

浑球红细菌谷氨酸合酶基因 (*glt*) 的

克隆和图谱分析*

鲁 涛 吴永强 宋鸿遇

(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032)

摘 要 利用转座子 Tn5 随机插入诱变筛选得到 12 株浑球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 氨同化缺陷突变株 (Asm^-)。这些突变株胞内均无 GOGAT 活性, 同时它们均无固氮酶活性 (Nif^-), 并且具有氮代谢多效性缺失表型 (Ntr^-)。将含有 *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 的完整 *glt* 基因的质粒 pHB10 转入突变株中能互补上述表型。通过筛选携带 Tn5 的 R-prime 质粒克隆了 *glt::Tn5* 片段。Southern 杂交证明所克隆 *glt::Tn5* 片段与 *E. coli* 的 *gltBD* 基因有同源性。用此片段与以 pLAFR3 为载体所构建的 *R. sphaeroides* 601 基因文库进行菌落原位杂交筛选到了携带 *glt* 基因的 cosmid pLT27。pLT27 能互补所有 12 株 *R. sphaeroides* 氨同化缺陷突变株。酶切分析表明在该 cosmid 中插入的染色体 DNA 片段大小约为 26.5kb。以 pRK415 为载体亚克隆了 4.0kb 与 10.5kb 的 pLT27 的 HindIII 酶切片段, 分别命名为 pLTRK271 与 pLTRK272。pLTRK272 能互补变种 GT6, GT10, GT11, pLTRK271 能互补其余的变种。通过单、双酶切作出了 pLTRK271 与 pLTRK272 的物理图谱。上述 10.5kb 的 pLT27HindIII 酶切片段与 *E. coli gltBD* 基因具有同源性。Southern 杂交分析表明 Tn5 均插在变种染色体的同一区域并得出了其插入位点。由此可确定 *glt* 基因大致位于一段 11kb 的 EcoRI-HindIII 克隆片段内。

关键词 浑球红细菌, 谷氨酸合酶基因, 氨同化缺陷突变株, 物理图谱

谷氨酸合酶 (glutamate synthase, GOGAT; EC2.6.1.15) 是细菌氨同化的一个关键酶, 当生物体处于氮限量的环境中时, 它与谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS; EC 6.3.1.2.) 所催化的反应是合成谷氨酸的主要途径^[1]。在不同细菌中, 编码 GOGAT 的 *glt* 基因的组成各不相同, 同时它们的调控特性也不相同^[2~7]。在光合细菌中, 对于 GOGAT 的工作报道得很少, 而对于编码 GOGAT 的 *glt* 基因的工作则还未见报道。我们以前曾经筛选得到光合细菌 *R. sphaeroides* 的 GOGAT⁻ 突变株^[8], 并对其生理生化特性有了一些研究^[9, 10]。很多研究表明 GOGAT 与固氮调控有很密切的关系, 但由于在光合细菌中对于 GOGAT 分子水平上的研究是一片空白, 因而有很多现象不能从根本上得到解释。本文筛选了氨同化缺陷型菌株, 克隆了 *glt* 基因并对 *glt* 基因进行定位和图谱分析, 以期对光合细菌中氨同化及固氮调控有进一步了解。

* 国家高技术发展(863)计划资助项目。

本文于 1994 年 12 月 19 日收到。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验所用菌株和质粒见表1。

表1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

菌株	特性	来源 / 文献
Strains	Relevant characteristics	Source / Reference
<i>E. coli</i>		
HB101	<i>F</i> , <i>hdsS</i> , <i>hdsM</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> <i>xyl</i> , <i>mtl</i> , <i>recA</i> , <i>supE</i> , <i>Sm</i> ^r	Boyer 1969
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hdsR17</i> <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan 1983
BHB2688	(N205, <i>recA</i> [λ imm434 <i>cltsb2redEamSam</i> / λ])	Hohn 1977
BHB2690	(N205, <i>recA</i> [λ imm434 <i>cltsb2redDamSam</i> / λ])	Hohn 1977
LE392	<i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>hdsR514</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> <i>metB1</i> , <i>trpR55</i> , <i>lacY1</i>	Borck 1976
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
601	wile type	Pemberton
6001	Rif ^r derivative of 601	this work
204	GOGAT ⁻ derivative of 601	[8]
2041	Rif ^r derivative of 204	this work
GT4-GT15	Tn5-induced GOGAT ⁻ , Nif ⁻ , Ntr ⁻ derivative of 6001, Rif ^r , Km ^r ,	this work
质粒		
Plasmids		
pSUP1011	p15A replicon, Mob ⁺ , Cm ^r , Km ^r containing Tn5	Simon 1983
pBR322	Tc ^r , Ap ^r	Bolivar 1977
pLAFR3	cos, Mob ⁺ , Tra ⁻ , IncP, Tc ^r	Staskawicz 1987
pRK2013	Tra ⁺ , IncP; Km ^r	Diita 1980
pRK415	Mob ⁺ , Tra ⁻ , IncP, Tc ^r	Keen 1988
pRSP20	<i>gltB</i> ⁺ D ⁺ , ColEI immunity	Covarrubias 1980
pRSP21	<i>gltB</i> ⁺ D ⁺ , Cm ^r derivative of pRSP20	Covarrubias Unpub.
pHB10	pWB5 derivative, ORS571 <i>glt</i> locus, Tc ^r	Hilgert 1987
pCJ5	<i>nac</i> ⁺ cloned in pBGS9	[24]
pMN2	Km ^r derivative of R68.45, Ap ^r Tc ^r	Nayudu 1987
R' 81	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pMN2, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r	this work
R' 82	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pMN2, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r	this work
R' 83	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pMN2, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r	this work
R' 101	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pMN2, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r	this work
R' 104	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pMN2, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r	this work
R' 105	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pMN2, Ap ^r , Tc ^r , Km ^r	this work
pBA1043	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pBR322, Ap ^r , Km ^r	this work
pSA1045	<i>glt</i> ::Tn5 derivative of pBR322, Ap ^r , Km ^r	this work
pLT27	<i>R.s. hlt</i> locus cloned in pLAFR3, Tc ^r	this work
pLTRK271	4.0kb HindIII fragment of pLT27 cloned in pRK415, Tc ^r	this work
pLTRK272	10.5kb HindIII fragment of pLT27 cloned in pRK415, Tc ^r	this work

1.2 培养条件

E. coli 于 37℃ 振荡培养, *R. sphaeroides* 于 28℃ 光照 (2500~3000lux) 厌氧培养或暗好氧振荡培养。TB、SOB、SOC、LB 培养基参照文献[11]。RCVB 培养基参照文献[12], 其中 NH_4^+ 浓度为 7.5mmol/L, 谷氨酸浓度为 7.5mmol/L, 视具体实验不同加入 NH_4^+ 或谷氨酸为氮源, Z 培养基参照文献[13]。

根据实验需要添加不同抗生素, 浓度如下: Ampicillin 50 μg /ml, Chloramphenicol 10 μg /ml (*E. coli*) 和 1 μg /ml (*R. sphaeroides*), Kanamycin 25 μg /ml, Rafampicin 50 μg /ml, Streptomycin 50 μg /ml, Tetracycline 15 μg /ml (*E. coli*) 和 1 μg /ml (*R. sphaeroides*)。

1.3 氨同化缺陷型菌株的筛选

按文献[14]方法进行两亲本杂交, 然后按文献[15]方法用 Ap 富集突变株。收集菌体, 洗涤并经系列稀释后涂布于含 Rif 和 Km 的 LB 平板上, 于 28℃ 培养 3~4d 至单菌落出现。用无菌牙签把单菌落转移至含 Km 的 RCVB 平板(以谷氨酸为氮源)和 RCVB 平板(以 NH_4Cl 为氮源)上。于 28℃ 培养 2d。挑出 LB 平板上生长而在以 NH_4Cl 为氮源的 RCVB 平板上不生长的菌落, 进行纯化保存。

1.4 谷氨酸合成酶与谷氨酸脱氢酶活性的测定

参照文献[1]与文献[16], 用 BECKMANDU-70 分光光度计进行分析。

1.5 蛋白质含量测定

参照文献[17], 用牛血清白蛋白为标准。

1.6 固氮酶活性测定

采用乙炔还原法, 按文献[18]所述方法测定。

1.7 R-prime 质粒的筛选

参照文献[19]所述方法进行。

1.8 三亲本杂交

参照文献[14], 以 pRK2013 为助质粒。

1.9 DNA 操作

质粒 DNA 的制备和纯化、去磷酸化反应和连接反应、Lambda 噬菌体包装提取物的制备及体外包装、菌落原位杂交、Southern 印迹转移及杂交、低熔点琼脂糖凝胶回收 DNA 方法、 α -互补现象的检测、大肠杆菌感受态细胞的制备及转化方法均按文献[11]所述进行; 限制性内切酶反应按产家说明书进行; 切口平移法标记 DNA 参照探针标记试剂盒说明书; 细菌总 DNA 的大量抽提参照文献[20], 小量抽提参照文献[21]。

1.10 *R. sphaeroides* 基因文库的构建

参照 Sambrook^[11]所述方法首先确立 *R. sphaeroides* 总 DNA 的限制性内切酶部分消化最适条件, 然后用适量的限制酶 *Sau3A*I 大量消化 *R. sphaeroides* 总 DNA 使 20~30kb 片段含量最多。用酚: 氯仿抽提两次后乙醇沉淀回收 DNA, 之后通过 10%~40% 的蔗糖密度梯度平衡超离心收集 20~30kb 片段, 然后与经 *Bam*HI 酶切并脱磷的载体 pLAFR3 连接, 经体外包装后感染 *E. coli* DH5 α , 最后在含 Tc 和 X-gal, IPTG 的 TB 平板上筛选白色菌落保存。

1.11 主要药品来源

限制性内切酶购自 Bio-lab 公司和华美生物工程公司, T4 DNA 连接酶购自 Bio-lab 公司, 碱性磷酸酶购自华美生物工程公司, 琼脂糖、NADPH、抗生素购自 Sigma 公司, 低熔点琼脂糖购自 BRL 公司, 硝酸纤维素滤膜购自 S&S 公司, 缺口平移试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, 生物素标记试剂盒购自 BRL 公司, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司, 其它所用药品均为分析纯。

2 结果

2.1 氨同化缺陷突变株的筛选

按材料与方法中所述, 利用接合转移将携带转座子 Tn5 的自杀性质粒 pSUP1011 转入到 *R. sphaeroides* 6001 中, 由于 pSUP1011 在 *R. sphaeroides* 中不能稳定复制, 因而筛选 Tn5 的 Km 抗性标记就可得到染色体 DNA 上插有 Tn5 的 *R. sphaeroides* 菌株, 然后在以 NH_4^+ 为唯一氮源的 RCVB 基本培养基上鉴定这些 Km 抗性的接合转移子利用 NH_4^+ 的能力, 不能利用 NH_4^+ 为唯一氮源生长而必须补充谷氨酸才能生长的菌株即为氨同化缺陷突变株。本文用此方法从 10 次独立的筛选中得到了 12 株氨同化缺陷突变株, 其中 Km 抗性的接合转移子出现的频率约为 $10^{-6}\sim 10^{-7}$ 个接合转移子/受体细胞, 谷氨酸缺陷型出现的频率约为 10^{-3} 个/接合转移子。

2.2 氨同化缺陷突变株的特性鉴定

检测了 *R. sphaeroides* 谷氨酸脱氢酶活性, 证明在 *R. sphaeroides* 粗提液中没有谷氨酸脱氢酶活性。 *R. sphaeroides* 主要是利用 GS/GOGAT 途径来同化 NH_4^+ 。由于突变株不能利用 NH_4^+ 或 Gln 为唯一氮源而必须补充谷氨酸才能生长, 其内部的氨同化途径必定被阻断, 因而我们测定了突变株的 GOGAT 活性, 见表 2。各氨同化缺陷突变株都无 GOGAT 活性, 因而 Tn5 可能插入了与 GOGAT 合成有关的基因, 但目前还不能确定 Tn5 插入导致了其结构基因突变还是与其合成有关的调控基因的突变。

本文还就各突变株对各种不同氨基酸的利用进行了检测。各突变株都具有氮代谢多效性缺失特性, 即不能利用组氨酸、精氨酸和谷氨酰胺等多种氨基酸为唯一氮源生长。另外本文还测定了上述菌株的固氮酶活性。其活性见表 2。所有的氨同化缺陷突变株都没有固氮酶活性。这与我们以前用 NTG 诱变筛选到的 GOGAT⁻ 突变株 204^[8] 的表型是一致的。

质粒 pHB10 含有完整的根瘤菌 *Azorhizobium sesbaniae* *glt* 基因, 其载体为 pWB5, 是一个可移动的广宿主范围的克隆载体, 以 pRK2013 为辅助质粒, 通过三亲本杂交将 pHB10 导入氨同化缺陷突变株 GT8 及 GT9 中, 发现突变株能利用 NH_4^+ 为唯一氮源生长。从表型回复的 GT8 和 GT9 中抽提质粒再转化 *E. coli* DH5 α 可得到 pHB10, 说明 pHB10 并未与变种染色体发生重组, 即 pHB10 能反式互补上述变种的 Asm^- 表型。同时, 在不同氨基酸上的生长测定表明, 当 pHB10 转入到突变株中, 突变株的氮代谢多效性缺失表型也得到了恢复, 说明所筛选变种确为 GOGAT⁻ 突变株。

2.3 含 *glt::Tn5* 的 R-prime 质粒的筛选及 *glt::Tn5* 片段的克隆

pMN2 是一种广宿主范围的质粒, 它能通过接合转移在不同种间移动并通过一种尚

表 2 *R. sphaeroides* 不同氮同化缺陷型菌株及其互补子的 GOGAT 与固氮酶活性Table 2 GOGAT and nitrogenase activities of *R. sphaeroides* Asm⁻ mutants and their complements

菌株 Strains	固氮酶 N ₂ ase*	GOGAT*	菌株 Strains	固氮酶 N ₂ ase*	GOGAT*	GOGAT**
GT4	0	0	GT4 / pLTRK271	395	6.3	27.6
GT5	0	0	GT5 / pLTRK271	737	6.1	37
GT6	0	0	GT6 / pLTRK272	600	4.8	48.6
GT7	0	0	GT7 / pLTRK271	734	6.0	22.1
GT8	0	0	GT8 / pLTRK271	423	6.6	28.2
GT9	0	0	GT9 / pLTRK271	500	11.5	20.6
GT10	0	0	GT10 / pLTRK272	800	9.3	26.2
GT11	0	0	GT11 / pLTRK272	822	9.9	36.5
GT12	0	0	GT12 / pLTRK271	470	9.0	24.7
GT13	0	0	GT13 / pLTRK271	769	9.4	30.6
GT14	0	0	GT14 / pLTRK271	468	10.1	44
GT15	0	0	GT15 / pLTRK271	856	8.3	30.5
			6001	666	5.3	19.9

[1] * 以 7.5mmol / L Glu 为唯一氮源。 ** 以 7.5mmol / L NH₄⁺ 为唯一氮源。

[1] * 7.5mmol / L Glu was used as sole nitrogen source. ** 7.5mmol / L NH₄⁺ as sole nitrogen source.

[2] GOGAT 活性单位为 nmoles NADPH oxidized min⁻¹mg⁻¹protein.

固氮酶活性单位为 nmoles C₂H₄h⁻¹mg⁻¹protein.

[2] GOGAT activity was expressed as nanomoles of NADPH oxidized per minute per milligram of protein.

Nitrogenase activity was expressed as nanomoles C₂H₄ produced per hour per milligram of protein.

未完全了解的机制截取一段宿主染色体 DNA 而形成嵌合质粒,称为 R-prime 质粒。本文就利用 pMN2 的这些特性来筛选带有 *glt::Tn5* 片段的 R-prime 质粒。首先用 *E. coli* HB101 / pMN2 与氮同化缺陷突变种杂交,在含 Rif KmTc 的 LB 平板上筛选含有 pMN2 的氮同化缺陷突变种,然后再用所得到的含有 pMN2 的突变株与 *E. coli* HB101 进行杂交,在 SmTc Km 的 LB 平板上筛选抗性菌株,在此过程中,pMN2 就有可能截取了一段变种染色体 DNA 而形成 R-prime 质粒,利用 Tn5 的 Km 抗性标记就可筛选到含有 *glt::Tn5* 的 R-prime 质粒。利用这种体内克隆法分别从 GT8 和 GT10 中各筛选到了三个 R-prime 质粒。分别命名为 R' 81、R' 82、R' 83 和 R' 101、R' 104、R' 105。通过 Southern 杂交分析表明各 R-prime 质粒上均带有 Tn5。用含有 *E. coli gltBD* 基因的质粒 pRSP21 为探针与所得 R-prime 进行 Southern 杂交,可得到杂交带,证明所筛选到的 R-prime 质粒上含有 *E. coli glt* 结构基因的同源顺序。

限制性内切酶 BamHI 和 Sall 在 Tn5 上的酶切位点位于 Tn5 的中央,用它们酶切 Tn5 不会破坏 Tn5 所携带的 Km 抗性基因。所以用 BamHI 完全酶解 R' 104,然后将酶解产物与经 BamHI 酶解的 pBR322 连接,转化 *E. coli* DH5 α ,筛选 Ap 和 Km 抗性标记就可克隆到 *glt::Tn5* 片段,此质粒命名为 pBA1043。用同样方法可克隆到用 Sall 酶解

的 *glt::Tn5* 片段,此质粒命名为 pSA1045。上述两质粒分别含有 5.2kb 和 8kb 的插入片段。通过酶切分析证实上述两个质粒中分别存在 3.1kb 和 2.6kb 的 Tn5 DNA。因此这两个质粒分别含有 2.1kb 和 5.4kb 携带有部分 *glt* 基因的 *R. sphaeroides* 染色体 DNA。

2.4 *R. sphaeroides* 基因文库的构建

为了从 *R. sphaeroides* 中分离完整的 *glt* 基因,本文构建了 *R. sphaeroides* 的基因文库。首先,抽取 *R. sphaeroides* 的总 DNA,用识别四个碱基对的限制性内切酶 *Sau3A1* 部分酶解 *R. sphaeroides* 的总 DNA。按前述方法先通过预备实验找出总 DNA 经部分酶解后 20~30kb 片段含量最多的酶切条件。实验证明每微克 *R. sphaeroides* 的总 DNA 用 0.25 单位的限制性内切酶 *Sau3A1* 酶切 1h 后 20~30kb 的片段最多。然后按此条件大量酶解总 DNA 之后,通过蔗糖密度梯度平衡超离心回收 20~30kb 片段。将此片段与经 *Bam*H1 酶切并脱磷的载体 pLAFR3 连接。将连接产物按前述方法用两种抽提物进行体外包装(所抽提包装蛋白效价为 $10^8/\mu\text{gDNA}$),然后感染 *E. coli* DH5 α ,挑取白色菌落。由此得到 1400 个重组子。随机挑选菌落抽提质粒检测,各质粒均含有插入片段,其插入片段大小范围为 17~30kb,平均为 24kb。*R. sphaeroides* 的染色体 DNA 大小约为 4000kb,插入片段大小按 24kb,则根据 $N = \ln(1-p) / \ln(1-x/y)$,其中 N 为菌落数, p 为覆盖率, x 为插入片段平均大小, y 为基因组大小可计算出此基因文库覆盖率为 99.9%。从该基因库中可筛选到 *glt* 基因。

2.5 含 *R. sphaeroides glt* 基因的阳性克隆 pLT27 的筛选

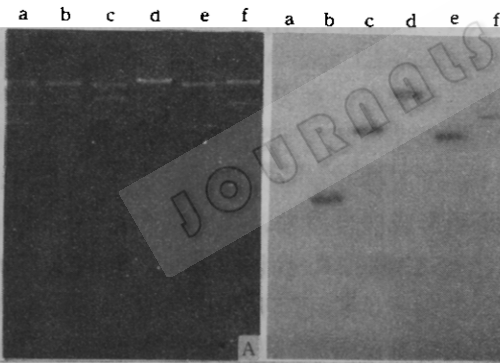


图1 以 pBA1043 为探针与 pLT27 作 Southern 杂交图

Fig.1 Southern hybridization of pLT27 with pBA1043

A. 琼脂糖凝胶电泳图 Ethidium bromide-stained gel;

B. Southern 杂交图 Autoradiograph of southern blot.

a. λ / HindIII; b. pLT27 / BamHI; c. pLT27 / BglII;

d. pLT27 / ClaI; e. pLT27 / EcoRI; f. pLT27 / HindIII.

子的表型,发现 pLT27 能互补所有突变株的 Asm^- 表型,即含有 pLT27 的 GTX 菌株能利用 NH_4^+ 为唯一氮源生长。其中接合转移子出现的频率为 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 个/每受体细胞。同时所有突变株的多效性氮代谢缺失表型以及 GOGAT 活性和固氮酶活性均能为 pLT27 所恢复。

将 pLT27 分别用限制性内切酶 *Bam*H1, *Bgl*II, *Call*, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sac*I, *Sall*,

以 pBA1043 和 pSA1045 中的插入片段为探针与所构建的 *R. sphaeroides* 基因文库作菌落原位杂交,均得到同一阳性克隆,此克隆命名为 pLT27。将 pLT27 用不同限制性内切酶酶切后转移到硝酸纤维素滤膜上,以 pBA1043 为探针进行 Southern 杂交,结果见图 1。

以 pRK2013 为辅助质粒,以 *E. coli* DH5 α / pLT27 为供体菌,分别用以 *R. sphaeroides* GOGAT $^-$ 突变株 GTX 为受体菌进行三亲本杂交,在含 Rif 和 Tc 的平板上筛选接合转移子,然后在以 NH_4^+ 为唯一氮源的 RCVB 基本培养基上鉴定接合转移

*Sma*I 和 *Xho*I 等酶切分析, 并用 *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Sac*I 和 *Sma*I 进行双酶切分析。单、双酶切所得数据表明 pLT27 大小约为 48.5kb, 因而在 pLT27 中外源插入片段大小为 26.5kb。

2.6 pLTRK271 与 pLTRK272 的构建及其物理图谱

将 pLT27 用 *Hind*III 完全酶解后产物与经 *Hind*III 完全酶解并脱磷的载体 pRK415 连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 在含 Tc 和 X-gal, IPTG 的 LB 平板上挑取白色菌落, 抽提质粒可分别得到含有 4.0kb 或 10.5kb 插入片段的重组质粒, 分别命名为 pLTRK271 与 pLTRK272。通过单双酶切方法作了 pLTRK271 与 pLTRK272 的酶切图谱, 见图 2。

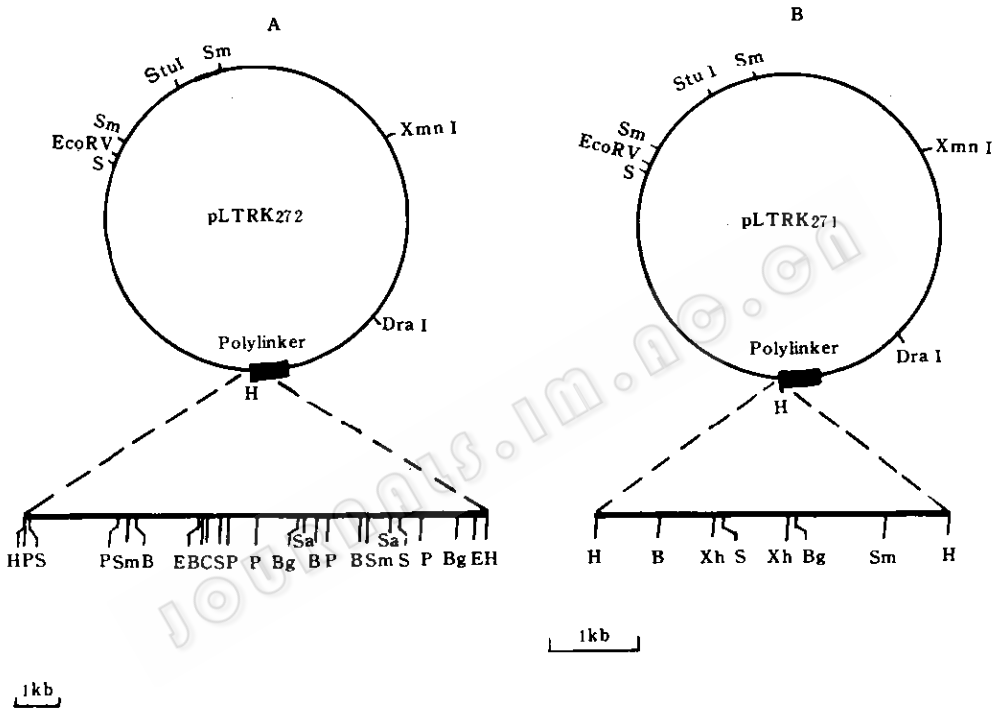


图 2 pLTRK272 与 pLTRK271 的物理图谱

Fig.2 Physical map of pLTRK272 and pLTRK271

A. pLTRK272 的物理图谱 Physical map of pLTRK272; B. pLTRK271 的物理图谱 Physical map of pLTRK271.

Abbreviations of restriction endonuclease are as follows: B, BamHI;

Bg, BglIII; C, ClaI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; Sa, SacI; S, SalI; Sm, SmaI; Xh, XhoI.

按材料与方法中所述, 通过三亲本杂交将 pLTRK271 与 pLTRK272 转移至各氨同化缺陷突变株中, 结果见表 3。

pLTRK272 可使变种 GT6、GT10 及 GT11 恢复利用 NH $_4^+$ 的能力, 但不能使其余变种恢复这种能力。而 pLTRK271 可使除 GT6、GT10 和 GT11 以外的其它变种恢复利用 NH $_4^+$ 的能力, 各突变株的 Ntr $^-$ 表型也同时恢复。经测定, 各变种的 GOGAT 与固氮酶活性也可恢复, 见表 2。各互补子的 GOGAT 活性较野生型高, 这可能是因为 pRK415 在

胞内有数个拷贝的缘故。另外,各互补子在以 NH_4^+ 为唯一氮源生长时 GOGAT 活性较以 Glu 为唯一氮源生长时高 3~4 倍,这种现象在 *Salmonella typhimurium* 及 *Bacillus subtilis* 中也存在^[5,22]。在 *B. subtilis* 中产生这种现象的原因是 Glu 抑制 *glt* 基因的转录,而在 *R. sphaeroides* 中 Glu 是否对 *glt* 基因转录有影响还有待进一步证实。

表 3 *R. sphaeroides* 氮同化缺陷型菌株互补子在不同氮源上的生长*

Table 3 Growth of complements of *R. sphaeroides* Asm^- mutants on RCVB media containing various nitrogen sources

菌株 Strains	NH_4Cl	His	Arg	Gln	Glu	菌株 Strains	NH_4Cl	His	Arg	Gln	Glu
GT4/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT4/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT5/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT5/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT6/pLTRK271	-	-	-	-	+	GT6/pLTRK272	+	+	+	+	+
GT7/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT7/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT8/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT8/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT9/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT9/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT10/pLTRK271	-	-	-	-	+	GT10/pLTRK272	+	+	+	+	+
GT11/pLTRK271	-	-	-	-	+	GT11/pLTRK272	+	+	+	+	+
GT12/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT12/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT13/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT13/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT14/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT14/pLTRK272	-	-	-	-	+
GT15/pLTRK271	+	+	+	+	+	GT15/pLTRK272	-	-	-	-	+
6001	+	+	+	+	+						

*培养基为 RCVB(Glu 浓度为 7.5mmol/L, 其它氨基酸为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。"-"为不生长;"+"为生长。

The medium was RCVB containing 7.5mmol/L Glu or 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ other amino acid as sole nitrogen source.

"-", Growth; "+", No growth.

将 pLTRK272 用各种限制性内切酶酶切后以 *E. coli gltBD* 基因为探针进行 Southern 杂交,结果见图 3。由图 3 可见,10.5kb 的 *R. sphaeroides glt* 基因克隆片段与 *E. coli* 的 *gltBD* 基因有同源性。而 pLTRK271 中的 4kb 的 *R. sphaeroides glt* 基因克隆片段与 *E. coli gltBD* 基因没有同源性,此片段是否代表一新的基因有待进一步研究。

2.7 各氮同化缺陷突变株中 Tn5 在染色体上的插入位点确定

分别抽提 *R. sphaeroides* 各氮同化缺陷突变株的总 DNA,用 HindIII、BamHI 及 HindIII-BamHI 酶切后转移至硝酸纤维素膜上,然后以 Tn5 为探针与其杂交,表明在各变种中 Tn5 均插入同一段染色体 DNA。由此可得到各突变株中 Tn5 在染色体上的插入位点,见图 4。此结果与前述互补结果相吻合。在此基础上结合前述图 3 的杂交结果大致可将 *glt* 基因定位于一段 11kb 的 EcoRI-HindIII 片段内。

3 讨论

R. sphaeroides 氮同化缺陷型菌株具有 Ntr^- 表型这种现象在肠道菌的 *glt* 基因突变

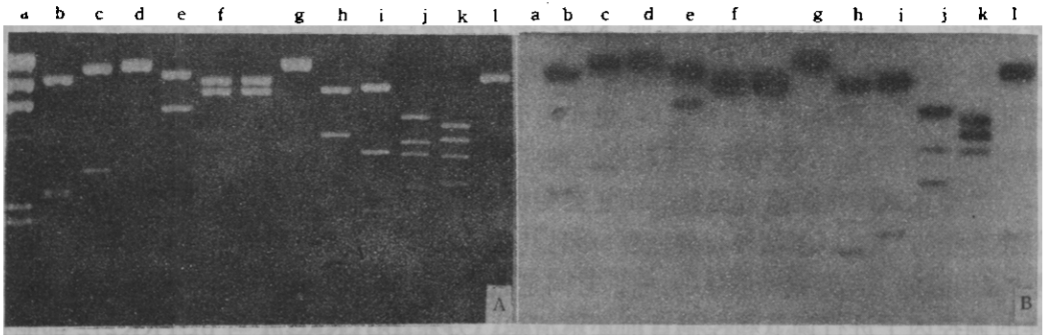


图3 以 pRSP21 为探针与 pLTRK272 的 Southern 杂交图

Fig.3 Southern hybridization of pLTRK272 with pRSP21

A. 琼脂糖凝胶电泳图 Ethidium bromide-stained gel electrophoresis of pLTRK272 digests;

B. Southern 杂交图 Autoradiograph of southern blot.

a. λ /HindIII; b. BamHI; c. BglII; d. ClaI; e. EcoRI; f. HindIII; g. KpnI; h. PstI; i. SacI; j. Sall; k. SmaI; l. XhoI.

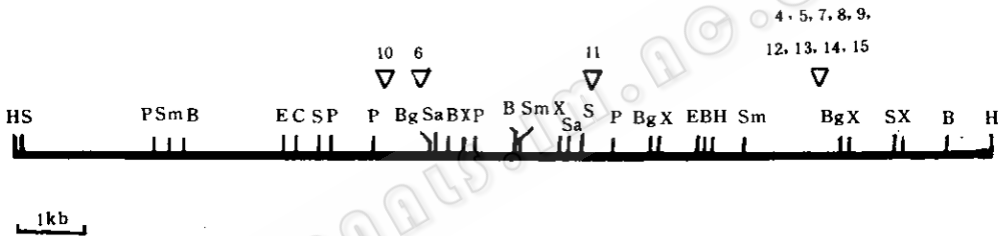


图4 Tn5 在各变种染色体上的插入位点

Fig.4 The position of Tn5 insertions in the chromosome DNA of *R. sphaeroides* 6001 Asm^- mutants

▽: Tn5 插入位点 the position of Tn5 insertion

Abbreviations of restriction endonuclease are as follows: B, BamHI; Bg, BglII; C, ClaI; E,

EcoRI; H, HindIII; P, PstI; Sa, SacI; S, Sall; Sm, SmaI; Xh, XhoI.

中也存在。在 *R. sphaeroides* 中氨同化缺陷突变株会产生这种特性的原因还不清楚,在肠道菌中这可能与 *gltBDF* 操纵子中的 *gltF* 基因有关,因为上述基因同处于一个转录单位,转录方向为 *gltB* 到 *gltD* 再到 *gltF*,由于上游基因突变所产生的极性效应,则使得 *gltF* 基因的表达受到影响,而 *gltF* 基因与 Ntr 系统的调控有关(其作为 Ntr 系统的一个正调因子而促进 Ntr 系统的表达),从而使这些氨同化缺陷突变株呈现 Ntr^- 表型。在光合细菌中,对于编码 GOGAT 的基因了解得很少,其是否存在类似于肠道菌中的 *gltBDF* 操纵子以及是否存在 *gltF* 这样的调控因子还不清楚,所以上述表型所产生的原因到目前为止还有待解释。

由前所述,在 *R. sphaeroides* 中可能因为其 Ntr 系统的表达受到影响,使得受 Ntr 系统调控的 *nifA* 等基因的合成受到抑制,使固氮酶的合成关闭,因而变种呈现 Nif^- 表型。另外也可能由于 GOGAT 失活导致胞内谷氨酰胺积累,通过某种未知的机制使已合成的固氮酶的活性丧失。至于胞内所积累的谷氨酰胺是通过何种机制起作用目前尚不清楚。前

人认为,固氮酶表达取决于培养基的 N/C 比值,当 N/C 超过一个限定值时,固氮酶活性消失^[23]。但我们以前的研究表明,N/C 比值固然与固氮酶活性表达有关,然而固氮酶去阻遏合成时 N/C 比值因碳源种类不同而相差很远^[9]。因此很可能存在依赖 Gln 的多功能效应子,它既作用于固氮系统,也作用于以氮调节为中介的组氨酸利用(*hut*)和精氨酸利用(*aut*)等基因,这个设想还有待证实。

当筛选氮同化缺陷型菌株的回复突变株或当把完整 *glt* 基因转入到突变株中时,不但突变株的 GOGAT 活性得到恢复,而且其氮代谢多效缺失表型与固氮酶活性也得到恢复,表明它们之间是紧密联系的,它们之间是通过什么样的方式进行信号传递及通过什么样的调控因子进行调节和控制目前还不清楚。另外,pLTRK271 与 pLTRK272 都能在 *R. sphaeroides* 中表达从而互补不同的变种,可能它们各自有自身的启动子。在 *E. coli* 中,虽然 *gltD* 基因与 *gltB* 基因是一同转录的,但它们都有各自的启动子。目前这一启动子的功能还不清楚,它可能在某种特殊的生理状态下起作用。在 *R. sphaeroides* 中是否存在类似大肠杆菌的基因结构还有待进一步研究。此外,在 *K. aerogenes* 中还发现了一个与氮同化有关的基因,称为 *nac* (nitrogen assimilation control) 基因^[24]。NAC 蛋白是一个类似于 LysR 的转录调控蛋白,它参与和氮代谢有关的一些依赖于 σ^{70} 因子操纵子的调控。它把这些依赖于 σ^{70} 因子的操纵子与受 Ntr 系统调控的依赖于 σ^{54} 的操纵子联系在一起。NAC 激活那些利用限量氮的操纵子(例如 *hut*)但对那些利用最适氮源的操纵子(例如 *gdh*)则起抑制作用。*nac* 基因自身则是处于 Ntr 系统的调控之下的。在 *K. aerogenes* 中,GOGAT 受到 NAC 的调控。我们曾以 *K. aerogenes* 的 *nac* 基因为探针与 *R. sphaeroides* 总 DNA 杂交,但未发现 *R. sphaeroides* 中存在有与其同源的片段,但这并不能完全排除 *R. sphaeroides* 中存在有类似调控因子的可能性。

参 考 文 献

- [1] Meers J L, Tempest D W, Brown C M. *J Gen Microbiol*, 1970, **64**: 187~194.
- [2] Castano I, Bastarrachea F, Covarrubias A A. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 821~827.
- [3] Castano I, Flores N, Valle F *et al*. *Mol Microbiol*, 1992, **6**: 2733~2741.
- [4] Bohannon D E, Rosenkrantz M S, Sonenshein A L. *J Bacteriol*, 1985, **163**: 957~964.
- [5] Bohannon D E, Sonenshein A L. *J Bacteriol*, 1989, **171**: 4718~4727.
- [6] Donald R G K, Lapointe J, Ludwig R A. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 1197~1204.
- [7] Pelanda R, Vanoni M A, Perego M *et al*. *J Biol Chem*, 1993, **268** (5): 3099~3106.
- [8] 宋鸿遇, 吴永强, 邵宝麟. 微生物学报, 1984, **24**(2): 149~155.
- [9] 吴永强, 陈秉俭, 朱美珍, 等. 植物生理学报, 1992, **18**(3): 285~292.
- [10] 吴永强, 仇哲, 宋鸿遇. 生物化学与生物物理学报, 1993, **25**(3): 325~329.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [12] Weaver P F, Wall J D, Gest H. *Arch Microbiol*, 1975, **105**: 207~216.
- [13] Pemberton J M, Bowen A R St G. *J Bacteriol*, 1981, **147**: 110~117.
- [14] Glazebrook J, Walker G C. *Meth in Enzymol*, 1991, **204**: 398~418.
- [15] Marrs B, Kaplan S, Shepherd W. *Meth in Enzymol*, 1980, **69**: 29~37.
- [16] Johansson B C, Gest H. *J Bacteriol*, 1976, **128**: 683~688.
- [17] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265~275.
- [18] 上海植物生理研究所固氮研究室. 植物学报, 1974, **16**(4): 382~384.

- [19] 陈汉才, 龙北国, 宋鸿遇. 生物工程学报, 1991, 7: 124~131.
[20] Dilella A G, Woo S L. *Meth in Enzymol.* 1987, 152: 199~212.
[21] Owen R J, Borman P. *Nucl Acids Res.* 1987, 15(8): 3631.
[22] Brenchley J E, Baker C A, Patil L G. *J Bacteriol.* 1975, 124: 182~189.
[23] Hillmer P, Gest H. *J Bacteriol.* 1977, 129: 724~731.
[24] Best E A, Bender, R A. *J Bacteriol.* 1990, 172: 7043~7048.

CLONING AND PHYSICAL MAPPING OF THE *glt* GENE IN *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Lu Tao, Wu Yongqiang, Song Hongyu

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

Abstract Twelve *Rhodobacter sphaeroides* mutants disturbed in ammonia assimilation (Asm^-) were independently isolated by employing transposon Tn5-generated mutation. Biochemical and physiological analysis revealed that these mutants had no activity of glutamate synthase (GOGAT $^-$) and showed a defective pleiotropic phenotype in nitrogen metabolism (Ntr^-) and a Nif^- phenotype in RCVBN medium. The *glt* gene locus of *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 is able to complement the *R. sphaeroides* mutants containing Tn5 insertions which produced characteristic Asm^- phenotypes. The *glt::Tn5* region of the mutants was cloned and shown to have a homological sequence with the *Escherichia coli* *gltBD* genes using Southern hybridization analysis. A cosmid named pLT27 containing *glt* gene was identified using *glt::Tn5* fragment as a probe from *R. sphaeroides* 601 genomic library constructed by using cosmid pLAFR3. pLT27 was able to complement the 12 GOGAT $^-$ mutants. After physical mapping of the 26.5kb of *R. sphaeroides* insert DNA in pLT27, the 4kb and 10.5kb HindIII fragments of pLT27 were subcloned in pRK415. The resulted plasmid pLTRK272 could complement mutants GT6, GT10 and GT11, and failed to complement other 9 mutants. But pLTRK271 only complemented the 9 mutants. The cloned 10.5kb HindIII fragment of pLTRK272 had homology with *E. coli* *gltBD* genes. Southern hybridization indicated that the specific positions of transposon insertions of the mutants GT6, GT10 and GT11 mapped within a 7kb EcoRI-HindIII fragment of pLT27, while those of other 9 mutants located at a 4kb HindIII fragment of pLT27. The physical maps of pLTRK271 and pLTRK272 were constructed. A 11kb EcoRI-HindIII fragment of *R. sphaeroides* genome DNA contains genetic information corresponding to some structural or regulatory loci for GOGAT biosynthesis.

Key words *Rhodobacter sphaeroides*, Glutamate synthase gene, Ammonia assimilation mutant, Physical map