

ลักษณะสมบัติของไซโตเต็ม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์และเอนไซม์บีเทน-ไฮโมซิสเตอินเมทิลทรานสเฟอร์เรส
ของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

นางสาวรุ่งอรุณ วาดีดี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0357-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20556573

CHARACTERIZATION OF SODIUM/PROTON ANTIporter AND BETAINE-HOMOCYSTEINE
METHYLTRANSFERASE OF A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*

MISS RUNGAROON WADITEE

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2001

ISBN 974-03-0357-9

Thesis Title Characterization of sodium/proton antiporter and betaine-homo
cysteine methyltransferase of a halotolerant cyanobacterium
Aphanothece halophytica


By Rungaroon Waditee

Field of Study Biochemistry

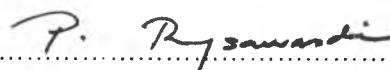
Thesis Advisor Associate Professor Aran Incharoensakdi


Thesis Co-advisor Professor Teruhiro Takabe

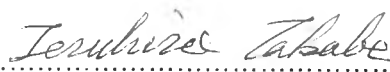
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctor 's Degree

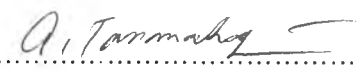

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph. D.)

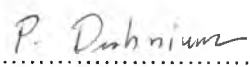
Thesis committee


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


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph. D.)


..... Thesis Co-advisor
(Professor Teruhiro Takabe, Ph. D.)


..... Member
(Associate Professor Anchalee Tassanakajorn, Ph. D.)


..... Member
(Patcharaporn Dejnium, Ph. D.)

นางสาวรุ่งอรุณ วาติที : ลักษณะสมบัติของโซเดียม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์และเอนไซม์บีเทน-โฮโมซิสเตอีนเมทิลทรานสเฟอเรสของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*. (CHARACTERIZATION OF SODIUM/PROTON ANTIporter AND BETAINE-HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE OF A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. อรุณ อินเจริญศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : PROFESSOR DR. TERUHIRO TAKABE 126 หน้า. ISBN 974-03-0357-9

ยีนบริเวณที่กำหนดรหัสการสร้างโซเดียม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์จากไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*, *apnhaP*, ได้ถูกแยกโดยใช้เทคนิคอินเวอร์สพีซีอาร์ พบว่ายีนนี้ถอดรหัสให้เป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วย 521 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุล 56,881 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ hydropathy plot ประกอบกับโปรแกรม transmembrane prediction พบว่าโปรตีน ApNhaP ประกอบด้วย transmembrane 11 segment จากการเปรียบเทียบความคล้าย (homology) ของยีนนี้กับกลุ่มของโซเดียม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์ในฐานข้อมูล พบว่าโซเดียม/โปรตอนแอนติพอร์เตอร์จาก *A. halophytica* มีความคล้ายกับโซเดียม/โปรตอน แอนติพอร์เตอร์ของพืช (*SOS1* และ *AINHX1* จาก *Arabidopsis*) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (*NHEs* จากมนุษย์) และแบคทีเรีย (*nhaP* จาก *Pseudomonas* และ *synnhaP* จาก *Synechocystis*) แต่แสดงความจำเพาะต่อการแลกเปลี่ยนแคทไอออนโปรตอน โปรตีน ApNhaP ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีน *apnhaP* แสดงกิจกรรมของการแลกเปลี่ยนโซเดียม/โปรตอน ตั้งแต่ช่วงพีเอชทดสอบ 5 – 9 และสามารถคอมพลีเมนต์กับสายพันธุ์กลายพันธุ์ *E. coli* TO114 ($\Delta nhaA\Delta nhaB\Delta chaA$) โปรตีน ApNhaP ไม่ปรากฏกิจกรรมการแลกเปลี่ยนลิเทียม/โปรตอนทุกค่าพีเอชทดสอบ แต่แสดงกิจกรรมการแลกเปลี่ยนแคลเซียม/โปรตอนในช่วงพีเอชที่แตกต่าง ในการศึกษาครั้งนี้ได้สร้างยีนลูกผสม 2 ชนิดคือ *apsynnhaP* และ *synapnhaP* ซึ่งชนิดแรกกำหนดรหัสการสร้างบริเวณปลายเอ็น(N-terminal) ซึ่งเป็นส่วน transmembrane ของยีน *apnhaP* และบริเวณปลายซี (C-terminal) ซึ่งเป็นส่วน cytosolic ของยีน *synnhaP* ส่วนชนิดที่สองรหัสการสร้างบริเวณปลายเอ็น ซึ่งเป็นส่วน transmembrane ของยีน *synnhaP* และบริเวณปลายซี ซึ่งเป็นส่วน cytosolic ของยีน *apnhaP* ผลิตภัณฑ์ของยีนลูกผสมทั้งสองชนิดคือ ASNhaP และ SANhaP ถูกนำมาตรวจสอบกิจกรรมการแลกเปลี่ยน แคทไอออนโปรตอน เปรียบเทียบกับโปรตีนต้นตอ (ApNhaP และ SynNhaP) เป็นที่น่ายินดีว่าโปรตีนลูกผสม ASNhaP แสดงกิจกรรมการแลกเปลี่ยนลิเทียม/โปรตอน ซึ่งไม่เคยตรวจสอบพบใน ApNhaP ส่วนยีนลูกผสมชนิด SANhaP มีกิจกรรมการแลกเปลี่ยนทั้งโซเดียม/โปรตอน และ ลิเทียม/โปรตอนลดลง จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าปลายด้านซีมีส่วนเกี่ยวข้องกับความจำเพาะในการแลกเปลี่ยนไอออน

อีกส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบการย่อยสลายไกลซีนบีเทนใน *A. halophytica* พบว่าสภาวะที่มีผลในการชักนำให้เกิดการย่อยสลายไกลซีนบีเทนเกิดขึ้นเมื่อเซลล์เผชิญกับภาวะความเครียดของเกลือที่ลดต่ำลง ซึ่งในการย่อยสลายไกลซีนบีเทนนี้พบว่าเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์บีเทน-โฮโมซิสเตอีนเมทิลทรานสเฟอเรส เมื่อเซลล์เผชิญภาวะความเครียดของเกลือที่ลดลงจาก 2.0 โมลาร์เป็น 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปริมาณไกลซีนบีเทนในเซลล์ลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 460 นาโนโมล ชั่วโมง⁻¹ มิลลิกรัมโปรตีน⁻¹ กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเซลล์เผชิญภาวะขาดคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ได้ทำเอนไซม์บีเทน-โฮโมซิสเตอีนเมทิลทรานสเฟอเรสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี hydroxyapatite DEAE-Sepharose CL-6B และ Sephadex G-200 ตามลำดับและพบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 24 เท่า ได้ปริมาณผลผลิตสุดท้าย 11 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 595 นาโนโมล ชั่วโมง⁻¹ มิลลิกรัมโปรตีน⁻¹ เมื่อตรวจสอบมวลโมเลกุลของเอนไซม์ในภาวะที่เสียสภาพโดยการทำให้ SDS-PAGE พบว่าขนาด 45 กิโลดาลตัน และมวลโมเลกุลของเอนไซม์ในภาวะธรรมชาติมีขนาด 350 กิโลดาลตัน ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์นี้มีลักษณะโครงสร้างที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย 8 หน่วย เอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.5 ค่า Km สำหรับไกลซีนบีเทนและแอล-โฮโมซิสเตอีน เท่ากับ 4.3 มิลลิโมลาร์และ 1.3 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วย 5 มิลลิโมลาร์ไดเมทิลไกลซีนประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนซารโคซีนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อย สารอานาลอกของไกลซีนบีเทนสองชนิดคือโคลิโนและบีเทนแอลดีไอด์ ได้ถูกทดสอบผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า 5 มิลลิโมลาร์โคลิโนมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรม 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 2.5 มิลลิโมลาร์บีเทนแอลดีไอด์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมดเช่นกัน

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิลิต.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... (11หน้า)

4173841723 : MAJOR Biochemistry
 KEY WORD : SODIUM/PROTON ANTIporter / *Aphanothece halophytica* / BETAINE-HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE
 RUNGARON WADITEE CHARACTERIZATION OF SODIUM/PROTON ANTIporter AND BETAINE-HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE OF A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*
 THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph. D.,
 THESIS CO-ADVISOR : PROF. TERUHIRO TAKABE, Ph. D., 126 pp.
 ISBN 974-03-0357-9

The coding region of the Na^+/H^+ antiporter gene from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*, *apnhaP*, was isolated by Inverse Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The predicted gene product consists of 521 amino acids with a molecular mass of 56.881 Da. Analysis of the hydropathy plot and the transmembrane prediction program predicted 11 putative transmembrane segments in ApNhaP. It turned out that *A. halophytica* contains an Na^+/H^+ antiporter homologous to plants (*SOS1* and *AtNHX1* from *Arabidopsis*), mammals (*NHEs* from human), and some bacteria (*nhaP* from *Pseudomonas* and *synnhaP* from *Synechocystis*), but with novel ion specificity. Its gene product, ApNhaP, exhibited the Na^+/H^+ antiporter activity over a wide range of pH between 5 and 9 and complemented the Na^+ -sensitive mutant *E. coli* TO114 ($\Delta nhaA\Delta nhaB\Delta chaA$). The ApNhaP had virtually no activity of Li^+/H^+ antiporter, but showed high $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter activity at alkaline pH. The chimeric gene which encodes the N-terminal transmembrane region of *apnhaP* and the C-terminal cytosolic region of *synnhaP* and vice versa was constructed. Its gene products, ASNhaP and SANhaP, were examined for antiporter activity compared with two parental types (ApNhaP and SynNhaP). Interestingly, the Li^+/H^+ exchange activity which was virtually non-detectable in ApNhaP could be clearly observed in the ASNhaP chimeric protein. SANhaP chimeric protein showed reduced exchange activity of both Na^+/H^+ and Li^+/H^+ antiporter activity compared to the parental SynNhaP. These results suggest that the ion specificity of an Na^+/H^+ antiporter is partly determined by the structural properties of the C-terminal tail which was well exemplified in the case of *A. halophytica*.

The degradation of glycinebetaine in *A. halophytica* was also investigated in this study. It was found that glycinebetaine degradation occurred when cells were subjected to hypoosmotic stress (salt downshock) and this degradation was caused by the activity of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT). The intracellular glycinebetaine level was decreased approximately 50% after salt downshock from 2.0 M to 0.5 M NaCl medium. The activity of BHMT increased from 0 to 460 $\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ after 3 h of salt downshock. Small increase of the enzyme activity was also observed when *A. halophytica* was deprived of carbon and nitrogen sources in the growth medium.

BHMT was purified to homogeneity by hydroxyapatite, DEAE-Sepharose CL-6B and Sephadex G-200 column chromatography. A 24-fold purification and 11% overall yield were achieved with a specific activity of 595 $\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$. The subunit molecular mass was determined to be 45 kDa by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the native enzyme was found to have a molecular mass of 350 kDa, suggesting an octameric structure of the enzyme. The enzyme showed optimum activity at 37°C, pH 7.5. The apparent K_m values for glycinebetaine and L-homocysteine were 4.3 mM and 1.3 mM, respectively. The enzyme was 70% inactivated by 5 mM dimethylglycine whereas the same concentration of sarcosine slightly inactivated the enzyme. Two analogs of glycinebetaine were also tested for enzyme inactivation and it was found that 5 mM choline inactivated 60% of the enzyme activity and 2.5 mM betaine aldehyde completely abolished the enzyme activity. NaCl at 200 mM or higher also completely inactivated the enzyme.

DepartmentBiochemistry.....
 Field of study..... Biochemistry.....
 Academic year....2001.....

Student's signature.....
 Advisor's signature.....
 Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENT



I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate professor Dr. Aran Incharoensakdi and my co-advisor, Professor Dr. Teruhiro Takabe, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajorn and Dr. Patcharaporn Deshniem for serving as thesis committee, for their available comments and also useful suggestions.

My appreciation is also expressed to Dr. Tetsuko Takabe, Dr. Takashi Hibino, Dr. Yoshito Tanaka, Dr. Hiroshi Ishikawa, Dr. Tetsunosuke Nakamura, Dr. Kiyomo Ono, Dr. Etsuko Araki, Dr. Akira Hamada, Toshie Inaba and Eiko Tsuenekawa for their help in laboratory and suggestion during my stay in Japan.

Sincere thanks are also extended to all staff members and friends of Biochemistry Department and Biotechnology Program for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents, my sister for their unlimited love, support and understanding.

This work was supported by Royal Golden Jubilee Ph. D. Scholarship from the Thailand Research Fund and AIEJ Scholarship.

CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Regulation of ions.....	1
The accumulation of organic compound.....	6
Glycinebetaine: characteristics and functions.....	8
Glycinebetaine: synthesis and degradation.....	9
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	13
2.1 Instruments.....	13
2.2 Chemicals.....	13
2.3 Supplies.....	14
2.4 Kit.....	17
2.5 Enzymes and restriction enzymes.....	17
2.6 Bacterial strains and plasmids.....	18
2.7 Isolation and characterization of <i>A. halophytica</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter, <i>apnhaP</i>	19
2.7.1 <i>A. halophytica</i> culture condition.....	19

2.7.2 Chromosomal DNA extraction.....	19
2.7.3 Isolation of <i>A. halophytica</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter.....	20
2.7.4 Construction of expression plasmids.....	21
2.7.5 Na ⁺ /H ⁺ antiporter activity.....	22
2.7.6 Construction of chimeric genes.....	23
2.7.7 Quantitation of ApNhaP mRNA expression level.....	25
2. 7. 7. 1 <i>A. halophytica</i> culture condition.....	25
2. 7. 7. 2 Total RNAs extraction	25
2. 7. 7. 3 Quantitation of ApNhaP mRNA expression level.....	26
2.7.8 Immunoblotting.....	28
2.8 Degradation of glycinebetaine in <i>A. halophytica</i>	29
2.8.1 Condition for induction of betaine-homocysteine methyltransferase in <i>A. halophytica</i>	29
2. 8. 1. 1 BHMT assay.....	29
2. 8. 1. 2 Determination of glycinebetaine.....	30
2.8.2 Determination of intermediate product(s) of BHMT activity.....	30
2. 8. 2. 1 Labelling <i>A. halophytica</i>	31
2. 8. 2. 2 Extraction of radioactive compound (s).....	31
2. 8. 2. 3 Identification of radioactive compound (s)...	31
2.8.3 Purification of BHMT and its properties.....	32
2. 8. 3.1 Cell extraction.....	32

2. 8. 3. 2 Hydroxyapatite Column Chromatography..	32
2. 8. 3. 3 Sepharose CL-6B Column Chromatography	33
2. 8. 3. 4 Sephadex G-200 Column Chromatography...	33
2. 8. 3. 5 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	35
2. 8. 3. 6 The properties of BHMT.....	35
CHAPTER III RESULTS.....	37
3.1 Isolation and characterization of <i>A. halophytica</i>	
Na ⁺ /H ⁺ antiporter, <i>apnhaP</i>	37
3.1.1 Isolation of <i>A. halophytica</i> Na ⁺ /H ⁺ antiporter.....	37
3.1.2 Construction of expression plasmids and..... complementation test.....	41
3.1.3 Na ⁺ /H ⁺ antiporter activity.....	48
3.1.4 Construction of chimeric genes.....	53
3.1.5 Quantitation of ApNhaP mRNA expression level..	60
3.1.6 Immunoblotting.....	62
3.2 Degradation of glycinebetaine in <i>A. halophytica</i>	63
3.2.1 Condition for induction of betaine-homocysteine methyltransferase in <i>A. halophytica</i>	63
3.2.2 Determination of intermediate product(s) of BHMT activity.....	63
3.3.3 Purification of BHMT and its properties.....	67
CHAPTER IV DISCUSSION.....	82

CHAPTER V CONCLUSION.....	91
REFERENCES.....	93
APPENDICES.....	106
BIOGRAPHY.....	126

LIST OF TABLES

	PAGE
Table 1 Primer and probes for isolation and expression of Na ⁺ /H ⁺ antiporter Genes and for detection of their mRNA levels.....	18
Table 2 Purification of BHMT from <i>A. halophytica</i>	72
Table 3 Effect of substrate analog on BHMT activity.....	80
Table 4 Effect of NaCl on BHMT activity.....	81

LIST OF FIGURES

	PAGE
Figure 1.1 Structure of some compatible solutes.....	7
Figure 1.2 Proposed pathway of glycinebetaine degradation in <i>Rhizobium</i> <i>Meliloti</i>	11
Figure 2.1 Schematic figure for construction of chimeric gene.....	24
Figure 3.1 Genomic organization of the <i>apnhaP</i> locus of <i>A. halophytica</i> . and nucleotide sequence of the junction region between a <i>apnhaP</i> and <i>cyt.c 550</i>	39
Figure 3.2 Alignment of the deduced amino acid sequences of Na ⁺ /H ⁺ antiporters from eight organisms and Phylogenetic analysis of eight Na ⁺ /H ⁺ antiporters.....	40
Figure 3.3 Topology model of ApNhaP.....	41
Figure 3.4 PCR product of <i>apnhaP</i> analysed on agarose electrophoresis.....	43
Figure 3.5 Analysis of pANhaP with <i>NcoI</i> and <i>HindIII</i> on agarose gel electrophoresis.....	44
Figure 3.6 Effects of NaCl on the growth rates of three kinds of <i>E. coli</i> cells.....	45
Figure 3.7 Effects of pH and NaCl on the growth rates of three kinds of <i>E.</i> <i>coli</i> cells.....	47
Figure 3.8 The activities of Na ⁺ /H ⁺ antiporters measured by the acridine orange fluorescence quenching method.....	49

Figure 3.9 The activities of Cation/Proton antiporters measured by the acridine orange fluorescence quenching method.....	50
Figure 3.10 Effects of LiCl and CaCl ₂ on the growth rates of three kinds of <i>E. coli</i> cells.....	52
Figure 3.11 Schematic figure for construction of chimeric genes pASNhaP and pSANhaP.....	53
Figure 3.12 Analysis of pASNhaP restriction cut on agarose gel electrophoresis.....	54
Figure 3.13 Analysis of pSANhaP with restriction cut on agarose gel Electrophoresis.....	55
Figure 3.14 The activities of chimeric antiporters.....	58
Figure 3.15 Effects of NaCl, LiCl and CaCl ₂ on the growth rates of <i>E. coli</i> cells expressing ASNhaP and SANhaP chimera.....	59
Figure 3.16 Total RNAs of <i>A. halophytica</i> upon salinity change analysed on agarose gel electrophoresis.....	60
Figure 3.17 ApNhaP mRNA expression level in intact <i>A. halophytica</i> upon salinity change.....	61
Figure 3.18 Immunoblotting analyses of pANhaP expressing cells.....	62
Figure 3.19 Effect of salt downshock on glycinebetaine level.....	64
Figure 3.20 Activity of BHMT and level of glycinebetaine in response to saltshock.....	65
Figure 3.21 Effect of carbon and nitrogen starvation on BHMT activity and glycinebetaine level.....	66

Figure 3.22 Autoradiogram of radioactive compound (s) extracted from intact cell of <i>A. halophytica</i> under hypoosmotic stress.....	67
Figure 3.23 Hydroxyapatite chromatography of <i>A. halophytica</i> BHMT.....	69
Figure 3.24 Sepharose CL-6B chromatography of <i>A. halophytica</i> BHMT...	70
Figure 3.25 Sephadex G-200 chromatography of <i>A. halophytica</i> BHMT.....	71
Figure 3.26 Estimation of molecular mass of <i>A. halophytica</i> BHMT by gel filtration chromatography.....	73
Figure 3.27 Estimation of molecular mass of <i>A. halophytica</i> BHMT by SDS-PAGE.....	74
Figure 3.28 Effect of pH on BHMT activity.....	76
Figure 3.29 Effect of temperature on BHMT activity.....	77
Figure 3.30 Double reciprocal plot of activity of partially purified BHMT as a function of the concentration of the substrate, glycinebetaine.....	78
Figure 3.31 Double reciprocal plot of activity of partially purified BHMT as a function of the concentration of the substrate, L-homocysteine.....	79

LIST OF ABBREVIATIONS

A	Absorbance
Asp	Aspartic acid
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BHMT	Betaine-homocysteine methyltransferase
Ci	Curie
cm	Centimeter
°C	Degree celsius
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
g	Gram
hr	Hour
l	Litre
mA	Milliampere
min	Minute
μl	Microlitre
ml	Millilitre
mM	Millimolar
M	Molar

LIST OF ABBREVIATIONS

A	Absorbance
Asp	Aspartic acid
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
BHMT	Betaine-homocysteine methyltransferase
Ci	Curie
cm	Centimeter
°C	Degree celsius
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
g	Gram
hr	Hour
l	Litre
mA	Milliampere
min	Minute
μl	Microlitre
ml	Millilitre
mM	Millimolar
M	Molar

nm	Nanometer
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revolution per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBE	Tris/borate electrophoresis (buffer)
TE	Tris/EDTA (buffer)
TM	Trans-membrane
UV	Ultraviolet
V	Volume

ABBREVIATION OF GENES, PLASMIDS AND PROTEINS

<i>apnhaP</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter gene from <i>Aphanothece halophytica</i>
<i>synnhaP</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter gene from <i>Synechocystis</i> sp.PCC6803
<i>apsynnhaP</i>	Chimeric gene in which N-terminal transmembrane region is <i>apnhaP</i> and C-terminal region is <i>synnhaP</i>
<i>synapnhaP</i>	Chimeric gene in which N-terminal transmembrane region is <i>synnhaP</i> and C-terminal region is <i>apnhaP</i>
ApNhaP	Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein from <i>Aphanothece halophytica</i>
SynNhaP	Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein from <i>Synechocystis</i> sp.PCC6803
ASNhaP	Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein from chimeric gene <i>apsynnhaP</i>
SANhaP	Na ⁺ /H ⁺ antiporter protein from chimeric gene <i>synapnhaP</i>
pANhaP	Recombinant plasmid harboring <i>apnhaP</i>
pSNhaP	Recombinant plasmid harboring <i>synnhaP</i>
pASNhaP	Recombinant plasmid harboring <i>apsynnhaP</i>
pSANhaP	Recombinant plasmid harboring <i>synapnhaP</i>