

การตรวจหายีนของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสโดยตัวติดตาม
ชนิดโอดีโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์

นาย สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-072-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**DETECTION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE
GENE BY SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES**



Mr. Surasak Laloknam

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry**

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-639-072-4

สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ: การตรวจหาชิ้นของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสโดย
ตัวติดตามชนิดโอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ (Detection of Cyclodextrin
Glycosyltransferase Gene by Synthetic Oligonucleotide Probes),

อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์,

อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 152 หน้า. ISBN 974-639-072-4

ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจากเชื้อ *Bacillus* sp. A11 ผ่านการทำให้
บริสุทธิ์โดยการดูดซับด้วยแป้ง ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 40-80
เปอร์เซ็นต์ และโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ คีออีเอ-เซลดูโลส มีแอกติวิตีจำเพาะ 5,000 หน่วย/มิลลิกรัม
โปรตีน มีความบริสุทธิ์ 44.8 เท่า และให้ผลผลิต 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และ
แอกติวิตีของเอนไซม์ด้วยพอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่เสียดสภาพ พบว่าเอนไซม์
บริสุทธิ์ให้แถบโปรตีนตรงกับแถบอะไมโลไลติกแอกติวิตี และ CD-forming แอกติวิตี 2 แถบ คือ แถบ
เข้มและแถบจาง และพบโปรตีนแถบสำคัญแถบเดียวในระบบเจลที่มีไซเคียมโคเคซิลซัลเฟต เมื่อนำ
เอนไซม์บริสุทธิ์ไปหาค่าประกอบของกรดอะมิโนพบว่ามีการอะมิโนประเภทโพลาร์ประมาณ
60 โมลเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิด acidic อันได้แก่ กรดแอสพาทิก แอสพาราจีน กรดกลูตามิก
และ กลูตามีน ในปริมาณสูง (ประมาณ 25 โมลเปอร์เซ็นต์) จากนั้นได้หาลำดับกรดอะมิโนที่ด้านปลาย
อะมิโน 20 ตัวแรก พบว่าเป็น ala, pro, asp, thr, ser, asn, tyr, asn, lys, glu, asn, phe, arg, tyr, asp, val,
ile, gln, และ ile ตามลำดับ การออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 17 เบส 2 สาย จากการเปลี่ยน
รหัสลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนที่หาได้ส่วนทางด้านปลายคาร์บอกซิล มาจากการเปรียบ
เทียบกรดอะมิโนของ CGTase จาก *Bacillus* sp.A11 กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ผลิต CGTase ให้ชื่อว่า
PNB 5' HO-GTA(C/T)TATGATGTCAGCG-OH 3' และ PCC 5' HO-
CAACAAGCA(G/C)AATTTCC-OH 3' ตามลำดับ แล้วทำการติดฉลากด้วย [γ - 32 P] ที่ปลาย 5' [PO_4]³⁻
ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์แล้วใช้เป็นตัวติดตามยีน CGTase ซึ่งเตรียมโดยการนำดีเอ็นเอของโครโมโซม
จาก *Bacillus* sp.A11 ที่ย่อยด้วยเรสติกชันเอนไซม์ *Sau* 3AI แบบไม่สมบูรณ์มาเชื่อมกับตำแหน่ง *Bam*HI
บนเวกเตอร์ pUC18 แล้วเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน *E. coli* strain DH5 α
โดยการติดตามด้วยวิธีโคโลนีไฮบริโดเซชัน วิธีติดตามแอกติวิตีในการย่อยแป้งแล้วเกิด clear zone และ
ติดตามแอกติวิตีในหลอดทดลองด้วยวิธี Dextrinizing activity, Phenol red inclusion complex test
(PICT) และ CD- trichloroethylene assay พบว่ามี 5 ทรานสเฟอร์แมนท์ที่สามารถผลิต CGTase
โดย ทรานสเฟอร์แมนท์ 909 แสดงแอกติวิตีสูงที่สุดแต่ต่ำกว่า *Bacillus* sp.A11 ดังนั้นจึงทำการศึกษา
แหล่งที่ให้ Dextrinizing activity พบว่าที่บริเวณนอกเซลล์ periplasmic space และ ตะกอนเซลล์มี
แอกติวิตี 87.5, 11.7 และ 1.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs
ด้วย HPLC พบว่า CGTase ของทรานสเฟอร์แมนท์ 909 ให้อัตราส่วน α -: β -: γ -CD เป็น
1: 4.6: 1.6 และแสดงสมบัติเหมือน CGTase ของ *Bacillus* sp. A11 เมื่อตรวจสอบด้วย
พอลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ภาควิชาชีวเคมี.....
สาขาวิชาชีวเคมี.....
ปีการศึกษา2540.....

ลายมือชื่อนิสิต สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
.....

#C726182
KEY WORD

: MAJOR BIOCHEMISTRY

SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDE PROBE/ CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE
SURASAK LALOKNAM: DETECTION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE
GENE BY SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDE PROBES,
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D.,
THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. VICHIEEN RIMPHANITCHAYAKIT, Ph.D.,
152 pp. ISBN 974-639-072-4

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus* sp.A11 was purified approximately 44.8 folds with a 30 % yield and specific activity of 5,000 units/mg protein by corn starch adsorption, ammonium sulfate precipitation, and DEAE-cellulose column chromatography. Detection on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme revealed a major and minor bands which corresponded to those of amylolytic and CD-forming activities. The intense protein band was found when sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis was performed. When the purified enzyme was determined for its amino acid composition, 60 mol% of content was polar amino acids: aspartic acid, asparagine, glutamic acid, and glutamine was rather high (25 mol%). The amino acid sequence of 20 residues at N-terminal was determined to be ala, pro, asp, thr, ser, asn, tyr, asn, lys, glu, asn, phe, arg, tyr, asp, val, ile, gln, and ile, respectively. The two oligonucleotides containing 17 bases were designed by deducing the N- and C-terminal amino acid sequences, and named PNB 5' HO-GTA(C/T)TATGATGTCAGCG-OH 3' and PCC 5' HO-CAACAAGCA(G/C)AATTTCC-OH 3', respectively. Both synthetic oligonucleotides were labeled at 5' end with [γ -³²P] and used as probe for the first screening of CGTase by colony hybridization. Partially *Sau3AI*-digested chromosomal DNA from *Bacillus* sp.A11 was ligated to *Bam*HI-digested pUC18 and transformed into *E. coli* strain DH5 α . Five CGTase-producing transformants were screened and isolated by colony hybridization, starch hydrolysis and clear zone detection, dextrinizing activity, phenol red inclusion complex test, and CD-trichloroethylene assay. Transformant 909 showed the highest activity but lower activity than *Bacillus* sp.A11. Localization of CGTase in transformant 909 was determined and 87.5%, 11.2%, and 1.3% of dextrinizing activity were found in extracellular enzyme, periplasmic space, and cell pellet, respectively. HPLC analysis of products showed that ratio of α -: β -: γ -CD was 1:4.6:1.6. Crude CGTase of transformant 909 showed the same electrophoretic patterns as that of *Bacillus* sp.A11 when analyzed by non-denaturing and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....

ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....*สุวิภาณี น.ศ.ศก.น.ว.*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*สุวิภาณี น.ศ.ศก.น.ว.*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*สุวิภาณี น.ศ.ศก.น.ว.*.....



ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor and co-advisor, Associate Professor Piamsook Pongsawasdi and Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Dr. Tipaporn Limpaseni, Dr. Pairoh Pinphanichakarn, and Dr. Rath Pichyangkura for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

This work was partially supported by research grant from Office of Atomic Energy for Peace, Ministry of Science, Technology and Environment and from the Graduate School, Chulalongkorn University.

Sincere thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in Laboratory and discussion with sincerity and friendships. Special thanks are also extended to Pee Toom, Pee Mong, Pee Nok, Pee Prem, Pee Bee, Pee Baew, Pee Ju, Pee Oy, Deer, Jeab, Rung, Neng, Na, and Ju for their kindness, willpower and suggestions.

My appreciation is also to Boonprakobkul family for help in the computer equipments and kindness.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my father, my mother, my family and my good brother Mr. Sompong Jaideechoey for their unlimited love, understanding and encouragement.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATION.....	xvi
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II MATERIALS AND METHODS	28
2.1 Equipments	28
2.2 Chemicals.....	30
2.3 Enzyme and Restriction enzyme	31
2.4 Bacteria	31
2.5 Media Preparation.....	32
2.6 Cultivation of Bacteria.....	33
2.7 Enzyme assay.....	33
2.8 Protein Determination.....	34
2.9 Purification of CGTase	35
2.10 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)	37
2.11 Amino acid analysis.....	37
2.12 Determination of N-terminal Amino Acid Sequence....	38
2.13 Oligonucleotide Design and Synthesis.....	39

	Page
2.14 Labeling of Synthetic Oligonucleotide Probe with [γ - ³² P]	40
2.15 Purification of Labeled Synthetic Oligonucleotide Probes.....	40
2.16 Extraction and Purification of Chromosomal DNA from <i>Bacillus</i> sp.A11	40
2.17 Large Scale Preparation of Plasmid by Rapid Alkaline Extraction.....	42
2.18 DNA Digestion by Restriction Enzymes.....	43
2.19 Agarose Gel Electrophoresis	43
2.20 DNA Cloning	44
2.21 Ligation	45
2.22 Transformation.....	45
2.23 Colony Hybridization	46
2.24 Detection of CGTase gene.....	48
2.25 Determination of size and restriction sites of recombinant colonies	50
2.26 DNA sequencing.....	51
III RESULTS.....	53
Purification of CGTase	53
Amino acid composition of CGTase	60
N-terminal amino acid sequence of CGTase.....	60
Oligonucleotide design and synthesis	66
DNA extraction and preparation of <i>Bacillus</i> sp.A11 for cloning.....	84

	Page
Library construction and screening	86
Screening of transformants containing the CGTase activity....	86
Amylolytic activity	86
Dextrinizing activity	90
Phenol red inclusion complex test (PICT).....	90
CD-TCE assay	93
Detection of CGTase activity in recombinant colonies.....	93
Analysis of CD by HPLC	96
Analysis of CGTase enzyme from transformant 909 by native-PAGE and SDS-PAGE.....	99
IV DISCUSSION.....	101
V CONCLUSION.....	116
REFERENCES	118
APPENDICES	133
APPENDIX A.....	134
APPENDIX B.....	135
APPENDIX C.....	139
APPENDIX D.....	140
APPENDIX E.....	141
APPENDIX F	143
APPENDIX G.....	144
APPENDIX H.....	145
APPENDIX I.....	146
APPENDIX J.....	147
APPENDIX K.....	148

	Page
APPENDIX L.....	149
APPENDIX M.....	150
APPENDIX N.....	151
BIOGRAPHY.....	152



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1 Characteristics of cyclodextrins.....	3
2 Industrial applications of cyclodextrins.....	9
3 The uses of cyclodextrins in Japan during 1984-1987	11
4 Summarization of CGTase mechanisms.....	13
5 Relationship between length of substrate and mechanism of CGTase.....	13
6 Properties of cyclodextrin glycosyltransferases.....	16
7 CGTase-producing bacteria.....	18
8 Amino acid compositions of CGTases from <i>Bacillus</i> strains	20
9 Comparison of 20 amino acid sequences at the N-terminal of CGTases from various bacterial strains	21
10 Molecular cloning of CGTase genes	24
11 Purification table of CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11	58
12 Amino acid composition of CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11	65
13 Dextrinizing activity of wild type and transformants	91
14 CD-TCE assay of wild type and transformant cells.....	94
15 Dextrinizing activity in various locations of cells	95
16 The specific activity of different pools from DEAE- cellulose column chromatography.....	103
17 Amino acid composition of CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11 and other microorganisms.....	106
18 Comparison of 20 amino acid sequences at the N-terminal of CGTase of <i>Bacillus</i> sp.A11 and of other strains	108

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Structure and molecular dimension of cyclodextrins (CDs).....	2
2 Structure of β -cyclodextrin.....	4
3 Inclusion complex formation between CDs and variable guest leading to modification of guest physical and chemical properties.....	6
4 Guest orientation in CD-guest complex	7
5 Model of CGTase mechanism from <i>Bacillus oxytoca</i> M5a1	15
6 Restriction map of CGTase genes from some CGTase producing bacteria.....	25
7 Profile of DEAE-cellulose column chromatography of CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11 at pH 8.5	54
8 Non-denaturing PAGE of fractions obtained from DEAE-cellulose column chromatography.....	55
9 SDS-PAGE of fractions obtained from DEAE-cellulose column chromatography	57
10 Non-denaturing PAGE of CGTase from different steps of purification	59
11 SDS-PAGE of CGTase from different steps of purification.....	61
12 Standard curve of molecular weight and relative mobility from SDS-PAGE technique	62
13 Chromatograms of various amino acid standards from Amino acid analyzer.....	63

Figure	Page
14 Chromatograms of amino acid composition of CGTase from amino acid analyzer	64
15 Analysis of CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11 after electroblotting onto PVDF membrane.....	67
16a Chromatogram of blank condition obtained from PTH-C18 reverse phase cartridge column.....	68
16b Chromatogram of amino acid standards obtained from PTH-C18 reverse phase cartridge column.....	69
16c Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle1, (b) cycle2.....	70
16d Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle3, (b) cycle4.....	71
16e Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle5,(b) cycle6.....	72
16f Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle7,(b) cycle8.....	73
16g Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle9,(b) cycle10.....	74

Figure	Page
16h Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle11,(b) cycle12.....	75
16i Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTasefrom PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle13, (b) cycle14.....	76
16j Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTasefrom PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle15, (b) cycle16.....	77
16k Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle17, (b) cycle18.....	78
16l Chromatogram of N-terminal amino acid of purified CGTase from PTH-C18 reverse phase cartridge column (a) cycle19, (b) cycle20.....	79
17 Comparison of 20 residues of N-terminal amino acid sequence of CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11 with whole amino acid sequence of CGTases from other bacterial strains	81
18 N-terminal amino acid sequences of CGTases from <i>Bacillus</i> sp.A11.....	82
19 C-terminal amino acid sequences of CGTases from <i>Bacillus</i> sp.A11.....	83

Figure	Page
20 Analysis of partially digested chromosomal DNA from <i>Bacillus</i> sp.A11 with <i>Sau</i> 3AI on 1.0% agarose gel electrophoresis	85
21 Examples of colonies with strong hybridization signal from colony hybridization screening with the ³² P labeled PNB oligonucleotide probes	87
22 Examples of colonies with strong hybridization signal from colony hybridization screening with the ³² P labeled PCC oligonucleotide probes	88
23 Examples of transformants having amylolytic activity on LB-starch agar plate compared with DH5α containing pUC18	89
24 Detection of CGTase activity by PICT	92
25 HPLC chromatograms	97
26 HPLC chromatograms	98
27 PAGE of crude and purified CGTase from <i>Bacillus</i> sp.A11, crude enzyme from transformant 909 and crude extracts of DH5α5 and DH5α5 containing pUC18	100

ABBREVIATION

A	Absorbance
bp	Base pair
cm	Centimetre
°C	Degree celcius
dATP	Deoxyadenosine 5'triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5'triphosphate
dGTP	Deoxyguanine 5'triphosphate
dTTP	Deoxythymidine 5'triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
hr	Hour
kb	Kilobase
l	litre
M	Molar
μCi	Microcurie
μg	Microgram
μl	Microlitre
mg	Milligram
ng	nanogram
min	Minute
rpm	Revolution per minute