

华癸中生根瘤菌共生质粒的定向标记、 消除与结瘤功能的鉴定

胡国元^{1*} 李伟伟¹ 周俊初²

(1. 武汉工程大学绿色化工过程省部共建教育部重点实验室 武汉 430073)

(2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘要: 采用Tn5-*mob-sacB*转座子对华癸中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)菌株 7653R的共生质粒进行定向标记, 获得该质粒标记菌株 7653RT14。利用*sacB*基因对蔗糖的敏感性, 对标记质粒进行消除实验, 获得 7653R的共生质粒消除突变株 7653R-1。测得Tn5-*mob-sacB*转座频率高于 10^{-5} 。突变株的培养特征与出发菌株基本一致。采用琼脂管法对 7653RT14 和 7653R-1 进行回接实验, 结果显示 7653RT14 能正常结瘤固氮, 表明Tn5 的插入并未影响其共生能力, 但失去共生质粒的 7653R-1 则为不结瘤或只结个别小瘤。稳定性实验结果表明供试菌株的标记质粒在本实验条件下是稳定的, 可以作为共生质粒转移的供体菌。

关键词: 华癸中生根瘤菌, Tn5-*mob-sacB*, 共生质粒, 定向标记, 消除, 结瘤

Labeling, Curing and Identification of Nodulation Ability of Symbiotic Plasmids in *Mesorhizobium huakuii*

HU Guo-Yuan^{1*} LI Wei-Wei¹ ZHOU Jun-Chu²

(1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430073)

(2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: The symbiotic plasmid pMh7653Rb of *Mesorhizobium huakuii* strain 7653R was labeled by Tn5-*mob-sacB* insertion, the mutant strain 7653RT14 labeled its symbiotic plasmid was obtained. Plasmid curing experiment was carried out using the *sacB* positive selection method, the derivative 7653R-1 of symbiotic plasmid cured was obtained. Transpositional frequency of transposon Tn5-*mob-sacB* was higher than 10^{-5} . Cultural characteristics of the mutant derivatives were similar to wild type strain 7653R. The nodulation tests presented that 7653RT14 could form pink effective nodules, the result showed that pMh7653Rb inserted by Tn5-*mob-sacB* did not lost nodulation ability. However, 7653R-1 lost nodulation ability or only formed a few small null nodules. The results of stability tests indicated that 7653RT14 carrying symbiotic plasmid inserted by Tn5-*mob-sacB* was stably inherited under the conditions tested, and could be used as donor strain of symbiotic plasmid transfer.

Keywords: *Mesorhizobium huakuii*, Tn5-*mob-sacB*, Symbiotic plasmid, Labeling, Curing, Nodulation

为了研究根瘤菌质粒的生物学功能和根瘤菌质粒之间的相互作用, 通常采用质粒的消除、标记与转移等方法。多数质粒要实现菌株间的转移, 首先必须对被转移的质粒进行定向分子标记。Zou 等报道采用Tn5-*mob-sacB*定向标记华葵中生根瘤菌(*Mesorhizobium huakuii*)CH203 的 3 个大质粒, 然后利用*sacB*基因对蔗糖的敏感性消除质粒, 获得了系列质粒缺失突变株^[1]。郭先武通过三亲本接合转移, 将Tn5(*sacB-luxAB*) 插入华葵中生根瘤菌 7653R 菌株基因组中。在含有 8% 蔗糖的YMA 平板上获得 8 个突变株, 但其选择标记消失。质粒检测发现其共生质粒均有不同程度的缺失甚至消除。结瘤实验证明: 所有共生质粒部分缺失(多者达 1/3) 的突变株依然能结瘤。经用*luxAB* 探针的分子杂交证实: 8 个菌株中有 3 个标记菌株的 Tn5 插在共生质粒上^[2]。我们的前期工作采用Tn5-*mob-sacB*成功定向标记了华葵中生根瘤菌HN3015 的 3 个内源质

粒, 并获得了HN3015 的系列质粒消除或缺失突变株^[3]。

周俊初等用高温和吡啶橙分别处理具有 2 个大质粒的华葵中生根瘤菌 7653R, 获得了表型为不结瘤(Nod⁻)和结瘤而不固氮(Nod⁺, Nif⁻)的突变株^[4]。其后的研究将*M. huakuii* 7653R 的 2 个大质粒的大小分别确定为 174 kb和 318 kb, 并证实*nod* 和 *fix*基因都定位于第一大质粒上^[5-7]。考虑到该菌株的重要性, 本研究进一步利用两亲本杂交将Tn5-*mob-sacB*导入受体菌 7653R, Tn5-*mob-sacB*可能随机插入受体菌的染色体或质粒中, 然后利用*sacB*基因对蔗糖的敏感性来消除标记质粒, 从而反向筛选出被Tn5 定向标记的质粒。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究的供试菌株和质粒见表 1。

表 1 供试的菌株和质粒		
Table 1 Bacterial strains and plasmids tested in this study		
菌株和质粒 Strains or plasmids	相关性状 Relevant characteristics	文献或来源 Source or reference
<i>Mesorhizobium huakuii</i>		
7653R	Wild strain, Nod ⁺ , Fix ⁺	This lab
7653RT14	Derivative of 7653R, pMh7653Rb labeled with Tn5- <i>sacB</i>	This work
7653R-1	7653R, cured pMh7653Rb	This work
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	Containing pMH1701, Tc ^r , Km ^r , Nal ^s	[11]
Plasmid		
pMH1701	Containing Tn5- <i>mob-sacB</i> , Tc ^r , Km ^r	[11]
pMh7653Rb	The largest plasmid of 7653R (pSym)7653R	This work
pMh7653Ra	The second largest plasmid of 7653R	This work

1.2 培养基和培养条件

根瘤菌采用YMA培养基^[8]、TY培养基^[9]或SM培养基^[5]培养, 培养温度 28 ℃, 2 d~4 d。大肠杆菌采用LB培养基^[10], 培养温度 37 ℃。本研究使用的抗生素浓度(μg/mL)如下: 卡拉霉素(Km), 50; 萘啶酮酸(Nal), 20; 四环素(Tc), 10。

1.3 根瘤菌质粒定向标记菌株的筛选与标记质粒的消除

进行根瘤菌质粒定向标记与标记质粒的消除的方法参见文献[2,3,11]。

取用TY液体培养至对数期的供试根瘤菌先涂布于TY+Nal平板, 将长出的抗性单菌落经SM+ Nal平板再纯化 1 次后, 获得Nal^r自发突变株。

将分别培养至对数期的供体菌 S17-1 和受体菌的培养液各取 1 mL 混合后离心, 收集菌体悬浮于 80 μL TY液体中, 滴加于TY平板上的灭菌微孔滤膜上, 28 ℃培养 1 d~2 d后, 用 2 mL无菌水将滤膜上的菌体制成菌悬液, 取 10⁰和 10⁻¹涂布TY+Nal+ Km平板, 28 ℃培养 3 d~4 d, 待平板上长出单菌落后, 于SM+Nal+Km平板再划线分离纯化 1 次后, 编号转座

突变株保存备用。

用无菌牙签将转座突变株分别接种于 TY+7% 的蔗糖平板和 TY 平板上培养，分别于 37 和 28 各培养 2 d，每一菌株挑取 10 个单菌落分别点种于 TY 和 TY+Km 平板，28 培养后，选取失去 Km 抗性的菌落做质粒检测，确证是否有质粒被消除。

1.4 根瘤菌质粒的快速检测

根瘤菌质粒的快速检测采用经修改的Eckhardt方法^[12]。将待测菌株在TY培养基活化后，转接至PA液体培养基中，在 28 下培养至对数生长期，取约 1 mL左右菌悬液，离心收集菌体，用滤纸吸去多余液体，冰上预冷至少 5 min，将新配制的裂解液约 50 μL加入菌体沉淀(视菌体多少而定)管中，打散混匀后冰浴静置 30 min。然后在SDS琼脂糖凝胶中电泳，先低压 20 V电泳 30 min，再在高压 100 V电泳 6 h，EB染色后观察结果。

1.5 植物结瘤实验

采用琼脂管法：首先选取优良的紫云英种子，进行常规表面消毒，95%酒精浸泡 5 min，倒去酒精，加入 0.1%的HgCl₂溶液再浸泡 5 min，最后用无菌水洗 8~10 次。种子在无菌水中充分吸涨后，均匀铺于琼脂平板，22 倒置催芽 2 d。取生长一致的芽定植

于 1%琼脂的无氮培养液试管斜面上，在光照培养箱中培养(温度 20 ，每日光照 18 h，光强度 7000 lx)，现出第一片真叶时接种根瘤菌菌悬液(每管接菌液 1 mL，菌数约 10⁸ CFU/mL)，每个接菌处理设 5 管重复，另设各 5 管不接菌空白对照与 7653R 正对照。继续光照培养，30 d ~ 35 d 内观察植株生长情况和现瘤与否，确定突变菌株的结瘤能力^[13]。

2 结果与分析

2.1 7653R Tn5-mob-sacB 转座突变株的获得与标记质粒的消除

菌株 7653R 为本室常用并具有高固氮效率的野生型菌株。其原始抗药性的测定结果表明：7653R 具有 Nal 抗性，不抗 Km；供体菌 S1701(pMH1701)对 Nal 敏感，但有 Tc 和 Km 抗性，可以用 Km 抗性来淘汰受体根瘤菌，用 Nal 来淘汰供体菌。

以*E. coli* S1701(pMH1701)为供体与 7653R进行两亲本接合转移，通过计数平板和选择平板统计菌落数，测得Tn5-mob-sacB转座频率高于 10⁻⁵(表 2)。在SM+Nal+Km平板上分别挑取 286 个经纯化并依次编号的Tn5-mob-sacB转座突变株。

表 2 转座子 Tn5-mob-sacB 转座频率 Table 2 Transpositional frequency of transposon Tn5-mob-sacB				
Mating tests no. (S17-1×7653R)	Selection plates (SM + Nal+ Km)	Counting plates (SM + Nal)	Frequencies of transposon Tn5-mob-sacB	Spontaneous Km- resistant mutation frequencies
1	1.71×10 ⁴	4.75×10 ⁸	3.60×10 ⁻⁵	10 ⁻⁹
2	3.80×10 ³	1.15×10 ⁸	3.33×10 ⁻⁵	10 ⁻⁹
3	3.51×10 ³	2.15×10 ⁸	1.634×10 ⁻⁵	10 ⁻⁹
4	1.86×10 ⁴	6.35×10 ⁸	2.77×10 ⁻⁵	10 ⁻⁹
5	1.33×10 ⁴	4.05×10 ⁸	3.28×10 ⁻⁵	10 ⁻⁹

注：表中各数据为 5 个平板菌落数的平均值
Note: The data are the means of CFU number from five culture plates

用无菌牙签分别将获得的转座突变株接种于 TY+7%的蔗糖平板和TY平板上培养，分别于 37 和 28 各培养 2 d，对根瘤菌转座突变株的Tc抗性测定结果表明均为 Tc^s型，表明根瘤菌中不存在 pMH1701 质粒，其Tn5-mob-sacB已发生了转座。在 TY+7%蔗糖平板上生长的菌株可能为消除标记质粒的菌株。再从TY+7%蔗糖平板随机各挑取 10 个菌落分别点种于SM和SM+Km平板，在两个平板上

均生长的菌落为sacB基因失活但插入质粒的Tn5 仍存在，推定为质粒并未消除的菌株，应予以淘汰。仅在SM平板上生长的菌落可能为我们需要的消除标记质粒的菌株。经过质粒检测和与出发菌 7653R质粒带谱比较确定菌株相应的消除质粒，将 7653R质粒消除突变株命名为 7653R-1(pMh7653Rb⁻)，但未获得 7653R-2(pMh7653Ra⁻)，表明第二大质粒不容易被消除，该质粒可能与菌株的生存相关，本结果

与周俊初等的报道一致,他们采用高温和吡啶橙处理也未能消除该质粒^[4]。由此反向确定 7653R 的共生质粒标记菌株为 7653RT14(含 pMh7653Rb::Tn5-*mob-sacB*)(图 1)。

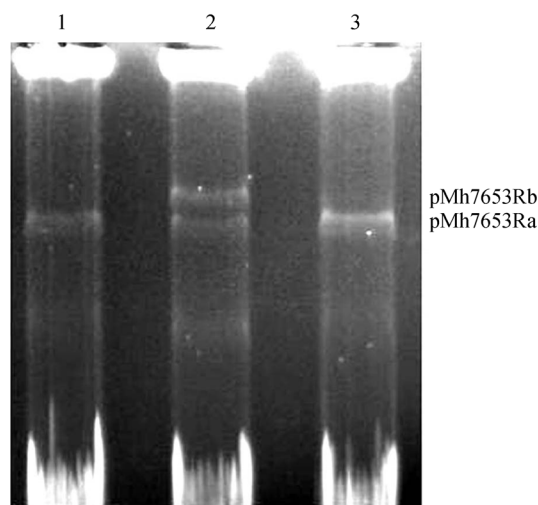


图 1 华癸中生根瘤菌 7653R 及其质粒消除突变株的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid profiles of 7653R and its derivatives cured plasmid

1,3: 7653R-1 (7653R cured pMh7653Rb); 2: 7653R

2.2 7653R 菌株标记菌株及其质粒消除的突变株的培养特征与结瘤能力测定

将以上获得共生质粒标记或消除突变株与野生型出发菌株进行培养特征比较,并没有在其间观察到任何明显差异。有研究指出华癸中生根瘤菌的脂多糖(LPS)分泌与质粒相关^[1],但是在本研究中并没有任何培养特征显示出脂多糖(LPS)突变。所有菌株在YMA平板上菌落光滑,可以产生丰富粘液;在PA液体培养基中也无菌体凝集现象。因此推测根瘤菌 7653R 菌株的脂多糖(LPS)合成与分泌相关基因不在共生质粒上。

采用琼脂管法对获得的质粒标记菌株 7653RT14 和质粒消除的突变株 7653R-1 进行回接实验,结果显示 7653RT14 能正常结瘤固氮,表明 Tn5 的插入并未影响其共生能力,但失去共生质粒的 7653R-1 则为不结瘤或只结个别小瘤。

2.3 质粒标记突变株的稳定性测定

为了检测标记质粒的稳定性,将突变株 7653RT14 在 TY 液体培养基中连续转接 15 次后,适当稀释取少量菌液涂布于 TY 平板,于 28 °C 培养 4 d

后随机挑取 10 个单菌落接种于 TY+Km 平板上,验证 Km 抗性是否存在,同时进行质粒检测。结果表明:所有供试突变株依然存在 Km 抗性,其质粒图谱均未发生改变(图 2),表明供试菌株的标记质粒在本实验条件下是稳定的,可以作为质粒转移的供体菌。

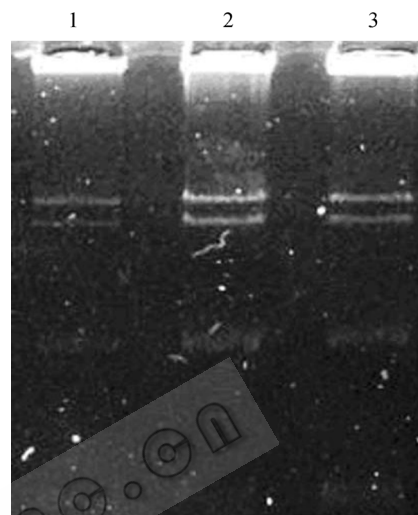


图 2 突变株 7653RT14 的质粒图谱

Fig. 2 Plasmid profiles of mutant strains 7653RT14

1: 7653R; 2,3: 7653RT14

3 讨论

本研究检测到 *M. huakuii* 的 Km 抗性自发突变频率很低,菌株 7653R 的测定结果均小于 10^{-9} (表 2),因此,在筛选转移接合子时一般影响不大。此外,本研究在对 7653R 进行 Str 和 Rif 自发突变株筛选时,发现 7653RSR 部分菌株丢失了第一大质粒。有关抗生素的选择作用导致某些质粒丢失的机制不明,也未见报道。

本研究也发现 Hynes 建立的向无质粒的根癌土壤杆菌转移的方法^[11]仍有一定的缺点,如 pMh7653Rb 向无质粒根癌土壤杆菌 9023 的诱动转移频率很低,本研究通过多次接合转移依然未能获得相应质粒转移接合子。该法还有可能使真正的带有标记的质粒菌株漏筛。由于带有 Tn5-*mob-sacB* 的转座子的质粒消除简便易行,因此本研究在经根癌土壤杆菌进行质粒诱动转移定位未果的情况下,通过对转座突变株的质粒消除来筛选质粒上带有转座子标记的突变株。结果表明,这两种方法可以有效

互补。本研究对 7653RT14 (pMh7653Rb:: Tn5-*mob-sacB*) 菌株的筛选就是通过质粒消除方法反向确定的。

另外本研究是通过两亲本杂交获得转座突变株, 获得转座突变株直接进行质粒消除实验, 在该实验过程中, 减少了杂交亲本, 且是在质粒消除实验结束后再对相应的转座突变株进行质粒的检测, 这无疑提高了实验的效率, 也减少实验的环节, 尤其避免了对获得的大量转座突变株逐一进行质粒检测。标记菌株 7653RT14 的获得为后续共生质粒的转移和质粒间相互作用的研究提供了有价值的实验材料, 同时也为其它根瘤菌质粒的定向标记与质粒的功能研究建立了切实可行的方法。

参 考 文 献

- [1] Zou XH, Li FD, Chen HK. Characteristics of plasmids in *Rhizobium huakuii*. *Curr Microbiol*, 1997, **35**: 215–220.
- [2] 郭先武. 华癸根瘤菌染色体基因和质粒基因群体遗传学比较研究. 华中农业大学博士学位论文, 1998.
- [3] Hu GY, Li YG, Zhou JC. Biological characteristics of plasmids of *Mesorhizobium huakuii* HN3015 from *Astragalus sinicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, **23**: 845–851.
- [4] 周俊初, 张忠明, 黄诚金, 等. 紫云英根瘤菌质粒的研究: II. 紫云英根瘤菌经高温和吡啶橙处理后结瘤和固氮突变株的产生和质粒的消除. 华中农业大学学报, 1987, **6**(2): 156–164.
- [5] Zhang Z, Chen H, Li F, *et al.* Construction of gene library and isolation of pRaZ15 containing complete nodulation genes in *Rhizobium astragali*. *Chin J Biotechnol*, 1991, **7**: 213–219.
- [6] Zhang XX, Zhou JC, Zhang ZM, *et al.* Behavior of plasmid pJB5JI in *Rhizobium huakuii* under free-living and symbiotic conditions. *Curr Microbiol*, 1995, **31**: 97–101.
- [7] Zhang XX, Turner SL, Guo XW, *et al.* The Common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 2988–2995.
- [8] Vincent J. A manual for the practical study of root nodule bacteria (IBP Handbook 15). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.
- [9] Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*, 1974, **84**: 188–198.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] Hynes MF, Jurgens Q, O'Connell MP, *et al.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposon carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Gene*, 1989, **78**: 111–120.
- [12] Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmids deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid*, 1978, **1**: 584–588.
- [13] 李卓棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术, 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.95–99.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 $S E$ 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。