

苜蓿中华根瘤菌 042BM *noeA* 基因的克隆、敲除与功能的初步分析

杜秉海 姜巨全 李小红 王 磊 杨苏声*

(中国农业大学生物学院微生物学系 农业部农业微生物资源与其应用重点开放实验室 北京 100094)

摘 要 通过 PCR 扩增获得了 042BM 的 *noeA* 基因。该基因与苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)1021*noeA* 的同源性为 99% ,而其 *NoeA* 与 1021*NoeA* 的相似性为 97% 。还发现其 *NoeA* 与中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium* sp.)BNC1 可能的 SAM-依赖性的甲基转移酶相似性为 32% ,而其 303 ~ 362 氨基酸区域与大肠杆菌(*Escherichia coli*)的核糖体 50S 亚基的 L11 蛋白甲基转移酶(*PmM*)的 160 ~ 220 氨基酸区域的相似性达到 41% 。通过插入卡那盒 ,敲除 *noeA* ,获得突变株 042BMA-Km。与苜蓿中华根瘤菌 042BM 相比 ,敲除 *noeA* 的突变株在普通紫花、保定、宁夏、百发和傲汉苜蓿品种上的结瘤数、根瘤鲜重和植株地上部分的干重都有不同程度的增加 ,而在秘鲁苜蓿品种上的结瘤数和植株地上部分的干重明显下降 ,在皇后和美国杂花苜蓿品种上则没有明显的变化。

关键词 苜蓿中华根瘤菌 , 结瘤基因 , 基因敲除 , 结瘤作用

中图分类号 : Q93 , Q78 文献标识码 : A 文章编号 : 0001-6209 (2005) 02-0195-06

根瘤菌与植物的共生相互作用是具有专一性的 ,即每种根瘤菌(或菌株)只能在特定的豆科植物上结瘤固氮 ,其共生结构的形成是一个十分复杂的生物学过程 ,依赖于共生体双方分子信号的识别和交换 ,而且是由根瘤菌和植物多个基因所决定的^[1]。根瘤菌的结瘤基因包括 *nod*、*nol* 和 *noe* 等。在百脉根中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)^[2]和大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)^[3]基因组中 ,结瘤基因主要位于染色体上的共生岛内 ,而苜蓿中华根瘤菌的结瘤基因主要集中于共生质粒 *pSymA* 上^[4]。1995 年 Ardourel 等报道 ,*noeA* 和 *noeB* 是苜蓿中华根瘤菌的两个宿主专一性结瘤基因 ,而且处于同一个操纵子中^[5] ,它们的功能可能具有紧密的相关性。2004 年 本实验室采用 Tn5-1063 转座诱变法分离了 042BM *noeB* 基因 ,并推测其 *NoeB* 是一个跨膜蛋白 ,含有 4 个跨膜区 ,但与已知的运输蛋白没有同源性 ,可能具有一个未知的新的共生作用机制^[6]。

pJQ200SK 是一个自杀性质粒 ,含有枯草芽孢杆菌的 *sacB* 基因 ,该基因编码果聚糖蔗糖酶 ,可以被蔗糖诱导表达 ,对革兰氏阴性菌产生致死作用^[7] ,因此 ,在 5% 蔗糖存在时 ,该质粒在根瘤菌中不能存活。此外 ,它还是一个穿梭质粒^[8] ,所以可以将外源

基因克隆到 *pJQ200SK* 上 ,然后利用 *pUC4K* 上的卡那盒对目标基因进行体外敲除^[9]。再将携带有突变基因的重组质粒转移到根瘤菌中 ,进行同源重组 ,筛选基因敲除突变株^[10]。

本文采用上述方法 ,对分离自新疆和田的普通紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的苜蓿中华根瘤菌 042BM 的 *noeA* 基因进行敲除 ,获得 *noeA* 敲除突变株。并通过结瘤试验 ,研究 042BM *noeA* 基因与结瘤作用的关系 ,分析其功能 ,试图阐明 *noeA* 基因作用的分子机制 ,从而丰富人们对根瘤菌—豆科植物共生相互作用过程的认识。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本试验所用菌株与质粒见表 1。

1.1.2 酶和生化试剂 :*Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、PCR 其它试剂、*Pst* I、*Apa* I、*Spe* I 以及庆大霉素(Gm)、氨基青霉素(Ap)、卡那霉素(Km)和氯霉素(Cm)等购自华美公司 ,T4 DNA 连接酶、碱性磷酸单脂酶、IPTG、X-gal 和 DNA 胶回收试剂盒等购自上海生物工程技术服务有限公司。

基金项目 国家 973 项目 (2001CB108905) 欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10056)

* 通讯作者。Tel 86-10-62732674 Fax 86-10-62731332 E-mail :yangssh@cau.edu.cn

作者简介 杜秉海 (1963 -) 男 , 山东人 , 博士研究生 , 主要从事分子微生物学的研究。

收稿日期 2004-07-16 , 修回日期 2004-12-21

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain/Plasmid	Relevant characteristic	Source
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
042BM	Wild type strain, Cm ^r	This laboratory
042BMA-Km	042BM <i>noeA</i> ⁻ mutant, <i>noeA</i> : :Km, Cm ^r , Km ^r	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Host of recombinant plasmids	Hanahan D. 1983 ^[11]
pJQ200SK	Cloning vector, suicide plasmid carrying <i>sacB</i> , Gm ^r	Sevilla University
pRK2013	Helper plasmid, <i>tra</i> ⁺ Km ^r	Wolk C P. 1991 ^[12]
pUC4K	Carrying Km cassette, Km ^r , Ap ^r	Taylor L A. 1988 ^[9]
pJQ-A	<i>noeA</i> DNA fragment cloned into pJQ200SK, Gm ^r	This study
pJQA-Km	Km-cassette in <i>Pst</i> I site inserted into <i>noeA</i> of pJQ-A, Gm ^r , Km ^r	This study
pGEM-T easy	T-A cloning vector, Ap ^r	Promega
pGEMT-A	PCR product of <i>noeA</i> cloned into pGEM-T easy, Ap ^r	This study

1.2 培养基和培养条件

042BM 及相关突变株采用 TY 培养基^[13], 在 28℃ 下培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)采用 LB 培养基^[14], 在 37℃ 下培养。

1.3 结瘤试验

采用试管琼脂斜面法^[15]进行结瘤试验。在温室培养 30d 后, 观察结瘤情况。

1.4 *noeA* 的 PCR 扩增和 DNA 测序

根据苜蓿中华根瘤菌 1021 基因组中的 *noeA* 序列, 设计一对 PCR 扩增引物, 分别为 *noeAP1*: 5'-ATGGCAAGAATGGCGGACAG-3' 和 *noeAP2*: 5'-TTACTCTGATCTTTTCAACG-3'。引物的合成由上海博亚生物技术有限公司完成。

PCR 反应体系(50 μ L): ddH₂O 40.5 μ L, 10 \times *Pfu* buffer 5 μ L, dNTP(10 μ mol/L)1 μ L, *noeAP1*(10 μ mol/L)1 μ L, *noeAP2*(10 μ mol/L)1 μ L, 042BM 总 DNA 1 μ g, *Pfu* DNA 聚合酶 2U。反应条件: 94℃ 4min, 94℃ 1min, 50℃ 2min, 72℃ 4min, 30 个循环, 72℃ 10min。在预变性后, 加入 *Pfu* DNA 聚合酶, 以防止其对引物的降解。在最后延伸阶段, 加入 *Taq* DNA 聚合酶, 添加 dA 尾巴。

将上述扩增产物连接到 pGEM-T easy 上, 送上海博亚生物技术有限公司测序。

1.5 分子遗传学操作

苜蓿中华根瘤菌总 DNA 的提取参照文献 [16]; 质粒 DNA 提取、DNA 的限制性酶切和连接等按文献 [14] 进行。

1.6 *noeA* 敲除突变株的筛选

在辅助质粒 pRK2013 的帮助下, 通过三亲本杂交^[6]将携带 *noeA*::Km 的重组质粒导入苜蓿中华根瘤菌 042BM, 在含有卡那霉素(20 μ g/mL)、氯霉素(7 μ g/mL)和蔗糖(5%)的 TY 培养基上筛选突变株。

1.7 菌落 PCR 筛选双交换突变株

建立以下反应体系(100 μ L): ddH₂O 79mL, 10 \times *Taq* buffer 10mL, MgCl₂(25mmol/L)6 μ L, dNTP(10 μ mol/L)1 μ L, *noeAP1*(10 μ mol/L)1 μ L, *noeAP2*(10 μ mol/L)1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 10U。

将上述 25 μ L 的 PCR 反应液分装于 0.5mL 的薄壁管中。用无菌牙签随机挑取上述 10 个突变株的少许菌体, 分别接种于薄壁管反应液中, 进行 PCR 扩增。其反应条件为: 94℃ 10min, 94℃ 1min, 51℃ 2min, 72℃ 3min, 30 个循环, 72℃ 10min。

2 结果

2.1 042BM *noeA* 基因的克隆

以 042BM 总 DNA 为模板, 用引物 *noeAP1* 和 *noeAP2* 进行 PCR 扩增。回收 PCR 产物, 将其连接于 pGEM-T easy, 转化 *E. coli* DH5 α 。在含有氨苄青霉素(50 μ g/mL)、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上, 经过蓝白斑筛选和酶切分析, 获得重组质粒 pGEMT-A。对插入的 PCR 产物进行测序, 将测序结果在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 Blastn 搜索。结果证实, 所扩增产物为 *noeA* 基因(GenBank Accession NO.: AY573929)。042BM *noeA* 与 1021 *noeA* 的同源性为 99%。对 042BM 的 *NoeA* 进行 Blastp 搜索, 其与 1021 *NoeA* 的相似性为 97%。此外, 还发现其 *NoeA* 与中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium* sp.)BNC1 可能的 SAM-依赖性的甲基转移酶相似性为 32%, 而其 303~362 氨基酸区域与大肠杆菌、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)和睡眠嗜血菌(*Haemophilus somnus*)的核糖体 50S 亚基的 L11 蛋白甲基转移酶(PmA)的 160~220 氨基酸区域的相似性分别达到 41%、39% 和 35%。与深海发光细菌

(*Photobacterium profundum*) L11 蛋白甲基转移酶的 174 ~ 234 氨基酸区域的相似性为 40% ,说明该区域是这类甲基转移酶的保守性结构域 (图 1)。

2.2 重组质粒 pJQA-Km 的构建

通过限制性酶切位点的分析发现, *noeA* 基因中没有 *Apa* I 和 *Spe* I 位点。可以利用 pGEM-Teasy 上

NoeAMARMADSKLVAAAPRGRVAGSFRDPSGQVHFHQDRILRTMDSAAAIE	48
ZP00193419	MNEPRPLQKGATVAIESLSGVDTPQAIEREPEGSYRDRNGAVFYGDGRVFRYLSAQALAN	60
PrmA	0
CAG21693	0
NP407111	0
ZP00132569	0
NoeA	FASAERVMRQLVV..EGRLVDFSDAEP SLHQLFQGS IARVLQHPLLEQITYPYEWFSAGL	106
ZP00193419	WRLLEVAPFFQVFKREGHVVDTWVDPGAEGLELGRWAGVVEHARMPFISYPYEWFSGML	120
PrmA	0
CAG21693	0
NP407111	0
ZP00132569	0
NoeA	KAAALFHLQLQLDLLDQGFCLSDATAINVOFEGRPTFIDHLSIKPYRDGQLWYGHKQFC	166
ZP00193419	KDAALLHLELMRGA LSADMILK DSSAYNIQWNGVRPVFIDHLSFEP LNKGEFVWGYRQFC	180
PrmAMPW IQLKLNITIGANAECLSDATMEA.GAVSITFQDT	35
CAG21693	..MLKFHARISPLCSNRSQI I SELT MPW IQLKLNATENAEAI GDMLEETGALSATFIDA	59
NP407111MPW IQLKLNITIGNAESLGDVLVES.GAVSITFQDT	35
ZP00132569MAW IQLRLNSINKEAEKISEMTEEI.GAVSITFQDS	35
NoeA	EQFLMPLLIIRSVFLITTHHSWYRGNLEGVPSADFV KLI ISTRWFVSHKLFMHIILPAKLQSS	226
ZP00193419	ELFLYPLMLCAYKGVDFRPFWRGRVVDGTPAEEMRAIMSSRDLLRPGVLLHVAAGAAALQKR	240
PrmA	HDTVFVEFLPGETRLWGD TDVIGLEDAETDMNDVVAILENHIFSLGAGFAHKLEQLEDKDW	95
CAG21693	QDTPVFEPMPGETRLWGD TDVIGLYDAEIDMDFVLMMLKNSFLIAEDFAHKLEQLEDKDW	119
NP407111	HDTVFVEFLPGETRLWGD TDVIGLYDAETDMACVVAMLECHEIIGKGFTHKLEQLEDKDW	95
ZP00132569	QDTPVFEFLPGETRLWGD TDVIALFDKINMQIVRLLQOKNHL DENTAMKLEQLEDKDW	95
NoeA	RTSOTKVDLGDSPRFRITPKDAFRAMLAQLYSWISGTRKVDVGGKOSVWGGYANNTYTATOR	286
ZP00193419	YSGGGNMFALADAGEFKALIERNVEKLSRIVGRLEPANTKTITWADYDRTHSYDDAFILN	300
PrmA	EREWMDNFHMPMRFGRRLWICPSWRDVPDENAVNVMIDPGLAFGTGTHPTTSLCIEWLDSI	155
CAG21693	EREWMDNFHMPMRFGRRLWICPSWRDVPDENAVNVMIDPGLAFGTGTHPTTSLCIEWLDSI	179
NP407111	EREWMDNFHMPMRFGRRLWICPSWRDVPDPTAVNVMIDPGLAFGTGTHPTTALCIEWLDSI	155
ZP00132569	EREWMDNFHMPMFKGRRLWICPSWRDIPDENAINVMIDPGLAFGTGTHPTTALCIEWLDSI	155
NoeA	SDKQYVAEFVAQHKKPRITLIDLCNTGDFSYVALENGAEKAI GFD FPHALDAAFDRSVQ	346
ZP00193419	KKIEFVRRSAATHRWRLAW..DLG CNTGDFSR IAAEHS DYVVAMDGDMATEHLYRFEKGA	359
PrmA	DLINGK.....IVLDFGCGSILAI AALKLGAARAIGIDIDPOA IQASRDNAER	203
CAG21693	DIVGK.....IVLDFGCGSILAI AALKLGAEKVIGIDIDPOA IQASRDNAER	227
NP407111	DINGK.....IVLDFGCGSILAI AALKLGAARAIGIDIDPOA IQASRDNAQR	203
ZP00132569	DLINGK.....IVLDFGCGSILAI AALKLGA KSAVGIDIDPOA I IASFNNAEQ	203
NoeA	TS.KN...FLFLYL DARNPSPSQGWGERERQGFSSRSADAVLALAFEHHLATAHNMVPL	401
ZP00193419	DRAKN...IIFLVVNLADASPQGWRCARKAITERGRPELTLCLALVHHIVISANIPL	415
PrmA	NGVSRILEFLYLPPDQPEEMKADV VVANILAGPLRELAFLIISVLPVSGGL..LGLSGIILAS	261
CAG21693	NGVSKLALFLPPDQPTDVCADV VVANILAGPLRELSFVIKSLVKVGGK..LAISGVLEI	285
NP407111	NGVSRILEFLYLPPDQPAELSADV VVANILAGPLRELAFLIISVLPPTTGGH..LGLSGVLAT	261
ZP00132569	NGVAERLQLFLSEKIPDLDCA DVVIANILAGPLKEIYIILSNLVKPGD..LGLSGIILST	261
NoeA	AEVVAWVTVQAPKGTIEFMEKEDETVRMLAGREDIFSDYNEEAFASALSOKARVVRKHL	461
ZP00193419	ADFISWLAGLGTSLVIEFVGRDDEMVKILLANKDDQYDDYHPDVFRALLSAHFDTQAEEP	475
PrmA	QAESVCEAYADSFALDPVVEKEEWCRTITGKKN	293
CAG21693	QAEDVSTYYSDELALDPVVARDEWCRTISGYKA	317
NP407111	QAAGVAQAYEDKFIILDPVAEKEEWCRTITGIKK	293
ZP00132569	QAESVCEAYQCKEITLDPITIEREWCRTITGKNSFV	296
NoeA	IPGSKRTLYTFERS	475
ZP00193419	LKGKRRHIYFATAK	489
PrmA	
CAG21693	
NP407111	
ZP00132569	

图 1 042BM NoeA 与 L11 蛋白甲基转移酶的氨基酸序列同源性比较

Fig.1 Sequence identifies of 042BM NoeA with L11 methyltransferases

ZP00193419, SAM-dependent methyltransferase; PrmA, CAG21693, NP407111, ZP00132569 are the 50S ribosomal subunit L11 methyltransferases of *Escherichia coli*, *Photobacterium profundum*, *Yersinia pestis* and *Haemophilus somnus*, respectively.

的相应位点,用 *Apa* I 和 *Spe* I 对 pGEMT-A 进行双酶切,回收 *noeA* DNA 片段。然后连接到同样经过 *Apa* I 和 *Spe* I 双酶切的线性 pJQ200SK 上,获得含有 *noeA* 的自杀性重组质粒 pJQ-A。由于在 *noeA* 基因第 259、346 和 667 个碱基处有 3 个 *Pst* I 限制性酶切位点。因此,可以用 *Pst* I 酶切 pUC4K,回收卡那盒。后将其连接到经过 *Pst* I 酶切的线性 pJQ-A 上。将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 。经过蓝白斑筛选和限制性酶切分析,获得重组质粒 pJQA-Km。在该质粒上,*noeA* 的第 266~666 碱基之间的 401bp 的 DNA 片段被 1241bp 的卡那盒所取代。

2.3 042BM *noeA* 基因的敲除

通过三亲本杂交,将重组质粒 pJQA-Km 导入苜蓿中华根瘤菌 042BM 中,重组质粒上的 *noeA*:Km 与根瘤菌基因组中的 *noeA* 发生同源重组,将 *noeA* 进行敲除(图 2)。

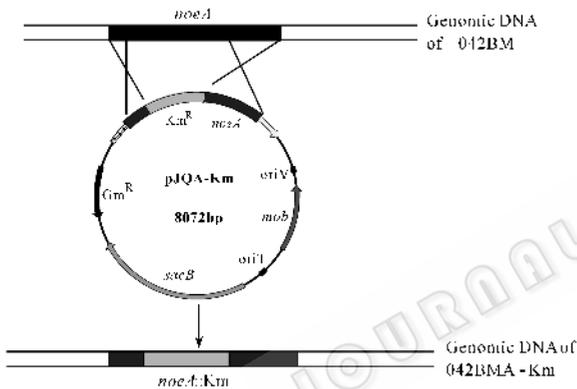


图 2 Km 盒对 042BM *noeA* 基因的敲除突变示意图

Fig.2 Deletion of 042BM *noeA* with Km cassette

由于在 5% 蔗糖存在的情况下,pJQA-Km 所携带的 *sacB* 基因的表达对 042BM 产生致死作用,只有发生双交换的重组子才能够存活下来。因此,可以在含有 5% 蔗糖、7 μ g/mL Cm 和 20 μ g/mL Km 的 TY 平板上筛选 *noeA* 发生双交换的突变株。进一步通过菌落 PCR 方法,以 *noeA*P1 和 *noeA*P2 为引物,以可能的 *noeA* 双交换突变株 042BMA-Km 基因组 DNA 为模板,进行扩增。对扩增产物进行凝胶电泳检测。从菌落 PCR 扩增产物的凝胶电泳谱可以看出,*noeA* 重组突变株 042BMA-Km 的 PCR 扩增产物大约为 2.2kb,而野生型菌株 042BM 的 PCR 扩增产物约为 1.4kb(图 3)。这个结果说明,在 042BMA-Km 基因组中,*noeA* 基因的 401bp 的 *Pst* I DNA 片段确实是通过双交换而被 1241bp 的卡那盒 DNA 片段所取代。

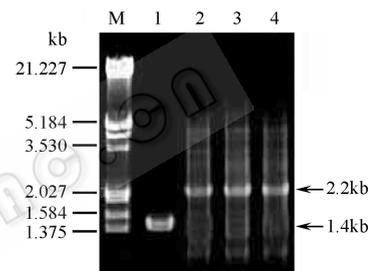


图 3 用 *noeA* primer 进行的 042BMA-Km 菌落 PCR 凝胶电泳图谱

Fig.3 Colony PCR products of 042BMA-Km with *noeA* primers
M. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III; 1. PCR product of 042BM genomic DNA; 2~4. PCR products of 042BMA-Km genomic DNA.

2.4 042BMA-Km 突变株的结瘤能力

用突变株分别接种保定苜蓿、宁夏苜蓿、美国杂花苜蓿、秘鲁苜蓿和百发苜蓿等,并以 042BM 为对

表 2 042BMA-Km 对不同苜蓿(*Medicago sativa*)品种的结瘤情况

Table 2 Nodulation of 042BMA-Km on different cultivars of alfalfa

Cultivar	Strain	Number of nodules per plant/mg	Nodule color	Fresh weight of nodules per plant/mg	Plant top dry weight per plant/mg
Putong Zihua	042BMA-Km	4.94 \pm 0.33	Pink	2.25 \pm 0.25	7.60 \pm 0.26
	042BM	3.77 \pm 0.50	Pink	1.82 \pm 0.16	5.55 \pm 1.14
Baoding	042BMA-Km	4.71 \pm 0.53	Pink	2.54 \pm 0.30	8.22 \pm 0.48
	042BM	3.33 \pm 0.58	Pink	1.00 \pm 0.00	5.62 \pm 0.90
Ningxia	042BMA-Km	5.08 \pm 1.04	Pink	2.42 \pm 0.29	9.00 \pm 0.50
	042BM	4.44 \pm 0.77	Pink	1.33 \pm 0.58	4.81 \pm 1.15
Baifa	042BMA-Km	4.17 \pm 1.34	Pink	2.00 \pm 0.00	6.13 \pm 1.24
	042BM	2.25 \pm 0.25	Pink	1.58 \pm 0.38	5.75 \pm 1.09
Aohan	042BMA-Km	4.67 \pm 0.34	Pink	2.33 \pm 0.35	6.17 \pm 0.76
	042BM	2.76 \pm 0.29	Pink	1.65 \pm 0.92	5.00 \pm 0.00
Huanghou	042BMA-Km	2.00 \pm 0.38	Pink	1.50 \pm 0.35	5.92 \pm 1.66
	042BM	2.42 \pm 0.42	Pink	1.33 \pm 0.58	5.50 \pm 0.71
Zahua	042BMA-Km	2.75 \pm 0.87	Pink	1.58 \pm 0.38	6.50 \pm 0.75
	042BM	3.75 \pm 0.29	Pink	1.75 \pm 0.00	5.33 \pm 1.76
Milu	042BMA-Km	3.83 \pm 0.76	Pink	2.17 \pm 1.04	8.17 \pm 1.89
	042BM	5.67 \pm 0.29	Pink	3.25 \pm 1.06	15.00 \pm 4.95

Value in the table is the means \pm SD. Triplicates were done for each treatment 5 plants per tube.

照, 观察结瘤情况。从表 2 中可以看出, 与 042BM 相比, *noeA* 敲除突变株 042BMA-Km 在普通紫花、保定、宁夏、百发和傲汉苜蓿品种上的结瘤数、根瘤鲜重和植株地上部分的干重都有不同程度的增加, 而在秘鲁苜蓿品种上的结瘤数和植株地上部分干重明显下降, 在皇后和美国苜蓿品种上则没有明显的变化。这些结果表明, 该突变株对苜蓿的结瘤固氮能力表现出明显的品种特异性。

3 讨论

基因敲除技术是研究根瘤菌基因功能的有效途径之一^[10]。与出发菌株 042BM 相比, *noeA* 基因的敲除突变株 042BMA-Km 在保定等苜蓿品种上的结瘤固氮能力显著提高, 而且表现出明显的品种特异性。这些试验结果与 *noeB* 基因的转座子插入突变对结瘤固氮能力的影响相似^[6]。由于它们同处于一个操纵子, 这意味着它们在功能上具有密切的联系。此外, 042BM NoeA 的 303-362 氨基酸区域与大肠杆菌 K-12 菌株的核糖体 50S 亚基的 L11 蛋白甲基转移酶 P_{rmA} 的 160 ~ 220 氨基酸区域的相似性达到 41%。P_{rmA} 对 L11 蛋白进行翻译后甲基化修饰, 进而影响 L11 的功能^[17]。L11 具有多种功能, 其严紧型应答作用使得在外界氨基酸缺乏时 RNA 合成速度降低和合成量减少^[18]。据此推测, 042BM 的 NoeA 可能与 NoeB 共同参与氨基酸信号转导途径。NoeA 可能对 L11 进行甲基化修饰, 改变 L11 的构象, 使其失去了对 RNA 的稳定和保护作用, 进而降低了一系列与结瘤和固氮作用有关的基因的蛋白质翻译速度。当 *noeA* 发生突变后, 可能解除了 NoeA 对 L11 的甲基化修饰作用, 提高了与结瘤和固氮有关基因的蛋白质合成水平, 从而使 042BMA-Km 在某些苜蓿品种上的结瘤固氮能力提高。以上设想有待进一步证实。

参 考 文 献

[1] Hungria M, Pueppke S G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Bio Biochem*, 1997, **29**: 819 - 832.

[2] Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res*, 2000, **7**(6): 331 - 338.

[3] Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*

USDA110. *DNA Res*, 2002, **9**(6): 189 - 197.

- [4] Galibert F, Finan T M, Long S R, et al. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 2001, **293**(5530): 668 - 672.
- [5] Ardourel M, Lortet G, Maillat F, et al. In *Rhizobium meliloti*, the operon associated with the *nod* box n5 comprises *nodL*, *noeA* and *noeB*, three host-range genes specifically required for the nodulation of particular *Medicago* species. *Mol Microbiol*, 1995, **17**(4): 687 - 699.
- [6] 杜秉海, 李小红, 林榕姝, 等. 利用 Tn5-1063 转座诱变法分离苜蓿中华根瘤菌 042BM *noeB* 基因的研究. *微生物学报*, 2004, **44**(2): 206 - 209.
- [7] Pelicic V, Reyat J, Gicquel B. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol*, 1996, **178**(4): 1197 - 1199.
- [8] Quandt J, Hynes M F. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 1993, **127**: 15 - 21.
- [9] Taylor L A, Rose R E. A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 358.
- [10] Duelli D M, Tobin A, Box J M, et al. Genetic locus required for antigenic maturation of *Rhizobium etli* CE3 lipopolysaccharide. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 6054 - 6064.
- [11] Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 1966: 557.
- [12] Wolk C P, Cai Y, Panoff J M. Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive gene in a cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(12): 5355 - 5359.
- [13] Honeycutt R J, McClland M, Sobral B W. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol*, 1993, **175**(21): 6945 - 6952.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 908.
- [15] Vincent J M. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria: IBP Handbook No. 15*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970: 164.
- [16] de Bruijn F J, Rossbach S, Schneider M, et al. *Rhizobium meliloti* has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol*, 1989, **171**(3): 1673 - 1682.
- [17] Vanet A, Plumbridge J A, Alix J H. Cotranscription of two genes necessary for ribosomal protein L11 methylation (*prmA*) and pantothenate transport (*panF*) in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1993, **175**(22): 7178 - 7188.
- [18] Draper D E, Reynaldo L P. Survey and summary of RNA binding strategies ribosomal protein. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(2): 381 - 388.

Cloning , deletion and functional analysis of *noeA* from *Sinorhizobium meliloti* 042BM

DU Bing-hai JIANG Ju-quan LI Xiao-hong WANG Lei YANG Su-sheng*

(Key Laboratory for Microbial Resources and Application of Agriculture Ministry ,Department of Microbiology ,
College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract : 042BM *noeA* was obtained by PCR. It is identical to that of *S. meliloti* 1021 at 99% level , and similarity of their *NoeA* is 97% . In addition , it was found that this protein shares significant homology with the SAM-dependent methyltransferase of *Mesorhizobium* sp. BNC1(32% similarity) , and the similarity of its 303 ~ 362 region to the 160 ~ 220 region of L11 methyltransferases of *E. coli* (PrmA) is 41% . Compared to 042BM , the *noeA* deletion mutant 042BMA-Km showed different degrees of increase in number of nodule , fresh weight of nodule and plant top dry weight on alfalfa cultivars of Putong Zihua , Baoding , Ningxia , Baifa and Aohan , but decrease on Milu. However , this mutant has no significant change in ability to nodulate cultivars of Huanghou and Zahua. Hence , *noeA* is involved in alfalfa cultivar-specific nodulation.

Key words : *Sinorhizobium meliloti* , *noeA* gene , Deletion of gene , Nodulation

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2001CB108905) ; European Commission INCO-DC Program (ICA4-CT-2001-10056)

* Corresponding author. Tel 86-10-62732674 ; Fax 86-10-62731332 ; E-mail : yangssh@cau.edu.cn

Received date : 07-16-2004

Nikon 显微镜新产品介绍

为适应科研领域对显微镜技术日益增加的需求 , Nikon 公司近期推出了一系列显微镜新产品。这些产品针对科研领域的热点(比如活细胞研究) 作了大量技术改进 , 使整个显微系统性能得到有效提高。新产品主要包括 : C1Si 光谱式激光共聚焦显微镜 , 90i/80i 新型显微镜 , TIRF/W - TIRF 全反射荧光显微镜 , PA-GFP 模块 , PFS 完美调焦系统。

C1Si 光谱式激光共聚焦显微镜 : 在 C1Si 的开发理念中 , Nikon 的设计人员着重强调了 4 点 : 更亮 , 更快 , 更准确 , 更灵活。DEES 衍射效率增强系统从光路上提高了整体效率 , 又采用了双积分器设计使得曝光时间得到 100% 的利用 (Nikon 专利技术)。32 个经过严格校准的 PMT 同时拍摄 32 个波长 , 只需要 1 秒钟就可以得到 32 通道的全光谱图像 , 速度和性能居于同类产品榜首。使用光谱线性拆分技术 , 可以准确区分出各种荧光染料(即使发射峰非常接近) , 提高了用户在设计实验方案时的灵活性。

90i/80i 新型显微镜 : 90i/80i 系列显微镜充分体现了“ 为数码成像服务 ”的设计理念。其中的 DIH 数码成像头将荧光光路 , DIC 棱镜等光学组件和两个照相端口整合为一体 , 并首次在显微镜领域引入了光学变倍 (0.8 - 2X) , 使显微镜和数码相机的配合更加合理有效。复眼照明保证了视场更加均匀 , 切趾相差减少了相差观察时的光晕现象 , 提供了 3 种 DIC 模块(标准型/高分辨率型/高反差型) 供用户选择。电动 ND 滤光片的应用使得用户不用再受色温变化的困扰 , 在连续调节光亮度 (2 - 100%) 的同时保持恒定的色温。

TIRF/W - TIRF 全反射荧光显微镜 : TIRF 系列利用全反射成像 , 将成像范围限制在玻片表面 50 - 100 纳米范围内 , 极大减少了干扰荧光 , 从而可以观察到高信噪比的单分子荧光等图像。W - TIRF 采用普通荧光光源而不是激光 , 可以直接从目镜观察到 TIRF 图像 , 同时滤光片选择的灵活性大大提高 , 在性价比方面相当出色。

PA - GFP 模块 : 简化了用户在进行 PA - GFP 实验时的操作 , 并提供高质量的图像。PFS 完美调焦系统 , 解决了一直困扰用户的焦点漂移现象。该模块通过实时反馈和自动调节 , 保证了焦点的稳定性。非常适合于需要长时间拍摄的用户。

尼康仪器(上海)有限公司

地址 : 上海市浦东新区浦东南路 1111 号新世纪办公中心 18F ; 邮编 : 200120

电话 : (021) 58360050 ; 传真 : (021) 58360030 ; 网址 : www.nikon-instruments.com.cn

尼康仪器(上海)有限公司北京办事处

地址 : 北京市朝阳区东三环中路 39 号建外 SOHO , B 座 2801 室 ; 邮编 : 100022

电话 : (010) 58692255 ; 传真 : (010) 58692277