

# 苜蓿中华根瘤菌 042BM *noeAB* 基因的转录调控

杜秉海 王 磊 李小红 亓苏伟 杨苏声\*

( 中国农业大学生物学院微生物学系 农业部微生物资源及其应用重点实验室 北京 100094 )

**摘 要** 对苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 042BM *noeAB* 基因的表达调控进行研究。结果发现, 葫芦巴碱不能使 *noeAB* 的表达水平提高, 证明它们的转录不受 *nodD2* 的调控。当 *nodD3* 和 *syrM* 同时存在时, *noeAB* 的表达水平没有明显的变化, 表明它们也不受 *nodD3-syrM* 系统的调控。在 FY 基本培养基上, 毛地黄黄酮的诱导使 *noeAB* 基因的表达水平提高 16 倍, 而在不添加该诱导物的 TY 培养基上, *noeAB* 基因的表达水平也能够提高 30 倍以上, 说明 *noeAB* 是受 *nodD1* 控制的, 但除受毛地黄黄酮诱导外, *noeAB* 还可能受到其他因子的调节。

**关键词** 苜蓿中华根瘤菌, *noeAB* 转录调控

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)03-0339-05

苜蓿中华根瘤菌与宿主的结瘤共生过程是由结瘤基因控制的, 其中, 公共结瘤基因和宿主专一性结瘤基因的转录表达是受结瘤调节基因 *nodD* 控制的。苜蓿中华根瘤菌含有 3 个 *nodD* 基因。*nodD1* 是组成型表达的, 它对结瘤基因的调控需要毛地黄黄酮的诱导激活<sup>[1]</sup>。*nodD2* 的调控作用则需要葫芦巴碱和水苏碱的诱导激活<sup>[2]</sup>。*nodD3* 的表达受 *syrM* 的调控, 其上游含有 2 个分离的启动子, 它们之间含有 2 个开放阅读框架。第一个启动子控制整个操纵子的转录, 介导结瘤基因的高效组成型表达; 第二个启动子紧靠着 *nodD3* 编码区的上游, 对结瘤基因的转录激活作用需要 *NodD1* 和植物类黄酮的参与<sup>[3,4]</sup>。

*noeAB* 是苜蓿中华根瘤菌中与结瘤固氮作用有关的两个基因, 与 *nodL* 一起组成一个操纵子, 受 *nod box n5* 启动子的控制<sup>[5]</sup>。它们的功能以及表达调控机制尚不十分清楚。我们已经克隆获得了苜蓿中华根瘤菌 042BM 的 *noeB*<sup>[6]</sup> 和 *noeA* 基因<sup>[7]</sup>。在此基础上, 对其表达调控机制进行研究, 有助于对它们功能的了解。本文根据苜蓿中华根瘤菌 1021 基因组的测序结果<sup>[8]</sup>, 通过 PCR 扩增获得了 042BM 的不同结瘤调节基因, 并利用报告基因 *lacZ*<sup>[9,10]</sup> 研究了 *nodD*、*syrm* 以及植物类黄酮化合物对 *noeAB* 基因的转录调控的情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 种子、菌株和质粒**: 苜蓿种子为紫花苜蓿 (*Medicago sativa*), 购自中国农业科学院畜牧研究所。本研究所用菌株和质粒见表 1。

**1.1.2 培养基**: 042BM 及相关突变株采用 TY<sup>[11]</sup> 或 FY<sup>[12]</sup> 培养基。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株采用 LB 培养基<sup>[13]</sup>。根据不同菌株的抗性, 添加相应的抗生素。

**1.1.3 酶和生化试剂**: *Sal* I、*Bgl* II、*Kpn* I 等限制性内切酶、DNA 纯化试剂盒和卡那霉素、氯霉素、四环素、链霉素、庆大霉素和氨苄青霉素等购自上海 Sangon 公司, *Taq* DNA 聚合酶、*Pfu* DNA 聚合酶、PCR 其它试剂、T4 DNA 连接酶、碱性磷酸单脂酶和 pGEM-T easy 试剂盒等购自 Promega, LA DNA 聚合酶购自 TaKaRa (大连) 公司, IPTG、X-Gal 等购自华美公司, 大肠杆菌感受态细胞购自北京博大生物技术有限责任公司, 毛地黄黄酮和葫芦巴碱购自 Sigma 公司。毛地黄黄酮的配制采用 70% 乙醇溶解, 浓度为 1mmol/L, 于 -20℃ 避光保存; 葫芦巴碱的配制和保存按说明书进行, 浓度为 0.5mmol/L。

### 1.2 DNA 的提取和遗传操作

苜蓿中华根瘤菌总 DNA 的提取参照文献 [14] 的方法; 质粒的提取、DNA 的限制性酶切和连接等操作参照文献 [13] 的方法进行。

基金项目: 国家 973 项目 (001CB108905) 欧盟科技合作项目 (ICA4-CT-2001-10056)

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

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

收稿日期: 2004-09-22, 修回日期: 2005-02-05

表 1 菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain and plasmid	Relevant characteristic	Source
<i>S. meliloti</i>		
042BM	Wild type strain ,Cm <sup>r</sup>	This laboratory
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
LPR5045	pSym-cured chromosome marker Rif <sup>r</sup>	University of Leiden ,The Netherlands
RBL-5045	LPR5045( pMP154/pMP261 )	This study
RBL-01D1	LPR5045( pMP190/pMP261 )	This study
RBL-02D1	LPR5045( pMP190-N5/pMP261 )	This study
RBL-01D2	LPR5045( pMP190/pBBR1MCS5-D2 )	This study
RBL-02D2	LPR5045( pMP190-N5/pBBR1MCS5-D2 )	This study
RBL-01MD3	LPR5045( pMP190/ pBBR1MCS5-MD3 )	This study
RBL-02MD3	LPR5045( pMP190-N5/pBBR1MCS5-MD3 )	This study
RBL-01D3	LPR5045 pMP190/pBBR1MCS5-D3 )	This study
RBL-02D3	LPR5045( pMP190-N5/pBBR1MCS5-D3 )	This study
RBL-01M	LPR5045( pMP190/pBBR1MCS5-M )	This study
RBL-02M	LPR5045( pMP190-N5/pBBR1MCS5-M )	This study
RBL-01MCS	LPR5045( pMP190/pBBR1MCS-5 )	This study
RBL-02MCS	LPR5045( pMP190-N5/pBBR1MCS-5 )	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	Host of recombinant plasmids	This laboratory
Plasmid		
pRK2013	Helper plasmid , <i>tra</i> <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	This laboratory
pMP190	1.5kb derivative of pKT214 <i>lacZ</i> ( promoterless ) , InQ <i>mob</i> <sup>+</sup> ,Cm <sup>r</sup> ,Sm <sup>r</sup>	University of Leiden ,The Netherlands
pMP190-N5	<i>nod</i> box n5 in pMP190	This study
pMP154	Promoter <i>nodA-lacZ</i> fusion in pMP190 ,InQ , <i>mob</i> <sup>+</sup> , Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>	University of Leiden ,The Netherlands
pMP261	<i>nodD1</i> with itself promoter in pMP92 InP , Tc <sup>r</sup>	University of Leiden ,The Netherlands
pGEM-T easy	T-A clone vector , Ap <sup>r</sup>	Promega
pGEMT-N5	PCR product of <i>nod</i> box n5 cloned into pGEM-T easy , Ap <sup>r</sup>	This study
pGEMT-D2	PCR product of <i>nodD2</i> cloned into pGEM-T easy , Ap <sup>r</sup>	This study
pGEMT-D3	PCR product of <i>nodD3</i> cloned into pGEM-T easy , Ap <sup>r</sup>	This study
pGEMT-M	PCR product of <i>syrM</i> cloned into pGEM-T easy , Ap <sup>r</sup>	This study
pBBR1MCS-5	Broad host-range cloning vector ,Cm <sup>r</sup>	University of Sevilla Spain.
pBBR1MCS5-D2	<i>nodD2</i> with itself promoter in pBBR1MCS-5	This study
pBBR1MCS5-D3	<i>nodD3</i> with itself promoter in pBBR1MCS-5	This study
pBBR1MCS5-M	<i>syrM</i> with itself promoter in pBBR1MCS-5	This study
pBBR1MCS5-MD3	<i>nodD3</i> with itself promoter P1and P2 in pBBR1MCS5-M	This study

### 1.3 引物的设计

根据苜蓿中华根瘤菌 1021 基因组<sup>[8]</sup>中的相关区段、基因的上下游序列以及克隆载体上多克隆位点的情况,设计引物。扩增 *nod* box n5 所用的上游引物添加 *Sal* I 位点,即 N5P1 5'-GTCGACACTCCTTC-CTTGCCGAG-3';在下游引物添加 *Bgl* II 位点,即 N5P2: 5'-AGATCTCGTCTCCTCTCAGAACG-3'。扩增 *nodD2* 所用的上游引物添加 *Sac* I 位点,即 *nodD2*P1 5'-GAGCTCCCGCAATCAAGCCAAAGT-3';在下游引物添加 *Xho* I 位点,即 *nodD2*P2: 5'-CTCGAGT-GCTCGTGAICTCTCGCAGC-3'。扩增 *nodD3* 所用的上游引物添加 *Kpn* I 位点,即 *nodD3*P1 5'-GGTACCCG-GCTTCACGCCTGGCGGC-3';在下游引物添加 *Kpn* I 位点,即 *nodD3*P2: 5'-GGTACCACGGTCTTCAGATGGCGCA-3'。扩增 *syrM* 所用的上游引物添加 *Xho* I 位点,即 *syrM*P1: 5'-CTCGAGAGCTCGCGCCGGTGAAGAC-3';在下游引物添加 *Spe* I 位点,即 *syrM*P2 5'-ACTAGTGCT-GTGTGATCATCGGGCAA-3'。

### 1.4 *nod* box n5 和结瘤调节基因的 PCR 扩增和菌落 PCR

*nod* box n5 的扩增反应体系(50 $\mu$ L): ddH<sub>2</sub>O 40.5 $\mu$ L, 10 $\times$  *Taq* buffer 5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25mmol/L) 3 $\mu$ L, dNTP (10mmol/L) 1 $\mu$ L, 042BM 总 DNA 1 $\mu$ L(100ng), N5P1 (20 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ L, N5P2(20 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L 扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 50 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增 *nodD2* 的反应体系(50 $\mu$ L): ddH<sub>2</sub>O 40.5 $\mu$ L, 10 $\times$  *Pfu* buffer 5 $\mu$ L, dNTP(10mmol/L) 1 $\mu$ L, 042BM 总 DNA 1 $\mu$ L(100ng), *nodD2*P1(20 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ L, *nodD2*P2(20 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ L, *Pfu* DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L 扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 1min 50 $^{\circ}$ C 2min 72 $^{\circ}$ C 5min 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。*Pfu* DNA 聚合酶要求在预变性后加入,以防止其对引物的降解;在最后延伸阶段,再加入 *Taq* DNA 聚合酶,用于使 PCR 产物添加 dA 尾巴,便于进行 T-A 克隆。扩增 *nodD3* 的反应体系(50 $\mu$ L): ddH<sub>2</sub>O 37.5 $\mu$ L, 10 $\times$  LA buffer 5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25mmol/L) 3 $\mu$ L, dNTP

(10mmol/L)1 $\mu$ L, 042BM 总 DNA 1 $\mu$ L(100ng), *nodD3*P1 (20 $\mu$ mol/L)1 $\mu$ L, *nodD3*P2(20 $\mu$ mol/L)1 $\mu$ L, LA DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ L)0.5 $\mu$ L; 扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 6min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 4min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增 *syrM* 所用的反应体系和条件, 除引物 *syrMP1* 和 *syrMP2* 外, 与 *nodD2* 相同。

菌落 PCR 反应体系(100 $\mu$ L): ddH<sub>2</sub>O 77.5 $\mu$ L, 10 $\times$  Taq buffer 10 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L)6 $\mu$ L, dNTP (10mmol/L)2 $\mu$ L, N5P1 1 $\mu$ L, N5P2 1 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L)2 $\mu$ L。将上述反应液按每管 25 $\mu$ L 分装到 0.5mL 的 PCR 薄壁管中, 用牙签分别挑取少量转化子的菌体, 在反应液搅拌片刻, 进行扩增。反应条件 94 $^{\circ}$ C 10min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 50 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

### 1.5 DNA 序列测定

将 PCR 产物连接于 pGEM-T easy 载体上, 送上海博亚生物技术有限公司进行测序。

### 1.6 三亲本杂交试验

操作步骤按文献 [6] 进行。

### 1.7 类黄酮化合物的诱导

**1.7.1** 在培养基平板上进行的诱导试验: 在 FY 和 TY 培养基中分别添加相应的诱导物: 毛地黄黄酮 10 $\mu$ mol/L, 葫芦巴碱 5 $\mu$ mol/L。并在平板表面涂布 40 $\mu$ L X-Gal(20mg/mL)。在上述培养基中加入相应的抗生素, 10 $\mu$ g/mL 四环素(Tc), 5 $\mu$ g/mL 氯霉素(Cm), 25 $\mu$ g/mL 链霉素(Sm), 25 $\mu$ g/mL 庆大霉素(Gm)。将待测菌株接种于培养基中, 在 28 $^{\circ}$ C 培养 3~5d。观察记录菌落颜色的变化情况, 如菌落变蓝, 表明 *lacZ* 基因表达。

**1.7.2** 在液体培养条件下的诱导试验和  $\beta$ -半乳糖苷酶活测定<sup>[15]</sup> 将待测菌株接种于含有相应抗生素的 FY 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180r/min 震荡培养 48h, 然后将培养物浓度用 FY 培养液调整到  $A_{600}$  为 0.25 左右。分别加入相应的诱导物: 10 $\mu$ mol/L 毛地黄黄酮, 5 $\mu$ mol/L 葫芦巴碱。继续培养 18h, 然后用 FY 培养液将培养物浓度调整到  $A_{600}$  为 0.40 左右, 测定  $\beta$ -半乳糖苷酶活。

## 2 结果

### 2.1 042BM *nod box n5* 启动子区的获得和 pMP190-N5 的构建

以 042BM 总 DNA 为模板, 用 *nod box n5* 的引物扩增, 获得了 270bp 左右的 PCR 产物, 经过 T-A 克隆

构建了重组质粒 pGEMT-N5。测序结果证实该扩增产物为含有 *nod box n5* 启动子区的 DNA 片段(GenBank Accession NO. AY578293)。利用 *Sal I* 和 *Bgl II* 对 pGEMT-N5 进行双酶切, 将酶切片段连接到 pMP190 上, 得到重组质粒 pMP190-N5(图版 I-A)。

### 2.2 042BM *nodD2*、*nodD3* 和 *syrM* 的获得

以 042BM 总 DNA 为模板, 用相应的特异性引物进行 PCR 扩增, 通过 T-A 克隆、酶切分析和测序验证, 分别获得含有 *nodD2*(GenBank Accession NO. AY578290), *nodD3*(GenBank Accession NO. AY578292) 和 *syrM*(GenBank Accession NO. AY578291) 及其自身启动子的重组质粒 pGEMT-D2、pGEMT-D3 和 pGEMT-M。

### 2.3 含有结瘤调节基因的重组质粒的构建

为了确定不同的结瘤调节基因对 042BM *noeAB* 的调控作用, 需要构建含有不同结瘤调节基因的重组质粒。用 *Sac I* 和 *Xho I* 对 pGEMT-D2 进行双酶切, 将酶切片段连接到 pBBR1MCS-5 上, 构建了含有 *nodD2* 及其自身启动子的重组质粒 pBBR1MCS5-D2(图版 I-B)。

用 *Kpn I* 对 pGEMT-D3 进行完全酶切, 将酶切片段连接到 pBBR1MCS-5 上, 构建了含有 *nodD3* 及其自身启动子的重组质粒 pBBR1MCS5-D3。用 *Spe I* 和 *Xho I* 对 pGEMT-M 进行双酶切, 将酶切片段连接到 pBBR1MCS-5 上, 构建了含有 *syrM* 及其自身启动子的重组质粒 pBBR1MCS5-M。用 *Kpn I* 酶切 pGEMT-D3, 回收含有 *nodD3* 的 DNA 片段, 将其克隆到 pBBR1MCS5-M 上, 构建了含有 *nodD3* 和 *syrM* 的重组质粒 pBBR1MCS5-MD3(图版 I-C)。

### 2.4 042BM 诱导表达调控系统的建立

通过三亲本杂交, 将 pMP190(含有 *lacZ*) 和 pMP190-N5 分别导入缺失共生质粒的豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) LPR5045 中, 获得了分别含有上述质粒的重组菌株 RBL-01、RBL-02。再将重组质粒 pMP261(含有 *nodD1*)、pBBR1MCS5-D2、pBBR1MCS5-D3、pBBR1MCS5-M、pBBR1MCS5-MD3 以及 pBBR1MCS-5 分别导入 RBL-01 和 RBL-02 中, 获得重组菌株 RBL-01D1、RBL-01D2、RBL-01D3、RBL-01M、RBL-01MD3 和 RBL-02D1、RBL-02D2、RBL-02D3、RBL-02M、RBL-02MD3 以及 RBL-01MCS、RBL-02MCS。此外, 将 pMP154(含有 *nodA* 的启动子) 和 pMP261 转移到 LPR5045 中, 获得重组菌株 RBL-5045。

**2.5 类黄酮等化合物对 042BM *noeAB* 启动子的诱导** 分别将上述重组菌株接种于含有相应诱导物、X-Gal 的 FY 和 TY 平板上, 并以缺失共生质粒的豌

豆根瘤菌 LPR5045 作为阴性对照,以 RBL-5045 (含有 pMP154/pMP261)作为阳性对照。在 28℃ 下培养 3~5d,观察菌落的颜色变化情况(图版 I-D)。

从图版 I-D-a 可以看出,在 TY 平板上,RBL-02D1 的菌落变蓝色;在含有毛地黄黄酮的 FY 平板上(图版 I-D-b),RBL-02D1 的菌落也变蓝色,但颜色比其在不加毛地黄黄酮的 TY 平板上淡;在含有葫芦巴碱的 FY 培养基上(图版 I-D-c),RBL-02D2 和 RBL-02MD3 的菌落均不变蓝色。

为了定量研究不同结瘤调节基因对 *noeAB* 基因 *nod box n5* 启动子的转录调控作用,分别将上述重

组菌株接种于 FY 或 TY 液体培养基,28℃、180r/min 条件下,振荡培养 48h,然后加入相应的诱导物,继续培养 18h。测定了在不同的诱导条件下各重组菌株培养液的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性(表 2)。当 *nodD1* 存在时,在 FY 培养基上,毛地黄黄酮的诱导使 *noeAB* 基因的表达水平提高了 16 倍,而在不添加毛地黄黄酮的 TY 培养基上,表达水平则提高了 30 多倍。在含有葫芦巴碱诱导物的 FY 培养基上,RBL-02D2 培养物的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性没有变化,RBL-02MD3 与 RBL-01MD3 培养物的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性也没有明显的差别。

表 2 042BM 重组菌株培养物的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

Table 2  $\beta$ -galactosidase activities in cultures of recombinant strains from 042BM

Strain	Plasmid	Medium	Inducer		Activity of $\beta$ -galactosidase /Miller units
			Luteolin	Trigonelline	
RBL-01D1	pMP190/pMP261	FY	+	-	15
		FY	-	-	12
		TY	-	-	21
RBL-02D1	pMP190-N5/pMP261	FY	+	-	160
		FY	-	-	10
		TY	-	-	630
RBL-5045	pMP154/pMP261	FY	+	-	15382
		FY	-	-	113
		TY	-	-	282
RBL-01D2	pMP190/pBBR1MCS5-D2	FY	-	+	17
RBL-02D2	pMP190-N5/pBBR1MCS5-D2	FY	-	+	17
RBL-01MD3	pMP190/pBBR1MCS5-MD3	FY	-	-	69
RBL-02MD3	pMP190-N5/pBBR1MCS5-MD3	FY	-	-	43
RBL-01D3	pMP190/pBBR1MCS5-D3	FY	-	-	27
RBL-02D3	pMP190-N5/pBBR1MCS5-D3	FY	-	-	36
RBL-01M	pMP190/pBBR1MCS5-M	FY	-	-	53
RBL-02M	pMP190-N5/pBBR1MCS5-M	FY	-	-	19
RBL-01MCS	pMP190/pBBR1MCS-5	FY	+	-	12
RBL-02MCS	pMP190-N5/pBBR1MCS-5	FY	+	-	21

Values in the table is the means of three replicates.

### 3 讨论

苜蓿中华根瘤菌 1021 基因组全序列的测定结果<sup>[8]</sup>为本实验研究 042BM *noeAB* 的转录调控提供了方便和快捷的途径。诱导试验表明,*noeAB* 基因的表达是受 *nodD1* 调控的,但在不添加毛地黄黄酮的富含氨基酸的 TY 培养基上,*noeAB* 基因也具有较高的表达水平,说明它们除受毛地黄黄酮的诱导外,还可能受到其它因子的诱导。葫芦巴碱对 *nod box n5* 没有诱导作用,表明 *noeAB* 不受 *nodD2* 的调控。*nodD3-syrM* 的调控作用是不需要类黄酮诱导的,因此,*noeAB* 也不受 *nodD3-syrM* 的调控。

NoeB 是一个与转运蛋白无同源性的膜蛋白<sup>[16]</sup>,而 NoeA 是一个可能的核糖体 L11 蛋白的甲基化转移酶,对其进行翻译后甲基化修饰,从而影响该蛋白

的功能<sup>[7]</sup>。L11 具有严紧型应答的功能,也就是在外界氨基酸缺乏时,控制 RNA 的合成,使合成速率降低<sup>[16]</sup>。在苜蓿中华根瘤菌中,严紧型应答对根瘤菌-植物共生相互作用的影响是多方面的<sup>[17]</sup>。如鸟苷四磷酸(ppGpp)是严紧型应答的效应物分子,它可调节琥珀酰葡聚糖的合成,控制着根瘤菌对宿主植物和环境的适应性的生理学变化,特别是对氨基酸等营养物质的供应状况方面的适应性变化。由此推断,*noeAB* 可能是与膜结合性信号转导有关的 2 个基因,它们的表达可能受到某些氨基酸的诱导。具体的调控分子机制有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Mulligan J T, Long S R. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics*, 1989, 122: 7-18.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 2 ] Phillips D A , Joseph C M , Maxwell C A . Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* , 1992 , **99** :1526 - 1531 .
- [ 3 ] Demont N , Ardourel M , Maillat F , et al . The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by(omega-1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO J* , 1994 , **13** :2139 - 2149 .
- [ 4 ] Yu G Q , Zhu J B , Gao Y F , et al . Further studies on structure of *nodD3* gene in *Rhizobium meliloti*. *Sci in China( SeriesB )* , 1994 , **37** ( 8 ) :975 - 983 .
- [ 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 林榕姍 , 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 ] 杜秉海 姜巨全 李小红 , 等 . 苜蓿中华根瘤菌 042BM *noeA* 基因的克隆、敲除与功能分析 . 微生物学报 , 2005 , **45** ( 2 ) : 195 - 200 .
- [ 8 ] 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 .
- [ 9 ] Spaik H P , Okker R J H , Wijffelman C A , et al . Promoter in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* , 1987 , **9** :27 - 39 .
- [ 10 ] Zaat S A J , Wijffelman C A , Spaik H P , et al . Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones. *J Bacteriol* , 1987 , **169** ( 1 ) :198 - 204 .
- [ 11 ] Honeycutt R J , McClland M , Sobral B W . Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* , 1993 , **175** ( 21 ) : 6945 - 6952 .
- [ 12 ] 杨苏声 吴拙如 高为民 , 等 . Tn5-Mob 系统诱导根瘤菌之间耐盐和共生性状的转移 . 生物工程学报 , 1993 , **9** ( 3 ) : 193 - 197 .
- [ 13 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 2<sup>nd</sup> ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 , 908 .
- [ 14 ] 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 .
- [ 15 ] Miller J H . Experiment in molecular genetics . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1972 , 352 - 355 .
- [ 16 ] 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 .
- [ 17 ] Wells D H , Long S R . The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affect multiple aspects of symbiosis. *Mol Microbiol* , 2002 , **43** ( 5 ) : 1115 - 1127 .

## Transcriptional regulation of *noeAB* from *Sinorhizobium meliloti* 042BM

DU Bing-hai WANG Lei LI Xiao-hong QI Su-wei YANG Su-sheng\*

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

**Abstract** : The expression regulation of *S. meliloti* 042BM *noeAB* was studied. The results showed that trigonelline could not elevate the level of *noeAB* expression , which indicated that these genes are not regulated by *nodD2*. Since association of *nodD3* and *syrM* could not change the level of the genes expression , they aren't also controlled by *nodD3-syrM* system. However , induction of luteolin resulted in 16 times increase of *noeAB* expression , which indicated that *noeAB* was regulated by *nodD1*. Most interestingly , more than 30 times increase in its expression was observed on TY medium without any flavonoid. Thus , it was suggested that *noeAB* may be controlled by other unknown factors.

**Key words** : *Sinorhizobium meliloti* , *noeAB* , Transcriptional regulation

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( 001CB108905 ) ; 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 09-22-2004