

## 在结瘤基因 *nodA* 启动子内发现了两个不同功能的结构区域

常维忠 洪国藩

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

**摘 要** 在豌豆根瘤菌(*Rhizobium Leguminosarum*)结瘤基因 *nodA* 的启动子内发现了具有两个不同功能的结构区域:其一我们称为  $R_{IP}$ , 在 *nodA* 诱导表达中起着关键作用,可能识别经诱导剂作用而发生构象变化的调控蛋白 NodD;另一为  $R_{IP}$  缺失后留下的,我们称为  $R_P$  区。只要  $R_P$  存在,不需要诱导剂, NodD 蛋白即能导致结瘤基因 *nodA* 的表达。因此该区可能识别原始构象的调控蛋白 NodD。

**关键词** 共生固氮, 结瘤基因, *nodA* 启动子, 表达调控, 诱导表达

生物固氮是生物圈中重要的生命活动,因为它为几乎所有的生物直接或间接地提供了可利用的氮源,其中共生固氮是固氮效率最高的一种形式。结瘤过程是共生固氮的必需环节,它是一个复杂的过程,既受根瘤菌有关基因(结瘤基因, *nod gene*)的控制,又受到豆科植物基因的控制。显然,对结瘤基因调控机制的阐明,关系到对豆科植物和根瘤菌相互关系的认识的深入,有着重要的理论和实际意义。豌豆根瘤菌(*R. leguminosarum*)中,至少有 13 个结瘤基因参与了豌豆根部的结瘤,这些基因分属五个操纵子,均受 NodD 蛋白的调控,不过 NodD 控制这些操纵子时,必须要有根分泌的诱导剂类黄酮类物质(flavonoid)的存在<sup>[1]</sup>。

作为结瘤基因之一的 *nodA* 的启动子可在类黄酮类物质(本研究使用 Narigenin)存在下,由 NodD 蛋白诱导表达。在本工作中,我们利用 Exo III 对 *nodA* 启动子进行系统缺失,结果发现, *nodA* 启动子内含有两个功能不同的区域:其一我们称为  $R_{IP}$ , 在 *nodA* 诱导表达中起着关键作用,可能识别经诱导剂作用而发生构象变化的调控蛋白 NodD;另一为  $R_{IP}$  缺失后留下的,我们称为  $R_P$  区。只要  $R_P$  存在,不需要诱导剂, NodD 蛋白即能导致结瘤基因 *nodA* 的表达。因此该区可能识别原始构象的调控蛋白 NodD。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株

*E. coli* 803<sup>[2]</sup>; *E. coli* pRK2013 ( $Km^r$ )<sup>[3]</sup>; *E. coli* MV1190; *R. leguminosarum* 8401pIJ1518 (*nodD*<sup>+</sup>, *Str*<sup>r</sup>,  $Km^r$ )<sup>[1]</sup>; *R. leguminosarum* 8401pKT230 (*nodD*<sup>-</sup>, *Str*<sup>r</sup>,  $Km^r$ )<sup>[4]</sup>。

#### 1.2 质粒

本文于 96 年元月 8 日收到。

pND487<sup>[5]</sup>, pUC119, pMP220<sup>[6]</sup>, Bluescript KS(M13- )。

### 1.3 细菌培养

大肠杆菌于 37℃ LB 培养基中培养过夜;根瘤菌于 28℃ TY 培养基(每升含 5g 蛋白胨, 3 克酵母膏和 0.66g CaCl<sub>2</sub>, pH7.0)中培养 36~48h。

### 1.4 DNA 重组

质粒提取、DNA 酶解与连接、质粒转化大肠杆菌均按 Molecular Cloning<sup>[7]</sup>进行。

### 1.5 ExoⅢ 系统缺失

根据 Pharmacia 公司的系统缺失试剂盒(Catalog No. 27-1691-01)的标准方法进行,但作了如下改变:为降低缺失进行速度,于 16℃ 进行反应,30s 取样一次。所得的缺失质粒进行测序以确定缺失位置,测序方法按 BIO-RAD 公司的 Bst DNA Sequencing Kit (catalog No. 170-3409)说明书中双链测序方法进行(包括 DNA 模板的提取和纯化)。

### 1.6 接合

在 *E. coli* pRK2013 存在下, pMP220 系列质粒会从 *E. coli* 803 转移至 *R. leguminosarum* 8401 中,以 Ty(Str、Km、Tc)筛选接合子。

### 1.7 启动子活力的测定

测定 1.6 得到的根瘤菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶活力<sup>[8]</sup>,即可比较克隆在 pMP220 系列质粒的多克隆位点中启动子的活力。

## 2 结果与讨论

### 2.1 系统缺失

**2.1.1 操作质粒的构建及其系统缺失:**在 pND487<sup>[6]</sup>中,有两个 SalI 和 BamHI 作用位点,所以无法利用 pND487,因此将 pND487 中的 EcoRI-PstI 片段(*nodA-nodD* 基因间区)重组入 pUC119,得 pUCWZ(图 1),这样我们就可以利用其中的 SalI 和 BamHI 内切酶位点:以 SalI 酶解 pUCWZ,用 Klenow 催化以  $\alpha$ -S-dNTP 补平,产生抗 ExoⅢ 作用的末端;以 BamHI 酶解上述 DNA,可得一 5'突出的对 ExoⅢ 敏感的末端;利用 1.5 所述之 ExoⅢ 缺失方法,得到从 *nodD* 基因方向开始的系统缺失的缺失突变质粒 pUCWZD(图 1)。

图 1 描述了本项研究的战略,表明了本项研究的启动子 DNA 在结瘤基因群的位置,基本操作质粒的构建,启动子 DNA 的缺失方向及启动子活力报告质粒的构建。

**2.1.2 缺失位置的确定:**经测序确定了一系列缺失突变质粒 pUCWZD 的缺失位置,我们着重研究其中的 3 个缺失突变子,其缺失位置见图 2。

### 2.2 缺失突变的 *nodA* 启动子活力的测定

我们对表达质粒 pMP220 进行了改造:先以 HindⅢ 酶切,再重新将多克隆位点重组进去,获得多克隆位点方向完全相反的表达质粒 pMP220T。为了以后实验的需要,再将 pUC18 的 EcoRI 与 PstI 之间的多克隆位点重组入 pMP220T,得 pMP221(图谱见图 1)。

将 pUCWZ 和 pUCWZD 的 EcoRI-PstI 片段克隆入 pMP221,分别得到野生型和缺失突变型的 *nodA* 启动子活力报告质粒 pMPUDA(图 1),使作为报告基因 *lacZ* 基因在野生型和缺失突变型的 *nodA* 启动子的控制之下。将含有以上报告质粒 pMPUDA 的 *E. coli* 803,分别与 *R. leguminosarum* 8401pIJ1518(*nodD*<sup>+</sup>)和 *R. leguminosarum* 8401pKT230

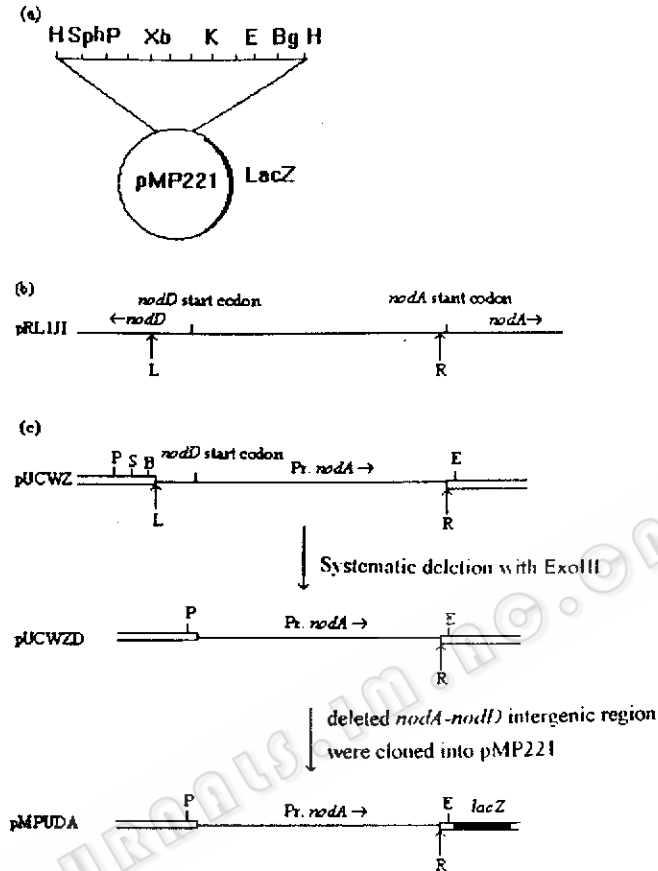


图 1 本项研究的流程图

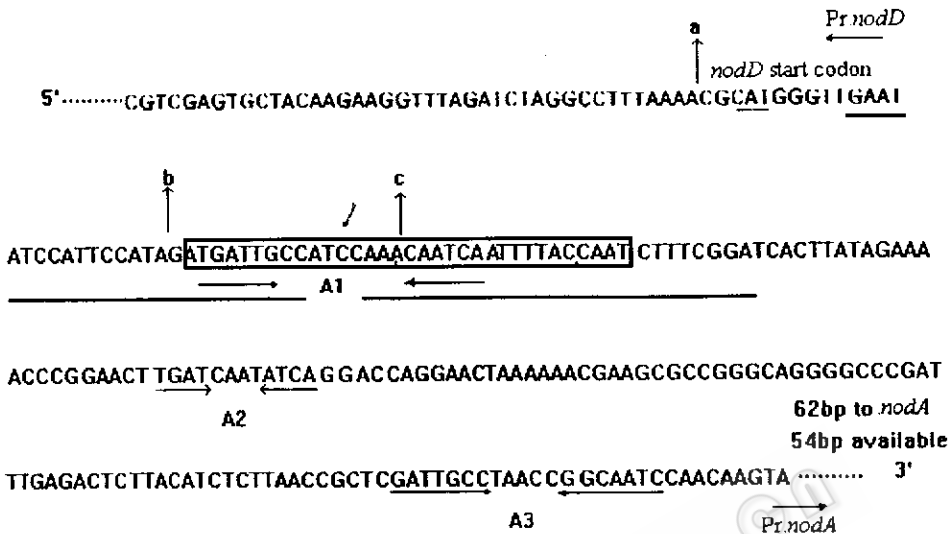
Fig. 1 Flow chart of the research strategy

(a)Plasmid map of pMP221 constructed in this paper. (b)The location on symbiotic plasmid pRL111 of the *nodA*-*nodD* intergenic region marked with L and R. the sequence of the region was shown in Fig. 2. (c) Systematic deletion of *nodA*-*nodD* intergenic region from *nodD* toward *nodA* with ExoIII and the construction of recombinants pMPUDA with deleted regions placed upstream of reporting gene (*lacZ*) in the direction of *nodA* promoter. Pr. *nodA* denoted *nodA* promoter. Restriction site designation: P, PstI; S, SalI; B, BamHI; E, EcoRI; H, Hind III ; Sph, SphI; Xb, XbaI; K, KpnI; Bg, Bgl II .

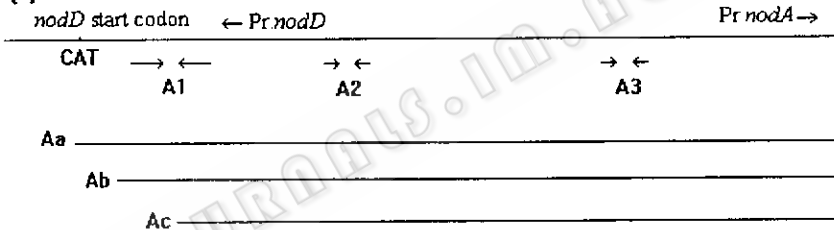
(*nodD*<sup>-</sup>)两种根瘤菌菌株接合,从而将 pMPUDA 分别转入这两种根瘤菌菌株中,然后测定各接合菌株的 β-半乳糖苷酶活力。结果如表 1 所示(每个活力数据为三个独立反应的平均值)。

由表 1 可以看出,缺失进行到箭头 a(图 2)时, *nodA* 启动子特征几乎没有变化,但是,当缺失进行到箭头 b 时, *nodA* 启动子的性质发生了质的变化:它仍可导致基因表达,但是却不再需要诱导剂了。Burn 等<sup>[10,11]</sup>的研究指出:诱导剂是和 NodD 蛋白作用,引起 NodD 蛋白构象的变化,而这种构象变化了的 NodD 蛋白与结瘤基因启动子作用,导致结瘤基因的表达。我们的研究指出,虽然在 a-b 缺失的情况下,结瘤基因的表达仍需要

(i)



(ii)

图 2 *nodA* 启动子系统缺失突变Fig.2 Systematic deletion mutated *nodA* promoter

( i ) DNA sequence of the *nodA-nodD* intergenic region with a series deletion from *nodD* toward *nodA*. Arrows a, b and c indicated the sites where the deletion ended. Boxed sequence stands for *nod* box. Sequences underlined with long thick line were the regions protected by NodD protein<sup>[9]</sup>.

( ii ) The diagram of deletion mutated *nodA* promoter.

NodD 蛋白,但并不需要诱导剂,这说明 NodD 蛋白的构象变化对 *nodA* 表达已不再必需,所以 a-b 区( $R_{IP}$ )可能是构象变化了的 NodD 蛋白的作用场所,亦即它与诱导剂(Inducer)和诱导蛋白(Protein)两者相关。另一方面,由于只要有  $R_P$ (缺  $R_{IP}$ 后剩下部分)存在,不需要诱导剂,NodD 蛋白即能使 *nodA* 表达,这说明  $R_P$  可能是原始构象 NodD 蛋白的作用场所。不过,我们应该注意到,虽然去掉 a-b 区后,未发生构象变化的 NodD 蛋白能诱导结瘤基因的表达,但表达量只有正常情况的 60% 左右(表 1),这说明 a-b 区可能还存在着与启动子活力有关的其它功能,但此已不在本文内容之列。

从表 1 又可以看出,当缺失继续进行到箭头 c 时,NodD 蛋白对 *nodA* 启动子的诱导活力消失。

我们以前研究<sup>[9]</sup>指出,NodD 蛋白在结瘤基因 *nodA* 启动子内有两个结合位点,位于

表 1 从 *nodD* 向 *nodA* 方向开始的缺失突变  
*nodA* 启动子的活力

Table 1 Activities of mutated *nodA* promoter  
deleted from *nodD* toward *nodA*

No of Promoter	pKT230 (8401, <i>nodD</i> <sup>-</sup> )	pIJ1518(8401, <i>nodD</i> <sup>-</sup> ) N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>
Aw	32.5	32.5	396.9
Aa	34.3	31.0	426.2
Ab	33.7	222.6	235.3
Ac	33.1	32.0	34.0

\* N<sup>+</sup> 100nmol/L naringenin present in media,

N<sup>-</sup> No naringenin present in media. W Wild type

不同的结构区:其一在 *nodA* 诱导表达中起着关键作用,可能为变构蛋白识别区,识别经诱导剂作用而发生构象变化的调控蛋白 NodD(我们称此区域为 R<sub>IP</sub>);另一结构区域(我们称为 R<sub>P</sub>)则可能为原始构象 NodD 蛋白识别区,因为在 R<sub>IP</sub> 缺失的情况下(即只有 R<sub>P</sub> 存在),不需要诱导剂,原始构象 NodD 蛋白也能导致结瘤基因 *nodA* 的表达。

*nod - box* 及其附近区域(图 2),我们这次研究表明,当缺失到达箭头 b 时, NodD 蛋白的一个结合区被破坏了(图 2),此时调控蛋白 NodD 的变构不再必需, *nodA* 仍能表达;缺失到箭头 c 第二个 NodD 蛋白结合区也被破坏了(图 2),此时导致 *nodA* 启动子活力的完全丧失。所以,更确切地说, R<sub>IP</sub> 和 R<sub>P</sub> 区域可能是被 NodD 蛋白精确保护的两个区域。

总之,我们对 *nodA* 启动子的缺失研究表明,在 *nodA* 启动子区存在两个功能

## 参 考 文 献

- [1] Rossen L, Shearman C A, Johnston A W B *et al.* EMBO J. 1985, 4: 3369~3373.
- [2] Wood W B, J Mol Biol, 1966, 16: 118~113.
- [3] Ditta G, Stanfield S, Corbin D *et al.* Proc Natl Acad Sci. USA, 1980, 77: 7347~7351.
- [4] Bagdasarian M. *et al.* Gene, 1981, 16: 237~247.
- [5] Ni F D. *et al.* Chinese Science Bulletin, 1990, 36: 1126~1129.
- [6] Spaik H P, Okker R J H, Wijnffelman C A *et al.* Plant Mol Biol. 1987, 9: 27~39.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning (2nd ed) 1990, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N Y.
- [8] Miller J H. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N Y. 1972, pp352~355.
- [9] 吕幼仪, 徐有成, 洪国藩. 科学通报, 1993, 38: 1998~2000.
- [10] Burn J E, Rossen L, Johnston A W B. Genes Dev. 1987, 1: 256~464.
- [11] Burn J E, Hamilton W D, Wootton J C *et al.* Mol Microbiol. 1989, 11: 1567~1577.

## Two Functional Regions were Discovered within *nodA* Promoter

Chang Weizhong Hong Guofan

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

**Abstract** Within *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae *nodA* promoter, two functional regions were discovered: One was named as R<sub>IP</sub>, which played key role in induction of *nodA* expression. It may recognize the conformation-changed NodD (regulatory protein) induced by inducer. Another was named as R<sub>P</sub>, which was the remainder of *nodA* promoter region when R<sub>IP</sub> was deleted. When R<sub>IP</sub> was deleted (R<sub>P</sub> was remained), *nodA* expression could be induce by NodD in the absence of inducer. Therefore, R<sub>P</sub> region may recognize the original conformation of NodD protein.

**Key words** Symbiotic nitrogen fixation, nodulation gene, *nodA* promoter, regulation of gene expression, induced expression