

异源 $nifA^C$ 对根癌土壤杆菌 nif 基因表达的调节作用

张金玲 张静娟*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 用三亲交配方法分别将载有褐球固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)呈组成型表达的 $nifA^C$ 的质粒 pCK5 和肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)含有 $nifA^C$ 和 $nifA-ntrC$ 基因的质粒 pCK3, pSZ36 和 pSZ23-CA 导入根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) C58/pGV3850, 所得转移接合子的生长速率和野生型相似。在 10mmol/L NH_4^+ 浓度下, Western blotting 测出 *A. tumefaciens* C58/pGV3850(pCK5)有固氮酶合成, 乙炔还原法测定固氮酶活性恢复分别为 73%, 24%, 11% 和 62%。这些结果表明, 褐球固氮菌和肺炎克氏杆菌的固氮调节基因对土壤杆菌固氮基因表达有调节作用。其中, 褐球固氮菌 $nifA^C$ 的调节功能最强(73%), 其次是肺炎克氏杆菌 $nifA$ 和 $ntrC$ 的融合子(62%), 肺炎克氏杆菌 $nifA^C$ 的调节功能较弱(24%, 11%)。

关键词 nif 基因表达, 异源 $nifA^C$ 调节, 耐 NH_4^+ 的转移接合子, 根癌土壤杆菌

根癌土壤杆菌是生活在许多植物根际周围的土著微生物, 与根瘤菌同属于根瘤菌科(Rhizobiaceae)。它在《伯杰细菌鉴定手册》中被认为不能固定空气中的氮而列入土壤杆菌属。1990 年以后, 英国 Sastry^[1] 实验室和我们实验室^[2,3] 相继测到了根癌土壤杆菌的自生固氮活力, 并用 Western 免疫印迹和 Southern 印迹技术分别测到了类似肺炎克氏杆菌的固氮酶铁蛋白和相应的结构基因 $nifHDK$ ^[2], 以及调节基因 $nifA$ (未发表资料)。该菌与其它固氮微生物一样, 固氮基因也受 NH_4^+ 和氧的阻遏^[3]。固氮调节作用的研究指出, $nifA$ 基因产物 NifA 引起 NH_4^+ 存在下固氮酶合成的去阻遏作用^[4], 对同一受体引入不同来源 $nifA^C$ 和不同启动子的载体质粒, 其 $nifA$ 的调节效应可能不一样^[5]。在不同微生物中, $nifA$ 转录的调节方式亦有不同^[6,7], 在肺炎克氏杆菌和固氮根瘤菌(*Azorhizobium caulinodans*)中, 固氮酶结构基因启动子受 $nifA$ 和 $ntrC$ 串联激活。在 NH_4^+ 浓度低时, $ntrB$ 的激酶使 $NtrC$ 磷酸活化成为 $NtrC-P$, $NtrC-P$ 激活 $nifLA$ 的转录, 在 NH_4^+ 过量时, $ntrB$ 的磷酸酯酶使 $NtrC-P$ 去磷酸化, 不能激活 $nifLA$, 慢生大豆根瘤菌(*R. japonicum*) $nifA$ 的表达则不受 $ntrC$ 系统控制。本文报道的是固氮的根癌土壤杆菌 C58/pGV3850 的 nif 调节, 考查和比较褐球固氮菌 $nifA^C$ 和肺炎克氏杆菌 $nifA^C$ 及 $nifA-ntrC$ 对 C58/pGV3850 nif 基因的去 NH_4^+ 阻遏效应。

国家自然科学基金(39270024)资助项目。

* 通讯联系人。

本文于 1996 年元月 4 日收到。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株与质粒(见表 1)

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids

Strains/plasmids	Relevant characters	Source
<i>A. tumefaciens</i> C58/pGV3850	Ap ^r Rif ^r	Van Montagu
pCK3	Km ^r <i>K. pneumoniae</i> nifA	Kennedy ^[8]
pCK5	Km ^r , <i>A. chroococcum</i> nifA	Li J D
pSZ36	Cm ^r , Km ^r , <i>K. pneumoniae</i> 'Tn5::nifA'	Jiang Q Y ^[9]
pRK2013	Km ^r , tra, helper plasmid	Figurski ^[10]
pSZ23-CA	Cm ^r , <i>K. pneumoniae</i> 'ntrC-nifA'	You C B

1.2 菌株生长条件

根癌土壤杆菌 C58/pGV3850 在含利福平(100 μ g/ μ l)的改良克氏杆菌无氮培养基^[11]中(液体培养基含 0.1% 酵母粉, 固体培养基不含)30 $^{\circ}$ C 培养, 含质粒 pCK5, pCK3, pSZ36, pSZ23-CA 的大肠杆菌在含卡那霉素(50 μ g/ μ l)的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养。

1.3 接合转移

外源 nifA 基因对 *A. tumefaciens* C58/pGV3850 的导入按文献[12]的三亲交配方法进行。

1.4 *K. pneumoniae* nifA-ntrC 片段 DNA 转化

转化 *E. coli* HB101 按文献[13]所述方法进行。

1.5 质粒提取

大肠杆菌小质粒和根癌土壤杆菌 C58/pGV3850 大质粒的提取均按文献[14]中所述的碱法提取方法进行, 大质粒的提取过程应注意温和操作。

1.6 DNA 杂交

按 Zeta-probe 印迹膜说明书中碱印迹法进行。

1.7 蛋白浓度测定

按 Bradford^[14]的考马斯亮蓝法进行。

1.8 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白免疫印迹

按文献[15]所述方法进行菌体蛋白质电泳, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 4%。电泳开始电流强度为 10mA, 待样品进入分离胶后电流升至 15mA, 电泳结束后, 用硝酸纤维素膜进行蛋白免疫印迹。封闭液为 1.5% BSA, I 抗为 *K. pneumoniae* 菌的固氮酶铁蛋白, II 抗为磷酸化酶的羊抗兔 IgG 抗血清, 显色剂(二氨基联苯胺)用磷酸化酶缓冲液(mmol/L)(NaCl 100, MgCl₂ 5, Tris.HCl 100, pH 9.5)配制。

1.9 固氮酶活性测定

按文献[3]固氮酶活性的乙炔还原法测定。

表 2 转移接合子在不同 NH_4^+ 浓度下的固氮酶活性Table 2 N_2 ase activity of transconjugants in the presence of ammonia

Strains	[NH_4^+] (mmol/L)		
	0	10	20
C58/pGV3850(pCK5)	1183	927	687
C58/pGV3850(pCK3)	710	303	0
C58/pGV3850(pSZ36)	1017	140	0
C58/pGV3850(pSZ23-CA)	1193	733	273
C58/pGV3850	1267	0	0

Note: 1. N_2 ase activity unit is showed by $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

2. The values of above table are average of three tests.

3. Transconjugants are named by acceptor name (donor name).

上述结果表明, *A. tumefaciens* C58/pGV3850 中可能存在 *nifA* 和 *ntrC* 类似基因。这一结果与先前本实验室用分子杂交证明 C58 中存在 *nifA* 类似基因(未发表资料)及德国 Rossbach 等人^[16]报道 C58 存在 *ntr* 调节系统的事实是相一致的。它的固氮基因表达调节机制可能与肺炎克氏杆菌和慢生型大豆根瘤菌相似, 存在 *nifA*-*ntrC* 的串联调节机制^[6,7]。因此, 当引入 *K. pneumoniae* *nifA*-*ntrC* 融合片段时, 调节和恢复固氮酶活性(62%)的效果高于单独 *nifA*(24%)的作用。结果也预示了根瘤土壤杆菌在生物系统发育过程中, 瘤菌固氮菌的关系可能比肺炎克氏杆菌更近些, 前者的 *nifA* 对根瘤土壤杆菌 *nif* 表达的调节更强, 表明它们的 *nifA* 序列同源程度可能高。

2.2.2 转移接合子固氮酶蛋白的免疫印迹(Western blotting)分析: 将上述菌株传接约 2000 代, 经气相色谱分析证明有耐 NH_4^+ 功能的转移接合子 C58/pGV3850(pCK5)在含 10mmol/L NH_4^+ 的无氮基本培养基上培养至对数期, 菌体经 SDS 裂解, 离心, 上清液进行 SDS-PAGE 电泳和以 *K. pneumoniae* 菌铁蛋白为 I 抗的免疫印迹分析(见图 3)。结果表明, 对照菌 C58/pGV3850(见图 3-2, 4)在 10mmol/L NH_4^+ 时, 固氮酶铁蛋白的合成受阻, 而转移接合子 C58/pGV3850(pCK5)在 10mmol/L NH_4^+ 时仍有固氮酶铁蛋白合成(见图 3-3, 5)。

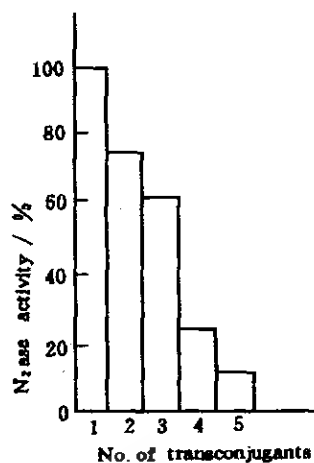


图 2 转移接合子在 10mmol/L NH_4^+ 时固氮酶活性恢复示意图

Fig. 2 N_2 ase Activity restoration of transconjugants in 10mmol/L ammonia

1. C58/pGV3850 (in 0mmol/L NH_4^+)
2. C58/pGV3850(pCK5) (in 10mmol/L NH_4^+)
3. C58/pGV3850 (pSZ23-CA) (in 10mmol/L NH_4^+)
- 4, 5. C58/pGV3850 (pCK3) (in 10mmol/L NH_4^+)



图 3 转移接合子固氮酶铁蛋白的免疫印迹

Fig. 3 Western blotting analysis of Fe-peptide from transconjugants (in 0 mmol/L NH_4^+)

1. C58/pGV3850, 2. C58/pGV3850, 3. C58/pGV3850(pCK5) (in 10 mmol/L NH_4^+)

致谢 感谢中国农科院原子能研究所[尤崇杓]教授、中国农业大学李季伦教授和中国科学院植物研究所李久蒂教授给予本工作中的实验材料支持和有益讨论。

参 考 文 献

- [1] Kanvinde L, Sastry G R K. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(7):2087~2092.
- [2] 张静娟, 王 丽, 李丽娜等, *科学通报*, 1992, 37(18):1725.
- [3] 王 丽, 张静娟, *微生物学报*, 1994, 34(5):385~392.
- [4] 朱家璧, 俞冠翹, 江群益等, *中国科学(B辑)*, 1983, 8:688~696.
- [5] 张耀平, 李季伦, *微生物学报*, 1991, 31(5):338~345.
- [6] Alvarez-Morales A, Hennecke H. *Mol Gen Genet*, 1985, 199:306~314.
- [7] Hans-Martin F. *Microbiol Rev*, 1994, 58(3):352~386.
- [8] Kennedy C, Drummond M H. *J Gen Microbiol*, 1985, 131:1787~1795.
- [9] 江群益, 周宗汉等, *科学通报*, 1990, 35(4):302~305.
- [10] Figurski D H, helinski D R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:1648~1652.
- [11] Hill S. *J Gen Microbiol*, 1976, 93:335~345.
- [12] Buchanan-Wollaston V, Cannon M C, Beynon J L *et al.* *Nature*, 1981, 294:776~778.
- [13] Sambrood J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- [14] Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976, 72:248~254.
- [15] 李永兴, 胡长征, 王继文等, *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18:242~243.
- [16] Rossbach S, Scheu J, Bruijn de F J. *Mol Gen Genet*, 1987, 209:419~426.

Role of the Heterologous $nifA^C$ Product in the Regulation of nif Expression in *Agrobacterium tumefaciens*

Zhang Jinling Zhang Jingjuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The plasmid pCK5, pCK3, pSZ36 and pSZ23-CA which carried constitutive $nifA^C$ gene of *Azotobacter chroococcum* and *Klebsiella pneumoniae* were transferred into *A. tumefaciens* C58/pGV3850 with triparental mating. The growth rate of these transconjugants was similar to the wild type. Nitrogenase synthesis was demonstrated by Western blotting, in the presence of 10mmol/L NH_4^+ , and the nitrogenase activity was restored to 73%, 24%, 11% and 62%, respectively. The results showed that the regulation gene of nitrogen fixation in *A. chroococcum* and *K. pneumoniae* played a regulative role for the expression of nitrogen fixation gene from *A. tumefaciens*. Among them, the role of *A. chroococcum* $nifA^C$ gene was the strongest, the fusion plasmid pSZ23-CA which carried $nifA$ - $ntrC$ gene of *K. pneumoniae* was stronger and the $nifA^C$ gene of *K. pneumoniae* was weak.

Key words nif expression, role of heterologous $nifA^C$, NH_4^+ -tolerant transconjugants, *Agrobacterium tumefaciens*