Thesis Title Expression of an Acid Response-Related Gene of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

Author Mr. Yasassawin Panyaboon

Degree Master of Science (Biotechnology)

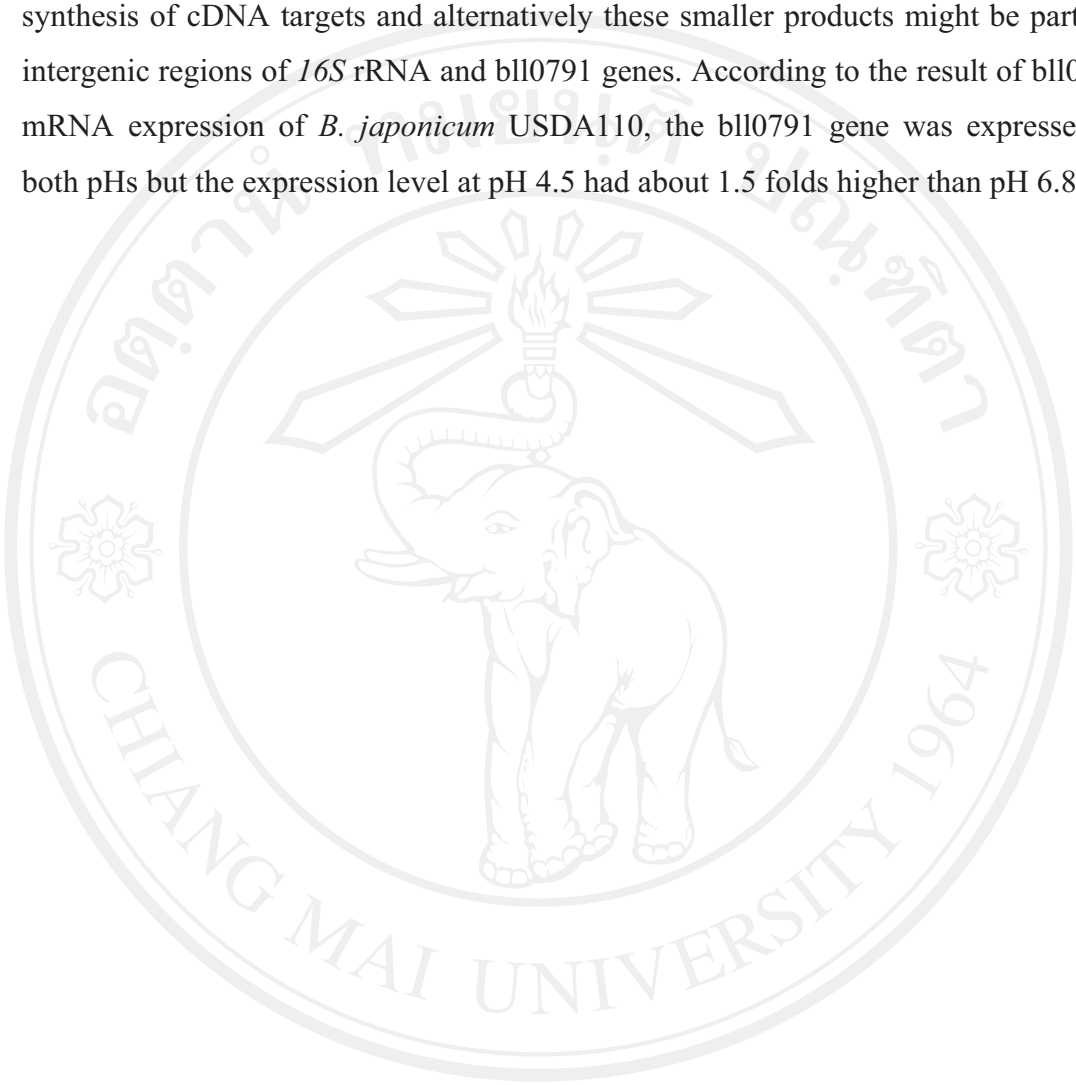
Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup

ABSTRACT

Soil acidity affects the growth and survival of soil bacteria and the nodulation of legumes. However, various kinds of root nodule bacteria are able to grow in acidic soil including *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, which can survive in YM media at a pH as low as 4.5. The *actA* gene from *Sinorhizobium meliloti* WSM419, previously reported to involve in acid response, was thus used to blast a genome of *B. japonicum* USDA110. The bll0791 (67% GC) from *B. japonicum* USDA110 was found to be related to the *actA* gene. Then, *actA* primer pair was designed to selectively amplify bll0791. The genomic DNA of *B. japonicum* USDA110 was used as the template for PCR with *actA* primer pair. The PCR product of the expected size (1500 bp) was purified and sequenced. The partial nucleotide sequences from *actA*F and *actA*R primers showed 97% and 95% identity to bll0791 nucleotide sequence of *B. japonicum* USDA110, respectively. The extracted RNA from *B. japonicum* USDA110 culture growing at pH 4.5 and 6.8 were used as template for first strand cDNA synthesis. The *16S* rRNAF primer and *actA*R primer were used for cDNA synthesis of housekeeping gene (*16S* rRNA) and acid response-related gene (bll0791), respectively. The result showed that the expected band of 1,480 bp of *16S* rRNA gene at both pH 4.5 and 6.8 was not observed, but unexpected products of 330 and 510 bp were detected. So as the case of bll0791, the expected band of 1500 bp did not appear

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

at both pHs. But the unexpected band of 370 bp at pH 4.5 with higher intensity than that of pH 6.8 was detected. This result may be due to the absence of intact RNA for synthesis of cDNA targets and alternatively these smaller products might be parts of intergenic regions of *16S* rRNA and bll0791 genes. According to the result of bll0791 mRNA expression of *B. japonicum* USDA110, the bll0791 gene was expressed at both pHs but the expression level at pH 4.5 had about 1.5 folds higher than pH 6.8



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อกรดของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

ผู้เขียน นาย ยศัสวิน ปัญญาบุญ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หทัยชนก เนียมทรัพย์

บทคัดย่อ

ดินเป็นกรดส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การอยู่รอดของแบคทีเรียในดิน รวมทั้งการเกิดปมราก อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียที่ปมรากหลายชนิดสามารถเจริญในดินที่เป็นกรด รวมถึง *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถอยู่รอดในอาหาร YM ที่พีเอชต่ำประมาณ 4.5 ได้ ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีน *actA* ใน *Sinorhizobium meliloti* WSM419 มีการตอบสนองต่อกรด ดังนั้นจึงได้นำยีนนี้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทั้งจีโนมของ *B. japonicum* USDA110 ซึ่งพบว่ายีน *actA* มีความสัมพันธ์กับยีน bll0791 (67% GC) ของ *B. japonicum* USDA110 ดังนั้นจึงได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์ขึ้นเพื่อสังเคราะห์ยีน bll0791 อย่างจำเพาะ โดยใช้จีโน-มิกดีเอ็นเอของ *B. japonicum* USDA110 เป็นแม่แบบสำหรับการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ *actA* จากการทดลองพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส จากนั้นจึงได้ทำให้บริสุทธิ์และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ *actA*F และ *actA*R บางส่วนมีความเหมือนกับยีน bll0791 ของ *B. japonicum* USDA อยู่ 97% และ 95% ตามลำดับ ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก ได้นำอาร์เอ็นเอ ของ *B. japonicum* USDA110 ที่เลี้ยงในอาหารพีเอช 4.5 และ 6.8 มาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก สำหรับยีน *16S* rRNA ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาจะใช้ไพรเมอร์ *16S* rRNAF ส่วนยีนที่มีการตอบสนองต่อกรด (bll0791) จะใช้ไพรเมอร์ *actA*R ในการสังเคราะห์ cDNA สายแรก ผลการทดลองพบว่า ยีน *16S* rRNA ที่พีเอช 4.5 และ 6.8 ไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดที่คาดไว้ คือ 1,480 คู่เบส แต่ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 330 และ 510 คู่เบส ที่ทั้งสองพีเอช ในกรณีของยีน bll0791 ไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดไว้ที่ขนาดประมาณ 1500 คู่เบส แต่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 370 คู่เบส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาร์เอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบเกิดการแตกหัก ทำให้การสังเคราะห์ cDNA สายแรกไม่สมบูรณ์ จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เป็นเพียงแค่บางส่วนของยีน *16S* rRNA และ bll0791

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ จากการศึกษาการแสดงของยีน bll0791 ของ *B. japonicum* USDA110 พบว่ายีน bll0791 มีการแสดงในทั้งสองพีเอช แต่มีการแสดงออกในพีเอช 4.5 มากกว่าพีเอช 6.8 อยู่ประมาณ 1.5 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved