

巴西固氮螺菌 Yu62 *nifA* 基因克隆、测序及功能分析*

王 娟 陈三凤 马旅雁 李季伦

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘 要:用 TD-PCR 法克隆了巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 的 *nifA* 基因。序列分析表明它与巴西固氮螺菌 Sp7 的 *nifA* 序列高度同源(96.5%),其编码的产物 NifA 蛋白与 Sp7 菌株 NifA 的氨基酸序列同源性为 97.6%。该基因可以完全互补巴西固氮螺菌 Sp7 *nifA*⁻ 突变株的 Nif⁻ 表型。研究了 NH₄⁺ 和 O₂ 对 Yu62 *nifA* 基因的表达及 NifA 活性的影响。结果表明:*nifA* 基因在 Yu62 菌株中是部分组成型表达的,氮和氧不能完全阻遏其表达,在 5mmol/L NH₄Cl 与微氧(0.5% O₂)条件下表达最高;NifA 蛋白在 0.4% ~ 0.5% O₂ 时活性最高,氧分压降低和提高都使 NifA 活性下降,1mmol/L NH₄Cl 足以抑制 NifA 的活性。

关键词: 巴西固氮螺菌 Yu62, *nifA* 基因, 克隆

中图分类号: Q754 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 06-0655-07

1976 年, Döbereiner 从巴西热带禾本科牧草根际分离到巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Sp7^[1], 由于该菌可与许多种禾本科作物及牧草联合固氮, 并分泌多种促进植物生长的物质, 而受到各国同行的重视, 对该菌株的生理、生化、遗传、分类和应用等方面进行了广泛研究^[2,3]。

巴西固氮螺菌分布极为广泛, 从热带、温带、寒带均可分离出该菌。1984 年, 杨洁彬等人从北京郊区的玉米根系中分离出巴西固氮螺菌 Yu62^[4]。巴西固氮螺菌的固氮作用严格受土壤含氮量的制约, 高氮阻遏固氮酶的合成和活性。巴西固氮螺菌是微好氧固氮微生物, 具有鞭毛可自动游向适合其生长和固氮的氧浓度和定植于植物根部, 因此, 在土壤中 O₂ 不是限制其固氮和生长的主要因素。为了发挥巴西固氮螺菌在禾本科粮食作物生产中节约氮肥和增产的效应, 首先要破除铵阻遏该菌固氮酶合成和活性抑制的双重障碍, 才能在高氮肥力水平的土壤中发挥其固氮作用, 而达到节肥和增产的目的。本实验室承担了“863”高科技计划的玉米联合固氮菌的研究, 主要目标是对 Yu62 进行遗传改造, 构建耐铵工程菌。本室先后克隆和分析了 *ntrBC*、*draTG*、*glnB*、*glnZ* 等重要固氮调节基因, 其中 *ntrBC* 基因编码产物的氨基酸序列与 Sp7 NtrBC 蛋白同源性分别达到 95.3%、97.9%^[5]; *draTG* 基因编码产物的氨基酸序列与 Sp7 相应蛋白同源性分别达到 99.0%、97.7%^[6]; 而 *glnB*、*glnZ* 编码产物 P_I 和 P_Z 蛋白较为保守, 与 Sp7 相应蛋白同源性为 100%^[7], 说明两个菌株之间在基因水平上高度同源, 属于同一菌株的两个不同菌系, 其基因调节的基本原则应该是相同的。但巴西固氮螺菌 Yu62 为我国固有, 适合在我国应用而

* 国家 863 高科技计划(863-101-03-04-02)资助项目

作者简介: 王 娟(1975-), 女, 吉林省人, 中国农业大学生物学院博士研究生。

收稿日期: 2001-03-13, 修回日期: 2001-04-12

且在生产和应用上可避免发生知识产权纠纷问题。

本文报道 *nifA* 基因的克隆、测序和表达及其活性受氨和氧调节的分析, 序列分析结果进一步证明了二者在基因上高度同源, 而表达分析结果证明二者之间存在差异, 为 Yu62 菌株以后的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

本实验用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Phenotypes and / or genotype	Source or reference
Strains:		
<i>E. coli</i> K-12		
S17-1	Tp ^r Sm ^r RP4-2(Tc ^r ::Mu)(Km ^r ::Tn7), Pro ⁻ , res ⁻ mod ⁺	[8]
<i>A. brasilense</i>		
Yu62	Ap ^r Nx ^r , wild type	[4]
Sp7358	Spe ^r Km ^r , <i>nifH</i> :: <i>lacZ-Km</i>	[10]
Sp70671	Spe ^r Km ^r , <i>nifA</i> ⁻ , <i>nifH</i> :: <i>lacZ-Km</i> (Nif)	[10]
Sp7358-pKC11	Spe ^r Km ^r , <i>nifH</i> :: <i>lacZ-Km</i> with plasmid pKC11	This work
Sp70671-pKC11	Spe ^r Km ^r , <i>nifA</i> ⁻ , <i>nifH</i> :: <i>lacZ-Km</i> with plasmid pKC11	This work
Yu62-pKS212	Ap ^r Nx ^r Km ^r Tc ^r Yu62 with plasmid pKS212	This work
Sp7067-pKS212	Ap ^r Nx ^r Km ^r Tc ^r , Sp7067 with plasmid pKS212	This work
Plasmids		
pGEM-T	T-vector	Promega Co
pGEM3zf(+)	Ap ^r , cloning and sequencing vector	Promega Co
pGEM11zf(+)	Ap ^r , cloning and sequencing vector	Promega Co
pNS3	pGEM3zf(+) derivative carrying a 2.1kb <i>A. brasilense</i> Yu62 <i>nifA</i> gene	This work
pNC11	Ap ^r , pGEM11zf(+) derivative carrying a 2.4kb <i>A. brasilense</i> Yu62 <i>nifA</i> gene	This work
pVK100	Tc ^r Km ^r	[11]
pKOK5	Ap ^r Km ^r pUC19 derivative carrying a <i>lacZ-Km</i> Cassette	[12]
pKC11	Tc ^r , pVK100 derivative carrying a 2.4kb <i>A. brasilense</i> Yu62 <i>nifA</i> gene	This work
pKS212	Tc ^r Km ^r , pVK100 derivative carrying <i>A. brasilense</i> Yu62 <i>nifA</i> :: <i>lacZ-Km</i>	This work

1.1 培养方法

巴西固氮螺菌用 LD 培养基 30℃ 培养;测定 β -半乳糖苷酶活性时选用 K-lactate 培养基^[9] 30℃ 培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 LB 培养基 37℃ 培养。对 *E. coli*, 抗菌素的使用浓度为:氨卞青霉素(Ap) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;四环素(Tc) 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;卡那霉素(Km) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对 *A. brasilense*, 各抗菌素浓度分别为:Ap 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Km 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 萘啶酮酸(Nx) 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Tc 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 质粒的接合转移

按文献[9]进行。

1.4 β -半乳糖苷酶活性测定

将待测菌株的过夜培养物离心收集菌体,用含相应浓度 NH_4Cl 的 K-Lactate 培养基洗两次,稀释至 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.4$ 。将 1 mL 稀释好的菌液接入含不同氧分压的 10 mL 血清瓶中,然后置于 30℃ 水浴摇床 100 r/min 诱导 4h,开始测定 β -半乳糖苷酶活性。 β -半乳糖苷酶活性测定依据分子克隆 p844 所述方法^[13], β -半乳糖苷酶活性的单位数(即: miller units) = $1000 \times (OD_{420} - 1.7 \times OD_{550}) / (t \times V \times OD_{600})$, 式中 t 为时间(单位: min); V 为体积(单位: mL)。不同氧分压血清瓶的制备:在血清瓶中注满灭菌水,塞上胶塞时可在胶塞上插一针头,以排除气泡。胶塞上插两个针头,一个接排水管,另一个接进气管,将血清瓶中的水用高纯氮(99.99% N_2)置换,继续通气 and 排气 3 min,使瓶内气压与大气压平衡。按照空气中氧浓度为 20.8% 计算,氧终浓度为 0.1% 时,打入 0.29 mL 空气,在打空气之前按照算出的体积,先从瓶中抽出等体积的氮气,依此类推制备不同氧分压的气体瓶。

1.5 酶及试剂

核酸限制性内切酶、DNA 聚合酶 Klenow 片段购自 Promega 公司和华美公司, T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司,地高辛标记 DNA 检测盒购自 Rhoche 公司。

1.6 TD-PCR(touching down PCR)

根据 *A. brasilense* Sp7 *nifA* 基因的序列,合成一对引物:

Primer 1: 5' CAT ACC GTC CTC CAG GGT C 3'

Primer 2: 5' TCC CCC CGA CCA TAT CCA G 3'

分别与巴西固氮螺菌 Sp7 *nifA* 基因 5' 和 3' 端互补, PCR 运行程序: 94℃ 1 min, 66℃ ~ 54℃ 1 min, 每个循环降低 0.5℃, 72℃ 3 min, 然后 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 3 min, 进行 10 个循环。

1.7 λ 噬菌体文库筛选及 DNA 克隆

按文献[13]进行。

2 结果和分析

2.1 巴西固氮螺菌 Yu62 *nifA* 基因的克隆和序列分析

从基因组文库中克隆位于 2.4 kb *Sal* I 片段上的 *nifA* 完整基因没有成功,获得的十几个阳性克隆均为 2.0 kb,可能是由于在构建文库时 *Sau*3A I 对 *nifA* 基因上 2.0 kb 处的 *Sau*3A I 位点具有偏好性造成的,将此片段克隆至测序载体 pGEM3zf(+),命名为 pNS3,测序表明,该片段具有 5' 端的 440 bp 非编码区及 N-端和中间结构域的序列缺失了 C-端的

一部分序列。改用 TD-PCR(touching down PCR)法扩增巴西固氮螺菌 Yu62 *nifA* 基因。将扩增的 2.4kb 片段克隆至载体 pGEM-T, 命名为 pTnifA。测序发现, 该序列与巴西固氮螺菌 Sp7 *nifA* 同源性为 96.5%, 此片段含有一个编码 625 个氨基酸的 ORF, 即巴西固氮螺菌 Yu62 NifA, 与巴西固氮螺菌 Sp7 NifA 序列同源性为 97.6%。该序列在 GenBank 上的注册号为 AF288483。

2.2 巴西固氮螺菌 Yu62 *nifA* 基因穿梭质粒及其表达载体的构建

将 pTnifA 和载体 pGEM11zf(+)用 *Not* I 酶切, 回收 2.4kb *Not* I 片段与载体连接得到重组质粒 pNC11。将 pNC11 用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 回收 2.4kb 的完整 *nifA* 基因片段, 与经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切的穿梭质粒 pVK100 载体连接得到重组质粒 pKC11(图 1)。

为了研究巴西固氮螺菌 Yu62 *nifA* 基因表达规律, 将 *lacZ*-Km 盒(*lacZ*-Km cassette)克隆至 *nifA* 基因启动子之后, 通过测定 β -半乳糖苷酶活性, 来测定 Yu62 *nifA* 基因的表达。为避免 PCR 引入突变, 采用从巴西固氮螺菌 Yu62 基因组文库中克隆出 2.0kb *Sal* I 片段构建 *nifA* 基因启动子表达载体。用 *Sal* I 酶切 pNS3, 回收 2.0kb *Sal* I 片段, 克隆至穿梭质粒 pVK100 的 *Xho* I 位点, 筛选 Km 敏感株, 经酶切鉴定, 得到与 Km 抗性基因方向相反的重组质粒, 命名为 pKS2。将含有 *lacZ*-Km' Cassette 的质粒 pKOK5 用 *Pst* I 酶切, 回收 4.8kb 的 *lacZ*-Km' 基因片段, 克隆至 pKS2 的 *Pst* I 位点, 筛选 *lacZ* 基因方向与 *nifA* 基因方向一致的重组质粒, 命名为 pKS212, 即构建成由 *nifA* 基因启动子表达的 *lacZ* 基因, 通过测定 β -半乳糖苷酶活性即可检测 *nifA* 基因的表达(图 1)。

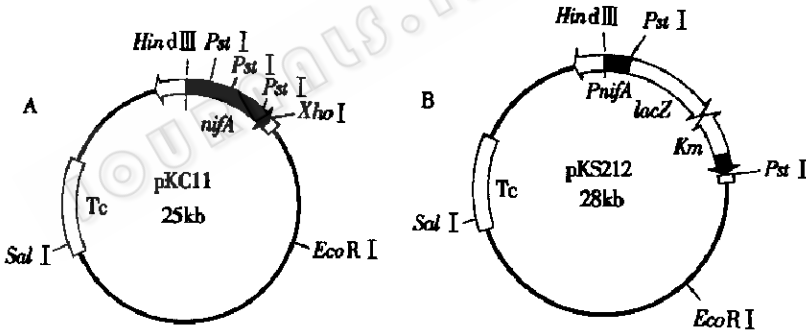


图 1 重组质粒 pKC11、pKS212 结构示意图

Fig.1 Construction of recombinant plasmids pKC11 and pKS212

A: Broad-host plasmid pKC11 containing complete Yu62 *nifA* gene; B: Expression vector of Yu62 *nifA* gene;

PnifA indicates the promoter region of *nifA* gene.

2.3 NH₄Cl 及氧浓度对 *nifA* 基因表达的影响

用三亲接合法将 *nifA* 基因表达载体 pKS212(*nifA*::*lacZ*)转入巴西固氮螺菌 Yu62 中, 分别在空气(20% O₂)和微氧(0.5% O₂)的条件下, 与不同浓度 NH₄Cl 基本培养基中, 测定各菌株中 β -半乳糖苷酶的活性。结果如图 2。在微氧条件下 Yu62(pKS212)菌株中 *nifA* 基因表达比空气条件下表达高, 说明 *nifA* 基因表达受高氧的阻遏。在微氧条件下, *nifA* 基

因在含 20mmol/L NH₄Cl 的基本培养基中的表达比在 0 mmol/L NH₄Cl 条件下表达略有降低,说明 NH₄Cl 对 *nifA* 基因的表达有微弱阻遏作用。微氧时, *nifA* 基因在 5mmol/L NH₄Cl 条件下表达最高,随着氨浓度的进一步提高, *nifA* 基因表达开始下降。在有空气条件下, *nifA* 基因在含 20mmol/L NH₄Cl 的基本培养基中的表达比在 0 mmol/L NH₄Cl 条件下表达也略有降低,2 mmol/L NH₄Cl 条件下表达最高,随着氨浓度的进一步提高, *nifA* 基因表达开始下降(图 2),说明 NH₄Cl 和氧存在协同作用。

2.4 NH₄Cl 及氧浓度对 NifA 活性的影响

用三亲接合法将含完整 Yu62 *nifA* 基因的穿梭质粒 pKC11 转入巴西固氮螺菌 Sp70671 和 Sp7358 菌株。通过筛选 Ap'Nx'Km'Te' 表型,并提质粒,酶切鉴定,确认质粒已转入 Sp70671 和 Sp7358 菌株。Sp70671 为 *nifA*⁻ 而 *nifH* 基因启动子之后插入 *lacZ-Km* 盒,用以检测 *nifH* 基因的表达,转入 pKC11 后,通过测定 *nifH* 基因的表达,即可研究 Yu62 NifA 蛋白的活性。在 Sp7358(pKC11)中,同时含有 Sp7 基因组上的 *nifA* 和质粒 pKC11 中 Yu62 *nifA* 基因。在不同氧分压和 NH₄Cl 浓度下,测定巴西固氮螺菌 Sp70671 (pKC11)、Sp7358 (pKC11) 及 Sp70671、Sp7358 中 *nifH-lacZ* 的表达结果见表 2。

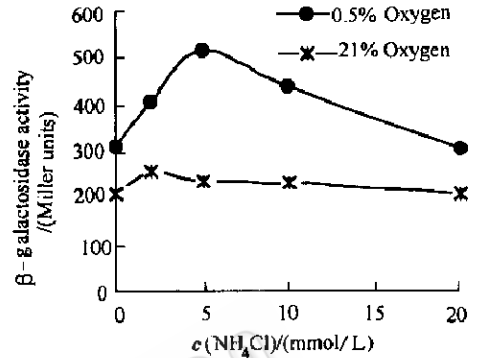


图 2 NH₄⁺ 浓度与 O₂ 分压对 Yu62(pKS212)中 *nifA* 基因表达的影响

(以 β-半乳糖苷酶活性(单位: miller units)表示)
Fig.2 β-galactosidase activity (miller units) of *nifA* expression vector pKS212 in *A. brasilense* Yu62, under different concentration of ammonium chloride (mmol/L) and oxygen.

表 2 NH₄⁺ 浓度与 O₂ 分压对 Yu62 NifA 活性的影响

Table 2 Yu62 NifA activity under different concentrations of ammonium chloride and oxygen (Measured by β-galactosidase activity of *nifH-LacZ* (unit: miller units))

Strains	β-galactosidase activity (miller units)											
	c(NH ₄ Cl)										c(NH ₄ Cl)	
	= 0 mmol/L					= 1 mmol/L						
	c(O ₂)/%											
	0	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	1	5	20	0.5	0.5
Sp70671 ^a (pKC11)	37.6	56.7	87.3	90.1	71.2	68.2	46.1	21.2	9.4	1.5	0.5	0.5
Sp70671 ^b		ND [*]		0.50				ND				0.44
								ND				
Sp7358 ^c (pKC11)				122.1				ND				9.4
		ND						ND				
Sp7358 ^d		ND		83.7				ND				1.2
								ND				

* ND: not detected; "a" Sp7 chromosomal *nifA*::Tn5, *nifH*::*lacZ*, with plasmid-borne Yu62 *nifA* gene; "b" Sp7 chromosomal *nifA*::Tn5, *nifH*::*lacZ*; "c" Sp7 wild type with *nifH*::*lacZ* and plasmid-borne Yu62 *nifA* gene; "d" Sp7 wild type with *nifH*::*lacZ*; Results were averages of three independent assays.

表2指出, Yu62菌株的 *nifA* 基因可以互补巴西固氮螺菌 Sp7 的 Nif^- 表型。Sp7358 (pKC11) 菌株的 *nifH-lacZ* 表达比在 Sp70671(pKC11) 中表达高, 说明 *nifA* 基因拷贝数增加导致了 *nifH* 表达提高。Yu62 *NifA* 活性在 0.5% O_2 时最高。0.5% O_2 时 5mmol/L 以下的 NH_4Cl 不阻遏 *nifA* 基因的表达(图2), 但 1mmol/L NH_4Cl 足以阻遏 *nifH* 表达, 说明 *NifA* 蛋白在 1mmol/L NH_4Cl 的培养条件下即失活。*NifA* 蛋白在 0.5% 氧分压下活性最高, 氧分压低于和高于 0.5% 时都会引起 *NifA* 活性下降。氧分压降至 0, 即完全厌氧时, *NifA* 蛋白仍有最高活性的 42%。而氧分压提高到 0.7% 以上时, *NifA* 蛋白活性急剧下降, 直至 1% 时 *NifA* 蛋白活性下降至最高活性的 23%。氧分压进一步提高, *NifA* 蛋白活性缓慢降低, 至 5% 氧分压时下降至最高活性的 10%, 至 21% 氧分压, 即空气条件下, 降至最低水平, *NifA* 活性受氧调节的特征可能与 *NifA* 蛋白 C-端具有氧敏感的 C-X11-C-X19-C-X4-C 保守序列有关, 氧分压在低于 0.5% 时, *NifA* 活性下降可能是由于低氧影响了产能代谢。

3 讨论

在肺炎克氏杆菌中氮和氧严格调节 *nifA* 的表达, 只有在低氧和低氮 (< 2mmol/L) 条件下, *nifA* 基因才能表达。*A. brasilense* Yu62 菌株中, 氮和氧都不能完全阻遏 *nifA* 的表达。但是本实验分析的 Yu62 *nifA* 基因的表达与 Liang 等人^[9] 对 Sp7 菌株中的分析并不完全一致, 在 Sp7 菌株中 *nifA* 的表达主要受氧的调节, 受氮的影响很小, 在 21% O_2 和无氮条件下 *nifA* 的表达为最高, 在 21% O_2 和 20mmol/L NH_4Cl 和条件下, *nifA* 的表达最低, 为无氮时表达的 20%^[9]; 而在 Yu62 中, *nifA* 的表达受高氧的阻遏, 在 0.5% O_2 和 5mmol/L NH_4Cl 时, *nifA* 的表达最高; 而本实验分析结果与 Fadel-Picheth 等人对巴西固氮螺菌 Fp2 菌株中 *nifA* 的表达的分析结果是基本一致的, 即 *nifA* 的表达是对氧敏感的。菌株之间不同的分析结果的原因还需进一步的实验证明。巴西固氮螺菌的 *nifA* 表达及其蛋白活性调节的分子机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Döbereiner J, Day J M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Newton W E, Nyman C J. Proceeding of the 1st International Symposium on Nitrogen fixation. Pullman: Washington State University Press, 1976. 518 ~ 538.
- [2] Zhang Y, Burris R H, Ludden P W, et al. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 152:195 ~ 204.
- [3] Halbleib C M, Ludden P W. *Recent Advances in Nutritional Sciences*, 2000, 130:1081 ~ 1084.
- [4] 杨洁彬, 曹增良, 李季伦. 北京农业大学学报, 1984, 10:321 ~ 329.
- [5] 阎大来, 何路红, 李季伦. 微生物学报, 1995, 35:242 ~ 249.
- [6] 马旅雁, 李季伦. 生物工程学报, 1997, 13:227 ~ 235.
- [7] 陈三凤, 杨红, 王娟, 等. 中国农业大学学报, 2000, 5:9 ~ 13.
- [8] Simon R, Priefer U, Puhler A. *Biotechnol*, 1983, 1:784 ~ 791.
- [9] Liang Y Y, Kaminski P A, Elmerich C. *Mol Microbiol*, 1991, 5:2735 ~ 2744.
- [10] Florence A, Sunietha K, Kennedy I R, et al. *Mol Plant-Microbe Interactions*, 1994, 7:748 ~ 757.
- [11] Knauf V C, Nester E W. *Plasmid*, 1982, 8:45 ~ 54.
- [12] Kokotek W, Lotz W. *Gene*, 1989, 84:467 ~ 471.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second ed., New York: Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989.

[14] Fadel-Picheth C M T, Souza E M, Rigo L U, *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **179**:281 ~ 188..

CLONING SEQUENCING AND EXPRESSION PATTERN, FUNCTIONAL ANALYSIS OF *nifA* GENE IN *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Yu62

Wang Juan Chen Sanfeng Ma Luyan Li Jilun

(College of Biology Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The *nifA* gene of *Azospirillum brasilense* Yu62 was cloned and sequenced. The expression of *nifA* gene was investigated in wild type strain *Azospirillum brasilense* Yu62. The results show that expression of *nifA* gene is not repressed by ammonium and oxygen completely. But the expression of Yu62 *nifA* gene is different from that of strain Sp7 *nifA* gene. Expression of Yu62 *nifA* seems more sensitive to oxygen than that of Sp7 *nifA* which shows the highest expression in condition of aerobic, while the Yu62 *nifA* gene shows the highest expression in the condition of microaerobic. The regulation of NifA protein activity by ammonia and oxygen was investigated. Results showed that the NifA protein is repressed by ammonia, 1mmol/L NH₄Cl can inhibit activity of NifA protein completely. Oxygen concentration affects activity of NifA protein. NifA protein is highly active in 0.4% ~ 0.5% O₂.

Key words: *Azospirillum brasilense* Yu62, *nifA* gene, Cloning