A Comparative Study of Glutamine Synthetase in Free-living *Klebsiella* R15 and in *Klebsiella* R15 Associated with Rhizosphere of Rice

Miss Ladda Saengduan

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1992

ISBN 974-581-723-6

i17227849

การศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสใน *Klebsiella* R15 เมื่ออยู่อย่างอิสระและอยู่ร่วมกับต้นข้าวบริเวณราก

นางสาวลัดดา แสงเดือน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2535

ISBN 974-581-723-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019282

Thesis Title A Comparative Study of Glutamine Synthetase in Free-living *Klebsiella* R15 and in *Klebsiella* R15 Associated with Rhizosphere of Rice

By Miss Ladda Saengduan

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.

Thavorn Vajrabhaya

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D)

Thesis committee

Sanha Panichajakul

.....Chairman

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

Jariya Boonjawat

.....Thesis advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Suganya Soontaros

.....Member

(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

Nantakorn Boonkerd

.....Member

(Nantakorn Boonkerd, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ลัดดา แสงเดือน : การศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทสใน Klebsiella R15 เมื่ออยู่อย่างอิสระและอยู่ร่วมกับต้นข้าวบริเวณราก (A COMPARATIVE STUDY OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN FREE-LIVING Klebsiella R15 AND IN Klebsiella R15 ASSOCIATED WITH RHIZOSPHERE OF RICE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, 75 หน้า. ISBN 974-581-723-6

Klebsiella R15 เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากรากข้าวพันธุ์ กข.7 ใช้วิถีกลูตา-มีนซินเทเทส-กลูตาเมทซินเทส (GS-GOGAT) ในกระบวนการใช้แอมโมเนียทั้งในสภาวะที่ใช้สารประกอบไนโตรเจนและสภาวะตรึงไนโตรเจน เนื่องจากกลูตามีนซินเทเทส (GS) เป็นเอนไซม์สำคัญในไนโตรเจนเมตาโบลิซึมของ Klebsiella R15 จึงศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมจำเพาะปริมาณของเอนไซม์ GS ใน Klebsiella R15 เมื่ออยู่อิสระและอยู่ร่วมกับต้นข้าวในสภาวะตรึงไนโตรเจน โดยวัดกิจกรรมเอนไซม์ GS ด้วยวิธีทรานเฟอเรสพบว่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ GS เพิ่มขึ้น 7-9 เท่า ในแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับต้นกล้าข้าวพันธุ์ กข.7 หลังจากใส่แบคทีเรีย 7-8 วัน ปริมาณ GS โปรตีนในแบคทีเรียทั้ง 2 สภาวะวัดโดยเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนสอบแบนท์ แอสเสย์ (ELISA) และวิธีอิมมูโนบลอท หรือ Western blot โดยเตรียมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ GS บริสุทธิ์พบว่าโปรตีน GS ในแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับต้นข้าวเพิ่มสูงขึ้น 3-5 เท่าโดยวิธี ELISA และความเข้มของแถบ GS สังเกตจาก อิมมูโนบลอทเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับต้นข้าวเทียบกับแบคทีเรียที่อยู่อิสระ ผลการทดลองนี้แสดงว่าการควบคุม GS ใน Klebsiella R15 เมื่ออยู่ร่วมกับต้นข้าวเป็นการควบคุมที่ระดับการสังเคราะห์ GS สำหรับกิจกรรมของไนโตรจิเนส-เอนไซม์เพิ่มขึ้น 400-500 เท่าในแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับต้นข้าวหลังจากเติมเชื้อ 6 วัน และเริ่มคงที่ ซึ่งเป็นเวลาตรงกับการเพิ่มกิจกรรมจำเพาะของ GS ของแบคทีเรียบริเวณรากข้าว ในขณะที่กิจกรรมจำเพาะของ GS ภายในรากข้าวที่มีเชื้อแบคทีเรียลดลงเล็กน้อย แสดงว่าเมื่อ Klebsiella R15 อยู่ร่วมกับต้นข้าวมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นและสามารถใช้แอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนเปลี่ยนให้อยู่ในรูปกลูตามีนหรือกรดอะมิโนอื่นและส่งผ่านไนโตรเจนไปยังต้นข้าวได้ เนื่องจากกิจกรรมจำเพาะของ GS ในรากข้าวที่เจริญในสภาวะนี้ลดลง แสดงว่าไม่น่าจะมีการขนส่งแอมโมเนียเข้าสู่รากข้าวโดยตรง

แอนติบอดีต่อ GS ของ Klebsiella R15 ที่เตรียมได้ทำปฏิกิริยาข้ามกับ GS ใน E. coli และ K. pneumoniae แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับ GS ในรากข้าว และจากการย้อมแอคติวิตีของ GS ในสภาพธรรมชาติบนโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรฟอเรซีส และการทำอิมมูโนบลอทของ GS ที่เสียสภาพธรรมชาติ พบว่า ขนาดโมเลกุลเชิงซ้อนและหน่วยย่อยของเอนไซม์ GS ในแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C125679 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : GLUTAMINE SYNTHETASE/KLEBSIELLA/RICE/RHIZOSPHERE
LADDA SAENGDUAN : A COMPARATIVE STUDY OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN FREE-LIVING Klebsiella R15 AND IN Klebsiella R15 ASSOCIATED WITH RHIZOSPHERE OF RICE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D.
75 pp. ISBN 974-581-723-6

Klebsiella R15 is a N_2-fixing bacteria isolated from rice root cv. RD 7 in which glutamine synthetase-glutamate synthase (GS-GOGAT) pathway is responsible for ammonium assimilation in combined nitrogen and N_2-fixing condition. Since GS is the key enzyme in N-metabolism of Klebsiella R15, comparative study on the GS specific activity and GS protein in free-living and in associative R15 in N_2-fixing condition has been conducted. GS activity is measured by transferase assay. It is found that GS specific activity has been increased 7-9 fold in associative bacteria after inoculation 7-8 days. Bacterial GS protein in both conditions have been determined by enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) and immunoblot or Western blot analysis, using antibody against purified GS. It is found that GS protein in associative bacteria is 3-5 fold of free-living by ELISA and the intensity of GS protein bands are significantly higher than free-living condition. These results indicate that regulation of GS in associative Klebsiella R15 is at the GS synthesis level. Nitrogenase activity is increased 400-500 fold in associative bacteria on day 6^{th} after inoculation and becomes constant, when GS specific activity of rhizospheric bacteria is increased. At this time, rice root GS specific activity slightly decrease in the presence of bacterial inoculation. It shows that when Klebsiella R15 are associated with rice seedlings, they can fix N_2 more efficiently and assimilate NH_3 from fixed-N to glutamine or other amino acids and transferring fixed-N to rice, because the GS specific activity of rice root is decreased in this condition indicating that NH_3 should not be directly transferred into rice root.

Anti-GS of Klebsiella R15 cross-reacts with GS of E. coli and K. pneumoniae, but does not cross react with rice root GS. Activity staining of native GS polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot of denatured GS show that there is no difference in molecular weight of GS complex and their subunit molecular weight among 3 bacterial strains.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต 16/5/35
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest appreciation to Associate Professor Dr.Jariya Boonjawat for her kindness, understanding, invaluable supervision, encouragement, and financial supports throughout my study.

My appriceation is also to Associate Professor Dr.Sanha Phanichajakul, Assistant Professor Dr.Suganya Soontaros, Dr.Nantakorn Boonkerd for serving as thesis committee, and their criticisms and valuable suggestion.

Thanks are also expressed to all staff and member students of Biochemistry Department for their helps in the laboratory with sincerity and friendship.

I wish to acknowledge the contributions of the National Genetic Engineering and Biotechnology, Ministry of Science Technology and Energy, and the Graduate School of Chulalongkorn University for financial support.

Finally, I am most grateful to my parents and members of my family for their love, understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....IV

ENGLISH ABSTRACT.....V

ACKNOWLEDGMENT.....VI

CONTENTS.....VII

LIST OF FIGURES.....X

LIST OF TABLES.....XII

ABBREVIATIONS.....XIII

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Role of GS in Nitrogen Metabolism.....1

1.2 GS in N_2-Fixing Bacteria.....5

1.3 GS in plant - microbe symbiosis.....7

1.4 Research problem.....9

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacteria.....12

2.2 Rice.....12

2.3 Media and Growth Condition.....12

2.4 Purification of GS.....17

2.5 Determination of GS activity by Transferase assay.....18

2.6 Determination of nitrogenase activity.....20

2.7 Polyacrylamide gel electrophoresis.....20

2.8 Preparation of the antiserum against GS.....21

2.9 Western blot analysis of GS protein by GS antibody....23

2.10 Determination of GS protein by ELISA.....24

Page

III RESULTS

3.1 Purification of GS.....27

3.2 Preparation of GS antibody.....27

3.3 Quantitation of GS protein by Western blot analysis...31

3.4 Homology between GS from *Klebsiella* R15 and other enteric bacteria.....31

3.5 Development of indirect ELISA for GS.....35

3.6 No cross - reactivity between bacterial GS and cytosolic GS of rice root.....39

3.7 Induction of bacterial growth in associative condition.....39

3.8 GS antigen level in *Klebsiella* R15-rice association...41

3.9 Change in GS specific activity of free-living *Klebsiella* R15 after inoculation into rice seedling cv. RD7.....44

3.10 Concurrent changes in nitrogenase activity and GS activity in associative *Klebsiella* R15.....47

IV Discussion

4.1 Purification and characterization of GS from *Klebsiella* R15.....50

4.2 Characteristics of GS antibody and immunological studies.....51

4.4 Regulation of GS activity and synthesis in free-living and associative *Klebsiella* R15.....52

4.5 Induction of nitrogenase and GS activity in free-living and associative *Klebsiella* R15.....55

Page

RERERENCES.....58

APPENDIX I.....63

APPENDIX II.....65

APPENDIX III.....67

APPENDIX IV.....70

BIOGRAPHY.....75

LIST OF FIGURES

Figure Page

1.1 The cyclic cascade of GS regulation.....4

1.2 A Model for the *nif* and *gln* regulation *K.pneumoniae*.....6

2.1 Protocols of *Klebsiella* R15 inoculation in rice(RD7).....15

2.2 Rice seedlings were grown in test tube with 7 ml of sterile water for nitrogenase and GS assay.....16

2.3 Protocol of non-competitive ELISA.....25

3.1a Gel electrophoresis of purified *Klebsiella* R15 glutamine synthetase was performed on discontinuous SDS-PAGE.....29

3.1b Determination for the molecular weight of the GS subunit by SDS-PAGE.....29

3.2a Immunization scheme and antiserum titer against GS.....30

3.2b Double immunodiffusion of purified GS.....30

3.3a Purification of antiserum against GS by affinity chromatography on an immobilized protein A.....32

3.3b Gel electrophoresis of purified IgG against GS.....32

3.4 Western blot analysis of purified GS.....33

3.5a Comparison of GS activity staining of *E.Coli* M5a1 and *Klebsiella* R15 crude extract.....34

3.5b Determination for the cross-reactivity between GS from *E.coli* and M5a1 crude extract with anti-GS antiserum.....34

Page

3.6 Standard curve of ELISA.....37

3.7a Comparison of GS activity staining of *Klebsiella* R15 crude extract and rice root supernatant fraction.....40

3.7b Determination cross-reactivity between cytosolic GS from rice root and GS from *Klebsiella* R15 for the antiserum against purified *Klebsiella* R15 GS.....40

3.8 Comparison of GS protein in free-living and associative *Klebsiella* R15 and rice root extracts by Western blot analysis.....43

3.9 Comparison of nitrogenase activity in *Klebsiella* R15, RD7 and *Klebsiella* R15 +RD7 after *Klebsiella* R15 was inoculated in rice seedlings.....48

LIST OF TABLES

Table Page

3.1 Purification of *Klebsiella* R15 GS.....28

3.2 Precission of the ELISA method.....36

3.3 Stability of GS protein in *Klebsiella* R15 crude extract was determined by ELISA method.....38

3.4 Total number of bacteria in free-living versus associative condition.....41

3.5 Changes in the GS protein of free-living *Klebsiella* R15 and associative *Klebsiella* R15.....42

3.6 Changes in the GS specific activity of free-living *Klebsiella* R15 and associative *Klebsiella* R15 versus change in total proteins.....45

3.7 Changes in the GS specific activity of rice root supernatant fraction(150 plants).....46

3.8 Rate of N_2 fixation in *Klebsiella* R15, RD7 and *Klebsiella* R15 + RD7 after inoculation with *Klebsiella* R15.....49

ABBREVIATIONS

ARA	Acetylene Reduction activity
ELISA	Enzyme-linked immunoasorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FIA	Freund's incomplete adjuvant
g	Gram
GS	Glutamine synthetase
GOGAT	Glutamate syntase
GDH	Glutamate dehydrogenase
h	Hour
l	Litre
LB	Luria broth
M	Molar
NF	Nitrogen free
ng	Nanogram
mg	Milligram
min	Minute
ml	Millilitre
PBS	Phossphate buffer saline
TBS	Tris-buffer saline
µg	Microgram
µl	Microlitre