ในการศึกษาบทบาทและความสำคัญของส่วน tandem repeats ในยีน *leuA* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ alpha-isopropylmalate synthase (α-IPMS) ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ดังกล่าว ที่เตรียมจากยีน *leuA* ปกติ และที่เตรียมจากยีน *leuA* ที่ได้ตัดส่วน tandem repeat ซึ่งยาวชุดละ 57 คู่เบส จำนวน 2 ชุด ออกโดยวิธี mutagenic PCR โดยยีน *leuA* ทั้ง 2 แบบได้ถูกเชื่อมต่อเข้ากับ expression vector pET15b และทำการสร้างเอนไซม์ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ B L 21(DE3) ซึ่งจากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 แบบถูกสร้างได้ดี เมื่อใช้สาร isopropylthio-β-galactoside ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในการกระตุ้นการทำงานของยีน และใช้อุณหภูมิ 25^0 ซ เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่ายีน *leuA* ที่ถูกตัดส่วน tandem repeats ออก สามารถกำหนดการสร้างα-IPMS ที่มี activity เทียบเท่าเอนไซม์ที่สร้างจากยีนปกติ โดยที่ mutated α-IPMS มีคุณสมบัติพื้นฐานใกล้เคียงกับเอนไซม์ปกติ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ และค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ความเสถียรในสภาพพีเอชต่างๆ และจำนวนหน่วยย่อยของเอนไซม์ สำหรับค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์พบว่า mutated α-IPMS มีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นผลมาจากการตัดส่วนของ tandem repeats ของยีน *leuA* ออก ผลจากการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า tandem repeat ดังกล่าว อาจไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *leuA* ในแง่การแสดงออกของยีน และคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ α-IPMS

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

In order to investigate for the role and significance of tandem repeats within *Mycobacterium tuberculosis leuA* gene encoding alpha-isopropylmatate synthase (α-IPMS), we compared the properties of native α-IPMS and mutated α-IPMS of which the 2 copies of 57 bp repeats had been deleted. By using mutagenic PCR procedure , we successfully constructed a recombinant plasmid of pET15b expression vector carrying the mutated gene. Optimum expression conditions were studied and properties of gene products were compared. Mutated gene was optimally amplified at 64^0C annealing temperature and well expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) at 25^0C for 3-6 hrs using isopropylthio - β-galactoside at the final concentration of 0.5 mM as inducer. Properties of both native and mutated enzymes were compared. The results showed that with deletion of the 2 copies of 57 bp tandem repeats, the mutated *leuA* can well expressed to a functional mutated α-IPMS. The basic properties of mutated α-IPMS was similar to the native α-IPMS. Mutated α-IPMS was smaller, corresponding to the deleted 2 copies of 19 amino acids repeats and the native form of the enzyme was also dimer. The optimal temperature and optimal pH for enzyme activity was between 30^0-50^0 C and 7.5 respectively. The stability of mutated α-IPMS also similar to the native α-IPMS. From this study, significant differenes was not observed between the two types of enzyme. These results showed that the 2 copies of 57 bp tandem repeats may have no relation to *leuA* expression and α-IPMS basic properties.

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