หนังสือภาษาอังกฤษ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ

การโคลนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแอนทรานิเลทซินเทสชนิดแอลฟ่าในต้นกระท่อม

Cloning and expression profile analysis of anthranilate synthase α subunit gene in *Mitragyna speciosa*

ผู้วิจัย

รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554-2555

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กันยายน 2555

สัญญาเลขที่ PHA540039S

ชื่อโครงการ: การโคลนและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแอนทรานิเลทซินเทสชนิดแอลฟ่าในต้นกระท่อม

บทคัดย่อ

เอนไซม์ anthranilate synthase (AS) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน chorismate เป็น anthranilate ในชีวสังเคราะห์ของ tryptophan และเป็นเอนไซม์ที่กำหนดอัตราของชีวสังเคราะห์ tryptophan โดย anthranilate ที่ได้จะถูกป้อนสู่ชีวสังเคราะห์ของ TIA ในฐานะสารตั้งต้น สำหรับการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีวสังเคราะห์ในขั้นแรกๆ ของสารมัยตรากัยนีน จึงมีเป้าหมายเพื่อโคลนและศึกษาคุณลักษณะของยีน *AS* จากใบกระท่อม อาศัยเทคนิค Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) ผลการทดลองพบว่ายีน *MSASA* ปรากฏ 2 รูปแบบ คือ *MSASA1* และ *MSASA2* ข้อมูลที่ได้จาก cDNA พบว่ายีน *MSASA1* และ *MSASA2* มีส่วน open reading frame (ORF) ขนาด 1,851 คู่เบส และ 1,728 คู่เบส และถอดรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ จำนวน 616 และ 575 หน่วยอะมิโน ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สายกรดอะมิโนพบว่า NH_2-termini ของ MSASA1 และ MSASA2 ประกอบด้วย chloroplast transit peptide จำนวน 69 และ 36 หน่วยอะมิโน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับความเหมือน (identity) ระหว่างกลุ่มเอนไซม์ AS α-subunit (ASA) พบว่า MSASA มีค่าความเหมือนระหว่าง 67-85% กับ ASA จากพืชอื่นๆ

การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน MSASA1 สายเต็ม ใน *E. coli* ทำได้โดยการสร้างเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pQE30-Xa-FMSASA1 และเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วยสาร isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์ recombinant AS α-subunit isoform 1 มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Ni-NTA และ Sephacryl S-100 ตามลำดับ มวลโมเลกุลที่ปรากฏบน SDS-PAGE พบว่า recombinant AS α-subunit isoform 1 มีขนาดประมาณ 68 กิโลดาลตัน และมวลโมเลกุลที่ปรากฏบน Sephacryl S-400 มีขนาดประมาณ 550 กิโลดาลตัน การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ โดยวัดการทำงานของเอนไซม์ recombinant AS α-subunit isoform 1 ในปฏิกิริยาที่ขึ้นกับแอมโมเนีย โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 4 และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่า K_m ของ chorismate และ NH_4Cl มีค่าเท่ากับ 144 ไมโครโมลาร์ และ 125 ไมโครโมลาร์ และค่า V_{max} ของ chorismate และ NH_4Cl เท่ากับ 0.46 พิโคเคทาลต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 0.87 พิโคเคทาลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สำหรับการศึกษาผลการยับยั้งแบบย้อนกลับโดย L-tryptophan พบว่าการทำงานของเอนไซม์ recombinant AS α-subunit isoform 1 ถูกยับยั้งได้ด้วย L-tryptophan แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ chorismate ในปฏิกิริยา กลับพบว่ามีผลทำให้ L-tryptophan ยับยั้งเอนไซม์ได้น้อยลง ผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีผลต่อการควบคุมแบบย้อนกลับโดย L-tryptophan

Grant No. PHA540039S

Project Title: Cloning and expression profile analysis of anthranilate synthase α subunit gene in *Mitragyna speciosa*

Abstract

Anthranilate synthase (AS) catalyzing the conversion of chorismate to anthranilate has been shown to be a rate-limiting step enzyme in the biosynthesis of tryptophan which is the supplied as precursor of the biosynthesis of TIA compounds. In the present study, we focused on the early step of mitragynine biosynthesis and aimed to clone and characterize the anthranilate synthase alpha-subunit from *M. speciosa* leaves. Using Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) technique, we obtained two homologous genes of AS α-subunit of *M. speciosa* (*MSASA*), designated as *MSASA1* and *MSASA2*. The cDNAs of *MSASA* genes contained the open reading frame (ORF) of 1,851 bp and 1,728 bp, encoding 616 and 575 amino acid residues for MSASA1 and MSASA2, respectively. The ChloroP prediction indicated that the NH_2-termini of MSASAs carried the chloroplast transit peptide and showed the cleavage site at amino acid position 69 and 36 for MSASA1 and MSASA2, respectively. Multiple alignments of the MSASA1 and MSASA2 with other plants illustrated the sequence identity of of 67-85%.

Heterologous expression of the full-length MSASA1 in *E. coli* was subsequently performed. The recombinant AS α-subunit isoform 1 was obtained by inducing the *E. coli* cells harboring pQE30-Xa-FMSASA1 with 0.1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 30°C for 5 h. The recombinant AS α-subunit isoform 1 was purified to homogeneity using Ni-NTA affinity column and Sephacryl S-100 gel filtration. SDS-PAGE showed that the recombinant AS α-subunit isoform 1 has an apparent molecular weight about 68 kDa. The native molecular weight was estimated to 550 kDa on Sephacryl S-400 gel filtration column. Kinetic study of the recombinant AS α-subunit isoform 1 in ammonia-dependent AS activity was analyzed by high performance liquid chromatography. The results indicated that its optimum pH and temperature was 9 and 45 °C, respectively. The K_m, and V_{max} values for chorismate and NH_4Cl were 144 μM and 125 μM, and 0.46 pkat.mg^{-1} and 0.87 pkat.mg^{-1}, respectively. The feedback inhibition revealed that recombinant AS α-subunit isoform 1 was inhibited by L-tryptophan. However, when the concentration of chorismate was increased, the inhibition effect of L-tryptophan on feedback reaction was decreased. These results may imply that the substrate concentration is influential in the feedback inhibition by L-tryptophan.