

Bradyrhizobium sp. SNU001의 nod 유전자 클로닝

고세리 · 심웅섭* · 안정선

서울대학교 자연과학대학 생물학과, *고려대학교 이과대학 생물학과

대두(*Glycine max*) 뿌리혹의 질소고정 공생균주 *Bradyrhizobium japonicum* SNU001의 *nod* 유전자를 클로닝하였다. *Rhizobium meliloti*의 4.5 kb *EcoRI/HindIII* 절편을 탐침으로한 계놈 혼성화반응으로 분리균주의 계놈상에 *nod* 유전자가 존재함을 확인하고, lambda EMBL3-*BamHI* vector를 이용하여 genomic library를 작성하였다. 작성된 library로부터 1, 2차 선별과정을 통해 *nod* 유전자가 있는 클론 1-5를 선별하고, 클론 2로부터 *nod DABC* 탐침과 lambda DNA 탐침을 사용한 혼성화반응을 수행하여 삽입된 genomic DNA에 대한 부분적인 제한효소 지도를 작성하였다. *nod DABC* 탐침과 가장 강한 혼성화반응을 보인 phage 클론 lambda CNS-1의 3.9 kb-*BamHI* 절편을 pBS KS(+) vector에 subcloning하고 동일한 탐침을 이용한 혼성화반응을 통해 subclone pBjCNS-1을 선별하였다. 이 subclone에 대한 부분적인 제한효소 지도를 작성하여 *nod DABC*가 1.8 kb *KpnI/SacI* 절편에 존재함을 확인하였다.

KEY WORDS □ *nod* genes, Cloning, *Bradyrhizobium* sp. SNU001, Soybean (*Glycine max*), Root nodule

생물학적 질소고정 공생관계를 성공적으로 확립하기 위해서는 초기와 후기 nodulin을 비롯한 숙주식물의 유전자와 *nod*, *nif* 및 *fix* 등의 질소고정균주의 유전자가 조화를 이루며 발현되어야만 한다(22). 이 중에서 *nod* 유전자는 숙주식물의 세포분열과 뿌리털의 deformation에 관여하여(4) 뿌리혹을 형성하게 하는 유전자로서, *Rhizobium*인 경우 sym-plasmid에 밀집되어 존재하지만(12) *Bradyrhizobium*의 경우는 밀집되어 존재하지 않으며(16) 발현양상도 훨씬 복잡하게 이루어진다.

이들 유전자는 일반적으로 *nod ABC*처럼 거의 모든 *Rhizobium*에서 기능적으로 상호교환이 가능한 common *nod* 유전자와 *nod FE*, *nod G*, *nod H*, *nod LMN*처럼 숙주식물에 따라 발현이 중단되는 숙주특이적 유전자(host specific *nod* gene; *hsn* genes)로 구분된다(6). *nod D* 유전자는 항상 발현되지만 그 외의 유전자들은 숙주식물의 분비물이나 분해물에 노출되었을 때 발현이 유도되며(15) *nod D* 유전자 산물도 함께 관여한다.

식물체가 분비하는 *nod* 유전자의 발현 유도물질은 flavonoids로서, 알팔파와 클로버의 경우는 luteolin (17), DHF(18), 대두의 경우는 isoflavone과 daidzein (1, 11)이 특정한 *nod D* allele에 작용하여 다양한 숙주식물에 대한 폭넓은 반응을 유도한다.

nod D 유전자는 독립생활과 공생생활상태에서 항상 발현되는 유전자로 이 유전자의 산물 (Nod D, 33 kd 단백질)은 숙주식물의 분비물과 협력하여 다른 *nod* 유전자의 발현 유도하는 transcriptional acti-

vator로서(5) *nod A*, *nod F*와 *nod H*의 전사 시작부위로부터 26-28 bp 상류에 위치한 약 47 bp의 보존적인 서열(*nod box*)에 결합하는 것으로(19) 규명되었다. 한편 *nod ABC*는 독립생활 중에는 발현되지 않으며 *nod AB* 산물은 세포분열을 촉진하고 *nod C* 단백질은 소수성 C-말단을 가지며 공생균주의 외막과 연관되어 있는 것으로 알려졌다(7).

위에서 살펴본 대부분의 *nod* 유전자에 대한 연구는 조생균주인 *Rhizobium* sp.를 대상으로 활발하게 이루어졌으나 만생균주인 *Bradyrhizobium* sp.에 대해서는 연구가 상대적으로 미흡한 실정이다. 더우기 우리나라의 경우는 콩과식물과 *Rhizobium* 사이의 공생관계에 관한 연구가 많지 않은 실정으로, 해너콩의 공생균주 *Rhizobium* sp. SNU003의 분리(9) 및 *nif-H,D* 유전자 클로닝(8) 등이 있을뿐 *nod* 유전자에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 생육중인 대두(*Glycine max*)의 뿌리혹으로부터 분리한 공생균주 *Bradyrhizobium* sp. SNU001(10)의 *nod* 유전자를 연구하기 위한 첫 단계로, 공생균주의 genomic library를 작성하고 이로부터 *nod* 유전자를 가지고 있는 클론을 선별하여 부분적인 제한효소지도를 작성하였다.

재료 및 방법

총 DNA 분리, 계놈 혼성화반응 및 탐침 DNA 표지 본 실험에 사용한 균주는 대두(*Glycine max*) 뿌리

혹의 공생균주 *Bradyrhizobium* sp. SNU001을 사용하였으며, 균주의 배양, DNA분리 및 게놈 혼성화반응은 Ko 등(10)의 방법을 따라 수행하였다. *nod* 유전자의 검정에 쓰인 탐침은 *R. meliloti*의 *nod* 부위를 cosmid pLAFR1에 클론한 pRmSL26의 *nod* 유전자 절편이며(12), alkaline lysis(13) 방법에 따라 정제된 DNA를 *EcoRI/HindIII*로 이중절단하여 얻은 4.5 kb *nod DABC*의 절편 DNA 1 µg을 Amersham에서 구입한 nick-translation kit를 사용하여 [α - 32 P]로 표지하였다.

Genomic library의 작성

Bateson과 Pollard(2)의 방법에 따라 *BamHI*으로 부분절단 한 약 15 kb의 DNA 절편을 Lamda EMBL 3-*BamHI* arm에 ligation 시킨 후 packaging extract와 phage완충액을 첨가하여 phage library stock을 만들었으며, 이를 Maniatis 등(13)의 방법에 따라 숙주세포인 KW251에 흡착시킨 후 10-12 시간 배양하여 생성된 plaque 수를 세어 packaging 효율을 계산하였다.

nod 유전자가 삽입된 phage 클론 선별

nod 유전자를 포함하고 있는 phage plaque의 1차 선별은 Benton과 Davis(3)의 방법을 수정하여 수행하였다. Plaque이 형성된 phage plate를 4°C에서 1 시간동안 방치한 후 nylon 막으로 옮겼다. 이 막을 denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 5 분, neutralizing solution (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA)에 5 분씩 2 회 처리하고 U.V. transilluminator 상에서 5 분간 cross-linking시켰다. 혼성화반응과 방사선 사진법은 전술한 방법에 따라 수행하였다. *R. meliloti*의 *nod* 유전자에 강한 혼성화반응을 보인 phage plaque 부분을 1차로 선별하고 이로부터 뚜렷이 구분되는 단일 클론을 선별하기 위해 Maniatis 등(13)의 방법에 따라 2차 선별작업을 수행하였다.

선별한 phage 클론의 혼성화반응

2차 선별에서 최종적으로 선별된 5 개의 클론 중 클론 2로부터 liquid culture extraction protocol (Dr. Sue Wessler, Univ. of Georgia)을 사용하여 phage DNA를 분리하였고, *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* 등을 이용하여 단일 및 이중절단을 수행한 시료를 0.7 % agarose 수평젤에 전기영동한 후 nylon 막으로 옮겨(21) *R. meliloti*의 4.5 kb *nod DABC* 유전자와 lambda DNA를 탐침으로 각각 혼성화반응을 수행하였으며 그 결과를 토대로하여 부분적인 제한효소 지도를 작성하였다.

3.9 kb-*BamHI* 절편의 subcloning 및 제한효소 지도 작성

*R. meliloti*의 *nod* 유전자와 강한 혼성화반응을 보이는 lambda CNS-1의 3.9 kb-*BamHI* 절편을 *BamHI*으로 절단한 pBS KS(+) vector에 ligation 시켜서 JM101에 형질전환 시킴으로서 subcloning을 수행하였다(20). X-gal/IPTG/Amp 배지상에 형성된 흰색 콜로니들을 대상으로 전술한 방법에 따라 *R.*

*meliloti*의 *nod* 탐침으로 혼성화반응을 수행하여 3.9 kb의 *BamHI* 절편이 subcloning된 pBjCNS-1을 선별한 후 삽입된 DNA에 대한 부분적인 제한효소 지도를 작성하였다.

결과 및 고찰

DNA 정제 및 게놈 혼성화반응

정제한 *Bradyrhizobium* sp. SNU001의 총 DNA의 A₂₆₀/A₂₈₀의 값이 2:1로 염이나 유기용매의 오염이 없는 순수한 시료로 판단되었고, 전기영동 결과 50 kb 이상의 단일 밴드로 나타난 시료는 *EcoRI*을 비롯한 다양한 제한효소에 대한 단일 및 이중절단 양상도 양호한 것으로 나타나서(자료는 제시하지 않았음), 이를 앞으로의 클로닝 시료로 사용하였다. *R. meliloti*의 *nod* 유전자를 탐침으로하여 게놈 혼성화반응을 수행한 결과 7.8 kb, 7.0 kb, 5.6 kb, 1.6 kb *EcoRI* 절편, 13 kb, 4.6 kb, 1.8 kb *HindIII* 절편, 10 kb, 4.4 kb *BamHI* 절편, 6.4 kb, 5.4 kb, 3.8 kb, 1.4 kb *PstI* 절편, 2.6 kb, 2.3 kb, 1.95 kb *SacI* 절편, 3.5 kb, 2.2 kb, 2.1 kb, 1.8 kb *EcoRI/HindIII* 절편, 2.0 kb *HindIII/PstI* 절편, 2.5 kb, 1.7 kb *BamHI/KpnI* 절편에서 각각 혼성화반응이 나타났다(Fig. 1).

하나 이상 여러 밴드에서 혼성화반응이 나타난 것은 *nodD* 유전자의 경우 게놈내에 한 copy 이상 존재할 가능성을 시사하며, 전체적으로 혼성화반응의 결과가 약하게 나타난 것은 탐침으로 사용한 *R. meliloti*와 *Bradyrhizobium* sp.의 *nod* 유전자간 상동성이 낮을 것으로 생각된다(14).

Genomic library 작성

정제한 DNA를 *BamHI*으로 50 분간 부분절단을 수행한 후 10-40%의 sucrose gradient에서 원심분리하여 받은 각 분획을 0.4% agarose 수평젤에서 전기영동한 결과 3 번과 4 번의 분획이 약 15-20 kb의 크기를 갖는 것으로 나타나(자료는 제시하지 않았음)

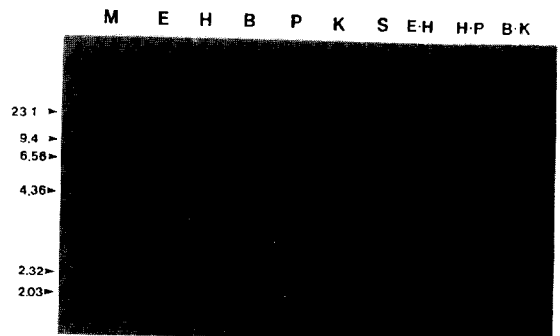


Fig. 1. Genomic hybridization pattern of *B. sp.* SNU 001 DNA to *R. meliloti* *nodDABC*. M, Lambda/*HindIII* size marker; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; P, *PstI*; K, *KpnI*; S, *SacI*. Scale units are in kb.

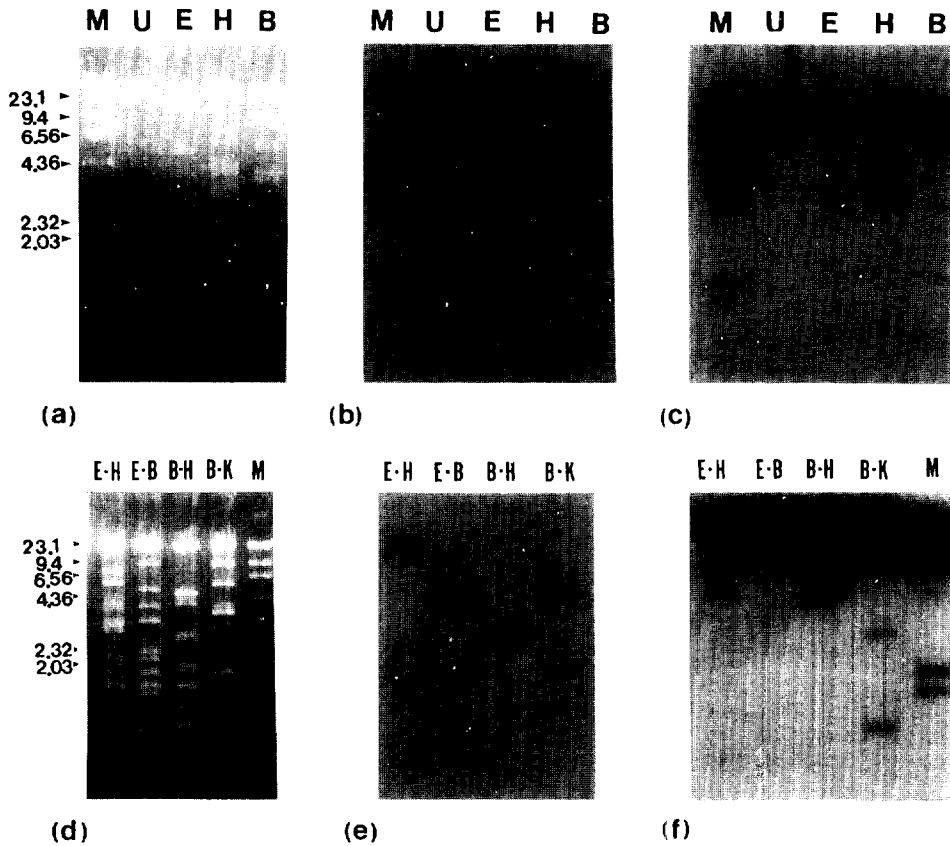


Fig. 2. Restriction enzyme digestion patterns of clone 2 DNA(a, d) and corresponding blots hybridized to *R. meliloti nodDABC* probe(b, e) and to labelled lambda DNA probe(c, f).

M, Lambda/*HindIII* size marker; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; K, *KpnI*; U, Uncut DNA. Scale units are in kb.

이 분획을 모아 ligation의 시료로 사용하였다. Lambda EMBL3-*BamHI* arm 0.5 μg 에 삽입 DNA 0.25 μg 을 ligation 시켜 *in vitro* packaging 시킨 결과 packaging efficiency가 약 3.8×10^4 pfu/ μg arm으로 계산되었다. 이는 *Rhizobium*과 같은 그램 음성 세균이며 계놈의 크기가 비슷한 *E. coli* (2.4×10^6 kdal)에서 약 20 kb의 삽입 DNA를 가지는 library를 작성할 때 계산상으로 약 1157 개의 plaque이 계놈의 99%를 대표한다는(23) 점을 감안하면 *Bradyrhizobium* sp. SNU001의 genomic library의 작성은 비교적 성공적이었다고 판단되었다.

nod 유전자가 삽입된 phage 클론 선별

1차 선별작업에서는 강한 혼성화반응을 보인 1 개의 phage 클론을 선별할 수 있었으며, 이로부터 다시 phage stock을 만든 후 2차 선별작업을 수행하여 분명하고 뚜렷이 구분이 되는 5 개의 클론을 선택하였다(자료는 제시하지 않았음). 이들을 각각 1,2,3,4,5로 구분하고, 클론 2를 앞으로의 실험 재료로 사용

하였다.

선별한 phage DNA의 혼성화반응 및 부분적인 제한효소 지도 작성

클론 2로부터 phage DNA를 분리하고 이를 *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*을 이용하여 단일 및 이중절단하고 전기영동하여 (Fig. 2a and d) nylon 막으로 옮기고 *nod DABC* 유전자 탐침으로 혼성화반응을 수행한 결과 15 kb *EcoRI*, 7.7 kb *HindIII*, 3.9 kb *BamHI*, 7.7 kb *EcoRI/HindIII*, 3.9 kb *EcoRI/BamHI*, 2.9 kb *HindIII/BamHI*, 3.9 kb, 2.2 kb *BamHI/KpnI* 절편들에서 강한 혼성화반응이 나타났다 (Fig. 2b and e). EMBL3-arm의 위치확인인 동일한 막에 대하여 lambda DNA를 탐침으로한 혼성화반응으로 확인할 수 있었다 (Fig. 2c and f). 이상의 결과를 토대로 lambda CNS-1으로 명명한 이 클론의 vector와 삽입 DNA의 위치를 확인하였고(Table 1) vector를 제외한 제한효소 절편들을 합한 크기인 약 23.5 kb의 삽입 DNA에 대한 제한효소 지도를 작

Table 1. Restriction enzyme fragments of cloned DNA hybridized with *nod* probe and lambda vector DNA, respectively

U	E	H	B	E/H	E/B	B/H	B/K
>30*	>20*	>20*	19.9	>20*	>20*	>20*	>20*
	15*	(15)	8.8	7.7	9.0	5.0	9.0
		7.7*	3.9*	5.9	3.9	4.2	3.9*
		5.5		4.2*		2.9*	3.2
		4.4					2.2*
							1.7

U, Uncut DNA; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; E/H, *EcoRI/HindIII*; E/B, *EcoRI/BamHI*; B/H, *BamHI/HindIII*; B/K, *BamHI/KpnI*.

* : hybridization signal with *nod* probe
 — : hybridization signal with lambda vector DNA
 () : partial digested fragment
 > : undigested and partial digested fragments

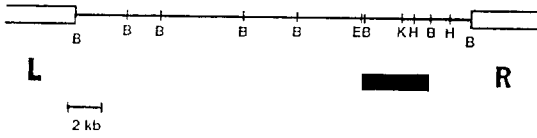


Fig. 3. Restriction map of inserted DNA in genomic clone 2, lambda CNS-1. Black box is the region showing hybridization signal to *R. meliloti nod DABC* probe. L, EMBL3 left arm; R, EMBL3 right arm; E, *EcoRI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*.

성하였다(Fig. 3).

제한효소 지도의 결과와 게놈 혼성화반응의 결과와 완전히 일치하지 않는 것은 게놈의 불완전 절단, 탐침 DNA와의 낮은 상동성에 기인한 약한 혼성화반응 및 게놈내에 여러 copy가 존재하기 때문이라고 생각된다.

3.9 Kb BamHI 절편의 subcloning 및 부분적 제한 효소 지도 작성

*R. meliloti*의 *nod* 유전자와 강한 혼성화반응을 보이는 lambda CNS-1의 3.9 kb *BamHI* 절편이 pBS KS(+) vector 2.96 kb에 subcloning 된것으로 판단되는 재조합 클론으로부터 DNA를 분리하고 *BamHI*을 비롯한 다양한 제한효소로 절단한 후 전기영동하고 (Fig. 4a) *nod DABC* 탐침을 이용하여 혼성화반응한 결과(Fig. 4b) 3.9 kb *BamHI* 절편이 subcloning 되었음을 확인할 수 있었으며, 5.7 kb의 *HindIII*, 2.8 kb의 *PstI*, 5 kb의 *KpnI*, 그리고 6.5 kb의 *SacI* 절편에서도 혼성화반응이 나타났다. 혼성화반응이 강하게 나타난 6.8 kb의 *EcoRI* 절편은 polycloning site의 *EcoRI* 인식부위가 절단되어 형성된 선형의 플라스미드이므로 subclone의 삽입 DNA 내부에 제한효소 인식부위가 존재하지 않음을 의미한다. 따라서 이 subclone의 삽입 DNA에는 *HindIII*, *KpnI*, *PstI* 및 *SacI*의 인식부위가 각각 하

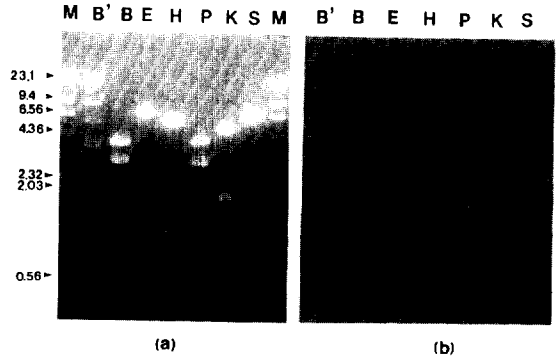


Fig. 4. Restriction digestion of pBjCNS-1(a) and corresponding blot hybridized to *R. meliloti nod DABC* probe(b).

M, Lambda/*HindIII* size marker; B', *BamHI* digested lambda CNS-1; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*; B, *BamHI*; K, *KpnI*; S, *SacI*. Scale units are in kb.

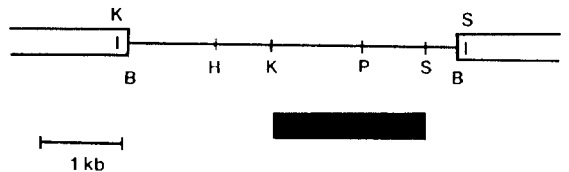


Fig. 5. Restriction map of pBjCNS-1. Black box shows region which hybridized to *R. meliloti nod DABC* probe.

H, *HindIII*; P, *PstI*; B, *BamHI*; K, *KpnI*; S, *SacI*.

나씩 있었다. 제한효소 인식부위를 비교한 결과 이 subclone에는 lambda CNS-1의 3.9 kb-*BamHI* 절편이 역방향으로 삽입되었으며, *nod* 유전자는 삽입 DNA 내의 1.8 kb *SacI/KpnI* 절편에 존재하였다. 이

subclone을 pBjCNS-1으로 명명하였으며 제한효소 절편과 혼성화반응의 결과를 토대로 부분적인 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 5).

그러나, 삽입 DNA의 내부에서 *nod D*, *nod A*, *nod B*, *nod C* 유전자의 위치는 명확히 구별해낼 수 없었다. 따라서 앞으로 이들 유전자를 탐침으로 사용하여 혼성화반응을 수행하고 그 결과를 토대로 보다 정확한 제한효소 지도를 작성해야 할 것이며 궁극적으로는 3.9 kb-*BamHI* 절편에 대한 염기서열을 결정해야 할 것이다.

사 사

본 연구는 교육부의 1990년도 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

- Banfali, Z., A. Nieuwkoop, M. Schell, L. Besl and G. Stacey. 1988. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.*, **214**, 420-424.
- Bateson, A.N. and J.W. Pollard. 1988. Construction of mammalian genomic libraries using lambda replacement vectors. In *Methods in Molecular Biology*. Vol. 4, New Nucleic Acids Techniques, J.M. Walker (ed.). Humana, New Jersey, pp. 235-255.
- Benton, D. and R.W. Davis. 1977. Screening lambda^{gt} recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science*, **196**, 180-182.
- Dudley, M.E., T.W. Jacobs and S.R. Long. 1987. Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta*, **171**, 289-301.
- Fisher, R.F., J.A. Swanson, J.T. Mulligan and S.R. Long. 1987. Extended region of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* 1021. II. Nucleotide sequence, transcription start sites and protein products. *Genetics*, **117**, 191-201.
- Horvath, B., C.W.B. Bachem, J. Schell and A. Kondorosi. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal interaction with the *nodD* gene product. *EMBO J.*, **6**, 841-848.
- John, M., J. Schmidt, U. Wieneke, H.D. Krüssmann and J. Schell. 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *Rhizobium meliloti* common nodulation protein NodC. *EMBO J.*, **7**, 583-588.
- Kang, M.S.. 1990 Molecular cloning of *nif-H*, *D* genes from symbiotic *Rhizobium* sp. SNU003 strain of *Canavalia lineata*. MS Thesis. Seoul National University.
- Kim, S.C. and C.S. An. 1989. Isolation of symbiotic *Rhizobium* spp. strain from root nodule of *Canavalia lineata*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **27**, 398-403.
- Ko, S., Y.K. Park and C.S. An. 1991. Characteristics of *Bradyrhizobium japonicum* SNU001, a symbiotic strain of *Glycine max*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **29**, 143-147.
- Kosslak, R.M., R. Bookland, J. Barkei, H.E. Paaren and E.R. Appelbaum. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7428-7432.
- Long, S.R., W.J. Buikema and F.M. Ausubel. 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. *Nature*, **298**, 485-488.
- Maniatis, T., E.F. Fritsh and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 256-294. 368-369. 464-465.
- Martinez, E., D. Romero and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **9**, 59-93.
- Mulligan, J.T. and S.R. Long. 1985. Induction of *Rhizobium meliloti* *nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6609-6613.
- Nieuwkoop, A.J., Z. Banfali, N. Deshmane, D. Gerhold, M.G. Schell, Sirotkin, K.M. and G. Stacey. 1987. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, **169**, 2631-2638.
- Peters, N.K., J.W. Frost and S.R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, **233**, 917-1008.
- Redmond, J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel and B.G. Rolfe. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*, **323**, 632-635.
- Rostas, K., E. Kondorosi, B. Horvath, A. Simoncsits and A. Kondorosi. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1757-1761.
- Sambrook, J., E.F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, **1**, 21-52.
- Southern, E.. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **38**, 503-512.
- Vincent, J.. 1974. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. In *Biology of Nitrogen Fixation*. A. Quispel, (ed.). North-Holland Press, Amsterdam, pp. 265-341.
- Winnaker, E.L.. 1987. From genes to clones.: Introduction to gene technology. VCH, New York, pp. 383-393.

(Received April 27, 1992)

(Accepted May 25, 1992)

ABSTRACT: Molecular Cloning of *nod* Genes from *Bradyrhizobium* sp. SNU001

Ko, Serry, Woong Seop Sim* and Chung Sun An (Department of Biology, Seoul National University, *Department of Biology, Korea University)

Molecular cloning of *nod* genes from *Bradyrhizobium* sp. SNU001, a nitrogen-fixing symbiont isolated from the root nodules of soybean (*Glycine max*), was carried out. *nod* genes were found to be located on the genome of the symbiont by genomic hybridization with 4.5 kb *EcoRI/HindIII* fragment (*nod DABC*) of *Rhizobium meliloti* as probe. Genomic library of this symbiont was constructed using λ phage EMBL3-*BamHI* vector, from which five *nod* positive clones were selected by primary and secondary screening methods. The partial restriction map of inserted genomic DNA of λ CNS-1(clone 2) was constructed, and 3.9 kb *BamHI* fragment, which showed strong hybridization signal to the probe, was subcloned into pBS KS(+) plasmid vector. Partial restriction map of a selected subclone (pBjCNS-1) was constructed and *nod DABC* was found to be located on the 1.8 kb *KpnI/SacI* fragment of this subclone.