

几种固氮菌 *nifA* 基因片段的同源性分析*

阎大来 李季伦

(北京农业大学微生物专业, 北京 100094)

参照已知数种固氮菌 *nifA* 基因的 DNA 序列, 选择其中间区域的两个保守性较强的序列合成引物, 利用肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)、巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)、草螺菌 (*Herbaspirillum seropedicae*) 和深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 的总 DNA 进行聚合酶链反应, 结果均扩增出约 450bp 大小的片段, 经证实为各种固氮菌的 *nifA* 基因部分片段。核酸印迹分子杂交结果显示 *nifA* 基因在不同固氮菌中的同源性不强。

关键词 固氮菌; *nifA* 基因; 聚合酶链反应

nifA 基因作为固氮酶结构基因 *nifHDK* 表达的正调节基因^[1], 在固氮遗传研究中占有重要地位。Buikema 等人^[2]在 1985 年首先报道了肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 的 *nifA* 基因全序列, 之后一些实验室又相继报道了其它几种菌的 *nifA* 基因全序列^[3-5]。这就为从分子水平上研究 *nifA* 的功能及特性提供了可靠的材料。

聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR) 是 1985 年美国 Cetus 公司 Mullis 等人开发的一项专利, 1988 年 Saiki 等人^[6]又报道了用耐热 DNA 聚合酶 (Taq DNA polymerase) 进行 PCR 的实验, 使这项技术在分子生物学领域广泛地应用开来。

本文介绍利用 PCR 方法对不同固氮菌的 *nifA* 基因部分片段进行体外扩增, 并对其相互的同源关系进行了讨论。

材料和方法

(一) 菌株与质粒

本文所使用的菌株与质粒见表 1。

(二) 培养方法

深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 用改进的 Ormerod 液体培养基^[9], 25℃ 光照培养, 光强约 1500Lux。棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 用修改的 Burk 液体培养基^[10], 于 30℃ 振荡培养。其它菌株在 LB 液体培养基中振荡培养。

(三) DNA 的制备

1. 细菌总 DNA 的提取: 按文献[11]进行, DNA 用乙醇沉淀后溶解。

本文于 1991 年 6 月 11 日收到。

* 本课题为“863”经费资助项目。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmid

菌株和质粒 Bacteria and plasmid	性状 Characteristics	来源或文献 Source or reference
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	nif+	from this laboratory
<i>Azotobacter vinelandii</i> OP	nif+	from this laboratory
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC11170	nif+	from this laboratory
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z78	nif+	(1)
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	nif+	from this laboratory
<i>Azospirillum brasilense</i> Yu62	nif+	from this laboratory
plasmid pGR397	7.1kb, Ap ^r contain 3.2kb K. p nif ⁺ BAL ⁺	from F. M. Ausubel ⁽⁸⁾

2. 质粒 DNA 的提取: 按文献[12]进行。

(四) 探针的光生物素 (Photoactivatable Biotin) 标记

按 Clontech 公司产品使用说明书进行。

(五) 核酸印迹分子杂交 (Southern Blot) 及检测

杂交及检测按 Clontech 公司生物素标记 DNA 检测盒说明书进行。

(六) 酶及试剂

核酸限制性内切酶购自 Promega 公司和华美公司, Taq 酶购自 New England Biolabs 公司, 光生物素及检测盒购自 Clontech 公司。引物系北京农业大学农业生物技术实验室用 ABI 公司 381 A 型 DNA 合成仪合成。

结 果

(一) PCR 引物的选择

用 PCR 方法对不同固氮菌的 *nifA* 基因进行扩增, 首先要选择保守性强的区域以设计引物。Drummond 等人^[13]将肺炎克氏杆菌 *nifA* 分成四个功能域, 之后报道的数种 *nifA* 氨基酸序列^[4, 14]与之相比较, 发现 *nifA* 的中间区与羧基端两个功能域同源性较强, 前者包括 ATP 结合位点, 可能还与 *ntrA* 的作用有关, 后者是 DNA 结合区域 (DNA binding domain)。

通过比较肺炎克氏杆菌、苜蓿根瘤菌^[2]、棕色固氮菌^[4]、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)^[5] 的 *nifA* 序列, 我们选择中间区域内两个同源性很强的片段设计引物 (见表 2), 5' 端引物为 19mer, 3' 端引物为 17mer。

(二) PCR 扩增不同固氮菌 *nifA* 基因的部分片段

利用不同固氮菌总 DNA 作为模板, 以上述合成的寡聚脱氧核糖核酸作为引物, 在 Hybaid 公司的 PCR 反应器中反应, 条件为: 70mmol/L Tris-HCl (pH8.8, 25℃), 2mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 200μmol/L, 100μg/ml BSA, 1μg 细菌总 DNA, 引物各 50pmol, Taq 酶 3 单位, 反应体积为 100μl。反应程序为: 94℃ 变性 1 分钟, 50℃ 退火 2 分钟, 72℃ 延伸 3 分钟, 共进行 30 个循环。

表 2 引物序列的确定

Table 2 Determination of primer sequence

<i>K. pneumoniae</i>	853	GAGAAAGGCGCCTTTACCG ...CGCGAACTGGAAAAC TG	1301(449bp)
<i>R. melilori</i>	817	GAGAAAGGTGCGTTCACCG ...CGCGAGCTGGAAAAC TG	1265(449bp)
<i>A. vinelandii</i>	850	GAGAAGGGCGCCTTCACCG ...CGCGAACTGGAGAAC TG	1298(449bp)
<i>R. capsulatus</i>	817	GAGAAAGGCGCCTTCACCG ...CGCGAGCTGGAAAAC TG	1265(449bp)
		5'-GAGAAAGGCGCCTTCACCG GCGCTCGACCTTTTGAC-5'	
		-----> <-----	
		5' primer, 19mer	3' primer, 17mer

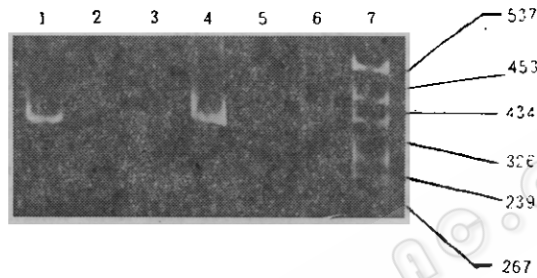
图 1 PCR 扩增 *nifA* 片段电泳

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR amplified *nifA* fragments
 1. *Azospirillum brasilense* Yu62; 2. *Azospirillum brasilense* Sp7; 3. *Herbaspirillum seropedicacae*; 4. *Rhodospirillum rubrum*; 5. *Klebsiella pneumoniae*; 6. *Azotobacter vinelandii*; 7. DNA Marker (bp)

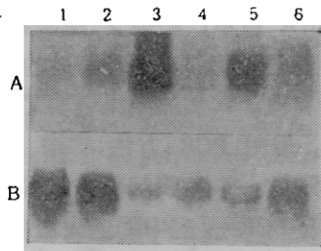
图 2 PCR 扩增 *nifA* 片段核酸印迹分子杂交

Fig. 2 Southern hybridization of PCR amplified *nifA* fragments

A: Using *Klebsiella pneumoniae* nif 'BAL' as probe

B: Using *Azospirillum brasilense* Yu62 PCR amplified *nifA* fragment as probe

1. *Azospirillum brasilense* Yu62; 2. *Azospirillum brasilense* Sp7; 3. *Herbaspirillum seropedicacae*; 4. *Rhodospirillum rubrum*; 5. *Klebsiella pneumoniae*; 6. *Azotobacter vinelandii*

产物经 6.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果见图 1。在 450bp 左右的相应位置上, 不同的菌总 DNA 扩增后均产生一个明显的片段。为了证实扩增 DNA 的准确性, 我们将肺炎克氏杆菌的扩增 DNA, 经 *Sau* 3AI 酶完全消化后产生三个片段, 其大小分别为 198

bp、166bp 和 85bp, 参照 Buikema 等人^[2]报道的肺炎克氏杆菌 *nifA* 基因序列, 与其上的 *Sau* 3A1 酶切位点完全相符。

(三) PCR 扩增产物的核酸印迹分子杂交

将等量的 PCR 扩增片段经 1% 琼脂糖电泳后, 用 LKB 公司的真空核酸转移系统将 DNA 转到 0.2 μ m 孔径的尼龙膜上, 分别用光生物素标记的肺炎克氏杆菌 *nif*'BAL' 片段及巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 PCR 扩增 *nifA* 片段作为探针进行杂交, 结果见图 2。我们发现, 肺炎克氏杆菌除与草螺菌 (*Herbaspirillum seropedicae*) 的 *nifA* 片段有强同源性外, 与其他的同源性均很低 (图 2-A)。巴西固氮螺菌与其它各属菌的 *nifA* 片段同源性也是很低的 (图 2-B)。

讨 论

已知 *nifA* 序列的四种固氮菌经本实验设计的引物进行 PCR 扩增后, 应产生 449bp 的扩增片段 (表 2), 这与本实验结果是相符的, 加之扩增片段的酶切分析及 Southern Blot 的结果, 可以肯定扩增片段确是各种菌 *nifA* 基因的一部分, 其中对巴西固氮螺菌、草螺菌和深红螺菌的 *nifA* 基因报道尚属首次。

已知序列的 *nifA* 基因在不同固氮菌属间同源性在 30—50% 之间^[4,5,14], 其保守性是较差的。Kennedy^[15] 认为, 与固氮作用密切相关的基因, 如 *nifHDK*, 其 DNA 序列保守性较强, 而调节基因如 *nifA* 的保守性则很差。Fani 等人^[16] 总结了已知的 19 种 *nifH* 基因 DNA 序列, 其同源性在 42—97% 之间, 在这种同源性水平下用核酸分子杂交方法较易检测出相互的同源序列, 但如用于 *nifA* 基因检测, 在有的固氮菌中是检测不出来的^[17]。

对于巴西固氮螺菌, 虽有证据表明存在有类似 *nifA* 的调节基因^[18], 但除 Nair 等人^[19]报道过用肺炎克氏杆菌的 *nifA* 做不严格杂交, 检测到非常弱的同源性片段外, 许多杂交实验均未得到肯定的结果。我们曾用肺炎克氏杆菌的 *nifA* 作为探针筛选巴西固氮螺菌的基因文库, 也未得到阳性克隆。本实验结果证实了肺炎克氏杆菌与巴西固氮螺菌的 *nifA* 基因同源性很弱 (图 2)。采用 PCR 方法, 扩增 *nifA* 基因中相对较保守的中间区域, 进而克隆 *nifA* 全基因片段, 这一方法将解决克隆弱同源基因的困难。

在实验中我们发现, 如果降低 PCR 反应中的退火温度, 扩增片段的产率会大幅度提高, 但同时伴随有一些非特异性扩增片段的出现, 而且在同一退火温度下, 不同固氮菌所扩增出的 *nifA* 片段产率相差很大, 这是由于引物序列在不同菌中保守性程度不同所致, 与 Sommer 等人^[20]关于引物同源性对 PCR 反应的影响所进行的分析是一致的。

从杂交实验可以看出, 即使在 *nifA* 基因的中间区域, 不同菌之间的同源性也不一致, 有的很低, 如肺炎克氏杆菌与巴西固氮螺菌。令人感兴趣的是, 肺炎克氏杆菌与草螺菌 *nifA* 基因的中间区域同源性很强, 而它们无论在分类地位上还是固氮类型上均相差很远, 其中的关系需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Gussin, G. N. et al.: *Ann. Rev. Genet.*, 20: 567—591, 1988.

- [2] Buikema, W. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 13: 4539—4555, 1985.
- [3] Thony, B. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 15: 8479—8499, 1987.
- [4] Bennett, L. T. et al.: *Mol. Microbiol.*, 2: 315—321, 1988.
- [5] Masepohl, B. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 212: 27—37, 1988.
- [6] Saiki, R. K. et al.: *Science*, 239: 487—491, 1988.
- [7] Baldani, J. I. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38: 86—93, 1986.
- [8] Riedel, G. E. et al.: *J. Bacteriol.*, 153: 45—56, 1983.
- [9] Ormerod, J. G. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 94: 449—463, 1961.
- [10] Strandberg, G. W. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 14: 25—31, 1968.
- [11] Rodriguez, R. L. et al.: *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, p. 45—46, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, 1983.
- [12] Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., p. 1.25—1.28, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [13] Drummond, M. et al.: *EMBO J.*, 5: 441—447, 1986.
- [14] Fischer, H. M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 16: 2207—2224, 1988.
- [15] Kennedy, C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1787—1795, 1985.
- [16] Fani, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 220: 81—87, 1989.
- [17] Jones, R. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 197: 318—327, 1984.
- [18] Pedrosa, F. O. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 23: 95—101, 1984.
- [19] Nair, S. K. et al.: *Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology.* (ed. W. Klingmuller), Birkhauser Verlag, Basel, p. 29—38, 1983.
- [20] Sommer, R. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 17: 6749, 1989.

HOMOLOGOUS ANALYSIS OF *nifA* GENE FRAGMENTS FROM SEVERAL NITROGEN-FIXING BACTERIA

Yan Dalai Li Jilun

(Division of Microbiology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

According to the published sequences of several nitrogen-fixing bacterial *nifA* gene, two highly conservative sequences in the central domain of *nifA* were selected and synthesized as primers. Fragments of *nifA* were amplified by polymerase chain reaction method, in which the total DNA of *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Rhodospirillum rubrum* were used as templates respectively. Fragments is about 450bp were amplified in each species. These products were confirmed as *nifA* gene fragment of above species. The result of Southern hybridization demonstrated that *nifA* gene appeared weak homology among various nitrogen-fixing bacteria.

Key words Nitrogen-fixing bacteria; *nifA* gene; Polymerase chain reaction