

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4680158

ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณลักษณะและยีนส์ของ malic enzymes ในไรโซเบียมที่แยกได้ ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : ศุภวัฒน์ สีนสูงศ์วัฒน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : aiissnsw@chiangmai.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 เมษายน 2546 - 30 เมษายน 2552

การจัดจำแนกไรโซเบียม 26 ไอโซเลทที่แยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่วในประเทศไทย โดย การวิเคราะห์ยีนที่ควบคุม 16S rRNA และการทดสอบลักษณะทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับไรโซเบียม มาตรฐานและ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ผลของการวิเคราะห์ 16S rDNA และความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมทำให้จัดจำแนกไรโซเบียมออกเป็น 6 สปีชีส์คือ *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* และ *Rhizobium galegae*. จึงคัดเลือก *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 และ *R. galegae* DASA12028 เป็นตัวแทนของแต่ละสปีชีส์เพื่อใช้ในการตรวจสอบ กิจกรรมของ TME และ DME เปรียบเทียบกับไรโซเบียมมาตรฐาน 3 ชนิดคือ *Rhizobium meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA122 และ *B. japonicum* USDA110 พบกิจกรรมของทั้ง DME และ TME มาลิคเอนไซม์ ในไรโซเบียมทั้ง 6 ชนิด เมื่อใช้ Native-PAGE และการย้อมสีตรวจกิจกรรมของ DME และ TME มาลิคเอนไซม์ พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในสารสกัดเอนไซม์ทั้งหมดจาก *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA110 และ *B. japonicum* USDA122 จึงเลือก *B. japonicum* USDA122 เพื่อใช้ศึกษาการโคลนและตรวจสอบลักษณะ ยีนที่ควบคุมมาลิคเอนไซม์ ไพรเมอร์ ME1f และ ME1r ได้รับการออกแบบจากการลำดับการจัดเรียงตัวของ เบสบนบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่ควบคุมมาลิคเอนไซม์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ME1 ขนาด 678 คู่เบสที่ คาดว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีน dme ได้จากจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวโดย PCR ลำดับการจัดเรียงตัวของเบสใน ME1 ถูกนำไปเปรียบเทียบกับ dme ยีนของจุลินทรีย์อื่น ๆ โดยมีความเหมือนกับ dme ยีนของ *M. loti* (AP002995) 75.0% และของ *S. meliloti* (AF017443) 75.6% ดังนั้น จึงใช้ ME1 เป็นตัวติดตาม dme ยีน ในจีโนมของไรโซเบียม เมื่อเปรียบเทียบลำดับการจัดเรียงตัวของเบส ของ ME1 กับข้อมูลจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 จากสถาบันดีเอ็นเอ Kazusa ทำให้สามารถออกแบบ ไพรเมอร์หนึ่งคู่ คือ DMEf และ DMEr ไพรเมอร์นี้ออกแบบจากจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดที่คาดว่าจะ เป็น ORF ในจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้งสองในการทำ PCR สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ *Bjdme2* จากจีโนมของ *B. japonicum* USDA122 ได้ ดีเอ็นเอที่ได้ถูกเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T ก่อน แล้วจึงโคลนอีกครั้งสู่เวกเตอร์ pET32a(+) เพื่อศึกษาการแสดงออก โปรตีนที่แสดงออกและผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถแสดงกิจกรรมของ DME เมื่อใช้ NAD⁺ และ NADP⁺ เป็นโคแฟกเตอร์ โดยมีค่ากิจกรรมเป็น 0.316 และ 0.044 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ โปรตีน ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ Southern Blot พบว่าตัวติดตาม ME1 เข้าคู่กับ *Bjdme2* และให้สัญญาณชัดเจน DME ที่แสดงออกมีน้ำหนักโมเลกุล 83 และ 664 kDa เมื่อหาด้วย SDS-PAGE และ การย้อมสีกิจกรรมเอนไซม์ใน native-PAGE ตามลำดับ

คำหลัก : *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, Malic enzymes, DME and Thailand

Abstract

Project Code : MRG4680158

Project Title : Studies on characteristic and genes of malic enzymes in local rhizobia isolated in Thailand

Investigator : Suphawatt Sinsuwongwat, Department of Biotechnology, Chiangmai University

E-mail Address : aissnsw@chiangmai.ac.th

Project Period : 1st April 2003 – 30th April 2009

Twenty-six bacteria isolates nodules of leguminous plant in Thailand were identified by 16S rRNA gene analysis and biochemical test and compared with standard rhizobia and *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The result of 16S rRNA gene analysis and phylogenetic relationships identified their into six species, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium galegae*. Represents of each species *B. elkanii* DASA35011, *R. tropici* DASA23046, *B. liaoningense* DASA12006, *B. japonicum* DASA02007, *R. gallicum* DASA12023 and *R. galegae* DASA12028 were determined of TME and DME activities and compared to those of 3 standard rhizobia, *Rhizobium meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA122 and *B. japonicum* USDA110. It was found that all six rhizobia showed both activities of DME and TME. Native-PAGE showed both activities staining of DME and TME in crude enzymes extracted from *R. meliloti* 1021, *B. japonicum* USDA110 and *B. japonicum* USDA122. *B. japonicum* USDA122 was selected for cloning and characterization of malic enzymes encoding genes. The degenerated primers, ME1f and ME1r, were designed according to the conserve region of malic enzyme genes, using the multiple sequence analysis. A proposed conserved region of DME gene (ME1: 678 bp) was amplified from genomes of *B. japonicum* USDA122 using those degenerated primers by PCR. The DNA sequence of the ME1 PCR product was compared with those DME genes of other microorganisms, the similarity in values was 75.0% with *M. loti* (AP002995) and 75.6% with *S. meliloti* (AF017443). Therefore, the ME1 PCR product used as a probe to follow the DME gene in rhizobium genome. When the DNA sequence of ME1 was compared with *B. japonicum* USDA110 genomic data of Kazusa institute, a set of PCR primers, DMEf and DMEr were designed based on the sequence at the beginning and end of proposed ORF on *B. japonicum* USDA110 genome. The PCR product (*Bjdme2*) amplified from *B. japonicum* USDA122 by those primers and subjected to pGEM[®]-T Easy Vector, then subcloned to pET32a(+) for expression. The expressed and purified protein showed the DME activity with NAD⁺ and NADP⁺ at 0.316 and 0.044 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, respectively. The *Bjdme2* showed the strong signal with ME1 probe by Southern Blot analysis. The molecular weight of expressed DME was 83 kDa by SDS-PAGE and 664 kDa by native-PAGE with activity stain.

Keywords : *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, Malic enzymes, DME and Thailand