

巴西固氮螺菌 *ntrBC* 基因的克隆与核苷酸序列分析*

阎大来 何路红 李季伦

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 以 EMBL3 为载体, 构建了巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) Yu62 的基因文库。以巴西固氮螺菌 Yu62 中 PCR 扩增出的 450bp DNA 片断作为探针, 对该基因文库进行筛选, 得到了 10 个阳性克隆 (EA1—EA10), 其中含有两种不同类型的克隆, 分别以 EA4 和 EA9 为代表。对 EA4 的杂交分析发现目的基因位于 2.9kb EcoRI 片段上。DNA 序列分析结果表明该片段含有完整的 *ntrC* 编码区, 其编码产物由 480 个氨基酸组成, 分子量为 53469; *ntrC* 上游是完整的 *ntrB* 编码区, 其编码产物由 400 个氨基酸组成, 分子量为 43487。对相应的 *NtrC* 和 *NtrB* 氨基酸序列进行同源性分析, 说明巴西固氮螺菌与根瘤菌的亲缘关系较与其它自生固氮菌的更为接近。

关键词 巴西固氮螺菌, 基因文库, *ntrBC* 基因, 核苷酸序列

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 是一类可与许多禾本科作物及牧草根际联合共生的微生物^[1], 由于其具有分布广、数量多、适应性强等优点, 成为最受重视的联合共生固氮菌。目前对其固氮遗传学研究的主要对象是巴西固氮螺菌 (*A. brasilense*), 其中许多固氮及相关基因已得到克隆和分析^[2]。我们参照已知数种固氮菌 *nifA*、*ntrC* 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, 对巴西固氮螺菌的总 DNA 进行 PCR, 结果扩增出长约 450bp 的片段^[3]。本文即是在这一工作基础之上, 利用该 PCR 扩增片段作为探针, 筛选巴西固氮螺菌的基因文库, 得到两种不同的克隆, 其中之一经序列分析表明其含有 *nifA* 同源基因(待发表)。本文报道另一个目的基因所在的 2.9kb EcoRI 片段的核苷酸序列, 结果表明该片段含有完整的 *ntrBC* 编码区。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒(表 1)

1.2 培养方法

所有菌株均用 LB 培养基培养。巴西固氮螺菌 30℃ 培养, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 37℃ 培养。

1.3 包装蛋白的制备

按文献[9]进行。

1.4 DNA 的制备

细菌总 DNA 的提取按文献[10]进行。λ 噬菌体、质粒和单链 M13 噬菌体 DNA 的

* 863 计划资助项目。

本文部分内容在 1992 年“第九届国际固氮大会”上报告。

本文于 1994 年 4 月 14 日收到。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株与质粒 Strain and plasmid	表型和/或基因型 Phenotype and/or genotype	参考文献 Reference
菌株		
Strain		
<i>E. coli</i> K-12		
BHB2688	(N205 <i>recA</i> [λ imm434 <i>clts</i> b2 red <i>Eam Sam</i> / λ])	[4]
BHB2690	(N205 <i>recA</i> [λ imm434 <i>clts</i> b2 red <i>Dam Sam</i> / λ])	[4]
JM101	<i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> Δ M15]	[5]
LE392	<i>supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1</i>	[6]
<i>A. brasilense</i>		
Yu62	wild type	[7]
质粒		
Plasmid		
pUC19	Ap ^r	[8]
pFG9	Ap ^r , <i>A. brasilense ntrBC</i>	this work

提取按文献[11]进行。

1.5 核酸印迹分子杂交

探针的生物素标记及杂交和检测均按 BioRad 公司生物素标记 DNA 检测盒说明书进行。

1.6 DNA 序列测定及计算机分析

据双脱氧末端终止法^[12], 以单链 M13 噬菌体 DNA 为模板, 按 Promega 公司 T,DNA 聚合酶测序试剂盒说明书进行。用 Beckman 公司的 MicroGenic 序列分析软件进行序列拼接、分析等。

1.7 酶及试剂

核酸限制性内切酶、DNA 聚合酶 Klenow 片段购自 Promega 公司和华美公司, T,DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司, 生物素标记 DNA 检测盒购自 BioRad 公司, T,DNA 聚合酶测序试剂盒购自 Promega 公司, α -³²P-dATP 购自福瑞公司。

2 结果和讨论

2.1 基因文库的构建及筛选

提取高分子量的巴西固氮螺菌 Yu62 总 DNA (>50kb), 用稀释法确定其 *Sau3AI* 部分酶切最佳条件, 据此进行大量的部分酶切, 电泳回收约 14—23kb 的片段。所提取的包装蛋白用标准浓度的 λ DNA 进行包装试验, 效价为 5×10^7 pfu/ μ g λ DNA。将 EMBL3/*EcoRI* + *BamHI* 双酶切产物与回收片段以适宜的比例和浓度进行连接 (1.5 μ g:0.5 μ g/10 μ l 连接体积), 并进行包装, 建立了巴西固氮螺菌 Yu62 的基因文库, 容量为 2×10^6 个重组子。

从基因文库中随机挑选 10 个噬菌斑, 提取各自的 DNA 并进行 *SalI* 酶切分析, 结果表明全部是重组子。进一步分析这 10 个重组子左右臂内插入片段的大小, 均在 15—

22kb 范围内,平均约 18kb。根据计算,该基因文库的容量适合于实验要求。

以巴西固氮螺菌 Y₆₂ 中 PCR 扩增的 450bp 片段^[3]作为探针,杂交筛选该基因文库,得到 10 个阳性噬菌体,分别称为 EA1-10。提取 EA1-10 的噬菌体 DNA,分别进行各种酶切和杂交分析,结果表明 EA1-10 分为两种不同类型的克隆。一种以 EA9 为代表,其目的基因位于一个 2.6kb Sal I 片段上,经序列分析结果发现其含有 *nifA* 同源基因(待发表)。另一种克隆以 EA4 为代表,其目的基因位于一个 2.9kb EcoRI 片段上。

2.2 2.9kb EcoRI 片段的物理图谱

将 2.9kb EcoRI 片段克隆到 pUC19 上,构成 pFG9。用多种限制性内切酶对 pFG9 进行酶切分析,建立其插入片段的物理图谱(图 1)。

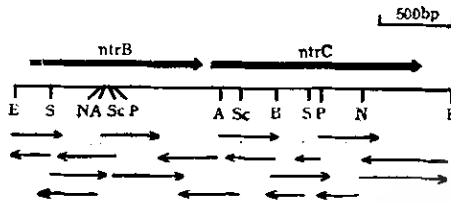


图 1 2.9kb EcoRI 片段的物理图谱

Fig. 1 Physical map of 2.9kb EcoRI fragment

Restriction sites: A-AvaI, B-BglII, E-EcoRI, N-NcoI, P-PstI, S-SalI, Sc-SacII. Heavy arrows indicate the coding regions of *ntrBC* and their direction. Light arrows indicate the sequencing direction and length.

2.3 2.9kb EcoRI 片段的 DNA 序列测定

利用 pFG9 插入片段的物理图谱,分别酶切回收各种合适的片段亚克隆到 M13mp 18/19 中,进行 DNA 序列测定,得到该插入片段共 2926bp 的全核苷酸序列(见图 2),其中 80% 以上为双向测序结果,其余亦是 3 次以上单向测序所得。该片段内 G + C% 达 66.1%,符合巴西固氮螺菌的特点。结合巴西固氮螺菌基因的密码子利用率^[4]及核糖体结合位点(RBS)的保守序列,该片段内有 2 个开放阅读框架(ORF),其产物分别与其它菌的 *NtrB* 和 *NtrC* 同源。

ntrB 起始密码子 ATG 位于 99bp 处,其上游 -15 至 -11 区域的 AAGGA 推测即是 RBS,基因全长 1203bp,其产物由 400 个氨基酸组成,分子量为 43487。*ntrC* 起始密码子 ATG 位于 1298bp 处,其上游 -12 至 -8 区域的 AGGGG 推测为 RBS,*ntrC* 基因共 1443bp,其产物由 480 个氨基酸组成,分子量为 53469。*ntrB* 的终止密码子与 *ntrC* 的起始密码子是重叠的,推测在巴西固氮螺菌中 *ntrBC* 是共转录的,与其它许多菌类似。在 *ntrB* 起始密码子上游的 98bp 内未发现类似于 σ^{70} 或 σ^{54} 型启动子的特点,可能启动子区域在 EcoRI 上游,或者 *ntrB* 上游还有 ORF,与 *ntrBC* 共转录。在 *ntrC* 起始密码子上游 -169 至 -153 区域(*ntrB* 编码区内)有一段序列即 CTGGCCTGGGGCTTGCA(图 2),是典型的 RpoN 依赖型启动子的特点,推测 *ntrBC* 的转录并不是单一的,可能 *ntrC* 还可以单独转录。

2.4 NtrC 及 NtrB 的同源性分析

根据大肠杆菌^[14]、肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)^[15]、根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)^[16]、苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*)^[17] 和巴西固氮螺菌的 *ntrC* 序列推测各自的 NtrC 氨基酸序列, 进行同源分析(表 2)。结果表明, 肠杆菌科内和根瘤菌科内的 NtrC 同源性均在 90% 以上, 肠杆菌科与根瘤菌科、巴西固氮螺菌在 45% 左右, 巴西固氮螺菌与根瘤菌科接近 70%, 这一结果与 Fani 等^[13]对 NifH 氨基酸序列同源性结论近似, 即巴西固氮螺菌与根瘤菌科的亲缘关系较与肠杆菌科更为接近。

同样, 大肠杆菌^[14]、肺炎克氏杆菌^[15]、慢生型根瘤菌 (*Bradyrhizobium parasponia*)^[18]、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)^[20] 和巴西固氮螺菌的 *ntrB* 序列, 对其 NtrB 氨基酸序列进行同源分析(表 3)。所得 NtrB 的同源百分率虽较 NtrC 的低, 但结果是一致的, 肠杆菌科与其它固氮菌的 NtrB 同源性仅 35% 左右, 巴西固氮螺菌与荚膜红细菌亦不足 40%, 而与慢生型根瘤菌 (*B. parasponia*) 达 52.1%, 同样说明了巴西固氮螺菌与根瘤菌的亲缘关系比其它自生固氮菌更近。

表 2 几种细菌 NtrC 氨基酸序列同源百分率

Table 2 Percentage sequence matches calculated for the deduced amino acid sequences of *ntrC* of different bacteria

	Ec	Kp	At	Rm	Ab
Ec	*	92.3	43.9	45.8	46.8
Kp		*	44.7	44.3	45.4
At			*	90.9	69.0
Rm				*	68.3
Ab					*

* Ec: *E. coli*; Kp: *K. pneumoniae*; At: *A. tumefaciens*; Rm: *R. meliloti*; Ab: *A. brasilense*.

表 3 几种细菌 NtrB 氨基酸序列同源百分率

Table 3 Percentage sequence matches calculated for the deduced amino acid sequences of *ntrB* of different bacteria

	Ec	Kp	Bp	Rc	Ab
Ec	*	93.1	36.4	34.5	34.2
Kp		*	34.6	35.5	32.5
Bp			*	43.1	52.1
Rc				*	38.2
Ab					*

* Ec: *E. coli*; Kp: *K. pneumoniae*; Bp: *B. parasponia*; Rc: *R. capsulatus*; Ab: *A. brasilense*.

NtrB 和 NtrC 属于典型的双组分调节蛋白, 根据双组分调节蛋白保守性特点^[21,22], 推测巴西固氮螺菌 NtrB 中的 His-166 和 NtrC 中的 Asp-54 分别是其各自的磷酸化位置(图 2), NtrB 将其 His-166 上的磷酸基团转移到 NtrC 的 Asp-54 上, 使 NtrC

EcoRI RBS 90
GAATTCGGCTCGAAGTCAACCGCATGTCGGATCCGAACGAGTGGCGGGTTCATCCGGACTTCTACGCCCGGGATCGAAAGGATG

ntxB→ 180
GCTGCCTGATGGCCCGTGCATCTGCCGCTGCTCCATTGCCCGCCGCGCGCGGCCCGTGGCCCTCCGGTTCCTACCGACCCGCTCC
M A R A S A A A P L P R R P A R P R A P S G S Y E P V

SalI 270
GCTCCTGCATCGATCCGTCCATCATGCTGAACCGCTCCCGACCCGGTCTGGTGGTGCACGGCTCCGGCGACATCCGCTACGTGAATC
R S C I D P S I M L N A L P D P V L V V D G S G D I R Y V N

360
TGGAGGCGCAGGAGTTCCTTGGCCTGTCCGCCACCATGATGGAAGGCATGCCGCTGGCGGAGTTGCTGCCGCCAACAGCCCGGTGAGCC
L E A Q E F P G L S A T M M E G M P L A E L L P P N S P V S

450
AGTTGATCGAGCAGTCCAGCAGGGCCGCCACCGCCCTCGCAGGAGGGCGTGGTTCATCGACACCGCGCATCCGCCCGCACCCAGTCA
Q L I E Q V Q Q G R H R A S Q E G V V I D T P R I G P H H V

540
CCGTGGCGGTACCAGCATGGCGAGCCACCGACCATGTGCATGCTGACGGTCAACGAGCGCACCGCTGCCCGCAAGATCGACAATTCCC
T V R V T A W A S P P T M C M L T V N E R T L A R K I D N S

NcoI AvaI SacI 630
TGACCACCGCAACCGCGCCGCTCCGTACCGCCATGGCGTCGATGCTCCGGCATGAGGTCAAGAATCCGCTGTCCGGCATCCCGGGG
L T H R N A A R S V T A M A S M L G H E V K N P L S G I R G

PstI 720
CGGCGCAGCTCCTGGAGGAGAAGTGCAGCGAGTCCGACCGGGTCTGACCCGGTGCATCTGGACGAGGCCGACCGCATCGTCCGCCCTGG
A A Q L L E E N C S E S D R V L T R L I C D E A D R I V A L

810
TCAACCGGATGGAGGTCTTCTCCGACAGCGCCGTTGGAACCGCATGCCGTGAACATCCACACCGTTCGGAGCATGTCGCAAGGTGG
V N R M E V F S D Q R P L E R D A V N I H T V L E H V R K V

900
CCCAGAGCGGCTTCGCACGGAACATCCGTTTCATGAGCGCTACGACCCGTCCTGCGCCGGTTTATGGCAACCGCAGCAGCTCATCC
A Q S G F A R N I R F I E R Y D P S L P P V Y G N E D Q L I

990
AGATTTTCCTCAACCTGATTAATAATCGCGCAGAGGCTGCACCGAATCGCGCGGCGAGATCATACTCAGCACATCTTATCAGCACCGCG
Q I F L N L I K N A A E A A P E S G G E I I L S T S Y Q H G

1080
TCCGCATGGCCCTGCCAGGCGCGACACCCGCTGCACCTGCCGTTGCTGGTGTCCGTTCCAGGATAATGGGGACGGCATACCCGACGATC
V R M A L P G G D T R L H L P L L V S V Q D N G D G I P D D

DPE 1170
TGGCTCCAACCTCTTCGATCGGTTTCATTACGACCAAGGTCAATGGGACTGGCGTGGGCTTGCATTGGTAGCCAAAATCGTCCGGCAGC
L R S N L F D A F I T T K V N G T G L G L A L V A K I V G D

1260
ACGGCGCGTTCATCGAATTTACAGCCAGCGCGCGCACCGTCTTCAAGGTCTCGCTACCCATGTTTCGATGAAGCGCAGATGAGCGGGG
H G G V I E F D S Q P R R T V F K V S L P M F D E A Q M S G

RBS ntrC→ 1350
ATCCTGACCCGGCCAGAGGCATCCGAGGGCCATCGGATGAGTGCAGCCAGCATCTGGTTGGGACGACGACCCGCCATCCGACCCCT
D P A P A R G I R G A I G

M S A A T I L V A D D D R A I R T V 1440
TCTGACCCAGCACTCGCCGCTCTCGGCCACGAGGTGGCACCACCGGCAACGCTTCCACCGTCTCGCCGCTGGGTGGCGGACGGGACGGG
L T Q A L A R L G H E V R T T G N A S T L W R W V A D G Q G

SacI 1530
CGACCTCATCATCCGACGCTGGTGCATGCCCGACGAGAACGGGCTGGACCTGATCCCGCGGATCAAGAAGATCCGGCCCGACCTGCCAT
D L I I T H V V M P D E N G L D L I P R I K K I R P D L R I

1620
CATCGTGCATGAGCGCCAGAACACCGTGCATCAGCGGGTGAAGGCGGCGGAGCGCGGAGCCTTCGAGTATCTGCCCAAGCCCTTCGACCT
I V M S A Q N T L I T A V K A A E R G A F E Y L P K P F D L

GAAGGAGTTGGTCTCGGTCGAGCGGGCGCTGAACTCCAACACGCCCGGGCGGCTTGCCCGCAGACGCCGGCGAGGGCGGACGACGA
 K E L V S V V E R A L N S N T P R R R L P A D A G E A D E Q 1710

BglI 1800
 GCTTCCCCTGATCGGCGGCTCGCGGCCATGCAGGAGACTACCGCGTCTTGCCCGTTTGATGGGCACCGACTCGACGGTGACCATCAC
 L P L I G R S P A M Q E I Y R V L A R L M G T D S T V T I T

CGGGAGTCGGGCACCGCAAGAACTGGTGGCCCGCGCGTGCACGATTACGGCAAGCGGCGCAACGGCCCTTCGTCCGGATCAACAT
 G E S G T G K E L V A R A L H D Y G K R R N G P F V A I N M 1890

SalI 1980
 CGCGCCATCCCGCGGAACTGATCGAGTCGAGCTGTTCCGGTACGAGAAGGGCGCTTCACCGGAGCCACCAACGGTGCAGCCGGCGG
 A A I P R E L I E S E L F G H E K G A P T G A T N R S T G R

PstI
 CTTCCGACAGGCGCAGGGCGGCACCCTGTTTCTCGATGAGATCGGCGACATGCCGCTGGAGCGCAGACCCGCTGCTCGCGGTGCTGCA
 F E Q A Q G G T L F L D E I G D M P L E A Q T R L L R V L Q 1980

GGAAGCGAGTACACCACCGTCGGCGGACGTACACCAATCAAGACGGACGTACGCATCGTCCCGCGACCCACCGGACCTGCGCACCCCT
 E G E Y T T V G G R T P I K T D V R I V A A T H R D L R T L 2160

GATCCGCCAGGGCCTGTTCCGCGAGGACCTGTTCTACCGTCTGTGCGTCTGCCATCCGCTCCCGCGCTGCGCGAGCGTACGGAGGA
 I R Q G L F R E D L F Y R L C V V P I R L P P L R E R T E D 2250

NcoI 2840
 CGTCCGCTCCTGGTTCGCCACTTCTGAACCAATGCTCGGCCAAGGGCTGCCGCTGAAGAGCATCGACCAGCCCGCATGGACCGGTT
 V P L L V R H F L N Q C S A Q G L P V K S I D Q P A M D R L

GAAGCGATACCGTTGGCCGGCAACGTTCCGCGAGCTGGAGAACCTTGTCGCGCGCTCGCCGCGCTCTATTCCGAGGAGTATCGGGCT
 K R Y R W P G N V R E L E N L V R R L A A L Y S Q E V I G L 2430

CGATGTGGTGGAGCGGACGTTGCCGACACCACACCCCGCCGGCAACCGTGGAGGAGCCGACAGGGCCGTGTCGCGCGCGTGGAGCG
 D V V E A D V A D T T P A A Q P V E E P H R G L S A A V E R 2520

CCACCTCAAGGATTATTTCCGCGGCAACAAGGACGGGATGCCGTCAAACGGCCTCTATGACCGGGTGTGCGCGAGGTCGAACGTTCCCT
 H L K D Y F A A H K D G M P S N G L Y D R V L R E V E R P L 2610

GATCTCGCTCAGCCTCTCGGCGACCGGGGCAACCAGATCAAGGCGGCGCAACTGCTCGGCTCAATCGCAACACGCTGCGCAAGAAGAT
 I S L S L S A T R G N Q I K A A Q L L G L N R N T L R K K I 2700

CCGCGATCTCGACATCCAGGTGGTGGCGGGTTGAAGTGATCCGCGCCCGTGGATCGGCGGGCTCACCGCAATCCACAGCGTGGTG
 R D L D I Q V V R G L K * 2790

TTTTGGACAGGCTTCGGCACCTCTGCCGTTCCGAATGCTCCTTAGGGACTGTGCGAAAGGCAGAGGGTTGCCGCTTGGCAGGACGG
 EcoRI 2926
 CAACAGCTCGTGATCATTCTGGCAACAGACTGCTTGCCGGAATC 2880

图 2 巴西固氮螺菌 Yu62 *nrBC* 编码区的核苷酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *A. brasilense* Yu62 *nrBC* coding regions
 RBS; putative ribosome binding site. DPE: putative RpoN dependent promoter. The potential
 start codons are shaded. Conserved histidine residue in NtrB and aspartic acid residue in
 NtrC are boxed, which are suspected to be the carrier and the acceptor of phosphate
 respectively.

具有 DNA 结合能力,以激活某些启动子的转录。

对于 NtrC 是否参与巴西固氮螺菌固氮基因的调控,不同实验室存在相反的推论。

Pedrosa 等^[23]通过对一些突变株的分析,认为巴西固氮螺菌 NtrC 同肺炎克氏杆菌的一样,参与其固氮基因的调控;而 Liang 等^[24]通过对 ntrC 的克隆与定位诱变分析,认为 NtrC 不参与巴西固氮螺菌固氮基因的调控。通过比较,本文所克隆的 ntrC 与后者所克隆的是一致的,这一工作将有助于精确阐明巴西固氮螺菌固氮基因的表达调控机制。

参 考 文 献

- [1] Pedrosa F O. *CRC Crit Rev Plant Sci*, 1985, 6: 345—384.
- [2] Elmerich C, Zimmer W, Vieckke C. Associative Nitrogen-Fixing Bacteria. In: Stacey G ed. *Biological Nitrogen Fixation*. New York, London: Chapman and Hall, 1992. 212—258.
- [3] 阎大来,李季伦. *微生物学报*, 1992, 32(5): 309—313.
- [4] Hohn B, Murray K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 82: 7525—7529.
- [5] Messing J. *Recom DNA Tech Bull*, 1979, 2(2): 43.
- [6] Borck K. *Mol Gen Genes*, 1976, 146: 199—207.
- [7] 杨洁彬,曹增良,李季伦. *北京农业大学学报*, 1984, 10(3): 321—329.
- [8] Yanisch-Perron C. *Gene*, 1985, 33: 103—119.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 100—101.
- [10] Rodriguez R L, Tsai R C. *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983, 45—46.
- [11] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.21—1.32.
- [12] Sanger F. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463—5467.
- [13] Fani R, Allotta G, Bazzicalupo M. *Mol Gen Genes*, 1989, 220: 81—87.
- [14] Miranda-Rfos J, Sanchez-Pescador R, Urdea M et al. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 2757—2770.
- [15] Buikema W J, Szeto W, Lemley P V et al. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13: 4539—4555.
- [16] Wardhan H. *Mol Plant-Microb Interact*, 1989, 2: 241—248.
- [17] Szeto W W, Tracy N B, Ronson C W. *J Bacteriol*, 1987, 169: 1423—1432.
- [18] MacFarlane S A, Merrick M J. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13: 7591—7606.
- [19] Nixon B T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 7850—7854.
- [20] Jones R, Haseikoru R. *Mol Gen Genes*, 1989, 215: 507—516.
- [21] Stock J B, Ninfa A, Stock A M. *Microbiol Rev*, 1989, 53: 450—490.
- [22] Weiss V, Magasanik B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8919—8923.
- [23] Pedrosa F O, Yates M G. *FEMS Microbiol Lett*, 1984, 23: 95—101.
- [24] Liang Y Y, Arsene F, Elmerich C. *Mol Gen Genes*, 1993, 240: 188—196.

CLONING AND SEQUENCING OF *ntrBC* GENES FROM *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Yan Dalai He Luhong Li Jilun

(National Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract A gene library of *Azospirillum brasilense* Yu62 was constructed in EMBL3. The library was screened with PCR amplified fragment as a special probe. Ten positive plaques (EA1-EA10) were selected. Detection results showed they contained two different types of clones, representing as EA4 and EA9 respectively. Southern hybridization of EA4 displayed that target gene was located in a 2.9kb EcoRI fragment. Sequence of this fragment had allowed the position and identification of *ntrC* gene, which encoding a protein of 53469, consisted of 480 amino acids. In the upstream of *ntrC*, a complete *ntrB* coding region was also found, which encoding a protein of 43487, consisted of 400 amino acids. Homologous analysis of the deduced amino acid sequences of *ntrC* and *ntrB* from different bacteria demonstrated that *A. brasilense* was closer to *Rhizobia* than to other free-living diazotrophs.

Key words *Azospirillum brasilense*, Gene library, *ntrBC* gene, Nucleotide sequence