

肺炎克氏杆菌的 *nifA* 基因产物在巴西固氮螺菌中的功效*

张耀平 李季伦

(北京农业大学生物学院, 北京)

通过三亲本杂交将质粒 pCK3 [携带改变了启动子的肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) *nifA* 基因] 引入巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 菌株中, 由此获得的转移接合子巴西固氮螺菌 Yu62-4 菌株在 6.0 mmol/L 以上 NH_4^+ 浓度下, 能表现出微弱的固氮酶活性 (相当于无 NH_4^+ 时活性的 0.3—0.5%), 而野生型 Yu62 则全部丧失固氮酶活性。固氮酶的丙烯酰胺凝胶电泳和铁蛋白的免疫杂交实验表明, 转移接合子 Yu62-4 在高 NH_4^+ (50 mmol/L) 下, 虽有铁蛋白合成, 但合成量比无 NH_4^+ 时少得多, 而且有一部分铁蛋白未被共价修饰; 野生型菌株 Yu62 在此 NH_4^+ 浓度下无铁蛋白合成。实验结果表明: 外源 (来自肺炎克氏杆菌) 的基因产物在巴西固氮螺菌 Yu62 中不能有效地解除 NH_4^+ 对该菌固氮酶合成的阻遏作用。本文分析了出现这种现象的原因。

关键词 巴西固氮螺菌; 外源 *nifA* 基因产物的功能

固氮螺菌是一种能与禾本科作物根部联合共生固氮的微生物。它们分布广, 数量多, 能够利用作物根际分泌物和土壤中残留秸秆的半纤维素生长和固氮, 并能产生一些植物生长刺激素, 可望为禾本科作物提供氮源, 因而受到人们的重视。十多年来, 在世界各地曾进行了大量的田间接种试验, 但效果不一^[1], 即使有增产效果, 大多归因于其产生激素的作用^[2], 而不能归因于固氮, 因为这类菌在土壤中存在化合态氮肥 (如 NH_4^+) 时, 它们直接利用化合态氮源生长, 而不固氮。实验证明, 当 NH_4^+ 浓度 > 6.0 mmol/L 时, 该菌完全丧失固氮酶活性, 这是限制该菌田间应用的主要因素。为了解除 NH_4^+ 对该菌固氮作用的抑制, 有人采用常规人工诱变选育抗铵菌株^[3], 但由于性状不稳定或影响其正常生长, 一直未应用。

近年来, 肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的固氮 (*nif*) 基因的结构、

功能及其表达的调控机制已基本阐明。在高铵下, *nifA* 基因不能表达, 而 *nifA* 产物却又是其它 *nif* 基因, 包括 *nifHDK* (固氮酶结构基因) 表达所必需。据此, 已有人组建了一些质粒, 其上携带肺炎克氏杆菌或催娩克氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 的 *nifA* 基因, 并改换了启动子, 使其能组成型表达, 从而不受 NH_4^+ 调控^[4-7]。将这些质粒引入棕色固氮螺菌 (*Azobacter vinelandii*)^[8] 和阴沟肠杆菌 (*Escherichia cloacae*)^[6] 中, 其 *nifA* 都能组成型表达, 在高铵下, 仍有 80% 以上的固氮酶活性 (同无铵时相比)。但将这些质粒引入固氮螺菌 (*Azospirillum*) 中, 则效果不佳^[9,10]。

本文通过在巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 中引入肺炎克氏杆菌的 *nifA* 基因, 分析了外源 *nifA* 的功能, 并由此提出了组建抗铵固氮螺菌新菌株的

本文于 1990 年 2 月 21 日收到。

* 国家自然科学基金重点资助项目。

构想。

材 料 和 方 法

(一) 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表 1。

(二) 培养基

1. YGA 培养基^[3]。

2. 半固体培养基 (g): K_2PO_4 0.1, KH_2PO_4 0.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, NaCl 0.1, $CaCl_2$ 0.02, 葡萄糖酸钠 10, 洋菜 2

表 1 菌种和质粒

Table 1 Bacteria and plasmids

菌种和质粒 Bacteria and plasmids	有关特性 Relevant characteristics	来源或参考文献 Source or reference
菌种 Bacteria		
巴西固氮螺菌 <i>A. brasilense</i>		
Yu62	Amp ^r , Cb ^r .	[3]
Yu62-4	Amp ^r , Cb ^r , Tc ^r (pCK3).	This study
大肠杆菌 <i>E. coli</i>		
5K	thr, leu, thi, resK ⁻ , modK ⁺ .	[5]
HB101	pro, leu, thi, lacY, Sm ^r , endoI, reca ⁻ , r ⁻ m ⁻ .	[8]
质粒 Plasmids		
pCK3	<i>K. pneumoniae</i> nifA ^c , Tc ^r , IncP-1.	[5]
pRK2013	Km ^r , Tra ⁺ (help plasmid)	[8]

Amp: 氨苄青霉素 Cb: 羧苄青霉素 Tc: 四环素 Km: 卡那霉素 Sm: 链霉素

(粉末)。微量元素* 1 ml, 无离子水 1000 ml。pH 6.8。

3. 有氮培养液(g): K_2PO_4 2.5, KH_2PO_4 1.25, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 0.1, $CaCl_2$ 0.02, NH_4Cl 0.5 葡萄糖酸钠 10。蒸馏水 1000 ml。pH 6.8。

4. NfbHP 培养液 (g)^[3]: K_2PO_4 5, KH_2PO_4 4, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.020, 氨基三乙酸 0.056, NaCl 0.2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 乳酸钠 5。微量元素液同半固体培养基。

(三) 三亲本杂交

具体方法见文献 [8]。选择性标记为 Tc^r 和 Amp^r。

(四) 固氮酶活性测定

1. 在半固体培养基上测定: 菌种在 YGA 斜面上活化二次后, 接入有氮培养液中, 30℃ 振荡培养过夜, 当 $OD_{560} = 1.0$

左右时取 0.05 ml 接入半固体培养基中 (15 × 100 试管, 内装 3 ml 培养基), 30℃ 静止培养 4 天, 换用胶塞, 打入空间体积 10% 的乙炔, 30℃ 继续培养 4 小时, 取气体样品用气相色谱仪 (SQ-204) 测定乙烯峰高, 再培养 5 小时后, 测定乙烯峰高。打入标准乙烯样品 (1nmol) 测定其峰高, 进行换算。

2. 在液体培养基中测定: 菌种活化后接入 NfbHP 培养液中, 于 100 r/min 30℃ 振荡培养 14—22 小时, 取样测定固氮酶活性。取 1ml 菌液于 9 ml 小血清瓶中, 打入 10% 空间体积的乙炔, 于 100 r/min 30℃ 振荡反应, 不同时间取气样, 在气相色谱仪上测定乙烯峰高。

* 1ml 微量元素含 (mg): $FeCl_3$ 10, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, $MnSO_4$ 2.1, H_3BO_3 2.8, $ZnSO_4$ 0.24, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.41。

(五) 菌体蛋白质含量的测定

第二次测定乙烯峰高后的半固体培养基,于 4000r/min 离心 30 分钟,弃上清液(用作 NH_4^+ 浓度测定),用生理盐水洗涤沉淀三次,用碱法裂解菌体细胞:加入 1 ml 1mol/L NaOH, 80℃ 水浴保温 30 分钟,定容到 5ml。取 1ml 样品用 Folin-酚法测定蛋白质含量^[11]。以不接种的半固体培养基同样处理,作为对照。

(六) NH_4^+ 浓度测定

上述上清液以微量扩散法测定 NH_4^+ 的浓度^[12]。

(七) 质粒提取和电泳

固氮螺菌 Yu62 和 Yu62-4 用 Kado 法^[13]提取,而大肠杆菌 5K(pCK3)用醋酸酸钠法^[14]提取。电泳:1%琼脂糖(上海东海制药厂)100V 电泳 6 小时。

(八) 固氮酶复合体的提取

1. 菌体培养:用半固体培养基,方法同(四),但所用试管为 30 × 200 cm,内装培养基 8ml,培养后菌体厌氧离心收集,在液氮中保存。

2. 细胞破碎:用渗透崩解法。于 20g 菌细胞(含少量琼脂)中,加入 100ml 已还原的 50mmol/L Tris-HCl 甘油缓冲液(pH 7.7, 30% 甘油 V/V), 50 mg 溶菌酶, 1 mmol/L EDTA, 室温下融化并保持 30 分钟, 10000 × g 离心 10 分钟,弃上清液,快速加入 100 ml 已还原的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.7) 缓冲液,其中含 RNase 和 DNase 各 10 mg, 剧烈振摇,并室温保持 30 分钟, 10000 × g 离心 40 分钟,上清液进行固氮酶提取。所有操作都在厌氧下进行。

3. 固氮酶的提取:方法参照文献[15]并加以修改。用 Tris-HCl (pH7.7) 代替 Tris-醋酸缓冲液。DEAE-纤维素 52 离子交换柱 (1 × 8cm), 先用含 0.1 mol/L

NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl (pH7.2) 缓冲液进行平衡和还原(用 1mmol/L 连二亚硫酸钠), 上样后用含 0.15mol/L NaCl 的 50mmol/L Tris-HCl (pH7.2) 缓冲液洗脱杂蛋白, 最后用含 0.4 mol/L NaCl 的 50 mmol/L (pH7.2) 缓冲液收集钼铁蛋白和铁蛋白,在液氮中保存。

(九) 细胞粗提液的制备

巴西固氮螺菌 Yu62 和转移接合子 Yu62-4 分别接入含有 0、10 和 50mmol/L NH_4Cl 的 NfbHP 培养液中, 30℃ 100r/min 振荡培养, 取 10ml 菌液用 Whatman GF/A 滤膜快速过滤, 收集菌体, 投入液氮中, 然后根据 Kanemoto^[17] 等人的方法制备粗提液。

(十) 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

方法参照文献[16]稍作修改。分离胶丙烯酰胺的浓度为 10%, 浓缩胶为 5.5%。100V 电泳 1.5 小时后, 加大电压至 200V, 继续电泳 3 小时。

(十一) 蛋白质杂交

首先进行蛋白质电泳^[17]。丙烯酰胺/双叉丙烯酰胺为 30/1.75。硝酸纤维素膜 (NC 膜) 先在转移缓冲液 [25mmol/L Tris, 192mmol/L 甘氨酸, 20% (V/V) 甲醇(优级纯)] 中平衡半小时, 将电泳后的凝胶同 NC 膜放入转移电泳槽中 (内含预冷的转移缓冲液) 低温 5mA 电泳过夜。取出 NC 膜, 作好标记, 放入封闭液中 (1% 干酪素溶于 TBS 溶液中。TBS 溶液含 20mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, HCl 调 pH 7.5) 封闭 1 小时, 取出 NC 膜, 放入塑料袋中, 加入 1ml 封闭液和 20 μl 第一抗体 (棕色固氮菌铁蛋白的兔抗体), 封口, 轻摇反应 1 小时, 取出 NC 膜, 用 TTBS 溶液洗 3 次 (TTBS: TBS 中加入 0.05% Tween-20), 然后再将 NC 膜放入另一干净塑料

袋中,加入 10 ml 封闭液和 100 μ l 第二抗体 (HRP 酶联的羊抗兔 IgG, 0.1mg/ml), 封口,轻摇反应 1 小时,然后以 TTBS 洗 3 次,将 NC 膜取出放入干净盘中,加入染色剂(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 5mg, 溶于 10ml TBS 溶液中,用前加入 1.5 μ l H_2O_2),进行染色,直至肉眼能看到棕色带出现,迅速水洗,停止染色。

结 果

(一) 外源 *nifA* 基因在巴西固氮螺菌 Yu62 中稳定存在

通过三亲本杂交,经 6 小时接合,成功地将质粒 pCK3 (携带肺炎克氏杆菌组成型表达的 *nifA* 基因)引入巴西固氮螺菌 Yu62 中,转移接合子巴西固氮螺菌 Yu62-4 获得了 Tc 抗性。转移频率为 1×10^{-6} 。在含 Tc 和 Amp 抗菌素的选择平板上纯化三次以上,以淘汰帮助质粒 pRK2013。

将提取质粒进行琼脂糖电泳分析,发现质粒 pCK3 在转移接合子 Yu62-4 中能够稳定存在,帮助质粒 pRK2013 已被淘汰(图 1)。

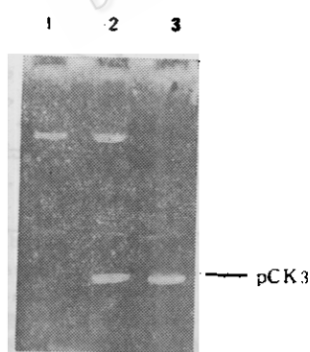


图 1 巴西固氮螺菌 Yu62 和 Yu62-4 的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid pattern of *A. brasilense* Yu62 and Yu62-4

1. Yu62; 2. Yu62-4; 3. *E. coli* 5K (pCK3)

(二) 外源 *nifA* 基因在巴西固氮螺菌 Yu62 中的表达

1. 固氮酶活性测定: 将巴西固氮螺菌 Yu62 野生型和 Yu62-4 转移接合子, 分别接种在含不同铵浓度 (0—75mmol/L) 的半固体培养基中, 30℃ 培养 4 天后测定固氮酶比活性及培养基中残留的铵含量, 结果见表 2。

表 2 在半固体培养基中不同 NH_4^+ 浓度下, Yu62 和 Yu62-4 的固氮酶比活性

Table 2 Specific activity of nitrogenase of Yu62 and Yu62-4 strains at different concentration of ammonia in semisolid media

培养基中铵最终浓度 Final concn. of NH_4^+ in the medium (mmol/L)	固氮酶比活性 Specific activity of nitrogenase (n. mol C_2H_4 h^{-1} mg protein $^{-1}$)
<i>A. brasilense</i> Yu62	
0.024	526.7
0.31	341.4
0.88	143.4
1.08	72.4
2.20	12.2
6.02	0
<i>A. brasilense</i> Yu62-4	
0.022	550.7
0.41	430.0
0.84	96.0
1.23	59.2
2.00	13.4
6.00	1.7
6.20	1.4
18.20	1.3
69.20	2.4

由表 2 可见, 当培养基中铵的残留量在 6.0mmol/L 以上时, 野生型 Yu62 完全丧失固氮酶活性, 但转移接合子 Yu62-4 在此高铵下仍有微弱的活性, 而且不再受铵浓度影响。在低铵 (<6.0mmol/L) 时, 两菌株的固氮酶活性都同样受铵的抑制。

在半固体培养基上, 对 Yu62 和 Yu62-4 分别在 32℃ 和 37℃ 下的固氮酶活性进行了测试, 结果发现: 在低浓度铵 (<2 mmol/L) 时, Yu62 和 Yu62-4 在 37℃

时的固氮酶比活性同 32℃ 时无明显差异。但在高铵 (70mmol/L) 时, Yu62 全部丧失固氮酶活性, Yu62-4 在 32℃ 时有少量活性(约为低铵时的 0.4%), 而 37℃ 时, 则也全部丧失活性, 这是因为肺炎克氏杆菌的 *nifA* 产物对温度敏感^[4]。这表明肺炎克氏杆菌和巴西固氮螺菌的 *nifA* 产物在特性上有所不同, 巴西固氮螺菌的 *nifA* 产物对温度的敏感性要低(数据未列)。

2. 外源 *nifA* 功能的分析: 在含 2 mmol/L 铵的半固体培养基上接种野生型 Yu62, 在含 35 mmol/L 的半固体培养基上分别接种 Yu62 和 Yu62-4, 30℃ 培养 4 天后, 分别厌氧收集菌体, 经渗透崩解法破碎细胞, 离心得到粗酶提取液, 通过 DEAE-纤维素 52 部分提纯后, 进行 SDS-PAGE 比较。三个样品上样量严格控制, 使总蛋白含量相同, 结果见图 2。

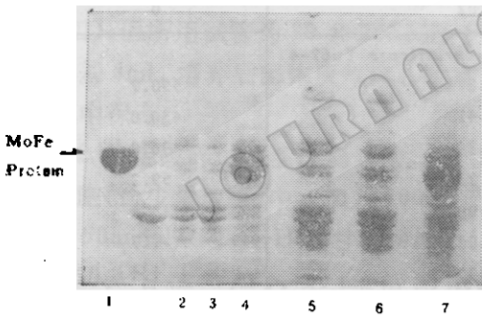


图 2 巴西固氮螺菌 Yu62 和 Yu62-4 固氮酶钼铁蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE pattern of nitrogenase (MoFe protein) of *A. brasilense* Yu62 and Yu62-4

1. *Clostridium pasteurianum* MoFe protein
2, 5. Yu62-4 (35 mmol/L NH_4^+); 3, 6. Yu62 (35mmol/L NH_4^+); 4, 7. Yu62 (2 mmol/L NH_4^+)

由图 2 可见, Yu62 和转移接合子 Yu62-4 在高铵 (35 mmol/L) 的半固体培养基上均少量合成钼铁蛋白, 二者的合成量无明显差异, 都比野生型 Yu62 在低铵 (2mmol/L) 的半固体培养基中所合成的

钼铁蛋白量少很多, 所不同的是转移接合子 Yu62-4 在含 35mmol/L 铵的半固体培养基上有少量的固氮酶活性, 而野生型 Yu62 则完全没有。

为了排除 NH_4^+ 在半固体培养基中扩散不均可能导致的误差, 又采用液体通气方式培养并测定了野生型 Yu62 菌株和转移接合子 Yu62-4 的固氮酶活性。结果表明: 在有固氮酶活性的液体培养物中, 加入 5mmol/L NH_4Cl , 可完全抑制野生型 Yu62 菌株的固氮酶活性, 而同样条件下转移接合子 Yu62-4 仍有微弱的活性; 加入 1mmol/L MSX 可以解除两菌株 NH_4^+ 的抑制(图 3)。以上结果进一步表明, *nifA*

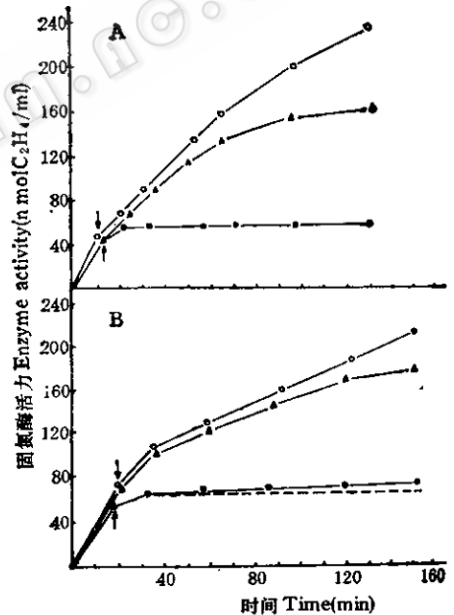


图 3 NH_4^+ 和 NH_4^+ + MSX 对巴西固氮螺菌 Yu62 (A) 和转移接合子 Yu62-4 (B) 固氮酶活性的影响

Fig. 3 Effect of NH_4^+ , NH_4^+ + MSX on the switch-off of the nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* Yu62(A) and Yu62-4(B)

At about 20 mins (arrow), NH_4Cl was added at final concentration of 5 mmol/L (●), or 1mmol/L MSX + 5mmol/L NH_4Cl was added (▲); As a control the same volume of water was added (○)

基因可能通过某种产物,影响了固氮酶的合成。

对细胞粗提液进行蛋白质免疫杂交,结果发现,用含 10mmol/L NH_4Cl 的培养液培养时,野生型 Yu62 的固氮酶还原酶(铁蛋白)的合成完全被阻遏,而转移接合子 Yu62-4 的铁蛋白仍有少量合成,且不完全被修饰(铁蛋白由两个相同大小的亚基组成,在 SDS-PAGE 上呈一条带,当铁蛋白被共价修饰后,其中一个亚基由于共价结合了 ADPR 基团而降低了电泳迁移率,这时铁蛋白在 SDS-PAGE 上呈两条带),见图 4。这一结果表明,外源 *nifA*



图 4 铁蛋白免疫杂交试验结果

Fig. 4 Immunoblots with antiserum against *Azotobacter vinelandii* Fe protein of *A. brasilense* Yu62 and Yu62-4 extracted by SDS PAGE

Lane 1, 2, 3, the crude extract of Yu62;
Lane 4, 5, 6: the crude extract of Yu62-4;
Lane 1, 4. 0mmol/L NH_4Cl ; Lane 2, 5. 10
mmol/L NH_4Cl ; Lane 3, 6. 50mmol/L NH_4Cl ;
Lane 7. modified Fe Protein of Yu62 was
used as control;

I: The subunit of Fe Protein modified by ADPR;
II: The unmodified subunit of Fe Protein;
III: Non-specific Protein

基因产物在巴西固氮螺菌中只能微弱地解除铵对其固氮酶合成的阻遏作用

讨 论

在阴沟肠杆菌和棕色固氮螺菌中引入肺炎克氏杆菌的 *nifA* 基因,能使它们组成

型地合成固氮酶,由于这两种菌的固氮酶活性不受 NH_4^+ 抑制,它们在高铵浓度下能固氮,酶活性可达到无 NH_4^+ 时的 80—100%^[5,6]。但是在巴西固氮螺菌中引入肺炎克氏杆菌的 *nifA* 后,其在高铵下的固氮酶活性只相当于无铵时的 0.3—0.5%,这一结果同 Pedrosa^[8] 等人将肺炎克氏杆菌 *nifA* 引入巴西固氮螺菌 FP 菌株中的结果和 Uozumi^[7] 等人将催婉克氏菌 *nifA* 引入产脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferrum*) 中的结果类似。转移接合子 Yu62-4 在高铵下固氮酶活性低的原因,可能有两个:

(1) 外源 *nifA* 在巴西固氮螺菌中不能有效表达,或即使表达,其产物也不能有效地启动其体内的其它 *nif* 基因的表达。

(2) 已合成的铁蛋白在高铵下被共价修饰而丧失固氮酶活性。

在我们的实验中发现这两个因素都存在。在 SDS-PAGE 上可以看到, Yu62-4 在高铵 (50mmol/L) 下,固氮酶的合成仍受阻遏,其合成量明显低于无铵时野生型 Yu62 的合成量,这说明引入肺炎克氏杆菌的 *nifA* 并未打破铵对其固氮酶合成的阻遏。这可能是由于两菌的 *nifA* 基因产物的特性差异所致。已有实验表明,不同来源的 *nifA* 基因、不同的载体质粒以及不同的受体菌, *nifA* 基因表达的效果不同。质粒 pMC73a(肺炎克氏杆菌 *nifA*) 转入肺炎克氏杆菌 UNF714 中,能使该菌株在高铵时固氮酶活性达到无铵时的 15—30%^[4],而朱家壁等人^[9]发现质粒 pST1021(肺炎克氏杆菌 *nifA*) 使肺炎克氏杆菌 CH 菌株在高铵下固氮酶活性达到无铵时的 90% 左右。Kennedy 等人^[10]也发现质粒 pCK3(肺炎克氏杆菌 *nifA*) 能使肺炎克氏杆菌 UNF913 和棕色固氮螺菌在高铵下的固氮酶活性分别达到低铵时的 75%

和 108%, 但该质粒在巴西固氮螺菌中效果不佳(本实验和 Pedrosa 等人的实验^[8])。Uozumi 等人^[9]也发现质粒 pNOW71A (催婉克氏菌 *nifA*) 只能使产脂固氮螺菌在高铵时固氮酶活性达到无铵时的 0.7% 左右。Kennedy^[5] 等人采用 *nif*-LacZ 融合质粒研究发现, 肺炎克氏杆菌和棕色固氮菌的 *nifA* 产物在功能上存在明显差异。朱家壁等人^[18]也发现肺炎克氏杆菌与阴沟肠杆菌的 *nifA* 产物在温度敏感性方面存在差异。本实验发现肺炎克氏杆菌和巴西固氮螺菌的 *nifA* 产物对温度的敏感性不同, 前者在 37℃ 时失活, 而后者不受影响。此外, Nair 等人^[19]通过同源杂交试验发现肺炎克氏杆菌 *nifA* 基因同巴西固氮螺菌的只有微弱的同源性。所有这些结果说明, 各菌之间 *nifA* 基因产物的差异可能影响了功能上的互补, 这是巴西固氮螺菌转移接合子 Yu62-4 在高铵下固氮酶活性低的主要原因。

此外, 在巴西固氮螺菌中存在着类似于红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 的铵关闭固氮酶活性的现象^[20], 这也影响了固氮酶活性。图 4 蛋白质免疫杂交实验表明, 在高铵下巴西固氮螺菌的铁蛋白呈两条带, 同红螺菌铁蛋白被修饰的情况一样。图 2 中野生型 Yu62 和转移接合子 Yu62-4 在 35mmol/L NH_4^+ 的半固体培养基上均有少量固氮酶合成, 这可能是由于半固体培养基流动性较差, 在菌生长后期, 菌体周围培养基的铵浓度低于原始铵浓度, 使一部分固氮酶脱阻遏而合成。用液体培养后澄清了这一现象(图 4), 实验表明, 用含 10mmol/L NH_4^+ 的培养液培养, 野生型 Yu62 的固氮酶已完全被阻遏, 而同样条件下, 甚至 NH_4^+ 的浓度达到 50 mmol/L 时, 转移接合子 Yu62-4 的固氮酶仍有少量合成。从图 4 还可发现, 肺炎克氏杆菌

的 *nifA* 基因虽未打破铵对巴西固氮螺菌固氮酶合成的阻遏, 但却使一部分铁蛋白不被修饰, 使转移接合子在高铵下表现微弱的固氮酶活性。这表明 *nifA* 基因可能以某种方式参与了固氮活性的调控, 这一结果有待深入研究。

通过实验, 发现外源 *nifA* 基因不能打破铵对巴西固氮螺菌固氮酶合成的阻遏作用。因此有必要分离巴西固氮螺菌 Yu62 自身的 *nifA* 基因, 并改造成组成型表达, 再转回巴西固氮螺菌中, 才可能使它在高铵下组成型合成固氮酶, 再进一步改造, 打破固氮酶活性的调控, 才有可能获得抗铵菌株。

参 考 文 献

- [1] Oken, Y.: *Trends in Biotechnology* 3: 223, 1985.
- [2] Elmerich, C.: *Bio/technology* 11: 967, 1984.
- [3] 杨洁彬等: 北京农业大学学报, 10: 321, 1984.
- [4] Buchanan-Wollaston, V. et al.: *Nature* (London), 249: 776, 1981.
- [5] Kennedy, C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1787, 1985.
- [6] 朱家壁等: 中国科学(B), 26: 1250, 1983.
- [7] Uozumi, T. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 50: 1539, 1986.
- [8] Pedrosa, F. O. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 23: 95, 1984.
- [9] Ditta, C. et al.: *PNAS* (U. S. A.), 77: 7347, 1980.
- [10] Figurski, D. et al.: *PNAS* (U. S. A.) 76: 1468, 1979.
- [11] 北京大学生物系生物化学教研室: 生物化学实验指导, 第73页, 高等教育出版社, 北京, 1979年.
- [12] Ji-lun, Li et al.: *Biochem.*, 22: 4472, 1983.
- [13] Robert, R. L. et al.: *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, p. 160, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1983.
- [14] Puhler, A. et al.: *Advanced Molecular Genetics*, p. 23, Springer-Verlag, Berlin Herdelberg, 1984.
- [15] Ludden, P. W. et al.: *Biochem. J.*, 173: 1001, 1978.
- [16] Laemli, U. K. et al.: *Nature* (London), 227: 680, 1970.
- [17] Kanemoto, R. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 158: 713, 1984.
- [18] Zhu, J. B. et al.: *J. Bacteriol.*, 166: 357, 1986.

- [19] Nair, S. K. et al.: *Azospirillum* II, Genetic, Physiology, Ecology. (Ed. W. Klingmuller), p. 29, Birkhauser Verlag Basel, 1983.
- [20] Hartmann, A. et al.: *Azospirillum* III, Genetic, Physiology, Ecology (Ed. W. Klingmuller), p. 116, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1985.

ROLE OF *nifA* GENE PRODUCT OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* YU62

Zhang Yaoping Li Jilun

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing)

with the triparental mating, the pCK3 plasmid, which carried the *nifA* gene of *Klebsiella pneumoniae* and its modified promoter, was transferred into *Azospirillum brasilense* Yu62 and it was stable. When the ammonia concentration was higher than 6.0mmol/L, the transconjugant Yu62—4 had a little activity of nitrogenase which was 0.3—0.5% of that in the absence of ammonia, but wild type Yu62 had no any nitrogenase activity at the same concentration. SDS-PAGE of MoFe protein and Western Blotting of Fe protein showed that Yu62-4 had synthesized Fe protein at

50 mmol/L NH_4^+ and its amount was less than that of Yu62 at 0mmol/L NH_4^+ and part of Fe protein was not covalently modified. Wild type Yu62 had not synthesized Fe protein at 10mmol/L NH_4^+ . The result showed that the *nifA* gene product of *K. pneumoniae* could not effectively break down the repression of nitrogenase synthesis by ammonia in *A. brasilense* Yu62.

Key words

Azospirillum brasilense; Role of foreign *nifA*