PDF4280030 ผศ.ดร. บุญศรี จงเสรีจิตต์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัสและแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอไล

The Cloning of Streptococcal hyaluronan synthase (HAS) gene and its expression in *Escherichia coli*

โดย ผศ. ดร. บุญศรี จงเสรีจิตต์ และคณะ

กันยายน 2544

สัญญาเลขที่ PDF/30/2542

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ **การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัส และแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอไล**

The Cloning of Streptococcal hyaluronan synthase (HAS) gene and its expression in *Escherichia coli*

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ผ.ศ. ดร.บุญศรี จงเสรีจิตต์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ผ.ศ. ดร.ธนิต ผิวนิ่ม	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ศ.ดร. อมเรศ ภูมิรัตน	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การที่จะประสบความสำเร็จในการวิจัยนั้น ประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่าง ทั้งความฉลาด ความรอบคอบในการวางแผนการทดลองและความเอาใจใส่ในการทดลอง รวมทั้งการแก้ปัญหาที่ไม่สามารถคาดการณ์ล่วงหน้าได้ ตลอดจนปัจจัยแวดล้อมต่างๆจากภายนอก เช่น สภาพของภาระงานหลักที่ทำอยู่ เวลา ความพร้อมของห้องปฏิบัติการ และความสนับสนุนทางด้านต่างๆ ทั้งด้านการเงินและด้านกำลังใจ งานวิจัยเรื่อง "การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัสและแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอไล" เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ทำในเมืองไทยหลังจากที่ผู้วิจัยสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกจากต่างประเทศ งานวิจัยชิ้นนี้เกิดขึ้นได้ด้วยความสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งต้องขอขอบคุณอย่างยิ่งสำหรับนโยบายการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยหลังปริญญาเอกในลักษณะเช่นนี้ที่ทำให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสเปิดช่องทางการทำวิจัยในที่ทำงานดนเอง ซึ่งต้องต่อสู้กับอุปสรรคและปัญหาหลายประการในการก่อร่างสร้างห้องปฏิบัติการทางอณูพันธุศาสตร์ขึ้นมาในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จนเป็นผลสำเร็จพร้อมๆกับการทำงานวิจัยนี้ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีส่วนสำคัญยิ่งในการเริ่มต้นพัฒนางานวิจัยด้านนี้ของภาควิชาฯ นอกจากนั้นต้องกราบขอบพระคุณ ศ.ดร. อมเรศ ภูมิรัตน ที่กรุณาให้ความสนับสนุนตั้งแต่เริ่มแรกในการเขียนขอรับทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในงานวิจัยชิ้นนี้ด้วยดีเสมอมา อีกท่านหนึ่งที่มองเห็นความสำคัญของงานวิจัยนี้และยินดีให้ความสนับสนุนแก่ผู้วิจัยคือ ผศ.ดร.ธนิด ผิวนิ่ม รวมทั้งขอขอบคุณ Prof. Shiginori Kanaya และ Assoc. Prof. Masaaki Morikawa ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำในเรื่องเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ดีเอนเอพาหะ และเซลล์เจ้าบ้านหลายสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ และที่จะขาดเสียมิได้คือขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งให้ความสนับสนุนและเป็นสถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้

บุญศรี จงเสรีจิตต์

Project Code : PDF/30/2542
(รหัสโครงการ)

Project Title : การโคลนยีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) จากสเตรปโตคอคคัส
(ชื่อโครงการ) และแสดงผลในเอชเชอริเชีย คอไล
The Cloning of Streptococcal hyaluronan synthase (HAS) gene and its expression in *Escherichia coli*

Investigator : ผ.ศ. ดร.บุญศรี จงเสรีจิตต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
(ชื่อนักวิจัย) ผ.ศ. ดร.ธนิต ผิวนิ่ม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ศ. ดร.อมเรศ ภูมิรัตน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address : boonsri@su.ac.th

Project Period : 2 ปี
(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

ในโครงการวิจัยนี้ได้เริ่มจากออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จากนั้นนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์นี้มาใช้ในการทำ PCR โดยมีจีโนมิกดีเอนเอของ *Streptococcus zooepidemicus* เป็นแม่แบบ แยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการวิเคราะห์ต่อไป จากการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความคล้ายคลึงกับยีนของไฮยาลูโรแนน ซินเทส (*has*A) ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น และได้ทำการวิเคราะห์โดย gene walking จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ *has*A ซึ่งมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ 1.25 กิโลเบส สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส ซึ่งให้ชื่อว่า sz HAS โดยเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว (มีน้ำหนักโมเลกุลดาลตามที่คำนวณได้คือ 47.77 kDa) โปรตีนนี้มี 2 putative transmembrane domain ที่ปลายอะมิโน และมี 2-3 transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล จากนั้นนำท่อนดีเอนเอของ *Streptococcus* ซึ่งมียีน *has*A มาเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR แล้วนำท่อนดีเอนเอที่ได้นี้มาเชื่อมต่อกับดีเอนเอพาหะสำหรับการแสดงออกคือ pET 28a (Invitrogen, USA) ได้เป็นพลาสมิด pHAS แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ *E. coli* BL 21 DE3, *E. coli* BL 21 (codon+) และ *E. coli* HMS 174 (DE3) pLysS ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนได้ใน *E. coli* BL 21 (codon+) แต่มีระดับต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากรหัสกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายกลุ่มอะมิโนของเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส (HAS) เป็นรหัสที่ไม่ค่อย

พบใน *E. coli* ดังนั้นจึงทำการดัดแปลงรหัสสำหรับกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโน อย่างไรก็ตาม พบว่า *E. coli* นี้ถึงแม้จะมีพลาสมิค pHAS ที่ดัดแปลงรหัสแล้วและสามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส แต่ไม่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ดังนั้นน่าจะต้องมีการโคลนยีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกร่วมด้วย

Abstract

The cloning of hyaluronan synthase (HAS) gene of *Streptococcus zooepidemicus* (group C Streptococcus, GCS) was performed by the strategy of the polymerase chain reaction (PCR), using the design of degenerate oligonucleotides based upon conserved sequences from other organisms. The PCR product was isolated, and then characterized by DNA sequencing. The nucleotide sequence was determined and the deduced amino acid sequence was then compared with known HAS sequences. The amino acid sequence showed high similarity to other known HAS. In order to obtain the entire *has*A sequence, gene walking was performed. Sequence analysis indicated that *hasA* encode a protein; hyaluronan synthase, designated szHAS, 417-amino acids protein (calculated molecular mass, 47.77 kDa). The protein has two putative transmembrane domains at the amino terminus and 2-3 transmembrane domains at the carboxyl end. Streptococcus DNA fragment containing *has*A was amplified using PCR. The amplified fragment was incorporated into expression vector pET-28a (Invitrogen, USA). The pHAS, bearing the *has*A has been transformed into *E. coli* BL21 DE 3, *E. coli* BL 21 (codon+) and *E. coli* HMS 174 (DE3) plysS. The result showed that the *has*A could only express in *E. coli* BL 21 (codon+). However, the expression level was made in disappointingly small amounts. One factor influencing expression level might be the result of rare codon usage of some codons near the N-terminus of *has*A which could have severe effects on protein yield. Therefore, the rare codon modifications near the N-terminus of *has*A were performed. However, the *E. coli* host could not produce HA even if they contain the pHAS plasmid with the rare codon modifications and could produce hyaluronan synthase.

Keywords: Hyaluronic acid, Hyaluronan synthase, *Streptococcus* sp., Polysaccharide engineering, Gene cloning

บทนำ

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นโพลีแซคคาไรด์(Polysaccharide)ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด มีการนำมาใช้ทางการแพทย์หลายอย่างเช่น ใช้เป็นสารหล่อเลี้ยงในการผ่าตัดตา ผ่าตัดเส้นโลหิต ผ่าตัดอวัยวะ และใช้ในการรักษาอาการอักเสบของข้อต่อ ใช้ในการรักษาแผล ตลอดจนใช้สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ streptococcal hyaluronidase ในซีรัมคน นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ใช้กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารให้ความชุ่มชื้นในครีมทาหน้า กรดไฮยาลูโรนิคที่นำมาใช้ในวงการแพทย์และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง มีมาตราฐานความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน ทางการแพทย์มีความต้องการความบริสุทธิ์ของกรดที่สูง เพื่อหลีกเหลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย

การผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสามารถผลิตได้หลายวิธีคือ การผลิตโดยการแยกจากสิ่งมีชีวิต การผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ขึ้นจากโมเลกุลของน้ำตาลโดยอาศัยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ และการผลิตจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* โดยวิธีการแยกสกัดจากสิ่งมีชีวิตทั้งจากเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ เป็นวิธีการที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในปัจจุบัน ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกจำหน่ายคือ HYLARTILE ของบริษัท Pharmacia,Inc. ซึ่งผลิตจากหงอนของไก่ตัวผู้ แต่เป็นวิธีที่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ทำให้ต้นทุนการผลิตมีราคาสูง นอกจากนั้นยังมีข้อเสียในเรื่องการปนเปื้อนของโพลิแซคคาไรด์ชนิดอื่น และการปนเปื้อนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสตลอดจนการปนเปื้อนจาก bacteriophage หรือไวรัสที่มีในเนื้อเยื่อสัตว์ ภายหลังได้ใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ของสัตว์ เพื่อนำมาทำการสกัด ซึ่งทำให้วิธีการผลิตง่ายขึ้นและราคาถูกลง แต่พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่ได้จากวิธีนี้จะปนเปื้อนด้วย proteoglycan ชนิดอื่นอยู่เสมอ เช่น chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate หรือ keratan sulfate สารเหล่านี้มีโครงสร้างและสมบัติใกล้เคียงกับกรดไฮยาลูโรนิก จึงมีผลต่อวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของกรดกระทำได้ยาก

สำหรับการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกด้วยกระบวนการหมักจากแบคทีเรียนั้นนับว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดและได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้อย่างรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ไม่พบปัญหาการปนเปื้อนของ proteoglycan และ glycosaminoglycan ชนิดอื่นๆ และที่สำคัญกว่านี้คือสามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยตามที่ต้องการได้ จัดเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตสูง ใช้เวลาในการหมักสั้น ต้นทุนต่ำเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้สามารถหาได้ง่าย อีกทั้งสามารถที่จะทำการปรับปรุงและควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่าย โดยการปรับปรุงสูตรอาหาร คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อ และควบคุมสภาวะในการหมักให้เหมาะสม แต่วิธีนี้ยังมีข้อเสีย คือเชื้อที่ใช้ในการผลิตและให้ผลผลิตกรดไฮยาลูโรนิกที่สูงนั้นอยู่ในกลุ่ม β-haemolytic Streptococci group A,C ซึ่งส่วนมากมักก่อให้เกิดโรค และยังสามารถผลิตสเตรปโตไลซินซึ่งเป็นสารที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงที่หากปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอกจะมีผลทำให้เกิดการ

ระคายเคือง และหากปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทางการแพทย์ก็จะเป็นอันตรายมากขึ้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ไฮยาลูโรเนตส่วนใหญ่ที่ใช้ในทางการแพทย์จึงเป็นไฮยาลูโรเนตที่สกัดมาจากสิ่งมีชีวิต อันได้แก่หงอนไก่และสายสะดือ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะแหล่งที่มาประกันความปลอดภัยได้ดีกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างกรดไฮยาลูโรนิกได้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะคงตัว(stationary phase) โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกแบบจำเพาะเจาะจงได้หน่วยย่อยของ N-acetylgluco samine ทำให้กรดดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลและความหนืดลดลง

ดังนั้นในการนำเชื้อเหล่านี้มาใช้งานจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตลอดจนในด้านความปลอดภัยของผู้ใช้ จึงควรคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติดังนี้

1. ไม่สร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส
2. สร้างกรดไฮยาลูโรนิกในปริมาณสูง
3. ปลอดสารพิษ
4. ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง

การที่จะได้เชื้อที่มีคุณสมบัติทั้งสี่ข้อครบถ้วนจากเชื้อตามธรรมชาตินั้นอาจหายาก จึงอาจใช้วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ (mutation) เพื่อให้ได้เชื้อที่มีคุณสมบัติตามต้องการ อย่างไรก็ดีแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพทำได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและความรู้ทางด้านอณูชีววิทยา งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาถึงยีนที่ควบคุมการสร้าง hyaluronan synthase จาก *Streptococcus* sp. โดยการโคลนยีน hyaluronan synthase (*has*A) เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ nucleotide อันจะเป็นพื้นความรู้สำคัญในการปรับปรุงโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป รวมทั้งได้ทำ overexpression ของยีน *has*A จาก *Streptococcus* sp. ใน *E. coli* ซึ่งจะทำให้ได้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติที่ดีทั้งสี่ข้อที่กล่าวมาในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเมื่อทำสำเร็จ จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตไฮยาลูโรเนตได้เป็นอย่างมาก ในปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์นี้ทั้งหมดจากต่างประเทศ พิจารณาเพียงการใช้สารนี้จำนวน 0.05 มิลลิลิตร ในการผ่าตัดเปลี่ยนเลนซ์เทียม 1 ครั้ง ก็เป็นค่าไฮยาลูโรเนตมากกว่า 5,000 บาทแล้ว งานวิจัยนี้อาจมีผลในระยะยาวในการช่วยบรรเทาสภาวะขัดสนทางเศรษฐกิจได้ทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

1. สามารถทำการโคลนยีน hyaluronan synthase จากเชื้อ *Streptococcus zooepidemicus* โดยใช้เทคนิคทาง PCR
2. สามารถทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ nucleotide ของ hyaluronan synthase gene (*has*A) จากเชื้อ *S. zooepidemicus* ได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการศึกษาทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ของ hyaluronan synthese (HAS) ต่อไป รวมทั้งการปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์นี้
3. สามารถสอดใส่ (transform) ยีน hyaluronan synthese (*has*A) ของเชื้อ *S. zooepidemicus* นี้เข้าไปใน *E. coli* เพื่อให้มีการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) ได้ในปริมาณสูงขึ้น
4. วิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในดีเอนเอลูกผสมที่ได้

วิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์และพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาคือ *Streptococcus zooepidemicus* ส่วนจุลินทรีย์ *Escherichai coli* TOP 10 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pCR®-Blunt และ pBAD-TOPO® vector (Invitrogen, USA) และ *E.coli* JM 109 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pUC18/19, PCR 2.1 cloning vector (original TA cloning vector kit) (Invitrogen, USA) และ pCR® Blunt cloning vector. นอกจากนั้น *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3, สายพันธุ์ BL21 (codon+) และสายพันธุ์ HMS 174 (DE3) pLysS ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับพลาสมิด pET-28a expression vector (Invitrogen, USA). อาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* ได้แก่ Brain Heart Infusion (BHI) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ *E.coli* คือ LB medium
2. การโคลนยีน hyaluronan synthase (*has*A) จาก *S. zooepidemicus*
    2.1 แยก genomic DNA จาก *S. zooepidemicus* ด้วยวิธีของ Caparon และ Scott (1991)
    2.2 สังเคราะห์ PCR primer โดยอาศัย conserved sequence ของลำดับกรดอะมิโนของ HAS จาก *Streptococcus pyogenes* และ *DG42* จาก *Xenopus laevis* (DeAngelis and Achyuthan, 1996) รวมทั้ง nod C ซึ่งเป็น *Rhizobium meliloli* modulation factor (Nagahashi et al., 1995). จากนั้นนำ PCR primer นี้มาใช้สำหรับทำ PCR โดยใช้ genomic DNA เป็น template ทำ PCR โดยใช้เครื่อง thermocycler (Geneamp PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster, CA) ด้วยโปรแกรมดังนี้: i)

1 รอบที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 min, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที, และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที; ii) 30 รอบ ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, และ72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

2.3 หลังจาก PCR amplification แล้ว นำท่อน DNA ซึ่งเป็น PCR product มาแยกให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gene clean kit (BIO 101. Inc.) แล้วนำมาทำ DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ homology ระหว่าง PCR product ที่ได้ กับ *has*A ของสิ่งมีชีวิตอื่น เมื่อมีความน่าจะเป็นว่าเป็นท่อน DNA ที่เราต้องการ และยังไม่ครอบคลุม *has*A gene ก็ให้นำท่อน DNA ดังกล่าวมาดำเนินการตามวิธีข้อ 2.4

2.4 Southern hybridization และ Colony hybridization: นำท่อน DNA ซึ่งเป็น PCR product จากข้อ 2.3 มาใช้เป็น probe โดยติดฉลากด้วย digoxigenin DNA labelling system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) เพื่อนำมาตรวจหาชิ้น DNA ที่มียีน *has*A อยู่ โดยวิธี Southern hybridization จากนั้นตัดชิ้นวุ้น (agarose gel) ที่มีท่อนดีเอนเอที่ต้องการ แล้วแยกดีเอนเอออกจากชิ้นวุ้น และนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC 19 จากนั้นสอดใส่เข้าใน *E. coli* JM 109 เพื่อสร้างเป็นธนาคารยีน แล้วทำการคัดเลือกหาโคโลนีที่มียีนที่ต้องการโดยวิธี Colony hybridization ซึ่งติดฉลากท่อนดีเอนเอที่ใช้เป็น probe ด้วย digoxigenin DNA labelling system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) จากนั้นสกัดดีเอนเอลูกผสมจากโคโลนีที่ให้ผลบวกมาตรวจสอบอีกครั้งโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและยืนยันผลอีกครั้งด้วยการทำ Southern hybridization เพื่อให้แน่ชัดว่าดีเอนเอดังกล่าวมาจาก *S. zooepidemicus* หลังจากหาลำดับ DNA และทำ homology search แล้ว หากท่อน DNA ชิ้นใหม่ที่ได้ยังไม่ครอบคลุมยีนที่ต้องการ ให้ดำเนินการดิดตามหาชิ้นส่วน DNA ที่ขาดหายไปโดยการทำ gene walking กล่าวคือ ออกแบบว่าจะใช้ชิ้นส่วนจาก DNA ที่มีอยู่ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใด เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้เป็น probe ตัวที่ 2 ในการทำ Southern และ Colony hybridization ครั้งที่ 2 ต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับ nucleotide ทำการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide บนท่อน DNA ซึ่งเป็นที่ตั้งของ *has*A homologue ด้วยวิธี dideoxynucleotide chain-termination method ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sanger และคณะ (1977) โดยใช้ fluorescent primers (Auto Read Sequencing kit, Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Sweden) และใช้เครื่องอ่านลำดับดีเอนเออัตโนมัติ (a automated DNA sequencing system, ALF express, Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Sweden). จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของลำดับ nucleotide

และ deduced amino acid โดยใช้ DNASIS™ software (Hitachi softwares Co. Ltd., Tokyo, Japan)

4. Expression cloning ของยีน *has*A ใน *E. coli*

   4.1 ทำการเพิ่มจำนวนท่อน DNA ซึ่งมียีน *has*A homologue โดยหลังจากหาลำดับ nucleotide ของทั้ง open reading frame (ORF) ของยีน HAS homologue แล้ว ทำการสังเคราะห์ oligonucleotide เพื่อใช้เป็น primer โดยต้องมี restriction site คือ *Nde*I และ *Bam*HI ที่เหมาะสมกับการโคลนยีนต่อไปเพื่อขยายจำนวนยีน (amplify) โดย PCR

   4.2 ทำ PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบไว้จากข้อ 4.1 และใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Promega, USA) ซึ่งจะได้ท่อนดีเอนเอขนาด 1.4 กิโลเบส นำท่อนดีเอนเอที่ได้นี้มาแยกให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด PCR 2.1 และสอดใส่เข้าใน *E. coli* จากนั้นสกัดดีเอนเอลูกผสมที่ได้ แล้วนำมาตัดด้วย *Nde*I และ *Bam*HI และนำเข้าเชื่อมต่อกับ expression vector คือ pET-28a® (Invitrogen, USA) จากนั้นนำดีเอนเอลูกผสมที่ได้นี้ซึ่งให้ชื่อว่า pHAS สอดใส่เข้าในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM 109 และ *E. coli* BL 21 DE 3 ตามลำดับ นอกจากนั้นได้ทำการสอดใส่เข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งได้แก่ *E.coli* BL 21 (codon$^+$) และ *E.coli* HMS 174 (DE3) pLysS เพื่อหาเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของยีน โดยทำการคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีพลาสมิด pHAS ด้วยวิธี colony PCR

5. ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *has*A ในเซลล์เจ้าบ้านตัวใหม่ โดยเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 DE3, สายพันธุ์ BL21 (codon+) หรือ สายพันธุ์ HMS 174 (DE3) pLysS ซึ่งมีพลาสมิด pHAS ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ซึ่งมี kanamysin (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดความขุ่นของเชื้อที่ 660 นาโนเมตรได้ 0.4 จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนโดยการใส่ isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 มิลลิโมลาร์ และบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นที่ 8,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง แล้วนำมาทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonication). จากนั้นนำมาปั่นที่ 120,000 x g เป็นเวลา 60 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วผสมกับบัฟเฟอร์ นำสารแขวงลอยเซลล์ที่ได้มาเติม UDP-*N*-acetylglucosamine 1 มิลลิโมลาร์ และ UDP-glucuronic acid 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเยื่อหุ้มเซลล์ออกโดยการปั่นที่ความเร็วสูง (ultracentrifuge) 120,000 g เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ซึ่งมี Triton

X-114 ลงในเยื่อหุ้มเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นที่ความเร็วสูงเพื่อแยกส่วนสารละลายใสไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

5.1 ทำการวิเคราะห์โดยดูจากแถบโปรตีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส บน sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

5.2 วิเคราะห์หาปริมาณของกรดไฮยาลูโรนิกโดยวิธีคาร์บาโซลด้วยการวัด uronic acid (ดัดแปลงจาก Dische, 1947; Bernfeld 1955; Miller 1958) โดยการปั่นแยกเชื้อที่เลี้ยงไว้ที่ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาเติมเอทธานอลเป็นปริมาตร 2 เท่า แล้วนำไปแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก จากนั้นเก็บเกี่ยวตะกอนที่ได้แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกต่อไป

ผลการทดลอง

1. ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ *S. zooepidemicus* ที่เหมาะสมในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกสำหรับทำการทดลองต่อไป

2. สามารถโคลนยีน hyaluronan synthase (*has*A) จากเชื้อ *S. zooepidemicus* ที่คัดเลือกไว้ โดยขั้นตอนดังนี้

2.1 แยก genomic DNA จาก *S. zooepidemicus*

2.2 สังเคราะห์ PCR โดยอาศัย conserved sequence ของ HAS จากสิ่งมีชีวิตอื่น

2.3 ทำ PCR amplification ด้วยการนำ primer ที่สังเคราะห์ได้มาทำ PCR โดยใช้ genomic DNA จาก *S. zooepidemicus* เป็นแม่แบบ หลังจาก PCR amplification แล้ว นำท่อน DNA ซึ่งเป็น PCR product มาทำ DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์ homology ระหว่าง PCR product ที่ได้ กับ HAS จากสิ่งมีชีวิตอื่น และจากการวิเคราะห์พบว่า PCR product ที่ได้มี homology กับ HAS จากสิ่งมีชีวิตอื่น จากนั้นทำการโคลนยีน *has*A จาก *S. zooepidemicus* แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3. ผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ของ *has*A จากเชื้อที่นำมาศึกษา พบว่ามีความยาว 1.25 กิโลเบส จากข้อมูลดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ได้ว่ามี homology กับเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างโพลิเมอร์ของกรดไฮยาลูโรนิก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน

417 ตัว มีค่ามวลโมเลกุลจากการคำนวณเป็น 47.77 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เป็น 9.01 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งได้ส่งข้อมูลเข้า GenBank โดยมีหมายเลขคือ BankIt 419336 AF 414053 สิ่งที่น่าสนใจคือลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *S. zooepidemicus* มีความเหมือนกับ *S. equisimilis* ถึง 99.7 % และมีความเหมือนกับ *S. pyogenes* ถึง 70.4 % ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3 นอกจากนั้นยังพบว่า szHAS มี topology (ดังแสดงในภาพที่ 4) เหมือนกับ seHAS (จาก *S. equisimilis*) และ spHAS (จาก *S. pyogenes*) รวมทั้ง HAS ที่พบในยูคาริโอต์ โดยมี 2 putative transmembrane domain ที่ปลายอะมิโน และมี 2-3 membrane-associated หรือ transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล รวมทั้ง hydropathy plot สำหรับเอนไซม์นี้จากเชื้อ Streptococcus ทั้งสามเหมือนกันด้วย

4. ผลการแสดงออกของ *has*A จากเชื้อ *S. zooepidemicus* ใน *E. coli* แสดงให้เห็นว่าดีเอนเอลูกผสมที่ได้จากการตัดต่อยีน *has*A เชื่อมต่อกับดีเอนเอพาหะ pET-28a (Invitrogen, USA) ที่ใช้ในการแสดงออกของยีนนั้น เมื่อ transform เข้าในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* BL21 (codon$^+$) และ *E. coli* HMS174 (DE3) pLayS พบการแสดงออกของยีน *has*A ได้เฉพาะใน *E. coli* BL21 (codon$^+$) อย่างไรก็ตามระดับการแสดงออกของยีนหรือการสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทส มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนอาจเป็นผลมาจากรหัสของกรดอะมิโนของ szHAS ซึ่งมีรายงานว่าเป็นรหัสที่ไม่ค่อยพบใน *E. coli* โดยเฉพาะอย่างยิ่งรหัส arginine ที่อยู่ใกล้กับปลายด้านกลุ่มอะมิโนของสายโปรตีน (N-terminus) ของ szHAS ซึ่งพบว่าจะมีผลอย่างยิ่งกับผลผลิตโปรตีนที่ได้ (Zhang et al., 1991; Sorensen et al., 1989; Brinkmann et.al., 1989; Chen and Inouye, 1990) ฉะนั้นจึงได้ทำการทดลองเปลี่ยนรหัสกรดอะมิโนที่เป็นรหัสซึ่งไม่ค่อยพบใน *E. coli* บางรหัสที่อยู่ใกล้ปลายด้านกลุ่มอะมิโนของสายโปรตีนคือ เปลี่ยนรหัส Arg จาก AGA เป็น CGT และ Thr จาก ACA เป็น ACC รวมทั้งเปลี่ยน Ile จาก ATA เป็น ATC (Komine et. al., 1990) จากนั้น เชื่อมต่อกับดีเอนเอพาหะ pET-28a ตั้งชื่อเป็น pET-*has*A (rare) แล้วtransform เข้าในเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ต่างๆคือ *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* BL21 (codon$^+$) และ *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS จากการทดลองพบว่า pET-*has*A(rare) มีการแสดงออกของยีน *has*A โดยพบแถบโปรตีนของเอนไซม์ hyaluronan synthase ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้เฉพาะใน *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS ดังแสดงในภาพที่ 5

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในดีเอนเอลูกผสมจากข้อ 4. ไม่พบว่ามีการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการโคลนยีน *has*A เพียงตัวเดียว ถึงแม้จะมีการผลิตเอนไซม์ไฮยาลูโรแนน ซินเทสได้ แต่ไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก กล่าวคือในการสร้างกรดไฮยาลูโรนิกนั้นอาจต้องการสับสเตรทบางตัวซึ่งไม่มีในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหายีนที่เกี่ยวข้องและจำเป็นต่อการสร้าง

กรดชนิดนี้ใน *E. coli* ซึ่งจากข้อมูลที่มีอยู่พบว่าในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตามธรรมชาติของ *S. pyogenes* จำเป็นต้องอาศัยความช่วยเหลือของเอนไซม์อีก 2 ตัวคือ UDP-glucose dehydrogenase และ UDP-glucose pyrophosphorylase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *has*B และ *has*C ตามลำดับ (Cameron และคณะ, 1998) อีกวิธีหนึ่งคือ ทำการเลือกเฟ้นหา *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้แล้ว

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยนี้สามารถโคลนยีน *has*A จาก *S. zooepidemicus* ซึ่งเป็น Group C Streptococcus ได้ ด้วยวิธี PCR โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนของไฮยาลูโรแนน ซินเทส ที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่น โดยมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ 1.25 กิโลเบส ยีน *has*A สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนไฮยาลูโรแนน ซินเทส (ชื่อย่อว่า sz HAS) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คำนวณได้คือ 47.77 kDa โปรตีนนี้มี 2 transmembrane domain ที่ปลายอะมิโนและมี 2-3 transmembrane domain ที่ปลายคาร์บอกซิล เมื่อนำท่อนดีเอนเอของ *Streptococcus* ซึ่งมียีน *has*A มาเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR แล้วนำท่อนดีเอนเอที่ได้นี้มาเชื่อมต่อกับดีเอนเอพาหะสำหรับการแสดงออกคือ pET 28a (Invitrogen, USA) จากนั้นทดลองนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านหลายสายพันธุ์ ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้ได้ใน *E.coli* BL 21 (codon+) เท่านั้น แต่มีระดับต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากรหัสของกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโนของ HAS เป็นรหัสที่ไม่ค่อยใช้ใน *E. coli* ดังนั้นจึงทำการดัดแปลงรหัสสำหรับกรดอะมิโนบางตัวที่ปลายอะมิโน อย่างไรก็ตามพบว่า *E. coli* นี้ถึงแม้จะมีพลาสมิด pHAS ที่ดัดแปลงรหัสแล้วและสามารถสร้างเอนไซม์ไฮยาลูโรแนนซินเทสแต่ไม่สามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกได้ ดังนั้นน่าจะต้องมีการโคลนยีนตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไฮยาลูโนิกร่วมด้วย ซึ่งจากข้อมูลพบว่าในการผลิตกรดไฮยาลูโรนิกตามธรรมชาติใน *S. pyogenes* ซึ่งเป็น Group A Streptococcus จำเป็นต้องอาศัยความช่วยเหลือของเอนไซม์อีก 2 ตัว คือ UDP-glucose dehydrogenase และ UDP-glucose pyrophosphorylase ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน *has*B และ *has*C ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปน่าจะทำการโคลนยีนทั้งสองนี้ด้วย

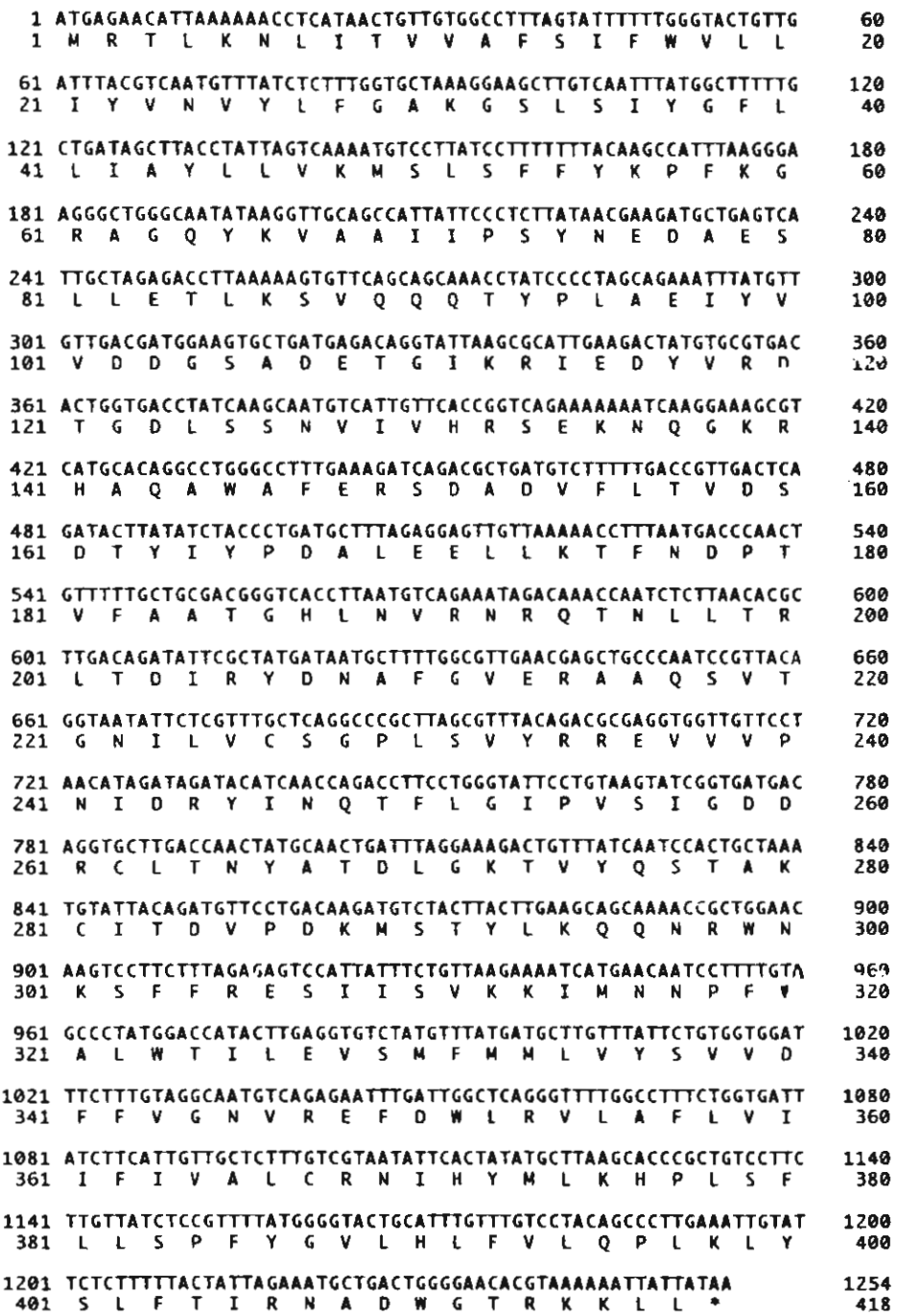

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *S. zooepidemicus* HAS ORF. The DNA sequence (top row) of the ORF encoding szHAS was cloned from genomic DNA of *S. zooepidemicus*. The encoded amino acid sequence is shown on the bottom row.

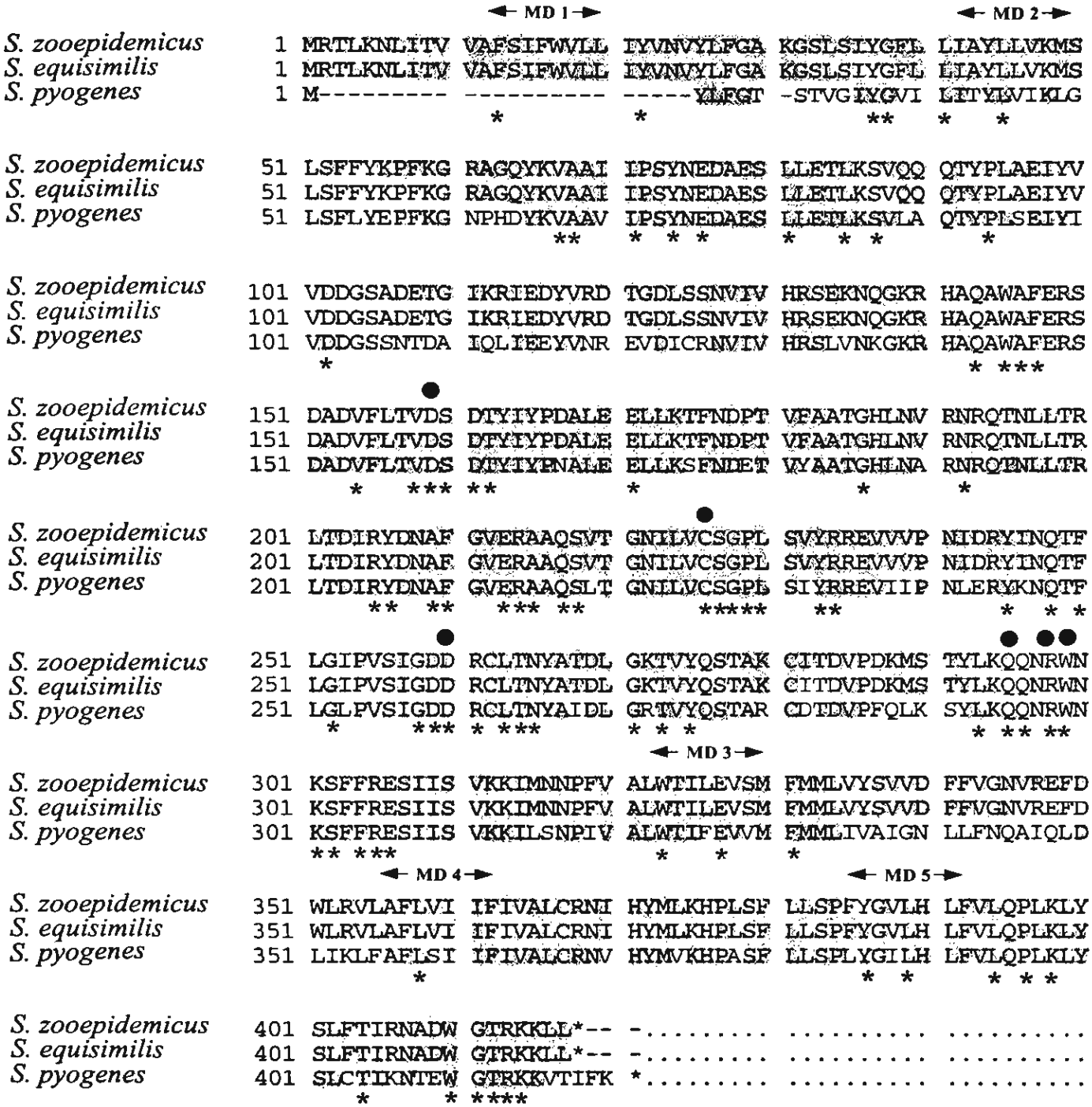

Fig. 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of HAS from *S. zooepidemicus* with *S. equisimilis* and *S. pyogenes*. The alignment was adjusted to the degree of overall sequence similarity with *S. zooepidemicus* using the DNASIS software (Hitachi Software, Yokohama, Japan). Identical amino acids are shown on a black background. Residues in szHAS that are identical in all other HAS family members (including human HAS1, HAS2 and HAS3, which are not shown) are denoted by asterisks. The amino acids indicated by dots are conserved in all members of the larger β-glycosyltransferase family (Nagahashi et.al.,1995). The approximate midpoints of predicted membrane domains (MD) 1 though 5 are indicated.

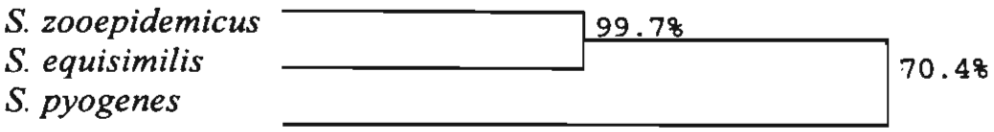

Fig.3. Evolutionary relationships among the 3 hyaluronan synthases. The phylogenetic tree was generated by the Higgins-Sharp (Higgins and Sharp, 1988) algorithm using the DNASIS multiple alignment program. The program takes as input a dendrogram produced by applying the UPGMA method (Sneath and Sokai, 1973) to a matrix of similarity scores for all of the aligned sequences. The calculated matching percentages are indicated at each branch point of the dendrogram.

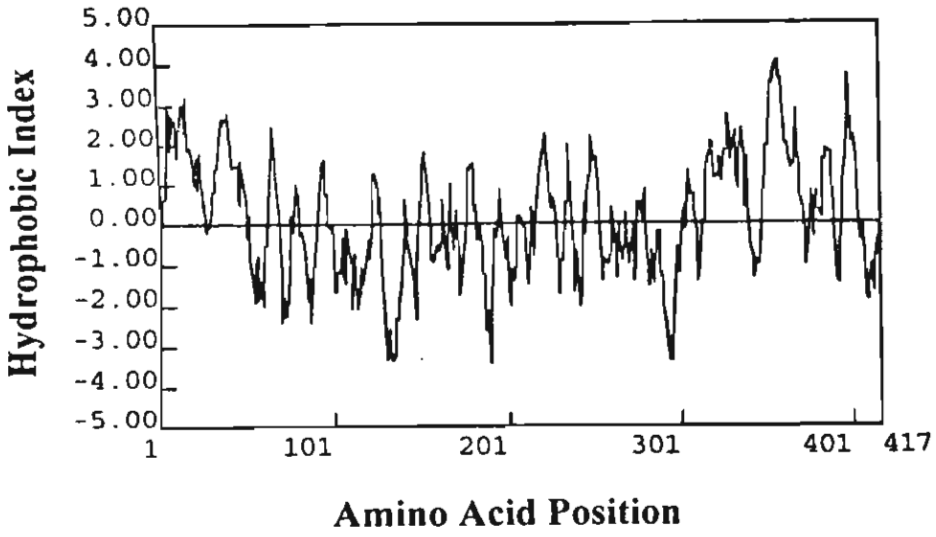

Fig. 4. Hydropathic analysis of the deduced amino acid sequence of HAS from *S. zooepidemicus*. The hydropathic indices are on the Y-axis and amino acid numbers for HAS (1-417) are on the X-axis. The hydrophobicity values were obtained according to the algorithm of Kyte and Doolittle (Kyte and Doolittle,1982). Positive values represent increased hydrophobicity.

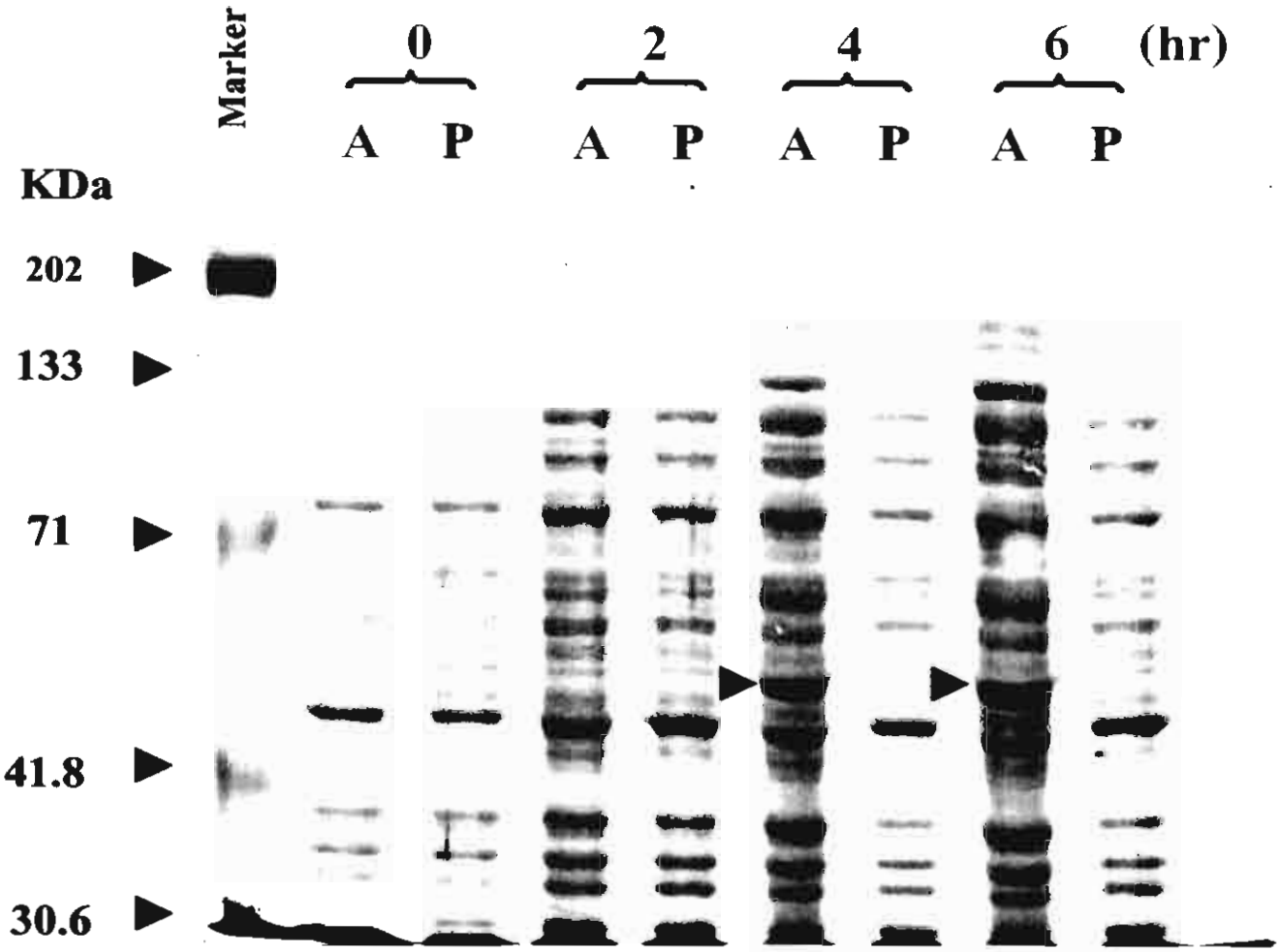

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of overexpressed streptococcal HAS in *E. coli* HMS 174(DE3) pLysS at induction time 0, 2, 4 and 6 hrs. The gel was stained with Coomassie Blue R-250. The position of HAS is marked by the arrow.

lane A : recombinant pHAS-r (pET-28a + modified *has*A)

lane P : vector alone (pET-28a)

เอกสารอ้างอิง

Brinkmann, U., Matles, R.E. and Buekel, P (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of dna Y gene product. *Gene*. **85**, 109-114.

Caparon, M.G. and Scott, J.R. (1991) Genetic manipulation of pathogenic Streptococci. *Methods Enzymol.* **204**: 556-586.

Chen GF, Inouye M. (1990). Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res.* **18**(6):1465-1473.

DeAngelis, P.L. and Achyuthan, A. M. (1996) Yeast-derived recombinant DG42 protein of Xenopus can synthesize hyaluronan in vitro. *J. Biol. Chem.* **271**: 23657-23660.

DeAngelis, P.L. and Weigel, P.H. (1994) Immunochemical confirmation of the primary structure of Streptococcal hyaluronan synthase and synthesis of high molecular weight product by the recombinant enzyme. *Biochemistry* **33**: 9033-9039.

Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hyaluronic acids. *J. Biol. Chem.* **164**, 189-198.

Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene **73**(1): 237-244.

Komine Y, Adachi T, Inokuchi H, Ozeki H. (1990). Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol.* **212**(4):579-698.

Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono,N., Sawada, R.,Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. (1995) Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J. Biol. Chem.* **270**: 13961-13967.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Ncad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

Sneath, P.H.A. and Sokai, R.R. (1973) Numerical Taxonomy, W.H. Freeman & Co., San Francisco.

Sorensen, M.A, Kurland, C.G. and Pedersen S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli. J. Mol. Biol.* **207**(2):365-377.

Weigel, P.H., Hascall, V.C., and Tammi, M. (1997) Hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 13997-14000.

Zhang, S.P., Zubay, G.and Goldmam, E. (1991). Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*.**105**(1):61-72.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Jongsareejit, B., Pewnim, T., Bhumiratana, A., Masaaki, M. and Kanaya, S. (2003). Molecular Cloning and Sequence of the Hyaluronan Synthase (HAS) Gene from Group C *Streptococcus zooepidemicus.* (manuscript submitted to FEMS Microbiol. Lett.)

2. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

ในเชิงวิชาการ : คือ มีการเริ่มต้นงานวิจัยและพัฒนาห้องปฏิบัติการวิจัยทางด้านอณูพันธุศาสตร์ขึ้นมาอย่างจริงจังในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จนมีความพร้อมในระดับหนึ่งในการทำงานวิจัยด้านนี้ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาการเรียนการสอนวิชาพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ในภาควิชาด้วย นอกจากนั้นยังเป็นส่วนสำคัญที่ผลักดันให้ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยในสาขาที่ศึกษามา ซึ่งเท่ากับเป็นการสร้างนักวิจัยใหม่ รวมทั้งมีการติดต่อแลกเปลี่ยนความรู้กับผู้วิจัยในประเทศญี่ปุ่น และประเทศออสเตรเลียด้วย ซึ่งหากได้รับการสนับสนุนต่อไปก็คาดว่าจะนำไปสู่การสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับต่างประเทศต่อไปได้

ในเชิงพาณิชย์ : โดยหากมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องต่อไป คาดว่าจะสามารถผลิตกรดไฮยาลูโรนิกเป็นการค้าได้ ซึ่งจะเป็นการลดการเสียดุลการค้าจากการนำเข้าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากต่างประเทศได้

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Jongsareejit, B., Bhumiratana, A., Masaaki, M. and Kanaya, S. (2001). Molecular Cloning and Sequence of the Hyaluronan Synthase (HAS) Gene from Group C *Streptococcus zooepidemicus.* In the Proceeding of BioThailand 2001 (From Research to Market), Gueen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

ภาคผนวก

บทความวิจัยสำหรับการเผยแพร่

Molecular Cloning and Sequence of the Hyaluronan Synthase (HAS) Gene from Group C *Streptococcus zooepidemicus*

Boonsri Jongsareejit[1], Thanit Pewnim[2], Amaret Bhumiratana[3]
Masaaki Morikawa[4], Shigenori Kanaya[4]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000, Thailand
[2] Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000, Thailand
[3] Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[4] Department of Material & Life Science, Graduate school of Engineering, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

The cloning of hyaluronan synthase (HAS) gene of *Streptococcus zooepidemicus* (group C Streptococcus, GCS) was performed by the strategy of the polymerase chain reaction (PCR), using the design of degenerate oligonucleotides based upon conserved sequences from other organisms. The PCR product was isolated, and then characterized by DNA sequencing. The nucleotide sequence was determined and the deduced amino acid sequence was then compared with known HAS sequences. The amino acid sequence showed high similarity to other known HAS. In order to obtain the entire *has*A sequence, gene walking was performed. Sequence analysis indicated that *has*A encode a protein; hyaluronan synthase, designated szHAS, 417-amino acids protein (calculated molecular mass, 47.77 kDa). The protein has two putative transmembrane domains at the amino terminus and 2-3 transmembrane domains at the carboxyl end. Streptococcus DNA fragment containing *has*A was amplified using PCR. The amplified fragment was incorporated into expression vector pET-28a (Invitrogen, USA). The pHAS, bearing the *has*A has been transformed into *E. coli* BL21 DE 3, *E. coli* BL 21 (codon+) and *E. coli* HMS 174 (DE3) plysS. The result showed that the *has*A could only express in *E. coli* BL 21 (codon+). However, the expression level was made in disappointingly small amounts. One factor influencing expression level might be the result of rare codon usage of some codons near the N-terminus of *has*A which could have severe effects on protein yield. Therefore, the rare codon modifications near the N-terminus of *has*A were performed. However, the *E. coli* host could not produce HA even if they contain the pHAS plasmid with the rare codon modifications and could produce hyaluronan synthase.

Keywords: Hyaluronic acid, Hyaluronan synthase, *Streptococcus* sp., Polysaccharide engineering, Gene cloning

Introduction

Hyaluronic acid (HA) is a naturally occurring polysaccharide composed of a β 1,4-linked repeating disaccharide of glucuronic acid and 1,3-linked to *N*-acetylglucosamine. HA is a major constituent of the vitreous humor of the eye, synovial fluid, extracellular matrices, and skin. The polysaccharide also interacts with various receptors and binding proteins that modulate cellular behavior such as migration, adhesion, and wound healing. Since the discovery of HA, much attention has focussed on the possible biomedical applications of highly purified HA fractions. Numerous studies have proven that HA isolated from various sources has an identical chemical structure. Therefore, since it is already present in the human body, exogenously applied HA of sufficient purity is highly biocompatible (i.e. it does not provoke adverse host reactions) and completely biodegradable by natural catabolic pathways.

In order to fulfill the raw material requirements for products for the biomedical applications, the identification of dependable and economically viable sources of HA has been an industrial priority. Initially, attention was focussed on the extraction of HA from animal tissues. Numerous tissue sources, including umbilical cord, skin and rooster combs, have been evaluated. Subsequently, rooster comb HA became the most widely used and traditionally accepted source both from an industrial and regulatory point of view. However, the high-molecular-weight material from animal source is difficult and costly to isolate due to the fact that the HA is complexed with proteoglycans. Therefore, attention has turned in recent years to the identification of alternative HA sources. Interestingly, HA is also found in the extracellular capsule of pathogenic group A and group C *Streptococci*. The enzyme that polymerizes the polysaccharide is HA synthase. It is now clear that, in group A streptococci, a single protein utilizes both sugar substrate; UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) and UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA), to synthesize HA (DeAngelis and Weigel, 1994). The abbreviation HAS, for the HA synthase, has gained widespread support for designating this class of enzymes. However, in this study we try to clone group C Streptococci which has been used for HA production in industry.

The molecular cloning of genes encoding enzymes responsible for hyaluronan biosynthesis is one of the essential steps in elucidating details of HA biosynthetic pathway in group C Streptococci. The cloning will also help in paving ways to improve enzyme function and resulting in non-pathogenic mutants for larger production of the desired hyaluronic acid which ensure the absence of other toxic impurities

Materials and Methods

Materials

Media reagents were purchased from Difco (Michigan, USA). Restriction and DNA modifying enzymes were purchased from Promega (Madison, USA). Synthetic oligonucleotides were made at the Bioservice Unit, National Science and Technology Development Agency, Thailand. All other reagents were of the highest grade available from Sigma chemical company (St. Louis, MO) except where state otherwise.

Microorganisms and plasmids

The selected strain of *Streptococcus zooepidemicus* was used through out the experiments. The *Escherichai coli* host strain TOP 10 was used as hosts for pCR®-Blunt and pBAD-TOPO® vector (Invitrogen, USA). *E.coli* strain JM 109 was used as host for pUC18/19, and PCR 2.1 cloning vector (original TA cloning vector kit) (Invitrogen, USA) and pCR® Blunt cloning vector. *E. coli* strain BL21 DE3, strain BL21 (codon+) and strain HMS 174 (DE3) pLysS were used as host for pET-28a expression vector (Invitrogen, USA). Unless otherwise noted, streptococci were grown in Brain Heart Infusion (BHI) and *E.coli* strains were grown in LB medium.

Isolation of streptococcal DNA

Genomic DNA was isolated from *S. zooepidemicus* by the method of Caparon and Scott (1991) with slight modifications.

Gene cloning by PCR

The genomic DNA was used as the template for the polymerase chain reaction. The hyaluronan synthase gene (*has*A) region was amplified with designed primers. PCR was performed in a thermocycler (Geneamp PCR System 2400, Perkin Elmer, Foster, CA) using the following program: i) 1 cycle of 95°C for 2 min, 45°C for 3 min, and 72°C for 5 min; ii) 30 cycles of 95°C for 45 sec , 45°C for 30 sec, and 72°C for 1 min 30 sec. The amplified products was separated on an agarose gel electrophoresis and purified using the Gene clean kit (BIO 101. Inc.) The DNA fragment was directly sequenced. The remaining portion of the *has*A gene was obtained by gene walking.

Southern and colony hybridizations

Southern blot analysis was performed according to standard procedures. Probe labelling hybridization and immunological detection was performed using the digoxigenin DNA labelling system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) and, as a probe, a DNA fragment amplified by PCR using appropiate primers. A fragment, which gave the strongest signal, was cut from a preparative agarose gel and ligated into the appropiate site of the pUC19 vector. *E. coli* JM109 was transformed with the recombinant plasmids and then a plasmid gene library was established.

Colony hybridization was also performed by the digoxigenin DNA labelling system (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Recombinant plasmids from colonies that gave positive signals was analyzed by restriction digestion following Southern hybridization analysis to confirm that the insert DNA originated from *S. zooepidemicus*.

DNA sequence analysis

DNA sequence analysis was performed by the dideoxynucleotide chain termination method modified from that described by Sanger et al. (1977) with fluorescent primers (Auto Read Sequencing kit, Pharmacia Biochemicals, Uppsala,

Sweden) using an automated DNA sequencing system (ALF express, Pharmacia Biochemicals, Uppsala, Sweden). The nucleotide and deduced amino acid sequences were analyzed using DNASIS™ software (Hitachi softwares Co. Ltd., Tokyo, Japan).

Expression cloning of the putative hasA in E. coli

PCR primers were designed at the start and stop codon regions of szHAS to contain a *Nde*I restriction site in the sense oligonucleotide and a *Bam*HI site in the antisense oligonucleotide. Using Taq DNA polymerase (Promega, USA), these primers amplified a 1.4-kb PCR product from genomic DNA of *S. zooepidemicus*. The amplified fragment was purified by agarose gel electrophoresis, and cloned into PCR 2.1 vector. Then, the recombinant plasmid was extract and cut with *Nde*I and *Bam*HI. The *Nde*I–*Bam*HI fragment was ligated into pET-28a® (Invitrogen, USA), expression vector. The recombinant plasmid, bearing the *has*A gene from *S. zooepidemicus*, as designated pHAS-1 was transformed into *E. coli* JM 109 and *E. coli* BL 21 DE 3, respectively. Furthermore, the pHAS-1 was transformed into *E.coli* BL 21 (codon$^+$) and *E.coli* HMS 174 (DE3) pLysS cells in order to examine the expression level. Screening of the positive transformant was performed by colony PCR.

Production of HAS

E. coli strain BL21 DE3, strain BL21 (codon+) or strain HMS 174 (DE3) pLysS cells carrying the expression plasmid were grown at 37°C in LB medium containing kanamysin (50 μg/ml) until the optical density at 660 nm reached 0.4. Expression was then induced with 1 mM isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and cells were incubated for 4 hr at 37°C. The cells were harvested by centrifugation 8,000x g for 10 min at 4°C and washed with buffer twice. The cells were disrupted by sonication. The disrupted bacteria were centrifuged at 120,000 g for 60 min at 4°C. The membranes were suspended in appropriate buffer. The suspension were incubated for 30 min at 37°C with 1 mM-UDP-*N*-acetylglucosamine and 1 mM-UDP-glucuronic acid. The membranes was separated from the substrate buffer by ultracentrifugation at 120,000x g for 30 min. The membranes were suspended in appropiate buffer. Triton X-114 was added to a final concentration of 2%(v/v) at 4°C. The suspension was subjected to ultracentrifugation and the supernatant was used for further analysis.

Electrophoretic analyses

The subunit molecular weight of HA was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

HA Production and Determination

Hyaluronic acid concentration in the culture broth was determined by the carbazole method measuring uronic acid (Dische, 1947; Bernfeld, 1955; Miller, 1958). The culture broth was centrifuged at 3,000x g for 20 min. After the cells were removed, 2 volumes of ethanol were added to 1 volume of the supernatant from the

culture broth and the solution was refrigerated at 4°C for 1 h to precipitate hyaluronic acid. The precipitate was recovered, redissolved in distilled water, and analyzed for the hyaluronic acid concentration.

Results and Discussion

Cloning of hasA from the S. zooepidemicus chromosome

Comparative analysis of the amino acid sequences of spHAS (*S. pyogenes*), DG42 (*Xenopus laevis* HAS) (DeAngelis and Achyuthan, 1996) and nodC (a *Rhizobium meliloti* modulation factor) (Nagahashi et al., 1995) has revealed the existence of conserved regions. Therefore, we designed two deoxyoligonucleotide primers for PCR. The PCR product was isolated, introduced into pCR®-Blunt cloning vector, and the insert was then characterized by DNA sequencing. The nucleotide sequence was determined and the deduced amino acid sequence was then compared with known HAS sequences. The amino acid showed high similarity to other known HAS. In order to obtain the entire *has*A sequence, Southern hybridization was performed using the PCR fragment as a probe against chromosomal DNA of *S. zooepidemicus* which were digested with *Hin*dIII, *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I or *Sal*I.

*Sequence analysis of has*A

HAS, the enzyme that polymerizes HA from *S. zooepidermicus* is composed of 417 amino acids with a calculated molecular mass of 47.77. Kda, and the predicted pI of 9.01. It is the same number of amino acids with *S. equisimilis*. The DNA sequence and the deduced amino acid sequences are shown in Fig. 1. Interestingly, amino acid sequence of *S. zooepidemicus* showed 99.7 % match to *S. equisimilis* and 70.4 % match to *S. pyogenes* by the homology search, as shown in Fig. 2 and 3.

The overall membrane topology predicted for szHAS (Fig. 4) was identical to that for seHAS (from *S. equisimilis*) and sp HAS (from *S. pyrogenes*) and the eukaryotic HASs reported thus far (Weigel et.al.,1997). The protein has two putative transmembrane domains at the amino terminus and 2-3 membrane-associated or transmembrane domains at the carboxyl end. The hydropathy plots for the three streptococcal enzymes are virtually identical.

Nucleotide sequence accession number

The *S. zooepidemicus has*A nucleotide sequence has been assigned Accession No. BankIt 419336 AF 414053 by GenBank.

*Expression cloning of the putative has*A *in E. coli*

The complete coding region of the *has*A gene from *S. zooepidemicus* was amplified using PCR with a set of forward and reverse primers. The recombinant plasmid, pHAS, bearing the *has*A gene from *S. zooepidemicus* was constructed and transformed into *E. coli* BL 21 DE 3, *E.coli* BL 21 (codon+) and *E.coli* HMS 174

(DE3) pLysS. The result showed that the *has*A could only express in *E.coli* BL 21 (codon+). However the expression level was made in disappointingly small amounts. One factor influencing expression level might be the result of rare codon usage near the N-terminus of *has*A which could have severe effects on protein yield (Zhang et al., 1991; Sorensen et al., 1989; Brinkmann et.al., 1989; Chen and Inouye, 1990). Therefore, the new designed primer near the N-terminus of *has*A which the Arg codon changed was from AGA to CGT and Thr codon from ACA to ACC as well as Ile codon from ATA to ATC were performed (Komine et.al., 1990). We found that the expression of modified rare codons of *has*A could only express in *E.coli* HMS 174 (DE3) pLysS as shown in Fig. 5. However, the *E. coli* host could not produce HA even if they contain the pHAS plasmid and could produce hyaluronan synthase. It might be that they require another enzyme to generate other substrates for HA production. As we know, the hyaluronic acid production in *S. pyogenes* need 2 more enzymes; UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase, encoded by *has*B and *has*C respectively. Therefore, the result suggesting that gene cloning of *has*B and/or *has*C may be required for HA production in *E. coli*

Acknowledgment

This work has been supported by grants from the Thailand Research Fund (PDF/30/2542) and Silpakorn University as well as the JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Large scale cooperative research program in the field of Biotechnology.

References

Brinkmann, U., Matles, R.E. and Buekel, P (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of dna Y gene product. *Gene.* **85**, 109-114.

Caparon, M.G. and Scott, J.R. (1991) Genetic manipulation of pathogenic Streptococci. *Methods Enzymol.* **204**: 556-586.

Chen GF, Inouye M. (1990). Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res.* **18**(6):1465-1473.

DeAngelis, P.L. and Achyuthan, A. M. (1996) Yeast-derived recombinant DG42 protein of Xenopus can synthesize hyaluronan in vitro. *J. Biol. Chem.* **271**: 23657-23660.

DeAngelis, P.L. and Weigel, P.H. (1994) Immunochemical confirmation of the primary structure of Streptococcal hyaluronan synthase and synthesis of high molecular weight product by the recombinant enzyme. *Biochemistry* **33**: 9033-9039.

Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hyaluronic acids. *J. Biol. Chem.* **164**, 189-198.

Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene **73**(1): 237-244.

Komine Y, Adachi T, Inokuchi H, Ozeki H. (1990). Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol.* **212**(4):579-698.

Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono,N., Sawada, R.,Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. (1995) Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J. Biol. Chem.* **270**: 13961-13967.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Ncad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467.

Sneath, P.H.A. and Sokai, R.R. (1973) Numerical Taxonomy, W.H. Freeman & Co., San Francisco.

Sorensen, M.A, Kurland, C.G. and Pedersen S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli. J. Mol. Biol.* **207**(2):365-377.

Weigel, P.H., Hascall, V.C., and Tammi, M. (1997) Hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 13997-14000.

Zhang, S.P., Zubay, G.and Goldmam, E. (1991). Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*.**105**(1):61-72.

```
   1 ATGAGAACATTAAAAAACCTCATAACTGTTGTGGCCTTTAGTATTTTTTGGGTACTGTTG     60
   1  M  R  T  L  K  N  L  I  T  V  V  A  F  S  I  F  W  V  L  L     20

  61 ATTTACGTCAATGTTTATCTCTTTGGTGCTAAAGGAAGCTTGTCAATTTATGGCTTTTTG    120
  21  I  Y  V  N  V  Y  L  F  G  A  K  G  S  L  S  I  Y  G  F  L     40

 121 CTGATAGCTTACCTATTAGTCAAAATGTCCTTATCCTTTTTTTACAAGCCATTTAAGGGA    180
  41  L  I  A  Y  L  L  V  K  M  S  L  S  F  F  Y  K  P  F  K  G     60

 181 AGGGCTGGGCAATATAAGGTTGCAGCCATTATTCCCTCTTATAACGAAGATGCTGAGTCA    240
  61  R  A  G  Q  Y  K  V  A  A  I  I  P  S  Y  N  E  D  A  E  S     80

 241 TTGCTAGAGACCTTAAAAAGTGTTCAGCAGCAAACCTATCCCCTAGCAGAAATTTATGTT    300
  81  L  L  E  T  L  K  S  V  Q  Q  Q  T  Y  P  L  A  E  I  Y  V    100

 301 GTTGACGATGGAAGTGCTGATGAGACAGGTATTAAGCGCATTGAAGACTATGTGCGTGAC    360
 101  V  D  D  G  S  A  D  E  T  G  I  K  R  I  E  D  Y  V  R  D    120

 361 ACTGGTGACCTATCAAGCAATGTCATTGTTCACCGGTCAGAAAAAAAATCAAGGAAAGCGT    420
 121  T  G  D  L  S  S  N  V  I  V  H  R  S  E  K  N  Q  G  K  R    140

 421 CATGCACAGGCCTGGGCCTTTGAAAGATCAGACGCTGATGTCTTTTTGACCGTTGACTCA    480
 141  H  A  Q  A  W  A  F  E  R  S  D  A  D  V  F  L  T  V  D  S    160

 481 GATACTTATATCTACCCTGATGCTTTAGAGGAGTTGTTAAAAACCTTTAATGACCCAACT    540
 161  D  T  Y  I  Y  P  D  A  L  E  E  L  L  K  T  F  N  D  P  T    180

 541 GTTTTTGCTGCGACGGGTCACCTTAATGTCAGAAATAGACAAACCAATCTCTTAACACGC    600
 181  V  F  A  A  T  G  H  L  N  V  R  N  R  Q  T  N  L  L  T  R    200

 601 TTGACAGATATTCGCTATGATAATGCTTTTGGCGTTGAACGAGCTGCCCAATCCGTTACA    660
 201  L  T  D  I  R  Y  D  N  A  F  G  V  E  R  A  A  Q  S  V  T    220

 661 GGTAATATTCTCGTTTGCTCAGGCCCGCTTAGCGTTTACAGACGCGAGGTGGTTGTTCCT    720
 221  G  N  I  L  V  C  S  G  P  L  S  V  Y  R  R  E  V  V  V  P    240

 721 AACATAGATAGATACATCAACCAGACCTTCCTGGGTATTCCTGTAAGTATCGGTGATGAC    780
 241  N  I  D  R  Y  I  N  Q  T  F  L  G  I  P  V  S  I  G  D  D    260

 781 AGGTGCTTGACCAACTATGCAACTGATTTAGGAAAGACTGTTTATCAATCCACTGCTAAA    840
 261  R  C  L  T  N  Y  A  T  D  L  G  K  T  V  Y  Q  S  T  A  K    280

 841 TGTATTACAGATGTTCCTGACAAGATGTCTACTTACTTGAAGCAGCAAAACCGCTGGAAC    900
 281  C  I  T  D  V  P  D  K  M  S  T  Y  L  K  Q  Q  N  R  W  N    300

 901 AAGTCCTTCTTTAGAGAGTCCATTATTTCTGTTAAGAAAATCATGAACAATCCTTTTGTA    960
 301  K  S  F  F  R  E  S  I  I  S  V  K  K  I  M  N  N  P  F  V    320

 961 GCCCTATGGACCATACTTGAGGTGTCTATGTTTATGATGCTTGTTTATTCTGTGGTGGAT   1020
 321  A  L  W  T  I  L  E  V  S  M  F  M  M  L  V  Y  S  V  V  D    340

1021 TTCTTTGTAGGCAATGTCAGAGAATTTGATTGGCTCAGGGTTTTGGCCTTTCTGGTGATT   1080
 341  F  F  V  G  N  V  R  E  F  D  W  L  R  V  L  A  F  L  V  I    360

1081 ATCTTCATTGTTGCTCTTTGTCGTAATATTCACTATATGCTTAAGCACCCGCTGTCCTTC   1140
 361  I  F  I  V  A  L  C  R  N  I  H  Y  M  L  K  H  P  L  S  F    380

1141 TTGTTATCTCCGTTTTATGGGGTACTGCATTTGTTTGTCCTACAGCCCTTGAAATTGTAT   1200
 381  L  L  S  P  F  Y  G  V  L  H  L  F  V  L  Q  P  L  K  L  Y    400

1201 TCTCTTTTTACTATTAGAAATGCTGACTGGGGAACACGTAAAAAATTATTATAA         1254
 401  S  L  F  T  I  R  N  A  D  W  G  T  R  K  K  L  L  *          418
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *S. zooepidemicus* HAS ORF. The DNA sequence (top row) of the ORF encoding szHAS was cloned from genomic DNA of *S. zooepidemicus*. The encoded amino acid sequence is shown on the bottom row.

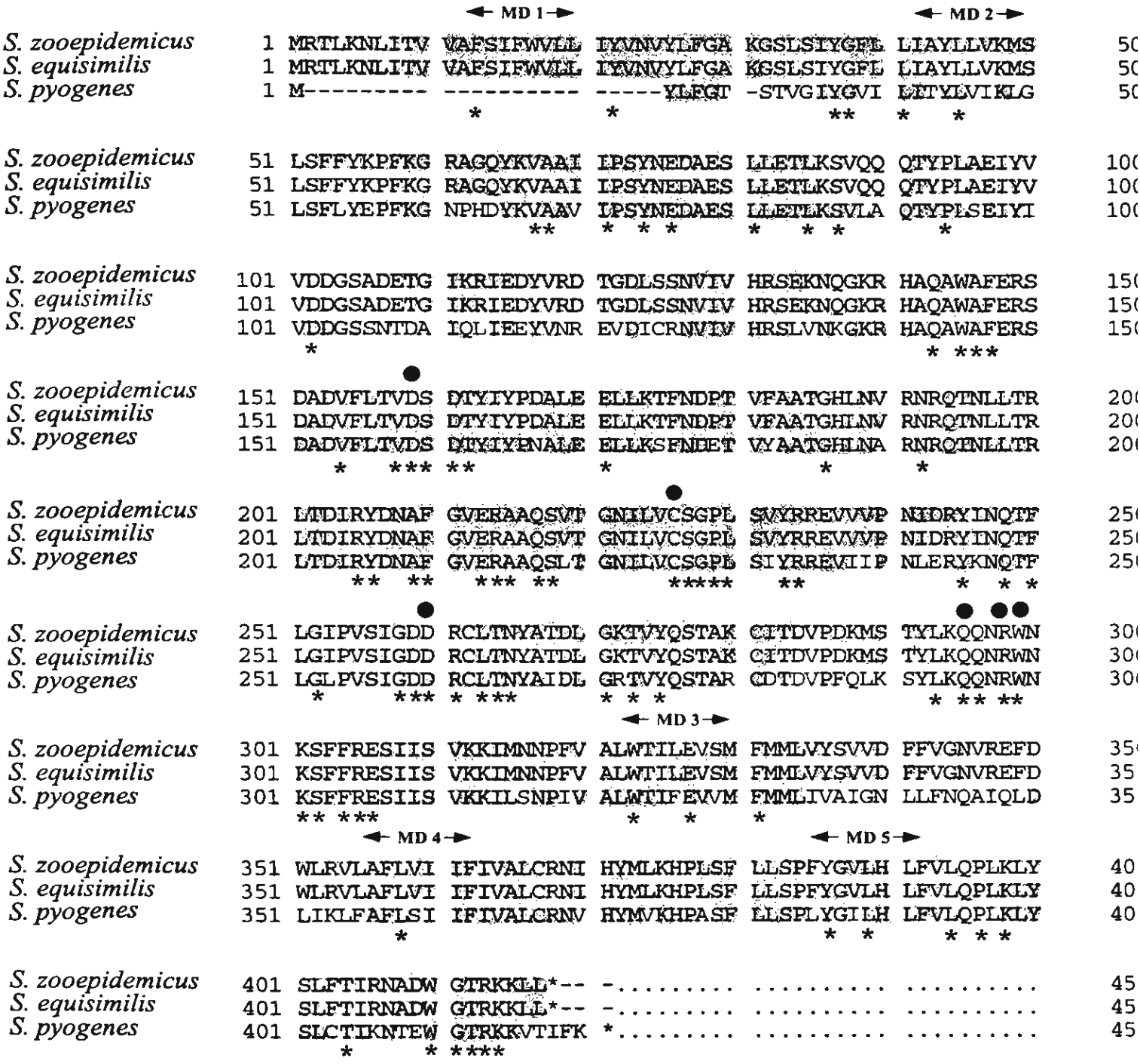

Fig. 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of HAS from *S. zooepidemicus* with *S. equisimilis* and *S. pyogenes*. The alignment was adjusted to the degree of overall sequence similarity with *S. zooepidemicus* using the DNASIS software (Hitachi Software, Yokohama, Japan). Identical amino acids are shown on a black background. Residues in szHAS that are identical in all other HAS family members (including human HAS1, HAS2 and HAS3, which are not shown) are denoted by asterisks. The amino acids indicated by dots are conserved in all members of the larger β-glycosyltransferase family (Nagahashi et.al.,1995). The approximate midpoints of predicted membrane domains (MD) 1 though 5 are indicated.

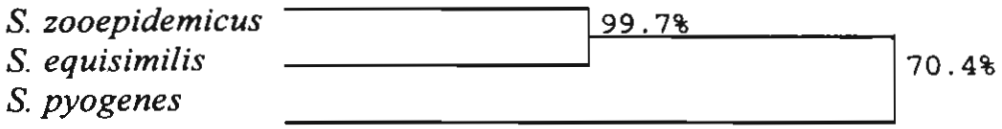

Fig.3. Evolutionary relationships among the 3 hyaluronan synthases. The phylogenetic tree was generated by the Higgins-Sharp (Higgins and Sharp, 1988) algorithm using the DNASIS multiple alignment program. The program takes as input a dendrogram produced by applying the UPGMA method (Sneath and Sokai, 1973) to a matrix of similarity scores for all of the aligned sequences. The calculated matching percentages are indicated at each branch point of the dendrogram.

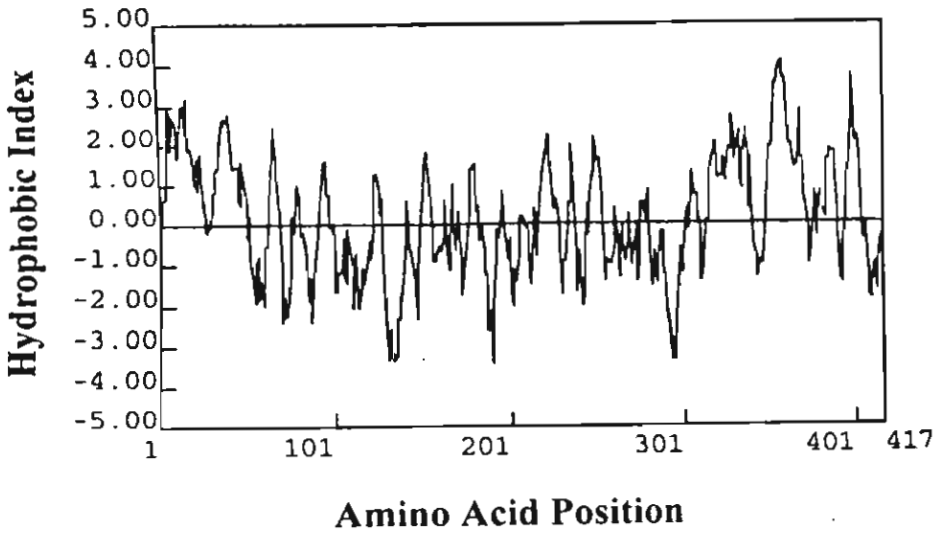

Fig. 4. Hydropathic analysis of the deduced amino acid sequence of HAS from *S. zooepidemicus*. The hydropathic indices are on the Y-axis and amino acid numbers for HAS (1-417) are on the X-axis. The hydrophobicity values were obtained according to the algorithm of Kyte and Doolittle (Kyte and Doolittle,1982). Positive values represent increased hydrophobicity.

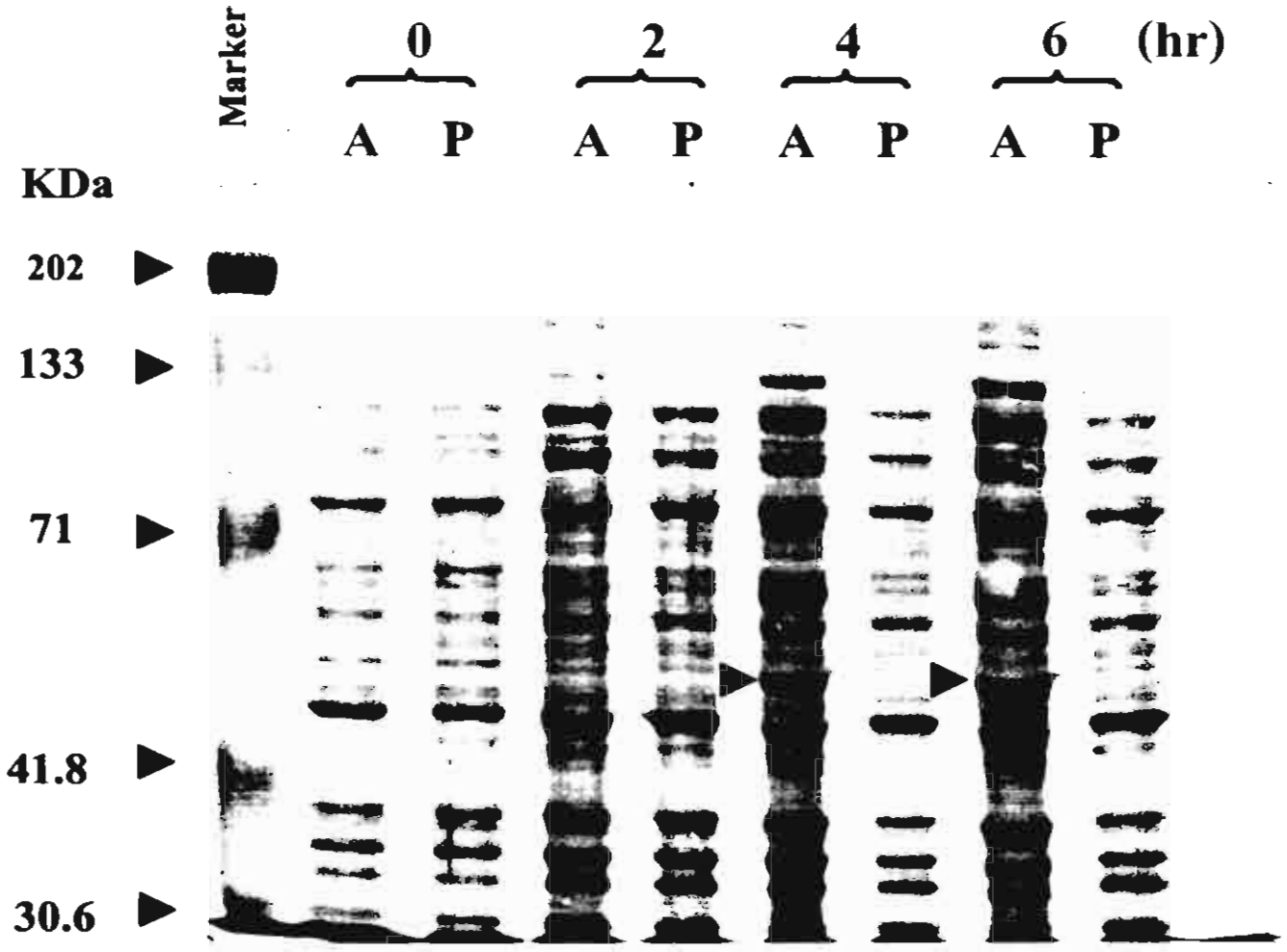

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of overexpressed streptococcal HAS in *E. coli* HMS 174(DE3) pLysS at induction time 0, 2, 4 and 6 hrs. The gel was stained with Coomassie Blue R-250. The position of HAS is marked by the arrow.
lane A : recombinant pHAS-r (pET-28a + modified *has*A)
lane P : vector alone (pET-28a)