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาบทบาทต่างๆของดีเอนเอเมทิลเลชั่นในพืชกันมากขึ้นแต่ยังไม่ขยายในวงกว้างนักเมื่อเปรียบเทียบกับในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์สัตว์ ในแง่ของเอนไซม์ในกระบวนการนี้ในพืชก็ยังมีการศึกษาน้อยมาก ในงานวิจัยนี้ได้ทำการ โคลน และศึกษาคุณสมบัติของ cDNA ของ C-5 cytosine-methyltransferase (C-5 DNA MTase) จากข้าวสายพันธุ์ *indica* พันธุ์ กข 23 โดยงานวิจัยนี้เริ่มจากการเตรียม cDNA library จากส่วนยอดของข้าวที่มีอายุการงอก 10 วัน ซึ่งพบว่ามี specific activity ของเอนไซม์สูงกว่าในรากข้าว และสูงกว่าในช่วงอื่นๆของการเจริญเติบโต ได้ทำการออกแบบ primer ที่จำเพาะกับ conserved region ของ C-5 DNA MTase gene ของ *Arabidopsis thaliana* แล้วใช้วิธี PCR เพื่อ amplify conserved region ในข้าว เพื่อใช้เป็น probe ในการแยก full length clone ของ C-5 DNA MTase gene ใน cDNA library ของข้าว จากการทดลองพบว่า C-5 DNA MTase cDNA ที่ clone ได้ประกอบด้วย 4,985 nucleotides โดยมีเพียง 4,503 nucleotides ที่แปลรหัสสร้างโปรตีน 1,501 amino acids และมีน้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 167 kDa ลำดับ amino acid มีความเหมือนกับ C-5 DNA MTase ของ eukaryote ชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบ N-terminal domain เชื่อมอยู่กับ C-terminal domain ด้วยไลซีน-ไกลซีน linker โดยใน C-terminal domain มี 8 conserved sequences จากการวิเคราะห์โดย Southern blot พบว่า gene นี้น่าจะมี 1 copy ใน genomic DNA ของข้าวและ พบว่า gene นี้จะแสดงออกมากที่สุดในส่วนยอดที่อายุ 10 วัน โดย transcript ที่พบมีขนาด 4.98 kb ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ gene นี้เป็น developmental specific และ tissue specific ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จะทำให้สามารถศึกษาต่อเนื่องทำให้เกิดความเข้าใจถึงบทบาทการทำงานของเอ็นไซม์ C-5 DNA MTase และการควบคุมกลไกดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในพืชและยังนำไปสู่การพัฒนางานวิจัยที่กลไกนี้เข้าไปเกี่ยวข้อง

Copyright by Mahidol University