

棕色固氮菌 *nifS* 敲除菌株的构建*

汪道涌^{1,2} 谢 维¹ 毛晓华^{2**}

(东南大学遗传学研究中心 南京 210009)¹ (东南大学医学院生物化学与分子生物学系 南京 210009)²

摘要: 从 *Azotobacter vinelandii* 中通过 PCR 扩增了 5' 和 3' 端分别缺失 264bp 和 261bp 的 *nifS'* 片段, 克隆至载体 pUC18, 形成重组质粒 pUCS, 再通过同源重组的方法, 将 pUCS 插入 *Azotobacter vinelandii* 的 *nifS* 中, 形成 *nifS* 阻断突变体 SU1, 经 Southern 杂交和 PCR 扩增, 证明所得确为 *nifS* 阻断突变株。SU1 在外加氮源的 BBTN 培养基中能够快速生长, 但在 Burk's 无氮培养基中, 生长却极其缓慢, 表明 *nifS* 基因的破坏, 已造成 SU1 的固氮能力接近完全丧失。该突变体的成功构建, 为进一步从中纯化固氮酶两组分, 研究 *nifS* 对固氮酶结构及功能的影响及 *iscS* 与 *nifS* 之间的关系奠定了良好的基础。

关键词: *Azotobacter vinelandii*, *nifS* 敲除, 固氮

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2003) 06-0034-06

THE CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF A *nifS* DISRUPTION MUTANT

WANG Dao-Yong^{1,2} XIE Wei¹ MAO Xiao-Hua²

(Genetics Research Center, Southeast University, Nanjing 210009)¹

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Southeast University, Nanjing 210009)²

Abstract: A central portion of *nifS*, designated *nifS'*, was amplified from *Azotobacter vinelandii*. The *nifS'* was cloned into pUC18 to make pUCS. Then pUCS was integrated into *Azotobacter vinelandii* chromosome DNA by homologous recombination. This *nifS* disruption mutants were generated by single cross-over event and selected by Amp resistance on BBTN medium. The *nifS* disruption mutant (named SU1) was affirmed by southern blot and PCR amplification. SU1 grows rapidly on BBTN, but very slowly on Burk's N-free medium. This phenomenon shows that SU1 nearly lost its nitrogen fixation ability because of the disruption of *nifS*. The successful construction of SU1 is helpful for further research on the effect of *nifS* on the structure and function of nitrogenase component-I and II.

Key words: *Azotobacter vinelandii*, *nifS* disruption mutant, Nitrogen fixation

* 东南大学医学基金资助课题 (No.9223001167)

** 联系人 Tel: 025-3272314, E-mail: wei.xie@seu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-04, 修回日期: 2002-12-20

催化生物固氮作用的固氮酶由 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白组成。Fe 蛋白为同型二聚体, 含有一个 Fe_4S_4 原子簇; MoFe 蛋白为 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体, 含有 2 个 $\text{FeMoco}(\text{Mo}_1\text{Fe}_7\text{S}_9)$ 和 2 个 P-cluster(Fe_8S_8 原子簇)^[1]。目前已知有近 20 个固氮基因(*nitrogen fixation gene*, 简称 *nif* gene)与有效的固氮酶合成有关, 其中 *nifH*、*nifD*、*nifK* 分别编码 Fe 蛋白和 MoFe 蛋白的 α 及 β 亚基, 其他绝大多数 *nif* 基因的功能目前业已清楚, 主要是与固氮酶金属原子簇的合成或固氮酶 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白的成熟有关^[2]。*NifS* 是一个 L-cys 脱硫酶, 能以 L-cys 为底物, 生成 L-Ala 和 S, 脱下的 S 可为固氮酶中的铁硫原子簇的合成提供 $\text{S}^{[3]}$ 。Pramvadee Yuvaniyama 等^[4]报道, *NifS* 能在体外条件下与 *NifU* 相互作用, 利用 L-cys 和 Fe^{3+} 等在 *NifU* 上形成一个不稳定的 Fe_2S_2 原子簇, 该 Fe_2S_2 原子簇可为后续的固氮酶 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白中金属原子簇的合成提供无机 Fe 和 S 原子。由此可见, *nifS* 对固氮酶的有效表达是至关重要的。但究竟 *nifS* 失活会对固氮酶的合成和成熟有何影响, 目前尚无此方面的报道。我们拟通过同源重组的方法构建一个 *nifS* 敲除突变体, 并分析其表型, 为进一步从 *nifS* 突变体中分离纯化固氮酶两组分, 并测定两组分底物还原特性、光谱学特性及其金属原子簇的组成和含量, 进而阐明 *NifS* 对固氮酶的结构和功能的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和培养基

质粒 pUC18, *E. coli* JM83 菌株及棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 野生菌株 OP 均由本室保存。LB 培养基按文献^[5]的方法配制, 需要氨苄青霉素 (Amp) 时按 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 量加入。Burk's 无氮培养基每升含: K_2HPO_4 0.8g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.7mg, Na_2MoO_4 2.4mg 和 20g 蔗糖; Burk's 有氮培养基 (BBGN) 则在上述无氮培养基中按 1.1g/L 的量加入 NH_4AC 。培养 *nifS* 突变体 SU1 时在培养基中按 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的量加入 Amp。配制固体培养基时则在上述液体培养基的基础上按 1.8% 的量加入琼脂粉。

1.2 试剂和酶

本实验中所使用的限制性内切酶、DNase I、DNA 连接酶、饱和酚、PCR 扩增试剂盒等均为 Takara Biotechnology 公司产品, Southern 杂交标记检测试剂盒为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。其他常用试剂为国产分析纯试剂。

1.3 DNA 操作

Southern 杂交按试剂盒说明书进行, 固氮菌总 DNA 的提取, 质粒的提取、酶切、鉴定、连接及转化 *E. coli* 等按常规方法进行。

1.4 PCR 扩增

扩增 5' 和 3' 端各缺失 264bp 和 261bp 的 *nifS'* 片段时, 根据文献发表的 *nifS* 序列 (全长 1,209bp, 产物含 402 个氨基酸) 设计 5' 端 (pnifS1) 和 3' 端 (pnifS2) 引物, 两端添加了 XbaI 酶切位点 (划线部分)。*nifS* 突变体 SU1 进行 PCR 扩增鉴定时采用引物 pnifS1 和测序通用引物 M4。各引物序列如下:

pnifS1: GCTCTAGAACGCAAGACCGTCATCA

pnifS2: GCTCTAGAACCGCTGGAGCGGCGCA

M4: GTTTTCCCAGTCACGACGT

扩增 *nifS'* 的条件为: 94℃变性 1min、52℃退火 1min、72℃延伸 90s 进行 6 个循环, 然后 94℃变性 1min、63℃退火 1min、72℃延伸 90s 进行 25 个循环, 最后在 72℃延伸 10min。*nifS* 突变体 PCR 扩增鉴定时的条件为: 94℃变性 1min、55℃退火 1min、72℃延伸 90s 进行 30 个循环, 再经 72℃延伸 10min。

1.5 固氮菌的转化及同源重组

固氮菌的转化按 Page W J 等^[6]的方法进行。由于 pUC18 中所带有的 *colE1* 复制起点不能在 *Azotobacter vinelandii* 中独立复制, 所以只有通过单交叉 (single cross-over event) 同源重组将整个质粒整合入 *Azotobacter vinelandii* 染色体 DNA 的菌体才能在含 Amp 的选择培养基中生长, 形成克隆, 故筛选 Amp 抗性的菌落即为通过单交叉同源重组的菌落。

1.6 固氮菌生长曲线的制作

将野生菌株 OP 接种至 50mL 液体 Burk's 无氮培养基中, *nifS* 突变体 SU1 接种至 50mL BBTN 中, 培养至 A_{600} 为 1.0 左右时, 向含有 100mL Burk's 无氮培养基或 BBTN 的三角烧瓶中接种等量的 *nifS* 突变体或野生菌株 OP, 30℃震荡培养, 然后每隔一定时间无菌取 3mL 菌液测定 A_{600} 并作图。

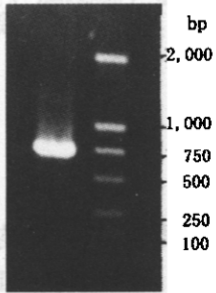


图1 PCR产物分析
1 DNA Marker(DL2000),
2 PCR products

2 结果

2.1 *nifS'* 片段的扩增

以 *pnifS1* 和 *pnifS2* 为引物, *Azotobacter vinelandii* 野生菌 OP 染色体 DNA 为模板, 理论上应能扩出长度为 712bp, 5' 和 3' 端分别缺失 264bp 和 261bp 的 *nifS'* 片段, 两端带有 *XbaI* 位点。经过 PCR, 我们确实获得了长度约为 0.7kb 的单一一条带, 这与预期结果是一致的 (图 1)。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收 PCR 产物, 用于下一步克隆。

2.2 *nifS'* 片段的克隆

将纯化的 *nifS'* 片段及载体 pUC18 分别经 *XbaI* 酶切、连接后, 转化 *E. coli* JM83 菌株, 用含有 Amp 并涂有 X-gal 的选择培养基进行筛选, 根据 α -互补作用, 所得白色菌落应为克隆有 *nifS'* 的阳性克隆 (克隆过程见图 2)。挑取阳性克隆、培养、提取质粒进行限制酶切鉴定, 结果显示, 提取的质粒经 *XbaI* 酶切后出现 1 个 0.7kb 左右的片段 (图 3)。另外, 经过序列测定表明, 所克隆的 0.7kb 片段与文献发表的 *nifS* 序列一致, 并且知道其转录方向与 pUC18 中 *LacZ* 的转录方向一致。这些结果表明, 扩增的 0.7kb 的 *nifS* 片段确已被克隆至载体 pUC18 上, 该重组质粒命名为 pUCS。

2.3 同源重组构建 *nifS* 敲除菌株

用重组质粒 pUCS 转化 *Azotobacter vinelandii* OP 菌株, 涂布于含 10 μ g/mL Amp 的 BBTN 选择培养

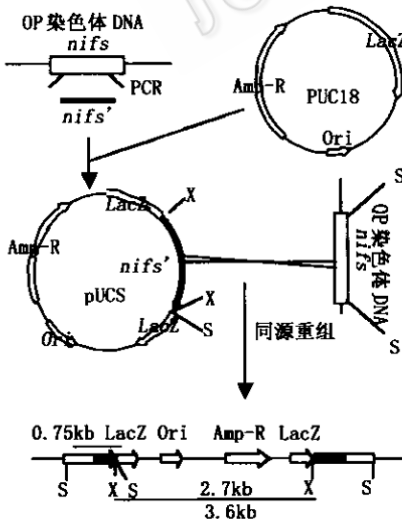


图2 *Azotobacter vinelandii* *nifS* 敲除菌株的构建
X *XbaI*, S *SmaI*

基中, 3d后检查菌落生长情况。由于质粒 pUC18 中所带有的 col E1 复制起点不能在 *Azotobacter vinelandii* 中独立复制, 故只有通过同源重组 (单交叉, single cross-over event) 将整个质粒整合入 *Azotobacter vinelandii* 基因组的菌体才能在含 Amp 的选择培养基中生长, 形成菌落, 所以在含 Amp 的选择培养基中生长的菌落即为发生单交叉同源重组的 *nifS* 插入突变体 (*nifS*::pUCS), 命名为 SU1 (同源重组过程如图 2)。为了验证 pUCS 确已整合到 *Azotobacter vinelandii* 基因组中, 我们从 SU1 中提取总 DNA, 分别经 *Xba*I 和 *Sma*I 消化, 以标记的 pUC18 为探针, 进行 Southern 杂交分析。经 *Xba*I 酶切后杂交出现约 2.7kb 的杂交信号; *Sma*I 消化、杂交后出现约 3.6kb 的杂交信号 (图 4)。由于 pUCS 中具有两个 *Xba*I 和一个 *Sma*I 酶切位点, 野生菌 OP 基因组 *nifS* 中距 *nifS*3' 端 28bp 处有一个 *Sma*I 位点 (图 2)。因此, 突变体 SU1 染色体 DNA 分别经 *Xba*I 和 *Sma*I 消化, 以标记的 pUC18 为探针, 理论上应分别能出现约 2.7kb (pUC18)、3.6kb (pUC18 + 约 0.9kb 5' 缺失 264bp 3' 缺失 28bp 的 *nifS*) 的杂交信号; 而野生菌 OP 由于不具有与 pUC18 的互补序列, 故不应出现特异杂交信号, 我们的杂交结果与此完全吻合。野生菌 OP 及突变株 SU1 染色体 DNA 酶切产物杂交后出现了几个 5~10kb 的较弱条带, 估计是洗膜不完全所引起的非特异性背景信号。此外, 我们还以 *pnifS*1 和 pUC 系列载体的测序通用引物 M4 作为引物, 突变体 SU1 和野生菌 OP 染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 反应。OP 染色体 DNA 中因不具有引物 M4 结合位点, 故不应扩出任何条带; 而 SU1 基因组 DNA 则由于 pUCS 的插入, 应能扩出约 0.75kb 的条带。我们的 PCR 结果也与此完全相符。上述结果已充分表明: 我们获得的 SU1 确为同源重组所得的 *nifS* 阻断菌株。

2.4 SU1 的生长曲线

由图 6 可知, SU1 在外加氮源的 BBTN 培养基中能够快速生长, 但在不提供氮源的 Burk's 无氮培养基中却生长极其缓慢, 经过近 30h 的培养, A_{600nm} 只能达到 0.11。表明由于 pUCS 通过同源重组插入 *nifS* 后, 引起 *nifS* 功能破坏, 使 SU1 的固氮能力急剧下降。

3 讨论

nifS 的功能是一个以 PLP 为辅酶的 L-cys 脱硫酶^[3], 它不仅能为固氮酶中 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白的合成提供 S^[3,4], 而

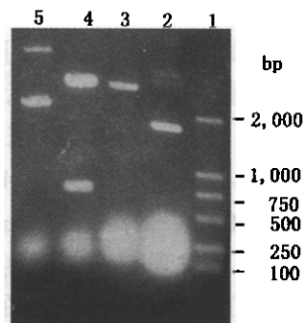


图 3 pUCS 限制酶切分析

1 DNA Marker (DL2000),
2 pUC18, 3 pUC18/*Xba*I,
4 pUCS/*Xba*I, 5 pUCS

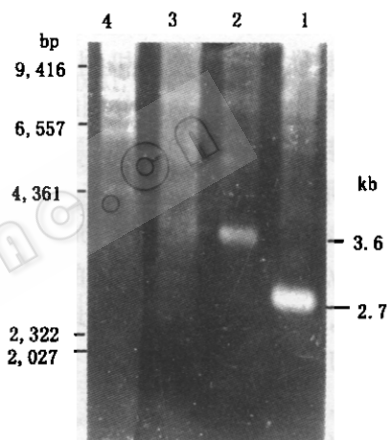


图 4 Southern 杂交分析

1, 2 SU1 chromosomal DNA digested with *Xba*I and *Sma*I respectively, 3, 4 Wild type strain OP chromosomal DNA digested with *Sma*I and *Xba*I respectively

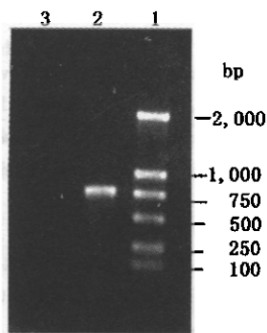


图 5 PCR 产物分析

1 DNA Marker (DL2000),
2 SU1 chromosomal DNA as template, 3 Wild type strain OP chromosomal DNA as template

且在体外的条件下,还能在不同的缺失铁硫原子簇的金属铁硫蛋白上组装形成新的铁硫原子簇,这些蛋白包括来自 *E. coli* 的 apo-FNR^[7] 和 apo-SoxR^[8], 来自 *Bacillus sphaericus* 的 apo-Biotin^[9] 以及来自 *Azotobacter vinelandii* 的 apo-NifU^[4]。另外,在 *Azotobacter vinelandii* 及 *E. coli* 还发现与 *nifS* 序列和功能类似的 *iscS*。Zheng L^[10] 等认为, *nifS* 的功能主要是与有活性的固氮酶的合成有关, *iscS* 则是一个管家基因,功能是参与固氮酶以外的其他金属铁硫蛋白中的铁硫原子簇的合成。目前,关于 *nifS* 的失活对固氮酶的结构与功能的影响,尚无人报道; *NifS* 与其他 *nif* 基因产物协同参

与组装铁硫原子簇的机制,也不甚清楚。我们通过 PCR 扩增了 *nifS'* 片段,与完整的 *nifS* 相比,5' 和 3' 端分别缺失 264bp 和 261bp,然后将之克隆至载体 pUC18 中,形成重组质粒 pUCS。再通过同源重组的方法,将 pUCS 整合入 *Azotobacter vinelandii* 的 *nifS* 位点,形成 *nifS* 阻断突变体 SU1。SU1 中含有两个分别缺失 5' 和 3' 端编码序列的不完整 *nifS* 拷贝,两者之间被 pUC18 间隔。经 Southern 杂交分析和 PCR 扩增鉴定,证明所得确为 *nifS* 阻断突变株。SU1 的生长曲线显示,在外加氮源的 BBTN 培养基中 SU1 能够快速生长,但是在 Burk's 无氮培养基中,其生长却极其缓慢,表明由于 pUCS 的插入,已造成 SU1 的固氮能力几近完全丧失。残存的微弱固氮能力可能起因于:(1) 该阻断突变体中,3' 或 5' 端删去了近 90 个氨基酸残基编码序列的非完整性 *nifS* 仍然具有部分功能;(2) *nifS* 失活条件下,合成的 apo-MoFe 和 apo-Fe 蛋白仍具有微弱的固氮活性;(3) *iscS* 等能部分补偿 *nifS* 的功能。具体原因,有待深入研究。该突变体的成功构建,为进一步从 SU1 中纯化固氮酶两组分,研究 *nifS* 对固氮酶结构及功能的影响以及 *nifS* 与管家基因 *iscS* 可能存在的相互作用奠定了良好的基础。

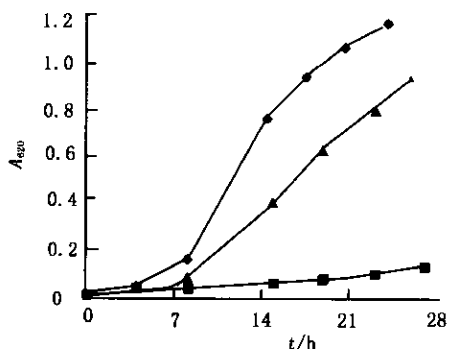


图 6 SU1 的生长曲线

◆ SU1 strain cultured on BBTN containing 10μg/mL Amp, ■ SU1 strain cultured on Burk's N-free medium containing 10μg/mL Amp, ▲ Wild type strain OP cultured on Burk's N-free medium

参考文献

- [1] Chan M K, Kim J, Rees D C. Science, 1993, 260: 792 ~ 797.
- [2] Orme-Johnson W H. Annu Rev Biophys Biochem, 1985, 14: 419 ~ 459.
- [3] Zhen L, White R H, Cash V L, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 2754 ~ 2758.
- [4] Yuvaniyana P, Agar J N, Cash V L, et al. Biochemistry, 2000, 39: 599 ~ 604.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著. 金冬雁, 黎孟枫等译, 侯云德等校. 《分子克隆》(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1992.10.
- [6] Page W J, von Tigerstrom M. J Bacteriol, 1979, 139: 1058 ~ 1061.
- [7] Khoroshilova N, Beinert H, Killey P J. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 2499 ~ 2503.
- [8] Hidalgo E, Dimple B. J Biol Chem, 1996, 271: 7269 ~ 7272.
- [9] Tse Sum Bui B, Escalantes F, Chottard G, et al. Eur J Biochem, 2000, 267: 2688 ~ 2694.
- [10] Zheng L, Cash V L, Flint D H, et al. J Biol Chem, 1998, 273: 13264 ~ 13272.