

肺炎克氏杆菌 *nifA* 基因在巴西固氮螺菌 固氮基因表达的铵调节中的作用

何路红 阎大来 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)

固氮螺菌 (*Azospirillum*) 是一类仅在限铵和微好氧条件下固氮的微生物, 它可与许多禾本科作物联合共生^[1], 具有较大的应用潜力。铵作为固氮作用的调节信号, 在固氮螺菌的实际应用中是首要的限制因素。在固氮螺菌中, 铵不但具有与肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 相似的阻遏固氮酶合成的作用, 而且还对已合成的固氮酶进行活性调节^[2]。研究表明, 其固氮酶翻译后活性调节的机制类似于深红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)^[3], 即在有铵条件下其固氮酶铁蛋白的一个亚基被共价修饰而丧失活性, 这一过程是可逆的。由于铵在固氮螺菌中双水平地调节固氮作用, 使得在野生菌株中研究其固氮基因表达水平上的调节较为困难。

Zhang 等^[4]利用区域定位诱变技术获得了巴西固氮螺菌 Sp7 (*A. brasilense* Sp7) 的 *draT*⁻ 突变株, 在该突变株中铵不再影响固氮酶的活性, 这为其固氮基因表达调节的研究提供了一个良好的材料。本文将组成型表达的肺炎克氏杆菌 *nifA* 基因引入该突变株中, 通过分析讨论铵对巴西固氮螺菌固氮基因表达的调节作用方式。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养方法

巴西固氮螺菌 Sp7 (Ap^rNx^r, 野生型) 和 UB3 (Ap^rNx^rKm^r, *draT*⁻^[4]) 在 LB 培养基中 30°C 培养, 固氮酶活性测定选用 NfbHp 培养基^[5] 30°C 培养; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 5K (pCK3) (Tc^r, 30°C 培养时有 Km^r, 含有肺炎克氏杆菌 *nifA*^[6]) 和 5K (pRK2013) (Km^r, 帮助质粒) 在 LB 培养基中 37°C 培养。抗生素使用浓度分别为: Ap-50μg/ml、Nx-4μg/ml、Km-20μg/ml、Tc-10μg/ml。抗性测定分别在 LB 和半固体 NfbHp 培养基中 30°C 或 37°C 检测。

1.2 质粒的接合转移

按文献 [5] 进行。

1.3 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 公司生物素标记 DNA 检测盒说明书进行。

1.4 固氮酶活性的测定

固氮酶活性用乙炔还原法测定, 用气相色谱测定乙烯生成量。

2 结 果

2.1 pCK3 向巴西固氮螺菌中的转移

按三亲交配法将 pCK3 转入巴西固氮螺菌 UB3 菌株, 在含 Ap、Nx、Km 和 Tc 的培养基上进行筛

863 计划资助项目。

本文在 1993 年“第六届国际非豆科固氮会议”上报告。

本文于 1994 年 4 月 14 日收到。

选, 得到大量接合子。经在选择培养基上多次传代后, 选取其中若干接合子进行质粒的电泳分析, 发现接合子中全部含有与 pCK3 大小一致的质粒。进一步以肺炎克氏杆菌 *nif'*BAL' 片段 (从质粒 pGR397⁽²⁾ 中回收得到) 作为探针, 进行 Southern 杂交分析, 在质粒条带处均呈阳性。以上结果表明, pCK3 已转入 UB3 并可在其中稳定存在。

2.2 接合子的固氮酶活性测定

在不同铵浓度的培养条件下, 分别测定接合子与出发菌株 UB3 的固氮酶活性, 以 UB3 在无氮条件下的固氮酶活性为 100%, 结果见表 1。由于 UB3 菌株是 *draT*⁻, 其固氮酶活性完全不受铵浓度的影响⁽⁴⁾, 即使在其活性培养物中加入 20mmol/L 的铵, 仍不对其固氮酶活性产生任何影响 (本室未发表的数据)。由此可以确定表 1 中的固氮酶活性数据即可代表相应的固氮基因表达的强弱。可见, 5mmol/L 的铵即可完全阻遏 UB3 的固氮酶合成; 而对于接合子, 在 5mmol/L 铵的条件下, 固氮基因的表达受到部分阻遏, 表达强度随着铵浓度的增高而减弱, 在 20mmol/L 铵的条件下仅有极微量的表现。

表 1 不同铵浓度培养条件下的固氮酶活性

菌株	相应特性	固氮酶活/% (NH ₄ Cl 浓度/mmol · L ⁻¹)		
		0	5	20
<i>A. brasilense</i> UB3	<i>draT</i> ⁻ , Ap ^r Nx ^r Km ^r	100	0	0
<i>A. brasilense</i> UB3 (pCK3)	<i>draT</i> ⁻ , Ap ^r N ₂ Km ^r Tc ^r <i>K. pneumoniae nifA</i> ^c	100	15	0.5~2

我们曾测定过肺炎克氏杆菌 *NifA* 对巴西固氮螺菌固氮基因的转录激活作用⁽⁵⁾, 结果表明前者可以有效地启动后者的转录表达。结合这一结论及表 1 的结果, 又由于 pCK3 中的 *nifA* 是在抗卡那霉素基因启动子下组成型表达的, 间接说明接合子在高铵条件下固氮基因仅微弱表达的原因, 是由于铵抑制了 *NifA* 的转录激活活性。为了进一步验证这一结论, 我们利用 pCK3 自身的特点, 又进行了卡那霉素抗性的测定。

2.3 卡那霉素抗性的测定

在 pCK3 中, 肺炎克氏杆菌 *nif'*BAL' 插入抗卡那霉素基因的启动子下游, *nifA* 依赖抗卡那霉素基因启动子组成型转录, 而抗卡那霉素基因本身则依赖于 *nifB* 启动子。有活性的 *NifA* 激活 *nifB* 启动子引导下的抗卡那霉素基因的转录, 使得含有 pCK3 的大肠杆菌在 30℃ 条件下具有卡那霉素抗性。由于肺炎克氏杆菌 *NifA* 是温度敏感的, 37℃ 时 *NifA* 失活, 此时大肠杆菌 (pCK3) 不能在含卡那霉素的培养基上生长。pCK3 的这种抗卡那霉素温度敏感的特点, 经检测在巴西固氮螺菌中同样存在 (见表 2), 说明可以利用这一特点, 通过测定卡那霉素抗性, 了解不同条件下 *NifA* 的活性情况。

表 2 卡那霉素抗性的测定

菌株	温度/℃	NfbHp	培养基	
			NfbHp + 20mmol · L ⁻¹ NH ₄ Cl	LB
<i>E. coli</i> (pCK3)	30	ND	ND	+
	37	ND	ND	-
<i>A. brasilense</i> Sp7	30	-	-	-
	37	-	-	-
<i>A. brasilense</i> Sp7 (pCK3)	30	+	-	-
	37	-	-	-

ND: 不能确定; +: 生长; -: 不生长。

由于 UB3 本身具有卡那霉素抗性,无法进行卡那霉素抗性的检测,我们就将 pCK3 引入野生菌株 Sp7,在含有卡那霉素的培养基中分别测定 Sp7 和 Sp7 (pCK3) 的生长情况(见表 2)。在无氮条件下,Sp7 (pCK3) 具有卡那霉素抗性;温度变化(30℃→37℃)和氮源的变化(无氮→高铵)均导致卡那霉素抗性的丧失;而作为对照,原始菌株 Sp7 则在任何条件下均不具备卡那霉素抗性。这些现象充分说明了在高铵条件下 NifA 是失活的,不能激活固氮基因的转录表达的。

3 讨 论

Liang 等^[9]曾构建了巴西固氮螺菌 *nifA::lacZ* 及 *nifH::lacZ* 的转录融合质粒,并分别测定了其在不同条件下的 β-半乳糖苷酶活性。结果发现 *nifA* 的转录活性在无氮条件下最高,在 20mmol/L 铵条件下仅有部分抑制作用,说明其 *nifA* 是组成型表达;而 *nifH* 的转录在 20mmol/L 铵条件下则几乎完全被抑制。这一结果间接说明了,铵是通过控制 NifA 的活性来调节巴西固氮螺菌固氮基因的表达的。

本文通过对 UB3 (pCK3) 的固氮酶活性测定,以及 Sp7 (pCK3) 的卡那霉素抗性测定,说明了在巴西固氮螺菌中,肺炎克氏杆菌 NifA 在高铵条件下丧失活性,从而不能激活固氮基因的转录表达。

在肺炎克氏杆菌中,铵信号通过 NifL 抑制 NifA 的活性^[10],NifL 和 NifA 基本上是等量合成的^[11],免疫化学分析表明 NifL 与 NifA 可形成复合物^[12],推测 NifL 是等量作用于 NifA 来使之丧失活性的。当向该菌中引入组成型表达的 *nifA* 时,在高铵条件下超量的 NifA 仍具有转录激活活性^[13]。很显然,巴西固氮螺菌则不同,迄今为止,未在巴西固氮螺菌中发现 *nifL* 的同源基因。通过前面的测定和分析,又因为肺炎克氏杆菌 *nifA* 转录表达后的产物是有活性的(这已在 *nifA* 的体外转录翻译体系中得到证实^[14]),我们推测在巴西固氮螺菌中存在一种负调节因子,铵通过这一因子控制 NifA 的活性。这种负调节因子在肺炎克氏杆菌中是不存在的。寻找和研究这一因子,将是构建固氮基因脱铵阻遏的巴西固氮螺菌工程菌株的关键。

参 考 文 献

- [1] Pedrosa F O, CRC Crit. Rev Plant Sci, 1988, 6: 345~384.
- [2] Hartmann A, Fu H A, Burris R H. *et al.* J Bacteriol, 1986, 165: 864~870.
- [3] Roberts G P, Ludden P W. Biological Nitrogen Fixation, Stacey G *et al.* (eds), Chapman and Hall, New York, London, 1992, pp. 135~165.
- [4] Zhang Y P, Burris R H, Roberts G P. J Bacteriol, 1992, 174: 3364~3369.
- [5] Pedrosa F O, Yates M G, FEMS Microbiol Lett, 1985, 23: 95~101.
- [6] Eneedy C, Drummond M H. J Gen Microbiol, 1985, 131: 1787~1795.
- [7] Riedel G E, Brown S N, Ausubet F M. J Bacteriol, 1983, 153: 45~56.
- [8] 闻大米,何路红,李季伦.生物工程学报,1995,11(3):205~210.
- [9] Liang Y Y, Arsene F, Elmerich C. Mol Microbiol, 1991, 5: 2735~2744.
- [10] Merrick M J, Hill S, Hennecke H. *et al.* Mol Gen Genet, 1982, 185: 75~81.
- [11] Govantes F, Santero E. 9th International Congress on Nitrogen Fixation; Program and Abstracts, 1992, ESX 443.
- [12] Henderson N, Austin A S, Dixon R A. Mol Gen Genet, 1989, 216: 484~491.
- [13] Uozumi T, Wang P L, Tonouchi N. *et al.* Agric Biol Chem, 1986, 50: 1539~1544.
- [14] Santero E, Takahashi T, Spudich J L, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 7746~7750.

Effect of *Klebsiella pneumoniae* nifA on the Regulation of nif Gene Expression by Ammonia in *Azospirillum brasilense*

He Luhong Yan Dalai Li Jilun

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

Abstract Plasmid pCK3, which carried a constitutive nifA gene of *Klebsiella pneumoniae*, was transferred into a dra T⁻ mutant strain of *Azospirillum brasilense*. It was found that pCK3 could not derepress nif gene expression of *A. brasilense* under high concentration of ammonia. Combined with the result of the phenotypes of the kanamycin resistant gene from pCK3 in *A. brasilense* under different incubated conditions, it demonstrated that NifA activity was inhibited by ammonia. We suppose that there is a negative regulator in *A. brasilense*, although not existing in *K. pneumoniae*, which has effect on NifA activity by ammonia.

Key words *Azospirillum brasilense*, NifA, nif gene expression