การโคลนและแสดงออกของยีนยูริดีน ฟอสโฟรีเลส ในเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม

นางสาวชยาภรณ์ วิชิตกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5153-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING AND EXPRESSION OF URIDINE PHOSPHORYLASE GENE IN *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Miss Chayaporn Wichitkul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5153-2

Thesis Title	CLONING AND EXPRESSION OF URIDINE PHOSPHORYLASE GENE IN*PLASMODIUM FALCIPARUM*
By	Miss Chayaporn Wichitkul
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Professor Jerapan Krungkrai, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Phisit Prapunwattana, Ph.D.

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

..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Jerapan Krungkrai, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Phisit Prapunwattana, Ph.D.)

..... Member

(Sutarnthip Reungprapavut, Ph.D.)

4475214930 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD : URIDINE PHOSPHORYLASE / *PLASMODIUM FALCIPARUM*

CHAYAPORN WICHITKUL : CLONING AND EXPRESSION OF URIDINE PHOSPHORYLASE GENE IN *PLASMODIUM FALCIPARUM*. THESIS ADVISOR : PROF. Dr. JERAPAN KRUNGKRAI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. Dr. PHISIT PRAPUNWATTANA, Ph.D. 94 pp. ISBN 974-17-5153-2

Uridine phosphorylase is an enzyme in the family of nucleoside phosphorylase that is an important biochemical reaction in the salvage pathway of pyrimidine nucleotide. Host cell of *P. falciparum* can obtain uracil from salvage pathway by the activity of uridine phosphorylase and the gene encoding enzyme is identified. In contrast to host cells, *P. falciparum* can only obtain pyrimidines from *de novo* and several enzymes for the salvage of pyrimidine nucleotides were not detected. However, the uridine phosphorylase was demonstrated. The purpose of this study was to identify *P. falciparum* uridine phosphorylase gene and to heterologously express in a bacterial system and to study on the kinetics of the enzyme.

The bioinformatics underlying NCBI resources was used to identify the gene and to design primers, then the PCR product of candidate gene was cloned into *E. coli*. The DNA clones were subsequently to sequencing and analysis of the sequence by the BLAST program, compared with the GenBank database. We have studied on the expression of *P. falciparum* uridine phosphorylase gene by cloning and expression in *E. coli*, then purified protein is studied for kinetics of the uridine phosphorylase activity.

We have found that the nucleotide sequence of candidate gene from PCR amplification is identical to the nucleotide sequence in the genome of *P. falciparum* in GenBank database with 99% identity by BLAST program. The purified protein from the expression in *E. coli* shows that it has uridine phosphorylase activity with specific activity of 342 ± 82 nmol/min/mg protein and its k_{cat} value is 1.18 min^{-1}.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Program

Field of study Medical Science

Academic year 2003

Student's signature Chayaporn Wichitkul

Advisor's signature Jerapan Krungkrai

Co-advisor's signature P. Prapunwattana

ชยาภรณ์ วิชิตกุล : การโคลนและแสดงออกของยีนยูริดีน ฟอสโฟรีเลส ในเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม (CLONING AND EXPRESSION OF URIDINE PHOSPHORYLASE GENE IN *PLASMODIUM FALCIPARUM*) อ.ที่ปรึกษา : ศ.ดร. จิระพันธ์ กรึงไกร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ. 94 หน้า ISBN 974-17-5153-2

เอนไซม์ยูริดีน ฟอสโฟรีเลส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไพริมิดีน นิวคลีโอไซด์ ฟอสโฟรีเลสที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ในเซลล์เจ้าบ้านของเชื้อมาลาเรียจะได้รับเบสไพริมิดีนชนิดยูราซิลโดยกระบวนการกู้คืน ซึ่งอาศัยเอนไซม์นี้ และพบว่ามียีนสำหรับเอนไซม์นี้อยู่ในจีโนมและมีการแสดงออกของยีนนี้ ส่วนในเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัมนั้น การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการกู้คืนเบสไพริมิดีนยังไม่ชัดเจน เนื่องจากเชื้อจะสังเคราะห์เบสไพริมิดีนขึ้นใหม่จากสารตั้งต้น และจากรายงานการศึกษาจีโนมของเชื้อยังไม่มีการกล่าวถึงยีนสำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการกู้คืนเบสไพริมิดีนเลย แต่ที่น่าสนใจคือ มีการตรวจพบเอนไซม์ยูริดีนฟอสโฟรีเลสในเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาว่าเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัมมียีนสำหรับเอนไซม์นี้อยู่ในจีโนม และมีการแสดงออกของยีนนี้หรือไม่

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้กระบวนการทางชีวสารสนเทศเพื่อสืบค้นข้อมูลสำหรับออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นจะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนDNAของเอนไซม์ยูริดีน ฟอสโฟรีเลสในเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ด้วยวิธี PCR ซึ่ง PCR product จะถูกโคลนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน แล้วนำไปหาลำดับเบสเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในจีโนมของเชื้อที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank และศึกษาการแสดงออกของยีนโดยโคลนชิ้นส่วน DNA และแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย โปรตีนที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

ผลการศึกษาพบว่าลำดับเบสของยีนสำหรับเอนไซม์ยูริดีน ฟอสโฟรีเลสที่ได้จากวิธี PCR มีความเหมือนกับลำดับเบสในจีโนมของเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ในฐานข้อมูลของ GenBank คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยใช้โปรแกรม BLAST ได้ 99 % ส่วนการศึกษาการทำงานของโปรตีนที่ได้จากการแสดงออกพบว่า โปรตีนมี activity ของเอนไซม์ยูริดีน ฟอสโฟรีเลส ค่า specific activity เท่ากับ 342 ± 82 nmol/min/mg protein และค่า k_{cat} เท่ากับ 1.18 min^{-1}.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2546

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

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis will never be success without all persons who helped me throughout 3 years of study at the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. I would like to express my deepest gratitude to :

My advisor, Professor Dr. Jerapan Krungkrai, for his valuable advice, helpful suggestions, kindness, understanding and encouragement throughout my study.

My sincere gratitude is also expressed to Dr. Sutarnthip Reungprapavut for serving as my committee and for her kindness and support for laboratory during the time I spent at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Rungsit University.

I am also grateful appreciation to Dr. Sudaratana Krungkrai for her helpful guidance, kindness and training me in all aspects of biomolecular techniques.

I would like also to express my deeply grateful to my co-advisor, Assistant Professor Dr. Phisit Prapunwattana, for his worthy comments, valuable suggestion and kindness during my study.

Finally, I would like to express special thanks to my parent for their infinite love, understanding and constant encouragement throughout my study.

TABLE OF CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... viii

LIST OF FIGURES..... ix

LIST OF ABBREVIATIONS..... xi

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II LITERATURE REVIEW..... 5

III MATERIALS AND EQUIPMENTS..... 22

IV METHODS..... 27

V RESULTS..... 40

VI DISCUSSION..... 75

VII CONCLUSION..... 79

REFERENCES..... 80

APPENDICES

APPENDIX A: Buffers and reagents..... 86

APPENDIX B: Oligonucleotides used in the study..... 93

BIOGRAPHY..... 94

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

4-1 PCR parameters for candidate DNA amplification..... 30

5-1 Result of uridine phosphorylase activity in the lysate 67

5-2 Result of uridine phosphorylase activity in the eluate 67

5-3 Kinetics measurement of uridine phosphorylase activity from non IPTG-induced expression in *E. coli*..... 68

5-4 Kinetics measurement of *P. falciparum* uridine phosphorylase from IPTG-induced expression in *E. coli*..... 68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2-1	Life cycle of the malarial parasite.....	6
2-2	Map of the pDrive cloning vector.....	19
2-3	Map of the pQE30 expression vector.....	20
4-1	Web page of NCBI.....	28
4-2	Web page of BLAST program.....	28
5-1	Amino acid sequence of *M.musculus* uridine phosphorylase.....	41
5-2	Amino acid sequence of *E. coli* uridine phosphorylase.....	42
5-3	BLAST result of *M. musculus* uridine phosphorylase.....	43
5-4	BLAST result of *E. coli* uridine phosphorylase.....	44
5-5	Open reading frame of candidate gene uridine phosphorylase gene in *P. falciparum*.....	46
5-6	Map of primer for DNA amplification by PCR.....	47
5-7	PCR amplification of fragment of candidate gene.....	48
5-8	Construction of pDrive cloning vector inserted with the PCR fragment of *P. falciparum* uridine phosphorylase gene..	49
5-9	Identification of recombinant plasmids, pDrive carrying PCR fragmrnt of *P. falciparum* uridine phosphorylase gene.....	50
5-10	Result of DNA sequencing by automate DNA sequencer.....	52
5-11	Result of DNA sequence analysis by the BLAST program.....	60
5-12	Construction of pQE30 expression vector inserted with the DNA fragment of *P. falciparum* uridine phosphorylase gene.....	61

LIST OF FIGURES (cont.)

FIGURE PAGE

5-13 Identification of recombinent plasmids, pQE30 carrying DNA fragment of *P. falciparum* uridine phosphorylase gene..... 62

5-14 Characterization of the transformants..... 64

5-15 SDS-PAGE analysis of recombinantly expressed proteins purified by Ni-NTA affinity chromatography..... 65

5-16 Michaelis-Menten kinetics of uridine phosphorylase from non IPTG-induced expression in *E. coli*..... 69

5-17 Lineweaver-Burk plot of uridine phosphorylase activity from non IPTG-induced expression in *E. coli*..... 70

5-18 Michaelis-Menten of *P. falciparum* uridine phosphorylase from IPTG-induced expression in *E. coli*..... 71

5-19 Lineweaver-Burk plot of *P. falciparum* uridine phosphorylase from IPTG-induced expression in *E. coli*..... 72

5-20 Standard curve for protein molecular mass determination..... 74

LIST OF ABBREVIATIONS

DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide containing the base adenine, thymine, cytosine and guanine, respectively
A T C G	=	Nucleotide sequence containing the base adenine, thymine,cytosine and guanine, respectively
bp	=	Base pair
^{o}C	=	Degree celsius
RT	=	Room temperature
kb	=	Kilobase
kDa	=	Kilodalton
g	=	Gram
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
M	=	Molar
µl	=	Microlitre
µM	=	Micromolar
mM	=	Millimolar
sec	=	Second
min	=	Minute
hr	=	Hour
O/N	=	Overnight
rpm	=	Revolutions per minute
TE	=	Tris-ethylene diamine tetraacetic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
PCR	=	Polymerase chain reaction
v/v	=	Volume by volume
w/v	=	Weight by volume
BLAST	=	Basic local alignment search tool

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย