


การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และการโคลนยีนฟีนอลอะลานีนดีไฮโดรจิเนส  
จากแบคทีเรียทนร้อน *Bacillus badius* BC1



นางสาวจิตติมา เจริญพานิช

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0512-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**NUCLEOTIDE SEQUENCING AND CLONING OF  
THE PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM  
THERMOTOLERANT *Bacillus badius* BC1**



**Miss Jittima Chareonpanich**

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

**Department of Biochemistry**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2001**

**ISBN 974-17-0512-3**

Thesis Title            Nucleotide sequencing and cloning of the phenylalanine  
                                 dehydrogenase gene from thermotolerant *Bacillusadius* BC1  
By                            Miss Jittima Chareonpanich  
Field of Study            Biochemistry  
Thesis Advisor           Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.  
Thesis Co-advisor       Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.

---

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

..... *Pipat Karntiang* ..... Deputy Dean for Administrative Affairs,  
Acting Dean, Faculty of Science  
( Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

..... *P. Pongsawasdi* ..... Chairman  
( Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... *Kanoktip Packdibamrung* ..... Thesis Advisor  
( Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

..... *Siriporn Sittipraneed* ..... Thesis Co-advisor  
( Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D. )

..... *Pairoh Pinphanichakarn* ..... Member  
( Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D. )

..... *Rath Pichyangkura* ..... Member  
( Rath Pichyangkura, Ph.D. )

จิตติมา เจริญพานิช : การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และการโคลนยีนฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสจาก  
แบคทีเรียทนร้อน *Bacillus badius* BC1 (NUCLEOTIDE SEQUENCING AND CLONING OF THE  
PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM THERMOTOLERANT *Bacillus badius* BC1)  
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ศิริพร สิริประณีต, 166 หน้า,  
ISBN 974-17-0512-3

ฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนส (EC 1.4.1.20) เร่งปฏิกิริยาการดึงหมู่อะมิโนจากแอล-ฟีนิลอะลานินให้  
ผลิตภัณฑ์คือแอมโมเนีย ฟินิลไพรูเวท และ NADH ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้และต้องการ NAD<sup>+</sup> เป็นโคเอนไซม์  
จากปฏิกิริยาดังกล่าวจึงได้มีการนำเอนไซม์นี้มาใช้ในการสังเคราะห์แอล-ฟีนิลอะลานินซึ่งเป็นสารต้นตอในการผลิต  
สารให้ความหวานแอสพาเทม รวมทั้งนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคนี้โคโนทาไลโซเปอร์ฟีนิลอะลานินเมีย และ  
ฟีนิลคีโตนิวเรียอีกด้วย จากการจำแนกแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ BC1 ที่มีแอกติวิตีของฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนส  
สูง โดยใช้สมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งลำดับเบสบริเวณอนุรักษ์ของ 16S rRNA พบว่าเป็น  
*Bacillus badius* นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลายอะมิโนคือ TSIKDFTLFEKMSEHEQV  
VFANDPATGLR และส่วนภายในของสายโปรตีนคือ GMTYKXAASDVDFGGGKAVIIGDPQKDKSPELFRAFG  
QFVDSLGGRFYTGTDMGTMEDFIHAMK, ATNK, DDLGGVTYAIQGLGKVGKVAEGLLEEGAHLFVT,  
AIAGSANNQLLTEDHGRHLADK, ERVLAK, และ WDIRN จากผลการทดลองนี้ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการ  
ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนในของฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งใช้โครโมโซมอล  
ดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หา  
ลำดับนิวคลีโอไทด์และนำมาเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ในการเพิ่มชิ้นส่วนในส่วนปลาย 5' และ 3'  
ที่ยังไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทคนิคพีซีอาร์ที่อาศัยการเชื่อมต่อยีนคาสเซท จากการวิเคราะห์หาลำดับ  
นิวคลีโอไทด์พบว่าชิ้นยีนฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสแปลรหัสพันธุกรรมได้สายพอลิเปปไทด์ที่มี 380 กรดอะมิโน  
นำฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสยีนที่ได้มาโคลนเข้าสู่ *E. coli* JM109 เมื่อวิเคราะห์สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากโคลน  
พบว่าเอนไซม์มีค่าแอกติวิตีรวมอยู่ในช่วง 0-360 ยูนิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร แอกติวิตีสูงที่สุดของโคลนที่  
พบสูงกว่าแอกติวิตีจาก *Bacillus badius* BC1 ประมาณ 60 เท่า เวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก  
ของยีนฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสสูงคือ 120 นาทีก่อนเก็บเซลล์ จากการทดสอบความเสถียรของยีนฟีนิลอะลานิน  
ดีไฮโดรจิเนสในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 โดยใช้วิธีเลี้ยงโคลนที่มีเอนไซม์แอกติวิตีสูงต่อเนื่องวันต่อวันเป็นเวลา  
15 วัน พบว่ารูปแบบและการแสดงออกของยีนฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสใน 5 โคลน จาก 6 โคลนยังคงมี  
ความเสถียรโดยปราศจากกระบวนการกำจัดออกของเซลล์เจ้าบ้านในช่วง 15 วัน ขณะที่หนึ่งโคลนถูกกำจัดขึ้น  
ออกไป และจากการส่งถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 อีกครั้งโดยการใส่กระแสไฟฟ้า  
พบว่ารูปแบบของพลาสมิดยังคงเหมือนเดิม และให้แอกติวิตีของฟีนิลอะลานินดีไฮโดรจิเนสในปริมาณที่คงที่

ภาควิชา .....ชีวเคมี.....  
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....  
ปีการศึกษา.....2544.....

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## 4272233023 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : phenylalanine dehydrogenase/ nucleotide sequence/ PCR cloning/ thermotolerant bacteria/ overexpression

JITTIMA CHAROENPANICH: NUCLEOTIDE SEQUENCING AND CLONING OF THE PHENYLALANINE DEHYDROGENASE GENE FROM THERMOTOLERANT *Bacillus badius* BC1. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D., 166 pp. ISBN 974-17-0512-3

Phenylalanine dehydrogenase (EC 1.4.1.20) catalyzes the NAD<sup>+</sup>- dependent reversible oxidative deamination of L-phenylalanine to form ammonia, phenylpyruvate, and NADH. The enzyme is important as a catalyst for the synthesis of L-phenylalanine used in the artificial sweetener, aspartame, production. Moreover, it is therefore applicable to diagnosis of neonatal hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. Thermotolerant bacterial strain BC1, which had high phenylalanine dehydrogenase activity, was identified by morphological and biochemical properties as well as 16S rRNA gene sequence. The results indicated that this strain was *Bacillus badius*. Amino acid sequence at the N-terminus was TSIKDFTLFEKMSEHEQVVFANDP ATGLR and 6 internal sequences of this enzyme were GMTYKXAASDVDFGGGK AVIIGDPQKDKSPELFRAFGQFVDSLGGRFYTGTDMGTNMEDFIHAMK, ATNK, DDLGGVTYAIQGLGKVGKYVAEGLLEEGAHLFVT, AIAGSANNQLLTEDHGR HLADK, ERVLAK, and WDIRN. The amino acid sequence was used to design degenerated primers which were used to amplify an internal part of phenylalanine dehydrogenase gene by PCR technique using restriction enzyme digested chromosomal DNA as templates. These PCR products were sequenced and the data was used for design next primers for amplification of 5' and 3' regions of the gene by using cassette-ligation mediated PCR. The whole nucleotide sequence of the structural gene consisted of 1140 nucleotides. The open reading frame encoding a polypeptide of 380 amino acids. The phenylalanine dehydrogenase gene was successfully cloned and expressed in *E. coli* JM109 cells. The enzyme total activities were found in crude extract of the clones in the range of 0 to 360 units/100 ml culture. The highest activity was 60 fold higher than that of the enzyme from *Bacillus badius* BC1. The optimum time to induce phenylalanine dehydrogenase gene expression was 120 minutes before cell harvesting. Stability of phenylalanine dehydrogenase gene in *E. coli* JM109 was studied. After daily subculturing recombinant clones that showed high phenylalanine dehydrogenase activity for 15 days, five from six recombinant clones still gave the plasmid pattern and enzyme activity similar to their original clones, however, the inserted gene from one of them was removed by host cell deletion process. Retransformation of recombinant plasmids into the host cell *E. coli* JM109 showed that all of them gave the same pattern with their original recombinant plasmids and phenylalanine dehydrogenase activity of all retransformants was still constantly remained.

Department .....Biochemistry.....

Field of study.....Biochemistry.....

Academic year.....2001.....

Student's signature.....*Jittima Charoenpanich*.....

Advisor's signature.....*K. Packdibamrung*.....

Co-advisor's signature.....*Siriporn Sittipraneed*.....

## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assist. Prof. Dr. Kanoktip Packdibamrung for her generous advice, skillful assistance, technical helps, guidance, encouragement, supporting, fruitful and stimulating discussions through the period of my study.

It is also a great honor and pleasure to acknowledge Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed for her valuable comments, new ideas and insights concerning.

My appreciation is also expressed to Prof. Haruo Misono and Prof. Shinji Nagata for their supporting and sequencing helps.

Sincere thanks and appreciation are due to Assoc. Prof. Dr. Piamsook Pongsawasdi, Assoc. Prof. Dr. Pairoh Pinphanichakarn and Dr. Rath Pichyangkura, who serve as the members of the master committees, for their helpful suggestions and comments.

The financially support of research scholarship, Chulalongkorn university, is also gratefully acknowledged.

The special thanks are also extended to Miss Arunee Leksakorn for her purified enzyme.

I wish to extend my appreciation to Miss Nantawadee Suwannaboon from Armed Forces Research Insititutes of Medical Sciences (AFRIMS) and also Department of Vertinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for their helps about sonication step.

I would like to express my sincere thanks to all teachers for their care and encouragement.

My cordial thanks also go to all friends of the Biochemistry and Biotechnology department especially my best friend, Miss Namthip Trongniphut, for their helps in the laboratory and friendships that make me enjoy and happy throughout my study.

I would like to feel grateful Mr. Paramai Supadulchai for his big help, take care, understanding and encouragement.

Last but not least, the warmest gratitude is extended to the patience, understanding, helping, encouragement, constant support and warmhearted love of my families whilst I have spent many hours with this thesis rather than with them. My thanks are also extended to my patience and sedulous too.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENT .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	ix
LIST OF FIGURES .....	x
ABBREVIATIONS .....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION .....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS .....	18
2.1 Equipments .....	18
2.2 Chemicals .....	19
2.3 Enzymes and restriction enzymes .....	21
2.4 Primers and cassettes .....	22
2.5 Bacterial strains and plasmids .....	22
2.6 Chromosomal DNA extraction .....	22
2.7 Identification of thermotolerant bacterial strain BC1 .....	23
2.8 Amino acid sequence analysis .....	24
2.9 PCR Amplification .....	26
2.10 Agarose gel electrophoresis .....	32
2.11 Nucleotide sequencing .....	34
2.12 Recombinant DNA preparation .....	34
2.13 Transformation .....	35
2.14 Plasmid extraction .....	36
2.15 Crude extract preparation .....	36
2.16 Enzyme activity assay .....	37
2.17 Protein measurement .....	38
2.18 Polyacrylamide gel electrophoresis .....	38
2.19 Induction time determination .....	40

	Page
2.20 Stability of phenylalanine dehydrogenase gene in host cell <i>E. coli</i> JM109.....	40
CHAPTER III RESULTS.....	42
3.1 DNA extraction.....	42
3.2 Identification of thermotolerant bacterial strain BC1.....	42
3.3 Amino acid sequence of phenylalanine dehydrogenase.....	46
3.4 PCR amplification for the internal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase.....	50
3.5 PCR amplification for the 5'- terminal and 3'-terminal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase.....	60
3.6 Deduced amino acid sequence comparison with phenylalanine dehydrogenase from other sources.....	68
3.7 PCR amplification of the whole gene fragment.....	68
3.8 Transformation.....	82
3.9 Phenylalanine dehydrogenase activity of transformant.....	86
3.10 Protein and activity patterns of crude extract from transformant.....	86
3.11 Induction time determination.....	86
3.12 Stability of phenylalanine dehydrogenase gene in host cell <i>E. coli</i> JM109.....	90
CHAPTER IV DISCUSSION.....	101
CHAPTER V CONCLUSION.....	110
REFERENCES.....	112
APPENDICES.....	120
BIOGRAPHY.....	166



## LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 The group of NAD(P) <sup>+</sup> -dependent amino acid dehydrogenase.....	2
1.2 Comparison of properties of microbial phenylalanine dehydrogenases.....	7
1.3 Synthesis of (S)-amino acids from 2-keto acids by using phenylalanine dehydrogenase and formate dehydrogenase.....	13
2.1 Nucleotide sequence of all primers used in 16S rRNA gene amplification.....	25
2.2 Nucleotide sequence and $T_m$ of all primers used in phenylalanine dehydrogenase amplification.....	29
2.3 Compatible recognition sites of the oligonucleotide-cassettes DNA.....	31
2.4 PCR condition in each step.....	33
3.1 Characteristics of the thermotolerant bacterial strain BC1 by TISTR.....	43
3.2 Phenylalanine dehydrogenase activity from crude extracts of transformants.....	87
3.3 Phenylalanine dehydrogenase activity from crude extracts of retransformants clones.....	99

  
 ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 The general reaction of L-amino acid dehydrogenases.....	4
1.2 The reaction of L-phenylalanine dehydrogenase.....	4
1.3 Strategy of cassette-ligation mediated polymerase chain reaction.....	10
1.4 Enzymatic synthesis of L-phenylalanine with coenzyme regeneration.....	12
1.5 Synthesis of (S)-amino acid from their 2-keto analogues by phenylalanine dehydrogenase (PheDH) with a regeneration of NADH by formate dehydrogenase (FDH).....	13
1.6 Enzymatic synthesis of D-amino acids by a multienzyme system consisting of the coupling reaction of four enzymes.....	14
1.7 Structures of allysine ethylene acetal and VANLEV.....	14
1.8 Scheme for conversion of the corresponding keto acid acetal to acetal amino acid.....	15
1.9 The detection system of L-phenylalanine.....	15
2.1 Position of primers used for 16S rRNA gene amplification and sequencing.....	25
2.2 Flow chart for degenerated primer design.....	27
2.3 Strategy for PCR amplification and sequencing of phenylalanine dehydrogenase gene of thermotolerant bacterial strain BC1.....	28
2.4 The sequences of oligonucleotide cassettes used in this research.....	31
3.1 PCR products of the 16S rRNA whole gene amplification using primer A and H'.....	47
3.2 Comparison between 16S rRNA gene sequence of <i>Bacillus badius</i> and partial 16S rRNA gene sequence of thermotolerant bacterial strain BC1.....	48
3.3 Phylogenetic relationship of thermotolerant bacterial strain BC1 and some related organisms based on 16S rRNA gene sequence.....	49
3.4 The reverse-phase HPLC profiles of lysyl endopeptidase digested peptides.....	51
3.5 The CLUSTAL X alignment of amino acid sequence of phenylalanine dehydrogenase from various sources.....	52

Figure	Page
3.6 Restriction enzyme digested chromosomal DNA of <i>Bacillus badius</i> BC1 .....	54
3.7 PCR products of primer N1 and C1 using various DNA templates .....	55
3.8 PCR products of primer N1 and C2 using various DNA templates .....	56
3.9 PCR products of primer N2 and C1 using various DNA templates .....	57
3.10 Recovered PCR products of the internal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase .....	58
3.11 Nucleotide sequence of the internal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase .....	59
3.12 The first 5'-terminal amplified products using primer Phe-N1 and Cassette primer C1 .....	61
3.13 The first 3'-terminal amplified products using primer Phe-C1 and Cassette primer C1 .....	62
3.14 The second 5'-terminal amplified products using primer Phe-N2 and Cassette primer C2 .....	63
3.15 The second 3'-terminal amplified products using primer Phe-C2 and Cassette primer C2 .....	64
3.16 Nucleotide sequence of the 5'-terminal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase using antisense primer Phe-N1 and Phe-N2 .....	65
3.17 Nucleotide sequence of the 3'-terminal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase using sense primer Phe-C1 and Phe-C2 .....	66
3.18 Nucleotide sequence of the 3'-terminal gene fragment of phenylalanine dehydrogenase using sense primer Phe-C3 .....	67
3.19 The nucleotide sequence and the deduced amino acid of phenylalanine dehydrogenase gene from <i>Bacillus badius</i> BC1 .....	69
3.20 Linear alignment of the nucleotide sequence of phenylalanine dehydrogenases gene from various sources .....	70

	Page
3.21 Linear alignment of the nucleotide sequence of phenylalanine dehydrogenases gene from <i>Bacillus badius</i> BC1 and published <i>Bacillus badius</i> .....	75
3.22 Linear alignment of the deduced amino acid sequence of phenylalanine dehydrogenase gene from <i>Bacillus badius</i> BC1 and published <i>Bacillus badius</i> .....	78
3.23 Linear alignment of the deduced amino acid sequence of phenylalanine dehydrogenases.....	79
3.24 PCR product of the whole phenylalanine dehydrogenase gene amplification using primer Phe-Eco and Phe-Bam.....	83
3.25 Extracted plasmid of transformants.....	84
3.26 <i>EcoRI-BamHI</i> digested plasmid of transformants.....	85
3.27 Protein pattern of crude extracts of phenylalanine dehydrogenase producing transformants detected by native-PAGE.....	88
3.28 Phenylalanine dehydrogenase activity staining of crude extracts of phenylalanine dehydrogenase producing transformants.....	89
3.29 Induction time course studies of the transformant No. 15.....	91
3.30 Extracted plasmid of the 15 <sup>th</sup> subcultured transformants.....	92
3.31 <i>EcoRI – BamHI</i> digested plasmid of the 15 <sup>th</sup> subcultured transformants.....	93
3.32 Comparison of phenylalanine dehydrogenase activity of subcultured clones.....	94
3.33 Protein pattern of crude extracts of 15 <sup>th</sup> subcultured transformants detected by native-PAGE.....	95
3.34 Phenylalanine dehydrogenase activity staining of crude extracts of the 15 <sup>th</sup> subcultured transformant.....	96
3.35 Extracted plasmid of retransformants.....	97
3.36 <i>EcoRI - BamHI</i> digested plasmid of retransformants.....	98
3.37 Protein pattern of crude extracts of retransformants detected by native-PAGE.....	100

## ABBREVIATIONS

A	absorbance, 2'-deoxyadenosine (in a DNA sequence)
bp	base pairs
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	bovine serum albumin
C	2'-deoxycytidine (in a DNA sequence)
°C	degree Celsius
cm	centrimetre
Da	Dalton
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate
DTT	dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
G	2'-deoxyguanosine (in a DNA sequence)
HPLC	high-performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid, kilobases in single-standed nucleic acid
kDa	kiloDalton
$K_m$	Michaelis constant
l	liter
LB	Luria-Bertani
$\mu\text{g}$	microgram
$\mu\text{l}$	microlitre
$\mu\text{M}$	micromolar
M	mole per liter (molar)
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
$M_r$	relative molecular mass

MW	molecular weight
N	normal
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
ng	nanogram
nm	nanometer
nt	nucleotide
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PheDH	phenylalanine dehydrogenase
pmol	picomole
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
RBS	ribosome-binding site
rpm	revolution per minute
RNase	ribonuclease
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	2'-deoxythymidine (in a DNA sequence)
TB	tris-borate buffer
TE	tris-EDTA buffer
$T_m$	melting temperature, melting point
UV	ultraviolet
V	voltage
v/v	volume by volume
w/w	weight by weight
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside