

豌豆根瘤菌结瘤基因启动子内二级结构区 与转录活性有关*

毛成建 洪国藩

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 用羟胺随机改变豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 结瘤基因 nodD 上游的调控区间的核苷酸顺序, 将它们插入广谱转录质粒 pMP220 的 LacZ 基因前, 启动 LacZ 基因的表达、突变表明与结瘤基因的转录活力有关。DNA 序列分析发现, 这些突变都在距 nodD 基因起始密码子约 80bp 的二级结构区内。

关键词 结瘤基因, 调控序列, 二级结构

在豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 中, 已经发现十三个结瘤基因^[1]。这些基因分成五个操纵子。其中, 结瘤基因 nodD 是自身负反馈调控的, 其它基因的表达则依赖 nodD 的产物 NodD 蛋白。nodD 与 nodABCIJ 相邻, 但转录方向相反。nodD 和 nodABCIJ 的起始密码子相距 300bp。我们用羟胺随机诱变方式改变这个区间的核苷酸序列, 并通过报告基因 LacZ 的表达活力来确定基因区间的结构与功能的关系。

1 材料和方法

1.1 菌种与质粒

本实验所用菌种、质粒见文献 [2]。

1.2 试剂

EcoR I, Pst I 购自 Anglian Biotechnology Ltd.。T₄-DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim Company。RNase 购自中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂。NA-45 膜购自 S & S 公司。羟胺、TEMED、o-nitrophenyl- β -galactopyranosidase (ONPG) 购自 Sigma 公司。琼脂糖购自 Serva 公司。低熔点琼脂糖为 FMC 公司产品。acrylamide, bis, Bst 高温酶测序试剂盒为 Bio-rad 公司产品。 α -³²P-dATP 为 Amershan 公司产品。尿素为 BRL 公司产品。Tris 为上海化学试剂采购供应站进口分装试剂, 其余化学试剂均为国产分析纯试剂。卡那霉素 (Km), 链霉素 (Str) 为国产医用针剂, 四环素 (Tc) 为 Sigma 公司产品。抗生素用量参见文献[3]。

1.3 实验原理及其说明^[2]

调控序列的诱变参见文献[3, 4], 质粒 DNA 制备, 酶解回收, 载体 pMP220 酶解及

* 863 计划资助项目。

本文于 1993 年 1 月 7 日收到。

3' TGAACAACCTAACGGCCAATCCGTTAGCTCGCCAATTCTCTACATTCTCAGAGTTTAGCCCCGGGAC

A A
T C → T (27)
A T
T A
(25) T ← C G → A (19)

A T
GGGCCGCGAAGCAAAAAATCAAGGACCAGG TCAAGGCCCAAAAGATATTCACTAGGCTTTCTAAC
↓
A_R
A (32)

CATTTTAACTAACAAACCTACCGTTAGTAGATACCTTACCTATAAGTTGGGTAC 5'
▲ nodD →

图2 野生型及突变型调控序列的部分核苷酸序列

箭头所指为突变后的核苷酸，括号内为突变子编号；A_R为二级结构；
加框部分为调控蛋白保护区间；三角符号表示 nodD 结构基因开始。

Fig. 2 Mutations in the nodD promoter region

The altered nucleotides are indicated by arrows and the numbers in parentheses indicate the nodD promoter mutation allele. A_R shows a diad symmetry structure; The domains NodD protein binds are boxed; Triangle indicates the proposed translational start of nodD.

在 NodD⁻ 时，调控序列突变子19、25、27、32的β-半乳糖苷酶活力与野生型的调控序列的β-半乳糖苷酶活力明显不同，说明这些突变与转录有关。其中，突变子25、27的β-半乳糖苷酶活力比野生型低，尤其是突变子27，下降特别多，只有野生型的五分之一。而与27号突变只相距二个核苷酸位置处发生的突变，即19号突变子，及与25号突变相距一个核苷酸位置处发生的突变，即32号突变子的β-半乳糖苷酶活力，却比野生型的高，这种邻近位置上核苷酸的改变引起转录活力上下大幅度变动的情况，对深入研究该 DNA 区域的结构功能关系提供了有用的手段。

参 考 文 献

- [1] de Maagd R D. *J. Bacteriol.*, 1989, **171**: 6764—6770.
- [2] 毛成建, 杨国平, 史文文, 等. 在豌豆根瘤菌中发现离调控蛋白结合区100多个核苷酸的二级结构区参与结瘤基

因调控。见:《生物工程学报》编辑部编, 生物工程论文集, 北京: 化学工业出版社, 1994, 44—48.

[3] Hong G F, Research Progress report to Rockefeller Foundation, 1990.

[4] Humfreys G O, Willshaw G A, Smith H R *et al.* *Mol Gen Genet*, 1976, **145**: 101—108.

[5] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, *Molecular Cloning*, 2ed, published by Cold Spring Habor Laboratory Press, 1989.

[6] Miller J H, *Experiment in Molecular Genetics*, published by Cold Spring Habor Laboratory Press, 1972.

A SECONDARY STRUCTURE REGION IN *nodD* PROMOTER IN *R. LEGUMINISARUM* WAS FOUND TO BE INVOLVED IN TRANSCRIPTION

Mao Chengjian Hong Guofan

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract The entire *nodD* promoter was mutagenized at random with hydroxylamine and the treated promoter was then inserted into the transcription vector, pMP220, with reporter gene, LacZ, downstream of the insertion site. Mutants with promoter activities different from that of the wild type promoter were obtained. The DNA sequence analysis revealed that a secondary structure region which located more than 80bp upstream of the first codon of *nodD* gene was involved in transcription.

Key words Nodulation gene, Regulation sequence, Secondary structure