โฮโมโลยีของ *nod* GENES ในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอยู่ร่วม

นางสาว เนตรนภิส ชินานนท์เวช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2537

ISBN 974-631-019-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16906698

HOMOLOGY OF *nod* GENES IN ASSOCIATIVE NITROGEN-FIXING BACTERIA

Miss Netnaphis Chinanonwait

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-631-019-4

Thesis Title Homology of *nod* genes in associative nitrogen-fixing bacteria

By Miss Netnaphis Chinanonwait

Department Biochemistry

Thesis Advisor Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

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

.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Jiraporn Limpananont, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เนตรนภิส ชินานนท์เวช : โฮโมโลยีของ *nod* GENES ในแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแบบอยู่ร่วม (HOMOLOGY OF *nod* GENES IN ASSOCIATIVE NITROGEN-FIXING BACTERIA) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, 107 หน้า. ISBN 974-631-019-4

Klebsiella oxytoca สายพันธุ์ R15, R17 และ NG13 เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ยึดเกาะบนผิวรากข้าวโดยมีเลกตินที่หลั่งออกมาจากรากข้าว โดยเลกตินจะจับกับ N-acetylglucosamine (GlcNAc) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดเดียวกันกับที่พบในปัจจัยก่อปม (nodulation factor) ใน *Rhizobium meliloti* สารนี้มีความสำคัญขั้นต้นในการอิงอาศัยระหว่างไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่ว โดยสารเหนี่ยวนำจำพวก isoflavonoid ที่หลั่งจากพืช ไปมีผลกระตุ้นการทำงานของยีนก่อปมสามัญ (common nodulation genes, *nod*DABC) จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือ การนำยีน *nod*D1 ABC ของ *R. meliloti* มาใช้เป็นตัวติดตามหาความคล้ายคลึงกันในระหว่าง *Klebsiella* สายพันธุ์ที่ยึดเกาะกับข้าว เปรียบเทียบกับ *Azospirillum brasilense* Sp7 แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับรากข้าว และ *Klebsiella pneumoniae* M5a1 สายพันธุ์อิสระ โดยใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการทดลอง และใช้ *nif*HDK จาก *K. pneumoniae* M5a1 เป็นตัวติดตาม เพื่อศึกษาการจัดกลุ่มของยีน *nod* และ *nif* โดยนำยีนติดตามมาติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี digoxigenin ทำการตัดโครโมโซมดีเอ็นเอของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนแต่ละชนิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ตัดจำเพาะ และนำมาไฮบริไดซ์กับตัวติดตามทั้งหมด พบว่าเมื่อตัดโครโมโซมดีเอ็นเอด้วย *Bam*HI แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ *nod*D1 พบความคล้ายคลึงในแถบดีเอ็นเอขนาด 4.0 และ 4.9 กิโลเบส ใน *Klebsiella* สายพันธุ์ที่ยึดกับข้าว *A. brasilense* Sp7 และไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ยกเว้น *Klebsiella* สายพันธุ์อิสระ แต่ไม่พบส่วนของดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกับ *nod*AB และ *nod*C และเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับ *nif*HDK ไม่พบหลักฐานว่ามีการจัดเรียงใกล้กันระหว่าง *nod*D1 และ *nif*HDK ทำการตัดต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาด 4.0 และ 4.9 กิโลเบส จาก *K. oxytoca* NG13 ที่ตัดด้วย *Bam*HI กับ pUC18 ได้ recombinant plasmids R1 และ R2 ที่คล้ายคลึงกับ *nod*D1 นอกจากนั้นประโยชน์ของการใช้ *nod* และ *nif* เป็นตัวติดตามคือทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียมได้ด้วย

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต	เนตรนภิส ชินานนท์เวช
สาขาวิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2537	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	-

C425801 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: *Klebsiella oxytoca* / *nif* GENES / *nod* GENES / *Rhizobium* spp. / RICE
NETNAPHIS CHINANONWAIT : HOMOLOGY OF *nod* GENES IN ASSOCIATIVE NITROGEN-FIXING BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. 107 pp. ISBN 974-631-019-4

Klebsiella oxytoca strain R15, R17 and NG13 are nitrogen-fixing bacteria that associate on the rice root surface with secretory root lectin as mediator. Since rice lectins bind specifically with N-acetylglucosamine (GlcNAc), the carbohydrate moiety of the nodulation factor of *Rhizobium meliloti*, which mediate the first step of *Rhizobium*-legume interaction, and its induction was known to be involved with the common nodulation genes (*nod*DABC) in response to the plant signal, isoflavonoid. The objective of this research is to use these *nod*D1 ABC genes from *R. meliloti* to search for homology of these *nod* genes in the local strains of associative *K. oxytoca* in comparision with other associative *Azospirillum brasilense* Sp7 and free-living *K. pneumoniae* strain M5a1, by using rhizobia strains as references. Plasmids containing *nif*HDK genes, from *K. pneumoniae* M5a1 was also used as probe to study *nod* and *nif* organization. After labeling with DIG-DNA labeling kit, Southern hybridization was performed with digested chromosomal DNA from these N_2-fixing bacteria. The *Bam*HI digested DNA from associative *K. oxytoca* strain R15, R17 and NG13 show two DNA fragments of 4.0 and 4.9 kb that hybridize with *nod*D1 probe, which resemble other rhizobia strains and associative *A. brasilense* Sp7, except the free-living *K. pneumoniae* M5a1. However, there was no DNA fragment that were homologous with *nod*AB and *nod*C, and no evidence for closely related organization between *nif*HDK and *nod*D1 by restriction fragment length polymorphism. The *nod*D1-liked gene was therefore cloned from strain NG13 and harboured in pUC18, resulted in two recombinant plasmids: R1 and R2 carrying 4.0 and 4.9 kb of *Bam*HI internal fragment hybridized with *nod*D1 probe. In addition, the results indicate the potential of using *nod* and *nif* probes in the identification of rhizobia.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต เนตรนภิส ชินานนท์เวช

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Assoc.Prof.Dr. Jariya Boonjawat for her encouragement, valuable suggestions, constructive criticism of the manuscript and supports throughout my study. I am especially indebted to Assist. Prof.Dr. Tipaporn Limpaseni, Assoc.Prof.Dr. Siriporn Sittipraneed and Assoc.Prof.Dr. Jiraporn Limpananont for serving as thesis committee, helpful discussions and interpretation, and also for valuable suggestions about the data in this study. My thank is extended to all staff members and students of the Biochemistry Department for their sincerity and friendship.

I would like to express my sincere thanks to Dr. Ann M. Hirsch, UCLA Los Angeles, for supplying plasmids: pE39, pRmSL42 and their descriptions, and many thanks to all the people in the BNF Resource Center, Division of Soil Science, Department of Agriculture, Bangkok for supplying strains of N_2-fixing bacteria. This work was supported in part by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Rockefeller Foundation, the Graduate School, Chulalongkorn University and the University Development Committee (UDC) scholarship of the Ministry of University Affairs.

Finally I would like to express my deepest appreciation to my parents and members of my family for their love, kindness and understanding throughout my study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....xi

ABBREVIATION.....xiv

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II MATERIALS AND METHODS.....26

2.1 Bacterial strains, plasmid DNA and standard DNA.....26

2.2 Media for bacterial culture.....29

2.3 Cultivations of bacterial strains and plasmid.....30

2.4 Reagents.....30

2.5 Amplification, isolation and purification of plasmid DNA.....31

2.6 Isolation and purification of chromosomal DNA.....33

2.7 Restriction endonucleases digestion.....35

2.8 Agarose gel electrophoresis.....37

2.9 Recovery of DNA fragments from low-melting temperature agarose gel electrophoresis.....38

2.10 Dot hybridization technique.....38

2.11 Southern blot transfer.....39

2.12 Labeling of DNA probes with DIG-dUTP by random primer.....42

2.13 Hybridization and washing.....44

2.14 Chemiluminescent detection with Lumigen™ PPD.....45

2.15 Stipping and reprobing chemiluminescence-detected membrane.....46

2.16 Cloning.....46

III RESULTS.....48

3.1 Analysis of DNA purity.....48

3.2 Restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA.....51

3.3 Preparation of purified DIG-labeled DNA probes by random primer.....55

3.4 Dot hybridization by *nod*D1, *nod*AB, *nod*C and *nif*HDK probes.....55

3.5 Comparision of RFLPs by *nod* genes and *nif* genes.....58

3.6 Cloning of 4.0-4.9 kb fragments of chromosomal DNA from *K. pneumoniae* NG13 into *Bam*HI site of pUC18....71

IV DISCUSSION.....75

REFERENCES.....84

APPENDIX.....97

BIOGRAPHY.....107

LIST OF TABLES

Table Page

1.1 Some organisms from which active nitrogenase has been extracted....4

1.2 The products and functions of the *nif* genes of *Klebsiella pneumoniae*....7

1.3 The functions and properties of *nod* genes of *Rhizobium meliloti*....14

1.4 Size of DNA fragments of *Azospirillum* and *Rhizobium meliloti* 2011 which show homology when probed with common *nod* genes (*nod*ABC D), and host specific *nod* genes (*nod*EFGH) after digestion with *Eco*RI, *Sal*I and *Bgl*II....23

2.1 Bacterial strains and plasmids....27

2.2 Recognition sequences of type II restriction endonucleases....36

2.3 The amount of synthesized DIG labeled DNA depends on the amount of template DNA in the labeling reaction and on the length of the incubation time at 37 °C....43

3.1 RFLP of *nod*D1 gene hybridized to 10 strains of N_2-fixing bacteria....63

3.2 RFLP of *nod*AB gene hybridized to 10 strains of N_2-fixing bacteria....65

Table Page

3.3 RFLP of *nod*C gene hybridized to 10 strains of N_2-fixing bacteria.....67

3.4 RFLP of *nif*HDK gene hybridized to 10 strains of N_2-fixing bacteria.....70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure — Page

1.1 The *nif* gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* and plasmid pSA30.....6

1.2 The *nod* gene cluster of *Rhizobium meliloti* and plasmid pE39 and pRmSL42.....12

1.3 Structure of plant signal: flavonoids in legume and rice.....17

1.4 Structure of nodulation factor or nod signal in *Rhizobium meliloti*.....19

2.1 Diagram of Southern blot transfer.....41

3.1 Electrophorogram of purified plasmid pE39, pRmSL42 and pSA30 after digestion with restriction enzymes.....49

3.2 High molecular weight chromosomal DNA from various strains of *Klebsiella*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, and *Bradyrhizobium*....50

3.3 Suitable condition for cutting chromosomal DNA of 10 strains of N_2-fixing bacteria digested with 8 restriction enzymes.....52

3.4 Electrophorogram of 3 μg chromosomal DNA of 10 strains of N_2-fixing bacteria digested with 8 restriction enzymes (40 units/ 4 μg DNA) on 0.7% agarose gel (100 x 90 x 6 mm) and electrophoresed in Tris-borate buffer, pH 8.3 at 80 volts for 3 hr.....54

Figure Page

3.5 Electrophorogram of *nod* gene and *nif* gene fragments obtained by cutting pE39 with *Bam*HI, cutting pRmSL42 with *Bam*HI, *Eco*RI and *Hind*III and cutting pSA30 with *Eco*RI and recovering from low-melting temperature agarose gel electrophoresis.....56

3.6 Dot hybridization experiment to evaluate the specific activity of labeled probe.....57

3.7 Dot hybridization between 30 ng/ml of digoxigenin labeled *nod*D1, *nod*AB, *nod*C and *nif*HDK and 2.0-3.0 μg of total chromosomal DNA of N_2-fixing bacteria.....59

3.8 Southern hybridization of *nod*D1, *nod*AB, *nod*C and *nif*HDK probes with nonlabeled genes, which were used as probe.....60

3.9 Southern hybridization of 8 restriction enzymes digested bacterial chromosomal DNA from 10 strains of N_2-fixing bacteria with *nod*D1 probe.....62

3.10 Southern hybridization of 8 restriction enzymes digested bacterial chromosomal DNA from 10 strains of N_2-fixing bacteria with *nod*AB probe.....64

3.11 Southern hybridization of 8 restriction enzymes digested bacterial chromosomal DNA from 10 strains of N_2-fixing bacteria with *nod*C probe.....66

3.12 Southern hybridization of 8 restriction enzymes digested bacterial chromosomal DNA from 10 strains of N_2-fixing bacteria with *nif*HDK probe.....69

Figure Page

3.13 Electrophorogram of recombinant plasmid: R1-R11 after ligation between *Bam*HI fragment of pUC18 and *Bam*HI digested chromosomal DNA from *K. oxytoca* NG13.....72

3.14 Dot hybridization between labeled *nod*D1 probe and recombinant plasmids: R1-R11 1.0 μg comparing with nonlabeled *nod*D1 100 ng and vectors 100 ng.....73

3.15 Southern hybridization between *nod*D1 probe and DNA from recombinant plasmids: R1 and R2 digested with *Bam*HI.....74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

A	Absorbance
Ap^r	Ampicillin resistance
bp	Base pair
cm	Centimetre
cpm	Count per minute
°C	Degree Celcius
DNA	Deoxyribonucleic acid
DpI	Deoxyribonucleic acid polymerase I
dUTP	Deoxyuridine 5' triphosphate
DIG	Digoxigenin
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
g	Gram
hr	Hour
kb	Kilobase
l	Litre
µg	Microgram
µl	Microlitre
mg	Milligram
ml	Millilitre
mm	Millimetre
mM	Millimolar
mmole	Millimole
min	Minute

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M	Molar
ng	Nanogram
nif genes	Nitrogen fixation genes
nod genes	Nodulation genes
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
rpm	Revolution per minute
RNase A	Ribonuclease A
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tc^r	Tetracycline resistance
Vol	Volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย