

## 巴西固氮螺菌 Yu62 *glnB* 基因和 *glnZ* 基因的克隆和序列分析

陈三凤 杨红 王娟 李季伦

(中国农业大学生物学院)

**摘要** *glnB* 基因编码的 P<sub>II</sub>蛋白在巴西固氮螺菌的固氮过程中起着非常重要的调控作用, 而 *glnZ* 是与 *glnB* 高度同源的基因, 其产物 P<sub>Z</sub> 可能也在固氮调控中起作用。本研究用 PCR 法克隆了巴西固氮螺菌 Yu62 *glnB* 基因和 *glnZ* 基因。DNA 序列分析表明 *glnB* 和 *glnZ* 这 2 个基因的编码区的长度都为 336 bp, 编码 112 个氨基酸。将巴西固氮螺菌 Yu62 菌株与标准菌株 Sp7 的 *glnB* 基因和 *glnZ* 基因分别进行比较, 结果表明这 2 个菌株的 *glnB* 基因在编码区的核苷酸顺序完全相同, 而 *glnZ* 基因在长 336 bp 的编码区内有 4 个碱基发生变化, 但改变后都是同义密码子, 即编码的氨基酸并未改变。*glnB* 基因和 *glnZ* 基因在核苷酸顺序上的同源性高达 73.2%, 氨基酸顺序的同源性达 66.7%。

**关键词** 巴西固氮螺菌 Yu62; *glnB* 基因; *glnZ* 基因; PCR; DNA 序列分析

**分类号** Q93

## Cloning and Sequencing of *glnB* and *glnZ* Genes from *Azospirillum brasilense*

Chen Sanfeng Yang Hong Wang Juan Li Jilun

(College of Biology, CAU)

**Abstract** The *glnB* and *glnZ* genes of *Azospirillum brasilense* Yu62 are cloned by PCR amplification. DNA analysis shows that the nucleotide sequence of the coding region of *glnB* gene from *A. brasilense* Yu62 is same with that of standard *A. brasilense* Sp7, while the nucleotide sequence of the coding region of *glnZ* gene from *A. brasilense* Yu62 is 98.8% identical to that of standard *A. brasilense* Sp7. There are 4 nucleotide bases that are changed in the coding region of *glnZ* gene, but the predicted amino acid residues are not changed. The homology of the nucleotide sequences of *glnB* and *glnZ* is 73.2%, while the homology of the amino acid sequences encoded by *glnZ* and *glnB* is 66.7%.

**Key words** *Azospirillum brasilense* Yu62; *glnB* gene; *glnZ* gene; PCR; DNA analysis

巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 是能够与玉米、小麦等许多禾本科作物联合共生的固氮菌, 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子, 既高浓度的铵对固氮起抑制作用。该问题的解决有赖于深入地研究其固氮基因的表达调控机制<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 1999-05-24

国家 863 高科技计划 (863-101-03-04-02) 资助项目

陈三凤, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学 (西校区), 100094

国外最近研究表明,在巴西固氮螺菌中,*glnB* 基因编码的  $P_{II}$  蛋白是固氮作用所必需的,这与其他固氮菌如肺炎克氏杆菌、荚膜红细菌等完全不同。在不同的铵水平下,  $P_{II}$  蛋白通过调节  $NifA$  的活性来调控固氮作用<sup>[2-6]</sup>。 *glnZ* 是一种与 *glnB* 高度同源的基因,其编码的  $P_Z$  蛋白也可能在固氮调控中起作用。因此, *glnB* 基因和 *glnZ* 基因的克隆,为进一步研究 *glnB* 基因编码的  $P_{II}$  蛋白与  $NifA$  蛋白相互作用及 *glnZ* 基因编码的  $P_Z$  蛋白与  $NifA$  蛋白的相互作用奠定基础,也为深入研究 *glnZ* 基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

巴西固氮螺菌(*A. brasilense*) Yu62、大肠杆菌 DH10B 及质粒 pGEM-11Zf 为本室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;测序试剂盒 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 购自 Perkin Elmer 公司。

### 1.2 巴西固氮螺菌 Yu62 的总 DNA 提取

将 5 mL 过夜培养的细菌菌液,离心收集菌体。菌体悬浮在 1 mL TE,离心后的菌体再悬浮在 400  $\mu$ L TE 中,再加入 50  $\mu$ L proteinase ( $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 50  $\mu$ L 10% SDS, 56  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h。然后用 1 mL 注射器(22 号针头)抽提 2 次,再用等体积的酚、氯仿依次抽提,最后向上清液中加入 0.1 体积的  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaAc}$  (pH 5.2) 和 2 体积的无水乙醇进行沉淀。离心收集沉淀,70% 乙醇洗后,将沉淀溶于 200  $\mu$ L TE (pH 8.0) 中。

### 1.3 PCR 反应中的引物

引物 1: 5'-GCA GAA TTCA TGAA GAA GA TCGAA GCCA TCA TT-3'

*EcoR I*

引物 2: 5'-A TCCGCTTCGA GTCA GA TCGCGTCGCCTCCCTTCTC-3'

*Xho I*

引物 3: 5'-GCA GAA TTCA TGAAA CTGGTTA TGGCCA TC-3'

*EcoR I*

引物 4: 5'-A TCCGCTTCGA GTCA GA GA GCTTCGGTGTGGTCTC-3'

*Xho I*

PCR 反应中所用的以上 4 个引物均在上海生工生物工程公司合成。

### 1.4 PCR 反应

50  $\mu$ L 反应体系中,引物为 50 pmol,模板 DNA 100 ng,1 U Tag 酶,dNTP 浓度为  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。扩增反应为先在未加 Tag 酶时煮沸 5 min 使模板 DNA 变性,然后加 Tag 酶,在 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 条件下进行 30 个循环,最后于 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.5 PCR 产物的纯化、酶切和连接

按常规方法将 PCR 产物从琼脂糖凝胶中纯化出来,用 *EcoR I* 和 *Xho I* 进行双酶切。将双酶切的 PCR 产物连接到用同样双酶切的载体 pGEM-11Zf 中。其酶切、连接和转化参照 Sambrook 等<sup>[7]</sup>方法。

### 1.6 DNA 序列分析

小量制备质粒 DNA,用 Perkin Elmer 公司 377 型序列分析仪测序。DNA 序列同源性比较

采用 DNA SIS 软件。

## 2 实验结果

### 2.1 *glnB* 基因和 *glnZ* 基因的 PCR 克隆

**2.1.1 *glnB* 基因的 PCR 克隆** 参照 de Zamarczy 等发表的巴西固氮螺菌 Sp7 的 *glnB* 基因序列, 选择包括起始密码子 ATG 在内的 N 端区域作为 5 引物(引物 1), 终止密码子 TGA 在内的 C 端区域作为 3 端引物(引物 2), 以巴西固氮螺菌 Yu62 总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得 0.3 kb 的 DNA 片段, 与予期结果相同。将 0.3 kb 的 PCR 产物回收后, 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后, 克隆到 pGEM-11Zf 载体上, 构成 pGII 重组质粒。

**2.1.2 *glnZ* 基因的 PCR 克隆** 参照 de Zamarczy 等发表的巴西固氮螺菌 Sp7 的 *glnZ* 基因序列, 选择包括起始密码子 ATG 在内的 N 端区域作为 5 引物(引物 3), 终止密码子 TGA 在内的 C 端区域作为 3 端引物(引物 4), 以巴西固氮螺菌 Yu62 总 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 获得 0.3 kb 的 DNA 片段, 与予期结果相同。将 0.3 kb 的 PCR 产物回收后, 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后, 克隆到 pGEM-11Zf 载体上, 构成 pGZ 重组质粒。

### 2.2 *glnB* 基因和 *glnZ* 基因的序列分析

**2.2.1 *glnB* 基因的序列分析** 将含有 PCR 产物的 pGII 重组质粒进行序列分析, 得到 *glnB* 基因编码区长 339 bp 的核苷酸序列(图 1)。与巴西固氮螺菌 Sp7 相应序列进性比较, 核苷酸顺序无任何差异, 说明巴西固氮螺菌菌株之间的 DNA 序列差异很小。

```

ATG AAG AAG ATC GAA GCC ATC ATT AAG CCG TTC AAA CTC GAC GAA GTG AAG GAA GCC CTT 60
Met Lys Lys Ile Glu Ala Ile Ile Lys Pro Phe Lys Leu Asp Glu Val Lys Glu Ala Leu 20
CAC GAA GTC GGC ATC AAG GGC ATC ACC GTC ACC GAG GCC AAG GGC TTC GGC CGT CAG AAG 120
His Glu Val Gly Ile Lys Gly Ile Thr Val Thr Glu Ala Lys Gly Phe Gly Arg Gln Lys 40
GGG CAC ACC GAG CTG TAC CGC GGC GCG GAG TAT GTG GTC GAC TTC CTG CCG AAG GTG AAG 180
Gly His Thr Glu Leu Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Val Val Asp Phe Leu Pro Lys Val Lys 60
ATC GAG GTG GTG ATG GAG GAC TCC CTG GTG GAG CGG GCG ATC GAG GCG ATC CAG CAG GCC 240
Ile Glu Val Val Met Glu Asp Ser Leu Val Glu Arg Ala Ile Glu Ala Ile Gln Gln Ala 80
GCC CAC ACC GGC CGC ATC GGC GAC GGC AAG ATC TTC GTC ACC CCC GTG GAA GAA GTT GTC 300
Ala His Thr Gly Arg Ile Gly Asp Gly Lys Ile Phe Val Thr Pro Val Glu Glu Val Val 100
CGC ATC CGG ACC GGC GAG AAG GGA GGC GAC GCG ATC TGA 339
Arg Ile Arg Thr Gly Glu Lys Gly Gly Asp Ala Ile *** 112

```

图 1 巴西固氮螺菌 Yu62 *glnB* 基因的核苷酸顺序及氨基酸顺序

**2.2.2 *glnZ* 基因的序列分析** 将含有 PCR 产物的 pGZ 重组质粒进行序列分析, 得到 *glnZ* 基因编码区长 339 bp 的核苷酸序列。与巴西固氮螺菌 Sp7 标准菌株的相应序列进性比较, 核苷酸顺序同源性达 98.8%, 即在编码区有 4 个碱基发生改变。Sp7 菌株的第 75, 99, 279 和 297 碱基 T, G, T 和 C 分别由 Yu62 菌株的 C, C, G 和 T 所置换, 但这些碱基所编码的氨基酸并未发生改变(图 2)。

```

Met Lys Leu Val Met Ala Ile Ile Lys Pro Phe Lys Leu Asp Glu Val Arg Glu Ala Leu 20
Yu62 ATG AAA CTG GTT ATG GCC ATC ATC AAG CCG TTC AAG CTC GAC GAA GTG CGC GAG GCG CTG 60
Sp7 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

Thr Ser Leu Gly Ile Gln Gly Leu Thr Val Ser Glu Val Lys Gly Phe Gly Arg Gln Lys 40
Yu62 ACG TCG CTC GGG ATC CAG GGC CTG ACG GTG AGC GAG GTC AAG GGC TTC GGA CGC CAG AAG 120
Sp7 --- --- --- --- --T --- --- --- --- --- --- --G --- --- --- --- ---

Gly Gln Thr Glu Ile Tyr Arg Gly Ala Glu Tyr Ser Val Ser Phe Leu Pro Lys Val Lys 60
Yu62 GGT CAG ACC GAG ATC TAC CGC GGC GCC GAG TAT TCC GTG AGC TTC CTG CCC AAG GTG AAG 180
Sp7 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

Val Glu Val Ala Val Ser Asp Asp Gln Tyr Glu Gln Val Val Glu Ala Ile Gln Lys Ala 80
Yu62 GTC GAG GTC GCG GTG TCC GAC GAC CAG TAC GAG CAG GTG GTC GAG GCG ATC CAG AAG GCC 240
Sp7 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

Ala Asn Thr Gly Arg Ile Gly Asp Gly Lys Ile Phe Val Leu Asp Ile Ala Gln Ala Val 100
Yu62 GCC AAC ACC GGC CGC ATC GGC GAC GGC AAG ATC TTC GTG CTG GAC ATC GCC CAG GCT GTG 300
Sp7 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --- --- --C ---

Arg Ile Arg Thr Gly Glu Thr Asn Thr Glu Ala Leu *** 112
Yu62 CGC ATC CGC ACC GGC GAG ACC AAC ACC GAA GCT CTC TGA 339
Sp7 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

图 2 巴西固氮螺菌 Yu62 *glnZ* 基因序列及其与标准菌株 Sp7 *glnZ* 基因序列的比较

### 2.3 *glnZ* 基因编码的 Pz 蛋白与 *glnB* 基因编码的 P<sub>II</sub> 蛋白的氨基酸同源性比较

与巴西固氮螺菌的标准菌株 Sp7 一样, Yu62 菌株的 *glnZ* 基因和 *glnB* 基因有 70% 以上的同源性, 所编码的氨基酸同源性也达 66.7% (图 3)。

```

Pz M KLVMA I KPFKL D E V R E A L T S L G Q G L T V S E V K G F G R Q K Q G T E Y R G A E Y S V S F L
PII K I E K H E V K I T A H L V D
Pz P K V K V E V A V S D D Q Y E Q V V E A Q K A A N T G R I G D G K I F V L D I A Q A V R I R T G E T N T E A L
PII I V M E S L V R A I Q H T P V E E V K G G D I

```

图 3 巴西固氮螺菌 Yu62 Pz 和 P<sub>II</sub> 蛋白质氨基酸顺序的比较

## 3 讨论

本研究用 PCR 法获得了巴西固氮螺菌 Yu62 *glnB* 基因和 *glnZ* 基因编码区全序列, 与标准菌株巴西固氮螺菌 Sp7 相应序列进行比较, 这 2 个菌株的 *glnB* 基因核苷酸顺序完全相同, 而 *glnZ* 基因虽有 4 个碱基的差异, 但所编码的氨基酸并未发生改变, 说明 *glnB* 和 *glnZ* 这两个基因保守性很强。从我们室克隆的巴西固氮螺菌 Yu62 的几个基因, 如 *ntfBC*, *draTG*, *nifA* 等基因的核苷酸顺序比较看, 尽管巴西固氮螺菌 Yu62 和 Sp7 这 2 个菌株同源性很高, 一般可达 97%, 但还是存在差异的<sup>[8]</sup>。这些差异可能反应了不同菌株的亲缘关系。

*glnB* 基因和 *glnZ* 基因可能是固氮调控基因, 但它们的作用机理尚不很清楚。本研究对这 2 个基因的克隆将为深入研究其功能奠定基础。

## 参 考 文 献

- 1 赵银锁, 李季伦. 固氮螺菌的固氮分子调控研究进展. 生物工程学报, 1997, 13(2): 115~ 120
- 2 De Zamarczy M, Paquelin A, Emerich C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. J Bacteriology, 1993, 175(9): 2507~ 2515
- 3 De Zamarczy M, Paquelin A, Pelter G, Forchhammer K, Emerich C. Coexistence of two structurally similar but functionally different P<sub>II</sub> proteins in *Azospirillum brasilense*. J Bacteriology, 1996, 178(14): 4143~ 4149
- 4 Arsene F, Kaminski A P, Emerich C. Modulation of NifA Activity by P<sub>II</sub> in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. J Bacteriology, 1996, 178(16): 4830~ 4838
- 5 De Zamarczy M, Delorme F, Emerich C. Characterization of three different nitrogen regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. Mol Gen Genet, 1990 (224): 421~ 430
- 6 De Zamarczy M. Structural homologues P<sub>II</sub> and P<sub>Z</sub> of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. Molecular Microbiology, 1998, 29(2): 449~ 463
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 马旅雁, 李季伦. 巴西固氮螺菌 Yu62 *draTG* 基因及其下游区域的克隆与核苷酸序列分析. 生物工程学报, 1997, 13(3): 227~ 235