เรสทริกชัน แฟรกเมนต์ เลงธ์ โพลีมอฟิซึมของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ที่อยู่ร่วมกับข้าว (Oryza sativa L.)

นางสาวสุวรรณา สุทธิสุคนธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2535

ISBN 974-581-724-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018115 i 14666819

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Rice (*Oryza sativa* L.)

Miss Suwanna Suthisukon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree in Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-724-4

Thesis Title	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Rice (*Oryza sativa* L.)
By	Miss Suwanna Suthisukon
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.
	Associate Professor Siriporn Sittipraneed, 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
..... Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

Siriporn Sittipraneed
..... Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

Nantakorn Boonkerd
..... Member

(Nantakorn Boonkerd, Ph.D.)

Vichien Rimphanitchayakit
..... Member

(Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

สุวรรณา สุทธิสุคนธ์ : เรสทริกชัน แฟรกเมนต์ เลงธ์ โพลีมอฟิซึม ของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับข้าว (Oryza sativa L.) (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) OF NITROGEN-FIXING BACTERIA ASSOCIATED WITH RICE (ORYZA SATIVA L.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ศิริพร สิทธิประณีต, 80 หน้า. ISBN 974-581-724-4

Klebsiella R15 และ R17 เป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชนิดเกาะติดกับพืชที่แยกได้จากรากข้าว ในสภาวะที่อยู่ร่วมกันระหว่างข้าว-Klebsiella พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพิ่มเป็นหลายร้อยเท่าเทียบกับแบคทีเรียที่อยู่อิสระ จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือศึกษาเปรียบเทียบเรสทริกชันแฟรกเมนต์เลงธ์โพลีมอฟิซึม (RFLP) ระหว่าง Klebsiella ที่ยึดเกาะกับข้าวคือ สายพันธุ์ R15 และ R17 กับสายพันธุ์อิสระ K. pneumoniae M5a1 ซึ่งเป็นที่รู้จักอย่างดีโดยใช้เรสทริกชันเอนไซม์และ Southern hybridization กับโพรบที่เป็นจีนโครงสร้างไนโตรจีเนส และจีนกลูตามินซินเทเทสของ K. pneumoniae M5a1 จากการตรวจหาพลาสมิดพบว่าทั้ง R15 และ R17 ไม่มีพลาสมิด เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอของโครโมโซมให้บริสุทธิ์และแยกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamHI BglII EcoRI HindIII PstI SalI SmaI และ XhoI เพื่อเปรียบเทียบ RFLP ของสายพันธุ์ยึดเกาะราก R15 และ R17 กับ K. oxytoca NG13 ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนชนิดยึดเกาะรากที่แยกจากข้าวญี่ปุ่น กับสายพันธุ์อิสระ K. pneumoniae M5a1 พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอแยกชิ้นมีความแตกต่างระหว่าง 3 สายพันธุ์ที่ยึดเกาะกับข้าวกับสายพันธุ์อิสระ K. pneumoniae M5a1 แต่ไม่มีรูปแบบที่แตกต่างระหว่าง 3 สายพันธุ์ที่ยึดเกาะราก เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดแล้วนี้มาไฮบริไดซ์กับโพรบ pSA30 ซึ่งมีจีนโครงสร้างไนโตรจีเนสด้วยวิธีของ Southern พบว่าจำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่มีฮอโมโลจีกับจีนโครงสร้างไนโตรจีเนสเหมือนกันในทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ยึดเกาะกับข้าว คือ NG13 R15 และ R17 ซึ่งแตกต่างกับสายพันธุ์อิสระ M5a1 เฉพาะเมื่อตัดดีเอ็นเอด้วย BglII PstI และ SmaI เมื่อไฮบริไดซ์กับ Fa Fb และ Fc ซึ่งมี nifHD nifDK และ nifKTYE ของจีนไนโตรจีเนสตามลำดับ พบความแตกต่างของลำดับเบสจำเพาะของเอนไซม์เหล่านี้เมื่อเทียบกับแผนที่การตัดของจีนไนโตรจีเนสของ K. pneumoniae อยู่ในบริเวณของ nifL nifE และ nifJ ตามลำดับ และเมื่อใช้จีนกลูตามีนซินเทเทสเป็นโพรบ พบว่าบริเวณ glnA ntrBC ของ Klebsiella ทั้ง 4 สายพันธุ์มีฮอโมโลจีสูงเมื่อใช้เอนไซม์ 7 ชนิดที่มีความจำเพาะในบริเวณนี้ตัด และทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ยึดเกาะกับข้าวแตกต่างจากสายพันธุ์อิสระ M5a1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ XhoI ซึ่งตำแหน่งตัดอยู่นอกบริเวณ glnA ntrBC ผลการทดลองทั้งหมดแสดงว่า Klebsiella ทั้ง 3 สายพันธุ์ NG13 R15 และ R17 มีวิวัฒนาการร่วมกันเนื่องจาก RFLP เหมือนกันทั้งในจีนไนโตรจีเนสและบริเวณ glnA ntrBC และค่อนข้างเหมือนกับสายพันธุ์อิสระ K. pneumoniae M5a1 ซึ่งพบลำดับเบสแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต สุวรรณา สุทธิสุคนธ์

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

CO25951 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM, RFLP, NITROGEN-FIXING, ORYZA SATIVA L.
SUWANNA SUTHISUKON : RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) OF NITROGEN-FIXING BACTERIA ASSOCIATED WITH RICE (ORYZA SATIVA L.)
THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D., ASSO. PROF. SIRIPORN SITTIPRANEED, Ph.D. 82 pp. ISBN 974-581-724-4

Klebsiella R15 and R17 are associative nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of rice. In associative rice-Klebsiella system, the nitrogenase activity is several hundred folds higher than free-living condition. The aim of this research is to compare the restriction fragment length polymorphism (RFLP) between the associative Klebsiella strains R15 and R17 with the best known free-living K. pneumoniae M5a1 by using restriction enzymes and Southern hybridization with nif structural genes and glnA gene of K. pneumoniae M5a1 as probes. Since both Klebsiella strains R15 and R17 have no plasmids, their chromosomal DNAs were purified and digested individually with BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, PstI, SalI, SmaI and XhoI for the RFLP patterns to compare with those of associative K. oxytoca NG13, the rhizospheric diazotroph isolated from japonica rice and free-living K. pneumoniae M5a1. Restriction patterns of all restriction enzymes show pattern of discrete bands which can distinguish the 3 associative Klebsiella strains from the free-living K. pneumóniae M5a1, but there is no polymorphism among the 3 associative strains. Southern hybridization between pSA30 containing nif structural genes region and digested DNA show identical profile of hybridization band among 3 associative strains NG13, R15 and R17, which differ from free-living M5a1 only in DNA subjected to BglII, PstI and SmaI digestion. Probing with subfragments Fa, Fb and Fc of nifHDKTYE containing nifHD, nifDK and nifKTYE respectively locate the differences in BglII, PstI and SmaI restriction sites from the restriction map of K. pneumoniae to reside in nifL, nifE and nifJ regions respectively. Southern hybridization of DNA, digested with 7 restriction enzymes which cut within glnA ntrBC region, with glnA probe also shows high degree of homology among all Klebsiella strains. The 3 associative strains differ from free-living M5a1 only by XhoI cutting which is outside the glnA ntrBC region. All these results indicate coevolution of the 3 associative Klebsiella NG13, R15 and R17 with highly conserved nif genes region, and glnA ntrBC region; only a few changes in DNA sequences from the strictly free-living K. pneumoniae M5a1 can be detected.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต สุวรรณา สหิสดนธ์
สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest sense of gratitude to my adviser, Dr. Jariya Boonjawat for her encouragement, valuable suggestions, constructive criticism of the manuscript and support, and my deep appreciation is also expressed to my co-advisor, Dr. Siriporn Sittipraneed.

I am especially indebted to Dr. Sanha Panichajakul, Dr. Nantakorn Boonkerd and Dr. Vichien Rimphanitchayakit for serving as thesis committee, helpful discussions and interpretation, and also for valuable suggestions about the data in this study.

I wish to acknowledge the contribution of the National Center of Genetic Engineering and Biotechnology for the financial support of this research.

My thank is extended to all staff members and students of the Biochemistry Department for their sincerity and friendship, and especially to Mrs. Haumchan Srisopa for preparing the manuscript.

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

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....

CONTENTS.....

LISTS OF TABLES.....

LISTS OF FIGURES.....

ABBREVIATION.....

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II MATERIALS AND METHODS.....14

2.1 Bacterial strains and plasmids.....14

2.2 Media and growth condition.....15

2.3 Reagents and buffers.....15

2.4 Detection and preparation of plasmids.....18

2.5 Isolation and purification of chromosomal DNA.....21

2.6 DNA manipulation by restriction enzymes.....22

2.7 Recovery of DNA fragments from low-melting temperature agarose gel electrophoresis.....23

2.8 Labelling of DNA probes with [α-^{32}P] dCTP by nick translation reaction.....23

2.9 Southern blot transfer.....25

2.10 Hybridization.....25

2.11 Autoradiography.....26

III RESULTS.....27

3.1 Detection and preparation of plasmid DNA.....27

3.2 Preparation of chromosomal DNA.....32

3.3 Comparison of restriction fragment length polymorphism (RFLP) of free-living and associative Klebsiella strains.....32

3.4 Comparison of RFLP by nif structural genes.....39

3.5 Comparison of RFLP by glnA probe.....46

IV DISCUSSION.....58

REFERENCES.....71

APPENDIX.....79

BIOGRAPHY.....82

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

2.1 Bacterial strains and plasmids....14

2.2 Recognition sequences of type II restriction endonucleases....22

3.1 Restriction analysis of *nif* structural genes of *Klebsiella* strains by Southern hybridization....44

3.2 Restriction analysis of *nif* structural genes of *Klebsiella* strains by Southern hybridization using *nif* structural gene fragments as probes....49

3.3 Restriction analysis of *glnA* gene of *Klebsiella* strains by Southern hybridization....57

LIST OF FIGURES

Figure — Page

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

1.2 Restriction maps of pGE100 and pAM51.....11

1.3 Model for the regulation of *nif* genes via *nif*LA by *gln*A *ntr*BC regulon.....12

3.1 Gel electrophoresis of lysate from *E. coli* strains harbouring plasmid and associative *Klebsiella* spp. by modified Eckhardt's method.....28

3.2 Electrophoresis of lysates from *E. coli* strains harbouring plasmid and associative *Klebsiella* spp. by rapid procedure of Kado and Liu (1981).....30

3.3 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA prepared by rapid alkaline extraction.....31

3.4 Gel electrophoresis of pBR322, pSA30 and pAM51 after purification by isopycnic centrifugation.....33

3.5 The chromosomal DNA of *Klebsiella* spp. extracted by method of Rodriquez and Tsit (1983).....34

3.6 Suitable condition for cutting chromosomal DNA from *Klebsiella* spp. digested with 8 restriction enzymes.....35

3.7 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of chromosomal DNA of *Klebsiella* spp. digested with 8 restriction enzymes.....37

3.8 Electrophoresis of purified plasmid pSA30 before and after digestion with *Eco*RI, *Hin*dIII, *Bam*HI and combination of *Hin*dIII and *Bam*HI.....40

Page

3.9 Time course of nick translation reaction into pSA30.....41

3.10 Southern hybridization between pSA30 probe and chromosomal DNA of Klebsiella spp. digested with BamHI, EcoRI, HindIII, SalI and XhoI.....42

3.11 Southern hybridization between pSA30 probe and chromosomal DNA of Klebsiella spp. digested with BglII, PstI and SmaI.....43

3.12 Electrophoresis nif structural gene fragments obtained by cutting pSA30 with BamHI and HindIII and recovered form low-melting temperature agarose gel electrophoresis.....45

3.13 Time course of nick translation reaction into Fa, Fb and Fc fragments of pSA30.....47

3.14 Southern hybridization of nif structural genes fragments (Fa, Fb and Fc) with chromosomal DNA of Klebsiella spp. digested by BglII, PstI and SmaI.....48

3.15 Hybridization scheme between nif genes of K. pneumoniae and pSA30, Fa, Fb and Fc probes.....50

3.16 Restriction patterns of plasmid pAM51 on agarose gel.....51

3.17 Time course of nick translation reaction into pAM51.....52

3.18 Patterns of glnA fragment after cutting pAM51 with EcoRI and recovered from low-melting temperature agarose gel electrophoresis.....53

3.19 Time course of nick translation reaction into glnA probe.....55

3.20 Southern hybridization between glnA probe and chromosomal DNA of Klebsiella spp. digested with 8 restriction enzymes.....56

ABBREVIATION

A	Absorbance
bp	Base pair
Carb	Carbenicillin
Ci	Curie
cm	Centrimetre
cpm	Count per minute
°c	Degree celcius
dATP	Deoxyadenosine 5′ triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5′ triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine 5′ triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase I	Deoxyribonuclease I
dTTP	Deoxythymidine 5′ triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
g	Gram
h	Hour
kb	Kilobase
Km	Kanamycin
l	Litre
M	Molar
µCi	Microcurie
µg	Microgram
µl	Microlitre
µM	Micromolar
mg	Milligram
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmole	Millimole
ng	Nanogram
POPOP	Phenyl-oxazolylphenyl-oxazolylphenyl
PPO	2,5-Diphenyl oxazole
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNase I	Ribonuclease I
rpm	Revolution per minute
Tc	Tetracycline
V	Volume