

评论

DNA碱基顺序测定在固氮遗传 研究中的应用

马庆生

(广西农学院分子遗传学研究室, 南宁)

生物固氮的遗传学研究是农业生物工程中的重要领域之一。它的目的在于彻底了解固氮微生物所具有的固氮能力的本质, 从而为利用生物固氮、减少人类对化学氮肥的依赖开拓途径, 在过去十多年中, 固氮遗传的研究取得了很大进展, 在以克氏杆菌为代表的自生类型和以根瘤菌为代表的共生类型固氮微生物中都已识别、定位了有关固氮的基因群(簇), 克隆了与固氮有关的基因^[1,2]。固氮基因是一些受到严格控制的基因, 当外界有可利用的氮, 或在高氧分压的情况下, 固氮基因处于抑制状态, 只有条件合适才处于活动状态, 因而固氮基因的调控研究对于利用生物固氮又具有关键作用。

研究基因调控可通过互补分析、基因融合等方法, 但这些方法对研究固氮基因的调控, 尤其是根瘤菌共生固氮基因的调控分析有一定困难, 因为一些性状的表达, 如根瘤菌固氮能力的表达需要在合适寄主植物上, 经过相当一段时间才能看出来, 一个克服的办法是直接利用DNA碱基顺序测定的方法, 对固氮基因启动子(Promoter)进行研究, 以求了解在转录水平上固氮基因受控的情况, 这方面已有了不少有价值的结果。

在肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumo-*

niae)中, 固氮基因簇由17个基因组成, 分属7—8个操纵子^[3]。其中nifL和nifA是调节基因, 同处一个操纵子中^[4]。nifL起负调控作用, 抑制其它固氮基因的表达, nifA起正调控作用, 激活其它固氮基因的活动, Merrick^[5]在研究克氏杆菌固氮基因的调控和细胞内含氮化合物代谢的调控关系后, 提出了固氮基因在二个水平上受控的假说(图1), 即固氮基因除受nifLA操纵子调节外, 还受细胞内含氮化合物代谢调控基因ntr基因的控制, 根据这个假说, 直接控制固氮基因活性的仍然是nifLA操纵子。Drummond等^[6]检查了nifLA启动子区域的DNA碱基顺序, 结果在离转录起点-10位点找不到经典的Pribnow顺序(TATAAT)^[6], 同时还发现在-35位点附近的缺失并不造成转录的终止, 这不同于典型的基因正调控的模式。

在固氮微生物中编码固氮酶结构基因的DNA碱基顺序是十分相似的^[7], 这也促使人们考虑有关的调节机制有无共同之处, Sundaresan等^[8]检查了肺炎克氏杆菌和苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)中的固氮酶结构基因nifHDK的启动子区域的DNA碱基顺序, 同样发现不具有经典的Pribnow顺序, 但这二种不同的固氮微

生物的nifHDK启动子区域的DNA碱基顺序却有着相似的排列,这种相似性启示他们进一步设计了一个利用乳糖操纵子中β-半乳糖苷酶基因作为指示的基因融合实验(nifH::lacZ,由苜蓿根瘤菌的nifH启动子与β-半乳糖苷酶基因融合),结果发现克氏杆菌中的nifA产物同样可以激活、引起苜蓿根瘤菌中固氮酶结构基因操纵子的转录,苜蓿根瘤菌中固氮基因的范围业已确定^[8],通过转座子Tn5诱变,发现有一个插入位点会影响其它的固氮基因活性,因而这个位点上的基因被认为是苜蓿根瘤菌中的nifA类似基因。

在克氏杆菌已经识别的7—8个操纵子中,只有nifLA涉及调控作用,为了寻找nifLA对其它固氮操纵子的调节机制,Beynon等^[10]检查了所有固氮操纵子的启动子区域DNA碱基顺序,结果发现在所有固氮操纵子的启动子区域有一种独特的相似顺序,即...CTGG...8bp...TTGCA...9bp...Py(+1)(图2)。

显然这种独特的相似顺序与经典的Pribnow顺序完全不同,他们认为-10位点的TTGCA相当于Pribnow顺序,是

RNA聚合酶结合的位点,而-23位点的CTGG则与正调控的激活物结合有关,拿这种相似顺序去检查已知苜蓿根瘤菌中的nifHDK启动子区域,也同样发现了类似顺序。

苜蓿根瘤菌中,除了固氮酶结构基因外,尚未准确定出其它基因,但在已知固氮基因区域通过互补分析查明可能有3—4个操纵子,Better等^[11]用S₁核酸酶作图的办法确定了二个操纵子的启动子区域,在进行这二个启动子区域DNA碱基

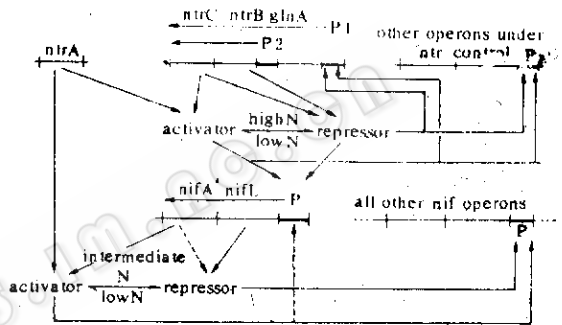


图1 克氏杆菌中固氮基因(nif)操纵子受控情况

Activator(激活物); Repressor(阻遏物)
Operons(操纵子); P(启动基因)
摘自Merrick^[5]

	-26	-10	+1
<u>nifH</u>	GACAAATAACTAACTTCATAAAAATCATAAGAATACATAAACAGCCCGCTGGTATGTTCCCTGCACCTTCTCTGTGGCAAACACTCAACA		
<u>nifE</u>	TTTGTCCGAAAGCCAAACCTCTTTTCTTTAAAAATCAAGGCTCCGCTTCTGCGCCGGAATTGCATCTTCCCGCTCATCCCCACCGTCA		
<u>nifU</u>	ACCTTGTCCAGGACTAATACACAACCATTTGAAAAATATTAATTTTATTCTCTGCTATCGCAATTGCTAGTTGTTATCGCCACGGGCTTCC		
<u>nifB</u>	CGGCTTCCCGTTAAAAAGTCTACTTTTCATCGCGTTGCGAAATTAACCTCTGCTACAGCAITTGACGAGGAAGGTATCGCCGGAACCCAGC		
<u>nifM</u>	GATGCATCGGCTGCCCGGAGCAGGAGCTGATCCCCATCAGCCAGCCGCTGGCTGCGCGGAAATTTGCAATACAGGATAGCGTCACTGCCAG		
<u>nifF</u>	CTGAAGCGATCGTTTGGGGCAGGATGCCCCGCGTACTGCAAGCAAGCTGGCACAGCCTTCGCAATACCCCTCGGAGAACCGCTATTTT		
<u>nifL</u>	GCCCTGCTTTTCCCTACCGGATCAATGTTTCTGCACATCAGCCGATAGCGCCGCAAGCTGGCACAGCCTTCGCAATACCCCTCGGAGAACCGCTATTTT		

图2 肺炎克氏杆菌中固氮基因(nif)操纵子启动子区域DNA碱基顺序的比较 (+1)代表转录起点,实线框内代表保守相似顺序,底部划线部分表示在S₁核酸酶作图时受到保护的区段 摘自Beynon^[10]

顺序确定后,也惊人地发现在相应位置有 TTGCA 的保守顺序在豌豆根瘤菌中。Rossen等^[12]通过 DNA 碱基顺序测定发现了一个类似克氏杆菌 *nifB* 的基因,在这个基因的启动子区域也同样找出了 TTGCA 的相似顺序。

编码固氮酶的结构基因有三个,即编码组分 II 铁蛋白的 *nifH*, 编码组分 I α 亚单位的 *nifD*, 和编码组分 I β 亚单位的 *nifK*, 在克氏杆菌和苜蓿根瘤菌中这三个基因同处一个操纵子中^[13,14],但在二种慢生根瘤菌中 (*R. japonicum* 和 *R. sp. Parasponia*) *nifDK* 同处一个操纵子,而 *nifH* 处于另一单独操纵子中^[15,16],由于固氮酶的二个组分对于完整的功能都是必需的,这就对基因调控上提出了一个有兴趣的问题,这二个操纵子是怎样协同表达的? Kaluza^[17]等在大豆根瘤菌中完成了 *nifH* 和 *nifD* (包括启动子区域) 的 DNA 碱基顺序分析,结果发现这二个启动子区域确实有着广泛的相似性,在 *nifDK* 的启动子区域也同样发现了 5'-CTGG-8bp-TTGCA 的相似顺序,在 *nifH* 的启动子区域则发现了稍有不同的顺序, 5'-TTGG-8bp-TTGCT。

固氮酶结构基因的位置在鱼腥藻 (*Anabaena sp. 7120*) 中又有不同特点, *nifHD* 位于同一操纵子,而 *nifK* 单独为一个操纵子,并离开 *nifHD* 有 11kb 之远^[18], Golden 等结合 DNA 碱基顺序测定发现鱼腥藻固氮基因在转录时发生基因位置的重新排列,从而使 *nifK* 与 *nifHD* 同时转录^[18],这与决定抗体分子可变部分基因

和恒定部分基因在转录时的位置重排十分相似。

自从 Nuti 等^[20]首次报道在固氮微生物中固氮酶结构基因 DNA 碱基顺序具有保守性以来,最近关于在克氏杆菌和一些根瘤菌固氮基因操纵子的启动子区域 DNA 顺序保守性的发现具有重要意义,虽然目前还不确切知道这种保守性的作用,但它表明在固氮基因调控方面,固氮微生物也可能具有某些共同特征。

根瘤菌在合适寄主上成瘤,这个过程曾广为研究以发现细菌与植物相互作用的关系,一般认为这一复杂过程必定需要为数众多的基因才能完成,在过去几年里,从豌豆、苜蓿根瘤菌中定位了结瘤基因的位置,结果发现只有少数基因参与这一过程^[21]。为了准确定位结瘤基因的数目, Downie 等^[22,23]直接用 DNA 碱基顺序测定对豌豆根瘤菌中有关结瘤功能的 DNA 片段进行全顺序分析,结果发现有三个基因,命名为 *nodA*, *nodB*, *nodC*, 与此同时在苜蓿根瘤菌中也定位了三个结瘤基因,比较它们的 DNA 碱基顺序时发现有着 70% 以上的一致性。

综上所述,应用 DNA 碱基顺序测定已经在固氮遗传研究中得到了许多有意义的结果,这些结果为揭示固氮基因,结瘤基因的本质提供了重要信息,使用这种方法,可对一些难以进行传统遗传分析的基因,直接在 DNA 分子水平进行研究,可以预计随着 DNA 碱基顺序测定的广泛应用,必将会在固氮遗传研究中获得更有价值的结果。

参 考 文 献

- [1] 马庆生, 细胞生物学杂志, 7(1):12—14, 1985.
- [2] 马庆生, 细胞生物学杂志, 7(2):54—58, 1985.
- [3] Puhler, A. and W. Klipp, Inbiology of inorganic nitrogen and sulphur, H. Boethe and A. Trebst, eds. (Berlin, Springer-Verlag) pp.276—286, 1981.
- [4] Buchanan-Wollaston, V. et al., *Nature*, 294:776—778, 1981.
- [5] Merrick, M.J., *EMBO J.*, 2:39—44, 1983.
- [6] Drummond, N. et al., *Nature*, 301:302—307, 1983.
- [7] Cannon, F.C. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 174:59—66, 1979.
- [8] Sundaresan, V. et al., *Nature*, 301(24):728—732, 1983.
- [9] Ruvkun, G.B. et al., *Cell*, 29:551—559, 1983.
- [10] Beynon, J. et al., *Cell*, 34:665—671, 1983.
- [11] Better, M. et al., *Cell*, 35:479—485, 1983.
- [12] Rossen, L. et al., *Nucleic Acid Research*, 12:7123—7134, 1984.
- [13] Kennedy, C. et al., Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In Gibson AH, Newton WE (eds) Current perspectives in nitrogen fixation, Australian Academy of Science Canberra, 146, 1981.
- [14] Corbin, D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:3005—3009, 1983.
- [15] Kaluza, K. et al., *J. Bacteriol.*, 155:915—918, 1983.
- [16] Scott, K.F. et al., *DNA*, 2:141—148, 1983.
- [17] Kaluza, K. and H. Hennecke, *Mol. Gen. Genet.*, 196:35—42.
- [18] Rice, D. et al., *J. Biol. Chem.*, 257:13157—13163, 1982.
- [19] Golden, J.W. et al., *Nature*, 314:419—423, 1985.
- [20] Nuti, M.P. et al., *Nature*, (London) 301:307—313, 282:533—535, 1977.
- [21] Downie, J.A. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 190:359—365, 1983.
- [22] Rossen, L. et al., *Nucleic Acids Research*, 12:9497—9508, 1984.
- [23] Downie, J.A. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 198:255—262, 1985.