

日勾维肠杆菌中固氮基因表达的调节*

李久蒂 李永兴 靳红帆 王继文

(中国科学院植物研究所 北京 100044)

摘 要 用³²P 标记的 *nifHDK* 和 *nifA* 基因探针与日勾维肠杆菌(*E. gergoviae* 57-7)DNA 杂交,证明在 *E. gergoviae* 57-7 中存在类似 *nifHDK* 及 *nifA* 的基因。经接合转移法把 *nifH* promoter:lacZ 融合子引入 *E. gergoviae* 57-7,在转交子中可测到较高的 β-半乳糖苷酶活性,表明在 *E. gergoviae* 57-7 中类似 *nifA* 基因对固氮基因表达的调节特性与 *K. pneumoniae* 的类似。载有组成型表达 *nifA* 基因的质粒 pCK3 经接合转移法引入 *E. gergoviae* 57-7,转交子生长速率与野生型相似,在高氮下合成固氮酶并能恢复 50% 以上的固氮活性。

关键词 日勾维肠杆菌, *nifA*, *nifH*:lacZ 融合子,耐氮转交子

肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)是研究自生固氮菌固氮基因结构、功能和调节的模式菌。20 个 *nif* 基因构成 8 个操纵子成簇位于染色体上^[1]。固氮酶结构基因 *nifHDK* 为一操纵子位于正负调节基因 *nifLA* 操纵子上游。*nifLA* 基因的产物调节所有其余 7 个操纵子和本身的表达,以适应外界因子,如 NH_4^+ 浓度及溶氧(DOT)的变化^[2]。*nifA* 基因的产物 NifA 通过结合在 *nif* 启动子的特异 DNA 序列上以激活 *nif* 启动子^[3]。在 *K. pneumoniae* 中,*nifA* 仅仅是在限氮和厌氧条件下才能活化 *nif* 基因的启动子。在低浓度 NH_4^+ 和有氧条件下负调控基因 *nifL* 阻遏 NifA 的活化作用^[4,5]。

E. gergoviae 57-7 是从玉米根际分离得到具有高固氮活性的联合固氮菌,前文阐述了它的固氮特性——固氮酶合成受 NH_4^+ 阻遏,而固氮酶活性不受 NH_4^+ 调节^[6]。本文进一步研究 *E. gergoviae* 57-7 中固氮基因表达的调节,用接合转移法把载有组成型表达 *nifA* 基因的质粒转入 *E. gergoviae* 57-7,并研究了转交子的耐氮特性。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株与质粒(表 1)

1.2 培养基

采用 LB 培养基培养 *E. coli*,用改良的 Kp 基本培养基培养固氮菌^[6]。

1.3 接合转移试验

按 Simon^[13]等方法进行。

1.4 DNA 探针制备

按 Maniatis^[16]方法用氯化铯密度梯度离心法制备质粒 pSA30 和 pST1021,分别用

* “863”经费资助项目。

本文于 1993 年 1 月 12 日收到,1994 年 5 月 23 日定稿。

表 1 细菌菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株与质粒 Strains&plasmids	有 关 性 状 Relavant characters	参 考 Reference
Strains		
<i>E. coli</i> HB101	pro, leu, thi, lacY, hsd20, endA, revA	Boyer ^[7]
YMC 9	endA1, thi- 1, hsdR17, supE44, lac, U169	Backman ^[8]
5K	thi, thr- 1 leuB6, lacI Yi, tonA21, supE44, hsdR	Spratt
<i>K. pneumoniae</i> M5a1	Ap ^r	Mahl ^[9]
<i>E. gergoviae</i> 57-7	Ap ^r	本实验室
Plasmids		
pRk2013	Km ^r , tra, helper plasmid	Figurski ^[10]
pSF ₂	Ap ^r , Tc ^r , K. p nifH; lacZ fusion	沈炳福
pST ₁₀₂	Cm ^r , K. p nif 'BAL'	Zhu ^[11]
pSA30	Tc ^r K. p nifHDK	Cannon ^[12]
pCK3	Km ^r , K. p nif 'BAL', Inc p-1	Kennedy ^[14]

EcoRI 及 PstI、EcoRV 酶切制备 nifHDK 及 nif 'BAL' 探针, 用³²P dATP 标记探针。

1.5 DNA 印迹法转移及滤膜杂交

Southern 转移、缺口翻译、DNA 杂交按 Maniatis^[16] 等方法进行。按 Wilson^[15] 法制备细菌总 DNA 样品。

1.6 β 半乳糖苷酶活性测定

nifH promoter; lacZ 融合子的表达是通过测定 β-半乳糖苷酶活性来表示的。按 Miller^[17] 方法测定 β-半乳糖苷酶活性。转交子在 LB 培养基中培养 12 小时, 离心收集菌体, 悬浮于基本培养基中, 按实验所需加 20mol/L NH₄⁺, 抽气充 Ar 或加棉塞好气培养, 在 28℃ 80r/min 诱导 16 小时, 取 1ml 菌液测 β-半乳糖苷酶活性。

1.7 固氮活性测定

用乙炔还原法测固氮酶活性, 参照文献[18]所叙方法测高 NH₄⁺ 条件下转交子固氮酶活性。

1.8 免疫转迹实验

按文献[19]所叙方法进行蛋白质电泳、转迹及免疫杂交。

2 结果和讨论

2.1 *E. gergoviae* 57-7 含有与 *K. pneumoniae* nifHDK 相似的基因

固氮生物中固氮酶结构基因 nifHDK 是比较保守的 DNA 序列。用 *K. pneumoniae* nifHDK 作探针与 *E. gergoviae* 57-7 DNA 杂交, 结果如图 1 所示。*E. gergoviae* 57-7 DNA 杂交呈阳性, 说明 *E. gergoviae* 57-7 DNA 中含有与 nifHDK 相似的基因。*K. pneumoniae*

nifHDK 序列中有一 HindIII 酶切位点,因此 *K. pneumoniae* DNA HindIII 酶切片段呈现二条杂交带,而 *E. gergoviae* DNA HindIII 酶切片段亦有二条杂交带。说明二者的 nifHDK 同源性很强。

2.2 *E. gergoviae* 57-7 含有与 *K. pneumoniae* nifA 相似的基因

nifA 是 *K. pneumoniae* 固氮基因的正调控基因,用 *K. pneumoniae* nif 'BAL' 作探针与 *E. gergoviae* 57-7 DNA 作 Southern 杂交,结果如图 2。*E. gergoviae* 57-7 含有与 *K. pneumoniae* nifA 同源的片段。

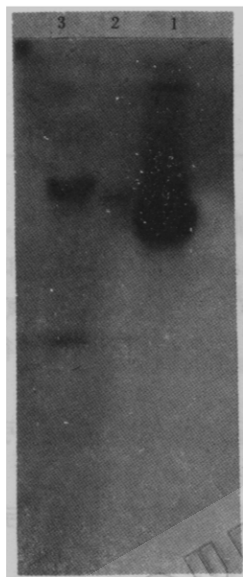


图 1 *E. gergoviae* 57-7 DNA 与 ^{32}P 标记的 nifHDK 探针 Southern 杂交图

Fig. 1 Hybridization of *E. gergoviae* 57-7 DNA

to ^{32}P labeled nifHDK probe

1. nifHDK; 2. *E. gergoviae* 57-7 DNA HindIII fragment;
3. *K. pneumoniae* DNA HindIII fragment; nifHDK 探针由质粒 pST1021 制备 nifHDK probe was prepared from pST1021.

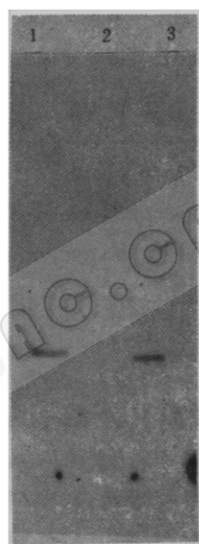


图 2 *E. gergoviae* 57-7 DNA 与 ^{32}P 标记的 nif 'BAL' 探针 Southern 杂交图

Fig. 2 Hybridization of *E. gergoviae* 57-7 DNA to ^{32}P labeled nif 'BAL' probe

1. *K. pneumoniae* DNA RI fragments;
2. *E. coli* HB101 DNA HindIII fragments;
3. *E. gergoviae* 57-7 DNA HindIII fragments; nif 'BAL' 探针是用质粒 pST1021 制备的 nif 'BAL' probe was prepared from plasmid pST1021.

2.3 *E. gergoviae* 57-7 中类似 nifA 的基因对 nifH:lacZ 融合子表达的调节

K. pneumoniae 中正调控基因 nifA 的产物 NifA 与固氮基因启动子上特异 DNA 序列相结合从而激活各固氮基因的启动子。研究 *E. gergoviae* 57-7 中类似 nifA 基因的调节机制是通过监测它对 nifH:lacZ 融合子的活化作用来决定的。测定不同条件下含 nifH:lacZ 融合子的 *E. gergoviae* 57-7(pSF2)转交子的 β -半乳糖苷酶活性(表 2)。

表 2 *E. gergoviae* 57-7 中类似 *nifA* 基因的产物对 *nifH::lacZ* 融合子表达的影响
Table 2 Effect of *nifA*-like products of *E. gergoviae* 57-7 on the expression of *nifH::lacZ* fusion

菌株 Strain	宿主基因型 Gene type of host	质粒特性 properties of relevant plasmid	β-半乳糖苷酶活性单位 Units of β-galactosidase activity			
			-O ₂		+O ₂ (80r. p. m)	
			+NH ₄ ⁺	-NH ₄ ⁺	+NH ₄ ⁺	-NH ₄ ⁺
<i>E. gergoviae</i> 57-7	野生型	---	24	13	5	14
<i>E. gergoviae</i> 57-7 (pSF2)	野生型	K. p <i>nifH::lacZ</i> Tc ^r Amp ^r	61	6586	22	7992
<i>K. pneumoniae</i> Msal	野生型	----	17	16	16	15
<i>K. pneumoniae</i> Msal (pSF2)	野生型	K. p <i>nifH::lacZ</i> Tc ^r Amp ^r	34	2588	24	652

结果表明 *E. gergoviae* 57-7 中类似 *nifA* 的基因其产物能激活 *nifH* 启动子, 这种激活作用受 NH₄⁺ 阻遏。*E. gergoviae* 57-7 中 *nifA* 基因对 *nifH::lacZ* 的活化在有氧和厌氧条件下是相似的, 而 *K. pneumoniae* *nifA* 对 *nifH::lacZ* 的活化作用明显受氧抑制, 氧的阻遏效应与负调控基因 *nifL* 的作用有关^[20]。在 *E. gergoviae* 57-7 中氧的作用机制值得研究。

2.4 外源 *nifA* 基因在 *E. gergoviae* 57-7 中的表达

把载有组成型表达 *K. pneumoniae* *nifA* 基因的质粒 pCk3 经结合转移法引入 *E. gergoviae* 57-7 得到转交子 *E. gergoviae* 57-7(pCK3), 其特性如下:

2.4.1 生长及固氮特性: 转交子与野生型菌株在无氮基本培养基中的生长曲线与固氮活性曲线相似, 说明外源 *nifA* 基因的引入不影响宿主的生长(图 3)。

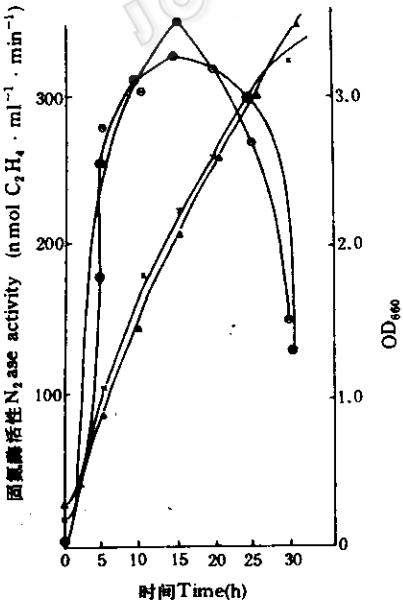


图 3 *E. gergoviae* 57-7 与转交子 *E. gergoviae* 57-7 (pCK3) 的生长曲线与固氮酶活性曲线
Fig. 3 Curve of growth and curve of nitrogenase activity in *E. gergoviae* 57-7 and *E. gergoviae* 57-7(pCK3)
●—● 野生型 *E. gergoviae* 57-7 固氮酶活性曲线
○--○ 转交子 *E. gergoviae* 57-7(pCK3) 固氮酶活性曲线
▲—▲ 野生型 *E. gergoviae* 57-7 生长曲线
×--× 转交子 *E. gergoviae* 57-7 (pCK3) 生长曲线

2.4.2 转交子 *E. gergoviae* 57-7(pCK3)的抗氮特性:免疫转迹(Western blotting)实验表明,在 50 m mol/L NH_4^+ 条件下转交子能合成固氮酶,而野生型不能合成固氮酶(图 4)。乙炔还原活性实验表明,转交子在 LB 中生长 12 小时后转入含有不同 NH_4^+ 浓度的基本培养基中,诱导 20 分钟后测 C_2H_4 形成,计算固氮活性的恢复。以无 NH_4^+ 条件下固氮活性为 100%,在 10 m mol/L NH_4^+ 时固氮活性恢复 88%,50 m mol/L NH_4^+ 时固氮活性恢复 76%,100 m mol/L NH_4^+ 时固氮活性恢复 52%。而野生型菌株在有 NH_4^+ 条件下不形成固氮酶,没有乙炔还原活性。

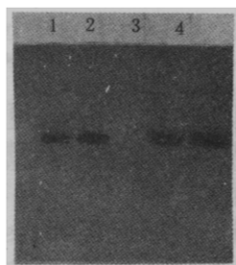


图 4 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的细胞粗提物的免疫转迹图

Fig. 4 The immunoblots of crude extracts separated by SDS-RAGE

1. 转交子细胞粗提物(在 50 m mol/L NH_4^+ 中生长的细胞);

Crude extracts of *E. gergoviae* 57-7 (pCK3) grown in 50mmol/L NH_4^+ ;

2. 转交子细胞粗提物(在 0 mmol/L NH_4^+ 中生长的细胞)

Crude extracts of *E. gergoviae* 57-7(pCK3)grown in 0 mmol/L NH_4^+ ;

3. 野生型细胞粗提物(在 50 mmol/L NH_4^+ 中生长的细胞)

Crude extracts of *E. gergoviae* 57-7 grown in 50mmol/L NH_4^+ ;

4. 野生型细胞粗提物(在 0 mmol/L NH_4^+ 中生长的细胞)

Crude extracts of *E. gergoviae* 57-7 grown in 0 mmol/L NH_4^+ ;

免疫转迹实验用抗 *A. vinelandii* 固氮酶铁蛋白为第一抗体

The antiserum against dinitrogenase reductase of *A. vinelandii* was used as the first antibody.

上述实验表明,*E. gergoviae* 57-7 中存在 *nifA*-like 基因,它对固氮基因表达的调节机制与 *K. pneumoniae* *nifA* 非常相似,朱家璧(1983 年)^[21]曾把载有组成型表达 *nifA* 基因的质粒 pST1021 引入野生型 *K. pneumoniae* 和 *E. cloacae* E26 中观察到固氮酶合成的去阻遏作用。因此当外源 *K. pneumoniae* *nifA* 在 *E. gergoviae* 57-7 中组成型表达就能使 *E. gergoviae* 57-7 在高 NH_4^+ 条件下(100 m mol/L)合成固氮酶,并能恢复 50%以上固氮酶活性。外源质粒 pCK3 在无抗性胁迫条件下经 2600 续代培养后仍稳定存在于转交子中,这种耐氮工程菌株有可能在田间应用上获得较野生型更有效的结果。

致谢 上海植物生理研究所分子遗传室的同志们给予技术指导。

参 考 文 献

- [1] Merrick M J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: Bothe, H. et al. eds. Nitrogen Fixation; Hundred Years After. New York; Gustav Fischer, Stuttgart, 1988, 293—302.

- [2] Gussin G N. *Ann. Rev. Genet.* 1986, **20**:567—591.
- [3] Buck M. J. *Bacterial*, 166:545—551.
- [4] Austin S, Hendersin N, Dixon R. *Eur J Biochem.* 1990, **187**:353—360.
- [5] Buchanan-Wollaston V, Cannon M C, Beynon J L. *Nature*, **294**:776—778.
- [6] 李永兴, 王继文, 李久蒂. 微生物学报, 1994, **6**, 在印刷中.
- [7] Boyer H W. *J Mol Biol.* 1969, **41**:459—472.
- [8] Backman K, Chen Y M, Magasanik B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**:3743—3747.
- [9] Mahl M C. *J. Bacteriol.* 1965, **89**:1482—1487.
- [10] Figurski D H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**:1648—1652.
- [11] Zhu J B, Yu G C, Jiang Q Y *et al. Sci Sin.* 1983, **26**:1258—1268.
- [12] Cannon F C, Riedel G E, Ausubel F M. *Mol Gen Genet.* 1979, **174**:259—266.
- [13] Simon R. *Mol Gen Genet.* 1984, **196**:413—420.
- [14] Kennedy C, Drummond M H. *J Gen Microbiol.* 1985, **131**:1787—1795.
- [15] Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: Current protocols in molecular biology. eds. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. 1972. 2. 4. 1.
- [16] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Lab. N. Y. 1982.
- [17] Miller J H. Assay of β -galactosidase. In: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor. N. Y. 1972, 352—355.
- [18] Takeshi, Vozumi, Wang Pei-Ling. *Agric Biol Chem*, 1986, **50**(6):1539—1544.
- [19] 李永兴, 胡长征, 王继文, 等. 生物物理与生物化学进展, 1990, **18**:242—243.
- [20] Morett E, Buck M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:9401—9405.
- [21] 朱家璧, 俞冠翹, 江群益, 等. 中国科学(B辑), 1983, **8**:688—696.

REGULATION OF NIF GENE EXPRESSION IN AN ASSOCIATIVE DIAZOTROPH- *ENTEROBACTER GERGOVIAE* 57-7

Li Jiudi Li Yongxing Jin Hongfan Wang Jiwen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

Abstract The *nifA*-like gene and *nifHDK* gene of *E. gergoviae* 57-7 were identified by southern DNA-DNA hybridization with a ^{32}P -labeled *nifA* and a *nifHDK* probe. The *nifA*-like gene in *E. gergoviae* 57-7 activated the *nifH::lacZ* fusion which was introduced into *E. gergoviae* 57-7 by plasmid pSF2. The properties of *nifA*-like gene in *E. gergoviae* 57-7 was very similar with *nifA* in *K. pneumoniae*. A *K. pneumoniae* *nifA* gene expressed constitutively was introduced into *E. gergoviae* 57-7 by plasmid pCK3. A NH_4^+ tolerant transconjugate was obtained and its characterization was studied.

Key words *E. gergoviae*, *nifA*, *nifH::lacZ* fusion, NH_4^+ tolerant transconjugate