

การโคลนยีนและศึกษาคุณลักษณะของยีนโฮโมเจนติสโตไฟฟิวทรานสเฟอร์จากอัญชันและมะหาด

นางสาวธनिया วัฒนคุปต์



ห้องสมุดคณะเภสัชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5276954933

CLONING AND CHARACTERIZATION OF HOMOGENISATE PHYTYLTRANSFERASE GENES  
FROM *CLITORIA TERNATEA* AND *ARTOCARPUS LAKOOCHA*

Miss Thaniya Wunnakup



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Chemistry

Department of Biochemistry and Microbiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title CLONING AND CHARACTERIZATION OF  
HOMOGENISATE PHYTYLTRANSFERASE GENES  
FROM *CLITORIA TERNATEA* AND *ARTOCARPUS*  
*LAKOOCHA*

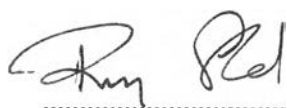
By Miss Thaniya Wunnakup

Field of Study Biomedical Chemistry

Thesis Advisor Associate Professor Wanchai De-eknamkul, Ph.D.


---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn  
University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

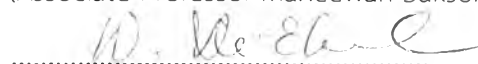


.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences  
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

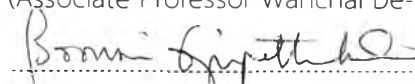
THESIS COMMITTEE



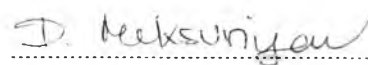
.....Chairman  
(Associate Professor Maneewan Suksomtip, Ph.D.)



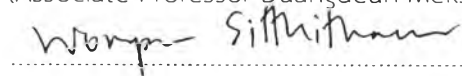
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Wanchai De-eknamkul, Ph.D.)



.....Examiner  
(Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, Ph.D.)



.....Examiner  
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)



.....External Examiner  
(Associate Professor Worapan Sitthithaworn, Ph.D.)



ธनिया วันณคุปต์ : การโคลนยีนและศึกษาคุณลักษณะของยีนโฮโมเจนทีเสตไฟทิวทรานสเฟอเรสจากอัญชันและมะหาด (CLONING AND CHARACTERIZATION OF HOMOGENITISATE PHYTYLTRANSFERASE GENES FROM *CLITORIA TERNATEA* AND *ARTOCARPUS LAKOOCHA*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วันชัย ดีเอโก นามกุล, 94 หน้า.

สารพรีนิวเอโรมาติกเป็นกลุ่มสารทุติยภูมิที่พบมากในพืช ซึ่งสารเหล่านี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยปฏิกิริยาการเติมหมู่พรีนิวด้วยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอโรมาติกพรีนิวทรานสเฟอเรส เอนไซม์จะทำการเติมหมู่พรีนิวที่มีความยาวของโครงสร้างที่ต่างกัน (C5, C10, C15 หรือ C20) ให้กับสับสเตรทที่เป็นเอโรมาติกที่ตำแหน่งต่าง ๆ ที่คาร์บอนของโครงสร้างเอโรมาติก ได้สารพรีนิวเอโรมาติกเป็นผลิตภัณฑ์ ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกยีนโฮโมเจนทีเสตไฟทิวทรานสเฟอเรส ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มของเอโรมาติกพรีนิวทรานสเฟอเรสและเกี่ยวข้องกับวิถีสังเคราะห์สารโทโคฟีรอลจากอัญชัน (*Clitoria ternatea: clt*) และมะหาด (*Artocarpus lakoocha: alrc2*) โดยยีน *clt* มีความยาวทั้งหมด 1,495 bp และมี ORF เท่ากับ 1,224 bp และยีน *alrc2* มีความยาวทั้งหมด 1,625 bp และมี ORF เท่ากับ 1,233 bp ยีนทั้งสองจะสังเคราะห์โปรตีน CTL และ ALRC2 ที่มีขนาด 407 และ 410 กรดอะมิโน ซึ่งทำนายน้ำหนักโมเลกุลได้ 45.58 kDa และ 45.59 kDa ตามลำดับ ในส่วนของลำดับของโปรตีนจะประกอบด้วยคุณลักษณะของเอนไซม์เอโรมาติกพรีนิวทรานสเฟอเรสประกอบด้วย สายเปปไทด์ส่งสัญญาณที่ปลายด้านอะมิโน (N-terminal) บริเวณจำเพาะที่จับกับสับสเตรท (NQXXDXXXD และ KDXDXD) และส่วนแอลฟาเฮลิคซ์ทรานสเมมเบรน จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ว่ายีนที่ได้มีความใกล้เคียงกับกลุ่มเอนไซม์โฮโมเจนทีเสตไฟทิวทรานสเฟอเรส และได้ทำการศึกษ การทำงานของเอนไซม์โดยการอาศัยการแสดงออกในต้นมะเขือเทศด้วยเทคนิค agroinfiltration จากนั้นทำการวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR และตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์โดยพบสาร intermediate และสารปลายทางของวิถีสังเคราะห์สารโทโคฟีรอล (DMPBQ และ  $\alpha$ -tocopherol) ด้วยเทคนิค TLC และ GC จากผลการทดลองพบว่าหลังจากนำยีน *clt* และ *alrc2* เข้าสู่ใบมะเขือเทศเป็นเวลา 3 วัน พบการสะสมของ  $\alpha$ -tocopherol ที่เพิ่มขึ้น  $2.4 \pm 0.38$  และ  $1.4 \pm 0.05$  เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่ายีน *clt* และ *alrc2* ทั้งสองนี้เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์โฮโมเจนทีเสตไฟทิวทรานสเฟอเรส

ภาควิชา ชีวเคมีและจุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต ธनिया วันณคุปต์

สาขาวิชา ชีวเวชเคมี

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก วันชัย ดีเอโก

ปีการศึกษา 2557

# # 5276954933 : MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY

KEYWORDS: HOMOGENTISATE PHYTYLTRANSFERASE / CLITORIA TERNATEA / ARTOCARPUS LAKOOCHA /  $\alpha$ -TOCOPHEROL

THANIYA WUNNAKUP: CLONING AND CHARACTERIZATION OF HOMOGENTISATE PHYTYLTRANSFERASE GENES FROM *CLITORIA TERNATEA* AND *ARTOCARPUS LAKOOCHA*.  
ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., 94 pp.

Prenylated aromatic compounds are secondary metabolites found to be distributed in various plant families. The group of key enzymes catalyzing the prenylation reaction to produce these prenylated aromatic compounds is called aromatic prenyltransferases (PTases). Each of these enzymes transfers a prenyl group in different lengths (C5, C10, C15 or C20) to an aromatic substrate at a specific carbon position to form a prenylated aromatic product. In this study, two genes encoding similar homogentisate phytyltransferases (HPT), a member of aromatic PTases were isolated from *Clitoria ternatea* L. (*clt*) and *Artocarpus lakoocha* Rox. (*alc2*). The full-length cDNAs of *clt* and *alc2* were 1,495 and 1,625 bp in size, containing 1,224 bp and 1,233 bp ORF, respectively. The *clt* and *alc2* genes encoded CLT and ALRC2 proteins of 407 and 410 amino acids with predicted MWs of 45.58 and 45.59 kDa, respectively. Both proteins contained important characteristics of aromatic PTase structures, including a signal transit peptide at N-terminal, Asp-rich regions of substrate binding site (NQXXDXXXD and KDXDXD), and nine trans-membrane  $\alpha$ -helices. According to the results from phylogenetic analysis, both were closely related to the HPT family members. The functional study of *clt* and *alc2* was then carried out in tomato by transient expression using agroinfiltration method, and evaluated by RT-PCR. For their enzyme activities, these were indirectly evaluated by detection of the accumulation of the intermediate 2,3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinone (DMPBQ) and the pathway product  $\alpha$ -tocopherol by TLC and GC-MS. The results revealed that the isolated *clt* and *alc2* could enhance the  $\alpha$ -tocopherol accumulation in tomato leaves after 3 days agroinfiltration by  $2.4 \pm 0.38$  and  $1.4 \pm 0.05$  fold higher than control. Taken together, both genes were possibly functioned as HPT enzyme.

2747256186



Department: Biochemistry and Microbiology Student's Signature Thaniya Wannakup  
Field of Study: Biomedical Chemistry Advisor's Signature W. De-Eknakul  
Academic Year: 2014

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express deepest gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Wanchai De-Eknamkul for his advice and encouragement that lead me to finish my doctoral research. His comments helped me to establish overall direction of the research and reach my goal. I thank him for gave me the opportunity and freedom to explore on my own.

I am grateful Asst. Prof. Sorkanok Vimolmangkang and Dr. Worrawat Promden for suggestion with direction, technical support and teaching me how to do research that helped me sort out the detail of my work.

I thank my colleagues of our laboratory for sharing idea and become a good friend.

I also thankful to all staffs of my department (Biochemistry and microbiology, Faculty of pharmaceutical sciences) for kind advice and help in information management and always ready to help with smile.

I acknowledge the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund for providing scholarships for chemicals and faculty of pharmaceutical sciences for supporting.

Finally, none of this would have been possible without the love, patience and understanding of my family. They never complain and tell me to focus on my study. I fell so lucky to have them to be my parents.

## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	vii
List of Tables .....	xi
List of Figures .....	xii
CHAPTER I Introduction .....	1
CHAPTER II Literature review .....	3
2.1 Plant prenylated aromatic compounds .....	3
2.1.1 Prenylated flavonoids .....	3
2.1.2 Prenylated xanthenes .....	5
2.1.3 Prenylated quinones .....	6
2.2 Plant aromatic prenyltransferase .....	7
2.2.1 Aromatic prenyltransferase in prenylated flavonoid biosynthesis .....	8
2.2.2 Aromatic prenyltransferase in prenylated quinone biosynthesis .....	11
2.3 Characterize and function of aromatic PTases .....	14
2.4 <i>Artocarpus lakoocha</i> Rox .....	17
2.4.1 Plant description .....	17
2.4.2 Chemical constituents and biological activities of <i>A. lakoocha</i> .....	18
2.5 <i>Clitoria ternatea</i> L. ....	19
2.5.1 Plant description .....	19
2.5.2 Chemical constituents and biological activities in <i>C. ternatea</i> .....	20



	Page
CHAPTER III Material and Methods .....	21
3.1 Plant materials .....	21
3.2 Bacterial Strains.....	21
3.3 Plasmids.....	22
3.4 Total RNA extraction .....	22
3.5 Synthesis cDNA.....	23
3.6 Determination of core sequences encoding PTases .....	23
3.7 Determination of full length gene by rapid amplification of cDNA ends (RACE) .....	25
3.8 Determination of full length gene for prenyltransferases genes .....	29
3.9 Cloning of gene in pGEM®-T Easy Vector for sequencing.....	30
3.10 Bioinformatics analysis .....	31
3.11 Alkaline lysis method for plasmid extraction (Sambrook, et al., 1989).....	32
3.12 Presto™ Mini Plasmid Kit for plasmid extraction .....	32
3.13 Preparation of competent <i>E. coli</i> cells.....	33
3.14 Transformation by heat-shock .....	33
3.15 Construction of expression vector .....	34
3.15.1 pENTR™ /D-TOPO® vector.....	34
3.15.2 Binary vector.....	36
3.16 Preparation of competent <i>Agrobacterium</i> cells.....	36
3.17 Transformation of <i>A. tumefaciens</i> by electroporation .....	37
3.18 <i>Agrobacterium</i> infiltration into tomato leaves.....	37
3.19 Gene expression analysis.....	38





	Page
3.19.1 RT-PCR .....	38
3.20 Extraction of recombinant protein from tomato leaves.....	39
3.21 Protein analysis.....	40
3.21.1 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE) 40	40
3.21.2 Western blot.....	40
3.22 Tocopherol extraction .....	41
3.23 Chlorophyll analysis .....	41
3.24 Tocopherol analysis .....	42
3.24.1 Thin Layer Chromatography (TLC) .....	42
3.24.2 Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer (GC-MS).....	42
CHAPTER IV Results .....	44
4.1 Total RNA extraction .....	44
4.2 Isolation of core sequences from degenerate primers.....	44
4.3 Full length genes from RACE PCR .....	45
4.4 Cloning of full length genes .....	51
4.5 <i>In silico</i> protein identification and characterization.....	51
4.6 Phylogenetic analysis.....	59
4.7 Construction of plant expression vectors.....	62
4.8 Gene expression of <i>ctl</i> and <i>alrc2</i> overexpressed in tomato leaves .....	64
4.9 Recombinant protein expression in tomato leaves .....	67
4.10 Determination of tocopherol content in agroinfiltrated tomato leaves .....	68
4.11 Determination of total chlorophyll content in agroinfiltrated tomato leaves .....	68



	Page
CHAPTER V Discussion .....	76
CHAPTER VI Conclusion .....	83
REFERENCES .....	84
VITA.....	94



## List of Tables

	Pages
Table 1 Aspartate rich regions of plant aromatic PTases.....	16
Table 2 Specific primers the determination of PTase core sequence. ....	24
Table 3 The expected size PCR products of each pair of primers.....	24
Table 4 PCR thermal cycling condition for amplification of the core sequence. ....	25
Table 5 The specific primers for RACE PCR technique. ....	28
Table 6 The components of RACE PCR reaction. ....	28
Table 7 RACE PCR thermal cycling condition. ....	29
Table 8 The specific primers of full length gene.....	30
Table 9 PCR thermal cycling condition of full length gene. ....	30
Table 10 The components of ligation reaction for pGEM®-T Easy Vector. ....	31
Table 11 PCR thermal cycling condition of gene expression analysis. ....	39
Table 12 Summary of computed pI and MW of the deduced proteins.....	53
Table 13 List of transmembrane domains of ALRC2 and CTL. ....	54
Table 14 Sequence data analysis by TargetP.....	55
Table 15 Sequence data analysis by WoLF PSORT and Protcomp. ....	56

## List of Figures

	Pages
Figure 1 The example of plant prenylated flavonoids.....	4
Figure 2 The example of plant prenylated xanthenes.....	6
Figure 3 The example of plant prenylated quinones.....	7
Figure 4 The example of plant flavonoid prenylated prenyltransferases activity.....	10
Figure 5 The activity of p-hydroxybenzoate geranyltransferase (PGT) in shikonin biosynthesis. ....	11
Figure 6 Biosynthesis of tocopherol, tocotrienol and plastoquinone in plants.....	13
Figure 7 Phylogenetic relationship of aromatic prenyltransferases. ....	14
Figure 8 Leaves of <i>Artocarpus lakoocha</i> Rox.....	17
Figure 9 The secondary metabolites from <i>A. lakoocha</i> .....	19
Figure 10 Plant and flower of <i>Clitaria ternatea</i> L. ....	20
Figure 11 The strategies for RACE PCR. ....	27
Figure 12 The strategies for construction of expression vector.....	35
Figure 13 The alignment of western blot setup. ....	41
Figure 14 Agarose gel of the total RNA isolated from <i>C. ternatea</i> L. (A) and <i>A. lakoocha</i> Rox (B).....	44
Figure 15 Agarose gel of the partial gene sequences from <i>C. ternatea</i> L. (A) and <i>A. lakoocha</i> Rox (B) amplified by multiple pairs of the degenerate primers.....	45
Figure 16 Isolation of full length cDNA of <i>ctl</i> and <i>alrc2</i> by RACE PCR. The nested RACE-PCR products (5' and 3' fragments) from <i>C. ternatea</i> (A) and <i>A. lakoocha</i> (B) are shown on 1% agarose gel, M: 1 kb DNA marker.. ....	47
Figure 17 Agarose gels of <i>ctl</i> and <i>alrc2</i> coding sequence.....	48
Figure 18 The full length cDNA of <i>ctl</i> gene and its translated protein.....	49



Figure 19 The full length cDNA of <i>alrc2</i> gene and its translated protein.....	50
Figure 20 Verification of gene insertion to pGemT vector by restriction enzyme digestion are shown on 1% agarose gel against 1 kb DNA marker (M).....	51
Figure 21 PSI-blast search of the putative proteins CTL and ALRC2. ....	52
Figure 22 TMHMM analysis of ALRC2 and CTL protein sequences.. ....	55
Figure 23 Multiple alignment of prenyltransferases family in plants. ....	57
Figure 24 The graphical image of transmembrane prediction by SignalP, C-, S-, and Y-score cleavage site were predicted to be at position of maximal Y score (A) CTL and (B) ALRC2.....	58
Figure 25 The phylogenetic tree of putative protein sequences of CTL and ALRC2 and related prenyltransferase proteins in plants. ....	60
Figure 26 Phylogenetic trees for conserved amino acid sequences (the aspartate rich regions) of prenyltransferase family.....	61
Figure 27 The construction of the entry vector (pENTR <sup>TM</sup> /D-TOPO <sup>®</sup> harboring the <i>ctl</i> and <i>alrc2</i> genes were analyzed on 1% agarose gel against 1 kb DNA marker (M).....	63
Figure 28 The construction of the destination vector.. ....	64
Figure 29 Tomato leaves after infiltration of the recombinant expression vectors via <i>A. tumefaciens</i> -mediated transformation.....	66
Figure 30 RT-PCR expression analysis of <i>ctl</i> and <i>alrc2</i> in the agroinfiltrated tomato leaves at 1 – 9 dpa.. ....	67
Figure 31 Detection of the recombinant proteins by western blots analysis.....	68
Figure 32 The standard curve of $\alpha$ -tocopherol.....	69
Figure 33 The $\alpha$ -tocopherol and total chlorophyll contents in pGWB6:: <i>alrc2</i> and pGWB6:: <i>ctl</i> agroinfiltrated leaves.....	70
Figure 34 TLC patterns of tomato leaves expressing <i>alrc2</i> and <i>ctl</i> extracts.....	71

Figure 35 GC-MS chromatogram of infiltrated leaves in 3 dpa of pGWB6:: <i>ctl</i> showed the increase of metabolites.....	73
Figure 36 GC-MS analysis of the chemical profiles of phytol and fatty acids comparing between the transient expression of <i>ctl</i> (A) and <i>alrc2</i> (B) and $\alpha$ -tocopherol together with intermediates (MPBQ, DMPBQ) involved in the biosynthetic pathway of <i>ctl</i> (C) and <i>alrc2</i> (D) in tomato leaves at 1, 3, 6 and 9 dpa compare with control (empty vector: pGWB6)..	74
Figure 37 Mass spectra of silylated (A) $\alpha$ -tocopherol (12.955 min), (B) MPBQ (7.923 min) and (C) DMPBQ (8.203 min) from infiltrated leaves.	75

