

## Frankia sp. Strain SNU 014201의 nif-H,D,K 유전자 클로닝

권석윤 · 강명수 · 안정선

서울대학교 자연과학대학 생물학과

물오리나무의 뿌리혹에서 분리한 *Frankia* sp. SNU 014201 공생균주의 게놈내에 13.5 kb의 *EcoRI*, 18.0 kb의 *BamHI*, 10.5 kb의 *BglII*, 4.5 kb의 *KpnI* 절편에 *nif-H, D* 유전자가 존재함을 확인하였다. 람다 파아지 EMBL3-*BamHI* arm을 사용하여 제조한 genomic library에서 *nif*-유전자를 포함하고 있는 14 개의 재조합 파아지 클론을 선별하였다. 이들 중 *Ahnif-12*번 클론은 *nif* 유전자를 포함하고 있는 18 kb의 삽입 DNA를 가지고 있었으며, 이중 7.9 kb의 *BamHI* 절편 내에 *nif-H, D, K*가, 3.6 kb의 *HindIII/KpnI* 절편내에 *nif D*의 일부와 *H*가 위치하고 있었다. 따라서 이들 절편을 각각 subcloning하고 제한효소 지도를 작성한 결과, *Frankia* sp. SNU 014201의 *nif-H, D, K* 유전자는 6.5 kb의 *HindIII/BamHI* 절편과, 5.2 kb *SafI/BamHI* 절편내에 연속 배열하고 있었다.

KEY WORDS □ *nif-H, D, K*, cloning, *Frankia* sp. SNU 014201, *Alnus hirsuta*, genomic library.

생물학적 질소고정은 분류학적으로 다양한 원핵생물에 의해 이루어지며 질소고정균에서 합성되는 질소고정 효소 복합체(nitrogenase enzyme complex)의 작용으로 대기중 질소가 고정되며(4), 이들을 지시하는 유전인자(*nif*-genes)와 단백질 구조에 대한 연구는 공생관계를 갖는 *Rhizobium*과 독립생활하는 *Klebsiella*, *Cyanobacteria* 등에서 많은 연구가 진행되었다(5). 이들 연구로부터 모든 질소고정 효소복합체는 두개의 구성효소로 이루어져 있고, nitrogenase는 *nif-D*와 *nif-K*의 산물인 55 kd와 60 kd의 두 종류의 단위체가 두 개씩 모여진 사중합체이며, nitrogenase reductase는 *nif-H*의 산물인 57~72 kd의 단위체가 두 개 모여진 이중합체임이 밝혀졌다(15, 23). 또한 각 단위체의 아미노산 서열(25) 및 DNA 염기서열(21)이 유사함이 밝혀져 질소고정 효소 복합체는 매우 안정된 구조임이 규명되었으나, *nif*-gene cluster에서의 유전자 배열 및 구성에는 많은 차이점이 발견되었다(20, 18, 9).

한편 비공과 목본식물의 질소고정 공생관계(Actinorhizal symbiosis)의 공생균주인 *Frankia*의 *nif*-유전자에 대한 연구로는 Cp11 균주에서 *K. pneumoniae*의 *nif-K, D, H*와 유사한 구조가 있다는 보고(21), 플라스미드가 존재한다는 보고(22)를 비롯하여, FaC1 균주에서는 *nif-D, K*는 연속적으로 배열되어 있고 *nif-H*는 적어도 2 kb 이상 떨어져 있다는 보고(12)와 Ar13 균주에서는 *nif-H*와 *D*가 연속적으로 배열되어 있고 *nif-H*의 염기서열을 밝힌 보고(17) 등이 있다. 그러나 *Frankia*의 *nif*-유전자의 위치, gene cluster에서의 유전자 배열, 각 유전자의 세부 구조

및 발현 기작에 관한 연구는 전반적으로 초기 단계에 머물고 있다.

따라서 본 연구는 우리나라에서 자생하는 물오리나무의 질소고정 공생관계를 분자생물학적 수준에서 이해하기 위하여 물오리나무의 뿌리혹에서 분리한 *Frankia* sp. SNU 014201(11)의 게놈상에서 *nif-K, D, H* 유전자의 존재를 확인하고 lambda EMBL3-*BamHI* 파아지 벡터를 사용하여 genomic library를 작성한 후 *nif*-유전자를 가지고 있는 재조합 파아지 *nif*-클론을 선별하고, *nif* 유전자를 subcloning하여 부분적 제한효소 지도를 작성하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배지

*Frankia* 균주는 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 뿌리혹에서 분리한 *Frankia* sp. SNU 014201균주(11)를 1 L의 mDPM 액체배지(1)에 접종하여 28°C의 암소에서 4 주간 정기 배양하여 사용하였고, 탐침 DNA를 가지고 있는 여러 재조합 클론의 보관과 배양은 적당한 항생제를 첨가한 LB 배지를 사용하였다. 실험에 사용한 균주, 벡터 및 재조합 클론은 Table 1에 정리하였다.

#### 총 DNA 분리 및 탐침 DNA 준비

배양하여 수확한 *Frankia* sp. SNU 014201 균체를 TS 완충용액(50 mM Tris-HCl, 0.75 M sucrose, pH 8.0)에 재분산시키고 lysozyme, proteinase K 및 SDS를 처리하여 원심분리하고, 케놀 및 클로로포름 용액(chloroform : isoamyl alcohol = 24:1)으로 추

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

List	Relevant characters	Reference or source
<i>Frankia</i> SNU014201	symbiont of <i>Alnus hirsuta</i>	(11)
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE, thi, Δ(lac-proAB)[F', traD36 proAB, lac<sup>r</sup>ZΔM15]</i>	(27)
KW251	F', <i>supE44, galK2, galT22, metB1, hsdR2, mcrB1, mcrA, [argA81 : Tn10], recD1014</i>	(16)
Plasmid pSA1	<i>nif</i> HD, 3.15 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI clone from <i>Klebsiella pneumoniae</i> in pBR322	(5)
pFQ167	<i>nif</i> HD, 5.6 kb <i>Bam</i> HI clone from <i>Frankia</i> O1 <i>nif</i> 6 in pBR328	(17)
pFQ148	<i>nif</i> HDK, 7.7 kb <i>Bam</i> HI clone from <i>Frankia</i> R1 <i>nif</i> 3 in pBR328	(17)
pANO-H	<i>nif</i> HD, 3.4 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III clone from <i>Frankia</i> FaC1 in pUC19	in preparation
pNIF7.9	<i>nif</i> HDK, 7.9 kb <i>Bam</i> HI clone from <i>Frankia</i> SNU 014201 in pUC19	in this study
pNIF3.6	<i>nif</i> HD, 3.6 kb <i>Hind</i> III/ <i>Kpn</i> I clone from <i>Frankia</i> SNU 014201 in pBS/KS(+)	in this study
pUC19	2.7 kb, Ap <sup>r</sup> , lacZ, plasmid vector	(14)
pBS/KS(+)	2.95 kb, Ap <sup>r</sup> , fl(+), phasmid vector	Stratagene
Bacteriophage EMBL3	lambda phage vector, Spi without stuffer arm	(7)
<i>Ahnif</i> 12	18 kb <i>Bam</i> HI clone from SNU 014201	in this study

출하고 에탄올로 침전시켜 총 DNA를 분리하였다 (10). 탐침 DNA를 포함하고 있는 재조합 플라스미드는 alkaline lysis 방법(13)으로 분리하였다. 재조합 플라스미드 pSA1을 *Eco*RI/*Bgl*II로 절단한 0.7 kb 절편을 *nif-H*로, *Bam*HI/*Bgl*II의 1.07 kb 절편을 *nif-D*로, pFQ167의 0.4 kb *Sac*I 절편을 *nif-D*로, 또한 pFQ148의 0.4, 1.3, 1.8 kb *Sac*I 절편을 각각 *nif-H*, D 및 K로, pANO-H를 *Sma*I로 절단한 1.8 kb 절편을 *nif-H*로 사용하였다. 이들 절편을 아가로즈 젤에서 정확하게 nick translation 방법으로 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP로 표지하여 탐침으로 사용하였다(19).

#### 게놈 혼성화 반응

총 *Frankia* DNA를 여러 제한효소로 절단하여 0.7% 아가로즈 젤상에서 전기영동하고 나일론 막에 옮겼다(24). 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 흔들며 반응시킨 후, 표지된 탐침 DNA를 specific activity가 약 5×10<sup>6</sup> cpm이 되도록 첨가하고 24 시간 동안 혼성화 반응을 수행하였다(13).

#### Genomic library 작성

총 DNA 200 μg에 800 U의 *Bam*HI을 가하여 20 분간 부분 절단하고 10-40%의 sucrose 농도 구배 위

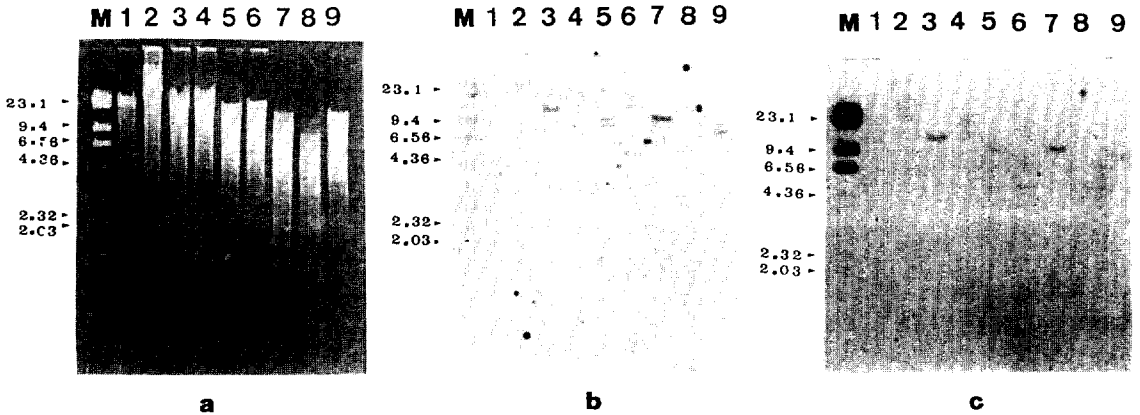
에서 27,000 rpm.으로 초원심분리한 후 0.5 ml/씩의 분획을 받고 0.4% 아가로즈 젤에서 전기영동하여 평균 15 kb 정도가 되는 DNA 절편을 모아 ligation의 삽입 DNA 시료로 사용하였다. 이 시료와 0.5 μg의 EMBL3-*Bam*HI arm을 1:1 및 2:1의 비율로 혼합하고 T4 DNA ligase를 처리하고, packaging extract를 처리한 후 파아지 완충용액(5.8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 mL 1 M Tris-HCl, pH 7.5/1 L)을 500 μl 가하여 genomic library를 작성하였다(2). 제조한 library stock중 10 μl를 숙주 세포인 KW251에 흡착시키고 45°C의 top agar(Bacto tryptone 10 g, NaCl 5 g, 10 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, agar 8 g/1 L)와 함께 혼합하고 LB 고형배지에 도말하여 37°C, 암소에서 12 시간 동안 배양한 후 생성된 plaque 수를 세어 패키징 효율을 계산하였다(13).

#### *nif*-파아지 클론 선별

고형배지에 생성된 plaque를 나일론 막으로 옮기고 *nif-D*를 탐침으로 혼성화 반응을 수행하여 일차로 *nif*-유전자가 삽입된 plaque를 선별하고 이로부터 파아지 stock을 만들어 이차 선별작업을 수행하였다(3).

#### 선별한 파아지 DNA의 혼성화반응

최종적으로 선별한 재조합 파아지 클론에서 총 DNA를 분리(Dr. Sue Wessler, Univ. of Georgia)하고 여러 제한효소로 절단한 후 아가로즈 수평 젤



**Fig. 1.** Restriction enzyme digestion pattern(a) of *Frankia* SNU 014201 DNA and corresponding blot hybridized to *Frankia nif-H*(b) and *nif-D*(c).

M: Lambda DNA/*Hind*III, 1: first-isolated uncut DNA, 2: second-isolated uncut DNA, 3: *Eco*RI, 4: *Bam*HI, 5: *Bg*II, 7: *Kpn*I, 7: *Pst*I, 8: *Sac*I, 9: *Bam*HI/*Bg*II.

**Table 2.** Restriction fragments which show hybridization signal to *Frankia nif-H,D* probes

probe	R.E	<i>Eco</i> RI	<i>Bam</i> HI	<i>Bg</i> II	<i>Kpn</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Bam</i> HI/ <i>Bg</i> II
<i>nif-H</i>		13.5	18.0	10.5 8.9	4.5	11	0.4	9.5 8.6
<i>nif-D</i>		13.5	18.0	10.5	4.5	11	1.3	9.5

에서 전기영동하고 나일론막에 옮겼다(24). 이 막을 *nif-H*와 D를 탐침으로 혼성화 반응을 수행하여 *nif*-유전자를 가지고 있는 DNA 절편을 확인하였다(13). *nif*-유전자의 subcloning 및 제한효소 지도작성

7.9 kb *Bam*HI 절편 및 3.6 kb *Hind*III/*Kpn*I 절편을, 해당 제한효소로 절단한 pUC19 과 pBS/KS(+) 벡터에 각각 ligation시켜 subcloning 하였다(8). *nif*-유전자를 포함하고 있는 재조합 클론을 선별한 후, 여러 제한효소로 절단하고 *nif-K*, D 및 H 각각을 탐침으로 하여 혼성화 반응을 수행하였으며, 혼성화 반응의 결과로부터 제한효소 지도를 작성하였다.

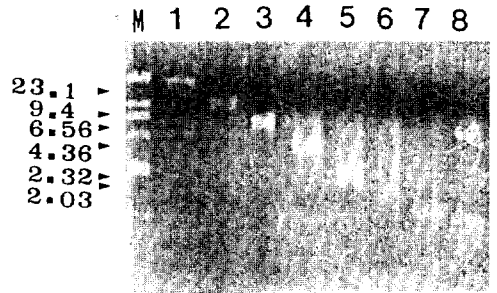
**결과 및 고찰**

**총 DNA의 분리**

분리한 *Frankia* 균주 SNU 014201의 총 DNA는 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>의 값이 2.2, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>의 값이 2.1로 염, 유기용매 및 단백질의 오염이 없는 순수한 시료였으며, 여러 제한효소에 대한 절단양상이 양호하여 클로닝의 시료로 사용하였다(자료는 제시하지 않았음).

***Frankia* sp. SNU 014201 계놈의 혼성화 반응**

총 DNA를 *Eco*RI, *Bam*HI, *Bg*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Bam*HI/*Bg*II로 절단하고 (Fig. 1a) *nif-D*와 혼성화 반응을 수행한 결과, 각각 13.5, 18.0, 10.5, 4.5, 11, 0.4, 9.5 kb 절편에서 혼성화 반응이 나타났다(Fig. 1 b). *nif-H*를 탐침으로 사용했을 경우, 다른 레인에서는



**Fig. 2.** Photograph of a gel showing size of DNAs fractioned on 10-40% sucrose gradient.

M: Lambda DNA/*Hind*III, 1: fraction 1, 2: fraction 4, 3: fraction 7, 4: fraction 10, 5: fraction 13, 6: fraction 16, 7: fraction 19, 8: fraction 22.

*nif-D*와 동일한 절편에서 혼성화 반응이 나타났으나, *Sac*I 절단의 경우는 0.4 kb의 절편에서만 혼성화 반응이 나타났고, *Bg*II로 절단한 경우 8.9 kb에서, *Bam*HI/*Bg*II로 절단했을 경우 8.6 kb 절편에서 추가적인 혼성화 반응이 나타났는데(Fig. 1c) 이는 *Bg*II에 의한 절단이 불완전하였기 때문으로 판단된다. 이상의 결과를 Table 2에 요약하였고, 이로부터 *Frankia* sp. SNU 014201 균주의 *nif-H, D* 유전자가 4.5 kb의 *Kpn*I 절편에서 11 kb의 *Pst*I 절편내에 존

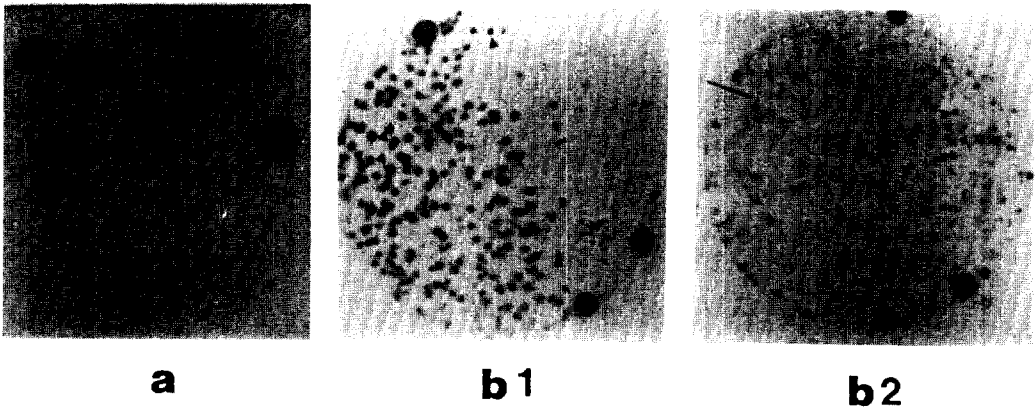


Fig. 3. Photographs of recombinant phage *nif* clones obtained by primary (a) and secondary (b) screening to *Frankia nif-D* probes.

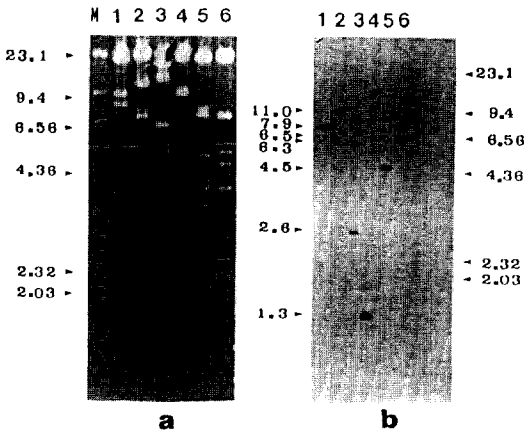


Fig. 4. Restriction enzyme digestion pattern of *Ahnif-12* clone(a) and corresponding blot hybridized to *Klebsiella pneumoniae nif-H,D* probes(b). M: lambda DNA/*Hind*III, 1: *Bam*HI, 2: *Bgl*II, 3: *Kpn*I, 4: *Sac*I, 5: *Bam*HI/*Bgl*II, 6: *Bam*HI/*Hind*III.

재하고 있음을 알 수 있었다.

**Genomic library 작성**

Sucrose 농도 구배에서 초원심분리한 후 수확한 22개의 분획들 중에서 1번 분획부터 4번 분획까지의 DNA가 약 10~20 kb의 크기를 갖는 것으로 나타나 이들을 모아 ligation의 시료로 사용하였다(Fig. 2). Genomic library의 패키징 효율은  $8.6 \times 10^4$  pfu/ $\mu$ g arm으로 계산되었다. 이는 계놈의 크기가  $1.2 \times 10^6$  kb인 *Frankia Ar13* 과 비슷한 크기의 계놈을 가지는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 약 20 kb의 삽입 DNA를 갖는 library를 작성할 때 3462개의 plaque이면 계놈의 99%를 대표한다는 점(26)을 감안하면 *Frankia* 균주 SNU 014201의 genomic library 작성은 성공적이라고 판단하였다.

**nif 파이지 클론 선별**

제조한 library에서 *nif-H, D* 유전자를 가지고 있는 재조합 파이지 클론을 얻기 위해 1차 및 2차 선별 작업을 수행하였다. 일차 선별작업으로 하나의 plate에서 2개씩(Fig. 3a) 모두 4개의 파이지 클론을 선별하였다. 이로부터 이차 선별작업을 수행하여,

Table 3. Restriction fragments of pNIF7.9 and pNIF3.6 which show hybridization signal to *nif-H,D,K* probes

pNIF7.9				pNIF3.6			
B	B/Bg	B/S	B/K	H/K	Bg	Sa	X
7.9 <sup>hdk</sup>	4.5 <sup>hdk</sup>	2.8 <sup>h</sup>	4.9 <sup>hd</sup>	3.6 <sup>hd</sup>	6.55 <sup>hd</sup>	3.75 <sup>d</sup>	4.4 <sup>hd</sup>
2.7	3.4 <sup>h</sup>	2.7	2.7	2.95		1.8 <sup>c</sup>	1.1 <sup>h</sup>
	2.7	1.7 <sup>k</sup>	2.6 <sup>dk</sup>			0.85	0.8
		1.3 <sup>d</sup>	0.4			0.1	0.25
		1.0					
		0.4 <sup>b</sup>					
		0.4					
		0.3 <sup>b</sup>					

B: *Bam*HI, Bg: *Bgl*II, S: *Sac*I, K: *Kpn*I H: *Hind*III, Sa: *Sal*I, X: *Xho*I. hdk: Restriction fragments hybridizing to *nif-H,D,K* probes of *Frankia ACoN24d* strain, respectively.

h: Restriction fragments hybridizing to *nif-H* probe of *Frankia ACoN24d*, alone.



7.9 kb *Bam*HI 절편 및 3.6 kb *Hind*III/*Kpn*I 절편을 pUC19과 pBS/KS(+) 벡터에 각각 subcloning하고, 원하는 절편이 들어있는 클론을 확인하여 각각을 pNIF7.9 및 pNIF3.6으로 명명하였다. 이 두 클론의 재조합 플라스미드를 각각 몇가지 제한효소로 절단하고(Figs. 5a, 6a), pNIF7.9는 각각 *nif-H*(Fig. 5b)와 *nif-D*(Fig. 5c) 및 *nif-K*(Fig. 5d)에 대해, pNIF3.6은 *nif-H*(Fig. 6b)와 *nif-D*(Fig. 6c)에 대해서 개별적으로 혼성화 반응을 수행하였다. 이로부터 pNIF7.9 및 pNIF3.6의 1.8 kb *Sac*I 절편에 *nif-H* 유전자가 존재하고, *nif-D* 유전자와 *nif-K* 유전자의 전부는 pNIF7.9의 2.6 kb *Kpn*I 절편에 연속배열하고 있음을 알 수 있었고, 이 결과를 Table 3에 정리하였다.

4.5 kb의 *Bam*HI/*Bgl*II 절편, 2.6 kb의 *Kpn*I 절편, 1.3 kb의 *Sac*I 절편에서 혼성화 반응이 나타나는 점은 Fig.4b에서 언급한 *Ahnif*-12에 대한 혼성화 반응 결과와 일치하며, 따라서 *Frankia* sp. SNU 014201의 계놈의 7.9 kb의 *Bam*HI 절편과 3.6 kb의 *Hind*III/*Kpn*I 절편이 클로닝 되었음을 확인하였다. 또한 pNIF7.9와 pNIF3.6의 제한효소 지도(Fig.7)는 *nif*-유전자를 포함하는 *Bam*HI과 *Sac*I의 절편 크기, 유전자들의 배열 양상, *nif-H* 유전자의 중심부위의 *Bgl*II의 인식부위를 보여주며 이러한 특징은 오리나무(*Alnus*)屬에 공생하는 *Frankia* ACoN24d 및 Ar13 균주와 매우 유사하였다(17).

그러나 *Alnus viridis* ssp. *crispa*의 공생균주 FaC1의 경우 *nif-H*와 *nif-D*가 서로 약 2 kb 떨어져서 존재하며(12), 보리수나무屬에 공생하는 EUNif, HRN18a 균주와 *Casuarina*屬의 공생균주 CeD에서는 *nif-K*가 *nif-D*와 연속배열하고 있지 않다는 점과 *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sac*I 등의 인식부위가 이질적이라는 점에서 *Frankia* sp. SNU 014201 균주는 이들과 다른 양상을 보였다(17).

## 사 사

본 연구는 1989년도 대우재단의 학술연구 지원에 의하여 수행된 것임.

## 참고문헌

1. Baker, D. and D. O'Keefe., 1984. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant and Soil*, **28**, 141-146.
2. Bateson, A.N. and J.W. Pollard., 1988. Construction of mammalian genomic library using lambda replacement vector. In, *Method in Molecular Biology*, vol. 4. New Nucleic Acids Techniques, J.M. Walker (ed.). Humana, New Jersey, pp. 235-255.
2. Benton, D. and R.W. Davis., 1977. Screening lambda-*gt* recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science*, **196**, 180-182.

4. Burns, R.C. and R.W.F. Hardy., 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York, pp. 14-38.
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. Frischauf, A., H. Lehrach, A. Poustka and N. Murry., 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.*, **170**, 827-842.
8. Hackett, P.B., J.A. Fuchs and T.W. Messing., 1988. An introduction to recombinant DNA techniques. Benjamin/Cummings, Tokyo, pp. 113-130.
9. Hahn, M., I. Meyer, D. Studer, B. Regenburger and H. Henneke., 1984. Insertion and deletion mutations within the *nif* region of *Rhizobium japonicum*. *Plant Mol. Biol.*, **3**, 159-168.
10. 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.
11. Kwon, S.Y. and C.S. An., 1989. Isolation of symbiotic *Frankia* strain SNU 014201 from the root nodules of *Alnus hirsuta*. *Kor. J. Bot.*, **32**, 1-9.
12. Ligon, J.M. and J.P. Nakas., 1987. Isolation and characterization of *Frankia* FaC1 genes involved in nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2321-2327.
13. Maniatis, T., E.F. Fritsh and J. Sambrook., 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 55-85, 92-94, 256-304.
14. Messing, N., 1983. New M13 vector for cloning. *Methods in Enzymology*, Vol. **101**, 20-30.
15. Mortenson, L.E. and R.N.F. Thorneley., 1979. Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 387-418.
16. Murry, N., 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 53-58.
17. Normand, P., P. Simonet and R. Bardin., 1988. Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol. Gen. Genet.*, **213**, 238-246.
18. Prakash, R.K. and A.G. Atherly., 1984. Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, **160**, 785-787.
19. Rigby, P.W.J., M. Diekmann, C. Rhodes and P. Berg., 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific acid activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-251.
20. Roberts, G.P. and W.J. Brill., 1981. Genetics and

- regulation of nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **55**, 207-235.
21. Ruvkun, G.B. and F.M. Ausubel., 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 191-195.
  22. Simonet, P., A. Capellano, E. Havasso, R. Bardin and A. Moiroud., 1984. An improved method for lysis of *Frankia* with acromopeptidase allow detection of new plasmids. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1292-1295.
  23. 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.*, **B 317**, 131-146.
  24. Southern, E., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-512.
  25. Tanaka, M., M. Haniu, J. Yasunobu and L. Mortenson., 1977. The amino acid sequence of *Closteridium pasteurianum* iron protein, a component of nitrogenase. *J. Biol. Chem.*, **252**, 7093-7100.
  26. Winnacker, E.L., 1987. From genes to clones: Introduction to gene technology. VCH. New York. pp. 383-393.
  27. 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 December 27, 1991)

(Accepted January 22, 1992)

---

**ABSTRACT: Molecular Cloning of *nif*-H,D,K Genes from *Frankia* sp. Strain SNU 014201**

**Kwon, Seok-Yoon, Myung-Soo Kang and Chung Sun An** (Department of Biology, Seoul National University)

*nif* (nitrogen fixation)-H,D,K genes of *Frankia* sp. SNU 014201, a symbiotic strain isolated from root nodule of *Alnus hirsuta*, were found to be located in the genome on 13.5 kb of *EcoRI*, 18.0 kb of *BamHI*, 10.5 kb of *BglII* and 4.5 kb of *KpnI* fragments. Using EMBL-3 *BamHI* arms of bacteriophage lambda, the genomic library was constructed, from which fourteen recombinant phage *nif*-clones were selected. Among them, *Ahnif*-12 had insert DNA of 18 kb, in which 7.9 kb of *BamHI* fragment contained *nif*-H,D,K and 3.6 kb of *HindIII/KpnI* had *nif*-H and partial -D. Therefore, the 7.9 kb and 3.6 kb fragments were subcloned and partial restriction maps were constructed. As the results, *nif*-H,D,K genes were found to be located continuously on the 6.5 kb of *HindIII/BamHI* and 5.2 kb of *Sall/BamHI* fragment in the genome of *Frankia* sp. SNU 014201.

<본 논문의 그림 및 사진은 편집과정중의 실수로 인하여 원본을 사용하지 못하였습니다.>