

Rhizobium sp. SNU003의 *nifHD* 클로닝

강명수 · 안정선

서울대학교 자연과학대학 생물학과

해너콩 뿌리혹의 질소고정 공생균인 *Rhizobium* sp. SNU003 균주의 게놈내 7.9 kb의 *EcoRI*, 6.5 kb의 *Sall*, 7.3 kb의 *HindIII*와 4.4 kb의 *PstI* 절편에 *nifHD*가 존재함을 확인하였다. 람다 파아지 EMBL3-*BamHI* arm을 사용하여 genomic library를 제조하였으며 이로부터 *nif*-유전자를 포함하고 있는 9개의 재조합 파아지 클론을 선별하였다. 이들 중 15.3 kb의 삽입 DNA를 가지고 있는 Rnif-6 클론은 7.6 kb의 *BamHI/SacI* 절편에 *nifHD*가 위치하고 있었다. 따라서 이 절편을 pUC19에 subcloning하고 제한효소 지도를 작성한 결과 *Rhizobium* sp. SNU003의 *nifH*와 *nifD*는 4.5 kb의 *BamHI/BglII* 절편에 연속 배열하고 있었다.

KEY WORDS □ *nifH*, *nifD*, *Rhizobium* sp. SNU003, *Canavalia lineata*, genomic library

다양한 원핵생물은 질소고정효소 복합체의 작용으로 대기의 질소를 고정하며, 이들을 암호화하는 유전자(*nifH*, *D*, *K*)와 단백질 구조에 대해서 공생관계를 갖는 *Rhizobium*과 독립생활을 하는 *Klebsiella*, *Cyanobacteria* 등에서 많은 연구가 진행되었다(6).

이들 연구로부터 모든 질소고정효소 복합체는 두 개의 구성효소로 이루어져 있고, component I(nitrogenase MoFe protein or dinitrogenase)은 각각 *nifD*와 *nifK*가 암호화하는 분자량이 55 kd와 60 kd인 α , β 두 종류의 단위체가 두 개씩 모여진 사중합체이며, component II(nitrogenase Fe protein or dinitrogenase reductase)는 *nifH*가 암호화하는 분자량이 57~72 kd인 한 종류의 단위체가 두 개 모여진 이중합체임이 밝혀졌다(19, 25). 또한 각 단위체의 아미노산 서열(27) 및 DNA 염기서열(23)이 유사함이 밝혀져 질소고정효소 복합체는 매우 안정된 구조임이 규명되었다.

그러나 이러한 유사성에도 불구하고 *nif*-gene cluster에서의 유전자 배열 및 구성에는 많은 차이점이 발견되었다. 즉 독립생활을 하는 *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodospseudomonas capsulata*, *Azotobacter vinelandii*에서는 *nifHDK*가 하나의 오페론으로 연속 배열하고(2, 5, 13) 남조류의 일종인 *Anabaena* sp. 7120에서는 *nifK*가 *nifHD*의 3'에서 약 11 kb 정도 떨어져 배열한다(21). 또한 콩과식물과 공생하는 *Rhizobium* 속(屬)에서 *nif*-유전자의 구조도 일정하지 않는데 조생균(早生菌)인 *R. meliloti*, *R. leguminosarum*에선 *nifHDK*가 하나의 오페론으로 연속배열하지만(8, 24) 만생균(晩生菌)인 *R. japonicum*에서는 *nifDK*가 *nifH*의 약 17 kb 5' 상류에 별개의 오페론으로 구성되어 있다(12).

우리나라의 제주도에 자생하는 콩과 식물의 일종인

해너콩(*Canavalia lineata*)의 질소고정 공생관계에 대한 연구로는 해너콩의 뿌리혹으로부터 공생균주 *Rhizobium* sp. SNU003의 분리(15) 및 해너콩의 뿌리혹 발달 단계에 따른 뿌리혹 특이 단백질의 변화 양상(7)에 대한 보고가 있으나 공생균주의 유전자에 대한 연구는 아직 없는 상태이다.

따라서 본 연구는 해너콩의 질소고정 공생관계를 분자생물학적 수준에서 이해하기 위한 연구의 일환으로, *Rhizobium* sp. SNU003(15)의 게놈상에서 *nifH*, *D*, *K*의 존재를 확인하고, lambda EMBL3-*BamHI* 파아지 벡터를 사용하여 genomic library를 작성한 후, *nif*-유전자를 가지고 있는 재조합 파아지 *nif*-클론을 선별하고 *nifHD*를 subcloning하여 부분적 제한효소 지도를 작성하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

Rhizobium 균주로는 해너콩의 뿌리혹에서 분리한 *Rhizobium* sp. SNU003을 100 ml의 YEM 액체배지 (mannitol 10g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, yeast extract 0.4g per liter)에 접종하여 28°C 암소에서 12시간 동안 현탁배양하여 사용하였다. 탐침 DNA를 가지고 있는 여러 재조합 클론의 보관과 배양은 적절한 항생제를 첨가한 LB 배지를 사용하였다. 실험에 사용한 균주, 벡터 및 재조합 클론은 Table 1에 정리하였다.

총 DNA 분리 및 탐침 DNA 준비

배양하여 수확한 세포를 9.5 ml의 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 재분산시키고 10% SDS, proteinase K(20 mg/ml), 5 M NaCl, CTAB/NaCl 용액(10% CTAB/0.7 M NaCl)을 각각

Table 1. List of bacterial strains, bacteriophages and plasmids used.

| List | Relevant characters | Reference or source |
|--------------------------------|--|-----------------------|
| <i>Rhizobium</i> sp. SNU003 | symbiont of <i>Canavalia lineata</i> | (15) |
| <i>E. coli</i> JM101 | <i>supE</i> , <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)[F'$, <i>traD36 proAB</i> , <i>lacI^qZAM15]</i> | (29) |
| KW251 | F^- , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>metB1</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrB1</i> , <i>mcrA</i> , [<i>argA81:Tn10</i>], <i>recD1014</i> | (20) |
| Plasmid pSA1 | <i>nifHD</i> , 3.15 kb <i>HindIII/EcoRI</i> clone from <i>Klebsiella pneumoniae</i> in pBR322 | (11) |
| pSA30 | <i>nifYKDH</i> , 6.0 kb <i>EcoRI</i> clone from <i>Klebsiella pneumoniae</i> in pACYC184 | (5) |
| pRN7.6 | <i>nifHD</i> , 7.6 kb <i>BamHI/SacI</i> clone from <i>Rhizobium</i> sp. SNU003 in pUC19 | in this study (18) |
| pUC19 | 2.7 kb, Ap ^r , <i>lacZ</i> , plasmid vector | (18) |
| Bacteriophage EMBL3 | lambda phage vector, Spi ⁻ without stuffer arm | (9) |
| Rnif1~9 | <i>BamHI</i> clones from <i>Rhizobium</i> sp. SNU003 | in this study |

처리하고, 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24 : 1) 용액으로 2회 추출한 후 상층액을 IPA로 침전시키고 70% ethanol로 세척한 다음 1 ml의 TE 완충용액에 완전히 DNA를 용해시켰다(1). 탐침 DNA를 포함하고 있는 여러 재조합 플라스미드는 alkaline lysis 방법(17)으로 분리하였다. 재조합 플라스미드 pSA1을 *EcoRI/BglIII*로 절단한 0.7 kb 절편을 *nifH*, *BamHI/BglIII*의 1.07 kb 절편을 *nifD*, pSA30의 1.3 kb *SacI* 절편을 *nifK* 탐침으로 사용하였다. 이들 절편을 아가로스 젤에서 수확하여 nick translation 방법으로 [α -³²P]-dCTP로 표지하여 탐침으로 사용하였다(22).

계승 혼성화 반응

총 *Rhizobium* DNA를 여러 제한 효소로 절단하여 0.7% 아가로스 젤상에서 전기영동하고 나일론 막에 옮겼다(26). 비닐백에 이 막과 전혼성화 반응용액(6×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.5% SDS, denatured salmon sperm DNA 20 µg/ml)을 함께 넣고 65°C에서 1시간 동안 흔들어 주면서 반응시킨 후, 표지된 탐침 DNA를 specific activity가 약 5×10⁶ cpm/µg이 되도록 첨가하고 24시간 동안 혼성화 반응을 수행하였다(17).

Genomic library의 작성

총 DNA 200 µg에 50 U의 *BamHI*를 가하여 40 분간 부분 절단하고 5~25%의 NaCl 농도구배 위에서 37,000 rpm으로 초원심분리한 후 0.5 ml씩의 분획을 받고 0.3% 아가로스 젤에서 전기영동하여 평균 15 kb 정도가 되는 DNA 절편을 모아 ligation의 삽입 DNA 시료로 사용하였다(14). 이 시료와 0.5 µg의 EMBL3-*BamHI* arm을 1 : 1 및 2 : 1의 비율로 혼합하고 T4 DNA ligase를 처리하고, packaging extract를 처리한 후 파아지 완충용액(5.8g NaCl, 2g MgSO₄·7H₂O, 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5/1 l)을

500 µl 가하여 genomic library를 작성하였다(3). 제조한 library stock중 10 µl를 숙주 세포인 KW251에 흡착시키고 45°C의 top agar(Bacto tryptone 10g, NaCl 5g, 10 mM MgSO₄·7H₂O, agar 8 g/l)와 함께 혼합하고 LB 고형배지에 도말하여 37°C 암소에서 12시간 동안 배양한 후 생성된 plaque 수를 세어 패키징 효율을 계산하였다(17).

nif-유전자가 삽입된 재조합 파아지 클론의 선별

고형배지에 생성된 plaque를 나일론 막으로 옮기고 *nifD*를 탐침으로 혼성화 반응을 수행하여 일차 선별된 plaque로부터 파아지 완충용액에 파아지 stock을 만들고 이차 선별작업을 수행하였다(4).

선별한 재조합 파아지 DNA의 혼성화반응

최종적으로 선별한 재조합 파아지 클론에서 총 DNA를 분리(17)하고 여러 제한효소로 절단한 후 아가로스 수평 젤에서 전기영동하고 나일론막에 옮겼다(26). 이 막을 *nifH*와 *nifD*를 탐침으로 혼성화 반응을 수행하여 이들 파아지가 *nif*-유전자를 가지고 있는지 확인하였다(17).

nif-유전자의 subcloning 및 제한효소 지도작성

7.6 kb *BamHI/SacI* 절편을 해당 제한효소로 절단한 pUC19 벡터에 ligation시켜 subcloning 하였다(10). *nif*-유전자를 포함하고 있는 재조합 클론을 선별한 후, 여러 제한효소로 절단하고 *nifH*, *D* 및 *K* 각각을 탐침으로 하여 혼성화 반응을 수행하였으며 혼성화 반응의 결과로부터 제한효소 지도를 작성하였다.

결과 및 고찰

총 DNA의 분리

분리된 *Rhizobium* 균주 SNU003의 총 DNA는

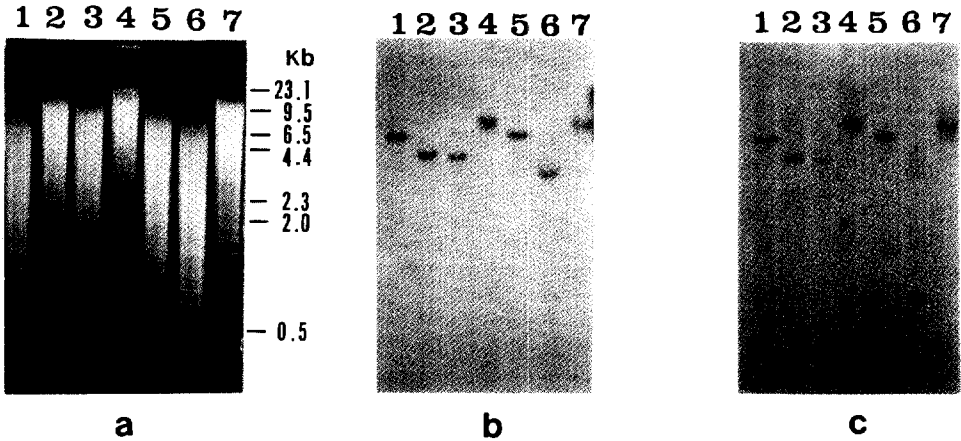


Fig. 1. Digestion patterns of *Rhizobium* sp. SNU003 DNA (a) and corresponding blot hybridized to *Klebsiella pneumoniae nifD* (b) and *nifH* (c).
1, *XhoI/SalI*; 2, *PstI*; 3, *HindIII/PstI*; 4, *HindIII*; 5, *SalI*; 6, *SalI/EcoRI*; 7, *EcoRI*.

A_{260}/A_{230} 의 값이 2.3. A_{260}/A_{280} 의 2.1로 염이나 유기 용매 및 단백질의 오염이 없는 순수한 시료였으며, 여러 제한효소에 대한 절단양상이 양호하여 클로닝의 시료로 사용하였다(자료 미제시).

Rhizobium 균주 SNU003 게놈의 혼성화 반응

총 DNA를 *EcoRI*, *EcoRI/SalI*, *SalI*, *HindIII*, *HindIII/PstI*, *PstI*, *XhoI/SalI*으로 절단하고(Fig. 1a) *nifD*와 혼성화 반응을 수행한 결과, 각각의 레인들에서 7.9, 3.5, 6.5, 7.3+6.8, 6.7+4.4, 4.4, 6.0 kb 절편에서 혼성화 반응이 나타났다(Fig. 1b). *nifH*를 탐침으로 사용했을 경우, 모든 레인들에서 *nifD*와 동일한 절편에서 혼성화 반응을 보였으나, *HindIII* 절단 레인을 제외한 다른 레인들에서는 1개에서 4개까지의 절편에서 부가적인 혼성화 반응을 보였다(Fig. 1c). *nifK* 탐침에 대해서도 혼성화 반응을 수행한 결과 *HindIII/PstI*, *XhoI/SalI* 절단 레인에서는 혼성화 반응이 나타나지 않았고 다른 레인에서는 *nifH*의 경우와 동일한 절편에서 혼성화 반응이 나타났으나 반응의 강도면에서 매우 희미하였다(자료 미제시). 이는 모든 질소 고정 세균에서 *nifK* 유전자의 보존 정도가 *nifH*와 *D*보다 낮다는 보고들과 일치한다(8, 16). 이로부터 *Rhizobium* sp. SNU003 게놈내 *nifH*와 *nifD*가 4.4 kb의 *PstI* 절편에서 7.9 kb의 *EcoRI* 절편내에 존재하고 있음을 알 수 있었다.

Genomic library의 작성

Sucrose 농도구배에서 초원심분리한 후 수확한 20개의 분획들 중에서 6번 분획부터 10번 분획까지의 DNA가 약 10~20 kb의 크기를 갖는 것으로 나타나(자료 미제시) 이들을 모아 ligation의 시료로 사용하였다. Genomic library의 패키징 효율은 2.0×10^4 pfu/ μ g arm으로 계산되었다. 이는 같은 그림음성 세균이며 게놈의 크기가 2.4×10^6 kdal로 *Rhizobium*과 비슷한 *E. coli*에서 약 20 kb의 삽입 DNA를

갖는 library를 작성할 때 1157개의 pfu이면 게놈의 99%를 대표한다는 점(28)을 감안하면 *Rhizobium* sp. SNU003의 genomic library 작성은 비교적 성공적이라고 판단되었다.

nif-유전자가 삽입된 재조합 파아지 클론의 선별

제조한 library에서 *nifHD*를 가지고 있는 재조합 파아지 클론을 얻기 위해 1차 및 2차 선별작업을 수행하였다. 일차 선별작업으로 한 plate에서 2개의 파아지 클론을 선별하였으며, 이로부터 이차 선별작업을 수행하여, 뚜렷이 구분되는 9개를 선택하여 Rnif 1~9로 구별지었다(자료 미제시).

선별한 재조합 파아지 DNA의 혼성화반응

선별한 파아지 클론 중 Rnif-1, 2, 3, 5, 6의 DNA를 분리하여 *BamHI*, *SalI*, *EcoRI*, *PstI*으로 절단하고 전기영동한 결과 동일한 절단 양상을 보여 동일한 클론으로 확인하였다(자료 미제시). 이 중에서 Rnif-6 클론의 DNA를 *BamHI/SacI*으로 절단하여 전기영동하고(Fig. 2a) 혼성화 반응을 실시한 결과 7.6 kb 절편이 *nifD* 탐침과 혼성화 반응을 나타내었다(Fig. 2 b).

nif-유전자의 subcloning 및 제한효소 지도작성

Rnif-6 클론내에서 *nifDH*와 혼성화 반응을 보이는 7.6 kb의 *BamHI/SacI* 절편을 pUC19 벡터에 subcloning한 후 원하는 절편이 들어있는 클론을 확인하여 pRN7.6으로 명명하였다. 이 클론의 DNA를 분리하여 *BglII*를 비롯한 5가지의 제한효소로 단일 및 이중절단을 수행하여 전기영동하고(Fig. 3) *nifH* (Fig. 4a)와 *nifD*(Fig. 4b)에 대해서 개별적으로 혼성화 반응을 수행하여 얻은 결과를 Table 2에 정리하였다. 탐침으로 사용한 *nifH*는 *K. pneumoniae*의 *nifH* 중 절반 정도를 가지고 있고 *nifD*는 *K. pneumoniae*의 *nifD*와 *nifH* 일부를 포함하고 있어 실제로는 *nifDH* 탐침이다(5, 11). 따라서 *nifD*와 혼성화 반응을 나타낸

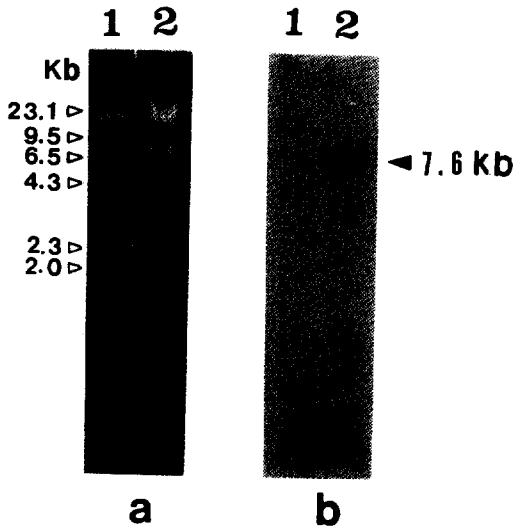


Fig. 2. Digestion pattern of *Rnif-6* clone (a) and blot hybridized to *Klebsiella pneumoniae nifD* probe (b).
1, lambda/*Hind*III; 2, *Bam*HI/*Sac*I.

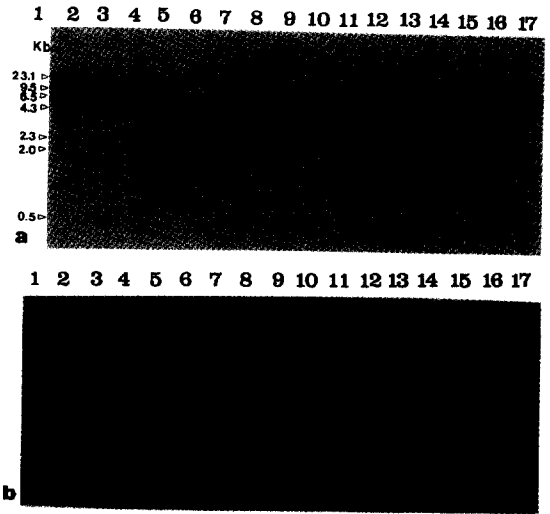


Fig. 4. Restriction fragments hybridized to *nifH* (a) and *nifD* (b).
Lane indication is the same as Fig. 3.

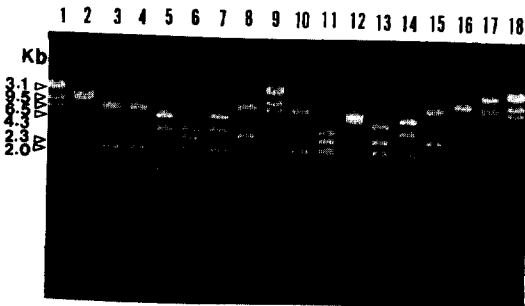


Fig. 3. Digestion patterns of *pRN7.6*.
1, 9, 18, Lambda DNA/*Hind*III; 2, *Bgl*II; 3, *Eco*RI/*Bgl*II; 4, *Eco*RI; 5, *Pst*I/*Bgl*II; 6, *Pst*I/*Eco*RI; 7, *Pst*I; 8, *Sac*I/*Bgl*II; 10, *Sac*I/*Eco*RI; 11, *Sac*I/*Pst*I; 12, *Bam*HI/*Bgl*II; 13, *Bam*HI/*Eco*RI; 14, *Bam*HI/*Pst*I; 15, *Bam*HI/*Sac*I; 16, *Bam*HI; 17, *Rnif-6* digested with *Bam*HI/*Sac*I.

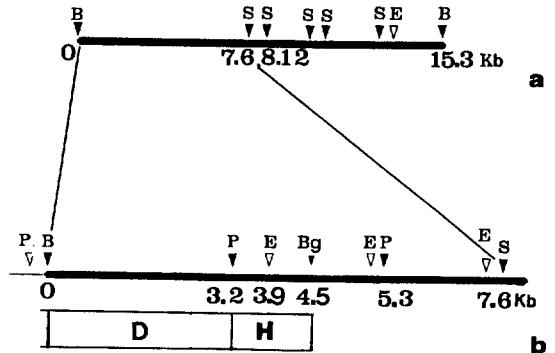


Fig. 5. Partial restriction maps of *Rnif-6* (a) and *pRNIF 7.6* (b).
The numbers marked are the size of fragments from left terminal in *Bam*HI insert.
B, *Bam*HI; S, *Sac*I; Bg, *Bgl*II; P, *Pst*I; E, *Eco*RI.

Table 2. Restriction fragments (in kb) of *pRN7.6*, a *pUC19* clone with 7.6 Kb insert.

| Bg | EBg | E | PBg | PE | P | ScBg | ScE | ScP | BBg | BE | BP | BSc | B |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 10.3 ^d | 6.5 ^d | 6.5 ^d | 5.1 | 3.2 ^d | 5.0 | 7.2 ^d | 6.5 ^d | 3.2 ^d | 5.9 | 3.9 ^d | 5.0 | 7.6 ^d | 10.3 ^d |
| | 2.1 | 2.1 | 3.2 ^d | 2.7 | 3.2 ^d | 3.1 | 2.1 | 2.7 | 4.5 ^d | 2.7 | 3.2 ^d | 2.7 | |
| | 0.7 | 1.4 ^h | 1.4 ^h | 2.0 | 2.1 ^h | | 1.3 ^h | 2.3 | | 2.1 | 2.1 ^h | | |
| | 0.7 ^h | 0.3 | 0.67 | 1.3 ^h | | | 0.3 | 2.1 ^h | | 1.3 ^h | | | |
| | 0.3 | | | 0.7 ^h | | | | | | 0.4 | | | |
| | | | | 0.3 | | | | | | | | | |
| | | | | 0.1 | | | | | | | | | |

B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; Sc, *Sac*I; P, *Pst*I; E, *Eco*RI.

^{-d}, Restriction fragments hybridized to *nifD* probe of *K. pneumoniae*.

^{-h}, Restriction fragments hybridized to *nifH* probe of *K. pneumoniae* additionally.

2개의 절편 중 1개는 실제로는 *nifH*의 일부와 반응한 것이므로 Table 2에서는 이것을 *nifH*와 부가적으로 혼성화 반응을 나타낸 절편으로 표시하였다.

이상의 결과를 요약하여 제한효소 지도를 작성한 결과, Rnif-6 클론은 7.6 kb의 *Bam*HI/*Sac*I 절편을 포함하는 약 15.3 kb의 삽입 DNA를 가지고 있고(Fig. 5a) pRN7.6의 4.5 kb의 *Bam*HI/*Bgl*II 절편에 *nifH*와 *nifD*가 연속 배열하고 있었다(Fig. 5b). 이러한 *Rhizobium* sp. SNU003 계통의 *nifHD* 배열은 *nifH*와 *nifD*가 연속 배열하고 있다는 점에서 조생균인 *R. meliloti*와 *R. leguminosarum*의 경우와 유사하며(8, 24), *Rhizobium* sp. SNU003이 형태적, 생리적인 면에서 이들 균주와 유사하다는 보고(15)와 일치한다.

사 사

본 연구는 1988~1990년도 과학재단의 목적기초 연구비 지원에 의해 일부 수행된 것임.

참 고 문 헌

1. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
2. Avtges, P., O.A. Scolnick, and R. Haselkorn, 1983. Genetic and physical map of the structural genes (*nifH*, *D*, *K*) coding for the nitrogenase complex of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* **156**, 251-256.
3. Bateson, A.N. and J.W. Pollard, 1988. Construction of mammalian genomic library using lambda replacement vector. p. 235-255. In J.M. Walker (ed.), Methods in molecular biology, vol. 4. New nucleic acids techniques. Humana, New Jersey.
4. Benton, D. and R.W. Davis, 1977. Screening lambda-*gt* recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
5. Cannon, F.C., G.E. Riedel, and F.M. Ausubel, 1979. Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized. *Mol. Gen. Genet.* **174**, 59-66.
6. Cannon, F.C., S. Hill, E. Kavanaugh, and F. Cannon, 1985. A molecular genetic study of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae* at the level of transcription, translation and nitrogenase activity. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 198-206.
7. Choi, S.H. and C.S. An, 1990. Changes in nodule-specific proteins during nodule development of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Bot.* **34**, 121-127.
8. Corbin, D., L. Barran, and G. Ditta, 1983. Organization and expression of *Rhizobium meliloti* nitrogen fixation genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **80**, 3005-3009.
9. Frischauf, A., H. Lehrach, A. Poustka, and N. Murry, 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**, 827-842.
10. Hackett, P.B., J.A. Fuchs, and T.W. Messing, 1988. An introduction to recombinant DNA techniques, p. 113-130. Benjamin/Cummings, Tokyo.
11. Hadel, R.G., A.R.J. Eaglesham, and A.A. Szalay, 1983. Conservation of DNA regions adjacent to *nifKDH* homologous sequences in diverse slow-growing *Rhizobium* strains. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 225-236.
12. Hanas-Martin, F. and H. Henneck, 1984. Linkage map of the *Rhizobium japonicum nifH* and *nifDK* operons encoding the polypeptides of the nitrogenase enzyme complex. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 537-540.
13. Jacobson, M.R., K.E. Brigle, L.T. Bennett, R.A. Setterquist, M.S. Wilson, V.L. Cash, W.E. Newton, J. Beynon, and D.R. Dean, 1989. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171**, 1017-1027.
14. Kaiser, K. and N.E. Murray, 1985. The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic library, p. 1-48. In D.M. Glover (ed.), DNA Cloning, vol. 1. IRL Press, Oxford.
15. Kim, C.S. and C.S. An, 1989. Isolation of symbiotic *Rhizobium* spp. strain from root nodule of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 398-403.
16. Klauza, K. and H. Hennecke, 1984. Fine structure analysis of the *nifDK* operon encoding the α and β subunits of dinitrogenase from *Rhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 35-42.
17. Maniatis, T., E.F. Fritsh, and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
18. Messing, N., 1983. New M13 vector for cloning, p. 20-30. In Methods in enzymology, vol. 101. Academic Press, New York.
19. Mortenson, L.E. and R.N.F. Thorneley, 1979. Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 387-418.
20. Murray, N., 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**, 53-58.
21. Rice, D., B.J. Mazur, and R. Haselkorn, 1982. Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **257**, 13157-13163.
22. Rigby, P.W.J., M. Diekmann, C. Rhodes, and P. Berg, 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.
23. Ruvkun, G.B. and F.M. Ausubel, 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 191-195.
24. Schetgens, T.M.P., G. Bakkeren, C. van Dun, J.G. J. Hontelez, R.C. van den Bos, and A. van Kammen, 1984. Molecular cloning and functional characterization of *Rhizobium leguminosarum* structural

- nif*-genes by site-directed transposon mutagenesis and expression in *Escherichia coli* mini cells. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 406-421.
25. Smith, B.E., F. Campbell, R.R. Eady, M. Eldridge, C.M. Ford, S. Hill, E.P. Kavanage, D.J. Lowe, R. W. Miller, T.H. Richardson, R.L. Robson, R.N.F. Thorneley, and M.G. Yates, 1987. Biochemistry of nitrogenase and the physiology of related metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B317**, 131-146.
 26. Southern, E., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-512.
 27. Tanaka, M., M. Haniu, J. Yasunobu, and L. Mortenson, 1977. The amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* iron protein, a component of nitrogenase. *J. Biol. Chem.* **252**, 7093-7100.
 28. Winnacker, E.L., 1987. From genes to clones: Introduction to gene technology. p. 383-393. VCH, New York.
 29. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing, 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strain; nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

(Received January 30, 1993)

(Accepted February 22, 1993)

ABSTRACT: Molecular Cloning of *nifHD* from *Rhizobium* sp. SNU003

Kang, Myung-Soo and Chung Sun An (Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Genes for dinitrogenase reductase (*nifH*) and dinitrogenase α subunit (*nifD*) were found to be located on 7.9 kb of *EcoRI*, 6.5 kb of *SalI*, 7.3 kb of *HindIII* and 4.4 kb of *PstI* fragments of the genomic blot of *Rhizobium* sp. SNU003, a symbiotic strain from root nodule of *Canavalia lineata*. Nine recombinant phage *nif*-clones were selected from the genomic library constructed by using EMBL-3 *BamHI* arms of bacteriophage lambda. Among them, Rnif-6 had insert DNA of 15.3 kb, in which 7.6 kb of *BamHI/SacI* fragment contained *nifHD* region. Therefore, the 7.6 kb fragment was subcloned into pUC19 and partial restriction map was constructed. As the results, *nifH* and *nifD* were found to be located continuously on 4.5 kb of *BamHI/BglII* in the genome of *Rhizobium* sp. SNU003 strain.