

苜蓿中华根瘤菌 042B *nodD* 基因的克隆、 序列分析及其表达 *

杨兴洪 杨苏声

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

摘 要 苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 042B 是一株能在苜蓿和大豆上结瘤的菌株。将 042B 的 *nodD* 基因克隆到载体 pBBR1MCS-5 ,并在豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) LRR5045 系统中进行功能分析 ,发现 042B 的 NodD 蛋白能与大豆的类黄酮化合物 genistein 结合 ,也能与苜蓿的类黄酮化合物 luteolin 反应。表明 042B *nodD* 基因很可能是其能够在两类寄主植物上结瘤的寄主专一性决定因子。

将 *nodD* 基因片段分别克隆到表达载体 pThioHis A、B 和 C ,得到了 3 个重组质粒 pXDA、pXDB 和 pXDC。通过序列分析发现 ,pXDC 中的 *nodD* 基因与 pThioHis C 中的 *trxA* 基因阅读框吻合。将大肠杆菌(*E. coli*) Top10(pXDC)经 IPTG 诱导后用 SDS-PAGE 分析 ,发现融合蛋白表达成功 ,其分子量恰为 TrxA 与 NodD 之和。利用 Western 印迹法证明 *E. coli* Top10(pXDC)所表达的蛋白质是由目的基因编码的。

关键词 苜蓿中华根瘤菌 ,*nodD* 基因 ,融合蛋白

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0416-25

根瘤菌能与豆科植物结瘤固氮 ,并具有高度的寄主专一性。只有当组成型表达的正调控基因 *nodD* 与寄主植物分泌的诱导物类黄酮结合后结瘤基因才能表达^[1,2]。结瘤基因的表达产物能够合成一种称为结瘤因子的物质 ,它能诱导植物根毛发生一系列的形态和生理方面的变化 ,最终导致根瘤的形成。根瘤菌的 *nodD* 基因不但调控着结瘤基因的表达 ,而且还是寄主专一性的决定因子 ,即它能与某一特定豆科植物所分泌的特定类黄酮化合物相互作用^[2,3]。

根据过去的报道 ,*S. meliloti* 只能在苜蓿、草木樨和葫芦巴 3 个属的豆科植物上结瘤固氮^[4]。本室发现 ,*S. meliloti* 042B 能与大豆植株结瘤固氮 ,具有广谱性^[5]。本文克隆其 *nodD* 基因是为了揭示其寄主范围广的分子机制。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

本实验所采用的菌株与质粒见表 1。

1.2 *nodD* 基因的 Southern 杂交

将 042B 总 DNA 用 *Eco*RI 酶切后电泳。将 DNA 条带影印至杜邦公司的 Gene-Screen® Plus 杂交转移膜上 ,然后与 *nodD* 探针(来自 pMP261 *nodD* DNA 片段 ,如表 1

* 欧盟科研项目资助(IC18CT970191)

本文 *nodD* 基因序列在登记号为 :AF040724

收稿日期 :1998-03-20 ,修回日期 :1998-06-03

所示)和 λ DNA/*Hind* III 探针进行 Southern 杂交,以确定目标 DNA 条带的位置。

1.3 目的基因片段的筛选与阳性克隆 pYSD 质粒图谱的绘制

用 *Eco*RI 酶切 042B 总 DNA,电泳,回收 4.0~6.0kb 之间含有目标 DNA 的片段,与经过 *Eco*RI 酶切的载体 pBBR1MCS-5 连接后转化 *E. coli* DH5 α 。在含有 X-gal 和 IPTG 的 LB 20 μ g/mL Gm)平板上筛选白斑。选取 300 个白斑在硝酸纤维素膜与探针 *nodD* 作 Southern 点杂交,得到阳性克隆。将该阳性克隆所含有的质粒称 pYSD。

用限制性内切酶 *Bam*HI、*Sac*I、*Bgl*II、*Hind*III 和 *Sal*I 对 pYSD 酶切后电泳,影印至 GeneScreen® Plus 杂交转移膜上,与 *nodABC* 探针(来自 pMUS389 *nodABC* 片段,如表 1 所示)和 *nodD* 探针分别进行 Southern 杂交。根据电泳图谱和 Southern 杂交的结果绘制 pYSD 的酶切图谱。

表 1 菌株和质粒的特性与来源

Table 1 Strains and plasmids		
菌株与质粒	特性	来源
Strain and plasmid	Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> DH5 α	Host for recombinant cosmids and plasmids	This laboratory
<i>E. coli</i> S17-1	pro ⁻ λ tra ⁺	This laboratory
<i>E. coli</i> Top10	<i>recA</i> ⁻ <i>endA</i> ⁻ <i>hsd</i> RMS.	Invitrogen
<i>S. meliloti</i> 042B	Forming nodules both on soybean and alfalfa	This laboratory
<i>R. leguminosarum</i>	pSym ⁻ , carrying plasmid pMP154 which contains the promoter of	Sevilla University,
bv. <i>viciae</i>	<i>nodA</i> controlling the <i>lacZ</i> gene. Chromosomal marker, Rif ^R Plasmid	Spain
LPR5045	marker Str ^R and Cm ^R	
pBBR1MCS-5	Cloning and sequencing vector, Gm ^R	Kovach(1995) ^[6]
pBluescript SK(+)	Sequencing vector, Amp ^R	This laboratory
pThioHisA B&C	Amp ^R , <i>lacI</i> ^q containing <i>trxA</i> fusion gene	Invitrogen
pMUS389	<i>S. meliloti nodABC</i> in pUC19, Amp ^R	Hua Zhong Uni.
pMP261	<i>S. meliloti nodD1</i> in pMP92, Tc	Sevilla Uni, Spain
pYSD1	1.8kb <i>Eco</i> RI and <i>Sac</i> I fragment containing <i>S. meliloti</i> 042B <i>nodD1</i>	This study
	cloned into pBluescript SK(+) for sequencing	
pYSD2	1.5kb <i>Bgl</i> II and <i>Xho</i> I fragment containing part <i>nodD1</i> cloned into	This study
	pGEM7Z(+) for sequencing	
pYSD3	1.3kb <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI fragment containing part <i>nodD1</i> cloned	This study
	into pGEM7Z(+) for sequencing	
pYSD11	1.8kb <i>Eco</i> RI and <i>Sac</i> I fragment from pYSD1 containing <i>S. meliloti</i>	This study
	042B <i>nodD1</i> cloned into pBBR1MCS-5 functional analysis	

Amp^R:Ampicillin resistance; Gm^R:Gentamycin resistance; Rif^R:Rifamycin resistance; Str^R:Streptomycin resistance.

1.4 目的基因的亚克隆与序列分析

通过对 pYSD 质粒的物理图谱确定 042B *nodD* 在外源片段上的位置。将该片段亚克隆至测序载体 pBluescript SK(+),得到一系列测序亚克隆 pYSD1、pYSD2 和 pYSD 以供测序用。通过 BLAST 软件^[7]将目的基因的序列与非重复的基因库 GenBank + EMBL + KKBJ + PKB 进行同源性比较。

1.5 042B *nodD* 的功能测定

1.5.1 pYSD11 质粒的构建 将 pYSD1 采用 *Eco*RI 和 *Sac*I 双酶切,与经过同样酶切的载体 pBBR1-MCS-5 连接。转化 *E. coli* DH5 α 经蓝白斑筛选和酶切分析,得到含有 042B

nodD 的阳性克隆,称该重组质粒为 pYSD11DNA。用碱法提取质粒 pYSD11,转化 *E. coli* S17-1。

1.5.2 黄酮诱导的显色反应 将 *E. coli* S17-1(pYD11)与 *R. leguminosarum* bv. *viciae* LPR5045 在硝酸纤维素滤膜上进行两亲杂交,在 FY 平板(Rif,10μg/mL;Cm,5μg/mL;Gm,10μg/mL)上于 28℃ 筛选接合子。将接合子涂至含有 600μg/mL X-gal 的上述平板,分别用 10⁻⁹mol/L luteolin 和 10⁻⁹mol/L genistein 在 28℃ 条件下诱导培养 2 天后检查颜色反应。

1.6 引物设计与 PCR 扩增

利用 Oligo5 软件,在 *nodD* 起始密码子上游 300bp~334bp 之间寻找合适的引物,得到 22bp 的最佳引物 5'-TCG AGG ATA TGG ATG CCG CAC A-3'。对该引物的 5'端进行改造,以引入 *Xho* I 酶切位点,需突变掉 315 位的(T→G),316 位的(G→A),317 位的(C→G)和 312 位的(A→C)。为了让该切点酶切时容易进行,在 5'端增加了两个保护碱基 A 和 G。修饰后引物为:

*Xho*I

P1 5'-AGC TCG AGGATA TGG ATG CCG CAC A-3' (25-mer)

在另一端,选用与 pBluescript SK(+)匹配的通用引物 T3,其序列为:5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3' (20-mer)。在 100℃ 条件下,将模板 pYSD1、引物、dNTP 混合物和缓冲液变性 5min,加入 0.5μL *Taq* Plus I DNA 聚合酶(5U/μL)。于 54℃、72℃ 和 94℃ 循环 26 次。末轮循环结束时,在 72℃ 下保温 10min。

1.7 融合基因的构建与序列测定

上述 PCR 产物用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后,与经过同样酶切的载体 pThioHisA、B 和 C 连接,转化 *E. coli* Top10。然后大量筛选,以寻找包含外源片段的重组质粒。对筛选得到的阳性克隆 *E. coli* Top10(pXDC),用 Wizard® Plus SV Minipreps 试剂盒提取其质粒。用下列引物测序:5'-TTC CTC GAC GCT AAC CTG-3' (18mer)(Invitrogen Cat No. K360-01)。

1.8 融合基因表达的诱导

从 LB 平板(Amp,100μg/mL)上挑取 *E. coli* Top10(pXDC)的单菌落,接种于 10mL LB(Amp,100μg/mL)液体培养基。在 37℃ 振荡培养过夜。次日,取 200μL 过夜培养物,接种至 10mL 新鲜 LB 液体培养基(Amp,100μg/mL)。在 37℃ 振荡培养,直至光密度达到 0.5。吸取 1mL 培养物,5000r/min 离心 5min,弃上清液,将沉淀物立即置 -20℃ 保存。该样品作为未经诱导的对照。余下的培养物,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L。在 37℃ 继续振荡培养。4h 后取出培养物,离心,立即置 -20℃ 保存。该样品作为经诱导的处理。

1.9 融合基因表达的检测(SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳)

样品处理和电泳按文献 8 及 Invitrogen 产品目录所介绍的方法进行,用考马斯亮蓝 R250 染色鉴定。

1.10 融合基因表达的证实(Western 印迹)

1.10.1 蛋白转移 按文献 8 的方法进行。

1.10.2 丽春红 S 染色,标出中度蛋白分子量标准条带:将 SDS-PAGE 凝胶电泳得到的

蛋白条带转移到硝酸纤维素滤膜。将滤膜浸入含有丽春红 S 溶液中染色 5~10min。当清晰的蛋白带出现时,用铅笔标出,作为分子量标准的参照蛋白的位置。然后用蒸馏水洗掉丽春红。

1.10.3 封闭硝酸纤维素滤膜的免疫球蛋白结合位点:将滤膜转移至 TBST(20mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150mmol/L NaCl 和 0.05% Tween 20)+1% BSA(牛血清蛋白)的封闭液中,在室温下温浴 30~60min。

1.10.4 第一抗体和靶蛋白的结合及第二抗体与第一抗体的结合:按文献[8] Invitrogen 和 Promega 公司的产品目录所介绍的方法进行。

1.10.5 洗去 Tween 20,显色:用 TBS(20mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150mmol/L NaCl)缓冲液冲洗滤膜,以去掉残留在滤膜上的 Tween 20。加入 Western BlueTM,显色至合适程度,弃去 Western BlueTM,用蒸馏水冲洗,以终止显色反应。

2 结果

2.1 042B *nodD* 基因的克隆

042B 总 DNA 用 *Eco*RI 充分酶切后,将其电泳条带在 GeneScreen[®] Plus 杂交转移膜上与 *nodD* 探针和 λ DNA/*Hind*III 探针进行固相杂交,发现 5.0kb 的 DNA 条带与 *nodD* 杂交呈阳性(图 1)。

042B 总 DNA 用 *Eco*RI 大量酶切,进行电泳。回收 4.0~6.0kb 的 DNA 条带,与经过 *Eco*RI 酶切的 pBBR1MCS-51 连接,然后转化 *E. coli* DH5 α 。通过蓝白斑筛选,并与探针 *nodD* 作 Southern 点杂交。最终找到了含有 *nodD* 基因的阳性菌落 5 个,随机选出 1 个,将该重组质粒称为 pYSD。

2.2 pYSD 质粒图谱的绘制

pYSD 经 *Bam*HI、*Sac*I、*Bgl*III、*Hind*III 和 *Sal*I 酶切后的电泳条带,在 GeneScreen[®] Plus 杂交转移膜上分别与探针 *nodABC* 和探针 *nodD* 进行 Southern 杂交(图 2)。根据电泳图谱和 Southern 杂交的结果,绘制 pYSD 的酶切图谱。

2.3 *nodD* 基因的亚克隆

pYSD 的物理图谱显示,*S. meliloti nodD* 介于 *Sac*I 与 *Eco*RI 之间的 1.8kb 片段内。将该片段亚克隆至测序载体 pBluescript SK(+),得到亚克隆 pYSD1;将 *Bgl*II 与 *Xho*I 间的 1.5kb 片段亚克隆至测序载体 pGEM7Z(+),得到测序亚克隆 pYSD2;将 *Bam*HI 与 *Eco*RI 间的 1.3kb 片段亚克隆至测序载体 pGEM7Z(+),得到测序亚克隆 pYSD3。将 pYSD1、pYSD2 和 pYSD3 按图 3 箭头所指方向测序。

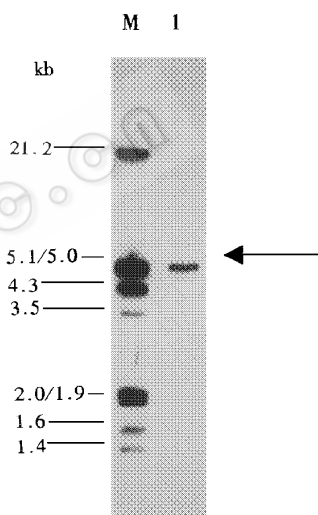


图 1 042B 总 DNA 用 *Eco*RI 充分酶切后的电泳条带与探针 *nodD* 杂交呈阳性条带的筛选

Fig.1 Screening of Southern hybridization positive band with probe *nodD* after electrophoresis of total DNA of 042B digested completely with *Eco*RI

M. 为 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III 标准分子量与 λ DNA 探针 Southern 杂交后显示出的 Southern 印迹;1. 042B 总 DNA 用 *Eco*RI 充分酶切后的电泳条带与探针 *nodD* 杂交得到阳性条带 5kb。

M. λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Southern hybridization positive band markers with *nodD* probe; 1. The 5kb fragment showed positive when the electrophoresis bands hybridized with probe *nodD*

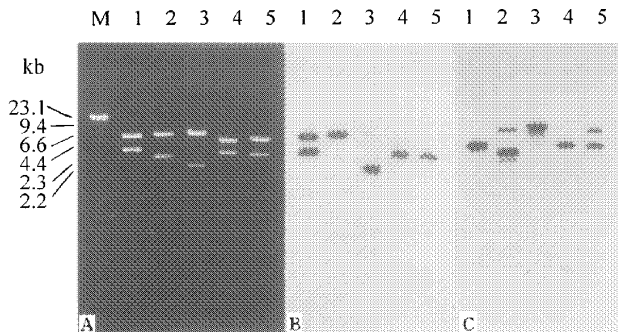


图 2 pYSD 经 (1)*Bam*HI (2)*Sac*I (3)*Bgl*II (4)*Hind*III 和 (5)*Sal*I 酶切后的电泳条带 (A) 分别与探针 *nodABC* (B) 和 *nodD* Southern 杂交 (C) 后的电泳图谱与 Southern 印迹。

Fig. 2 Southern blot and electrophoresis map of pYSD after it was digested with (1)*Bam*HI (2)*Sac*I (3)*Bgl*II , (4)*Hind*III and (5)*Sal*I (A) and Southern hybridized with both probe *nodABC* (B) and *nodD* (C)
M. λ DNA/*Hind*III markers.

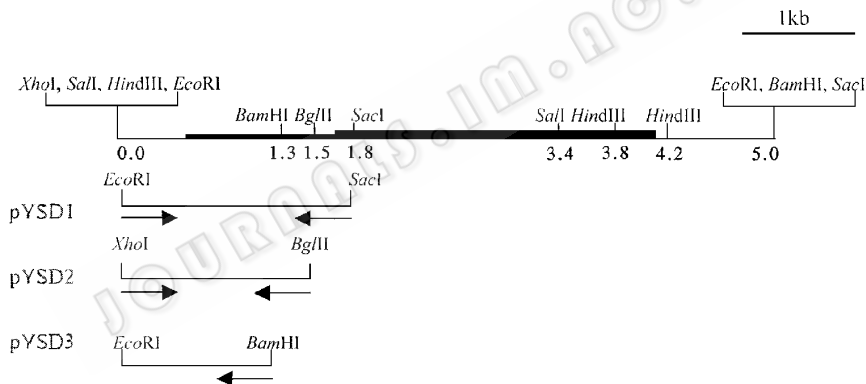


图 3 pYSD 插入片段的物理图谱及其亚克隆和测序方向

Fig. 3 Physical map and subclones of plasmid pYSD , and the sequencing direction of these subclones
最粗线为与 *nodABC* 杂交呈阳性的 DNA 区域 ; 中粗线为与 *nodD* 杂交呈阳性的 DNA 区域。

The boldest line indicates the DNA region which showed positive when Southern hybridized with probe *nodD*.

将 042B *nodD* 介于 *Sac* I 与 *Eco*RI 之间的 1.8kb 片段克隆到载体 pBBR1MCS-5 , 得到重组质粒 pYSD11。该质粒将用于检测 042B *nodD* 基因的功能。

2.4 序列分析

介于 *Sac* I 与 *Eco*RI 之间的片段由 1776bp 核苷酸组成 (图 4)。通过序列测定发现 , 从 334bp 至 1257bp 的阅读框与 *nodD* 基因相对应 , 共 924bp。 *nodD* 上游 - 54 ~ + 4 为标准的 *nod*box。通过与基因库 GenBank + EMBL + KKBj + PKB 同源性比较 , 表明 *nodD* 核苷酸与苜蓿根瘤菌、*Rhizobium* sp. NGR234、费氏中华根瘤菌 (*S. fredii*) 和豌豆根瘤菌 (*R. leguminosarum*) 等同源性分别为 99%、79%、78% 和 76%。

GAGCTCTGGTGGTCTGCACGTTCCAGCTGATTTTCCAGCATAGCTTCCACTGCACTTTTAAGGACATGTAAGAA	75
CTCCAGTGTGTTGTTTCTTCAAAGCAGCATCGAGAGTGGTGTGTACCCGGCAAGTTACACCGGGGACGCCAACCG	150
TAGCGCTGGACCGTTGGTCGAGCGCTTAGATGACGGCTCTAAATTCGGACCCATCCTGTACTTGTGAAACTTTTC	225
TCCGCGCGCACCTTGATTCCATTAACTTCAGGTTCTCTAATAGGACTCTGCAAGATTGGTAAAAATGATTGTTT	300
GGATAACGATCATCTGCGATATGGATCCCGCACATGCGTTTAGGGGCTAGATCTAAACCTCCTCGTCGCGCTC	375
M R F R G L D L N L L V A L	14
GACGCACTGATGACCGAGCGCAAGCTCACGGCCGCGCACGCCGATCAACCTCAGTCAACCGGCCATGAGCGCG	450
D A L M T E R K L T A A A R R I N L S Q P A M S A	39
GCTATCGCGCGCTGCGCACCTATTTTCGGCGACGAGCTGTTTTCGATGCAGGGCCGCGAACTATCCCGACACCG	525
A I A R L R T Y F G D E L F S M Q G R E L I P T P	64
CGTGCCGAGGCATTTGCCAGCCGTGCGCGACGCCCTTACTGCACATTAGCTTTCCGTCATTGCTTGGGATCCG	600
R A E A L A P A V R D A L L H I Q L S V I A W D P	89
ATCAACCCAGCCAGTCGGATCGCGTTTCAGGATCATCTTTTCGATTTCATGATACTTGTATTCTTTGCGAGG	675
I N P A Q S D R R F R I I L S D F M I L V F F A R	114
ATCGTGAACCGCTGGCTCGGGAGGCTCCCGCGTCAGCTTCGAGTTGCTGCCTCTCGATGATGATCCCCATGAG	750
I V E R V A R E A P G V S F E L L P L D D D P H E	139
CTTCTCCGGCGCGGGATGTTGATTTTCTGATTTTCCAGACGTGTTTCATGTCGAGCGCGCATCCCAAAGCGAAA	825
L L R R G D V D F L I F P D V F M S S A H P K A K	164
TTGTCGACGAGGCACTCGTGTGCGTCGGCTGCCCAACAAGAAGCTACTGGGGAACATCTCGTTCGAGACC	900
L F D E A L V C V G C P T N K K L L G N I S F E T	189
TATATGTCGATGGGCGATGTTGCAGCCGATTCGGACGAGAAATGAAGCCCTCCGTCGAGCAATGGCTATTGCTT	975
Y M S M G H V A A Q F G R E M K P S V E Q W L L L	214
GAGCAGGCTTCAATAGCGTATCGAGCTTGTGTGCCAGGTTTACCTTAATCCACGCGCTATTGTTCGGGTACT	1050
E H G F N R R I E L V V P G F T L I P R L L S G T	239
AACCGCATAGCAACTTTACCATTGCGTTTGGTTAAATATTTTGAACAAACGATACCACTGCGCATAGTCACATCT	1125
N R I A T L P L R L V K Y F E Q T I P L R I V T S	264
CCGCTGCCACCCCTCTTTTCACTGAAGCTATCCAGTGGCCCGCCCTTACAACACTGATCCAGGAACATTTGG	1200
P L P P L F F T E A I Q W P A L H N T D P G N I W	289
TTGCGGAGATACTGTTGCAAGAGCGTCGCGCATTTGATCCTCAGTCGGACACCTGTTAGACGTTGCCAAGAGCC	1275
L R E I L L Q E A S R I D P Q S D T C *	308
TTAACTTGCATGTTGATCAAGAACTCCTCGCTTTTCTCCGGTGTGCTTCGATTGCAACCGCCTCATCGAGCAAA	1350
TTCGTGCACATACCCGCGCTCTTGATAGCGCTTTGGGTATACTCTTGCACCTCCCGGTTTCGCGTATTGATT	1425
GCCGTAGCTTCTACTTTCTAATAGCAGCCGACCCCGTCGGAACCATGAACCTGTTAGCCAGCCGCGCTTTTCGG	1500
GTCGTGGCGCGCCCCGCGCTTCCTTCAGGCACTTTGTGTTCTCGGCATTGCTCTCAACGCAACTGAATCCATG	1575
TTACACTGTATGCATTTCGGGAGGGCCGACAGTTTCAGGCTTTTTTCGCTGAACGACGTTTCCACTTGGTGGCTAG	1650
CGCATCGACGTTGTTCCGAAGGTTGGCGGCATCGATTGCGGCGGATCGTACTCTGCACTGCCCCACCATTTCGAC	1725
AAGCTCATCGTGACGCTCGTGGTTTTTGTGGCAAGCGCTTCGCGGAATTC	1776

图 4 042B nodD 的核苷酸序列与蛋白序列

Fig.4 The nuclear acid sequences and amino acid sequences of 042B nodD gene and NodD protein
核苷酸序列从 334bp 处起始 ,至 1257bp 处结束 ,由 924bp 个核苷酸组成 ,编码 308 个氨基酸。
在起始密码子的上游有一个保守的 nodbox ,以阴影突出表示。

042B nodD gene sequence started from 334 and terminated at 1257bp ,composed of 924bp ,encoded 308aa.
Upstream of the start codon there is a well-defined nod box which was highlighted.

2.5 蛋白序列同源性比较

通过 BLAST 软件 [7] 将 042B NodD 氨基酸序列与非重复的基因库 GenBank + EM-BL + KKBj + PKB 进行同源性比较。结果表明 042B NodD 氨基酸序列与(1)*S. meliloti* 1021 NodD (2)*R. leguminosarum* bv. *viciae* 1001 NodD (3)*R. trifolii* Sym plasmid NodD (4)*S. fredii* NodD (5)*S. fredii* USDA 191 NodD (6)*R. galegae* NodD (7)*R.*
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

elkanii USDA94 NodD1 和(8)NGR234 NodD1 同源性分别为 99.9% ,77.6% ,75.3% ,73.7% ,73.7% ,80.2% ,72.1%和 69.8%。

2.6 042B NodD 蛋白的功能检测

将 *E. coli* S17-1 与 *R. leguminosarum* bv. *viciae* LPR5045 在硝酸纤维素滤膜上进行杂交,在 FY(Rif ,10μg/mL ;Cm 5μg/mL ;Gm ,10μg/mL)平板上得到的接合子为 *R. leguminosarum*(bv. *viciae* LPR5045(pMP154 ,pYSD11)。涂布 FY 平板(Rif ,10μg/mL ;Cm ,5μg/mL ;Gm ,10μg/mL ,X-gal) ,在 28℃ 培养 2d ,检查颜色反应,在含有 genistein 或 luteolin 的平板上呈蓝色反应(图版 I -A)。

2.7 融合基因构建的检测

在引物 P1 和通用引物 T3(5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3')及模板 pYD1 的 PCR 扩增反应体系中经 *Taq* plus I DNA 聚合酶的催化下经过 26 轮循环,将最终得到的 PCR 产物经电泳分析,其长度约为 1.5kb。经过简单的酶切分析,证明该片段是所需扩增的目的片段。

将上述扩增产物用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后,与同样经过 *Eco*RI 和 *Xho*I 酶切的 pThioHisA、B 或 C 连接,转化 *E. coli* Top10。经大量筛选,得到含有外源片段的重组质粒,将其分别命名为 pXDA、pXDB 和 pXDC。pXDC 经测序表明,外源片段插入后,与上游融合基因读框吻合。至此, *trxA* 和 *nodD* 基因融合成功,构建成 pXDC 重组质粒(图版 I -B)。

2.8 融合基因的表达

凝胶经考马斯亮蓝 R250 染色后,发现在 42.7kD 与 55.0kD 两条标准分子量条带之间,处理比未经诱导的对照,多出一条又宽又亮的蛋白带(图 5),大约为 47.7kD。其分子量为 33.8kD 的 NodD 蛋白与 *trxA* 编码的 12.8kD 蛋白之和。

2.9 融合基因的表达的证实(Western 杂交)

SDS-PAGE 电泳后的全细胞蛋白条带转移到硝酸纤维素膜后,经过 Western 杂交发现在 42.7kD 与 55.0kD 两条标准分子量条带之间,处理比未经诱导的对照多出一条又宽又亮的大约为 47.7kD 的蛋白带印迹(图 6)。另外,还有许多小于 47.7kD 的蛋白带印迹,可能是 NodD 蛋白降解所致。

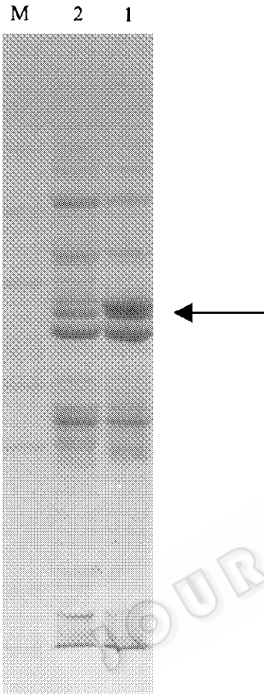


图 5 融合基因诱导表达后的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig.5 SDS-polyacrylamide gel eletrophoresis analysis after expression of fusion gene
M.中等蛋白分子量标准;1.未经 IPTG 诱导的 *E. coli* Top10 全细胞蛋白电泳图谱;2.经 IPTG 诱导后的 *E. coli* Top10 全细胞蛋白电泳图谱。
M. Mid-range protein molecular weight markers ;1. Whole cell SDS-PAGE of *E. coli* Top10 without induction ;2. Whole cell SDS-PAGE of *E. coli* Top10 induced by the IPTG.

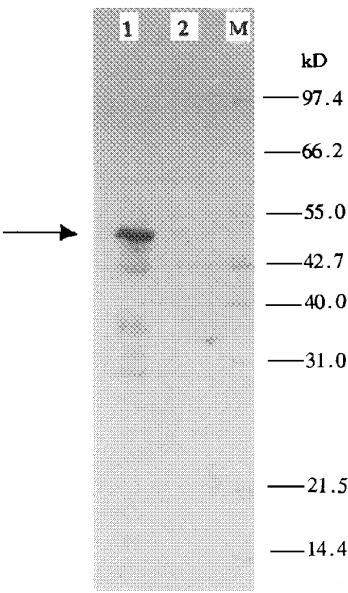


图 6 通过 Western 杂交证实融合基因诱导后的表达正确

Fig. 6 Identification of fusion protein expression by means of Western blot

1. 未经 IPTG 诱导的 *E. coli* Top10 全细胞蛋白电泳条带的 Western 杂交结果 2. 经 IPTG 诱导后的 *E. coli* Top10 全细胞蛋白电泳条带的 Western 杂交结果 ;M. 丽春红染色后 ,用铅笔标出的中等蛋白分子量标准。

1. The Western blot result of the whole cell protein electrophoresis of *E. coli* Top10 without induction 2. The Western blot result of the whole cell protein electrophoresis of *E. coli* Top10 induced by IPTG ;M. Mid-range protein molecular weight markers ,dyed by Ponceau S , and then indicated with pencil.

3 讨论

由于对类黄酮的专一性 ,*nodD* 基因作为豆科植物寄主专一性的遗传决定因子已经得到肯定^[3 9 10 11]。Genistein 是由大豆根系分泌的或贮存于种子中 ,是一种能诱导费氏中华根瘤菌(*S. fredii*)结瘤基因表达的最有效的诱导物 ,而 luteolin 则是由苜蓿根系分泌的能诱导苜蓿根瘤菌(*S. meliloi*)结瘤基因表达的最有效诱导物。两者均导致其相应 NodD 蛋白构象的改变 ,从而使根瘤菌细胞内呈本底表达的无活性状态的 NodD 被激活变成有活性的 NodD。有活性的 NodD 能与 *nod box* 结合 ,从而调控 *nodD* 基因的大量表达 ,而且激活其它 *nod* 操纵元 *nod* 基因的表达。由于 *nodD* 基因的大量表达 ,使得细胞内的 *NodD* 数量剧增 ,新合成的 *NodD* 立即与类黄酮化合物结合 ,进一步促进 *nodD* 基因的表达 ,这种调控方式是自我放大式的正调控。与此同时 ,其它 *nod* 操纵元 *nod* 基因也由于有活性 NodD 的增加而大量表达。

pMP154 是 InQ 系列的质粒 ,与 pBBR1MCS-5 属于不同质粒相容群 ,所以 pYSD11 能与 pMP154 共存于 *R. leguminosarum* bv. *viciae* LPR5045 细胞中。由于 pMP154 含有一个 *nodA* 基因的启动子 ,控制着下游 *lacZ* 基因的开关 ,所以反过来 ,可以通过检测 LPR5045 的 *lacZ* 基因的开关状态来了解启动子 *nodA box* 是否有 NodD 结合上来。本研究发现 ,*S. meliloti* 042B NodD 能分别在 genistein 和 luteolin 的诱导下结合 *nodA box* ,使下游的 *lacZ* 基因表达 ,使 X-gal 变蓝。这个现象说明 genistein 和 luteolin 均是 042B NodD

的有效诱导物。

042B 既能在大豆上结瘤,又能在苜蓿上结瘤,该菌株与这两种植物相互信号交流的第一步便是类黄酮与 NodD 蛋白的识别与结合的过程。已知这种结合呈寄主专一性^[2,3]。只有类黄酮是有效的,才能诱导 NodD 构象的改变,从而激活其它 *nod* 操纵元的表达,合成 Nod 因子,最终由 Nod 因子作用于寄主植物。在有效的 Nod 因子诱导下,植物产生一系列变化,最终形成根瘤。可见 NodD 与有效类黄酮的结合是整个结瘤过程中最基本的第一步反应。在本研究中,042B 所产生的 NodD 既能与 genistein 结合又能与 luteolin 结合表明该菌株确实存在着这样的初始反应机制。

参 考 文 献

- [1] Mulligan J T , Long S R . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1985 , **82** :6609~6613.
- [2] Spaink H P , Wijffelman C A , Pees E *et al.* 1987 , *Nature* **328** :337~340.
- [3] Horvath B , Bachem C W , Schell J *et al.* *EMBO J* , 1987 **6** :841~848.
- [4] van Rhijn P , Vanderleyden . *Microbiological Reviews* , 1995 **59** :124~142.
- [5] Gao W M , Yang S S . *Microbiology* , 1995 , **141** :1957~1962.
- [6] Kovach M E , Elzer P H , Hill D S *et al.* *Gene* , 1995 , **166** :175~176.
- [7] Altschul S F , Warren G , Webb M *et al.* *J Mol Biol* , 1990 **215** :403~10.
- [8] 萨姆布鲁克 J , 弗里奇 E F , 曼尼阿蒂斯 T . (金冬雁等译) 分子克隆实验指南. 北京 科学出版社 , 1992.
- [9] Le Strange K K , Bender G L , Djordjevic M A *et al.* *MPMI* , 1990 **3** :214~220.
- [10] Melver J , Djordjevic M A , Weinman J J *et al.* *MpMI* 1989 **2** :97~106.
- [11] Spaink H P . *J Bacteriol* , 1989 **171** :4045~4053.

CLONING , SEQUENCING AND EXPRESSION OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI* STRAIN 042B GENE *nodD*

Yang Xinghong Yang Susheng

(*Deptment of Microbiology , College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094*)

Abstract *S. meliloti* strain 042B is a *rhizobium* strain which can form nodules both on alfalfa and on soybean. In this study , *nodD* gene of 042B was cloned into pBBR1MCS-5. By functional analysis in the system of *R. leguminosarum* bv. *viciae* LPR5045(pSym⁻ , pMP154) , it was found that the NodD has responses both to luteolin and to genistein. This result showed that the 042B *nodD* gene is probably a specific nodulation determinant which determined its capability of nodulation on both alfalfa and soybean.

The *nodD* fragment was then cloned into the expressional vector pThioHis A , B and C , and three recombinant plasmids pXDA , pXDB and pXDC were constructed. The plasmid pXDC was identified to be in the same open reading frame with the *trxA* gene of pThioHis C through sequencing analysis. Inducing IPTG and analyzing with SDS-PAGE , it was found that the fusion protein expressed from *E. coli* Top10(pXDC) with the molecular weight of TrxA and NodD together. The Western bolt result demonstrated that the expression result is

the target gene *nodD* product.

Key words *Sinorhizobium meliloti* *nodD* gene Fusion protein

图 版 说 明
Explanation of plates

A. Genistein 和 luteolin 诱导 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* LPR5045(pSym⁻ ,pMP154 & pYSD11) 在 X-gal 平板上呈现的颜色反应

Genistein :用 Genistein 诱导 ;Luteolin :用 Luteolin 诱导 ;Control :不加任何诱导物。

A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* LPR5045(pSym⁻ ,pMP154 & pYSD11)induced by genistein and luteolin on FY medium containing X-gal

Genistein :induced by genistein ;Luteolin :induced by luteolin ;Control :with no inducer added.

B. pXDC 融合基因序列分析

nodD 的 PCR 扩增产物插入载体 pThioHis C 后经对外源片段进行序列分析 ,发现外源片段在限制性内切酶 *XhoI* 处与载体 pThioHis C 的 HP-thioredoxin 基因连接在一起。该位点用黑色画线标出。离 *XhoI* 位点 16bp 处为 *nodD* 的起始密码子 ATG。

B. Sequencing analysis of fusion genes from recombinant plasmid pXDC

Vector p ThioHis C is inserted by the PCR product of *nodD* gene ,and the insert was sequenced. The insert and vector were ligated at the endonuclear acid enzyme site of *XhoI* which was underlined. The start codon ATG of *nodD* is 16bp apart from the *XhoI* site.

* This work was funded by European Commission as part of the INCO-DC Programme(Contract n° IC18CT970191)

※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※ ※

优惠的价格 优质的服务
欢迎在《微生物学报》刊登广告

《微生物学报》为中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办的综合性学术刊物 ,创刊于 1953 年。主要报道我国普通微生物学 ,工业、农业、医学、兽医微生物学 ,病毒学 ,免疫学 ,以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果。为促进国内外学术交流 ,为我国的经济建设服务。本刊面向国内外从事微生物学学科及其各有关分支学科研究的科研人员、大学教师、研究生和大学生。《微生物学报》入选世界著名的权威检索系统“CA”、“BA”和“PJK”等。在《中文核心期刊要目总览》(第 2 版)中 ,本刊排生物类核心期刊第 6 名 ,并为国内多种检索系统收录。《微生物学报》影响面广 ,权威性强 ,发行量大。被评为中国科学院、中国科协和国家优秀科技期刊。

欢迎垂询 ,欢迎在《微生物学报》上刊登广告(文字版 ,黑白版 ,彩色版均可)。

电话 (010)62630422

通讯处 :100080 北京市海淀区中关村北一条 13 号《微生物学报》编辑部