

从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法*

陈 强^{1,2} 张小平^{1**} 李登煜¹ 陈文新² K.Lindström³ Z.Terefework³

(四川农业大学农学院微生物学系 雅安 625000)¹

(中国农业大学生物学院微生物学系 北京 100094)²

(Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland 00014)³

摘要: 豆科植物的新鲜根瘤经表面灭菌、破碎后直接加入 200 μ L 4mol/L 异硫氰酸胍 (GUTC) 裂解液混匀, 离心去掉根瘤残留物, 再加入适量 RNA 酶, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后, 加入 20 μ L 硅藻土吸附液, 室温处理 15min 离心去掉上清, 沉淀经 GUTC 裂解液二次处理, 再分别用洗涤液、70% 酒精洗涤。最后, 硅藻土沉淀经真空干燥, 加入 20 μ L 超纯水洗涤硅藻土沉淀, 即可获得类菌体根瘤菌 DNA。所获得的 DNA 可以用于 AFLP、16S rRNA PCR 反应。

关键词: 豆科植物, 根瘤, DNA 提取, AFLP 指纹图谱

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0063-05

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39970029)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39970029)

* ** 联系人 E-mail: zxp@sicau.edu.cn

收稿日期: 2001-11-21, 修回日期: 2002-01-10

ISOLATION OF DNA FROM THE ROOT NODULE OF LEGUME PLANT

Chen Qiang^[1,2] Zhang Xiao-Ping¹ Li Deng-Yu¹ Chen Wen-Xin² K. Lindström³ Z. Terefeework³

(Department of Applied Microbiology, Sichuan Agricultural University Yaan 625000)¹

(Department of Microbiology, China Agricultural University Beijing 100094)²

(Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Finland 00014)³

Abstract: The fresh root nodule from the legume plant was surface sterilized, and crashed in an Eppendorf tube, then mixed with 200μL of GUTC buffer thoroughly, and spinned briefly, the upper phase was transferred to a new Eppendorf tube, and RNase was added, and the mixture was incubated at 37℃ for 30min, and 20μL of diatomaceous earth solution was added and mixed properly. The mixture was incubated at room temperature for 15min, then centrifuged, and discarded the upper phase. The sediments were treated with GUTC buffer described as above again, and followed by 3 time rinsing of new wash buffer. The sediments were washed by 70% ethanol, and dried in vacuum. 20μL of ultrapure water was used to dissolve the DNA absorbed by diatomaceous earth sediments. After centrifuge, the upper solution was transferred to another tube, and used as template DNA to do the AFLP and 16S rRNA PCR. The results showed that high quality of DNA can be obtained by this method.

Key words: Legume plant, Nodule, DNA Isolation, AFLP Fingerprinting

众所周知，土壤中的根瘤菌能够同豆科植物的根系形成根瘤，将大气中的氮转化为 NH₃，供植物生长所需。通常，研究者们需要从豆科植物根瘤中分离纯化出根瘤菌，再以纯化的根瘤菌为材料，研究其形态、生理及遗传特性，这些根瘤菌为腐生状态。然而处于共生状态时，根瘤菌是以类菌体形式存在于同豆科植物形成的根瘤中，其形态及生理特性均与腐生状态的根瘤菌有差别。因此，直接研究根瘤中类菌体形式的根瘤菌的遗传特性，对于揭示根瘤菌与豆科植物、环境间共生行为及遗传信息交流具有特殊意义。

如何直接从根瘤中提取类菌体状态根瘤菌的 DNA，至今未见报道。吴少慧等^[1]曾报道了从非豆科植物根瘤中提取痕量放线菌 DNA 的方法，可以获得符合质量要求的 DNA。Little^[2]等介绍了用硅藻土吸附法提取细菌 DNA 的方法，该法已被证实可以有效地提取细菌 DNA^[3,4]。我们对硅藻土吸附法改进后，获得了一种从豆科植物根瘤中快速、简便地提取根瘤菌 DNA 的方法。

1 材料与方法

1.1 供试根瘤的获得

研究材料为花生和三叶草根瘤，供试花生品种为天府花生，三叶草为野生品种。

表 1 供试菌株及根瘤情况

| 编号 | 菌株 | 属、种 | 豆科植物 | 瘤重 (g) | DNA 含量 (ng/μL) |
|----|--------|---------------------------|------|--------|----------------|
| 1 | Spr2-9 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 花生 | 0.0130 | 200 |
| 2 | Spr3-5 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 花生 | 0.0043 | 180 |
| 3 | Spr3-7 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 花生 | 0.0021 | 160 |
| 4 | Spr4-5 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 花生 | 0.0037 | 160 |
| 5 | Spr7-1 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 花生 | 0.0032 | 160 |
| 6 | 三叶草根瘤菌 | <i>Rhizobium</i> sp. | 三叶草 | 0.0039 | 200 |

用于结瘤试验的慢生花生根瘤菌为 Spr2-9、Spr3-5、Spr3-7、Spr4-5、Spr7-1，其情况见表 1。

取 7 个容积

为 500mL 的玻璃瓶, 洗净后装入干净的石英砂, 瓶口用玻璃培养皿盖住, 160℃干热灭菌 4h, 冷却备用。

取 20 粒天府花生, 表面灭菌后用无菌蒸馏水浸泡种子, 在 25℃培养箱中发芽, 每天用无菌蒸馏水换水一次, 待胚根长出 1~2cm 后, 将幼苗移栽到沙培玻璃瓶中, 加入适量灭菌的 Jensen 营养液, 25℃光照培养。待花生的子叶展开后, 其中 5 瓶分别接种 5mL 经镜检纯度合格的供试花生根瘤菌菌液, 另 1 瓶不接菌, 作对照。光照培养 25d 后, 分别采集接种根瘤菌的花生根瘤备用。

野生三叶草植株采集自芬兰赫尔辛基大学 Viiki 实验农场, 经洗涤后随即取根瘤, 将根瘤表面灭菌后提取 DNA 和分离根瘤菌。

1.2 试剂的准备

1.2.1 GUTC 缓冲液: 称取 23.26g 异硫氰酸胍 (GUTC)、0.087g 反式环己二胺四乙酸 (trans-1, 2-Dianincyclohex- N, N, N', N', -Tetraacetic Acid, 简称 CTDA), 溶解于 20mL 浓度为 40mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲溶液中。待试剂完全溶解后, 用相同浓度的 Tris-HCl 溶液定容至 50mL 即成浓度 4mol/L 的 GUTC 缓冲液。

1.2.2 洗涤缓冲液: 按下列组成成分配制 500mL 洗涤缓冲液: 无水乙醇 60%, Tris-HCl (pH8.0) 20mmol/L, EDTA (pH8.0) 1mmol/L, NaCl 400mmol/L, 用超纯水定容至 500mL, 贮藏于玻璃瓶中。

1.2.3 硅藻土吸附缓冲液: 称取 5g 硅藻土 (Promega 公司出品, 商品名为 Celite), 用 1 × TE 缓冲液洗涤硅藻土 3 次, 最后按 1:1 (w/v) 加入 1 × TE 缓冲液, 配成硅藻土吸附液。所有的缓冲液均室温保存备用。

1.3 DNA 提取

1.3.1 从根瘤中直接提取类菌体根瘤菌 DNA: 取单个根瘤, 按标准方法进行表面灭菌, 将根瘤放入容积为 1.5mL 的 Eppendorf 管中, 加入 200μL 的 GUTC 缓冲液, 用无菌玻棒将根瘤充分压破、混匀, 8,000 r/min 离心 30s, 将上清液转入另一 Eppendorf 管, 加入 30ng RNA 酶, 37℃温育 30min。

将硅藻土吸附缓冲液充分摇匀, 每管加入 20μL ~ 30μL 该吸附液, 振荡均匀后室温放置 15min, 13,000 r/min 离心 30s, 弃去上清, 再加入 200μL GUTC 缓冲液, 混合均匀后室温放置 10min, 同上法离心处理。用洗涤缓冲液洗涤上述硅藻土沉淀 3 次, 每次 300μL, 然后用 200μL 70% 的酒精洗涤硅藻土沉淀 1 次, 13,000 r/min 离心 2min, 弃去酒精溶液, 真空抽干。最后根据每管加入硅藻土的量, 向每管加入 20μL ~ 30μL 超纯水, 在涡旋振荡器上充分混匀, 55℃保温 10min, 13000r/min 离心 5min, 小心将上清液移至另一支已编号的 Eppendorf 管, 该溶液即为从根瘤中提取的 DNA 样品。

1.3.2 以纯根瘤菌为材料提取 DNA: 将供试的根瘤菌纯菌株分别接种到 3mL 的 TY 液体培养基中, 28℃、150r/min 振荡培养 5d, 取 1.5mL 菌液于 Eppendorf 管中, 13000r/min 离心 4min, 倾去上清, 用 1 × TE 缓冲液洗涤菌体 2 次, 加入 500μL GUTC 缓冲液, 同上述方法提取纯根瘤菌株的 DNA。

以已知浓度的 λDNA 为标准, 取待测 DNA 样品各 1μL, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定样品 DNA 的浓度。全部 DNA 样品贮藏于 -20℃。

1.4 PCR 扩增

为了检测所提取的根瘤 DNA 的质量, 我们进行了 AFLP 和 16S rRNA 扩增试验。

1.4.1 AFLP: AFLP按 Vos^[5]、张小平^[6]的方法进行, 5 μ L 供试根瘤菌 DNA 样品经酶切连接后, 用具有 2 个选择性碱基的引物扩增, PCR 产物用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 再银染。

1.4.2 16S rRNA 扩增: 选用 fD1 和 rD1 为引物, 反应液组成: Dynazyme 聚合酶缓冲液 (10 倍浓度) 5 μ L, dNTPs (10m mol/L) 2.5 μ L, fD1 和 rD1 引物 (20 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA 50ng, Dynazyme 聚合酶 (2U/ μ L) 1 μ L, 最后用超纯水补足反应总体积 50 μ L。扩增反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行, 反应程序见文献 [4], PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 DNA 提取结果

采用本法提取根瘤中的类菌体根瘤菌 DNA, 所有样品均获得成功, DNA 浓度较高, 并且电泳图谱前端中未见 RNA 片段 (图 1), 说明 RNA 被完全酶解消除。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

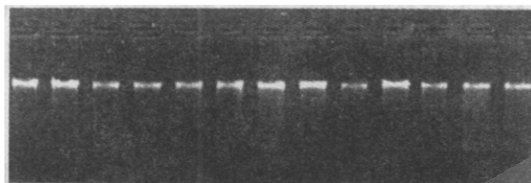


图 1 根瘤及根瘤类菌体 DNA

M λ DNA (200ng/ μ L), 1-6 分离自根瘤, 7-12 从根瘤菌纯培养物提取 1 Spr2-9, 2 Spr3-5, 3 Spr3-7, 4 Spr4-5, 5 Spr7-1, 6 三叶草根瘤 DNA, 7 Spr2-9, 8 Spr3-5, 9 Spr3-7, 10 Spr4-5, 11 Spr7-1, 12 三叶草根瘤菌 DNA

M 1 2 3 4 5 6 M

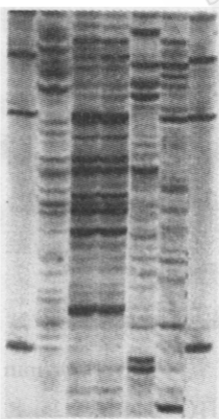


图 2 根瘤菌 DNA 的 AFLP 图谱

M pGEM Marker, 1 Spr2-9, 2 Spr3-5, 3 Spr3-7, 4 Spr4-5, 5 Spr7-1, 6 三叶草根瘤

2.2 PCR 扩增结果

2.2.1 AFLP 结果: 图 2 是供试根瘤菌 DNA 的 AFLP 图谱, 可见 AFLP 指纹图谱很清晰, 效果很好。图 3 是从供试根瘤中提取的类菌体根瘤菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱, 显然, 其结果同供试根瘤菌 DNA 的 AFLP 图谱相同。

2.2.2 16S rRNA 的扩增结果: 图 4 结果表明, 不论是根瘤菌

DNA, 还是类菌体根瘤菌 DNA, 均能顺利扩增多 16S rRNA 片段, PCR 产物片段大小为 1.5kb, 符合细菌 16S rRNA 基因片段大小范围。

3 讨论

根瘤菌与豆科植物根系形成根瘤后, 主要以类菌体形式存在于根瘤中^[8]。类菌体没有细胞壁, 容易为 GUTC 缓冲液裂解, 因此类菌体 DNA 更容易进入缓冲液。异硫氰酸胍 (GUTC) 是一种蛋白质强变性剂^[7], 能够使细菌细胞的蛋白质变性而沉淀, 经过洗涤缓冲液的充分洗涤, 可除去绝大部分蛋白质。硅藻土的成分是 SiO₂, 由于粒径小、比表面积大, 具有较强的吸附力, 能够吸附溶解于缓冲液中的 DNA, 洗涤去除蛋白质后再用超纯水洗脱硅藻土, 即可得到纯度较高的 DNA 样品。本研究中采集的根瘤, 鲜重介于 0.0021 ~ 0.013g 之间, 而提取的 DNA 浓度均超过 100 ng/ μ L, DNA 总体积可以达到 20 ~ 30 μ L, 能够满足根瘤菌遗传学特性研究的需要。

根瘤中的类菌体处于生理活跃状态, 含有大量的 RNA, 在缓冲

液中加入 RNA 酶,并在 37℃ 条件下温育 30min,即可去除 RNA。此结果似乎与 GUTC 的作用特点相矛盾,因为 GUTC 的作用是使蛋白质变性。可能的原因包括:由于实验过程中 RNA 酶用量较大,GUTC 缓冲液不能完全使 RNA 酶变性;RNA 酶活性很强,能够部分抵抗 GUTC 缓冲液的变性能力,并能发挥酶切 RNA 的功能。实验中采用 GUTC 缓冲液处理样品两次,目的是使根瘤类菌体细胞充分破碎以获得大量的 DNA,同时,第二次加入的 GUTC 缓冲液也起着使菌体蛋白质和 RNA 酶进一步失去活性的作用。采用该方法提取 DNA,固然不可能彻底去除菌体中所有的蛋白质,但实验结果表明,用该方法获得的 DNA,其质量能够达到 AFLP、16S rRNA 扩增的要求。我们用本方法从花生植株根系随机采集了 50 多个根瘤,提取 DNA,并进行了 AFLP 特性分析,全部获得成功。由于植物细胞具有较厚的细胞壁,应用该方法提取豆科植物根瘤中类菌体 DNA 时,不会将植物细胞中的 DNA 提取出来,我们的结果已证明了这一点(图 2、图 3),接种前的根瘤菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱与从根瘤中提取的类菌体根瘤菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱基本相同。但由于两次电泳后在染色时间上存在一些差异,因而图 2 和图 3 中 AFLP 指纹图谱颜色的深浅略有不同。

本实验除了用盆栽方式,用已知的慢生花生根瘤菌菌株与花生植株所结的根瘤为材料外,还采集了野生的三叶草根瘤,目的在于检验方法的可行性。实验结果说明,无论是盆栽、还是野生的豆科植物,只要能获得新鲜根瘤,即可采用此方法从根瘤中获得较高质量的根瘤菌 DNA。因此,本方法可以用于根瘤菌生态学特性研究。

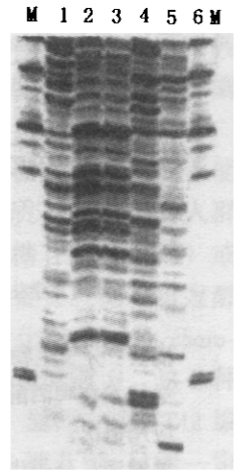


图 3 根瘤类菌体 DNA 的 AFLP 图谱
M: pGEM Marker, 1: Spr2-9, 2: Spr3-5, 3: Spr3-7, 4: Spr4-5, 5: Spr7-1, 6: 三叶草根瘤

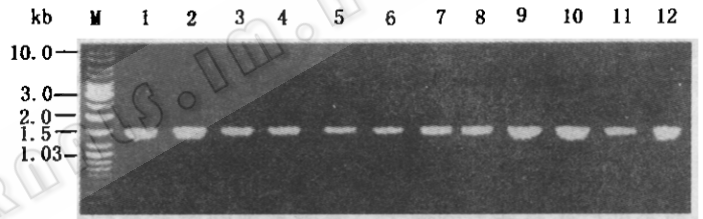


图 4 16S rRNA PCR 结果

M 1kb 梯级分子量标准, 1-6 根瘤菌 DNA 的 PCR 产物 7-12 根瘤菌 DNA 的 PCR 产物 1 Spr2-9, 2 Spr3-5, 3 Spr3-7, 4 Spr4-5, 5 Spr7-1, 6 三叶草根瘤 DNA 7 Spr2-9, 8 Spr3-5, 9 Spr3-7, 10 Spr4-5, 11 Spr7-1, 12 三叶草根瘤菌 DNA

参考文献

- [1] 吴少慧, 刘忠, 张成刚, 等. 应用与环境生物学报, 2001, 7 (1): 76~78.
- [2] Little M C. Process for purification of DNA on diatomaceous earth. United states patent No.5, Rad Laboratories. Inc., Hercules, Calif. 1991.
- [3] 高俊莲, 陈文新, Terefework Z, 等. 应用与环境生物学报, 1999, 6 (4): 387~395.
- [4] Zhang X X, Guo X W, Terefework T. et al. System Appl Microbiol, 1999, 22 (3): 312~320.
- [5] Vos P, Hogers M, Bleeker M, et al. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407~4414.
- [6] 张小平, 陈强, 李登煜, 等. 微生物学报, 1999, 39 (6): 483~488.
- [7] 北京化学试剂公司编. 化学试剂目录手册. 北京: 北京工业大学出版社, 1993.353.
- [8] 黄大昉, 林敏. 农业微生物基因工程, 北京: 科学出版社, 2001.15.