

4

การจำแนกลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์โครงสร้างของการตรึงไนโตรเจนของ  
AZOTOBACTER และ AZOSPIRILLUM SPP.

นางสาวยิ่งพิศ ยอดโยธี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดมหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN-974-569-099-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014420

117408850



PHYSICAL CHARACTERIZATION OF NIF STRUCTURAL GENES IN  
AZOTOBACTER AND AZOSPIRILLUM SPP.

MISS YINGPIT YODYOTEE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-099-6



Thesis Title Physical Characterization of nif Structural  
Genes in Azotobacter and Azospirillum spp.  
By Yingpit Yodyotee  
Department Biochemistry  
Thesis Advisor Assistant Professor Siriporn Siththipraneed

---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University  
in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's  
Degree.

*Thavorn Vajrabhaya* ..... Dean of Graduate School  
(Professor Dr. Thavorn Vajrabhaya)

Thesis Committee

*Jariya Boonjawat* ..... Chairman  
(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

*Siriporn Siththipraneed* ..... Member  
(Assistant Professor Siriporn Siththipraneed, Ph.D.)

*P. Thipayathasana* ..... Member  
(Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.)

*Preecha Kowin* ..... Member  
(Assistant Professor Preecha Kowin, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University





พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ยังพืด ยอดโยรี : การจำแนกลักษณะทางกายภาพของสัณโครงสร้างของการตรึงไนโตรเจน  
ของ Azotobacter และ Azospirillum spp. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ. ดร.  
ศิริพร ลิทธิประณีต

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพของจุลินทรีย์บางชนิด เกิดจากการทำงานของ  
เอนไซม์ ไนโตรซิเนส ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมและแสดงออกของสัณการตรึงไนโตรเจน ความรู้เกี่ยวกับ  
สัณการตรึงไนโตรเจนของ Azotobacter และ Azospirillum spp. ยังทราบน้อยมาก ดังนั้นเพื่อเป็น  
แนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณต่าง ๆ ของประเทศไทยให้มี  
ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มมากขึ้น จึงได้ศึกษาถึงตำแหน่งและลักษณะทางกายภาพของสัณ  
โครงสร้างของไนโตรซิเนสใน Azotobacter spp. 5 สายเชื้อ (strain) และ Azospirillum spp.  
4 สายเชื้อ

จากการตรวจหาพลาสมิดใน Azotobacter spp. 5 สายเชื้อ และ Azospirillum spp.  
4 สายเชื้อ พบว่า Azotobacter spp. ทุกสายเชื้อไม่มีพลาสมิดอยู่เลย แต่ใน 3 สายเชื้อของ  
Azospirillum spp. พบว่ามีพลาสมิดอยู่ 1 ถึง 4 ชนิด ขนาดตั้งแต่ 9 ถึง 100 กิโลเบส และพบว่าสัณ-  
โครงสร้างของไนโตรซิเนสไม่อยู่บนพลาสมิดเหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการซ้ำ (reiterated) ของการ  
เรียงตัวของเบสบนโครโมโซมมากทำให้เห็นความแตกต่างของขนาดขัณฑ์เอ็นเอหลังจากตัดด้วยเรสทริกชัน-  
เอนไซม์ได้ชัดเจน จนคาดว่าน่าจะสามารถแบ่งแยกสายเชื้อของ Azotobacter spp. และ Azospiril-  
lum spp. ได้จาก restriction endonuclease pattern ของโครโมโซม เมื่อนำขัณฑ์เอ็นเอมา  
ไฮบริดซ์กับ <sup>32</sup>P-pSA30 ซึ่งมีสัณโครงสร้างของไนโตรซิเนสจาก Klebsiella pneumoniae M5a1  
ด้วยวิธีของ Southern พบว่า สัณโครงสร้างของไนโตรซิเนสของเชื้อทั้ง 9 สายพันธุ์ อยู่บนโครโมโซม  
นอกจากนี้จำนวนและขนาดของขัณฑ์เอ็นเอที่มีฮอโมโลยีก็แตกต่างกันไปในระหว่างสายเชื้อ แม้อยู่ในชนิด  
(species) เดียวกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการจัดเรียงตัวของสัณบนโครโมโซมแตกต่างกัน  
อย่างสิ้นเชิงในแต่ละสายเชื้อ จากการหาดีกรี (degree) ของฮอโมโลยี (homology) ระหว่าง nif H,  
nif D และ nif K ของ Klebsiella pneumoniae กับสัณโครงสร้างของไนโตรซิเนสของ  
Azotobacter spp. หรือ Azospirillum spp. โดยอาศัยเทคนิค Dot blot hybridization พบว่า  
สัณโครงสร้างของไนโตรซิเนสของ Azospirillum spp. จะมีฮอโมโลยีเฉพาะกับ nif H และ nif D  
ของ Klebsiella pneumoniae ส่วนใน Azotobacter spp. พบว่ามีฮอโมโลยีทั้ง nif H, nif D  
และ nif K

ภาควิชา .....ชีวเคมี.....  
สาขาวิชา .....ชีวเคมี.....  
ปีการศึกษา ..... 2530 .....

ลายมือชื่อนิสิต Sud Sulej  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศิริพร ลิทธิประณีต



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

YINGPIT YODYOTEE : PHYSICAL CHARACTERIZATION OF NIF STRUCTURAL GENES IN AZOTOBACTER AND AZOSPIRILLUM SPP. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED

The ability to fix atmospheric nitrogen of some microorganism was involved with the nitrogenase and the genetic expression of nitrogen fixation genes. A little knowledge on the nitrogen fixation genes of Azotobacter and Azospirillum is known. So, as a fundamental research for genetic improvement of nitrogen fixing bacteria which was isolated from Thai source, localization and physical characterization of nitrogenase structural genes were studies in five strains of Azotobacter and four strains of Azospirillum spp.

No plasmid was detected in all strains of Azotobacter spp. Whereas one to four molecular species of plasmid ranging approximately from 9 to 100 Kb in size were detected in three strains of Azospirillum spp., and these plasmids did not carry nitrogenase structural genes. Restriction endonuclease patterns showed discrete bands and reproducible differences among the species and strains of Azotobacter and Azospirillum. This result indicated that very high reiterated sequences were found in the chromosome of Azotobacter and Azospirillum spp. Thus, we suggested that the restriction endonuclease patterns may be used to identify the strains of Azotobacter and Azospirillum spp. Southern blot hybridization between <sup>32</sup>P-pSA30 which carrying nitrogenase structural genes of Klebsiella pneumoniae M5a1 and restriction fragments of Azotobacter or Azospirillum chromosome showed that nitrogenase structural genes of the nine strains located on their chromosomes, Moreover, the hybridization patterns showed many differences among all strains examined. This preliminary study illustrated that the organization of nitrogenase structural genes were differences among these strains. Degree of homology was detected between nif H , nif D and nif K of Klebsiella pneumoniae and nitrogenase structural genes of Azotobacter or Azospirillum by Dot blot hybridization techniques. The homology was found limited only to nif H and nif D of Azospirillum DNA whereas the homology was observed with nif H, nif D and also nif K in all strains of Azotobacter spp.

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....ชีวเคมี.....

สาขาวิชา .....ชีวเคมี.....

ปีการศึกษา ..... 2530.....

ลายมือชื่อนิสิต 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 



## ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere and deepest gratitude to my advisor, Dr. Siriporn Sittipraneed, for her conscientious supervision, guidance and encouragements throughout this work. Without her kindness and understanding, this work would not be accomplished.

I am very grateful to Dr. Pairoi Thippayathasana serving as copreceptor, for her invaluable criticisms and valuable advice. Without her help, my study could not be accomplished.

Very deep thanks are expressed to the members of advisory committee, Dr. Jariya Boonjawat, Dr. Pairoi Thaipayathasana and Dr. Preecha Kownin, for their extensive counsel about the work in this study.

I am particularly grateful to all fellows in the Department of Biochemistry, Faculty of Science who courteously assisted and provided not only facilities but also materials.

I am much indebted to Dr. Sakol Panyim and Miss Sumalee Tungpradabkul of Department of Biochemistry, Faculty of Science at Mahidol University for providing some laboratory facilities and invaluable suggestions.

I am also indebted to the "Unit cell of genetic engineering" for supporting all necessary facilities throughout this work.

Special thanks are given to every member in the laboratory for their friendly collaboration, kindness, valuable suggestions, discussion and criticisms.

I wish to express my infinite thanks to my parents and everyone in my family for their unlimited love, kindness, support and understanding throughout my life.



Finally, I am very grateful to "Grant of Faculty of Science",  
"Rachadaphisakesompod Grant" and the Graduate School, Chulalongkorn  
University for their funding supports.



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI .....	IV
ABSTRACT IN ENGLISH .....	V
ACKNOWLEDGEMENT .....	VI
LIST OF TABLES .....	IX
LIST OF FIGURERS .....	X
ABBREVIATIONS .....	XV
CHAPTER	
I    INTRODUCTION .....	1
II   MATERIALS AND METHODS .....	17
III  RESULTS .....	44
IV   DISCUSSION .....	101
SUMMARY .....	115
REFERENCES .....	116
APPEXDIX .....	127
BIOGRAPHY .....	130

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF TABLES

table	page
1 The products and functions of the <u>nif</u> genes of <u>Klebsiella pneumoniae</u> M5a1.	10
2 Bacterial strains	18
3 Examples of type II restriction endonucleases	28
4 The growth properties of <u>Azotobacter</u> spp.	46
5 The growth properties of <u>Azospirillum</u> spp.	47
6 Plasmids in <u>Azotobacter</u> spp. and <u>Azospirillum</u> spp. : number and sizes.	54
7 Restriction analysis of <u>nif</u> structural genes of <u>Azotobacter</u> spp. and <u>Azospirillum</u> spp. by Southern hybridization when use <u>nif</u> structural genes of <u>Klebsiella pneumoniae</u> on pSA30 as a hybridization probe.	89
8 The relation homology of <u>nif</u> structural genes of <u>Azotobacter pneumoniae</u> and <u>Azotobacter</u> spp. or <u>Azospirillum</u> spp.	99
9 The relative homology of <u>nif</u> structural genes fragments between <u>Klebsiella pneumoniae</u> and <u>Azotobacter</u> spp. or <u>Azospirillum</u> spp. ( in $1 \times 10^8$ $\mu$ g of probe per Kb of genome)	100



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The <u>nif</u> gene cluster of <i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	9
2. Physical map of pSA30	11
3. Restriction map of pSA30 and <u>nif</u> structural genes fragments	34
4. Ethidium bromide staining patterns of plasmid profiles of five strains of <u>Azotobacter</u> and four strains of <u>Azospirillum</u> by Modified Eckhardt lysate electrophoresis.	49
5. Ethidium bromide staining patterns of plasmid profile extracted from various species and strains of <u>Azotobacter</u> and <u>Azospirillum</u> which were prepared by method of Hansen and Olsen.	52
6. Ethidium bromide staining patterns of plasmid profile extracted from various species and strains of <u>Azotobacter</u> by rapid alkaline extraction procedure.	53
7. Ethidium bromide staining patterns of extracted chromosomal DNA from various species and strains of <u>Azotobacter</u> and <u>Azospirillum</u> .	57
8. Ethidium bromide staining patterns of chromosomal DNA digested with restriction endonuclease on agarose gel.	58
9. Ethidium bromide staining patterns of Sma I digested fragments of chromosomal DNA from five strains of <u>Azotobacter</u> and four strains of <u>Azospirillum</u> .	59
10. Ethidium bromide staining patterns of Bgl II digested fragments of chromosomal DNA from five strains of <u>Azotobacter</u> and four strains of <u>Azospirillum</u> .	60



## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure	Page
11. Ethidium bromide staining patterns of EcoRI digested fragments of chromosomal DNA from <u>Azotobacter</u> spp. and <u>Azospirillum</u> spp.	61
12. Ethidium bromide staining patterns of Pst I digested fragments of chromosomal DNA from five strains of <u>Azotobacter</u> on agarose gel.	62
13. Ethidium bromide staining patterns of Pst I digested fragments of chromosomal DNA from four strains of <u>Azospirillum</u> on agarose gel.	63
14. Ethidium bromide staining patterns of BamHI digested fragments of chromosomal DNA from five strains of <u>Azotobacter</u> .	64
15. Ethidium bromide staining patterns of restriction endonuclease digested fragments of chromosomal DNA from four strains of <u>Azospirillum</u> on agarose gel.	65
16. Ethidium bromide staining patterns of Hind III digested fragments of chromosomal DNA from five strains of <u>Azotobacter</u> on agarose gel.	66
17. Ethidium bromide staining patterns of Hae III digested fragments of chromosomal DNA from <u>Azotobacter</u> spp. and <u>Azospirillum</u> spp.	67
18. Ethidium bromide staining patterns of pSA30 plasmid extracted by rapid alkaline extraction procedure.	69



## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure	Page
19. Ethidium bromide staining patterns of the plasmid and the restriction fragments on agarose gel.	70
20. Ethidium bromide staining patterns of crude and purified supercoiled pSA30 plasmid on agarose gel.	72
21. Ethidium bromide staining pattern of pACYC184 fragments.	73
22. Ethidium bromide staining patterns of plasmid and purified <u>nif</u> fragments on agarose gel.	74
23. The kinetics of nick translation reaction.	76
24. The electrophoretic mobility of <sup>32</sup> P-labelled pSA30 and native pSA30 on agarose gel.	77
25. Ethidium bromide staining pattern of sheared calf thymus DNA on agarose gel.	80
26. A : Ethidium bromide staining pattern of plasmid on agarose gel. B : Autoradiograph of the nitrocellulose filter containing plasmids of <u>Azospirillum</u> after hybridized with <sup>32</sup> P-labelled pSA30	81
27. Autoradiograph of nitrocellulose filter containing the Sma I digested fragments of various species and strains of <u>Azotobacter</u> and <u>Azospirillum</u> after hybridized with <sup>32</sup> P-labelled pSA30.	83
28. Autoradiograph of nitrocellulose filter containing the Bgl II digested fragments of various species and strains of <u>Azotobacter</u> and <u>Azospirillum</u> after hybridized with <sup>32</sup> P-labelled pSA30.	84



## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure	Page
29. Autoradiograph of the nitrocellulose filter containing the EcoRI-digested fragments of various species and strains of <u>Azotobacter</u> and <u>Azospirillum</u> after hybridized with $^{32}\text{P}$ -labelled pSA30.	85
30. A : Ethidium bromide staining pattern of restriction fragments of chromosomal DNA from <u>Azotobacter</u> . B : Autoradiograph of the nitrocellulose filter containing the restriction fragments of chromosomal DNA after hybridized with $^{32}\text{P}$ -labelled pSA30.	86
31. A : Ethidium bromide staining pattern of restriction fragments of chromosomal DNA from <u>Azospirillum</u> . B : Autoradiograph of the nitrocellulose filter containing the restriction fragments of chromosomal DNA after hybridized with $^{32}\text{P}$ -labelled pSA30.	87
32. A : Ethidium bromide staining pattern of Pst I digested fragments of chromosomal DNA from <u>Azospirillum</u> . B : Autoradiograph of the nitrocellulose filter containing the restriction fragments of chromosomal DNA after hybridized with $^{32}\text{P}$ -labelled pSA30.	88
33. Autoradiograph of dot blot filter containing chromosomal DNA of <u>Azotobacter</u> , <u>Azospirillum</u> and pSA30 after hybridized with $^{32}\text{P}$ -labelled pACYC184 fragments.	94
34. Autoradiographs of dot blot filter containing chromosomal DNA of <u>Azotobacter</u> and <u>Azospirillum</u> after hybridized with $^{32}\text{P}$ -labelled <u>nif</u> fragment A1, <u>nif</u> fragment A2, nif fragment A3.	95



## LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure	Page
35. Kinetics of dot blot hybridization of chromosomal DNA of <u>Azotobacter</u> spp. or <u>Azospirillum</u> spp. with <sup>32</sup> P-labelled <u>nif</u> fragment A1 (part of <u>nif</u> K).	96
36. Kinetics of dot blot hybridization of chromosomal DNA of <u>Azotobacter</u> spp. or <u>Azospirillum</u> spp. with <sup>32</sup> P-labelled <u>nif</u> fragment A2 (part of <u>nif</u> D).	97
37. Kinetics of dot blot hybridization of chromosomal DNA of <u>Azotobacter</u> spp. and <u>Azospirillum</u> spp. with <sup>32</sup> P-labelled <u>nif</u> fragment A3 ( <u>nif</u> H and part of <u>nif</u> D).	98

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ABREVIATIONS

$\mu\text{l}$	=	microliter ( $10^{-6}$ lit = $10^{-3}$ ml)
ml	=	milliliter ( $10^{-3}$ l)
l	=	liter
pg	=	picogram ( $10^{-12}$ gm)
ng	=	nanogram ( $10^{-9}$ gm)
$\mu\text{g}$	=	microgram ( $10^{-6}$ gm)
mg	=	milligram ( $10^{-3}$ gm)
gm	=	gram
min	=	minute
h	=	hour
in	=	inch
rpm	=	revolution per minute
$\mu\text{M}$	=	micromolar ( $10^{-6}$ M)
mM	=	millimolar ( $10^{-3}$ M)
M	=	molar
N	=	normal
nm	=	nanometer
$\mu\text{ci}$	=	microcurie ( $10^{-6}$ ci).
mci	=	millicurie ( $10^{-3}$ ci)
ci	=	curie
kb/kb	=	kilobasepair
U	=	unit
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
w/v	=	weight per volume



no.	=	number
dATP	=	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	=	deoxycytosine 5'-triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine 5'-triphosphate
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNase I	=	deoxyribonuclease I
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
DTT	=	dithiothreitol
LB	=	Luria-Bertani media
RM	=	Rich media
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SSC(1X)	=	0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0
TCA	=	trichloroacetic acid
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
nif	=	nitrogenase genes