

การสร้างมิวแตนต์ที่มีการทำลายชิ้นอะลานีนราซีเมสใน *Escherichia coli* BL21 (DE3)
โดยอินทรอนกลุ่ม 2



นางสาวดวงพร อังศุประเวศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF ALANINE RACEMASE GENE KNOCKOUT MUTANTS OF
Escherichia coli BL21(DE3) BY USING A GROUP II INTRON

Miss Duangporn Ungsupravate

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

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491541

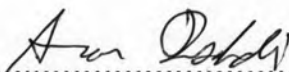
Thesis Title CONSTRUCTION OF ALANINE RACEMASE GENE
 KNOCKOUT MUTANTS OF *Escherichia coli* BL21(DE3) BY
 USING A GROUP II INTRON
By Miss Duangporn Ungsupravate
Field of Study Biochemistry
Thesis Advisor Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.

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

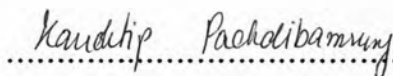


..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

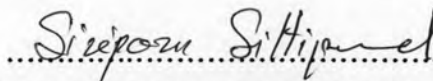
THESIS COMMITTEE



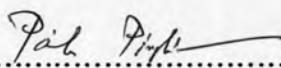
..... Chairman
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)



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



..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)



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

ดวงพร อังศุประเวศ: การสร้างมิวแตนต์ที่มีการทำลายยีนอะลานีนราซีเมสใน *Escherichia coli* BL21(DE3) โดยอินทรอนกลุ่ม 2. (CONSTRUCTION OF ALANINE RACEMASE GENE KNOCKOUT MUTANTS OF *Escherichia coli* BL21(DE3) BY USING A GROUP II INTRON)
 อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, 118 หน้า

ปัจจุบันมีการใช้กรดอะมิโนรูปแบบแอลในวงการอุตสาหกรรมอาหารและสุขภาพอย่างกว้างขวางและมีการนำแอล-อะลานีนไปใช้เป็นสารเพิ่มรสหวานและเป็นส่วนประกอบของยา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแอล-อะลานีนและการรีเจนเนอเรตโคเอนไซม์ ยีนของอะลานีนดีไฮโดรจีเนส (*aladh*) และฟอร์มेटดีไฮโดรจีเนส (*fdh*) ได้ถูกนำเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) โดย 2 วิธี คือ 1) สร้างโคลนที่มี heterologous gene ของ *aladh* และ *fdh* บนเวกเตอร์ pET-17b 2) ทรานส์ฟอร์มร่วมของยีน *aladh* และ *fdh* โดยใช้เวกเตอร์ pET-17b สำหรับ *aladh* และ pSY343 สำหรับ *fdh* และ 3) pMPM-K3 สำหรับ *aladh* และ pET-17b สำหรับ *fdh* ตามลำดับ พบว่าการผลิตอะลานีนของทุกโคลนไม่แตกต่างกัน โดยมีอัตราส่วนดี-อะลานีน:แอล-อะลานีน ประมาณ 1.6:1 เนื่องจาก *E. coli* เจ้าเรือนผลิตอะลานีนราซีเมส ใน *E. coli* มียีน 2 ยีนที่เข้ารหัสอะลานีนราซีเมส คือ ยีน *alr* ซึ่งมีการแสดงออกแบบ constitutive และ ยีน *dadX* ซึ่งมีการแสดงออกในภาวะที่มีแอล-อะลานีนในปริมาณที่สูง งานวิจัยนี้ใช้อินทรอนกลุ่ม 2 ในการทำลายยีนที่เข้ารหัสให้อะลานีนราซีเมส พบว่าทั้งในโคลนที่ทำลายยีน *alr* โคลนที่ทำลายยีน *dadX* และโคลนที่ทำลายทั้ง *alr* และ *dadX* มีการแทรกตัวของอินทรอนกลุ่ม 2 เฉพาะในบริเวณของยีนที่ต้องการทำลายเท่านั้น การทดสอบความเสถียรของการแทรกตัวของอินทรอนกลุ่ม 2 โดยการเพาะเชื้อต่อช่วง 20 ครั้ง พบว่าโคลนที่ทำลายยีน *alr* และโคลนที่ทำลายยีน *dadX* ยังคงมีการแทรกตัวของอินทรอนกลุ่ม 2 อยู่ โคลนที่ทำลายยีน *alr* และโคลนที่ทำลายยีน *dadX* นั้นมีแอกติวิตีของอะลานีนราซีเมสที่น้อยกว่าเซลล์ดั้งเดิม 3.3 และ 1.1 เท่า ตามลำดับ สำหรับโคลนที่ทำลายทั้งยีน *dadX* และ *alr* ในโคลนเดี่ยวนั้น พบว่ามีการเจริญในอาหารอุดมที่เสริมด้วยดี-อะลานีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ช้ามาก และไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็งได้ ทำให้ไม่สามารถทดสอบหาแอกติวิตีของอะลานีนราซีเมส และความเสถียรของการแทรกตัวของอินทรอนกลุ่ม 2

ภาควิชาชีวเคมี.....
 สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....
 ปีการศึกษา.....2549.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ดวงพร อังศุประเวศ.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....กนกทิพย์ ภักดีบำรุง.....

4672266123 : MAJOR OF BIOCHEMISTRY

KEY WORD: Group II intron/ L-alanine production/ knockout

DUANGPORN UNGSUPRAVATE: CONSTRUCTION OF ALANINE RACEMASE GENE KNOCKOUT MUTANTS OF *Escherichia coli* BL21(DE3). BY USING A GROUP II INTRON. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D., 118 pp.

The L-form of amino acid is widely used in food and health care industry. L-alanine is currently used as a food sweetener and for pharmaceutical application. To improve the L-alanine production as well as coenzyme regeneration, alanine dehydrogenase gene (*aladh*) and formate dehydrogenase gene (*fdh*) were introduced into *Escherichia coli* BL21(DE3) by 2 methods 1) cloning of heterologous gene of *aladh* and *fdh* in high expression vector pET-17b and 2) co-transformation of *aladh* gene and *fdh* gene using vectors a) pET-17b for *aladh* gene and pSY343 for *fdh* gene and b) pMPM-K3 for *aladh* gene and pET-17b for *fdh* gene. However, the production of alanine by various recombinant clones were not significantly different with ratio of D:L form about 1.6:1 because of the activity of alanine racemase. In *E. coli*, there are 2 types of alanine racemase encoding by *alr* gene and *dadX* gene. The *alr* gene encodes the constitutively expressed biosynthetic enzyme. The catabolic *dadX* gene, encodes a second alanine racemase isozyme whose expression is subjected to induction by L-alanine. For further L-alanine production, the alanine racemase gene(s) in *E. coli* BL21(DE3) must be disrupted. In this work, group II intron was used to inactivate alanine racemase genes. In all constructed mutants, *alr* gene knockout mutant, *dadX* gene knockout mutant as well as *dadX* and *alr* genes knockout mutant, group II intron inserted only at the target gene. At 20th of subculture, the *alr* gene knockout mutant and *dadX* gene knockout mutant still had intron insertion. Alanine racemase activity of *alr* gene knockout mutant and the *dadX* gene knockout mutant were lower than that of wild type 3.3 and 1.1 times, respectively. The *dadX* and *alr* genes knockout mutant showed very slow growth when cultured in LB medium supplemented with 10 mM D-alanine. Moreover, it could not grow on solid medium. Thus, its stability test and alanine racemase activity assay could not be performed.

DepartmentBiochemistry..... Student's signature...Duangporn Ungsupravate
 Field of study.....Biochemistry..... Advisor's signature...Kanoktip Packdibamrung
 Academic year.....2006.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would sincerely like to acknowledge the efforts of many people who contribute to this work . This thesis could not be achieved without their following assistance, my thesis 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.

Sincere thanks and appreciation are due to Assoc. Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Assoc. Prof. Dr. Siriporn Sittipraneed and Assoc. Prof. Dr. Pairoh Pinphanichakarn, who serve as the members of the master thesis 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 Rujirat Hatrongjitt for literature review.

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

Finally, I would like to thank the warmest gratitude is extend to the patience, understanding, helping, encouragement, constant support and warmhearted love of my family 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.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xiii
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Amino acids.....	1
1.2 L-alanine.....	2
1.3 L-alanine production.....	3
1.4 Alanine racemase.....	6
1.5 Intron.....	6
1.5.1 Group II intron.....	9
1.5.2 Splicing mechanism and structure of group II intron.	10
1.5.3 Retrohoming reaction.....	12
1.5.4 Group II intron as a gene targeting vector.....	13
1.6 Cre recombinase.....	15
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	18
2.1 Equipment.....	18
2.2 Chemicals.....	19
2.3 Enzymes and restriction enzymes.....	22
2.4 Oligonucleotide primers	23
2.5 Bacterial strains.....	24
2.6 Plasmid.....	24
2.7 Bacterial growth medium.....	24
2.8 Crude extract preparation	25

	Page
2.9 Protein measurement.....	25
2.10 Enzyme activity assay.....	26
2.10.1 Alanine dehydrogenase activity assay.....	26
2.10.2 Alanine racemase activity assay.....	26
2.11 Partial purification of alanine dehydrogenase.....	27
2.11.1 Bacterial cultivation.....	27
2.11.1.1 Starter inoculum.....	27
2.11.1.2 Enzyme production and crude enzyme Preparation.....	27
2.11.2 Purification procedures of enzyme.....	28
2.11.2.1 Ammonium sulfate precipitation.....	28
2.11.2.2 DEAE-Toyopearl column chromatography.....	28
2.11.2.3 Blue Sepharose column chromatography.....	30
2.12 Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	31
2.12.1 Pouring the separating gel (10% acrylamide).....	31
2.12.2 Pouring the stacking gel (5% acrylamide).....	32
2.12.3 Sample preparation.....	32
2.12.4 Gel running.....	32
2.12.5 Staining Procedure.....	33
2.13 Agarose gel electrophoresis.....	33
2.14 Extraction of DNA fragment from agarose gel.....	34
2.15 Transformation of plasmid.....	34
2.15.1 Competent cell preparation.....	34
2.15.2 Electroporation.....	35
2.16 Southern blot analysis.....	35
2.16.1 Chromosomal DNA extraction.....	35
2.16.2 Southern blotting.....	36
2.16.3 Probe labeling.....	37
2.16.4 Southern blot hybridization and autoradiography...	38

	Page
2.17 Construction of <i>alr</i> gene knockout mutant.....	40
2.17.1 Construction of pACD4K-C-Alr.....	40
2.17.2 Creation of a <i>alr</i> gene knockout with the pACD4K-C-Alr.....	40
2.17.3 Confirmation of <i>alr</i> gene inactivation	42
2.14.3.1 PCR analysis.....	42
2.14.3.2 Southern blot analysis.....	43
2.18 Construction of <i>dadX</i> gene knockout mutant	43
2.18.1 Construction of pACD4K-C-Dad.....	43
2.18.2 Creation of a <i>dadX</i> gene knockout with the pACD4K-C-Dad.....	45
2.18.3 Confirmation of <i>dadX</i> gene inactivation.....	45
2.15.3.1 PCR analysis.....	45
2.15.3.2 Southern blot analysis.....	45
2.19 Construction of <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes knockout mutant.....	46
2.19.1 Construction of pACD4K-C-loxP-Dad.....	46
2.19.2 Creation of a <i>dadX</i> gene knockout mutant with the pACD4K-C-loxP-Dad (first gene inactivation).....	46
2.19.3 Confirmation of <i>dadX</i> gene inactivation.....	46
2.19.4 Excision of kanamycin resistance gene cassette by the p706-Cre.....	49
2.19.5 Construction of pACD4K-C-loxP-Alr.....	49
2.19.6 Creation of a <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes knockout mutant with the pACD4K-C-loxP-Alr (second gene inactivation).....	49
2.19.7 Confirmation of <i>dadX</i> and <i>alr</i> gene inactivation...	50
2.20 Growth curve determination.....	50
2.21 Alanine racemase activity assay.....	51
2.22 Stability test.....	51

	Page
CHAPTER III RESULTS.....	52
3.1 Purification of alanine dehydrogenase	52
3.1.1 Preparation of crude enzyme and enzyme production.....	52
3.1.2 Ammonium sulfate precipitation.....	52
3.1.3 DEAE-Toyopearl column chromatography.....	52
3.1.4 Blue Sepharose column chromatography.....	55
3.2 Determination of enzyme purity and protein pattern by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	55
3.3 Creation of <i>alr</i> gene knockout mutant.....	58
3.3.1 Construction of pACD4K-C-Alr.....	58
3.3.2 Confirmation of <i>alr</i> gene inactivation.....	58
3.3.2.1 PCR analysis.....	58
3.3.2.2 Southern blot analysis.....	61
3.4 Creation of <i>dadX</i> gene knockout mutant.....	61
3.4.1 Construction of pACD4K-C-Dad.....	61
3.4.2 Confirmation of <i>dadX</i> gene inactivation.....	65
3.4.2.1 PCR analysis.....	65
3.4.2.2 Southern blot analysis.....	65
3.5 Confirmation of <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes knockout mutant.....	67
3.5.1 Construction of pACD4K-C-loxP-Dad and creation of <i>dadX</i> gene knockout mutant.....	67
3.5.2 Confirmation of <i>alr</i> gene inactivation.....	67
3.5.2.1 PCR analysis.....	67
3.5.2.2 Southern blot analysis.....	69
3.5.2.3 Excision of kanamycin resistance gene cassette by the p706-Cre from <i>dadX</i> gene knockout mutant.....	69
3.5.2.4 Construction of pACD4K-C-loxP-Alr an creation of <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes	

	Page
knockout mutant.....	73
3.5.2.5 Confirmation of <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes	
knockout mutant.....	73
3.5.2.5.1 PCR analysis.....	73
3.5.2.5.2 Southern blot analysis.....	74
3.6 Growth curve of <i>E. coli</i> BL21(DE3) and mutants.....	74
3.7 Alanine racemes activity of <i>E. coli</i> BL21(DE3) and mutants...	74
3.8 Stability of intron in <i>E. coli</i> BL21(DE3) and mutants.....	80
CHAPTER IV DISCUSSION.....	81
4.1 Creation and confirmation of <i>alr</i> gene knockout mutant.....	82
4.2 Creation and confirmation of <i>dadX</i> gene knockout mutant.....	83
4.3 Creation and confirmation of <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes knockout mutant.....	85
4.4 Growth of <i>E. coli</i> BL21(DE3) and mutants.....	85
4.5 Alanine racemase activity assay from <i>E. coli</i> BL21(DE3) and mutants.....	85
4.6 Stability of intron insertion in <i>E. coli</i> BL21(DE3) and mutants.....	87
CHAPTER V CONCLUSION.....	88
REFERENCES.....	89
APPENDICES.....	98
BIOGRAPHY.....	118

LIST OF TABLES

	Page
CHAPTER III	
3.1 Purification of alanine dehydrogenase.....	53
3.2 All predicted primers for <i>alr</i> gene inactivation from InGex Intron Prediction Program.....	59
3.3 All predicted primers for <i>dadX</i> gene inactivation from InGex Intron Prediction Program.....	63

LIST OF FIGURES

	Page
CHAPTER I	
1.1 Conjugated enzyme system of alanine dehydrogenase and formate dehydrogenase for production of L-alanine	5
1.2 Reaction catalyzed by alanine racemase.....	7
1.3 Group II introns splicing mechanism and secondary structure.....	11
1.4 Retrohoming of the <i>Lactococcus lactis</i> L1.LtrB intron.....	14
1.5 Simple mechanism of Cre/loxP system.....	17
 CHAPTER II	
2.1 Flow chart of purification process of alanine dehydrogenase.....	29
2.2 Construction of pACD4K-C-Alr.....	41
2.3 Construction of pACD4K-C-Dad	44
2.4 The Step of creation the <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes knockout mutant.....	46
2.5 Construction of pACD4K-C-loxP-Dad.....	47
2.6 Construction of pACD4K-C-loxP-Alr.....	49
 CHAPTER III	
3.1 Purification of alanine dehydrogenase by DEAE-Toyopearl column	54
3.2 Purification of alanine dehydrogenase by Blue Sepharose column...	56
3.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of alanine dehydrogenase..	57
3.4 PCR analysis of the <i>alr</i> gene knockout mutant.....	60
3.5 Southern blot analysis of chromosomal DNA of <i>alr</i> gene knockout mutant	62
3.6 PCR analysis of the <i>dadX</i> gene knockout mutant.....	66
3.7 Southern blot analysis of the <i>dadX</i> gene knockout mutant.....	68
3.8 PCR analysis of the <i>dadX</i> gene knockout mutant by pACD4K-C-loxP-Dad.....	70

	Page
3.9 Southern blot analysis of chromosomal DNA of <i>dadX</i> gene knockout mutant from pACD4K-C-loxP-Dad	71
3.10 PCR analysis of the <i>dadX</i> and <i>alr</i> genes knockout mutant.....	72
3.11 Southern blot analysis of chromosomal DNA of <i>dadX</i> with <i>alr</i> gene knockout mutant from pACD4K-C-loxP-Alr.....	75
3.12 Growth curve of <i>E.coli</i> BL21(DE3) and mutants.....	76

ABBREVIATIONS

bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
C	2'-deoxycytidine (in a DNA sequence)
°C	degree Celsius
cm	centrimeter
cp	chloroplast
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate
EBS	exon binding site
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
G	gram
FDAA	1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide
FDH	formate dehydrogenase
hr	hour
HCl	hydrochloric acid
IBS	intron binding site
IEP	intron encoding protein
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid and single-standed nucleic acid
KCl	potassium chloride
kDa	kiloDalton
KOH	potassium hydroxide

KPB	potassium phosphate buffer
l	liter
LB	Luria-Bertani
μg	microgram
μl	microliter
μmol	micromole
μM	micromolar
M	mole per liter (molar)
mA	milliampere
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mt	mitochondrial
MW	molecular weight
N	normal
NAD^+	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
ng	nanogram
nm	nanometer
nt	nucleotide
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PLP	pyridoxal 5'-phosphate

pmol	picomole
RNase	ribonuclease
RNP	ribonucleoprotein
RT	reverse transcriptase
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