

苜蓿根瘤菌 nod A 蛋白在细胞中的定位*

沈炳福 竺海蓉

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘要 应用噬菌体 T7 RNA 聚合酶/启动子表达系统, 质粒 pT7-6 作为载体, 构建了带有苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) nod A 基因的重组质粒 pBF3。nod A 在 T7 启动子的控制下, 经诱导在大肠杆菌 JAKE 中得到表达, 产物为 21.5kD 多肽。对 nod A 基因在大肠杆菌中的翻译产物 (NodA) 进行细胞定位分析表明, NodA 同时存在于细胞质和细胞膜中。

关键词 根瘤菌, NodA, 细胞蛋白定位

根瘤菌与宿主植物相互作用形成根瘤, 是许多结瘤基因参与的结果, 其中共同结瘤基因 nod A、B 和 C 具有强的保守性, 对诱导宿主植物根毛的卷曲和早期根瘤的形成起重要作用^[1-3]。nod A、B 和 C 操纵子的表达需要植物根的分泌物 (如 luteolin) 的诱导^[4]。

最近才开始的对结瘤蛋白生化特性的研究表明, NodA 可能是可溶性多肽, 也许参与植物生长因子的生成^[5,6]。本文报道了 nodA 在噬菌体 T7 启动子控制下, 在大肠杆菌中得到表达, 对 NodA 进行了细胞定位分析并对其生化功能进行讨论。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养条件

大肠杆菌 JAKE 用作重组质粒的受体菌, 其培养条件按文献^[7]。HB101 用作质粒的分离。

1.2 所用质粒和有关的 DNA 片段 (见表 1)。

1.3 质粒的制备和分析

按 Davis 等的方法^[8]。

1.4 T7 启动子控制的克隆基因的表达及基因产物的分析

按文献^[7,9]介绍的方法。

1.5 细胞组分分离

参照文献^[10,11]的方法。

1.6 限制性内切酶及化学试剂

均购自华美生物工程公司, 反应条件按 New England Biolabs 所述。分子量标准蛋白购自上海东风生化试剂厂。同位素³⁵S-甲硫氨酸(³⁵S-Met)购自 Amersham。国产 X-光片(P-5F)于-20℃感光。

* 国家重点基金资助项目。

本文于 1992 年 10 月 17 日收到。

表 1 所用质粒
Table 1 Plasmids used

质粒 Plasmid	构建及性状 Construction or properties	来源 Source
pT7-6	载体质粒, T7 启动子, Vector, T7 promoter	Ap ^R [7]
pGP1-2	助质粒, T7RNA 聚合酶基因, Helper, T7 RNA polymerase gene	Km ^R [7]
pRM3	pBR322 插入了 nod A、B 和 C 片段 nod A、B and C fragment in pBR322	Ap ^R Ausubel 提供 provided
pBF1	nod A、B 和 C 受 T7 启动子控制 nod A、B and C under control of T7 promoter	Ap ^R 本实验 This work
pBF2	带有 nod A 和 B 片段 nod A and B fragment in pT7-6	Ap ^R This work
pBF3	带有 nod A 片段 nod A fragment in pT7-6	Ap ^R This work
pBF6	带有 nod C 片段 nod C fragment in pT7-5	Ap ^R This work
pBF4	pBF6 缺失 Sph I -Sst I DNA 片段 Deletion of Sph I -Sst I of pBF6	Ap ^R This work
pBF8	pBF6 缺失 Hind III -Sst I DNA 片段 Deletion of Hind III -Sst I of pBF6	Ap ^R This work
pBF9	pBF6 缺失 Pst I -Sst I DNA 片段 Deletion of Pst I -Sst I of pBF6	Ap ^R This work

2 结果和讨论

2.1 pBF3 重组质粒的构建

为了便于对 NodA 的生化特性进行研究,应用噬菌体 T7 RNA 聚合酶/启动子表达系统, pT7-6 作为载体, 首先把来自 pRM31 质粒的 BamH I -EcoR I DNA 片段(该片段含有苜蓿根瘤菌的 nod A、B 和 C 基因)插入 pT7-6 的 BamH I、EcoR I 位点, 构建成 pBF1 质粒。带有 nod A 基因的 pBF3 重组质粒的构建, 应用内切酶 Sst I, 在体外处理 pBF1 质粒, 再连接, 导致 Sst I -Sst I DNA 片段的缺失(图 1-a), 克隆的 1.8kb BamH I -Sst I DNA 片段带有 nodA 基因, nod A 基因在 T7 启动子的控制下。同时也构建了带有不同大小 nod 基因片段的克隆(图 1-b)。

2.2 nod A 基因在大肠杆菌中的表达

将构建的 pBF3 质粒转移至大肠杆菌 JAKE, 同时引进助质粒 pGP1-2, 经 42℃ 温度诱导, T7RNA 聚合酶生成后, 应用利福霉素(200μg/ml)抑制宿主菌的 RNA 聚合酶, 然后在 30℃ 应用同位素³⁵S-甲硫氨酸掺入克隆基因的翻译产物, 经 SDS-PAGE 电泳, 放射自显影等分析克隆基因的翻译产物^[7,9]。pBF3 带有 nod A 基因, 生成 21.5kD 多肽。同样, 我们应用同位素³⁵S-Met 标记后的 NodA 及带有不同大小 nod 基因片段的质粒, 在大肠杆菌中的翻译产物, 经 SDS-PAGE 电泳及放射自显影分析了带有不同大小 nod 基因片段的质粒所编码的相应的多肽(图 2)。

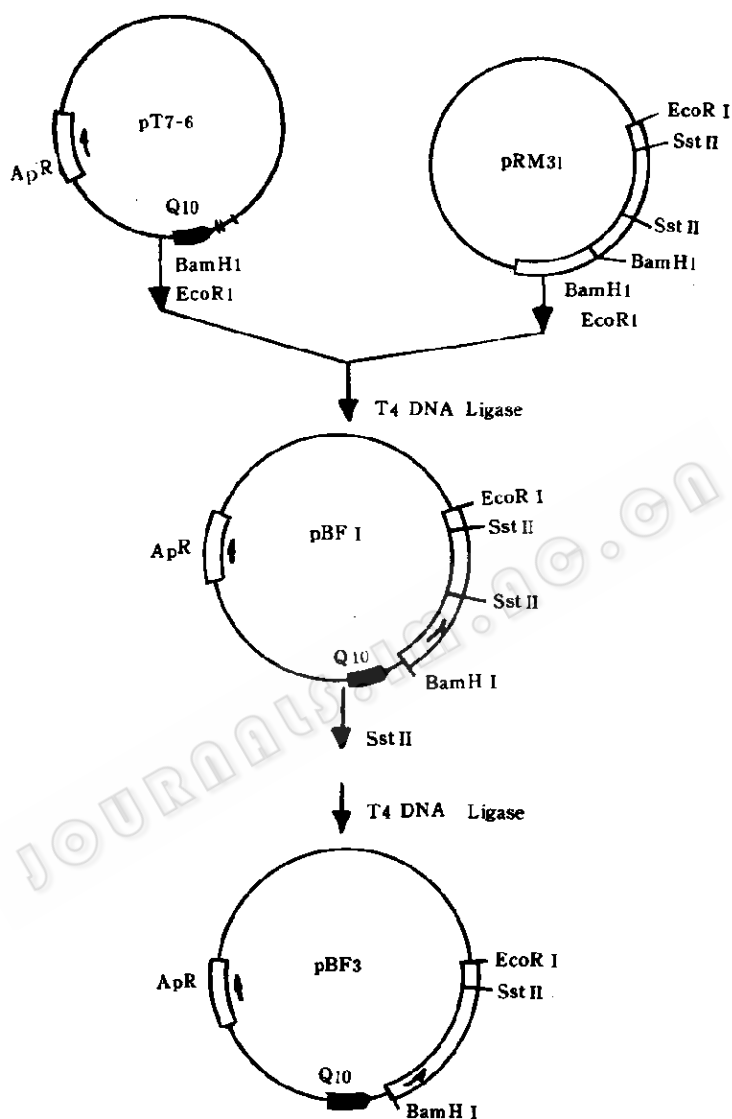


图 1-a 重组质粒 pBF3 构建示意图

Fig. 1-a Construction of plasmid pBF3 for the expression of nodA

2.3 NodA 在细胞中的定位

大肠杆菌(JAKE/pBF3)经 42℃ 诱导后,应用³⁵S-甲硫氨酸标记细胞,离心收集菌体,采用冷休克(cold shock),超声击碎,超离心等方法^[10,11],将细胞质、膜间介质和细胞膜等组分分开,分别加入 SDS 样品缓冲液,置沸水浴 5 分钟,然后进行 SDS-PAGE 电泳^[7]、放

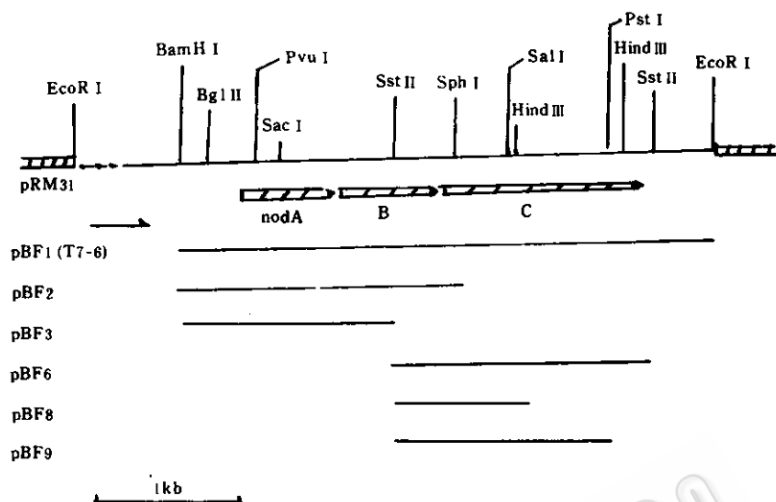


图 1-b 构建的 pBF 质粒的物理图谱

粗线表示克隆的 DNA 片段；箭头表示 T7 载体转录的方向。

Fig. 1-b Physical map of cloned plasmids with various nod gene fragments in T7 vectors

The heavy bars represent the cloned nod DNA fragment;

The arrow above T7 vector indicates the direction of transcription.

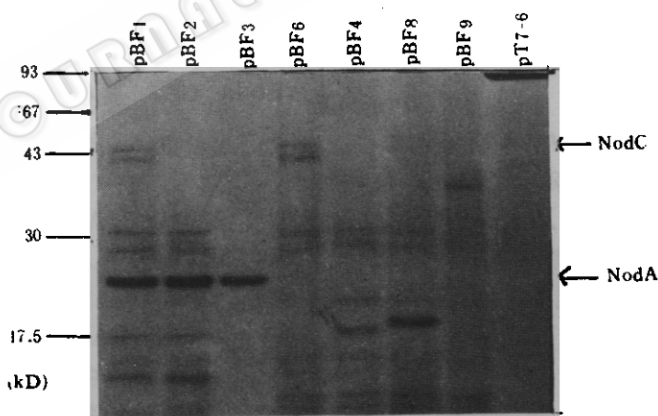


图 2 SDS-PAGE 电泳及放射自显影分析

标准蛋白分子量(kD): 磷酸化酶 b, 94; 牛血清白蛋白, 67; 肌动蛋白, 43;
碳酸酐酶, 30; TMV 外壳蛋白, 17.5.

Fig. 2 Translational products of nod genes in *E. coli* Cells containing with various constructions in T7 vectors were grown and labelled with ^{35}S -Met The translational products were analyzed in SDS-PAGE and radiographed The molecular weight standards (kD): Phosphorylase b, 94; Albumin, 67; Actin, 43; Carbonic anhydrase, 30; TMV outer coat protein, 17.5.

射自显影等分析,表明 NodA 同时出现在细胞质和细胞膜中(图 3)。

根瘤菌编码的 21.5kD 多肽的 nod A 在 T7 启动子控制下,在大肠杆菌中得到表达。对 NodA 在大肠杆菌中细胞定位分析表明,它同时存在于细胞质和细胞膜中。这不同于以前报道的 Nod A 仅出现在细胞质组分^[5]。而与 D. Johnson 等应用放射免疫方法研究 Nod A 在细胞中定位所得的结果相一致^[12]。我们曾应用蛋白酶 K 处理同位素标记的细胞,发现 Nod A 不能被酶水解,因此 Nod A 可能结合在细胞的内膜(未发表),Nod A 在细胞质核糖体上生成后,再结合到细胞内膜。我们已阐明了 Nod C 是转移膜蛋白,结合在细胞外膜的表面^[13],从其生化特性的分析,它可能具有传递信息分子的功能。但在结瘤作用中,Nod A、B 和 C 之间在生化功能上到底存在什么样的联系,目前尚不清楚。

应用噬菌体 T7 表达系统的优点是由于标记同位素较专一性地掺入克隆基因的表达产物,因此进行电泳分析时减少了背景杂蛋白的干扰,从而提高了同位素示踪克隆基因表达产物的灵敏度和正确程度。

致谢 感谢沈善炯先生和戴芳政先生对本工作的指导。

参 考 文 献

- [1] Djorkjeric M A et al. *Plant Mol Biol*, 1985, **4**:147—160.
- [2] Kondorosi E et al. *Mol Gen Genet*, 1984, **193**:445—452.
- [3] Fisher R F et al. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **49**:1432—1435.
- [4] Peters N K et al. *Science*, 1986, **233**:977—979.
- [5] Schmidt J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**:9581—9585.
- [6] Schmidt J et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:8578—8582.
- [7] Shen B F et al. *J Bacterial*, 1987, **169**:4602—4607.
- [8] Davis R W et al. *Advanced Bacterial Genetics: a manual for genetic engineering*, Cold Spring Horbor N Y, 1980. 140—141.
- [9] Tabor S et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1982, **82**:1074—1078.
- [10] Koshland D et al. *Cell*, 1980, **20**:749—760.
- [11] Oliver D et al. *Cell*, 1982, **30**:311—319.
- [12] Deane J et al. *J Bacterial*, 1989, **171**(9):4583—4588.

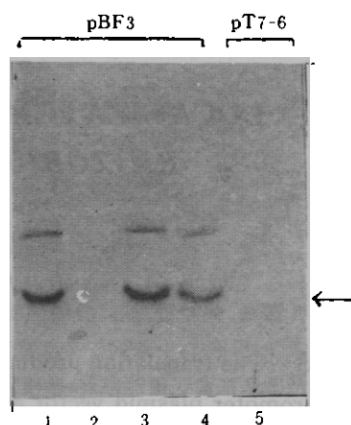


图 3 经同位素³⁵S-Met 标记的 nodA 的翻译产物在大肠杆菌中的定位(采用细胞组分分离, SDS-PAGE 电泳和放射自显影)
箭头所示 nodA 的翻译产物,全细胞(1, 5),膜间介质(2),细胞质(3),细胞膜(4)。

Fig. 3 Localization of translation product of nod A in *E. coli* by cell fractionation
Cells carrying pBF3 were labelled with ³⁵S-Met and analyzed in SDS-PAGE and radio-graphed whole cells (lane 1, 5), periplasm (lane 2), cytoplasm (lane 3), membrane (lane 4).

[13] 沈炳福. 科学通报, 1992, 23(22): 2083—2085.

LOCALIZATION OF THE Nod A PROTEIN OF *RHIZOBIUM MELILOTI* IN *E. COLI*

Shen Bingfu Zhu Hairong

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200032)

Abstract The translation product of the nod A of *Rhizobium meliloti* has been examined in T7 promoter plasmid vector and expressed in *E. coli* cells. Plasmid pBF3 carrying 1.8kb BamH1-SacII DNA fragment from pRM31 encodes 21.5kD polypeptide(NodA). Localization studies of the nodA gene product in *E. coli* showed that the Nod A was present in both cytoplasm and membrane. Some NodA associates with interior membrane of cells after translation in the cytoplasm.

Key words *Rhizobium*, NodA, protein localization

JOURNALS.IM.AC.CN