

## 研究报告

## 普通结瘤基因探针鉴定根瘤菌的研究

覃筱婷\* 汪恩涛 陈文新

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

**摘要** 普通结瘤基因 (*nodABC*) 是所有根瘤菌所特有的、最为保守的基因, 用苜蓿根瘤菌结瘤基因 (*nodABC*) 和豌豆根瘤菌的 (*nodC*) 基因片段为探针, 与 52 株包括常见土壤细菌、已知根瘤菌、根瘤未知分离物的总 DNA 进行斑点杂交, 探索用普通结瘤基因 (*nodABC*) 或 (*nodC*) 探针鉴定根瘤菌的可能性。结果, 未找到合适实验条件, 使来自这两个种的结瘤基因只能与根瘤菌菌株杂交, 而不与土壤细菌的菌株杂交。但在高温条件下, 两种探针都专一性的和种内菌株杂交。此结果表明: 在一定的实验条件下, 普通结瘤基因探针用做根瘤菌的鉴定, 只能在种的水平上, 而不能在种以上的水平进行。

**关键词** 探针, 斑点杂交, 根瘤菌

豆科植物结瘤能力是所有根瘤菌共有的特性, 而且是根瘤菌鉴定的最关键特征。因此, 有些与根瘤菌有高度 DNA 同源性, 但不能结瘤的细菌菌株未被承认是根瘤菌<sup>[1]</sup>。但是, 在对大量野生豆科植物根瘤菌的研究中, 植物种子的采集及对不同植物回接试验条件的控制很困难, 给根瘤菌资源研究工作带来很多不便。所以, 需要有一种快速简便的鉴定方法来鉴定根瘤菌。

1983 年, Hodgson 等和 Robert<sup>[2]</sup> 采用菌落杂交, 首次用总 DNA 探针鉴定豆科植物根瘤中的根瘤菌菌株。结果表明, 总 DNA 探针对于三叶草根瘤菌具有菌株专一性。此后 Wedlock 等<sup>[3]</sup> 采用同一技术鉴定了快生型大豆根瘤菌等。Coper 等<sup>[4]</sup> 用总 DNA 探针鉴定百脉根根瘤菌。这些研究表明, 总 DNA 探针可以鉴定某些根瘤菌的种或菌株, 但来自一个菌株的 DNA 总常常不能与同种的所有菌株杂交, 这是因为种内不同菌株间同源性不同所致<sup>[5]</sup>。

在根瘤菌基因组中, 普通结瘤基因是所有根瘤菌所共有和特有的基因<sup>[6]</sup>。目前, 已鉴定出 20 多个与结瘤有关的基因。其中 *nodABC*

是共有基因, 在不同的根瘤菌属中间, 具有碱基序列和功能方面的高度的保守性<sup>[6-8]</sup>。豌豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌两个种间的这三个基因的序列同源性依次为 72%、69% 和 71.4%<sup>[9]</sup>。在 Southern 印迹杂交中, 来自一个根瘤菌种基因, 可以与其他根瘤菌种或属的对应 DNA 片段杂交<sup>[10,11]</sup>。

本文以苜蓿根瘤菌 *nodABC* 基因和豌豆根瘤菌 *nodC* 基因为探针, 采用斑点杂交法探索了用结瘤基因探针鉴定根瘤菌的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌菌株和质粒

菌株和质粒列于表 1 中。这些菌株包括了不同根瘤菌属种及 10 种常见土壤细菌的代表。试验中还包括一些未确定分类地位的分离自豆科植物根瘤的菌株。新分离菌株按 Vincent 的方法<sup>[12]</sup>回接原寄主, 以检查其结瘤能力。

质粒 pRmSL42 中克隆了一个含有 *R.*

\* 责任作者, 现在华中农业大学生命学院, 武汉 430070  
本论文的工作为国家自然科学基金重点项目的一部分  
1995-04-25 收稿

表1 供试菌株和质粒

序号	菌株或质粒	菌名或寄主名
<b>质粒</b>		
1a	pRmSL42	<i>Escherichia coli</i>
1b	pIJ1419	<i>E. coli</i>
<b>菌株</b>		
2	M5aL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	p. f	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
4	C58	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
5	Arl. 150	<i>Ag. radiobacter</i>
6	AV. OP	<i>Azotobacter vinelandii</i>
7	DSM2286	<i>A. chroococcum</i>
8	DSM1715	<i>Beijerinckia indica</i>
9	DSM338	<i>Xanthobacter flavus</i>
10	E. h	<i>Erwinia heria</i>
11	Xcc008	<i>Xanthomonas campe</i>
12	CCBAU110 <sup>T</sup>	<i>Sinorhizobium xinjiangensis</i>
13	USDA205 <sup>T</sup>	<i>Rhizobium fredii</i>
14	103 <sup>T</sup>	<i>Rh. huakuii</i>
15	A-2BS	<i>Rh. loti</i>
16	HAMB1540 <sup>T</sup>	<i>Rh. galegae</i>
17	122*	<i>Sesbania cannabino</i> (红杆田菁)
18	132*	<i>Desmodium triquetrum</i> (葫芦茶)
19	H7*	<i>Leucaena leucocephala</i> (菲大银合欢)
20	ORS571 <sup>T</sup>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
21	12*	<i>Stylosanthes scabra</i> (西卡柱花草)
22	XJ40	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>
23	021B2	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseolus</i>
24	127k12	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseolus</i>
25	038R	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseolus</i>
26	112*	<i>Centrosema pubescens</i> (蝴蝶豆)
27	127*	<i>Macroptilium lathyroides</i> (紫花豆)
28	USDA1002 <sup>T</sup>	<i>Rh. meliloti</i>
29	H1	<i>Rh. meliloti</i>
30	042B	<i>Rh. meliloti</i>
31	J021*	<i>Medicago lupulina</i> (天蓝苜蓿)
32	102F28	<i>Rhizobium meliloti</i>
33	037B(大)*	<i>Melilotus suaveolens</i> (草木樨)
34	037B(小)*	<i>M. suaveolens</i> (草木樨)
35	XJ30	<i>R. meliloti</i>
36	XJ26	<i>R. meliloti</i>
37	J040*	<i>Melilotus lupulina</i> (天蓝苜蓿)
38	J064(大)*	<i>M. albus</i> (白香草木樨)
39	J064(小)*	<i>M. albus</i> (白香草木樨)
40	J044*	<i>M. suaveolens</i> (草木樨)
41	USDA6 <sup>T</sup>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
42	USDA110	<i>Br. japonicum</i>
43	170*	<i>Crotalaria hainanensis</i> (海南野百合)
44	161*	<i>Cr. chinensis</i> (中华野百合)
45	T14	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>
46	USDA2370 <sup>T</sup>	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>

续表 1

序号	菌株或质粒	菌名或寄主名
47	162X68	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>
48	1-2	<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>
49	J013*	<i>Vigna sinensis</i> (豇豆)
50	J014*	<i>Phaseolus radiatus</i> (绿豆)
51	J092 (大)*	<i>P. vulgaris</i> (菜豆)
52	J092 (小)*	<i>P. vulgaris</i> (菜豆)
53	J008*	<i>Vigna vexillata</i> (野豇豆)

T: 模式菌株; \*: 新分离菌株, 未确定分类地位, 其后的学名为原寄主植物。

菌株来源: (1a, 1b) 自英国, (7—11) 来自德国, 13 来自河南, 14 来自南京, 29 来自黑龙江, (12, 15, 16, 22, 23, 25, 30, 35, 36, 45) 来自新疆, (17—21, 26, 27, 43, 44) 来自海南, (31, 33, 34, 37—40, 49—53) 来自神农架, (2—6, 24, 28, 32, 41, 42, 46, 47) 来自美国。

*meliloti* nodABC 基因的 2.2Kb 的 BamHI-Hind III 限制性内切片段<sup>[13]</sup>。质粒 pIJ1419 由英国 John Innes 研究所的 Doenie 博士提供, 克隆了一个含有 *R. leguminosarum* nodC 基因的 1.0Kb 的 PstI-SalI 限制性 DNA 片段。两个质粒均含有氨卞青霉素抗性基因。

## 1.2 培养条件

含有质粒 pRmSL42 或 pIJ1419 的大肠杆菌在添加氨卞青霉素 (30—50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 的 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$  培养。其它菌株均在 TY 培养基<sup>[14]</sup>中 28 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养。

## 1.3 DNA 探针的制备

用碱裂解法提取质粒 DNA, 分别用限制性内切酶 BamHI 和 Hind III 消化 pRmSL42, 用 PstI 和 SalI 消化 pIJ1419; 电泳分离并回收 nodABC 基因片段和 nodC 基因片段。上述方法均按 Sambrook<sup>[15]</sup> 等的描述。最后, 参照产品使用说明, 用市售生物素标记试剂盒标记收集的普通结瘤基因片段。

## 1.4 细菌总 DNA 的提取

采用 Marmur 法<sup>[16]</sup>分别提取所有试验菌株的总 DNA。每个菌株取 5ml 处于对数生长期中期的培养物, 最终的提取物风干溶于 50 $\mu\text{l}$  16 $\times$  SSC 中, 检测浓度后于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.5 斑点杂交

按 Sambrook 等<sup>[17]</sup>的方法进行。每个菌

株取 3—5 $\mu$ g 总 DNA, 点到经过预处理的硝酸纤维素膜上, 点的直径约为 2mm。探针的用量为 200—300ng $\cdot$ ml<sup>-1</sup> 杂交缓冲液。杂交温度为 42℃。杂交后的滤膜在 2 $\times$ SSC-0.1% SDS 洗涤 3 次, 每次 5min; 洗涤温度为 nodABC 基因探针 65℃, nodC 基因探针 55℃。结果显示采用 NBT-BCIP 检测系统<sup>[17]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 *Rhizobium meliloti* nodABC 基因探针与试验菌株的杂交

nodABC 探针与试验菌株的杂交结果示于图 1, 结果分析列于表 2。

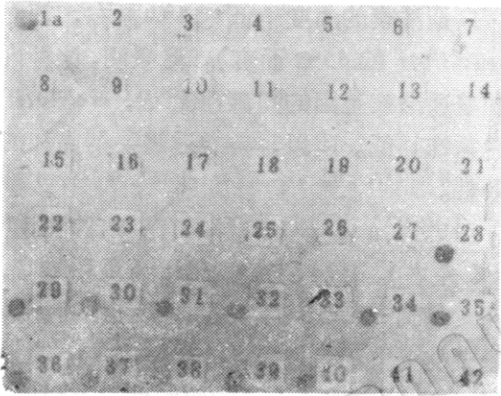


图 1 *Rhizobium meliloti* nodABC 探针与试验菌株总 DNA 斑点杂交图

试验条件: 杂交温度 42℃, 洗膜温度 65℃

从表 2 可以看出: nodABC 探针只特异地与来自同一种内根瘤菌杂交(菌株 29—32、35—36), 而与不同种的根瘤菌菌株(菌株 12—16、22—25、41—42)及土壤细菌(菌株 2—11)不杂交, 结果呈阴性。

菌株 17、18、19、21、26、27 均为本实验室刚从海南分离出来的未知培养物, 它们与该探针杂交结果为阴性。为了进一步验证此结果的可信度, 对此 6 株菌进行回接试验、数值分类及 DNA-DNA 杂交研究, 后期的实验也证实了此 6 株菌不属于 *R. meliloti*<sup>[19]</sup>, 与我们探针杂交结果是一致的, 它们不是 *R. meliloti*。

菌株 31、33、34、37—40 为来自湖北的 *Medicago lupulina*, *Meliloti suaveolens*, *M.*

表 2 *Rhizobium meliloti* nodABC 基因探针与供试菌株总 DNA 杂交结果

菌株编号	菌株特征	结果
1	质粒菌株 pRmSL42 <sup>(1)</sup>	+
2—11	土壤细菌 <sup>(2)</sup>	—
29—32 35—36	已知 <i>R. meliloti</i> 菌株	+
12—16 22—25 41—42	除 <i>R. meliloti</i> 外, 几个其他根瘤菌种的已知代表菌株	—
17—19 21, 26, 27	非 <i>R. meliloti</i> 菌株的正常寄主的根瘤分离物	—
31, 34 37—40, 33	来自 <i>R. meliloti</i> 三种正常寄主的分离物	+

(1): 阳性对照 (2): G<sup>-</sup> 细菌

*albus* 三种寄主根瘤中分离出来的菌株, 这些寄主是 *R. meliloti* 的正常寄主。除菌株 33 外, 其余均为阳性反应。31、34、37—40 共 6 株菌回接成功, 为 *R. meliloti* 菌株, 而菌株 33 回接不成功, 证明不是 *R. meliloti* 的菌株。

上述结果表明, 在本试验条件下, 来自 *R. meliloti* 的 nodABC 基因探针可以将种内菌株与其他种的根瘤菌菌株及常见的土壤细菌菌株相区别。

### 2.2 *R. leguminosarum* nodC 探针与试验菌株的杂交

杂交结果表明: 来自 *R. leguminosarum* 的 nodC 探针只与种内的菌株杂交(菌株 22—25、45—46), 不与来自其它种的根瘤菌及土壤细菌杂交(图 2)。

49 号为未知分离物, 其寄主为 *Vigna sinensis*, *Vigna* 属的根瘤菌的分类地位极为分散, 在以前的研究中曾报道快生豇豆根瘤菌菌株应为 *S. fredii*<sup>[19]</sup>。由本杂交结果, 应初步判定属于 *R. leguminosarum* 种内。菌株 50、51 的寄主植物为 *Phaseolus*, 属于 *R. leguminosarum* 的寄主范围。本结果也可以初步判定其应同 *R. leguminosarum* 相似。

— 菌株 52 与 51 来自同一根瘤的不同菌落形

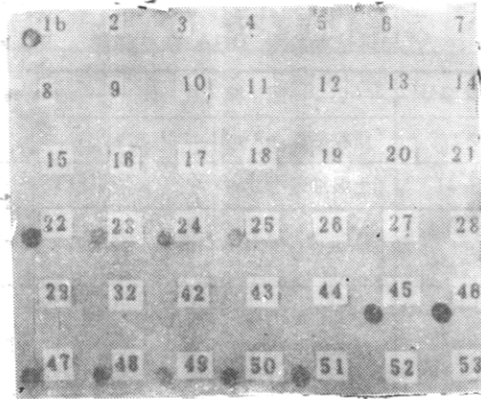


图2 *R. leguminosarum* nodC 探针与试验菌株总 DNA 斑点杂交图

试验条件: 杂交温度 42℃, 洗膜温度 55℃

态分离物, 菌株 52、53 不与探针杂交, 说明它们不是 *R. leguminosarum* 菌株, 51 号和探针杂交, 后期的回接结果证明其为 *R. leguminosarum* (表 3)。

表3 *R. leguminosarum* nodC 探针与试验菌株总 DNA 斑点杂交

菌株编号	菌株特点	结果
1	质粒菌株 pIJ1994 <sup>(1)</sup>	+
2—11	土壤细菌 <sup>(2)</sup>	—
22—25	已知 <i>R. leguminosarum</i> 菌株	+
45—48		+
12—21	除 <i>R. leguminosarum</i> 外几个已知根瘤菌的代表菌株	—
26—29		—
32, 42—44		—
49—51	未知分离物	+
52, 53	未知分离物	—

注释: (1): 阳性对照; (2): G<sup>-</sup> 细菌

### 3 讨论

普通结瘤基因 (nodABC) 是根瘤菌中最保守的基因。我们实验的最初设计思想是想利用其在根瘤菌间的高同源性将根瘤菌从众多的土壤细菌中鉴定出来, 从而作为初步分离鉴定根瘤菌的一种快速方法, 为根瘤菌分类及多样性研究获得更广泛的菌株提供方便。

但我们发现不能找到一种合适的条件使 *R. meliloti* 的 nodABC 探针及 *R. legumino-*

*sarum* 的 nodC 探针与所有根瘤菌菌株总 DNA 杂交都显阳性, 而其它的土壤杆菌都呈阴性。在我们多次实验确定的条件下, 即在一定的洗膜及杂交条件下, nodABC 探针能很好地区分 *R. meliloti* 种内菌株与其它的各个种的根瘤菌菌株和土壤杆菌。nodC 探针也得到同样的结果。因此, 我们认为, 普通结瘤基因 (nodABC) 探针, 用斑点杂交的方法, 只能作为根瘤菌菌种水平鉴定的一个快速有效的手段。

*R. leguminosarum* 种内的差异要比 *R. meliloti* 种内大。依据其寄主范围, 该种下设豌豆、菜豆和三叶草 3 个生物型<sup>[20]</sup>。供试的 3 个生物型的成员均可以和同种的 nodC 探针杂交, 只是洗膜的温度稍低 (55℃ 左右, 相对于 *R. meliloti* 的 65℃ 而言)。这表明, 该种内菌株间普通结瘤基因的同源性比 *R. meliloti* 的种内菌株间低。所以, 杂交后需要稍温和的洗膜条件。

考虑到 nodABC 的种间有一定的同源性 (70% 左右)。我们也尝试用更为温和的洗膜条件 (范围 35—55℃)。但在保证所有根瘤菌均能杂交上去的条件下 (40℃), 有的土壤细菌也呈阳性, 即出现了大量的假阳性。这说明, 普通结瘤基因 (nodABC) 探针用斑点杂交的方法, 不能在种以上或属的水平上鉴定根瘤菌, 只能用于种水平上的鉴定。

目前, 在菌落杂交中, 总 DNA 探针已被广泛用于根瘤菌菌种与菌株的鉴定<sup>[2-4]</sup>。在 Southern 杂交中, 普通结瘤基因探针 (nodABC) 可以与多种根瘤菌的相应 DNA 片段杂交, 该探针也用于从基因文库中调其它种的普通结瘤基因<sup>[9, 11]</sup>。无论是 Southern 杂交还是调基因, 在保证探针和种间特定片段杂交的条件下, 假阳性也是很普遍的。我们采用的是斑点杂交, 通过选择适宜的杂交条件及洗膜条件, 所用的二个种的基因探针均只与种内菌株的总 DNA 杂交, 而不与其它种的菌株的总 DNA 杂交, 说明要保证杂交不出现假阳性, 用斑点杂交法检测细菌所要求探针片段与靶序列的同源性必须很高 (大于 90%), 特异性才强。我们的实验结

果表明,普通结瘤基因 (nodABC) 探针检测根瘤菌,采用斑点杂交法,特异性强,它只能在种的水平上鉴定根瘤菌。这与用总 DNA 探针检测根瘤菌的结果相类似。

### 参 考 文 献

- [1] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, *et al.* IJSB, 1991, 41:582—587.
- [2] Hodgson B A, Roberts W F. J. Gen Microbiol, 1983, 129:207—212.
- [3] Wedlock D N, Jarvis B D W. IJSB, 1986, 36: 550—558.
- [4] Cooper J E, Bjorson A. J Appl Environ Microbiol, 1987, 7:1705—1707.
- [5] Debelle F, Rosenberg C, Vassre JF. J Bacteriol, 1986, 168:1075—1068.
- [6] Fisher R F, Tu J K T, Long SR. Appl environ Microbiol, 1985, 54:1432—1435.
- [7] Jacobs T W, Egelhoff T T, Long SR. J Bacteriol, 1985, 162:469—476.
- [8] Rossen L, Johnston A W B. Nucleic Acids Res, 1984, 12:9497—9508.
- [9] Torok J, Kondorosi E. Nucleic Acids Res, 1984, 12:9509—9524.
- [10] Scott K F. Nucleic Acids Res, 1986, 14:2905—2919.
- [11] 魏辉,李卓林,微生物学报, 1990, 30:330—335.
- [12] Vincent J M, A manual for the practical study of root nodulating bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1970.
- [13] Egelhoff T T, Fishier R F, D N A, 1985, 4:241—248.
- [14] Soberon-Chavez G, Najera R. J Bacteriol, 1986, 167:487—491.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F. Molecular cloning, a laboratory manual 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 pl. 38—13.9, 6.34—6.35.
- [16] Marmur J. Mol Biol, 1961, 3:208—218.
- [17] Keller G H, Cumming C U, Huang D P, *et al.* Anal Biochem, 1988, 170:441—450.
- [18] Robert F F, Janice K T. Appl Environ Microbiol, 1985, 53:1432—1435.
- [19] Gao J L, Sun J G, Li Y. IJSB, 1994, 41:151—158.
- [20] Jordan D C. Family III. Rhizobiaceae Conn. 1938, In NR Krieg and JG Holt (ed) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1. The Williams and Wilkins Co, Baltimore. 1984, 234—254.

## COMMON NODULATION GENES PROBES TO IDENTIFY *RHIZOBIUM MELILOTI* AND *R. LEGUMINOSARUM* BY DOTBLOTTING

Qin Xiaoting Wang Entao Chen Wenxin

(Department of Microbiology, College of Biology, Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract** Fragments of nodABC genes from *R. meliloti* and fragments of nodC gene from *R. leguminosarum* were used as probes to study the possibility of identifying rhizobial strains. Fifty-two strains were tested. They were root- and stem-nodulating bacteria and soil G<sup>-</sup> bacteria. The conditions which both of the probes could hybridize with all the rhizobial strains without false reaction were not found. The gene probes just hybridized with the strains from the same species accurately under the limited condition. It suggested that probes of common nodulation genes just could identify rhizobia in species level.

**Key words** Probe, Common nodulation genes, Identification, *Rhizobium*