

黄烷酮、NODD和nod-启动子 分子间专一性作用的证明

洪国藩 曹慧敏

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

采用亲和层析的方法纯化了NODD蛋白——根瘤菌中结瘤基因D(*nodD*)的产物。用这纯化的NODD研究黄烷酮(Naringenin, 以下简称NAR)、NODD和nod-启动子间的相互作用。当NAR浓度低于0.4mmol/L时, 实验没显示NAR对NODD和nod-启动子之间专一性结合的影响, 然而当浓度达到4.0mmol/L时, NAR能明显解离NODD和nod-启动子间的结合, 这表明NAR、NODD和nod-启动子之间的相互作用是存在的。

关键词 黄烷酮; NODD; nod-启动子; 专一性相互作用

豌豆根瘤菌中, 已知有13个结瘤基因(*nod gene*)^[1], 分别为 *nod O*、*T*、*N*、*M*、*L*、*E*、*F*、*D*、*A*、*B*、*C*、*I* 和 *J*。这些结瘤基因的表达是受结瘤基因D(*nodD*)的产物NODD蛋白、结瘤基因启动子(*nod-promoter*)和寄主植物(豌豆)根分泌物黄烷酮(NAR)三个因素协同调节的^[2]。利用凝胶阻滞技术(*retardation*), 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上检测到了NODD与*nod-promoter*的专一性结合^[3]。NAR是豌豆根分泌的信号分子, 是苯丙酸的代谢衍生物^[2]。只有*nodD*基因的表达不需要NAR这种信号分子, 其它的结瘤基因必须在NAR和NODD的存在下才表达^[4]。因而植物通过信号分子的传递控制了它的合作伙伴——根瘤菌^[2,3]。本文阐明了上述三个结瘤调节因素之间在体外存在着相互作用。

材料与方 法

(一) 试剂

α -³²P-dATP (400Ci/mmol) 购自Amersham公司; 丙烯酰胺和N, N'-甲

叉双丙烯酰胺购自Fluka公司; 琼脂糖购自Serva公司; 黄烷酮由英国John Innes研究所提供。其它试剂均为国产分析纯。

(二) NODD和nod-promoter的专一性结合

参照文献[3]。

(三) NAR解离NODD和nod-promoter专一性结合的复合物

结瘤基因(除*nodD*外)的表达需要NAR和NODD, 而NODD是通过与*nod-promoter*的专一性结合而行使其功能的。本实验研究了NAR对NODD和*nod-promoter*专一性结合的作用。

图1, 在1—4管的单独反应中, 标记487 DNA^[6](包含*nod-promoter*)量一致(含100倍于标记DNA量的pBR 322 DNA作为竞争剂), 2—4管各加纯化的NODD^[6] 8 μ l, 3管加NAR(溶于乙醇)使其终浓度为0.4mmol/L, 4管的NAR浓度为4.0mmol/L, 各管体积一致, 含乙醇量一样, 室温反应15min。样品加在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, X光片放射自显影。

本文于1992年2月20日收到。

图 2, 在1—4管的单独反应中, 含有相同量的487DNA(含100倍于标记DNA量的pBR322DNA作竞争DNA), 2—4管中纯化NODD量为1 μ l, 3号管加1 μ l的乙醇, 4号反应加1 μ l40mmol/L NAR(溶于乙醇), 反应体积各管均为10 μ l, 室温反应15min, 加样在10%非变性聚丙烯酰胺凝



图 1 NAR对NODD和nod-promoter 专一性结合的影响

Fig.1 The effect of NAR on NODD-nod-promoter specific binding
Top arrow indicated NODD-nod-promoter binding band
Low arrow indicated native fragment



图 2 NAR对NODD和nod-promoter 专一性结合的影响

Fig.2 The effect of NAR on NODD-nod-promoter specific binding
Top arrow indicated NODD-nod-promoter binding band
Low arrow indicated native fragment
胶中电泳, X光片放射自显影。

结果与讨论

(一) NAR对NODD和nod-promoter专一性结合的影响

由图 1 显示, 当NAR浓度为0.4mmol/L时(3号), 结合条带的数量和位置没有明显的变化, 然而当NAR浓度达到4.

mmol/L (4号) 时, 结合条带消失, 并且出现标记DNA条带。这说明NAR解离了NODD与nod-promoter间的专一性结合。图2显示, 当NODD含量较低(低于图1)时, 4.0mmol/L浓度的NAR强烈地解离了NODD和nod-promoter的结合(4号)。

图1、图2的结果都表明在NAR、NODD和nod-promoter之间存在着分子相互作用。

在NAR存在的情况下, 含有NODD的细胞粗抽提液能与nod-promoter形成专一性结合^[31]。

已经知道根瘤菌中结瘤基因的表达需要NAR, 但是还不清楚NAR是否进入细胞和NODD或/和nod-promoter相互作用或者它直接作为一个连接体, 结合到细胞外膜上的受体, 从而启动一个导致结瘤基因转录活化的级联反应。

本研究的结果显示NAR可能进入细胞内并和NAR或/和nod-promoter作用(图1、图2)。

NAR、NODD和nod-promoter之间分子的相互作用是高度专一的。

(二) NAR对非植物体系(如黄杆菌)中蛋白酶启动子和它的调节蛋白之间专一性结合的影响

为证明NAR、NODD和nod-promoter三者之间分子相互作用是高度专一的。实验用黄杆菌*Xanthomonas campestris*体系中蛋白酶的启动子和它的调节蛋白作为一个对照。英国John Innes研究所的Han Bin和M. Danuel已经证明这种蛋白酶基因的表达是通过一个调节蛋白而实现的。已证实这种调节蛋白能专一结合蛋白酶启动子, 用凝胶阻滞技术, 在非变性聚丙烯酰胺凝胶上能检测到这种结合(私人通讯)。

将NAR加在黄杆菌蛋白酶调节体系中(图3, 1—5管中标记DNA(蛋白酶启动子)量均为4 μ l(100cpm/ μ l), 2—5管调节蛋白量为4 μ l, 2—5管加竞争DNA poly dI/dC(0.5 μ g/ μ l)均为1 μ l, 2号加1 μ l乙醇, 3—5号加1 μ l 40mmol/L NAR(溶于乙醇), 反应体积均为10 μ l), 观察NAR

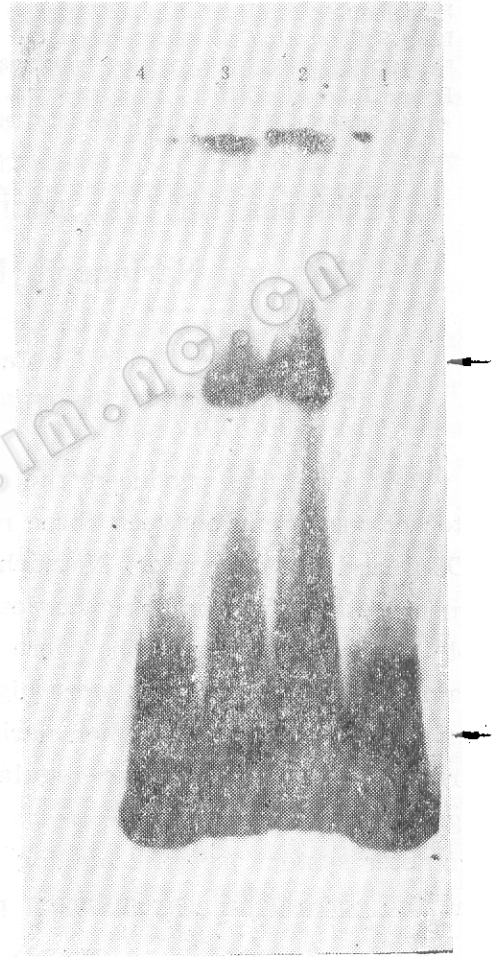


图3 NAR对黄杆菌体系中蛋白酶启动子和它的调节蛋白之间专一性作用的影响

Fig.3 Effect on the binding between the protease promoter and its regulatory protein of *Xanthomonas campestris*

Top arrow indicated binding between the protease promoter and its regulatory protein, low arrow indicated labeled DNA

对这个调节蛋白与蛋白酶启动子专一性结合的影响。在图3中可以看到2—5管的结合条带没有变化,说明浓度为4.0mmol/L的NAR对于黄杆菌的蛋白酶启动子和它的调节蛋白之间专一性结合没有影响。表

明NAR既不作用于调节蛋白,也不和蛋白酶启动子DNA结合。

综上所述, NAR对于NODD和 nod-promoter之间的作用是专一的。

参 考 文 献

- [1] Economou, A. et al.: *EMBO J.*, 9:349—354, 1990.
- [2] Long, S.R. et al.: *Cell*, 56:203—214, 1989.
- [3] Hong, G.F. et al.: *NAR*, 15:9677—9690, 1987.
- [4] Rossen, L. et al.: *EMBO J.*, 4:3369—3373, 1985.
- [5] 曹慧敏、洪国藩: 科学通报, 36:1814—1816, 1991.

Evidence for the Specific Molecular Interactions Between Naringenin, NODD and nod-promoter

Hong Guofan Cao Huimin

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

This paper has produced the evidence that the specific molecular interactions occur between three nod regulation elements: naringenin, NODD and nod-promoter. No such interactions were observed when the concentration of naringenin was less than 0.4mmol/L. However, remarkable molecular interactions were observed when naringenin was at 4.0 mmol/L. The interactions were highly specific, because no such interactions have been observed when naringenin was exposed at various concentrations to other promoter-regulatory protein system (e.g. the protease regulatory system of *Xanthomonas campestris*, though, like NODD-nod-promoter system, specific binding occurs between the protease promoter and the corresponding regulatory protein).

Key words: Naringenin; NODD; nod-promoter; specific interaction