

Abstract

Project code: MRG4580031

Project Title: Investigation for the Role and Significance of Tandem Repeats within
Mycobacterium tuberculosis leuA Gene

Investigator: Wimon Chanchaem ^a and Prasit Palittapongarnpi

^a Department of Biology , Faculty of Science, Ramkhamhaeng
University , Huamark, Bangkok, Bangkok 10240, Thailand.

^b Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol
University, RamaVI Rd, Phayathai , Bangkok 10400, Thailand.

E-mail Address: wimolc@hotmail.com

Project Period: 2 years

In order to investigate for the role and significance of tandem repeats within *Mycobacterium tuberculosis leuA* gene encoding alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS), we compared the properties of native α -IPMS and mutated α -IPMS of which the 2 copies of 57 bp repeats has been deleted. By using mutagenic PCR procedure , we successfully constructed a recombinant plasmid of pET15 b expression vector carrying the mutated gene. Optimum expression conditions were studied and properties of gene products were compared. Mutated gene was optimally amplified at 64⁰C annealing temperature and well expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) at 25⁰C for 3-6 hrs using isopropylthio - β -galactoside at the final concentration of 0.5 mM as inducer. Properties of both native and mutated enzymes were compared. The results showed that with deletion of the 2 copies of 57 bp tandem repeats, the mutated *leuA* can well expressed to a functional mutated α -IPMS. The basic properties of mutated α -IPMS was similar to the native α -IPMS. Mutated α -IPMS was smaller, corresponding to the deleted 2 copies of 19 amino acids repeats and the native form of the enzyme was also dimer. The optimal temperature and optimal pH for enzyme activity was between 30⁰-50⁰ C and 7.5 respectively. The stability of mutated α -IPMS also similar to the native α -IPMS. Upon the studies, significant differences was not observed between the two types of enzyme. These results showed that the 2 copies of 57 bp tandem repeats may have no effect on *leuA* expression and α -IPMS basic properties.

Keywords: tandem repeats, alpha-isopropylmalate synthase, *leuA*, *Mycobacterium tuberculosis*

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4580031

ชื่อโครงการ: การศึกษาบทบาทและความสำคัญของ Tandem Repeats ภายในยีน *leuA* ของเชื้อวัณโรค

ชื่อนักวิจัย: วิมล จันทร์แจ่ม¹ และ ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์²

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก

บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6

พญาไท กรุงเทพฯ 10400

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

ในการศึกษาบทบาทและความสำคัญของส่วน tandem repeats ในยีน *leuA* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ alpha-isopropylmalate synthase (α -IPMS) ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ดังกล่าวที่เตรียมจากยีน *leuA* ปกติและที่เตรียมจากยีน *leuA* ที่ได้ตัดส่วน tandem repeat ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบสจำนวน 2 ชุด ออกโดยวิธี mutagenic PCR โดยยีน *leuA* ทั้ง 2 แบบได้ถูกเชื่อมต่อกับ expression vector pET15b และทำการสร้างเอนไซม์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ B L 21(DE3) ซึ่งจากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 แบบถูกสร้างได้ดี เมื่อใช้สาร isopropylthio- β -galactoside ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการกระตุ้นการทำงานของยีน และใช้อุณหภูมิ 25⁰ ซ เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่ายีน *leuA* ที่ถูกตัดส่วน tandem repeats ออก สามารถกำหนดการสร้าง α -IPMS ที่มี activity เทียบเท่าเอนไซม์ที่สร้างจากยีนปกติ โดยที่ mutated α -IPMS มีคุณสมบัติพื้นฐานใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ความเสถียรในสภาพพีเอชต่างๆ และจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์ สำหรับค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์พบว่า mutated α -IPMS มีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นผลมาจากการตัดส่วนของ tandem repeats ออก ผลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า tandem repeat ดังกล่าว อาจไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *leuA* ในแง่การแสดงออกของยีนและคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์

คำหลัก: tandem repeats, alpha-isopropylmalate synthase, *leuA*, *Mycobacterium tuberculosis*