



**Molecular and Biochemical Studies on P_{II} Protein
from the Nitrogen Fixing Bacteria
*Paenibacillus polymyxa***

Thesis Submitted for the award of the degree of doctor
Philosophy in Microbiology (Molecular Biology) (Ph.D.)

By

Doaa Ezzat El-Hadedy

M.Sc. (Genetics) 2005

Assistant Lecturer

Atomic Energy Authority

**National Center for Radiation Research and Technology
(NCCRT)**

Supervised by

HM Gebreel

Dr. Hassan Mahmoud Gebreel

Associate Professor of Microbiology

Microbiology Department,

Faculty of Science,

Ain Shams University

Prof. Dr. Hussein Abd El-Kareem

Ahmed

Professor of Microbiology

**National Center for Radiation Research
and Technology**

Dr. Nahed Abdel Ghaffar Abdel Aziz

Ibrahim

Associate Professor of Microbial Molecular

Biology, Head of Microbial Molecular

Biology Department

**Agricultural Genetic Engineering Research
Institute**

Dr. Khaled Zakaria El-Baghdady

Lecturer of Microbiology

Microbiology Department,

Faculty of Science,

Ain Shams University

Microbiology Department

Faculty of Science

Ain Shams University.

2010



APPROVAL SHEET

Title of the thesis

Molecular and Biochemical Studies on P_{II} Protein from the Nitrogen Fixing Bacteria *Paenibacillus polymyxa*

Name of the candidate

Doaa Ezzat El-Hadedy

Supervision committee:

- | | |
|--|---|
| 1- Dr. Hassan Mahmoud
Gebreel | Assistant Professor of
Microbiology, Microbiology
Department, Faculty of Science,
Ain shams University |
| 2- Prof. Dr. Hussein Abd El-
Kareem Ahmed | Professor of Microbiology,
National Center for Radiation
Research and Technology |
| 3- Dr. Nahed Abdel Ghaffar
Abdel Aziz Ibrahim | Associate Professor, Head of
Microbial Molecular Biology
Department
Agricultural Genetic Engineering
Research Institute |
| 4- Dr. Khaled Zakaria El-
Baghdady | Lecturer of Microbiology,
Microbiology Department,
Faculty of Science, Ain shams
University |

The thesis for Ph.D degree has been approved by the following Committee:

- | | |
|--|---|
| 1- prof.Dr.Ahmed Bahy Eldien | Professor of Molecular Biology.
Head of Agricultural Genetic
Engineering Research Institute |
| 2-prof.Dr.Ahmed Ibrahiem Eldewany | Professor of Microbiology in
National Research Center |
| 3-- Dr. Hassan Mahmoud Gebreel | Assistant Professor of
Microbiology, Microbiology
Department, Faculty of Science,
Ain shams University |
| 4- Prof. Dr. Hussein Abd El- Kareem
Ahmed | Professor of Microbiology,
National Center for Radiation
Research and Technology |

Date of Examination

/ / 2010

*This thesis has not been
previously, submitted for
any degree at this or at any
other university.*

Signature
Doaa El-Hadedy

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

”الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لَنَهْتَدِيَ

لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ”

(سورة الأعراف الآية 43)

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ



"دراسات جزيئية وبيوكيميائية على بروتين P_{II} فى البينى باسيلس بوليمكسا المثبتة للنيتروجين"

رسالة مقدمه من

دعاء عزت الحديدى

ماجستير فى الوراثة

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفه فى العلوم ميكروبيولوجى

(البيولوجيا الجزيئية)

مدرس مساعد - هيئة الطاقه الذريه - المركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع

تحت اشراف

أ.د/ حسين عبد الكريم أحمد

أستاذ الميكروبيولوجى

المركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع

أ.د.م/حسن محمود جبريل

أستاذ مساعد الميكروبيولوجى

كلية العلوم

جامعة عين شمس

د/ خالد زكريا البغدادى

مدرس الميكروبيولوجى

كلية العلوم

جامعة عين شمس

أ.د.م/ناهد عبد الغفار عبد العزيز ابراهيم

أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئية - رئيس قسم

البيولوجيا الجزيئية - مركز بحوث الهندسة

الوراثية الزراعية

قسم الميكروبيولوجى

كلية العلوم

جامعة عين شمس

2010



" دراسات جزيئية وبيوكيميائية على بروتين P_{II} فى البينى باسيلس بوليمكسا المثبتة للنيتروجين "

رسالة مقدمه من

دعاء عزت الحديدى

ماجستير فى الوراثة

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفه فى العلوم ميكروبيولوجى

(البيولوجيا الجزيئية)

مدرس مساعد - هيئة الطاقه الذريه

المركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع

تحت اشراف

أ.د.م/حسن محمود جبريل

أستاذ مساعد الميكروبيولوجى

المركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع

أ.د.م/ناهد عبد الغفار عبد العزيز ابراهيم

أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئيه-رئيس قسم

كلية العلوم

جامعة عين شمس

أ.د.م/ناهد عبد الغفار عبد العزيز ابراهيم

أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئيه-رئيس قسم

كلية العلوم

جامعة عين شمس

أ.د.م/ناهد عبد الغفار عبد العزيز ابراهيم

أستاذ مساعد بيولوجيا جزيئيه-رئيس قسم

البيولوجيا الجزيئية - مركز بحوث الهندسة

الوراثية الزراعية

تاريخ البحث: / / 2010

الدراسات العليا

ختم الاجازة:

أجيزت الرسالة بتاريخ: / / 2010

موافقة مجلس الجامعة

موافقة مجلس الكلية

/ / 2010

/ / 2010



صفحة الموافقة على الرسالة

الاسم : دعاء عزت الحديدى
العنوان : " دراسات جزيئية وبيوكيميائية على بروتين P_{II} فى البنى باسيلس بوليمكسا المثبتة للنيتروجين "

الدرجة: الدكتوراه

لجنة الإشراف:

1- أ.د.م/حسن محمود جبريل

2- أ.د / حسين عبد الكريم أحمد

3- أ.د.م/ناهد عبد الغفار عبد العزيز ابراهيم

4- د/ خالد زكريا البغدادى

لجنة التحكيم:

1- أ.د/ أحمد بهى الدين

2- أ.د/ أحمد ابراهيم الديوانى

3- أ.د.م/حسن محمود جبريل

4- أ.د/ حسين عبد الكريم احمد

استاذ مساعد بقسم
الميكروبيولوجى- كلية
العلوم – جامعة شمس
أستاذ بقسم
الميكروبيولوجى-
المركز القومى لبحوث
وتكنولوجيا الاشعاع
استاذ مساعد - رئيس قسم
البيولوجيا الجزيئية-
مركز بحوث الهندسة
الوراثية الزراعيه
مدرس بقسم
الميكروبيولوجى-
كلية العلوم – جامعة عين
شمس

أستاذ البيولوجيا الجزيئية -
مدير معهد بحوث الهندسة
الوراثية الزراعيه
أستاذ الميكروبيولوجى بالمركز
القومى للبحوث

استاذ مساعد بقسم
الميكروبيولوجى- كلية العلوم
– جامعة شمس
أستاذ الميكروبيولوجى - بقسم
الميكروبيولوجى-
المركز القومى لبحوث
وتكنولوجيا الاشعاع



جامعة عين شمس
كلية العلوم
قسم الميكروبيولوجى

دعاء عزت الحديدى
الدكتوراه فى فلسفة العلوم
ميكروبيولوجى
العلوم
عين شمس
2000
2002-9
2005-7
2006-6
2010-5

اسم الطالب:
الدرجة العلمية:
القسم التابع له:
اسم الكلية:
الجامعة:
سنة التخرج:
سنة تسجيل الماجستير:
سنة الحصول على الماجستير:
سنة تسجيل الدكتوراة:
سنة منح الدكتوراه:



جامعة عين شمس
كلية العلوم
قسم الميكروبيولوجى

شكر

أشكر السادة الأساتذة الذين قاموا بالإشراف وهم:

1-أ.د.م/حسن محمود جبريل

استاذ مساعد الميكروبيولوجى – كلية العلوم – جامعة عين شمس

2- ا.د/ حسين عبد الكريم أحمد

أستاذ الميكروبيولوجى – المركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع - هيئة الطاقة الذرية

3-أ.د.م/ناهد عبد الغفار عبد العزيز ابراهيم

استاذ مساعد – رئيس قسم البيولوجيا الجزيئية – مركز بحوث الهندسة الوراثية الزراعية

4-د/ خالد زكريا البغدادى

مدرس ميكروبيولوجى - كلية العلوم – جامعة عين شمس

ثم الذين تعاونوا معى فى البحث وهم:

1. أ. د/ كارل فورشمير بجامعة توبينجن بالمانيا.

2. أ.د/ مايك ميرك بجامعة ايست انجليا بانجلترا

3. الاستاذ وليد النمر بجامعة الملك عبد العزيز بالسعودية

وكذلك الهيئات الآتية:

معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية

المركز القومى لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع - هيئة الطاقة الذرية.

وحدة السيكونسر بجامعة توبينجن بالمانيا

قسم المبيعات بشركة برويمجا بمصر

معهد بحوث البترول

Dedication

*I dedicate this work to the soul of my
father and my brother; my loving mother
and my darling brother Mohamed.*

*With all Respect
Appreciation and Admiration*

Doaa El-hadedy



Acknowledgment

I thank God for all the blessings

I would like to express my kindest regards and gratefulness to my supervisor **Dr. Hassan Mahmoud Gebreel**, Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Ain shams University and **Dr. Khaled Zakaria El-Baghdady**, Lecturer of Microbiology, Microbiology Department, Faculty of Science, Ain shams University for their valuable guidance, direct supervision, continuous support during the stages of this work and their valuable revision.

My deep gratitude and sincere thanks to **Prof. Dr. Hussein Abd-Kareem Ahmed**, Professor of Microbiology, National Center for Radiation Research and Technology for his supervising the present work, his effort in constructive criticism and valuable critical reading and revision the manuscript.

Sincere especial thanks are to **Dr. Nahed Abdel Ghaffar Abdel Aziz Ibrahim**, Associate Professor, Head of Microbial Molecular Biology Department, Agriculture Genetic Engineering Research Institute, for her supervising the present work, great encouragement, her effort throughout the Ph.D, valuable scientific ideas and advices. Also, for her inspiring guidance, valuable time and helpful notices and for progress of the work with keen interest and encouragement.

I wish to thank **Prof. Dr. Karl Forchhammer** at Tubingen University in Germany for his unlimited support, great encouragement and valuable advice, sending some important chemicals used in this work. I also, like to thank him for giving the chance to learn with right way.

I am grateful to **Prof. Dr. Mike Merrick** at Anglia University in England for his advices throughout the Ph.D during the early practical work.

Thanks to my lovely brother **Mohamed Ezzat El-hadehy** in MIT Institute, USA for helping in statistical analysis and soft ware DNA program.

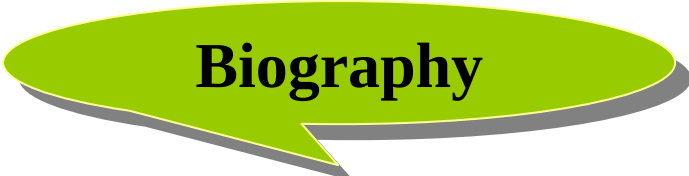
Especial thanks to **Dr. Sahar Tolba** lecturer in Microbiology department, Faculty of Science, Ain shams University for helping in sequence alignment.

My thanks are extending to the all members at Agriculture Genetic Engineering Research Institute, especially members of Microbial Molecular Biology Lab.

Also, I would like to thank all members at National Center for Radiation Research and Technology, Department of Microbiology and Gamma Radiation Unit.

Thanks for sales Department in Promega Company in Egypt. Especial thanks to dear colleague **Waleed Elnemr** in Saudia Arabia.

Finally, my great respect and gratitude to every one who participated in completion of this work.



Biography

Name: Doaa Ezzat El-Hadedy

Place of Birth: El-Mansoura

Locality: Cairo, Madinat Nasr

Qualification: B.Sc. degree in Microbiology with grade very good with degree of honor, ranked two, Faculty of Science, Tanta University (2000). M.Sc. Genetics (2005).

Degree awarded: Ph.D in Microbiology (Molecular Biology)

Faculty: Science

Department: Microbiology

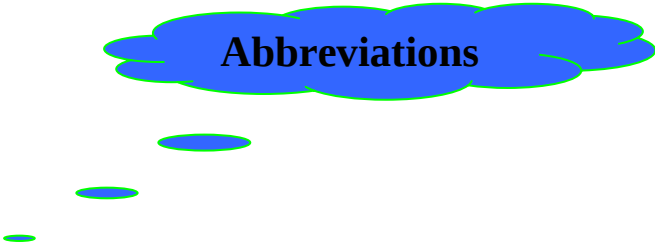
University: Ain Shams

Graduation year: 2000

Occupation: Assistant Lecturer, Microbiology Department, National Center for Radiation Research and Technology, Atomic Energy Authority.

Date of registration: 12-6-2006

Abbreviations



ADP	Adonsine di phosphate
ATase	Adenylyltransferase
AMP	Adonsine monophosphate
ATP	Adonsine tri phosphate
ATPase	Adonsine tri phosphatase
CcPA	Catabolite control protein A
CCR	Carbon catbolite repression
CDW	Cell Dry Weight
DMSO	Dimetheyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonuclic acid
dNTP	Deoxynucleotide tri phosphate
EDTA	Ethylenediaminetetra acetate
GOGAT	Glutamine-2-oxoglutarate –amino transferase
GS	Glutamine synthetase
HEPES	N-2 hydroxyethyle epiperazine N ₂ ethane sulfonic acid
IPTG	Isopropyl- β-D-Thiogalactopyranosid
Kbp	Kilo Base Pair
KDa	Kilo Dalton
KGy	Kilo grey
L.S.D	Least significance Difference
LB	Lauria Bertani medium
Mg⁺²	Magnessium ions
Mn⁺²	Manganease ions
MSM	Minimal Salt Medium
NB	Nutrient Broth
NF	Nitrogen fixing medium
Nif genes	Nitrogen fixing genes
NifA	Transcription factor for nif gene
Ntr	Nitrogen transport system
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glyverol
PTS	phosphotransferase transport system
RNA	Ribonucleic acid
Rpm	Rotation per minute
SD	Standered deviation

SDS	Sodium dodecyl sulphate
TAE	Tris-acetate-EDTA
TCA	Tricarboxylic acid cycle
TEMED	N, N, N, N, - tetramethyl ethylenediamine
Tris	Tris- hydroxymethyl aminomethane
TSS	Transformation and storage solution
U/ml	Unit per ml
Ur	Uridylation process
Utase	Urdyltransferase
UTase	Uridylyase enzyme
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3indoyl- β degalactopyranoside