

用酵母双杂交系统筛选与 NifA 相互作用的蛋白质

陈三凤^{①②} 管乐^① 涂然^② 孙文改^① 李季伦^{①③*}

(^①农业生物技术国家重点实验室; ^②农业部农业微生物资源及其应用重点实验室; ^③中国农业大学生物学院, 北京 100094.)

* 联系人, E-mail: lijulun@cau.edu.cn

摘要 利用酵母双杂合系统从巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*) Sp 中筛选与 NifA 有直接相互作用的蛋白质因子。首先将 *nifA* 基因克隆到 pGBD-C2 载体上, 构建成诱饵质粒 pGBD-*nifA*, 接着将巴西固氮螺菌的染色体 DNA 构建在 pGAD-C1, pGAD-C2 和 pGAD-C3 质粒载体上, 形成 3 个质粒文库 YSPC1, YSPC2 和 YSPC3。然后以 pGBD-*nifA* 为诱饵, 对 YSPC1, YSPC2 和 YSPC3 这 3 个文库进行了筛选, 得到 11 个阳性克隆。DNA 序列分析表明, 这 11 个阳性克隆分为 4 类, 包含 4 个 1~1.3 kb 不同的基因片段。对这 4 个基因片段进行同源性比较发现, 其中 2 个编码的蛋白质含有与信号传递有关的 PAS 结构域, 另外 1 个基因片段含有与吸收铁有关的 *fhuE* 基因, 另一个是未知蛋白。将这 4 个基因片段从原来的 pGAD 载体转移到 pGBD 载体, 即互换载体后, 它们仍然与 NifA 有相互作用; 对这 4 个基因片段进行移码突变则不再与 NifA 有相互作用, 说明了它们与 NifA 相互作用的特异性。

关键词 巴西固氮螺菌 酵母双杂合系统 PAS 结构域 NifA 蛋白

在固氮细菌中, 氧和铵是调节固氮基因表达的主要环境因子, 外界环境中的氧和铵浓度高时抑制固氮。最新研究表明, 所有已知的控制固氮的氧感应蛋白以及一些未知假定调节固氮和氮代谢的感应蛋白中均存在 PAS 结构域(PAS domain)^[1]。PAS 结构域一般包括 100~120 氨基酸, 其氨基酸序列在各基因间的保守性并不强^[1,2]。

在苜蓿根瘤菌、大豆慢生根瘤菌及其他根瘤菌中广泛存在着 FixL/FixJ 双组分调节系统。FixL 是一种含 PAS 结构域和血红素的组氨酸蛋白激酶, 血红素与位于 PAS 结构域内的组氨酸残基连在一起。在氧信号传递过程中, 氧直接结合到血红素上, 接着从 PAS 结构域的输入端解离, 使 PAS 结构域的构型发生改变, 从而提高了其 C 端的自我磷酸化活性, 形成磷酸化的 FixL。磷酸化的 FixL 催化磷酸基团转移到响应调节蛋白 FixJ 上。磷酸化的 FixJ 作为转录激活因子激活与固氮过程有关的 *nifA* 和 *fix* 基因的表达^[3]。

在自生固氮的肺炎克氏杆菌和棕色固氮菌中, 固氮酶的合成受 *nifA* 和 *nifL* 这一对非典型的双组分系统调控。NifL 是一种负调节蛋白, 根据外界环境中的氧浓度和固定的铵浓度对 NifA 的活性进行抑制。NifL 的 N 端含有 PAS 结构域。同时, NifL 也是一种黄素蛋白, 其 N 端含有 FAD 辅基, 这种结构可能与氧信号传递有关。NifL 分子上结合的氧化作用状态 FAD 作为分子开关来调控 NifA 的转录激活活性^[4,5]。

巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*) 是一种联合固氮菌。NifA 是一种非常重要的转录激活因子, 能激活几乎所有固氮基因(*nif*) 的表达, 如果 NifA 失活或不表达, 则不会发生固氮作用, 即表型为 Nif⁻。在巴西固氮螺菌中, 尚未发现负调节蛋白 NifL, 也尚未报道过含有 PAS 结构域的、类似于 FixL/FixJ 的双组分调控系统^[6]。

本研究利用酵母双杂合系统, 以 NifA 为诱饵, 筛选到 4 个与 NifA 有直接相互作用的蛋白质因子, 其中 2 个含有 PAS 结构域, 一个可能是与铁吸收有关的 FhuE, 另一个是未知蛋白。

1 材料与方法

(i) 试剂、菌株及质粒。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自大连 TaKaRa 公司, 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-Gal)及各种氨基酸均购自 Sigma 公司。本研究所用菌株及质粒见表 1。

(ii) 感受态酵母细胞的制备及转化和 β-半乳糖苷酶活力测定。按文献^[7]进行。

(iii) DNA 重组技术及操作。按文献^[8]进行。

2 结果

2.1 含 *nifA* 的诱饵质粒的构建及鉴定

酵母双杂合系统中有 3 个报告基因: *ade2*, *his3* 和 *lacZ*, 其中 *ade2* 基因表达最为严谨, *his3* 和 *lacZ* 的表达相对松弛。另外, 2 个报告基因 *trp* 和 *leu* 是分别由

表 1 菌株及质粒

菌株及质粒	表型及基因型	来源
菌株		
<i>E. coli</i> DH10B	<i>HsdR17, endA1, thi-1, gyrA96, relA1, recA1, supE44, ΔlacU169(Φ80lacZΔM15)</i>	Gibico 公司
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ(lac-proAB), F'[traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]</i>	[8]
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Tp^rSm^r, Rp4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7), Pro, res^rmod⁺</i>	[9]
<i>E. coli</i> KC8	<i>HsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacX74strA, galU, Km^r</i>	Clontech 公司
<i>S. cerevisiae</i> PJ69-4A	<i>MATa, trp1-109, leu2-3, 112 ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ</i>	[10]
<i>A. brasiliense</i> Sp7	<i>Ap^r, Nx^r, 野生型</i>	[11]
质粒		
pGAD-C(X)	<i>Ap^r, Gal4(768-881), LEU2, 酵母双杂交系统质粒</i>	[10]
pGBD-C(X)	<i>Ap^r, Gal4(1-147), TRP2, 酵母双杂交系统质粒</i>	[10]
pGAD- <i>nifA</i>	<i>Ap^r, pGAD-C2 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1.9 kb nifA 基因)</i>	[12]
pGBD- <i>nifA</i>	<i>Ap^r, pGBD-C2 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1.9 kb nifA 基因)</i>	本工作
pGAD ₁ -S4	<i>Ap^r, pGAD-C1 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 916 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₃ -S35	<i>Ap^r, pGAD-C3 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1341 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₃ -S64	<i>Ap^r, pGAD-C3 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1245 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₃ -S65	<i>Ap^r, pGAD-C3 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 927 bp 片段)</i>	本工作
pGBD ₁ -S4	<i>Ap^r, pGBD-C1 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 916 bp 片段)</i>	本工作
pGBD ₃ -S35	<i>Ap^r, pGBD-C3 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1341 bp 片段)</i>	本工作
pGBD ₃ -S64	<i>Ap^r, pGBD-C3 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1245 bp 片段)</i>	本工作
pGBD ₃ -S65	<i>Ap^r, pGBD-C3 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 927 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₂ -S4'	<i>Ap^r, pGAD-C2 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 916 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₂ -S35'	<i>Ap^r, pGAD-C2 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1341 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₁ -S64'	<i>Ap^r, pGAD-C1 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 1245 bp 片段)</i>	本工作
pGAD ₁ -S65'	<i>Ap^r, pGAD-C1 派生质粒(含巴西固氮螺菌 Sp7 9927bp 片段)</i>	本工作
pGAD-SIP I	<i>Ap^r, 酵母双杂交系统阳性对照</i>	[10]
pBDU-SNF I		

pGBD 和 pGAD 两个载体所携带。

将 *nifA* 的编码区构建在酵母双杂合系统的 pGBD-C2 载体上, 使 *nifA* 与载体的 DNA 结合域形成融合蛋白, 这样构建成为诱饵质粒 pGBD-*nifA*。将重组质粒 pGBD-*nifA* 转入酿酒酵母 PJ69-4A 中, 铺于 SD/-Trp, SD/-Trp/-Ade, SD/-Trp/-His+3-AT 及 SD/-Trp +X-Gal+BU 平板上, 30℃培养 2~5 d。pGBD-*nifA* 转化子在 SD/-Trp 和 SD/-Trp+X-Gal+BU 平板上有正常的菌落长出, 但在 X-Gal 存在下不呈现蓝色, 而在 SD/-Trp/-Ade 和 SD/-Trp/-His+3-AT 平板上没有菌落长出, 延长培养时间, 仍然呈阴性结果。这说明诱饵质粒 pGBD-*nifA* 不能自动激活报告基因的表达, 对宿主菌也没有毒性作用, 因此 pGBD-*nifA* 可以用作诱饵质粒。

2.2 巴西固氮螺菌 Sp7 基因文库的构建

提取巴西固氮螺菌 Sp7 的染色体 DNA, 用 *Sau*3A I 酶切后回收 0.5~3 kb 的 DNA 片段, 然后与

经 *Bam*H I 酶切的 3 个酵母双杂合系统的质粒载体 pGAD1-C1, pGAD-C2 及 pGAD-C3 分别进行连接(以确保外源片段的阅读框架与载体一致), 则构建成 3 个质粒文库, 分别命名为 YSPC1, YSCP2 和 YSCP3。0.5~3 kb 范围的基因片段一般可表达一个完整的结构域, 而且蛋白质间的相互作用往往发生在 2 个结构域之间, 此范围的片段既满足了通过蛋白相互作用进行筛选的目的, 同时避免了外源基因太大引起假阳性的可能。

2.3 巴西固氮螺菌 Sp7 基因文库的筛选和阳性克隆的鉴定

将基因组文库 YSPC1, YSPC2 和 YSPC3 分别与诱饵质粒 pGBD-*nifA* 共转化酵母感受态细胞, 从 YSPC1, YSPC2 和 YSPC3 三个基因组文库中共分别得到 1.4×10^6 , 3×10^5 和 3.5×10^5 个共转化子。筛选阳性克隆时, 首先将转化产物铺于 SD/-Leu/-Trp/-Ade 选择培养基上进行筛选, 3 个文库转化物中共有 168 个

菌落表现为 Ade⁺。再将 Ade⁺菌落挑出点种于 SD/-Trp/-Leu+X-Gal+BU, SD/-Trp/-Leu/-His 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 这 3 种不同的平板上进行筛选。最后, 从 3 个文库中筛选到对 3 个报告基因 *ade2*, *his3* 和 *lacZ* 均能激活的阳性克隆 109 个, 并对上述 109 个阳性菌落再次进行 β -半乳糖苷酶活性分析, 结果与平板分析的趋势基本一致。接着从 109 个阳性酵母菌落中分别提取质粒, 并将质粒 DNA 分别转入大肠杆菌 KC8(*leuB*⁻, *trpC*⁻)中进行分离纯化。转化子涂布在加有 1 mmol/L 硫酸素和 0.4%葡萄糖的 M9/Amp¹⁰⁰/Km¹⁰/Leu 平板上进行筛选, 只有带有 *leu* 基因的阳性质粒, 才能被选择和复制, 而带有 *trp* 基因的诱饵质粒 pGBD-*nifA* 会逐渐丢失。再次从大肠杆菌 KC8 中分离质粒, 并进行酶切鉴定, 发现这 109 个阳性菌落都分别含有长度不同的外源插入片段。

将这 109 个纯化后的质粒分别与诱饵质粒 pGBD-*nifA* 再次共转化酿酒酵母, 在选择性平板上进行鉴定, 结果表明, 只有 11 个组合可以同时激活 3 个报告基因的表达, 同时对这 11 个组合的 β -半乳糖苷酶活性进一步测定, 结果见表 2。

表 2 11 个阳性菌落的 β -半乳糖苷酶活性

阳性克隆编号	Miller Unit	阳性克隆编号	Miller Unit
S4	23.185	S26	53.792
S10	27.847	S71	12.812
S35	30.8	S12	11.268
S64	53.622	S43	12.135
S65	27.717	阳性对照 (pGAD-SIP I 和 pBDU-SNF I)	97.164
S1	61.774	阴性对照 (pGBD-C2)	0.956
S24	20.273	阴性对照 (pGBD- <i>nifA</i>)	2.922

2.4 阳性克隆的序列测定及同源性比较分析

对 11 个阳性克隆都进行了 DNA 序列分析, 结果表明这 11 个克隆归纳为 4 类: 与 S4 克隆相同的有 3 个; 与 S35 克隆相同的有 2 个; 与 S64 克隆相同的有 3 个; 与 S65 克隆有 3 个。这样, 我们选取 S4, S35, S64 及 S65 克隆进行深入分析。

S4 克隆的外源插入片段位于 pGAD-C1 载体上, 其融合质粒被命名为 pGAD₁-S4。S35, S64 和 S65 克隆中的外源片段分别都位于 pGAD-C3 载体上, 其融合质粒分别命名为: pGAD₃-S35, pGAD₃-S64 和 pGAD₃-S65 (表 1)。

S4 克隆中的外源基因片段长 916 bp, 共编码 305

个氨基酸, 与 pGAD-C1 载体上 GAL4 AD 融合后的可读框是一致的, 该基因片段中没有终止密码子, 它依赖于载体上的终止区, 是一段不完整序列。用 GenBank 进行蛋白序列比对时, 发现其编码产物与 2 个功能未知的保守区域(GenBank 登录号: COG2308 和 DUF404)有较高的同源性(>55%)(图 1(a)), 含有这些区域的蛋白在许多细菌, 如 *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Azotobacter vinelandii* 和 *Pseudomonas fluorescens* 等中都有发现, 推测这些保守区域可能参与细菌的基础代谢。

S35 克隆中的插入基因片段为 1341 bp, 共编码 447 个氨基酸, 与 pGAD-C3 载体上 GAL4 AD 融合后的可读框是一致的, 该片段中也没有终止密码子, 它依赖于载体上的终止区, 是不完整的基因。蛋白序列的比对发现它含有一个保守的 PAS 结构域(图 1(b)), 这个发现颇具有研究意义。因为 PAS 是感应蛋白家族中普遍存在的一个结构域, 可结合辅助因子共同参与氧、胞内氧还电位和光线信号的感应和传导, 在古生菌、细菌和真核细胞中均有发现。

S64 克隆中的插入基因片段为 1245 bp, 共编码 415 个氨基酸, 与 pGAD-C3 载体上 GAL4 AD 融合后的可读框是一致的, 与前 2 个片段一样, 插入基因片段中没有终止密码子, 它依赖于载体上的终止密码子, 也是不完整的基因。蛋白序列的比对发现, 它具有 PAS 保守结构域和 DUF(domain of unknown function)区域, 而且在较大范围内与 AtoS 有同源性(图 1(c))。AtoS 是一类信号传导蛋白, 同时含有 PAS 和 PAC 结构域。DUF 是细菌中普遍存在的结构域, 可能参与原核细胞的信号传导, 具体功能未知。

S65 克隆中插入基因片段为 927 bp, 共编码 309 个氨基酸, 与 pGAD-C3 载体上 GAL4 AD 融合后的可读框是一致的, 插入基因片段也是不完整基因。蛋白序列比较发现它分别与 FhuE, TonB-dep-Rec(TonB dependent receptor)及 CirA 的一部分具有较高(>50%)同源性(图 1(d))。FhuE 和 CirA 都是细菌中的外膜蛋白, 参与铁离子的吸收和运输。TonB 蛋白能够与 FhuE 和 CirA 等外膜蛋白相互作用, 将铁从细胞外运输到细胞内。

2.5 阳性克隆的再次验证及与 NifA 相互作用的再确定

根据所测阳性克隆的序列和酵母双杂合系统载体的特点, 进行阳性克隆和 *nifA* 基因载体互换实验

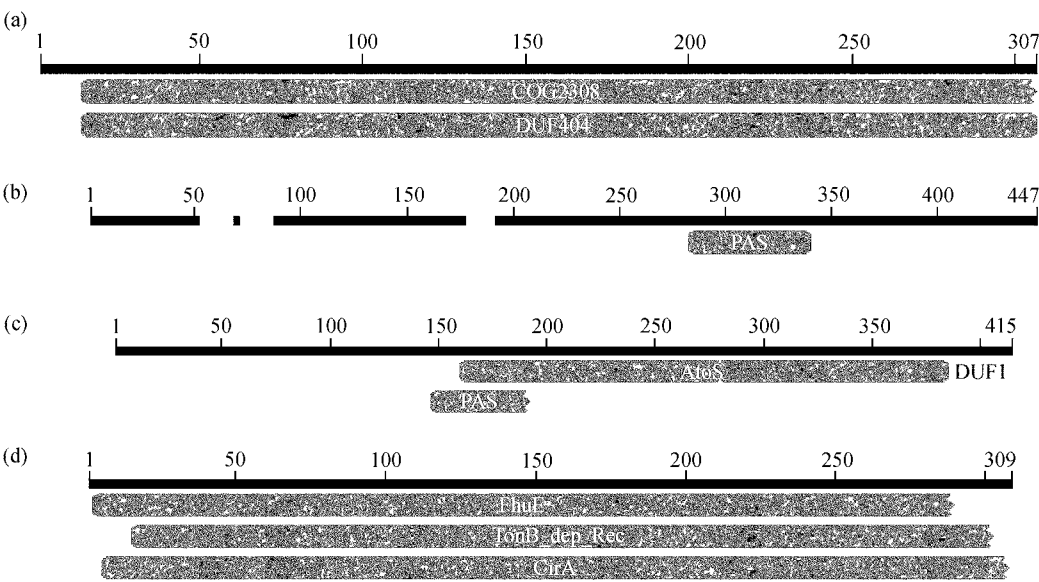


图 1 4 个克隆中插入基因片段的编码产物保守区
(a) S4 克隆; (b) S35 克隆; (c) S64 克隆; (d) S65 克隆

及阳性克隆移码表达的实验, 以进一步确证它们的编码产物与 NifA 蛋白之间的相互作用。

(i) 载体互换实验. 将 4 个克隆中的 4 个基因片段分别从它们所在的 4 个质粒 pGAD₁-S4, pGAD₃-S35, pGAD₃-S64 和 pGAD₃-S65 按照正确的读码框克隆到 pGBD-C1 和 pGBD-C3 载体上, 构建重组质粒 pGBD₁-S4, pGBD₃-S35, pGBD₃-S64 和 pGBD₃-S65. 将上述 4 种重组质粒与诱饵质粒 pGAD-nifA (nifA 克隆至 pGAD-C2 载体) 分别共转化酵母细胞, 同时以原来的 4 个质粒作对照, 它们的组合及简写见表 3. 然后分别检测报告基因的表达及进行β-半乳糖苷酶活性分析. 结果表明, 互换载体后β-半乳糖苷酶活性与没有互换的原质粒组合的活性处于同一水平(表 4); 在选择性平板上, 上述 4 对载体互换质粒及原质粒与 NifA 的共转化均能够激活 3 个报告基因的表达(图 2 (a)). 这些结果再次验证了这些基因片段的编码产物与 NifA 蛋白之间有直接的相互作用。

(ii) 移码质粒的构建和转化. 酵母双杂合系统中的 pGAD 和 pGBD 载体各有 3 个系列载体, 它们在

多克隆位点上(*Bam*H I 作用位点处)有 1 个碱基的差别, 分别以 3 个不同的可读框表达融合基因, 为构建移码突变提供了比较便利。

将 S4 克隆和 S35 克隆中的基因片段分别从它们所在的 pGAD-C1 和 pGAD-C3 载体上克隆到 pGAD-C2 载体上, 形成 pGAD₂-S4'和 pGAD₂-S35' 2 个重组质粒, 则导致原来的 2 个基因编码区发生移码. 将 S64 和 S65 克隆中的基因片段分别从它们所在的 pGAD-C3 载体上克隆到 pGAD-C1 载体上, 形成 pGAD₁-S64'和 pGAD₁-S65' 2 个重组质粒, 则导致原来的 2 个基因编码区发生移码. 将上述 4 个移码质粒和 4 个正确表达的原质粒分别与 NifA 共转化入酵母 PJ69-4A. 在 SD/-Trp/-Leu 培养后划线在 SD/-Trp/-Leu/-His, SD/-Trp/-Leu/-Ade 和 SD/-Trp/-Leu+X-Gal+BU 平板上, 培养 4~6 d 后, 发现移码质粒的共转化(分别表示为 A4'A, A35'A, A64'A 和 A65'A)不能激活任何一个报告基因的表达, 而原质粒依然可以同时激活 3 个报告基因的表达(图 2(b)), β-半乳糖苷酶活性分析结果(表 5)与之一致. 这就从另一个角度说明

表 3 转化酵母的不同的质粒组合及简写

共转化 简称	pGBD-nifA				pGAD-nifA			
	pGAD ₁ -S4	pGAD ₃ -S35	pGAD ₃ -S64	pGAD ₃ -S65	pGBD ₁ -S4	pGBD ₃ -S3	pGBD ₃ -S64	pGBD ₃ -S65
	A4A	A35A	A64A	A65A	B4A	B35A	B64A	B65A

表 4 载体互换实验的β-半乳糖苷酶活性

共转化组合	A ₆₀₀	V	时间/min	A ₄₂₀ 均值	Miller Unit
A4A	0.6169	24.5	0.6	0.1094	12.0638
B4A	0.5876	25.5	0.6	0.1022	11.3641
A35A	0.7713	12	0.6	0.1119	20.1560
B35A	0.7815	11	0.6	0.2533	49.1156
A64A	0.6392	21.5	0.6	0.0875	10.6157
B64A	0.6719	19.5	0.6	0.0898	11.4189
A65A	0.7493	12	0.6	0.2014	37.3311
B65A	0.7232	17	0.6	0.1166	15.8067
CK+	0.92	6	0.6	0.2479	74.8591
CK-	0.5725	35	0.6	0.0219	1.8188

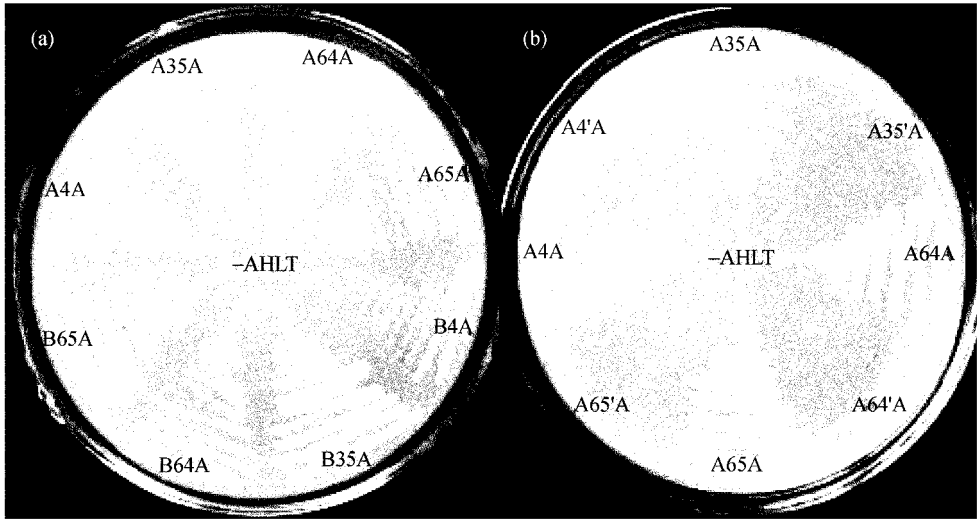


图 2 共转化子在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp(-AHLT)培养基上的生长情况
(a) 载体互换试验各共转化子的生长情况; (b) 4 个移码质粒和 4 个正确表达的原质粒分别与 NifA 共转化的生长情况

表 5 移码实验的β-半乳糖苷酶活性

质粒组合	A ₆₀₀	V	时间/min	A ₄₂₀ 均值	Miller Unit
A4A	0.619	0.5	18.5	0.0784	13.6867
A4'A	0.8198	0.5	24	0.0460	4.6725
A35A	0.9663	0.5	12.9	0.1310	21.0237
A35'A	0.7945	0.5	30	0.0530	4.4500
A64A	0.5263	0.5	13	0.1313	38.3714
A64'A	0.647	0.5	28	0.0488	5.3838
A65A	0.5755	0.5	17	0.0861	17.6079
A65'A	0.5688	0.5	31	0.0450	5.1041

了所筛选阳性因子与 NifA 蛋白之间特异的相互作用.

3 讨论

本研究以 NifA 为诱饵, 从巴西固氮螺菌基因文库中筛选到 4 个与 NifA 有相互作用的阳性克隆, 其中

2 个克隆所编码的蛋白质含有 PAS 结构域. PAS 结构域一般存在于信号传递蛋白中, 信号传递蛋白通过该结构域对环境中的氧、光等信号进行感应和传导, 但它的信号传导机制仅在细菌光感应蛋白 PYP 和氧感应蛋白 FixL 中得到阐明^[4]. 很多 PAS 结构域构象

中都含有一个结构上保守的 α/β 折叠,推测它们可能以相同的策略进行信号传导,只是在结合与其折叠关联的不同的因子,如Heme或Flavin等时使传导途径发生了显著变化,但是PAS结构域氨基酸序列的保守性不强^[13]。目前,在巴西固氮螺菌中只发现NtrB蛋白具有PAS结构域,NtrB蛋白与NtrC蛋白组成双组份调节系统,参与氮代谢的调控。本研究发现的与NifA有相互作用的2个含有PAS蛋白基因,将为深入研究巴西固氮螺菌中氧和铵的信号传递提供好材料。

另一个克隆的插入基因片段与大肠杆菌的*fhuE*基因有很高的同源性,该基因的产物是一种膜蛋白,参与铁的吸收。铁是固氮微生物中固氮酶的重要组成部分,但这种基因产物是如何与NifA起作用的,还需要深入研究。

最后一个克隆(S4克隆)属于功能未知的基因,有待于进行功能分析。

本研究室用酵母双杂交方法证明,NifA与P_{II}蛋白(*glnB*基因产物)有直接相互作用^[12]。从理论上说,在这次研究中,我们应该能筛选到*glnB*基因,可是我们的阳性克隆中并没有该基因。分析其原因,可能是由于我们在用*Sau3A*I酶切而构建基因文库时,由于*glnB*基因(编码区只有336 bp)周围没有合适的*Sau3A*I酶切位点而没有被包括进去。

总之,本研究用酵母双杂合系统筛选到4个与NifA有相互作用的阳性克隆,其中2个含有PAS结构域,为今后研究巴西固氮螺菌的氧和铵信号传递奠定了基础。关于为什么这4个克隆与NifA有相互作用,还需要用免疫共沉淀、共柱层析等方法来进一步验证。

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:30170020)及博士点基金(批准号:20010019002)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Taylor B, Zhulin I B. PAS domains: Internal sensor of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biology Rev*, 1999, 63(2): 479~502
- 2 Rutter J. PAS domains and metabolic status signaling. *Sicence*, 2002, 298: 1567~1568
- 3 de Philip P, Batut J, Boistard P. *Rhizobium meliloti* FixL is an oxygen sensor and regulates *R. meliloti* *nifA* and *fixK* genes differently in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1990, 172(8): 4255~4262
- 4 Hill S, Austin S, Eydman T, et al. *Azotobacter vinelandii* NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2143~2148 [DOI]
- 5 Soderback E, Reyes-Ramirez F, Eydman T, et al. The redox- and fixed nitrogen-responsive regulatory protein NIFL from *Azotobacter vinelandii* comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. *Mol Microbiol*, 1998, 28(1): 179~191 [DOI]
- 6 Arsène F, Kaminski P A, Elmerich C. Modulation of NifA activity by P_{II} in *Azospirillum brasilense*: Evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *J Bacteriol*, 1996, 178: 4830~4838
- 7 Miller J. *Experiments in Molecular Genetics*, New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- 8 Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 9 Simon R, O'Connell M, Labes M, et al. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Methods Enzymol*, 1986, 118: 640~659
- 10 James P, Halladay J, Craig E A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 1996, 144: 1425~1436
- 11 Tarrand J J, Krieg N R. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol*, 1978, 24: 967~980
- 12 陈三凤, 杜金萍, 伍丽娟, 等. 巴西固氮螺菌NifA与P_{II}蛋白之间的相互作用. *科学通报*, 2002, 47(23): 1820~1823 [摘要][PDF]
- 13 Taylor B L, Zhukin I G, Johnson M S. Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1999, 53: 103~128

(2004-10-08 收稿, 2005-01-31 收修改稿)