

研究报告

慢生型大豆根瘤菌的结瘤基因转入快生型大豆根瘤菌中

周路明 黄通旺 龚汉英 宁林夫 岑英华

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

通过三亲本杂交把慢生型大豆根瘤菌 USDA110 的基因文库转移至Tn5诱变的不结瘤的快生型大豆根瘤菌321, 338中, 用链霉素和四环素平板选择大量接合子, 接种大豆, 通过结瘤基因功能互补, 获得7个根瘤, 从中分离出的每个菌株都仍具有链霉素和四环素抗性。分离其质粒, 发现每个菌株都多了一条较载体质粒pLAFR1分子量大的质粒。将这些质粒转移至大肠杆菌HB101中, 分离其质粒, 用 ^{32}P 标记的nod探针进行DNA-DNA分子杂交, 除载体质粒pLAFR1为阴性反应外, 其他重组质粒均为阳性反应, 即所获得pLAFR1克隆的DNA片段上确有nod结构基因。回收重组质粒pLAFR1::nod, 用限制性内切酶EcoR I进行酶切, 从其琼脂糖凝胶电泳图上估计pLAFR1上克隆的DNA片段分子量为32kb。

关键词 互补; 结瘤基因; 质粒

随着分子生物学的发展, 许多根瘤菌的结瘤和固氮的遗传秘密被揭开, 固氮机制逐步得到阐述。对于三叶草、草木樨、苜蓿、紫云英、豌豆等豆科植物根瘤菌的遗传学研究已较深入, 但大豆根瘤菌由于生长慢等原因, 其遗传学研究直至近几年才展开。1982年H. H. Keyser等^[1]报道从中国的大豆根瘤和土壤中分离到快生型大豆根瘤菌。目前的研究结果已证实它的结瘤基因和固氮基因与其它快生型根瘤菌一样是在质粒上。目前研究得较多的快生型大豆根瘤菌USDA191, 它的固氮基因在112kb的质粒上, 结瘤基因在195kb的质粒上^[2]。E. R. Appelbaum等^[3]发现USDA191有两个结构与功能不同的nodD基因, nodD₁是控制nodABC在植物中转录能力的信号, nodD₂的功能是调节根瘤菌的表面多糖。H. Henneck等对慢生大豆根瘤菌的结瘤和固氮基因进行了深入

研究, 将其固氮系统分为两组, 一组是nifD, nifK, nifE, nifN, nifS, nifB, nifH, fixB, fixC^[4,5] 9个固氮基因, 一组包括普通结瘤基因(nodA, nodB, nodD, nodI, nodJ)和nifA, fixA基因^[6-8]。

我们以Tn5诱变的不结瘤的快生型大豆根瘤菌为受体, 直接用结瘤基因功能互补方法, 从慢生型的基因文库中获得了带结瘤基因的DNA片段, 并用 ^{32}P 标记的nod探针进行DNA-DNA分子杂交, 证明此DNA片段上有nod基因。

材料与方 法

(一) 材料

1. 供试菌株及其特征: 见表1。

本文于1988年9月26日收到。

表 1 细菌菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

菌株或质粒 Strain or Plasmid	特 征 Characteristics	来 源 Source
快生大豆根瘤菌 <i>Rhizobium fredii</i>		
191-4	wild type	中国农科院 ^[1]
321	1914::Tn5 Nod ⁻	(9)
338	1914::Tn5 Nod ⁻	(9)
321C ₁	321 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
321C ₂	321 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
321C ₃	321 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
321C ₄	321 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
338C ₁	338 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
338C ₂	338 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
338C ₃	338 (pLAFR1::nod) Nod ⁺	this work
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>		
HB101	ara gal lac leu pro xyl supE	(10)
质 粒 Plasmid		
pLAFR1	Tc ^r mob tra Inc P	(11)
pRK2013	HelPer plasmid for mobilization of(pLAFR1::c) Km ^r	(12)
pRm26	nod probe Km ^r	(13)

2. 培养基及培养条件：培养大肠杆菌用 LB 培养基，37℃ 下培养。培养快生型大豆根瘤菌用 YM 培养基，做细菌杂交预培养时用 TY 液体培养基，分离质粒用 PA 培养基，28℃ 下培养。细菌杂交用 TY 固体培养基，28℃ 下完成细菌杂交。各种培养基的成分参看文献〔14〕。

所用的抗生素有：硫酸链霉素 (Sm)，硫酸卡那霉素 (Km)，盐酸四环素 (Tc)，氯霉素 (Cm)。均为国产注射用药剂。根据不同菌株对各抗生素的要求，将抗生素加入培养基中，对 *E. coli* (pRK2013) 用 Km50μg/ml，对 *E. coli* (pLAFR1) 用 Tc 20 μg/ml，快生型大豆根瘤菌 321、338 用 Sm 30 μg/ml、Km 50 μg/ml，接合子 321C₂、321C₃、338C₁、338C₃ 用 Sm 30 μg/ml、Tc15μg/ml。

(二) 方法

1. 细菌的三亲本杂交

(1) 将慢生型大豆根瘤菌 USDA110 基因文库转移到不结瘤的快生型大豆根瘤菌中：Tn5 诱变的不结瘤快生型大豆根瘤菌突变株 321、338 用 YM Sm 30μg/ml、Km 50μg/ml 平板纯化，确保它们中的 Tn5 存在和不结瘤的性质。再分别接种于 3ml TY 液中，28℃ 震荡培养 36h，USDA110 的基因文库 (以 pLAFR1 为载体质粒，以 *E. coli* HB101 为受体菌) 在 LB 液中 37℃ 增强培养 2—2.5h，带辅助质粒的 *E. coli* (pRK-2013) 在 LB 液中，37℃ 震荡培养 16h，取 USDA110 基因文库 3ml 和 pRK2013 3ml 混和，37℃ 静置培养 1h，加 3ml 受体菌 321 或 338，混匀、过滤，滤膜置于 TY 平皿上培养 16h，用 10ml 无菌水洗脱菌体，菌悬液

适当稀释后涂 YM Sm 30 μ g/ml、Tc15 μ g/ml 平板,并用同样的平板影印 5 次后,选出 321 和 338 带有 USDA110 基因文库的接合子。用无菌水将接合子洗脱,装入无菌试管中待接种大豆。

(2) pLAFR1::nod 质粒从快生型大豆根瘤菌转移至 *E.coli* HB101 中:快生型大豆根瘤菌 321C、338C 接种于 3ml TY 液中,150rpm 摇动培养 36h,与 2ml 对数生长期的 pRK2013 混合,28 $^{\circ}$ C 静置培养 5h,再加 2ml 对数生长期的 HB101 混匀,过滤^[14],滤膜置于 TY 平板上培养 16h,10ml 无菌水洗脱菌体,用 LB Tc 20 μ g/ml 选出 HB101(pLAFR1::nod) 接合子。

2. 结瘤试验:采用砂培法盆栽试验,参见文献[15]。将大量的带有 USDA110 基因文库的 321 及 338 细胞 ($>10^4$) 接种大豆(六月爆)各 4 盆。一个月对照植株叶片发黄,即可取出植株观察结瘤情况。

3. 根瘤菌的分离:将所得到的根瘤用 0.2% 的升汞表面消毒 5min,用 5ml 无菌水洗涤 5 次,用镊子将根瘤夹破,流出的菌液划线于 YM Sm 30 μ g/ml、Tc 15 μ g/ml 结晶紫培养基的平皿上,并在此种平皿上划线纯化 3 次。

4. 质粒提取:根瘤菌质粒提取用快速细胞原位裂解法。将菌株接种于 3ml PA 液中,28 $^{\circ}$ C 摇动培养 20h,离心 1.5ml 菌液,沉淀悬浮于 20 μ l 10mg/ml 溶菌酶缓冲液中,0—4 $^{\circ}$ C 30min,上样电泳,见文献[16]。大肠杆菌质粒提取按文献[14]方法。

5. 探针的制备:结瘤基因(nod)探针 pRm26 采用氯化铯超离心法^[17]得到。

6. DNA-DNA 分子杂交:将分离好的质粒用 Southern 转移法将质粒 DNA 转

移至硝酸纤维素滤膜上。预杂交温度为 42 $^{\circ}$ C,杂交温度为 65 $^{\circ}$ C,洗膜温度控制在 42 $^{\circ}$ C,详细步骤参见文献[17]。

7. pLAFR1::nod 质粒的酶切试验:用电洗脱法回收质粒 DNA^[17],50 μ l 质粒 DNA 加 2 μ l 限制性内切酶 EcoRI(100 μ g/ml,华美生物工程公司生产),10 μ l 高盐缓冲液,双蒸水补充至 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 水浴保温 4h,煮沸 1min 后取 15 μ l 上电泳,检查酶切结果。参见文献[17]。

结 果

(一) 基因文库的转移

用 pLAFR1 为载体构建的 USDA110 基因文库,通过辅助质粒 pRK2013,与不结瘤菌株 321、338 进行三亲本杂交,pLAFR1 具 Tc 抗性基因,321、338 对 Tc 敏感,但有 Sm、Km 抗性,用 YM Sm 30 μ g/ml、Tc 15 μ g/ml 平板选择接合子,在此平板上长出的每个单菌落即为 321、338 获得的一个 USDA110 cosmid 克隆,我们将 321、338 的三亲本杂交菌悬液各涂 15 皿抗性选择平板,每皿单菌落在 300—400 之间,并在此平板上影印 5 次,淘汰受体菌及其回变体,所获得的菌落群体即为转移到 321、338 中的 USDA110 的基因文库,其转移频率为 5×10^{-4} 。

(二) pLAFR1::nod 接合子的获得

将转移到 321、338 的 USDA110 cosmid 基因文库接种大豆,只有 321、338 中获得了 USDA110 的 nod 基因的接合子才能结瘤,而获得了其它基因的接合子仍不结瘤。将带 USDA110 基因文库的 321、338 各接种四盆大豆,结果各有 2 盆长出了根瘤,总瘤数分别为 4 和 3。通过植物结瘤,从 321、338 的 USDA110 基因文库中钓到了带 nod 基因 cosmid 克隆的 DNA 片

段。

(三) 根瘤中分离的根瘤菌的特征

分离所获得的7个根瘤中的根瘤菌,这7株根瘤菌都具有Sm Tc抗性,且生长速度及菌落形态与亲株321、338及原始亲株191-4没有差别,说明这7株菌确为321、338的后代。将菌株编号为321C1、321C2、321C3、321C4、338C1、338C2、338C3。7个根瘤均呈粉红色,并且用气相色谱仪测定都具有固氮酶活性。

(四) 根瘤菌的质粒分离

用快速细胞原位裂解法分离以上7株根瘤菌的质粒,见图版I-A。可见321C、338C除保留原有的两条质粒外,都多出一条较pLAFR1分子量大的质粒,这条质粒即为cosmid载体pLAFR1上克隆有带USDA110的nod基因DNA片段的重组质粒——pLAFR1::nod,进一步证明从根瘤中分离的根瘤菌321、338获得pLAFR1::nod的接合子。

(五) pLAFR1::nod 质粒转移至 *E. coli* 及其质粒分离

为了方便进一步研究所获克隆DNA片段的大小及nod基因,将321C2、321C3、338C1、338C3中的重组质粒通过三亲本杂交转移到*E. coli* HB101中,用LB Tc 20μg/ml选出接合子。其接合转移频率为 1×10^{-4} 。接合子编号为:EC12, EC13, EC81, EC83。分离其质粒,见图版I-B。EC菌株都带一条较载体pLAFR1分子量大的质粒。

(六) 获得 pLAFR1::nod 重组质粒的物理证明

用Southern法将EC菌株质粒DNA转移至硝酸纤维素滤膜上,用 ^{32}P 标记的nod探针进行分子杂交,放射自显影结果见图版I-D。除载体pLAFR1为阴性反应外,EC12、EC13、EC81、EC83均为阳性

反应,证明用结瘤基因功能互补的方法从USDA110基因文库中获得的cosmid克隆的DNA片段上确实存在nod基因,即获得pLAFR1::nod重组质粒。

(七) pLAFR1::nod 质粒的酶切图谱

pLAFR1质粒有一个EcoRI酶切位点。将用EcoRI切开的pLAFR1与用EcoRI部分酶切的慢生型大豆根瘤菌USDA110总DNA连接,装入*E. coli*中而构成USDA110的基因文库。因此,为弄清所获克隆DNA片段的大小,将pLAFR1::nod质粒作了EcoRI的酶切图谱,结果见图版I-C。EC菌株与pLAFR1有一条相同的带,即为载体pLAFR1的线状DNA片段。此外,EC菌株都多出两个酶切片段,其分子量分别约为25kb和7.0kb,故载体质粒pLAFR1克隆的带nod基因的DNA片段分子量约为32kb。

讨 论

用不结瘤的根瘤菌为受体,通过植物结瘤基因功能互补的方法,从根瘤菌的基因文库中钓取结瘤基因,准确、省时、操作简便。1982年,Sharon R. Long^[13]曾用此方法获得草木樨根瘤菌(*Rhizbium meliloti*)的结瘤基因。我们将慢生型大豆根瘤菌USDA110的基因文库转移至不结瘤的快生型大豆根瘤菌321、338中,只有获得了pLAFR1::nod的受体才能结瘤,因此我们快速、准确地获得了慢生大豆根瘤菌USDA110的结瘤基因。

所有根瘤菌的结瘤基因都有nod ABC等相同的基因结构,但不一定能相互表达,互补其基因功能。本文的试验结果表明,慢生型大豆根瘤菌的结瘤基因能在快生型大豆根瘤菌中表达。由于后者生长速

度快,质粒易分离,所获得的 pLAFR1::nod 重组质粒易转入 *E. coli* 中,为进一步研究慢生大豆根瘤菌 nod 基因分子结构提供了极大的方便。

虽然快生型大豆根瘤菌生长快,竞争能力强,但它们大多都结无效瘤,固氮能力一般也较差。而慢生型大豆根瘤菌生长慢,但大多结有效瘤,固氮能力较强。因此,将慢生大豆根瘤菌的结瘤基因转入快生型中并表达功能,对于用基因工程手段

构建固氮能力强、生长速度快、竞争能力强的大豆根瘤菌具有重大意义。

Henneck 报道,USDA110 的 nod 基因与 nif 基因紧密连锁^[4]。我们初步测定 321C、338C 等 7 个根瘤的固氮酶活性,都较其亲本 USDA191 强。所得到的带 nod 基因的 DNA 片段上是否还存在 nif 基因,321C、338C 等菌株的固氮酶活性是否提高,有待进一步实验证明。

参 考 文 献

- [1] Keyser, H.H. et al.: *Science*, 215:1631—1632, 1982.
- [2] Appelbaum, E.R.: *Journal of Bacteriology*, 170:12—20, 1988.
- [3] Appelbaum, E.R. et al.: in "Advances in Nitrogen Fixation Research" Veeger C. and Newton W. E. (eds.) Nijhoff/Junk Prodoc. P. 670, 1984.
- [4] Ebeling, S., Henneck, H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 207:503—508, 1987.
- [5] Fuhrmann, M., Henneck, H.: *Mol. Gen. Genet.*, 199:315—322, 1985.
- [6] Lamb, J.W., Henneck, H.: *Mol. Gen. Genet.*, 202:512—517, 1986.
- [7] Lamb, J.W.: In B. Lugtenberg (ed), *Recognition in microbplant pathogenic and symbiotic interactions*. Springer-Verlag KG, Berlin, P. 78—86.
- [8] Nieuwkoop, A.J.: *J. Bacteriol.*, 169:2631—2638, 1987.
- [9] 周路明等: *遗传*, 9(5):27—30, 1987.
- [10] Kennedy, C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 205:318—325, 1986.
- [11] Friedman, A.M. et al.: *Gene*, 18:289—296, 1982.
- [12] Ditta, G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:7347—7351, 1980.
- [13] Sharon, R.L. et al.: *Nature*, 298:485—488, 1982.
- [14] 宁林夫等: *遗传学报*, 13(1): 1—10, 1986.
- [15] 湖北省微生物研究所固氮组: *微生物学报*, 17: 217—222, 1977.
- [16] 王常霖等: *遗传学报*, 15(1):25—33, 1988.
- [17] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

NODULATION GENE OF *BRADYRHIZOBIUM* *JAPONICUM* TRANSFERRED INTO *RHIZOBIUM FREDII*

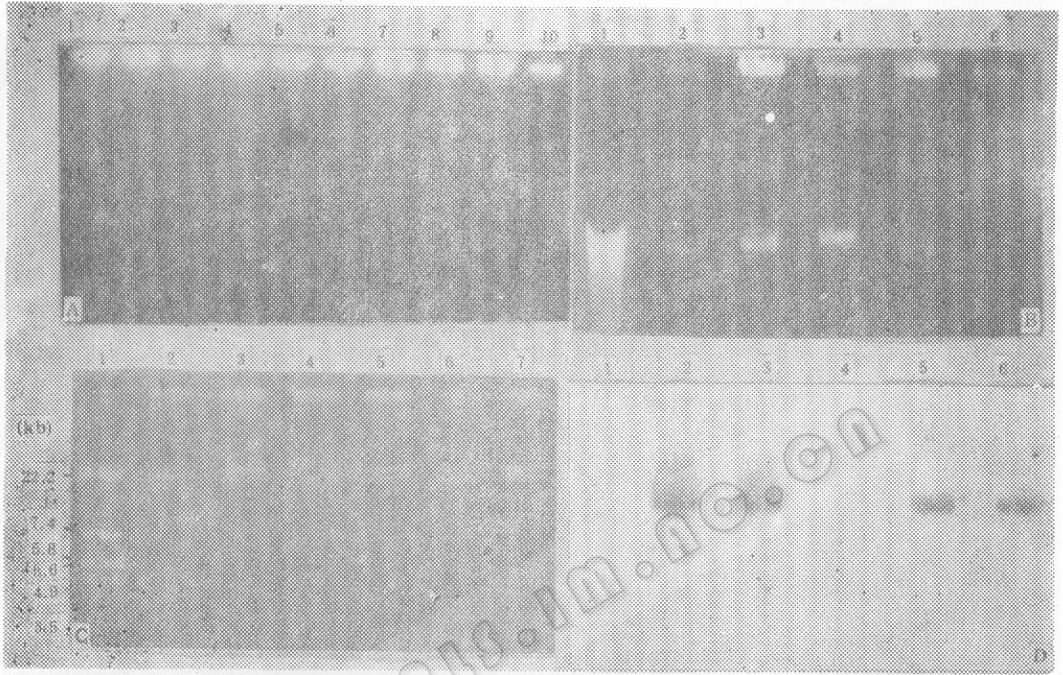
Zhou Luming, Huang Tongwang, Gong Hanying,
Ning Linfu, Cen Yinghua

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

The gene library of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 was transferred into non-nodulation mutants (mutated with Tn5) of *Rhizobium fredii* USDA 191. The conjugants were inoculated in soybean to obtain Nod⁺ strains which have the nod gene of USDA 110. Strains isolated from seven nodules are Sm^r and Tc^r and have a new plasmid larger than vector plasmid pLAFR1. Recombinant plasmids were transferred into *E. coli* HB101 for further study. They showed active reaction when hybridizing with nod probe. Digested with EcoRI, the recombinant plasmids all produced a 25kb fragment and a 7.0 kb fragment apart from the 21.6kb pLAFR1 fragment. So the fragment containing nod gene cloned into pLAFR1 is about 32kb.

Key words

Complementation; nodulation gene; plasmid



A. 快生型大豆根瘤菌接合子的质粒电泳图

Plasmids pattern of conjugant of *Rhizobium fredii*

1. Parent 191-4; 2. 321C1; 3. 321C2; 4. 321C3; 5. 321CH; 6. 338C1; 7. 338C2; 8, 9. 338C3; 10. Vector plasmid

B. 转移到大肠杆菌HB 101中的重组质粒

Recombinant plasmids transferred into *E. coli* HB101

1. Vector Plasmid pLAFR1; 2. EC12; EC13; 4. Receptor HB101; 5. EC81; 6. EC83

C. 重组质粒的 *Eco*RI 酶切图谱

*Eco*RI vestriction Pattern of recombinant plasmids

1. λ -DNA (as size marker); 2. vector plasmid PLAFR1; 3. EC12; 4. pLAFR1; 5. EC13; 6. EC81; 7. EC83

D. EC 菌株的重组质粒与nod探针进行DNA-DNA分子杂交

Recombinant plasmids in EC strains were made DNA-DNA molecular hybridization with nod probe

1. Vector plasmid pLAFR1—negative reaction; 2. EC12—Positive reaction; 3. EC13—positive reaction; 4. Receptor HB101—negative reaction; 5. EC81—positive reaction 6. EC83—positive reaction