

5-10

第20卷 第1期
1992年2月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol.20 No.1
Feb. 1992

弗兰克氏菌 *nifH* 及 *nifD* 基因的定位¹⁾

曾王勇²⁾ 崔玉海²⁾ 柏学亮 马庆生

(广西农学院分子遗传学研究室, 广西南宁·530005)

蒋爱民

(西北农业大学食品系, 陕西杨陵·712100)

摘 要 利用限制性内切酶酶切和分子杂交等手段, 对弗兰克氏菌菌株 At4 和 Hr16 的固氮基因克隆的 *nifH* (pPC1201)、*nifD*(pPC1202)及 *nifK*(pPC1203)基因为探针杂交, 定位了 At4 和 Hr16 的 *nifH* 和 *nifD* 基因。同时发现, 一条 1.3kb 的 *Bam*HI 片段丢失。

关键词 弗兰克氏菌, 分子杂交, 肺炎克氏杆菌, 固氮基因, 基因定位, 转座子, 亚克隆
中图分类号 S154.32, Q939.96

与绝大多数非豆科植物共生固氮的内生菌都属于弗兰克氏菌 (*Frankia*), 它与豆科根瘤菌拥有相似的固氮效率。迄今为止, 在弗兰克氏菌遗传学研究中, 最成功的方法是利用 DNA 探针杂交技术克隆 (clone) 与弗兰克氏菌共生固氮有关的基因。

本研究室以广谱可转移的 cos 质粒 pLAFRI 构建了基因文库, 以肺炎克氏杆菌的固氮酶结构基因 (*nifHDK*) 为探针, 通过放射性分子杂交, 克隆了菌株 At4 和 Hr16 的固氮酶结构基因。本文研究了弗兰克氏菌固氮酶结构基因的保守性, 意外发现, *nifH* 与转座子有关。

1 材料和方法

1.1 菌株的基因型和质粒的插入片段

详细组成如表 1 所示。

1.2 培养基和培养条件

大肠杆菌生长于 LB 培养基中 (37℃), 培养基中抗生素用量按 Maniatis 等的方法⁽⁴⁾ 进行。

1.3 质粒制备

大肠杆菌中质粒的提取参见文献 [4]。

1.4 DNA-DNA 杂交

滤膜杂交和探针标记按 Maniatis 等的方法⁽⁴⁾ 进行。

文稿收到日期: 1991-05-27

1) 国家自然科学基金资助项目; 2) 现分别在西北农业大学农化系和中国科学院沈阳应用生态研究所工作。

1.5 酶和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA 聚合酶 I 均为 Boehringer Mannheim 产品, α -³²P-dCTP 购自北京市福瑞生物工程公司, 反应条件按厂家要求。

表 1 菌株的基因型和质粒的插入片段

菌株	基因型	质粒	插入片段
大肠杆菌	F ⁻ , hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻), recA13,	pPC1201	肺炎克氏杆菌 nifH
HB101	ara-14, proA2, lacY1,	pPC1202	肺炎克氏杆菌 nifD
	galK2, rpsL20(Sm ^r), XY1-5,	pPC1203	肺炎克氏杆菌 nifK
	mtl-1, supE44, λ ⁻	pAt1Gx	nif 克隆, 来自 At4 文库
ED8767	recA56, supE, supF, hsdS	pHr14Gx	nif 克隆, 来自 Hr16 文库
	R ⁺ M ⁺ , met ⁻	pHr17Gx	nif 克隆, 来自 Hr16 文库
		pHr18Gx	nif 克隆, 来自 Hr16 文库
		pHr18'Gx	比 Hr18 少一条 1.3kb BamHI 片段(本工作)
		pHr18'-①Gx	比 Hr18'-①少一条 1.3kb BamHI 片段(本工作)
		pCclGx	CcolnifHDK 同源片段, 载体为 pBR322

2 结果与分析

2.1 各 nif 克隆的限制性内切酶分析

pAt1Gx 用 BamHI 酶切时, 有 5 条带; 用 BamHI-EcoRI 双酶切时, 有 7 条带 (不包括载体)。两条 BamHI-EcoRI DNA 片段分别为 2.0 和 0.6kb, 5 条 BamHI DNA 片段分别为 9.7, 6.9, 2.7, 2.1 和 1.7kb。HindIII, kpnI 和 PstI 在 pAt1Gx 上无切点。

对于 Hr14, Hr17 和 Hr18, 用 EcoRI 酶切时, 都只有一条 13kb 的带 (用 0.7%TAE 琼脂糖凝胶, 40V 电泳 30 h, 未能使这条带一分为二); 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切时, Hr14 有 5 条带, Hr17 和 Hr18 都包含有和 Hr14 一样的 5 条带。我们推测: Hr17 和 Hr18 均为两条 13kb EcoRI 片段的混合物。为了证明这个推断, 我们进行了下面的实验: 用 EcoRI 酶切 pHr18Gx, 加 T4DNA 连接酶随机连接后, 转化 HB101 (用四环素选择)。长出转化子后, 随机选出 12 个, 提取质粒 DNA, 用 BamHI-EcoRI 双酶切时, 发现两种亚克隆 (sub-clone): 一种与 Hr14 一样, 命名为 Hr18'-②; 另一种为 Hr18'-① (Hr14 与 Hr18'-①合起来, 即为 Hr18', 见图 1-C, 图 2)。

2.2 菌株 At4 和 Hr16 的 nifH 和 nifD 基因的定位

崔玉海等^[5]用 BamHI 酶切 At4 和 Hr16 的总 DNA, Southern 转移后, 以肺炎克氏杆菌的 nif HDK 为探针进行杂交, 结果在 At4 总 DNA 中发现两条杂交带: 一条为 1.7kb, 另一条为 0.8kb; 在 Hr16 总 DNA 中也有两条杂交带: 一条为 2.0kb, 另一条为 1.3kb (见图 1-A)。我们以 pCclGx 的插入片段为探针, 与 pHr18Gx 的 BamHI-EcoRI 酶切带杂交, 结果出现 3 条杂交带: 2.0kb, 1.3kb 和 1.2kb。根据上面

的信息, 2.0kb *Bam*HI 片段和 1.2kb *Bam*HI-*Eco*RI 片段属于 *Hr*14, 1.3kb *Bam*HI

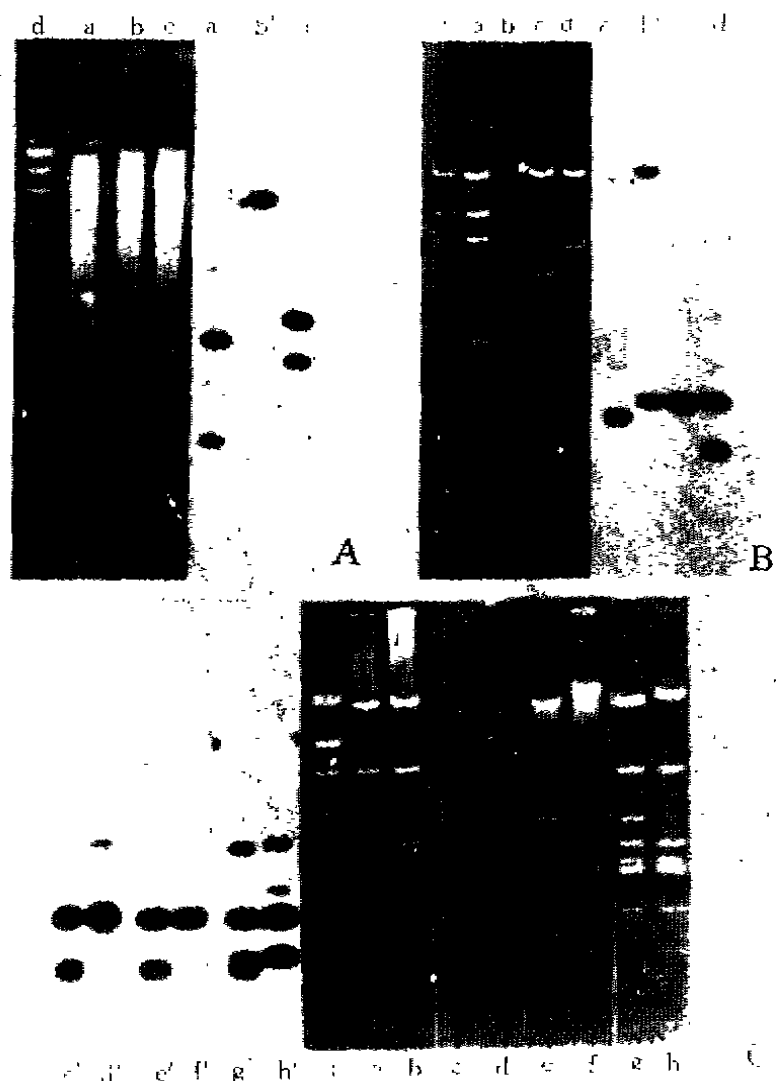


图1 弗兰克氏菌固氮酶结构基因的保守性

- A. a. At4 总 DNA / *Bam*HI; b. Ccol 总 DNA / *Bam*HI; c. Hr16 总 DNA / *Bam*HI;
a', b', c' 分别为 a, b, c 与 32 P 标记的 pSA30 杂交后的放射自显影图; d. λ / *Hind*III
- B. a. pAt1Gx / *Bam*HI; b. p13r14Gx / *Bam*HI; c. p17Gx / *Bam*HI; d. p18Gx / *Bam*HI;
a', b', c', d' 分别为 a, b, c, d 与 32 P 标记的 pCclGx 的插入片段杂交后的放射自显影图; e. λ / *Hind*III
- C. a. p18'-1'Gx / *Bam*HI-*Eco*RI; b. p18'-1'Gx / *Bam*HI; c. p18'-2'Gx / *Bam*HI-*Eco*RI;
d. p18'-2'Gx / *Bam*HI; e. p14Gx / *Bam*HI-*Eco*RI; f. p14Gx / *Bam*HI;
g. p18Gx / *Bam*HI-*Eco*RI; h. p18Gx / *Bam*HI; i. λ / *Hind*III;
c', d', e', f', g', h' 分别为 c, d, e, f, g, h 与 32 P 标记的 pCclGx 的插入片段杂交后的放射自显影图
 λ / *Hind*III 的 DNA 片段, 从大至小分别为: 23.7, 9.4, 6.7, 4.3, 2.3, 1.9 和 0.6kb(下图同)

片段属于 H18-① (见图 1-C)。因此, 可以推断: 1.3kb BamHI 片段与 1.2kb BamHI-EcoRI 片段之间是一条 0.1kb BamHI-EcoRI 片段。这就说明: ①为什么在照片上, Hr18 或 Hr18-①少一条 BamHI-EcoRI 片段 (琼脂糖凝胶电泳可分离的最小 DNA 片段是 100 多个碱基对, 这在照片上一般看不见); ②为什么 Hr18 用 BamHI 酶切时, 有两条杂交带, 而用 BamHI-EcoRI 双酶切时有 3 条杂交带; 另外, 以 pCclGx 的插入片段为探针, 与 pAt1Gx 的 BamHI 酶切带杂交, 出现两条杂交带: 一条为 1.7kb, 另一条位于载体上 (见图 1-B), 而载体本身与 pCclGx 的插入片段无杂交。结合以上事实说明: pAt1Gx 上的 BamHI-EcoRI DNA 杂交带为 0.6kb。

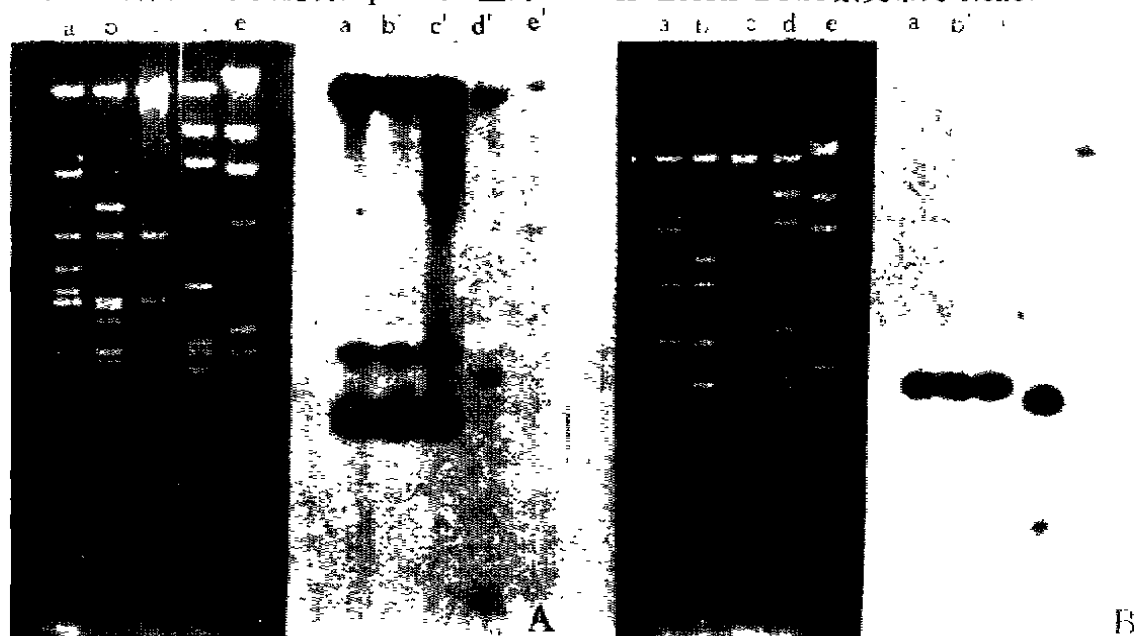


图 2 弗兰克氏菌 *nifH* 及 *nifD* 基因的保守性

- A. a. pHr18'Gx / BamHI-EcoRI; b. pHr17Gx / BamHI-EcoRI; c. pHr14Gx / BamHI-EcoRI;
d. pAt1Gx / BamHI-EcoRI; e. λ / Hind III
a', b', c', d', e' 分别为 a, b, c, d, e 与 ^{32}P 标记的 pPC1201 杂交后的放射自显影图
- B. 探针为 ^{32}P 标记的 pPC1202

最后, 我们分别以 pPC1201(*nifH*), pPC1202(*nifD*)和 pPC1203(*nifK*)为探针, 与 pAt1Gx, pHr14Gx, pHr17Gx 和 pHr18'Gx 的 BamHI-EcoRI 酶切带杂交 (见图 2)。结果表明: 在 pAt1Gx 中, 与 pPC1201 同源的是 0.6kb BamHI-EcoRI 片段, 由此可得出菌株 At4 *nifH* 及 *nifD* 基因的排布图 (见图 3, I); 在 pHr18'Gx 中, 与 pPC1201 同源性较强的是 1.2kb BamHI-EcoRI 片段, 而与 2.0kb BamHI 片段同源性较弱, 与 pPC1202 同源的是 2.0kb BmaHI 片段。可惜的是, 由于 Hr18'无 1.3kb BamHI 片段, 因此, 未能直接证明该片段属于 *nifH* 基因, 但有 3 个间接证据可表明这一点: ①该片段与 1.2kb BamHI-EcoRI 片段相邻; ②与 pCclGx 的插入片段杂交时, 这两个片段具有同等强度的杂交信号 (见图 1-C); ③迄今为止, 所有实验均表

明: 在弗兰克氏菌中, *nifH* 及 *nifD* 基因紧密连锁。所以, 可得出菌株 Hr16 的 *nifH* 和 *nifD* 基因的排布图 (见图 3, II)。

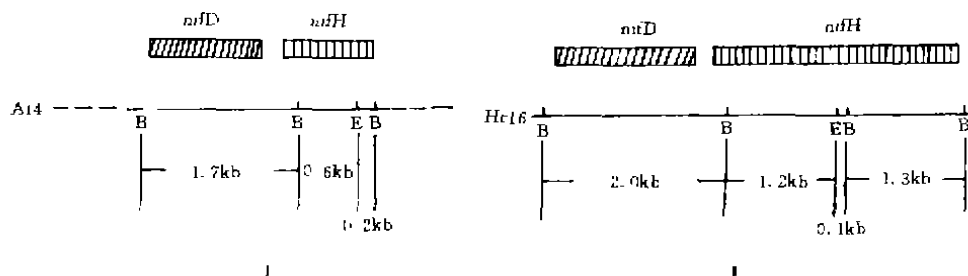


图 3 菌株 At4(I)、Hr16(II) 的 *nifH* 及 *nifD* 基因排列

B 示 BamHI; E 示 EcoRI

3 讨 论

以肺炎克氏杆菌的 *nifK* 基因为探针, 未探测到上述 *nif* 克隆中有杂交信号。这说明在弗兰克氏菌中, *nifK* 基因的保守程度比 *nifH* 和 *nifD* 基因差, 或者说, 这些克隆中没有 *nifK* 基因。

另外, 我们发现了一个奇怪的现象: Hr18' 和 Hr18'-① 缺失一条 1.3kb BamHI 片段 (属于固氮酶结构基因的一部分)。而衍生 Hr18'-① 亚克隆的 Hr18 是完整的, 有 1.3kb BamHI 片段存在。站在基因工程角度看, 这决非偶然的机械损伤。从理论上说, 关于二者丢失该片段的机会, 最大可能是在大肠杆菌繁殖期间。这与 Lechevalier 等人的发现有相似之处^[6]: 他们将来自红枝桉木 (*A. rubra*) 的菌株 AiR12 接种至桉木幼根上时, 结果产生根瘤, 但不固氮。用 Ar13 的 *nifHDK* 基因为探针, 与 AiR12 的总 DNA 杂交时, 未探测到任何杂交信号, 也就是说, 菌株 AiR12 的固氮酶结构基因全部丢失, 而这种丢失的可能途径是在菌株繁殖期间。如果我们认为这种缺失有必然性的话, 那么, 缺失的 DNA 片段最可能与转位因子有关。根据以上事实, 我们试图对固氮酶结构基因的缺失现象作出如下解释: 固氮酶结构基因有一部分位于转座子上, 当大肠杆菌繁殖时, 转座子切离跳至质粒上, 质粒随后丢失。这种行为与真核生物中的类质粒 DNA 相似。

为了证明上述解释, 可将 1.3kb BamHI 片段从凝胶中提取出来。用 BamHI-EcoRI 双酶切 pHr18'Gx, pHr14Gx 和 pHr18'-①Gx, 用 BamHI 酶切大肠杆菌 (去除质粒 pHr18'Gx) 总 DNA, 琼脂糖凝胶电泳及 Southern 转移后, 以 1.3kb BamHI 片段为探针杂交。如果与 Hr18' 总 DNA 有很强的杂交信号, 而与 Hr18', Hr14 和 Hr18'-① 仅有弱杂交或无杂交, 则说明缺失的 1.3kb BamHI 片段插入了大肠杆菌的染色体上。

本文承蒙西北农业大学农化系微生物教研室朱铭葵副教授校阅, 谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Ligon J M, Nakes J P. Isolation and characterization of Frankia sp. strain Fac1 genes involved in nitrogen fixation. *Appl Environ Microbiol*, 1987; 53:2321~2327
- 2 Simonet P, Normand P, Bardin R. Heterologous hybridization of Frankia DNA to Rhizobium meliloti and klebsiella pneumoniae nif genes. *FEMS Microbiology Letters*, 1988; 55:141~146
- 3 Normand P, Simonet P, Bardin R. Conservation of nif sequences in Frankia. *Mol Gen Genet*, 1988; 213:238~246
- 4 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1982
- 5 Cui Yuhai, Wang Yanling, Qin Min. Isolation and comparison of nitrogen fixation gene segments of Frankia. *Scientific Bulletin*, 1990; 18:1419~1421
- 6 Lechevalier M P, Baker D, Hornere F. Physiology, chemistry, serology and infectivity of two Frankia isolates *Alnus incana* subsp. *rugosa*. *Can J Bot*, 1983; 61:2826

Mapping of NifH and NifD Genes of Frankia

Zeng Wangyong Cui Yuhai Bai Xueliang Ma Qingsheng

(Laboratory of Molecular Genetics of Guangxi Agricultural College, Nanning Guangxi, 530005)

Jiang Aimin

(Department of Food science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Nif gene clones from Frankia strain At4 and Hr16 were analysed physically using digestion of restriction endonucleases, molecular hybridization and other techniques. And then, they were hybridized with nifH (pPC1201), nifD (pPC1202) and nifK (pPC1203) genes from *Klebsiella pneumoniae*, respectively. At the same time a loss of 1.3-kb BamHI DNA fragment was discovered.

Key words Frankia, molecular hybridization, *Klebsiella pneumoniae*, nitrogen fixation genes, gene mapping, transposon, sub-clone