

## 巴西固氮螺菌 Yu62 *draTG* 基因及其 下游区域的定位诱变分析\*

马旅雁 吴 粤 王 娟 赵银锁 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** 用卡那霉素盒(Km<sup>r</sup>-cassette)插入法,对巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*) Yu 62 的 *draTG* 基因及其下游区域进行了诱变,并获得相应的突变株。研究表明:*draT* 突变株的固氮酶活性不再受铵抑制,而 *draG* 突变株在有铵时则丧失固氮酶活性,但当铵耗尽后却不能像野生型菌株那样恢复活性。*draTG* 下游区域突变株 YZ4(突变位点距 *draG* 约 2kb)在无氮及限铵条件下,其固氮酶活性比野生型菌株的高,但其 *nifH-lacZ* 转录融合子的表达并不受影响,说明该区域可能有参与固氮酶活性水平调控的基因。

**关键词** 巴西固氮螺菌, *draTG*, 突变株

**分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0281-87

固氮螺菌(*Azospirillum*)是一类与许多禾本科作物及牧草根际联合固氮的微生物<sup>[1]</sup>。已知巴西固氮螺菌(*A. brasilense*) Sp7 和深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)一样,其固氮酶的活性也受 DraT(Dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase)和 DraG(Dinitrogenase reductas activating glycohydrolase)系统的调节<sup>[2,3]</sup>。DraT 也称失活酶,当外界环境中铵浓度高时,它可使固氮酶铁蛋白亚基上的第 101 位精氨酸残基,被 ADP-核糖基团共价修饰而丧失活性<sup>[4,5]</sup>。DraG 又称为激活酶,当外界铵浓度降低时,它可将铁蛋白的 ADP-核糖基团水解下来,而又恢复固氮活性<sup>[6]</sup>。铵对固氮酶活性的这种可逆抑制,称为铵“关闭”(Switch-off)现象<sup>[7,8]</sup>。DraT 和 DraG 分别由 *draT* 和 *draG* 编码,并组成一个操纵元(operon),*draTG*。在 *A. brasilense* Sp7 中 *draTG* 的上述功能已得到证实<sup>[9,10]</sup>。*A. brasilense* Yu62 菌株是 1984 年北京郊区玉米根际分离得到的<sup>[11]</sup>,它和来自巴西的 Sp7 菌株基本相似,只在微量氧(0.5%)和无铵条件下固氮。我们已克隆了 Yu62 的 *draTG* 同源片段,并进行了序列分析<sup>[12,13]</sup>,为了确定其功能,及探索 *draTG* 基因下游是否有与 *draTG* 表达相关的基因,对 Yu62 进行了定位诱变,本文报道这些诱变分析的结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与质粒

实验用菌株和质粒见表 1。

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 863-101-03-04-02)。

收稿日期:1998-08-17,修回日期:1999-04-19。

表 1 菌株与质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains/Plasmids	Phenotype and/or genotype	Reference
Strains		
<i>E. coli</i> K-12 S17-1	Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> RP4-2(Tc <sup>r</sup> ; Mu)(Km <sup>r</sup> ; Tn7), Pro, res <sup>-</sup> mod <sup>+</sup>	[14]
<i>A. brasilense</i>		
Yu62	Ap <sup>r</sup> Nx <sup>r</sup> , wild type	[11]
YT	Ap <sup>r</sup> Nx <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , <i>draT</i> ::Km	This study
YG	Ap <sup>r</sup> Nx <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , <i>draG</i> ::Km	This study
YZ1, YZ4	Ap <sup>r</sup> Nx <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , <i>draTG</i> downstream region::Km- <i>lacZ</i>	This study
Plasmids		
pSUP202	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	[14]
pUC4K	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> gene from Tn903	[15]
pKOK5	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , <i>lacZ</i>	[16]
pAB358	Tc <sup>r</sup> , pRK290 derivative carrying a <i>nifH-lacZ</i> transcriptional fusion	[17]
pLYM106	Ap <sup>r</sup> , <i>A. brasilense</i> Yu62 <i>draTG</i> (8.0-kb <i>Sal</i> I fragment) in pUC19	[12]
pSUTG	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> , <i>A. brasilense</i> Yu62 <i>draTG</i> (3.0kb fragment) in pSUP202	This study
pSUTG-1	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , derivative plasmid of pSUTG ( <i>draT</i> ::Km)	This study
pSUTG-2	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , derivative plasmid of pSUTG ( <i>draT</i> ::Km)	This study
pLYM106-KZP1	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> , derivative plasmid of pLYM106( <i>draTG</i> downstream region::Km)	This study
pSUP-KZP1	Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> , 12kb fragment from pLYM106-KZP1 in pSUP202	This study

## 1.2 酶及试剂

核酸限制酶、DNA 聚合酶分别购自 Promega 公司和华美公司, T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 培养:** 巴西固氮螺菌用 LD 培养基<sup>[4]</sup> 30℃ 培养, 测定全细胞固氮酶活性时选用 Nf-bHp 培养基<sup>[4]</sup> 30℃ 培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 LB 培养基 37℃ 培养。对 *E. coli*, 各种抗生素的使用浓度分别为: Ap-50μg/mL, Cm-25mg/mL, Tc-12.5μg/mL, Km-50μg/mL。对 *A. brasilense*, 各种抗生素浓度分别为: AP-25μg/mL; Km-12.5μg/mL; Nx-6μg/mL。

**1.3.2 质粒的接合转移及突变株的筛选:** 按文献[18]进行。

**1.3.3 固氮酶活性的测定:** 固氮酶活性用乙炔还原法测定, 用气相色谱测定乙炔生成量。

**1.3.4 β-半乳糖苷酶活力测定:** 将各菌株接种至 K-乳酸盐无氮培养基<sup>[20]</sup> 中, 分别在微量氧(0.5% O<sub>2</sub>, 99.5% Ar)、高氧(21% O<sub>2</sub>, 79% Ar)、无铵及有铵的条件下, 培养 4h 后分别取样, 参照 Miller 的方法测定 β-半乳糖苷酶活力<sup>[19]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 *draTG* 基因及其下游区域的定位诱变

**2.1.1 *draTG* 基因定位诱变:** 从质粒 pLYM106 上回收 3.0kb *draTG* 片段, 亚克隆到 pSUP202 质粒上, 获得重组质粒 pSUTG。pSUTG 用 *Pst* I 部分酶切后与从 pUC4K 上酶切回收的 1.4kb *Pst* I Km<sup>r</sup> 基因片段连接, 得到质粒 pSUTG-1(*draT*::Km, 见图 1A)。

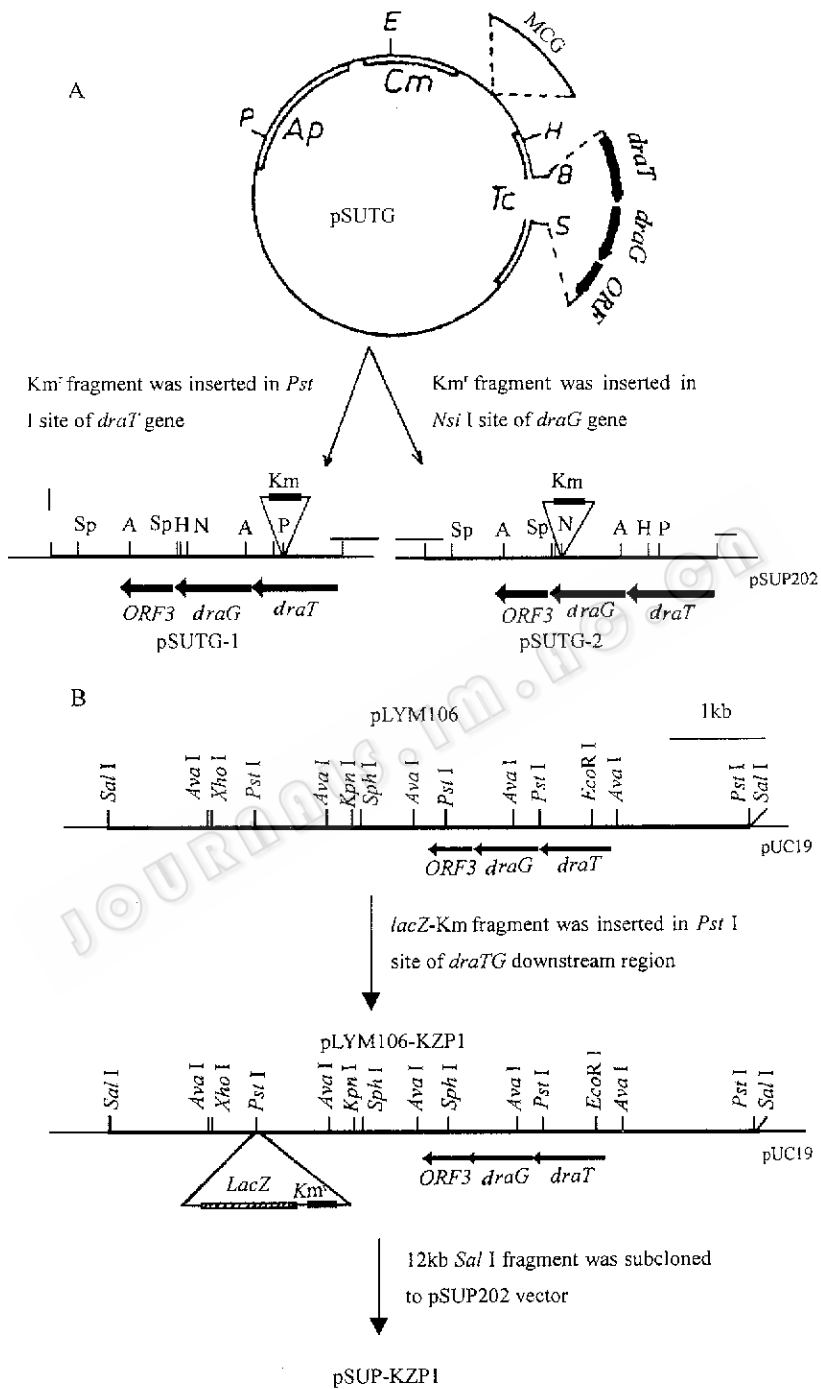


图 1 *A. brasilense* Yu62 *draTG* 基因及下游区域的定位诱变示意图

Fig.1 Site-directed mutagenesis of *draTG* genes and its downstream region in *Azospirillum brasilense* Yu 62

A. Site-directed mutagenesis of *draTG* genes;

B. Site-directed mutagenesis of the *draTG* 's downstream region

用 *Nsi* I 酶切的 pSUTG 与 1.4kb *Pst* I Km 片段连接, 得到 *draG* 基因结构区被插入诱变的质粒 pSUTG-2(图 1A)。将这 2 个质粒分别转入 *E. coli* S17-1 中, 再经接合转移法引入 *A. brasilense* Yu62, 筛选出 *draT* 和 *draG* 的突变株, 分别命名为 *A. brasilense* YT 和 *A. brasilense* YG。

**2.1.2 *draTG* 基因下游区域定位诱变:** pLYM106 的 *Pst* I 部分酶切产物与 Km-*lacZ* *Pst* I 片段(从 pKOK5 上回收)连接, 获得重组质粒 pLYM106-KZP1, 对该质粒酶切鉴定表明: Km-*lacZ* 插在 *draTG* 下游的 *Pst* I 位点(距 *draG* 约 2kb, 见图 1B)。用 *Sal* I 酶切 pLYM106-KZP1, 酶切产物经 Klenow 补平后, 与用 *Pst* I 酶切并经 T4 DNA polymerase 切平的 pSUP202 进行连接, 获得质粒 pSUP-KZP1(图 1B)。将该质粒转入 *E. coli* S17-1 中, 再经接合转移法引入 *A. brasilense* Yu62, 获得该区域插入失活的突变株 YZ1 和 YZ4。

## 2.2 突变株固氮酶活性铵关闭现象的检测

用 NfbHP-谷氨酸钠(10mmol/L)液体培养基, 分别培养野生型 Yu62 及其突变型 YT 和 YG, 16~20h 后, 在已有固氮酶活性的培养液中, 加入终浓度为 1 mmol/L 或 2 mmol/L 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 对照则加相应体积的灭菌水, 定时取 1 mL 菌液测定固氮酶活性。在野生型 Yu62 的培养液中, 只加 1 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  时, 其固氮酶活性立即被全部抑制; 继续培养 45min 后, 又恢复固氮活性, 此时培养液中的  $\text{NH}_4^+$  已基本耗尽。而加入 2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  时, 虽继续培养 80min 后, 其固氮酶活性仍不能恢复(图 2A)。在 *DraT* 突变株 YT 的培养液中, 加入 2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  后, 其固氮酶活性变化不大, 与野生型 Yu62 加水后的对照基本一致(图 2B, 2A), 说明 *draT* 的功能已被破坏, 在有铵时固氮酶不再被 *DraT* 修饰失活。在突变株 YG 的培养液中, 加入 0.5mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  后, 其固氮酶活性立即被抑制; 虽继续培养 90min, 其固氮酶活仍不能恢复(图 2B), 说明 *draG* 已被插入失活, 突变了 *DraG* 不能将已结合在固氮酶铁蛋白上的 ADP-核糖基团水解下来。

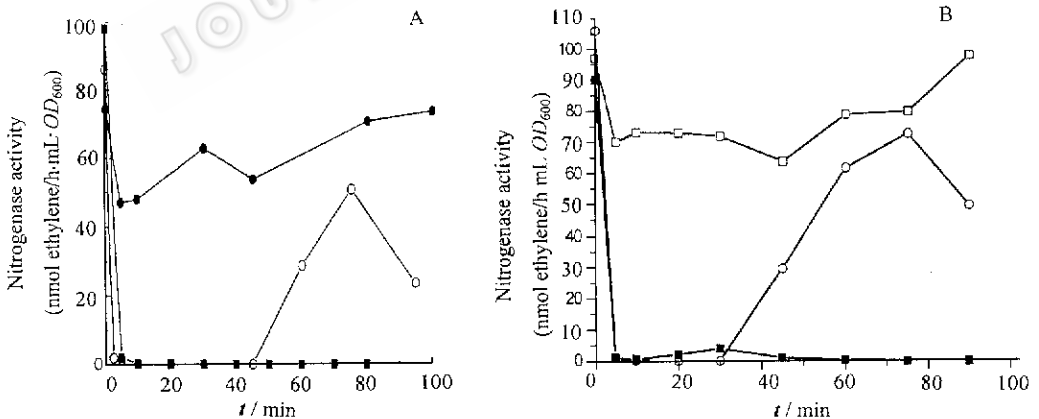


图2 *A. brasilense* Yu62 及其突变株固氮酶铵关闭现象的检测

Fig.2 Regulation of nitrogenase activity by ammonium addition in the culture of the wild type and its mutants of *A. brasilense* Yu62( $\text{NH}_4\text{Cl}$  was added in time zero)

A. Wild type; Yu62 -●- Water(control), -○- 1 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , -■- 2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$

B. Mutants; YT, YG and YZ4 -□- YT(2mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), -■- YG(0.5mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), -○- YZ4(0.5mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

*draTG* 下游区域突变株 YZ4 和野生型 Yu62 的铵关闭现象基本一致(图 2A, 2B -○-), 说明此区域的突变并未影响菌株对铵的反应。但对 *draTG* 下游区域突变株 YZ1 和 YZ4 的固氮酶活性测定表明: 在无铵及有 2mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (限铵条件)的 NfbHP 半固体培养基中, 它们的固氮酶相对活性都比野生菌株的高(表 2)。

### 2.3 转录融合子 *nifH-lacZ* 在突变株 YZ4 的表达

为了研究突变株 YZ4 在固氮酶合成水平的调控上是否发生变化, 将带有 *A. brasilense* SP7 *nifH-lacZ* 转录融合子的质粒 pAB358 分别转入突变株 YZ4 和野生型 Yu62 中, 检测这 2 个菌株在不同铵浓度条件下的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, 结果见表 3。

表 3 *nifH-lacZ* 转录融合子在 *A. brasilense* Yu62 野生型及突变株 YZ4 中的表达  
Table 3 Specific activity of  $\beta$ -galactosidase of the *nifH-lacZ* (pAB358) transcriptional genes fusion in wild type Yu62 and mutant YZ4 of *A. brasilense*

Strains/Plasmids	Specific activity of $\beta$ -galactosidase* (u/min. mg protein)			
	0.5% $\text{O}_2$		21% $\text{O}_2$	
	- $\text{NH}_4^+$	+ $\text{NH}_4^+$ (20mmol/L)	- $\text{NH}_4^+$	+ $\text{NH}_4^+$ (20mmol/L)
YZ4(Km- <i>lacZ</i> )	890 $\pm$ 7	1088 $\pm$ 68	882 $\pm$ 49	1046 $\pm$ 63
YZ4(Km- <i>lacZ</i> ) + pAB358( <i>nifH-lacZ</i> )	8896 $\pm$ 85	1021 $\pm$ 34	798 $\pm$ 15	959 $\pm$ 37
Yu62 + pAB358( <i>nifH-lacZ</i> )	9141 $\pm$ 45	167 $\pm$ 8	269 $\pm$ 46	219 $\pm$ 37

\* Data are averages of three independent assays.

从表 3 中可以看出: 突变株 YZ4 的  $\beta$ -半乳糖苷酶比活性无论在低氧、高氧、无铵和高铵的条件下都较高(约 1000 左右), 这是由于构建 YZ4 时, 插入了 Km-*lacZ* 片段。此 *lacZ* 基因是组成性表达的, 不受  $\text{O}_2$  或  $\text{NH}_4^+$  的调控。YZ4 + PAB358 中由于除 Km-*lacZ* 外还引入了 *nifH-lacZ*, 这个 *lacZ* 的表达, 可被  $\text{O}_2$  或  $\text{NH}_4^+$  调控; 只在微量  $\text{O}_2$  或无铵时才表达, 其  $\beta$ -半乳糖苷酶比活性要比突变株 YZ4 在无铵条件下的比活性高约 10 倍, 而与 Yu62 + pAB358 的比活性相似。说明突变株 YZ4 中的 *nifH* 的转录并无未影响, 也就是说这个被突变的区域内没有与固氮酶合成相关的基因; 但该区域被插入突变后, 却导致了固氮酶活性的提高(表 2), 说明此区域内可能有参与固氮酶活性水平调节的基因。我们对此区域已进行了克隆和测序, 发现其中含有一个依赖  $\sigma^{54}$  的开放阅读框架, 其功能分析尚在进行, 结果将另行报道。

在无铵或低  $\text{O}_2$ (0.5%) 条件下, YZ4 + PAB358 比 Yu62 + pAB358 的  $\beta$ -半乳糖苷酶比活性略低(应该略高, 因是 2 个 *lacZ* 表达之和); 以及在高铵(20mmol/L) 或高  $\text{O}_2$ (21%) 条

表 2 突变株 *A. brasilense* YZ1 和 YZ4 在不同铵浓度培养条件下的固氮酶活

Table 2 Nitrogenase activity of *A. brasilense* YZ1, 4 while growing in nitrogenfree medium and medium with 2mmol/L ammonium

Strains	Relative nitrogenase activity/ % *	
	- $\text{NH}_4^+$	+ $\text{NH}_4^+$ (2 mmol/L)
<i>A. brasilense</i> Yu62	100	130
<i>A. brasilense</i> YZ1	190	170
<i>A. brasilense</i> YZ4	196	214

\* The relative activity of nitrogenase was expressed as a percentage of the activity of *brasilense* Yu62 in nitrogen-free condition. (Data were taken from averages of three independent assays).

件下,其 $\beta$ -半乳糖苷酶比活性也比突变株 YZ4 的略低(应该持平)的现象,可是由于插入突变使 YZ4 合成 $\beta$ -半乳糖苷酶的效率略有降低所致。

**致 谢:**部分试验在法国巴斯德研究所 C. Elmerich 教授实验室进行了重复验证,并得到她的建议和帮助,特此深表谢意。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] F. O. Pedrosa. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1985, **6**:345~384.
- [ 2 ] A. Hartmann, Fu H.-A., R. H. Burris. *J. Bacteriol.*, 1986, **165**:864~870.
- [ 3 ] P. W. Ludden, G. P. Roberts. *Curr. Top. Cell Regul.*, 1989, **30**:23~55.
- [ 4 ] R. G. Lowery *et al.* *J. Bacteriol.*, 1986, **166**:513~518.
- [ 5 ] M. R. Pope *et al.* *Biochemistry*, 1985, **24**:2374~2380.
- [ 6 ] L. L. Saari *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**:4973~4977.
- [ 7 ] R. H. Kanemoto, P. W. Ludden. *J. Bacteriol.*, 1984, **158**:713~720.
- [ 8 ] P. W. Ludden, G. P. Roberts. *Curr Top Cell. Regul.*, 1989, **30**:23~55.
- [ 9 ] Y-P Zhang, R. H. Burris, G. Roberts. *J. Bacteriol.*, 1992, **174**:3364~3369.
- [ 10 ] J-H Liang, G. M. Nielsen, D. P. Lies *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1991, **173**:6903~6909.
- [ 11 ] 杨洁彬, 曹增良, 李季伦. 北京农业大学学报, 1984, **10**(3):321~329.
- [ 12 ] 马旅雁, 李季伦. 生物工程学报, 1997, **13**(3):227~235.
- [ 13 ] 马旅雁, 李季伦. 生物工程学报, 1997, **13**(4):343~349.
- [ 14 ] R. Simon *et al.* *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg. 1983, 98~106.
- [ 15 ] J. Vieira, J. Messing. *Gene*, 1982, **19**:259~268.
- [ 16 ] W. Kokotek, W. Lotz. *Gene*, 1989, **84**:467~471.
- [ 17 ] F. O. Pedrosa, M. G. Yate. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1985, **23**:95~101.
- [ 18 ] Y. Y. Liang, P. A. Kaminski, C. Elmerich. *Mol. Microbiol.* 1991, **5**(11):2735~2741.
- [ 19 ] J. H. Miller. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972, 352~355.
- [ 20 ] M. Galimand, B. Perroud, F. Delorme. *Gen. Microbiol.*, 1989, **135**:1047~1059.

## Site-directed Mutagenesis Analysis of *draTG* Genes and Their Downstream Region of *Azospirillum brasilense* Yu62\*

Ma Lüyan Wu Yue Wang Juan Zhao Yinsuo Li Jilun

(China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** *draT* and *draG* genes are involved in post-translational regulation of nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense* Yu62. Both genes and their downstream region were mutagenized by  $Km^r$  cassette insertions. Analysis of mutations introduced into the *dra* region on the *A. brasilense* Yu62

\* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development(No. 863-101-03-04-02).

chromosome showed that mutants affected in *draT* were incapable of regulating nitrogenase activity in response to ammonium. In contrast, a mutant with an insertion in *draG* was still capable of ADP-ribosylating dinitrogenase reductase in response to ammonium, but was no longer able to recover the activity after ammonium depletion. These results confirm that *draTG* genes are active in the regulation of nitrogenase activity of *A. brasilense* Yu62. Analysis of mutations introduced into the *draTG* downstream region (the mutagenized site is about 2kb downstream from *draG*) showed that the nitrogenase activity of the mutants were higher than that of the wild strain while growing in nitrogen-free medium and medium with 2 mmol/L ammonium. These results reveal that there isn't any gene that is necessary for transcription of *nifHDK* in the mutagenized region, but it is possible that there are some genes which play a role in regulation of the activity of nitrogenase. The results of monitoring the expression of transcriptional *nifH-lacZ* gene fusion in the mutant YZ4 showed that the transcription of *nifH* in the mutant YZ4 was the same as that in wild strain Yu62.

**Key words** *Azospirillum brasilense* Yu62, *draTG*, mutants