

NITROGEN-FIXING BACTERIA COLONIZE RICE ROOT XYLEMA

T. N. H. Nguyen, T. N. B. Ton, V. A. Tarasenko, N. A. Kozyrovskaja

State University, SRV, Hanoi;
Institute of Biology, NRC, SRV, Hanoi;
Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev;
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Bacteria possessing low nitrogen-fixing activity have been isolated from the rice histoplane, their localization into rice roots xylema being shown.

1. Patriquin D. C., Doberciner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil // Can. J. Microbiol.—1978.—24, N 6.—P. 734—742.
2. Umali-Garcia M. D., Hubbel D. H., Gaskins M. H. Infection of *Panicum maximum* by *Spirillum lipoferum* // Ecol. Bull.—1978.—26.—P. 373—379.
3. McClung C. R., Patriquin D. C. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter species* from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel // Can. J. Microbiol.—1980.—26, N 8.—P. 881—886.
4. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of *Kallar glass* / B. Reingold, T. Hurek, E.-G. Niemann, J. Fendrik // Appl. Environ. Microbiol.—1986.—52, N 3.—P. 520—526.
5. Bilal R., Malik K. A. Isolation and identification of N₂-fixing zooglyca-forming bacterium from *Kallar glass* histoplane // J. Appl. Bacteriol.—1987.—62, N 2.—P. 289—294.
6. Reingold B., Hurek T., Fendrik J. Cross-reaction of predominant nitrogen-fixing bacteria with enveloped, round bodies in the root interior of *Kallar glass* // Appl. Environ. Microbiol.—1987.—53, N 4.—P. 889—891.
7. Garvin S., Linderman W. C. Isolation, characterization, and inoculation of N₂-fixing bacteria from dicotyledonous plants // Can. J. Microbiol.—1986.—32, N 12.—P. 912—916.
8. Neuer G., Kronenberg A., Bothe H. Denitrification and nitrogen fixation by *Azospirillum*. 3. Properties of a wheat-*Azospirillum* association // Arch. Microbiol.—1985.—141, N 4.—P. 364—370.

Ханой. гос. ун-т
Ин-т биологии Нац. центра науч. исследований, Ханой
Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 12.02.88

УДК 577.21

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rplL* Escherichia coli МЕТОДОМ СЛИЯНИЯ С ГЕНОМ *lacZ* В ПЛАЗМИДЕ pNM481

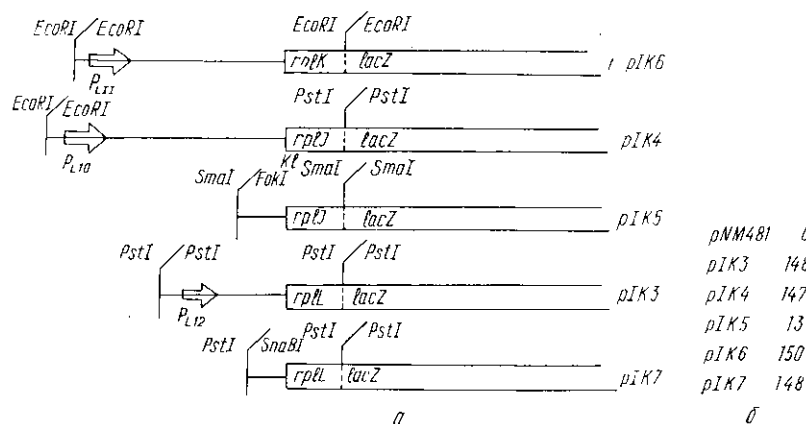
Е. Б. Патон, И. В. Крупская, А. Н. Живолуп

rplL-оперон является частью оперона *rplKAIL-rpoBC* и программирует синтез белков *L10* и *L7/L12*, входящих в большую субъединицу рибосомы [1, 2]. В отличие от всех 52 известных рибосомных белков *E. coli*, синтезирующихся в эквимольных количествах, белок *L7/L12* синтезируется в четырехкратном избытке [1]. По данным S1-картирования [2], основным транскриптом в кластере генов *rplKAIL* является тетрацистронная мРНК, инициируемая промотором P_{L11} . Менее обильны бицистронные транскрипты генов *rplKA* и *rplJL*, инициируемые промоторами P_{L11} и P_{L10} соответственно. Помимо P_{L10} оперон *rplJL* содержит внутренний промотор P_{L12} [3, 4], функция которого *in vivo* не ясна.

Различный уровень экспрессии генов одного и того же оперона может обеспечиваться на уровне транскрипции, трансляции, а также быть следствием различной стабильности мРНК.

Для изучения уровней экспрессии генов *L10* и *L7/L12* мы воспользовались векторной плазмидой *pNM481* [5], в которой промотор *lac* удален, а 21 пара оснований (п. о.) 5'-концевой части гена *lacZ* замещена полилинкерной областью, встраивание в которую 5'-концевых участков генов с промоторами может восстанавливать рамку считывания гена *lacZ* и обеспечивать его последующую транскрипцию и трансляцию. Результатом экспрессии химерного гена *lacZ* является синтез β-галактозидазы, активность которой позволяет судить об уровне экспрессии химерного гена.

Для исследования регуляции экспрессии генов *rplJL* нами сконструирован ряд рекомбинантных плазмид на основе *pNM481*, включающих 5'-концевую часть гена



Конструирование рекомбинантных плазмид на основе *pNM481* для определения уровней экспрессии генов *rplKAIL* оперона *E. coli*: *a* — участки рекомбинантных плазмид, включающие встраиваемые фрагменты ДНК (стрелками обозначены промоторы; места лигирования — изогнутыми линиями). Плазмида *pIK6* содержит *EcoRI*-фрагмент (~800 п. о.), выделенный из рекомбинантной плазмиды *pEP16* (*pUC19*, содержащей *SmaI*-*B*-фрагмент *pJC703*). *pIK4*-*EcoRI*-*PstI*-фрагмент (~900 п. о.); *pIK5*-*FokI*^{K1}-*SmaI*-фрагмент (линейный 5'-конец *FokI* достроен фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*) выделен из рекомбинантной плазмиды *pEP21* (*pUC19* со встроенным *BspRI*-фрагментом (882 п. о.) *rplJL*-оперона [11]); *pIK3* получена путем встраивания в *pNM481* *PstI*-фрагмента (640 п. о.) *pEP21*, содержащего промотор *P*_{L12} и гены *rplJ'L'*; *pIK7* содержит *SnaBI*-*PstI*-фрагмент, источником которого явился *PstI*-фрагмент (640 п. о.) *pEP21*; *b* — уровни активности β-галактозидазы, обеспечиваемые рекомбинантными плазмидами (в ед. Миллера)

Recombinant plasmids constructed for comparing levels of *E. coli rplKAIL* genes expression. *a* — regions of recombinant plasmids containing fragments of foreign DNA (arrows indicate restriction sites; bend lines — sites of ligation). *pIK6* contains *EcoRI* fragment (~800 bp) originated from *pEP16* (*pUC19* with an inserted *SmaI*-*B*-fragment of *pJC703*). *pIK4* is *pNM481* carrying 900 bp of *EcoRI*-*PstI*-fragment, and *pIK5*-*FokI*^{K1}-*SmaI*-fragment isolated from *pEP21* [11] (*FokI* protruding and refilled with *E. coli* DNA pol. I Klenow fragment); *pIK3* has been constructed by inserting 640 bp *PstI* fragment of *pEP21* on *pNM481*. *pIK7* contains the *SnaBI*-*PstI* subfragment of *pEP21*; *b* — levels of β-galactosidase activity provided with recombinant plasmids (Miller units)

rplK с промотором *P*_{L11} (*pIK6*), 5'-концевую часть гена *rplI* с промотором *P*_{L10} (*pIK4*) и без него (*pIK5*), 5'-концевую часть гена *rplL* с промотором *P*_{L12} (*pIK3*) и без него (*pIK7*). Физико-генетические карты плазмид приведены на рисунке. Для конструирования плазмид, получения и трансформации компетентных клеток *E. coli JM101* [6] были использованы стандартные методы, описанные в руководстве Маниатиса и др. [7]. Выделение плазмидной ДНК, расщепление ее эндонуклеазами рестрикции, электрофоретический анализ и получение фрагментов ДНК проводили, как указано в [7]. Использовали ферменты рестрикции и ДНК-лигазу *T4* производства НПО «Фермент» (Вильнюс), ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) производства НПО «Вектор» (Новосибирск). Ферментативную обработку производили в условиях, рекомендуемых изготовителями. Активность β-галактозидазы, обеспечиваемую присутствием в клетках рекомбинантных плазмид, измеряли по методу Миллера [8] без добавления каких-либо индукторов. Источником всех клонированных фрагментов была космида *pJC703* [9], сконструированная Дж. Коллинсом, а также сконструированные нами ранее [10, 11] рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты *pJC703*.

На рисунке приведена схема конструирования рекомбинантных плазмид и данные об активности β-галактозидазы, обеспечиваемой присутствием их в клетках *E. coli*.

Как можно заметить, химерные гены *rplK'-lacZ* (*pIK4*), *rplJ'-lacZ* (*pIK6*) и *rplL'-lacZ* (*pIK3*) под контролем собственных промоторов P_{L11} , P_{L10} и P_{L12} обеспечивают примерно равный уровень активности β -галактозидазы. По данным литературы [3], промотор P_{L12} примерно в 10 раз менее эффективен по сравнению с P_{L11} . Следовательно, присутствие его не может обеспечить столь высокого уровня экспрессии химерного гена *rplL'-lacZ* (*pIK3*) и гена *rplL* в интактном опероне *rplJL* *E. coli*.

При работе с *pNM481* мы обнаружили, что экспрессия химерных генов возможна и при встраивании в нее беспромоторных фрагментов ДНК, восстанавливающих рамку считывания гена *lacZ* и содержащих сайт инициации трансляции для слитного гена. Транскрипция таких генов обеспечивается, следовательно, каким-то промотором векторной плазмиды, расположенным выше и однонаправленно с геном *lacZ*. Таким промотором может являться P_4 , перенесенный при конструировании *pNM481* из плазмиды *pUC8*. Транскрипция с этого промотора неполностью терминируется *in vivo* [12]. Данный факт позволил сконструировать плазмиды *pIK5* и *pIK7*, обеспечившие *Lac'*-фенотип клеткам-хозяевам, и сравнить уровни активности β -галактозидазы, обеспечиваемые экспрессией генов *rplJ'-lacZ* без промотора P_{L10} и *rplL'-lacZ* без промотора P_{L12} . Как выяснилось, удаление промотора P_{L12} не снизило экспрессии химерного гена *rplL'-lacZ* (*pIK7*). Значительное превышение экспрессии этого гена по сравнению с *rplJ'-lacZ* (*pIK5*) отражает соотношение уровней синтеза рибосомных белков *L10* и *L7/L12*, кодируемых генами интактного *rplJL*-оперона *E. coli*.

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что промотор P_{L12} не определяет уровня экспрессии гена *rplL*. Незквивалентный синтез рибосомных белков *L10* и *L7/L12*, следовательно, может регулироваться более эффективной инициацией трансляции или большей стабильностью мРНК для *rplL*. Данные S1-картирования, однако, не выявляют гетерогенности 5'-конца бидирионного транскрипта *rplJL*, т. е. деградации части мРНК, кодирующей *L10*, что свидетельствует в пользу предположения о регуляции экспрессии гена *rplL* на уровне инициации трансляции.

STUDIES ON THE REGULATION OF *ESCHERICHIA COLI rplL* GENE EXPRESSION BY CONSTRUCTION OF *lacZ* FUSIONS ON *pNM481* PLASMID

E. B. Paton, I. V. Kroupskaya, A. N. Zhyvoloup

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

A series of recombinant *pNM481*-based plasmids has been constructed to study the regulation of *E. coli rplL* gene expression *in vivo*. Comparison of *rplJ'-lacZ'* and *rplL'-lacZ'* genes expression levels has revealed a more efficient initiation of translation for the latter. This might provide for the four-fold excess amount of *L7/L12* as against *L10* and all other *E. coli* ribosomal proteins.

1. Lindahl L., Zendel J. M. Ribosomal genes in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Genet.—1986.—20.—P. 297—326.
2. Downing M. L., Dennis P. P. Transcription products from the *rplKAL-rpoBC* gene cluster // J. Mol. Biol.—1987.—194, N 4.—P. 609—620.
3. An G., Friesen J. Characterization of promoter-cloning plasmids; analysis of operon structure in the *rif* region *Escherichia coli* and isolation of an enhanced internal promoter mutant // J. Bacteriol.—1980.—144, N 3.—P. 904—916.
4. Nucleotide sequence of ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase beta subunit in *Escherichia coli* / L. E. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 4.—P. 1697—1701.
5. Minton N. P. Improved plasmid vectors for isolation of translation *lac* gene fusions // Gene.—1984.—31, N 2.—P. 269—273.
6. Vieira J., Messing J. The *pUC* plasmids, an *M13mp7*-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Ibid.—1982.—19, N 2.—P. 259—268.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—479 с.
8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.—395 с.
9. Collins J. Deletions, insertions and rearrangement affecting *rpoB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.—1979.—173, N 1.—P. 217—220.

10. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.— С. 217—219.
11. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Ориентационные эффекты, вызываемые присутствием в плазмиде *pUC* фрагментов *rplIL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* // Там же.—1988.—4, № 3.— С. 163—167.
12. Plasmid vector *pBR322* and its special-purpose derivatives — a review / P. Balbas, X. Sobregon, E. Merino et al. // Gene.—1986.—50, N 1.— P. 3—40.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 20.06.88

УДК 577.112.088.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРЕОНИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ИЗ *Thermus thermophilus**

А. Д. Яремчук, М. А. Тукало, С. П. Егорова, Г. Х. Мацука

Аминоацил-тРНК синтетазы представляют группу ферментов, играющих существенную роль в реализации генетической информации. Их специфическое взаимодействие с тРНК до сих пор является одной из важнейших проблем молекулярной биологии. Особый интерес вызывает треонил-тРНК синтаза бактерий, поскольку для этого фермента показана отрицательная авторегуляция биосинтеза на уровне трансляции [1]. При этом установлено, что нуклеотидная последовательность участка собственной мРНК, с которым связывается треонил-тРНК синтаза при ингибировании трансляции, гомологична последовательности антикодонного стебля тРНК^{Thr}, который взаимодействует с треонил-тРНК синтазой. Следовательно, изучение комплекса тРНК^{Thr} с треонил-тРНК синтазой может способствовать выяснению молекулярного механизма взаимодействия оператора и репрессора трансляции. Для исследований удобным объектом является треонил-тРНК синтаза из экстремального термофила *T. thermophilus*, которая обладает высокой термостабильностью.

В настоящем сообщении описан метод выделения высокоочищенного препарата треонил-тРНК синтазы из *T. thermophilus*.

Бактериальная масса *T. thermophilus* выращена в Ин-те физиологии и биохимии микроорганизмов АН СССР, пострибосомальный супернатант был любезно предоставлен М. Б. Гарбер (Ин-т белка АН СССР). Суммарный препарат тРНК из *Escherichia coli* получен из ВНИИ прикл. биохимии (Олайне, ЛатвССР). Треонил-тРНК синтазную активность определяли по начальной скорости образования аминоацил-тРНК. Инкубационная смесь в 0,05 мл содержала 100 мМ трис-НСl-буфер, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ АТФ, 0,4 мМ ¹⁴С-треонин, 4 мг/мл суммарной тРНК *E. coli*, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ KCl и от 0,1 до 10 мкг белка (в зависимости от степени очистки фермента). Смесь инкубировали при 55 °С в течение 30 с. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшиеся осадки отмывали на миллиметровых фильтрах 50 мл 5 %-ной ТХУ. Радиоактивность проб определяли на сцинтилляционном счетчике SL-30 фирмы «Intertechnique» (Франция). За единицу активности треонил-тРНК синтазы принимали количество фермента, катализирующее аминокислотирование 1 нмоля тРНК^{Thr} за 1 мин при 55 °С. Молекулярную массу треонил-тРНК синтазы изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях при разных концентрациях геля [2], молекулярную массу субъединиц — с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии DS-Na [3].

На первой стадии очистки треонил-тРНК синтазы использовали высаливание пострибосомального супернатанта сульфатом аммония (45 % насыщения). Полученный осадок диализовали против 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,8, содержащего 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид натрия, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (буфер А) и наносили на колонку (5×50 см) с ДЭАЭ-сефарозой («Pharmacia», Швеция), уравновешенную этим же буфером. Элюцию проводили в буфере А в градиенте концентрации NaCl от 0,03 до 0,3 М. Фракцию, обладающую треонил-тРНК синтазной

* Представлена членом редколлегии А. В. Ельской.