

보리수나무 뿌리혹 공생균주인 *Frankia* EuIK1의 *nifH*, *D* 클로닝

김호방 · 김준호 · 송순달¹ · 안정선*

서울대학교 자연과학대학 생물학과, ¹경북대학교 자연과학대학 생물학과

보리수나무 (*Elaeagnus umbellata*) 뿌리혹에서 분리한 공생균주인 *Frankia* 균주 EuIK1 계능에 대해 *K. pneumoniae*의 *nifH*, *D*를 탐침으로 Southern hybridization을 수행한 결과, 3.2 Kb와 5.5 Kb *Bam*HI 절편과 15 Kb *Pst*I 절편이 강한 혼성화 반응을 보여 이들 절편에 *nifH*, *D* 유전자가 존재함을 확인하였다. 동일 탐침을 사용한 colony hybridization을 통해 pWE15 cosmid vector에 작성된 계능 library로부터 하나의 *nif*-클론 (pEuNIF)을 선별하였다. 이 클론을 *Bam*HI으로 절단한 후 동일한 탐침으로 혼성화 반응을 수행한 결과, 3.2 Kb와 5.5 Kb가 강한 혼성화 반응을 보였으며, 이 결과는 계능 혼성화 반응 결과와 일치하였다. 그러나 *Frankia* FaC1의 *nifH* 만을 탐침으로 이용한 결과 3.2 Kb *Bam*HI 절편만이 혼성화 반응을 나타내었다. 또한 3.2 Kb의 3' 말단과 5.5 Kb의 5' 말단의 염기서열로부터 추론한 아미노산 서열을 Ar13의 *nifD*와 비교한 결과 182번부터 240번까지, 241번부터 282번까지의 아미노산 서열과 각각 매우 높은 유사성을 보였다. 이러한 결과로부터 3.2 Kb 절편에는 *nifH*와 일부의 *nifD* 서열이 존재하고, 이 절편에 연속된 5.5 Kb 절편에는 나머지 *nifD* 서열이 존재함을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ *Elaeagnus umbellata*, *Frankia* EuIK1 strain, genomic library, *nifH*, *D*, molecular cloning

대기 중의 질소는 질소고정 세균에서 합성되는 질소고정 효소복합체의 작용으로 생물학적으로 고정된다 (6). 질소고정 효소복합체는 두 개의 component로 이루어져 있는데, component I (dinitrogenase, FeMo protein)은 분자량이 55 kD과 60 kD인 소단위가 두 개씩 모여 구성된 사합체이며 component II (dinitrogenase reductase, Fe protein)는 57~72 kD인 소단위가 두 개 모여 구성된 이합체이다 (13, 20).

질소고정 효소복합체를 암호화하며 발현조절에 관여하는 유전자를 *nif*-유전자라 하는데, *Klebsiella pneumoniae*에서는 약 25 kb의 *nif*-유전자 cluster 안에 21개 정도의 *nif*-유전자들이 7~8개의 operon에서 전사된다. *nif*-유전자 중 *nifD*와 K 유전자는 component I을 구성하는 두 소단위를 암호화하며 *nifH* 유전자는 component II를 구성하는 소단위를 암호화한다 (17).

오리나무 (*Alnus*), 보리수나무 (*Elaeagnus*), 소귀나무 (*Myrica*) 등 21속 200여종에 이르는 숙주식물의 뿌리혹에서 대기질소를 고정하는 공생균은 방선균의 일종인 *Frankia*로 알려졌으며, 이러한 비콩과 목본 식물에 의한 질소고정 공생관계를 actinorhizal symbiosis라 한다 (22).

Frankia 균주의 *nif*-유전자에 대해서는 Normand 등 (15)이 Ar13 균주의 *nifH* 유전자의 염기서열을 보고한 것을 시작으로 근래에 연구가 진행되었으나 전체 *nif* operon에 대한 정보는 없는 실정이다. An 등 (1)은

Alnus viridis ssp. *crispa*로부터 분리된 *Frankia* FaC1 균주(12)의 *nifH*, *D*, *K*를 함유하는 genomic 클론을 이용하여 이들 유전자의 배열양상이 다른 *Frankia* 균주와 마찬가지로 연속적으로 배열되어 있음을 밝히고 *nifD*와 K 일부의 염기서열을 결정하였으며, 최근에 FaC1 균주의 *nifH*에 대한 염기서열을 밝혔다 (16). 그러나 DNA homology 및 생리적 특성 등에서 오리나무 분리균주와는 다른 성질을 갖는 보리수나무 분리균주의 *nif*-유전자에 대한 연구로는 *Elaeagnus umbellata*에서 분리한 EUNIF로부터 *nif*-클론을 선별하고 이 클론의 *nifH* 와 *D*에 대한 유전자 지도를 작성한 보고 (15) 등이 있을 뿐 매우 초보적인 단계에 머물러있다.

따라서 본 연구에서는 *Frankia* 균주의 *nif*-유전자들의 배열양상, 염기서열, 발현조절에 관한 연구의 일환으로 우리나라에서 자생하는 보리수나무 뿌리혹에서 분리한 *Frankia* EuIK1 균주 (10)에 대한 계능 library를 작성하고 이로부터 *nifH*, *D*를 클로닝하고자 하였다.

재료 및 방법

제한효소, 시약 및 kits

각종 제한효소, 시약 및 kit들은 BM (restriction enzymes), USB (DNA sequencing kit), Promega (nick-translation kit, ligase), Amersham (nylon membrane, [α -³²P]-dCTP, [³²S]dATP S)과 Sigma

(기타 시약)에서 구입하여 사용하였다.

균주 및 플라스미드

Frankia 균주는 보리수나무의 뿌리혹에서 분리한 *Frankia* EuK1 균주를 사용하였다 (10). 계놈 library 작성을 위해 cosmid vector인 pWE15 (Stratagene)를 사용하였고, plasmid vector로는 pBluescript와 pUC19를 사용하였다. 재조합 DNA의 transformation을 위한 숙주세포로는 *E. coli* 균주인 JM101과 NM554를 사용하였다.

DNA 분리

배양하여 수확한 *Frankia* 균체를 GTE 완충용액 (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0)에 현탁시키고 lysozyme, proteinase K 및 SDS를 처리하여 세포를 파괴한 후, phenol 및 chloroform으로 단백질을 제거한 후 에탄올로 침전시켜 총 DNA를 분리하였다 (9). Cosmid와 plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법 (18)을 사용하였다.

합성 DNA 표지

탐침 DNA로는 *K. pneumoniae*의 *nifH*, *D* 유전자를 함유하는 pSA1의 3.15 Kb *EcoRI*/*HindIII* 절편 (7)과 *Frankia* FaC1 균주의 *nifH* 유전자를 함유하는 pANOH의 0.8 Kb *XhoI*/*SalI* 절편 (16)을 사용하였으며, DNA 표지는 nick-translation system (Promega)을 사용하여 [α - 32 P]-dCTP로 표지하였다.

계놈 혼성화 반응

정제된 *Frankia* EuK1 총 DNA를 *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*으로 절단하여 0.7% agarose 겔 상에서 전기영동하고 Southern (21)의 방법에 따라 nylon 막으로 옮긴 후 탐침 DNA로 혼성화 반응을 수행하였다.

계놈 library 작성

총 DNA 100 μ g에 25 units의 *BamHI*을 가하여 37°C에서 25 분간 부분절단하고 10~40% sucrose/NaCl 농도구배 위에 적재한 후 25,000 rpm에서 초원심 분리하였다. 원심분리 후 튜브 하부로부터 0.5 ml 씩 분획을 받은 후 각 분획에서 일부를 취해 0.4% agarose 겔에서 전기영동하여 DNA 절편의 크기가 30~50 kb가 되는 분획을 확인하고 이들 분획의 DNA를 모아 삽입 DNA 시료로 사용하였다 (5). 삽입 DNA 시료를 *BamHI*과 alkaline phosphatase로 처리된 pWE15 cosmid vector와 혼합한 후 T4 DNA ligase로 ligation시키고, GigapackII packaging extract (Stratagene)를 첨가하여 20°C에서 90분간 반응시킨 후 500 μ l의 phage 완충용액 (5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO₄, 50 ml 1 M Tris-Cl pH 7.5, 5 ml 2% gelatin per liter)을 첨가하여 genomic library를 작성하였다.

계놈 library로부터 *nifH*, *D* 클론 선별

제조된 계놈 library에서 일부의 phage를 취해 숙주세포인 *E. coli* 균주 NM554에 transfection시켜

균체가 형성되도록 한 후 ampicillin이 함유된 LB 고체 배지에 도말하고 이들을 *nif*-클론 선별에 이용하였다. 형성된 균체를 Sambrook 등 (18)의 방법에 따라 나이론 막으로 옮긴 후 탐침 DNA로 혼성화 반응을 수행하였다.

nif-유전자의 subcloning

최종적으로 선별된 *nif*-클론으로부터 cosmid DNA를 분리하여 *BamHI*으로 절단하고 agarose 겔에서 전기영동한 후 나이론 막으로 옮겼다. 이 막에 대해 *K. pneumoniae*의 *nifH*, *D*를 탐침으로 혼성화 반응을 수행하여 원하는 *nif*-유전자를 가지고 있는 DNA 절편을 확인하였다. 혼성화 반응을 보인 5.5 kb와 3.2 kb *BamHI* 절편을 pUC19과 pBluescript의 *BamHI* 부위에 각각 subcloning 하였다.

염기서열 결정 및 분석

염기서열 결정은 M13 reverse primer (NEB)와 -40 primer (USB)를 사용하여 Sanger 등 (19)의 방법을 이용하여 결정하였다. Sequenase version 2.0 system (USB)을 이용하여 반응을 시킨 후 6% acrylamide-urea sequencing gel에서 전기영동하였고 전기영동한 gel은 10% acetic acid, 12% methanol 용액에서 urea를 제거한 후 건조시켜 X-ray 필름에 노출 시켜서 autoradiogram을 얻어 판독하였다.

결정된 염기서열 및 이로부터 유도된 아미노산 서열에 대해 다른 서열과의 유사도 분석에는 Intelli-Genetic Inc.의 PC-GENE program을 이용하였다.

결과 및 고찰

계놈 혼성화 반응

Frankia 균주 EuK1에서 분리한 총 DNA를 *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*으로 절단한 후 0.7% agarose 수평겔에서 전기영동하였다 (Fig. 1A). 같은 양의 DNA를 동일한 조건에서 동일한 제한효소 양으로 절단했을 때, *EcoRI*과 *HindIII*에 비해 *BamHI*과 *PstI*이 양호한 절단양상을 보였다. *BamHI*과 *PstI*은 *EcoRI*과 *HindIII*에 비해 제한효소 인식부위의 G+C 비율이 높다는 점을 감안할 때, 이러한 절단 양상은 *Frankia*의 G+C%가 비교적 높은 68~72%라는 보고 (2)와 어느정도 관련이 있는 것으로 추정된다. 0.7% agarose 수평겔에서 전기영동한 후 nylon 막으로 옮겨 *Klebsiella pneumoniae*의 *nifH*, *D* 유전자를 탐침으로 혼성화 반응을 수행한 결과 다양한 절편에서 혼성화 반응이 나타났다 (Fig. 1B). 특히 5.5 kb 및 3.2 kb *BamHI* 절편과 15 kb *PstI* 절편에서 강한 혼성화 반응을 보여 이들 절편에 *nifH* 혹은 *D* 유전자가 존재함을 확인할 수 있었다.

계놈 library 작성

부분절단된 *Frankia* EuK1 균주의 총 DNA를 10~40% sucrose/NaCl 농도구배에서 초원심분리한 후 수확한 분획들 중 29에서 35번 분획이 pWE15

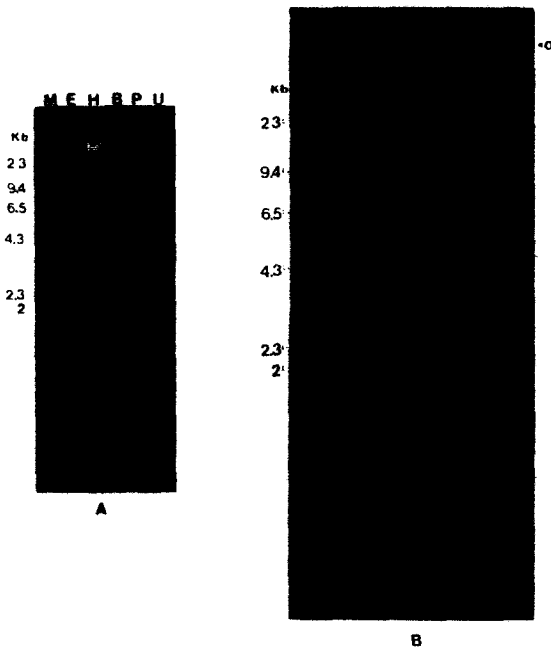


Fig 1. Restriction enzyme digestion pattern of genomic DNA from *Frankia EulK1* strain (A) and corresponding blot hybridized with 315 Kb insert of pSA1 containing *nifH* and D of *K. pneumoniae* (B). 3 μ g of genomic DNA was digested with *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, respectively. M: λ /*HindIII* size marker; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; P, *PstI*; U, uncut genomic DNA.

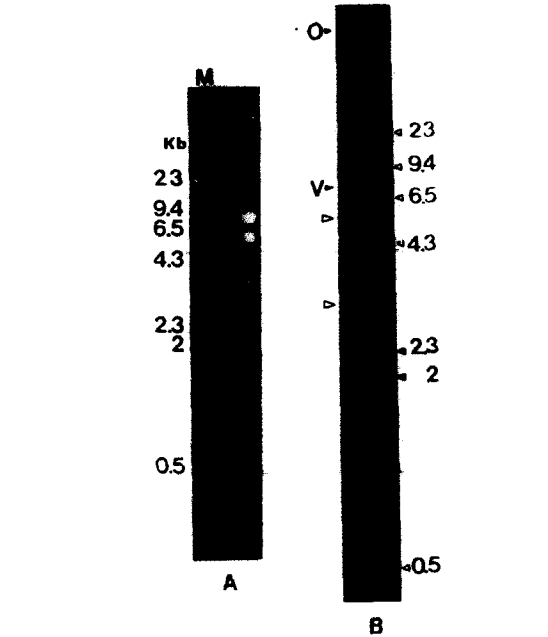


Fig 2. *BamHI* digestion pattern of a *nif* clone, pEuNIF from clone selection procedures (A) and corresponding blot hybridized with 3.15 Kb insert of pSA1 (B). O and V are running origin and pWE15 cosmid vector, respectively. Two empty triangles are 3.2 Kb (low) and 5.5 Kb (upper) fragment hybridized with the probe. M is lambda DNA digested with *HindIII* for size marker.

cosmid vector에 ligation 시키기에 적합한 30~50 kb의 크기를 갖는 것으로 나타나 (자료 미제시), 이들 분획의 DNA를 library 작성을 위한 시료로 사용하였다. 작성된 genomic library의 효율은 대략 6.7×10^5 transformants/ μ g insert DNA로 계산되었는데, 이러한 효율은 삽입 DNA 1 μ g당 $10^5 \sim 10^6$ 개의 transformants를 얻을 수 있다는 제조회사의 지침 (Stratagene manual)을 충분히 만족시켰다.

계놈 library로부터 nif 클론 선별

Frankia 균주의 하나인 Ar14는 8.3×10^9 의 분자량을 갖는데 (3), 이는 대장균 계놈 크기의 약 2.5배에 해당하는 것으로 염기쌍 수로 환산하면 약 12×10^6 염기쌍에 해당한다. 이를 토대로 pWE15 cosmid vector에 삽입된 DNA 절편의 크기를 40 Kb로 추정할 때 약 1400개의 colony면 계놈의 99%를 대표한다고 볼 수 있다 (23). 계놈 library로부터 *nif* 클론을 선별하기 위하여 *Frankia*의 계놈 크기에 해당하는 약 1500개의 colony가 사용되었다. *K. pneumoniae*의 *nifH*, D를 탐침으로 이용한 클론 선별과정을 통해 최종적으로 하나의 클론을 선별하였으며, 이 클론은

로부터 alkaline lysis 방법 (18)에 의해 cosmid DNA를 분리한 후 *BamHI*으로 절단하여 0.7% agarose 수평젤에서 전기영동하였다 (Fig. 2A). 이를 nylon 막으로 옮겨 *K. pneumoniae*의 *nifH*, D를 함유하는 pSA1의 3.15 Kb *EcoRI*/*HindIII* 절편 (7)을 탐침으로 혼성화 반응을 수행한 결과 (Fig. 2B), 3.2 Kb와 5.5 Kb 절편이 강한 혼성화 반응을 보여 이 두 절편이 *nifH* 혹은 D를 포함함을 알 수 있었다. 이러한 혼성화 반응 양상은 계놈 혼성화 결과 (Fig. 1B)와도 일치하였다. 또한 위의 *nif* 클론 *BamHI* 절편들에 대해 *Frankia* FaC1의 *nifH* 유전자 (16)만을 탐침으로 혼성화 반응을 수행한 결과, 3.2 Kb 절편에서만 강한 혼성화 반응을 보여주었는데 (자료 미제시), 이러한 결과는 이 절편이 적어도 *nifH* 유전자를 포함함을 보여주며, 5.5 Kb 절편에는 완전한 *nifD* 혹은 일부가 존재함을 암시해 준다고 하겠다. 따라서 이 *nif* 클론을 pEuNIF라 명명하였다.

Normand 등 (15)은 보리수나무 뿌리혹에서 분리한 공생균주인 EUNif 균주에 대한 genomic library

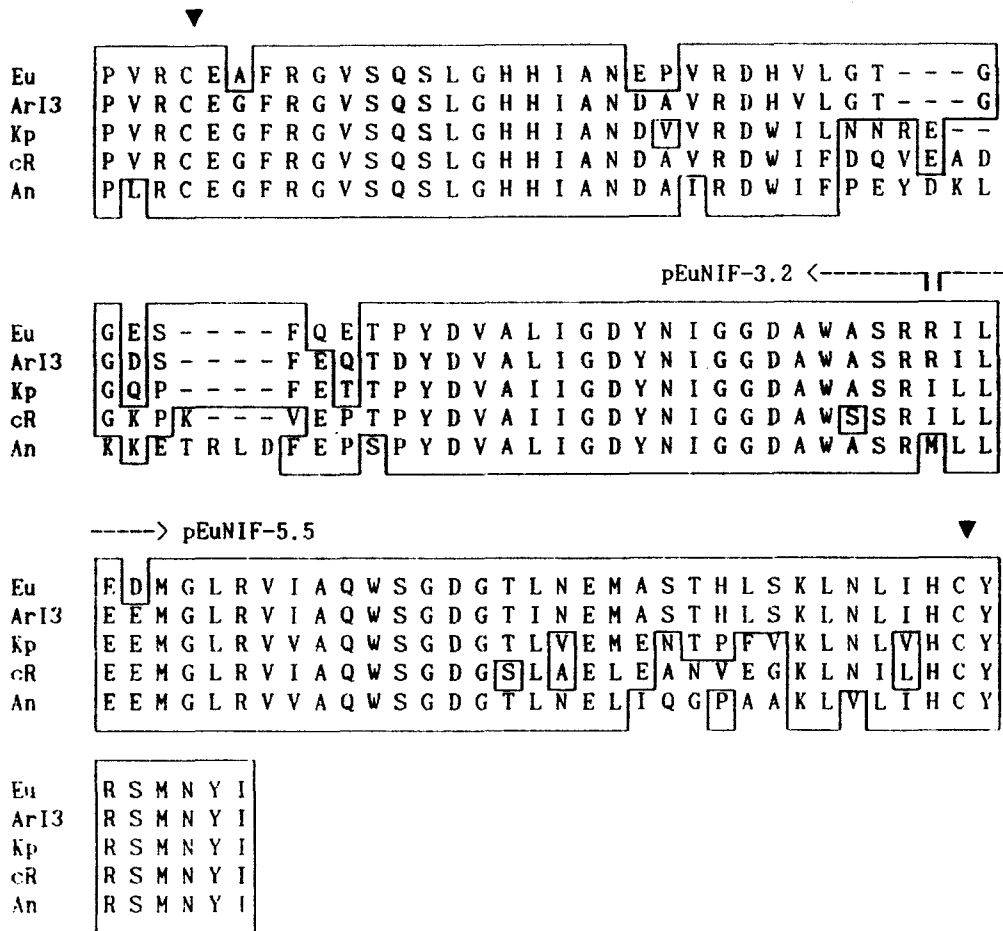


Fig. 3. Comparison of the deduced partial amino acid sequence of *nifD* from *Frankia* *EuK1* (*Eu*) with partial *nifD* sequence of *Frankia* *ArI3* (*Ar*), *K. pneumoniae* (*Kp*), *cowpea Rhizobium* *IRC78* (*cR*), *Anabaena* (*An*). The amino acid positions of other *nifD* sequence used in comparison with partial *nifD* sequence of *EuK1* are 182 to 282 (*ArI3*), 181 to 283 (*Klebsiella*), 186 to 290 (*cowpea Rhizobium*), 182 to 289 (*Anabaena*), respectively. Filled triangles indicate the conserved cysteine residues. Other conserved regions are boxed.

로부터 *nif* 클론을 선별하고, 이 클론의 *Bam*HI 절편에 대한 혼성화 반응을 수행한 결과, 4.5 Kb와 1.4 Kb *Bam*HI 절편이 혼성화 반응을 보였으며, *Bam*HI 절편에 대한 혼성화 반응 양상은 계능 혼성화 결과와도 일치한다고 보고하였다. 그러나 우리나라에서 자생하는 보리수나무 뿌리혹에서 분리한 공생균주인 *EuK1* 균주의 계능 및 *nif* 클론에 대한 혼성화 반응 양상은 *EUNif* 균주와는 달리, *Bam*HI 절편의 경우 3.2와 5.5 Kb에서 혼성화 반응을 보이는 것으로 보아 같은 종의 숙주식물에서 분리하였으나 서로 다른 균주로 추정할 수 있었다.

부분적인 염기서열 결정 및 아미노산 서열 분석

탐침 유전자와 강한 혼성화 반응을 보인 3.2 Kb와 5.5 Kb *Bam*HI 절편에 대한 염기서열을 결정하기

위하여 두 절편을 pUC19 혹은 pBluescript에 sub-cloning하고 각각을 pEuNIF-3.2와 pEuNIF-5.5로 명명하였다. 두 subclone에 대해 M13 reverse primer (NEB)와 -40 primer (USB)를 이용하여 부분적인 염기서열을 결정하고 이로부터 아미노산 서열을 유추하여 몇몇 질소고정균의 *nifD* 서열과 비교한 결과 (Fig. 3), 3.2 Kb와 5.5 Kb *Bam*HI 절편에 걸쳐서 연속적인 *nifD* 서열과 높은 상동성을 갖는 서열이 존재하였다. 즉 3.2 Kb의 3' 말단과 5.5 Kb의 5' 말단의 아미노산 서열은 *ArI3 nifD*의 182번부터 240번까지, 241번부터 282번까지의 아미노산 서열과 각각 매우 높은 유사성을 보였다. 염기서열로부터 추정된 아미노산 서열을 *Frankia* *ArI3* 균주 (14), *K. pneumoniae* (4), *Rhizobium* *IRC78* (24), *Anabaena*

(11)의 *nifD* 서열과 비교한 결과, 각각 91.1%, 76.2%, 71.3%, 72.3%의 상동성을 보여주었다. 염기서열 비교에서는 Ar13 균주와의 경우를 제외하고는 아미노산서열에 비해 다소 낮은 상동성을 보여주었는데, 이는 *K. pneumoniae*, *Rhizobium* IRC78, *Anabaena*의 경우에 두 *Frankia* 균주와는 달리 3 bp에서 21 bp까지 염기서열의 삽입과 이로 인한 아미노산 서열의 추가 및 두 서열간의 유사도 비교시 염기서열과 아미노산 서열의 배열방식에 있어서의 차이로 인한 결과로 추정된다. 아미노산 서열을 비교한 결과, 두 개의 잘 보존된 cysteine 잔기가 나타났는데 이러한 cysteine 잔기는 dinitrogenase의 Fe-S cluster에 대한 ligand로 작용할 것으로 추정된다(8). 이와 같이 3.2 Kb와 5.5 Kb *Bam*HI 절편에 연속적인 *nifD*와 상동성을 갖는 서열이 존재한다는 점은 3.2 Kb와 5.5 Kb *Bam*HI 절편이 연속적임을 보여주는 결과이다.

이상과 같은 탐침을 이용한 혼성화 반응 결과와 부분적인 염기서열 결정 결과는 *Frankia* EuIK1 균주의 *nifH, D*는 다른 여러 *Frankia* 균주에서와 마찬가지로 연속적으로 배열하고 있음을 보여주었다(1, 15).

사 사

본 연구는 한국과학재단 학술연구 조성비 지원(91-0-70-03)에 의해 일부 수행되었음.

참 고 문 헌

- An, C.S., P. Twigg, J.M. Ligon, and B.C. Mullin. 1990. *nif-H, D* and *K* are contiguous in *Frankia* strain FaCl. Proceeding of 8th international congress on nitrogen fixation. p. 824.
- An, C.S., W.S. Riggsby, and B.C. Mullin. 1983. Deoxyribonucleic acid composition of twelve *Frankia* isolates. *Can. J. Botany* **61**, 2859-2862.
- An, C.S., W.S. Riggsby, and B.C. Mullin. 1985. Relationships of *Frankia* isolates based on deoxyribonucleic acid homology studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 140-146.
- Arnold, W., A. Rump, W. Klipp, U.B. Priefer, and A. Puhler. 1988. Nucleotide sequence of a 24,20 6-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **203**, 715-738.
- 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.
- Burns, R.C., and R.W.F. Hardy. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York.
- Hardley, R.G., A.R.J. Eaglesham, and A.A. Szalay. 1983. Conservation of DNA regions adjacent to *nif* KDH homologous sequences in diverse slow-growing *Rhizobium* strains. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 225-236.
- Hausinger, R.D. and J.B. Howard. 1983. Thiol reactivity of the nitrogenase Fe protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* **258**, 13486-13492.
- Hintermann, G., R. Cramer, T. Kieser, and R. Hutter. 1981. Restriction analysis of the *Streptomyces glaucescens* genome by agarose gel electrophoresis. *Arch. Microbiol.* **130**, 218-222.
- Kim, S.C., C.D. Ku, M.C. Park, C.H. Kim, S.D. Song, and C.S. An. 1993. Isolation of symbiotic *Frankia* EuIK1 strain from root nodule of *Elaeagnus umbellata*. *Korean J. Bot.* **36**, 177-182.
- Lammers, P.J. and R. Haselkorn. 1983. Sequence of the *nifD* gene coding for the α subunit of dinitrogenase from the cyano-bacterium *Anabaena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4723-4727.
- Ligon, J.M. and J.P. Nakas. 1987. Isolation and characterization of *Frankia* sp. strain FaCl genes involved in nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2310-2327.
- Mortenson, L.E. and R.N.F. Thorneley. 1979. Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 387-428.
- Normand, P., M. Gouy, B. Cournoyer, and P. Simonet. 1992. Nucleotide sequence of *nifD* from *Frankia alni* strain Ar13: Phylogenetic inferences. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 495-506.
- Normand, P., P. Simonet, and R. Bardin. 1988. Conservation of *nif* sequence in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 238-246.
- Oh, B.S., Y.S. No, and C.S. An. 1993. Nucleotide sequence of *nifH* from *Frankia* strain FaCl. *Mol. Cells* **3**, 137-141.
- Roberts, G.P., T. Mackneil, D. Makneil, and W.J. Brill. 1978. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **136**, 267-279.
- Sambrook, J., E.F. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. 2nd ed., Cold Spring Laboratory, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- 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 physiology of related metabolism. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **317**, 131-146.
- Southern, J.D., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-512.
- Torrey, J.G., 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience*

28. 586-591.
23. Winnacker, E.L., 1987. From genes to clones: Introduction to gene technology. VCH, New York.
24. Yum, A.C. and A.A. Szalay, 1984. Structural genes of dinitrogenase and dinitrogenase reductase are transcribed from two separate promoters in the broad host range cowpea *Rhizobium* strain IRC7 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7358-7362.

(Received May 30, 1994)

(Accepted July 18, 1994)

ABSTRACT: Molecular Cloning of *nifH,D* from *Frankia* EuK1 Strain, A Symbiont of *Elaeagnus umbellata* Root Nodules.

Kim, Ho Bang, Chun Ho Kim, Seung Dal Song¹, and Chung Sun An*
(Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742 and
¹Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea)

Genomic Southern hybridization of *Frankia* EuK1 strain, a nitrogen fixing symbiont of *Elaeagnus umbellata* root nodules, with *nifH,D* of *K. pneumoniae* as a probe, showed that 3.2 Kb and 5.5 Kb of *Bam*HI fragments and 15 Kb *Pst*I fragment were strongly hybridized with the probe, indicating *nifH,D* are located on these fragments. Using the same probe, one clone(pEuNIF) was isolated from the genomic library constructed into pWE15 cosmid vector by colony hybridization. The 3.2 Kb and 5.5 Kb *Bam*HI fragments of this clone were hybridized with the same probe and this result corresponds to the genomic Southern hybridization data. However, using *nifH* of *Frankia* FaC1 strain as a probe, only the 3.2 Kb *Bam*HI fragment showed hybridization signal. Amino acid sequence deduced from nucleotide sequence of 3' terminus of the 3.2 Kb and 5' terminus of the 5.5 Kb fragments showed that the former was highly homologous with that of ArI3 *nifD* from 182nd to 240th amino acids, while the latter was from 241st to 282nd amino acids. These results show that *nifH* and partial *nifD* sequences are located on the 3.2 Kb fragment and residual sequences of *nifD* on the 5.5 Kb fragment which is contiguous to the 3.2 Kb fragment.