Production of Nitrate Reductase from Corn (*Zea mays* L.) Cell Suspension Culture

Jirawadee Pulsuk

Master of Science Thesis in Biochemistry
Prince of Songkla University
2004

T
เลขหมู่ QK898.N57 J57 2004 c.1
Bib Key 242958
19 ก.ค. 2547

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอ็นไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยข้าวโพด

ผู้เขียน นางสาวจิราวดี พูลสุข

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

การชักนำแคลลัสข้าวโพดหวานเพื่อใช้เตรียมเซลล์แขวนลอยสำหรับศึกษาการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (NR; EC 1.6.6.1) พบว่าคัพภะอ่อนขนาด 1-2 มิลลิเมตร เหมาะต่อการชักนำ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บรักษาไว้ในที่มืด นอกจากนี้พบว่าแนวการวางคัพภะในแนวราบหรือแนวตะแคงข้างบนอาหารแข็งไม่มีผลต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะอ่อนแต่มีผลต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะที่เจริญเต็มที่แล้ว เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเหลวเป็น 3% ทำให้แคลลัสเจริญเติบโตดีที่สุด

เมื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่าทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* ให้ผลใกล้เคียงกัน และจากการศึกษาความสเถียรของเอนไซม์พบว่าการสกัดเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีทั้ง chymostatin และ PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์และมีความเสถียรสูงที่สุด นอกจากนี้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสถูกยับยั้งได้ด้วย Mg^{2+}

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารสูตร N6 ที่มีไนเตรต พบว่าความว่องไวเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสูงสุดในวันที่ 4 ซึ่งเป็นช่วงที่แคลลัสเริ่มมีการเพิ่มของน้ำหนักอย่างรวดเร็วหลังจากการเปลี่ยนอาหาร หลังจากนั้นความว่องไวของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในวันแรกต่อจากนั้นจะคงที่ ปริมาณไนไตรต์ที่สะสมในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 4 หลังจากเปลี่ยนอาหาร ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาผลของช่วงแสงต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสพบว่าเมื่อได้รับแสง 16 ชั่วโมง/8 ชั่วโมงในที่มืด ค่าความว่องไวของเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากได้รับแสง 4 ชั่วโมง จากนั้นจะลดลงและคงที่เมื่อเข้าสู่ช่วงมืดในรอบวัน และพบว่าน้ำตาลลดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในช่วงมืดของวัน ไม่พบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อไม่มีไนเตรต การศึกษาปริมาณไนเตรต แอมโมเนียม น้ำตาลชนิดต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร N6 และความเข้มแสงในการชักนำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสระหว่างการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย พบว่าเมื่อเลี้ยง

แคลลัสในอาหารเหลวที่มี KNO_3 ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ และไม่มีแอมโมเนียม ให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงสุด แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยแอมโมเนียม เมื่อได้รับน้ำตาลต่างชนิดกันได้ความว่องไวของเอนไซม์สูงที่สุดในแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร N6 ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 3%ในอาหารเหลวสูตร N6 และเมื่อได้รับความเข้มแสงที่ระดับ 345 $\mu mole\ m^{-2}\ s^{-1}$ ให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงที่สุด

การเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นกล้าข้าวและข้าวโพดอายุ 1 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้าข้าวมีค่าความว่องไวของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงกว่าข้าวโพดเมื่อได้รับไนเตรตที่ความเข้มข้นเดียวกัน และแอมโมเนียมมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นกล้าข้าวโพดและในเซลล์แขวนลอย พบว่า เซลล์แขวนลอยให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์สูงกว่า เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแคลลัสข้าวโพดมีคุณสมบัติ NAD(P)H-bispecific เช่นเดียวกับในราก สามารถใช้ NADH และ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยมีค่า K_m ของ NADH เท่ากับ 0.27 มิลลิโมลาร์ และค่า K_m ของ NADPH เท่ากับ 0.302 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ KNO_3 เป็น 10 มิลลิโมลาร์

Thesis Title	Production of Nitrate Reductase from Corn (*Zea may* L.) Cell Suspension Culture
Author	Miss Jirawadee Pulsuk
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

Friable calluses (Type II) were induced from 1-2 mm immature embryos of sweet corn with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at 2 mg. l^{-1} under dark condition, in order to establish a cell suspension culture in N6 medium. The orientation of immature corn embryos, both horizontal and vertical placement on N6 medium culture had no effect on callus induction. The callus growth was highest in N6 liquid medium supplemented with 3% sucrose.

NR activity measured by the *in vitro* and *in vivo* assays showed similar trends. The NR activity of enzyme extracted in the presence of both chymostatin and PMSF, without Mg^{2+}, was very stable and highest among other buffers. In contrast, corn NR activity was sensitive to Mg^{2+} inhibition, even in the presence of both chymostatin and PMSF; the NR activities of that remained lower than other extraction buffers and decreased slightly throughout the incubation on ice.

During the preliminary study, rapid increase of NR activity was observed on the 4^{th} day after the transfer of the calluses to the liquid medium, which coincided with the callus growth. There was also a direct relationship between callus growth and NR activation. The protein content was increased very little on the 1^{st} day, then constant throughout culture period. However, the increase of nitrite accumulation in the calluses inhibited the callus growth and NR activation. Analysis of NR activity in cultured calluses over the 16 h light: 8 h dark photoperiod showed light/dark-dependent variations. However, no NR activity was detected in the absence of nitrate. In dark condition, sucrose supply in the presence of nitrate partially prevented the inhibition of NR

activation. Factors regulating the expression of NR activity in corn cell suspension culture such as concentrations of sugar (sucrose, glucose and fructose), nitrate and ammonium ions in the medium were investigated. In N-free media no NR activity was detected in the cells. The optimal nitrate concentration for induction of high NR activity was about 30 mM of KNO_3 in N6 medium in the absence of 3.5 mM $(NH_4)_2SO_4$. The presence of ammonium ions in the culture medium resulted in low levels of NR activities. The effect of nitrate and ammonium ions on NR activity in callus suspension culture suggested that ammonium inhibited NR activity. The role of sugars on the induction of NR was inferred from the observation that exogenously supplied sugars led to increasing NR activation. It was shown that fructose, in the presence of nitrate, markedly increased the levels of NR activity more than sucrose and glucose.

The values of NR activities were determined in corn calluses illuminated with 354 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$. The activities of NR and protein levels were largely correlated under the same light intensity. When light intensity was increased, the NR activity and protein level increased. It is concluded that, in corn callus suspension, light, nitrate and sugar (especially fructose) could induce NR.

Rice seedlings showed markedly higher nitrate reduction than corn seedlings at the same concentration of nitrate. NR activity increased with increasing nitrate concentrations in corn seedlings. However, the NR activity of both species was greatly reduced in the presence of ammonium ion. The NR activity in corn callus was higher than that in corn seedlings. However, the NAD(P)H-NR activity of corn calluses was estimated as NADH-NR activity of shoot plus NAD(P)H-bispecific NR activity of root of corn seedlings. The response of corn calluses to NR induction was similar to that of corn seedling tissues, especially roots. In corn calluses crude extract, the apparent K_m-values of NR are 0.27 mM for NADH and 0.302 mM for NADPH. This showed that in corn callus, NR was NAD(P)H-NR bispecific.