

## 肺炎克氏杆菌 NifA 对巴西固氮螺菌 nifH 启动子的转录激活作用

阎大来 何路红 马旅雁 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** 用 PCR 方法克隆了巴西固氮螺菌 Yu62 nifH 的启动子片段, DNA 序列分析表明菌株 Yu62 与标准菌株 Sp7 之间的 DNA 序列差异很小。利用启动子探针质粒载体 pCB182, 构建了 3 个不同的 nifH::lacZ 转录融合质粒, 在大肠杆菌中分别测定肺炎克氏杆菌 NifA 对它们的转录激活作用。结果表明巴西固氮螺菌 nifH 启动子的转录是依赖于 NifA 的, 缺失了上游激活序列的启动子不能被 NifA 激活转录, 肺炎克氏杆菌 NifA 对其自身 nifH 及巴西固氮螺菌 nifH 启动子的转录激活作用并无很大差异。

**关键词** 巴西固氮螺菌, nifH 启动子, NifA, 转录融合

在固氮菌中, 铵浓度信号是通过 nifA 基因的产物控制固氮基因的表达, NifA 作为其它固氮基因表达的正调控因子, 其作用机制首先在肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 中得以阐明, 之后在其它一些固氮菌的研究中得到了证实<sup>[1]</sup>。

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 是一类可与许多禾本科作物及牧草联合共生的固氮菌<sup>[2]</sup>。在实际应用中限制其固氮效力发挥的主要因素是环境中的高浓度结合态氮, 因此构建在高浓度铵条件下仍能保持较高固氮活性的基因工程菌株就成为应用的首要前提。为了获得有效的工程菌株, 曾将克氏杆菌组成型表达的 nifA 引入固氮螺菌中<sup>[3,4]</sup>, 结果发现接合子在高铵条件下仅可表现出微弱的固氮活性, 一般为无氮条件下的 1% 左右。对这一结果的推测之一是认为克氏杆菌与固氮螺菌 NifA 结构上有差异, 使得克氏杆菌 NifA 不能有效启动固氮螺菌 nif 基因的转录。为了验证这一推测, 本文克隆了巴西固氮螺菌 (*A. brasilense*) nifH 启动子片段, 并将其在大肠杆菌中进行了测定和分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株与质粒

菌株: 大肠杆菌 CB454 ( $F^- \Delta lacZ^- lacY^+ galK\ rspL\ thi\ recA56$ )<sup>[5]</sup> 和 JM101 {supE thi  $\Delta$  (lac-proAB)  $F'$  [traD36 proAB<sup>+</sup> lac I<sup>s</sup> lacZ  $\Delta$ M15]}<sup>[6]</sup>; 固氮螺菌 Sp7<sup>[7]</sup> 和 Yu62<sup>[8]</sup>。

质粒: 启动子探针质粒 pCB182<sup>[5]</sup>, 克隆载体 pUC19<sup>[9]</sup>, nif 质粒 pSA30 (含肺炎克氏杆菌 nifHDKTYE')<sup>[10]</sup> 和 pST1021 (含肺炎克氏杆菌 nif'BAL')<sup>[11]</sup>。

#### 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 37℃ 培养。

### 1.3 DNA 的制备和 PCR 方法

细菌总 DNA 的提取按文献〔12〕进行。质粒及单链 M13 噬菌体 DNA 的提取按文献〔13〕进行。PCR 方法按 PE 公司 GENE AMP PCR 试剂盒说明书进行。由于固氮螺菌 DNA 的 (G+C)% 较高, 首次变性温度选为 97℃, 其后变性温度为 95℃。

### 1.4 核酸印迹分子杂交

探针的光生物素标记及杂交和检测均按 Clontech 公司检测盒的说明书进行。

### 1.5 缺失克隆方法

用核酸外切酶 III 进行 DNA 的缺失<sup>〔14〕</sup>按 Promega 公司缺失克隆试剂盒说明书进行。

### 1.6 DNA 序列测定及计算机分析

据双脱氧末端终止法<sup>〔15〕</sup>, 以单链 M13 噬菌体 DNA 为模板, 按 Pharmacia LKB 公司, T7DNA 聚合酶测序试剂盒说明书进行。用 Beckman 公司的 MicroGenie 序列分析软件进行序列拼接、分析等。 $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定按文献〔13〕进行。

### 1.7 酶及试剂

核酸限制酶、DNA 聚合酶 Klenow 片段购自 Promega 公司和华美公司, T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司, Taq 酶购自 PE 公司, 光生物素及检测盒购自 Clontech 公司, 缺失克隆试剂盒购自 Promega 公司, T7DNA 聚合酶测序试剂盒购自 Pharmacia LKB 公司,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 购自福瑞公司。寡聚核苷酸引物系本室用 ABI 公司 381A 型 DNA 合成仪合成。

## 2 结果和讨论

### 2.1 nifH 启动子片段的 PCR 克隆

参照 de Zamaroczy 等<sup>〔15〕</sup>发表的巴西固氮螺菌 Sp7 nifH 序列, 选择-224 至-205 区域作为 5' 端引物, 即 TCATTGCGAGAGACCCGACA (20mer), 388 至 407 区域作为 3' 端引物, 即 GCGAAACCGCCGCACACCAC (20mer), 预计 PCR 产物应为 631bp。分别以巴西固氮螺菌 Yu62 和 Sp7 总 DNA 为模板, 利用上述引物进行 PCR, 结果均扩增出 0.6kb 的 DNA 片段, 但即使在 55℃ 条件下退火, 仍有一些非特异性扩增的小片段。酶切回收 pSA30 中的 6.2kb EcoRI 片段 (含肺炎克氏杆菌 nifHDKTYE') 作为探针, 对 PCR 产物进行 Southern 杂交, 结果证明从 Yu62 和 Sp7 中均扩增出了目的片段。将巴西固氮螺菌 Yu62 PCR 扩增 0.6kb 片段进行回收后, 克隆到 pUC19 上, 构成 pFG13。

### 2.2 nifH 启动子片段的序列分析

用 EcoRI+Hind III 双酶切 pFG13, 回收 0.6kb 的插入片段, 分别克隆到 M13mp18/19 中, 对这两种克隆进行序列测定, 得到 nifH 启动子区域及 5' 端编码区共 632bp 的核苷酸序列 (见图 1)。与巴西固氮螺菌 Sp7 相应序列进行比较, 发现同源性达 97.8%, 说明巴西固氮螺菌菌株之间的 DNA 序列差异很小。在 nifH5' 端的编码区内有 3 个碱基产生变化, 其中一个改变后是同义密码子, 另两个的改变导致铁蛋白的第 119 位缬氨酸残基 (Sp7) 变为甘氨酸残基 (Yu62)。铁蛋白中第 101 位精氨酸残基推测即为 ADPR 共价修饰位点<sup>〔17〕</sup>。在起始密码子 ATG 上游的核糖体结合位点 (RBS) 及 2 个相互重叠的上游激活序列 (TGT-N<sub>10</sub>-ACA, UAS) 均未发生任何改变, 在 RpoN 依赖型启动子保守序列

(DPE)中有 1 个碱基的变化。该片段两端各 20bp 的序列与引物序列完全一致。另一克隆 pHU8 的插入片段(克隆自与 pFG13 不同次的 PCR 产物)经序列分析,与 pFG13 的结果一致。

### 2.3 利用启动子探针质粒载体 pCB182 构建 nifH::lacZ 转录融合质粒

2.3.1 根据 pSA30 的物理图谱<sup>[10]</sup>,将其用 EcoR I 酶切后用 Klenow 补平,再经 Bgl I 消化,回收约 730bp 的片段,该片段内含有肺炎克氏杆菌 nifH 编码区的 5'端及其上游的 DPE 和 2 个 UAS,见图 2-A (1)。将这一片段定向克隆到 pCB182/Sma I + Bgl I 上,构成 pHCl。

2.3.2 将 pHU8 (同 pFG13,插入片段方向相反)用 EcoR I 酶切(该 EcoR I 切点位于 pUC19 的多聚酶切位点上),经 Klenow 补平后再用 Xho I 消化,回收约 460bp 的片段,该片段内含有巴西固氮螺菌 Yu62 nifH 编码区的 5'端及其上游的 DPE 和 2 个相互重叠的 UAS,见图 2-A (2)。将这一片段定向克隆到 pCB182/Sma I + Sal I 上,构成 pHCl。

2.3.3 用核酸外切酶 III 在适宜的条件下对 pFG13 中的插入片段做缺失,得到一个克隆



图 1 巴西固氮螺菌 Yu62 与 Sp7 nifH 启动子和 5'端编码区核苷酸序列的比较

Fig. 1 Comparison between nucleotide sequences of *A. brasilense* Yu62 and Sp7 nifH promoter and 5' coding regions. RBS. Putative ribosome binding site, DPE. Putative RpoN dependent promoter. The start codon is shaded. The arginine residue in position 101, which is suspected to be the site of ADP-ribosylation, is boxed. The asterisks indicate two overlapping UASs. The arrows indicate 5' and 3' primers in PCR.

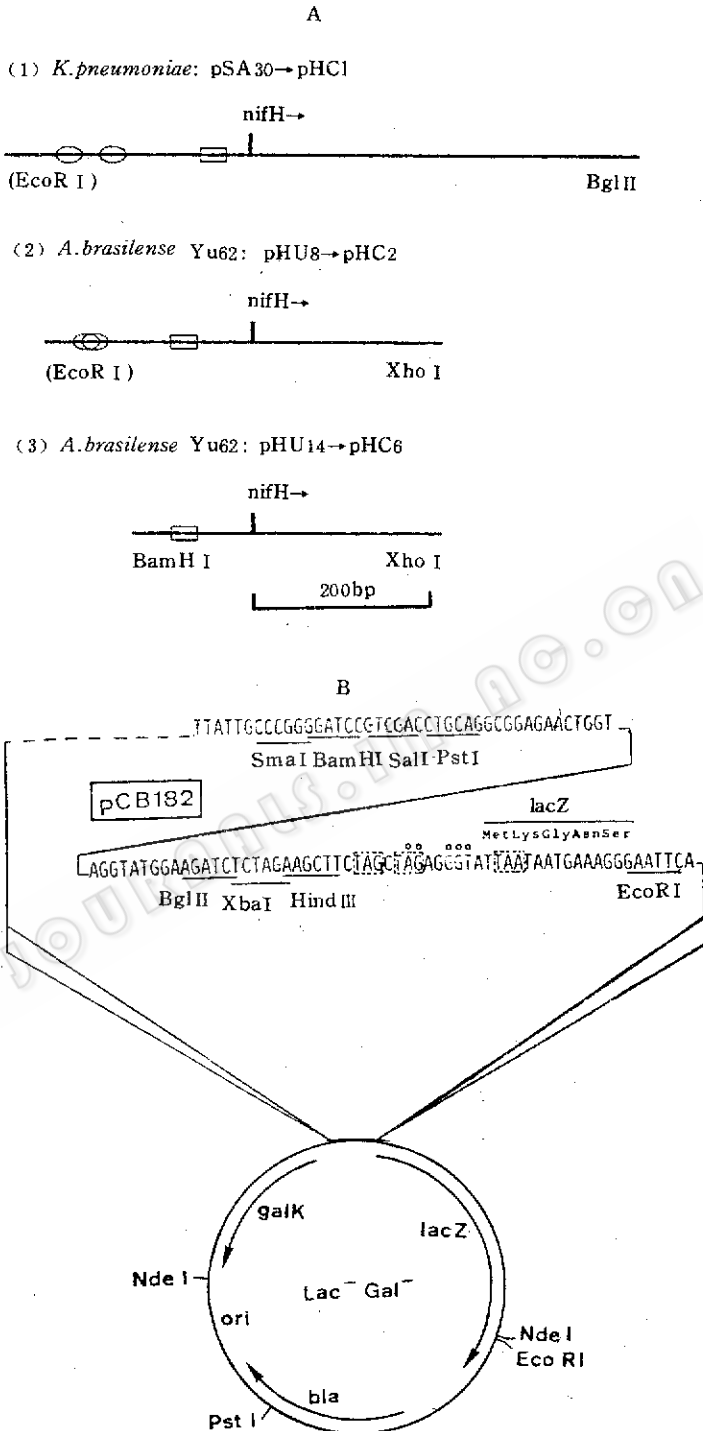


Fig. 2 Construction of three different *nifH::lacZ* transcriptional fusion plasmids.

- A. Fragments purified from different plasmids. The start codon, DPE (square), UAS (circle) and two digested ends are pointed out respectively. The sites filled with Klenow fragment are bracketed.
- B. Vector pCB182<sup>(15)</sup>.

pHU14。对 pHU14 中插入片段的部分序列测定发现,其与 pFG13 相比,缺失了 103bp (1~103bp, 见图 1),即缺失掉了巴西固氮螺菌 Yu62 nifH 启动子区域的 2 个相互重叠的 UAS,而保留了 DPE。将 pHU8 用 BamH I 和 Xho I 双酶切(其中 BamH I 切点位于 pUC19 的多聚酶切位点上),回收约 350bp 的片段,该片段内含有巴西固氮螺菌 Yu62 nifH 编码区的 5'端及其上游的 DPE,但无 UAS 见图 2-A (3)。将该片段定向克隆到 pCB182/BamH I +Sal I 上,构成 pHC6。

**2.3.4 NifA 对 nifH 启动子的转录激活作用:**将 pHC1、pHC2 和 pHC6 分别引入大肠杆菌 CB454 及 CB454 (pST1021) 中,测定各个转化子的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性(见表 2)。pST1021 含有肺炎克氏杆菌 nifA<sup>c</sup>。nifA 在四环素抗性基因启动子下组成型表达<sup>(1)</sup>。结果表明,完整的 nifH 启动子在 NifA 的激活作用下才能起始转录,即巴西固氮螺菌 nifH 启动子转录亦是依赖于 NifA 的,这一结果与 Tripathi 等<sup>(18)</sup>对产脂固氮螺菌 nifH 启动子(在大肠杆菌中)及 Vande Broek 等<sup>(19)</sup>对巴西固氮螺菌 nifH 启动子(在苜蓿根瘤菌 *Rhizobium meliloti* 中)的分析一致。肺炎克氏杆菌 NifA 对其自身 nifH 及巴西固氮螺菌 nifH 启动子的转录激活活性并无很大差异。缺失了 2 个相互重叠 UAS 的巴西固氮螺菌 nifH 启动子即使在有 NifA 条件下仍无活性,证实了该缺失区域是 NifA 的作用位点,这与 Schipani 等<sup>(20)</sup>用 nifH::cam 转录融合质粒在巴西固氮螺菌中的测定结果存在差异,后者在脱阻遏条件下对缺失了 UAS 的 nifH 启动子进行测定,发现虽然活性较完整的启动子明显下降,但仍有约 20%,推测其 NifA 对 nifH 启动子的转录激活作用存在有不同于肺炎克氏杆菌的机制。

表 1  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的测定

Table 1  $\beta$ -galactosidase activity of the nifH::lacZ transcriptional fusions in *E. coli* CB454

Plasmid	pST1021 +pHC1	pST1021 +pHC2	pST1021 +pHC6	pST1021	pHC1	pHC3	pHC6
$\beta$ -galactosidase*	172±10	143±19	<1	<1	<1	<1	<1

\*: Data are averages of three independent assays.

从序列分析结果可以看出巴西固氮螺菌 nifH 启动子具有典型的 nif 启动子特点,在大肠杆菌中的启动子活性测定进一步验证了这一点,而且肺炎克氏杆菌 NifA 完全可以激活其转录,这说明前人所推测的肺炎克氏杆菌 NifA 不能有效启动固氮螺菌 nif 基因的转录<sup>(3,4)</sup>是不准确的。

## 参 考 文 献

- (1) Merrick M J. Biological Nitrogen Fixation, In: Stacey G, Evans H J Burreis R H (eds.), Chapman and Hall, New York: London, 1992, pp. 835~876.
- (2) Pedrosa F O. CRC Crit Rev Plant Sci., 1988, 6: 345~384.
- (3) Uozumi T, Wang P L, Tonouch N *et al.* Agric Biol Chem, 1986, 50: 1539~1544.
- (4) 张耀平,李季伦.微生物学报,1991,31(5):338~345.
- (5) Schneider K & Deck C F. Gene, 1986, 42: 37~48.
- (6) Messing J. Recomb DNA Tech Bull, 1979, 2(2): 43.
- (7) Tarrant J J, Krieg N R, Dobereiner J *et al.* Can J Microbiol, 1978, 24: 967~980.
- (8) 杨洁彬,曹增良,李季伦等.北京农业大学学报,1984,10(3):321~329.

- [9] Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J *et al.* Gene, 1985, **33**: 103~119.
- [10] Riedel G E, Ausukel F M & Cannon F C. J Bacteriol, 1983, **153**: 45~56.
- [11] 朱家璧, 俞冠翹, 江益群. 中国科学 (B 辑), 1983, (8): 688~696.
- [12] Rodriguez R L & Tait R C, Recombinant DNA Techniques, An Introduction, The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1983.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Henikoff S. Gene, 1984, **28**: 351~359.
- [15] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. Proc Natl Acad Sci USA 1977, **74**: 5463~5467.
- [16] De Zamaroczy M, Delorme F, Elmerich C. Gen Genet, 1989, **220**: 88~94.
- [17] Fani R Allotta G, Bazzicalupo M *et al.* Mol Gen Genet, 1989, **220**: 81~87.
- [18] Tripathi A K, Kreutzer R, Kingmuller W. Mol Gen Genet, 1991, **227**: 86~90.
- [19] Vande Broek A, Michiels J, Defaria S M *et al.* Mol Gen Genet, 1992, **232**: 279~283.
- [20] Schipani C, Bazzicalupo M, Bussotti A *et al.* Nitrogen Fixation, In: Polsinelli, M. (eds). London, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, 1991, pp. 127~132.

## Transcriptional Activation of *Azospirillum brasilense* nifH Promoter by NifA of *Klebsiella pneumoniae*

Yan Dalai    He Luhong    Ma Lüyan    Li Jilun

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

**Abstract** In this study, nifH promoter region of *Azospirillum brasilense* Yu62 was cloned by PCR method. The nucleotide sequence displayed that the strain Yu62 was very closely related to the strain Sp7. Using promoter probe vector pCB182, three different nifH::lacZ transcriptional fusion plasmids were constructed.  $\beta$ -galactosidase activity was detected *in vivo* in *Escherichia coli*, in the presence or absence of NifA of *Klebsiella pneumoniae*, respectively. the results demonstrated that: 1. The transcription of nifH promoter of *A. brasilense* was NifA-dependent; 2. The nifH promoter with deletion of upstraem activator sequence (UAS) could not be activated even in the presence of NifA; 3. There was no obvious difference of NifA-mediated transcriptional activation of nifH promoter between *K. pneumoniae* and *A. brasilense*.

**Key words** *Azospirillum brasilense*, nifH promoter, NifA, transcriptional fusion