

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳用于根瘤菌鉴定的研究

汪恩涛* 陈文新 李季伦 俞大绂

(北京农业大学生物学院)

摘要 运用凝胶电泳技术分析了 40 余个根瘤菌菌株的可溶性蛋白。对蛋白质电泳图谱做了紫外扫描。结果发现,供试的慢生根瘤菌与快生根瘤菌各个种有明显区别,快生根瘤菌种间也有明显差别。蛋白质电泳图谱可用于种群鉴定,用于区分各种群的主要区域在相对迁移率为 0.42 至 1.0 之间。该方法比裂解气相色谱法费时多些,但比生理生化鉴定快,且重复性好,方法简便。

关键词 凝胶电泳;蛋白质;根瘤菌鉴定

迄今为止,在豆科植物上结瘤固氮仍然是鉴定根瘤菌的唯一标准^[1]。但是,有不少报道认为根瘤菌的结瘤能力由质粒基因决定^[2]并有

根瘤菌丧失结瘤能力的情况^[3]。按照根瘤菌的

* 现在北京市农科院土肥所。

上述鉴定标准,丧失结瘤能力的菌株就不再是根瘤菌了。但是有试验表明,丧失结瘤能力的菌株其 DNA 碱基序列并未发生明显变化^[3]。显然,以结瘤固氮能力作为分类范畴中根瘤菌鉴定的唯一标准是不合适的。近年来,许多人对根瘤菌的鉴定方法做了探讨,其中核酸分子杂交^[4],可溶性蛋白质的双向电泳分析^[5],数值分类中多特征分析^[6]等均可用于根瘤菌的鉴定。但是这些方法均费时或要求特殊的仪器和药品。1980年, Noel 和 Brill^[7]用可溶性蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳做了大豆根瘤菌群体动态和差异的研究,提出该方法可用于大豆根瘤菌菌株的鉴定。

在根瘤菌分类研究中,我们发现蛋白质电泳图谱在根瘤菌,尤其是快生根瘤菌中具有种的特异性,可以用于根瘤菌种的鉴定。

材料与方 法

供试菌株包括 44 株根瘤菌和 2 株土壤杆菌。均采用酵母汁-甘露醇培养基^[8]。培养温度 28℃。

5ml 液体菌种接种于 100ml 培养液中,振荡培养至稳定生长期初期。4,000 r/min(约 $3,500 \times g$)离心 20 分钟收集菌体。用冰冷的 10mM Tris-HCl pH7.0 缓冲液离心洗涤三遍。保存于-20℃或立即超声破碎。破碎时每 0.1g 湿菌体加 2 ml 冰冷的 10mM Tris-HCl pH7.0 缓冲液,于冰浴中超声破碎 4 分钟。之后于 0℃, 10,000r/min(约 $5,500 \times g$)离心 10 分钟。取上清液 4℃冰箱保存或立即测蛋白浓度。蛋白浓度的测定用 Lowry 法^[9],用牛血清白蛋白做标准曲线。样品用 10mM Tris-HCl pH7.0 缓冲液调至 2.4mg 蛋白/ml。取 1ml 与 0.5ml 样品缓冲液^[7](2 ×)混合,得到每 50 μ l 含蛋白 80 μ g 的工作样品,于-20℃保存。

电泳采用 Laemmli 体系^[10]。电泳仪为 CSR-4 高压电泳仪。电泳槽为北京六一仪器厂生产的多用途电泳槽。压缩胶浓度为 4.5%,分离胶浓度为 12%,另以 15% 胶封底。胶厚 1.5mm。

每块胶板可加样品 15 个,每样品加 50 μ l 含蛋白 80 μ g。电泳初始电流 40mA,挂冰冷却。至溴酚蓝指示剂进入分离胶即转入 4℃冰箱,加大电流至 80mA,稳压电泳至溴酚蓝指示剂距分离胶底部 1cm 时结束。染色用溶于 25% 三氯乙酸的 0.1% 考马斯亮蓝 R-250,室温染色 3 小时。用 30% 乙醇-7% 乙酸脱色 8 小时,中间换两次脱色液。然后转入 7% 乙酸中边脱色,边保存,直至背景无色时,对胶板进行紫外扫描。

紫外扫描在 CS-910 双波长薄层色谱扫描仪上完成。扫描波长 580nm,参比波长 450nm,狭缝长 5.7mm。胶板扫描和记录纸走的速度同步,为 80mm/min。

结果与讨论

1. 重复性: 为了检验试验结果的重复性,做了同一菌株的重复培养物,同一培养物的不同次处理和同一样品不同次电泳的比较。从所得结果看,同一菌株的重复培养之间和同一培养物的不同次处理之间样品的蛋白质电泳图谱无明显差异。不同次电泳会造成蛋白质图谱的微小变化,但这种变化不足以造成错误的鉴定结果。上述结果表明,供试菌株的蛋白质电泳图谱在本试验条件下是稳定的,结果的重复性较好。在试验中,我们感到对紫外扫描图谱的比较要比对电泳图谱的直接比较容易些,但在比较紫外扫描图谱时,最好与电泳图谱进行对照。

2. 种的鉴定和菌株鉴定: 对蛋白质电泳图谱的比较可以看出,全部供试菌株的可溶性蛋白在电泳中的分布趋势是相同的。大量的蛋白分布在相对迁移率(Ef) 0.20—0.64 之间,在此范围外的大分子和小分子蛋白的量都较少。

从图 1 列出的几个根瘤菌种的代表菌株的图谱可以看到:慢生根瘤菌与快生根瘤菌各个种有明显区别,快生根瘤菌种间也有明显差别。而苜蓿根瘤菌(图 2),紫云英根瘤菌(图 3)和快生大豆根瘤菌(图 4)各种内菌株间蛋白质图谱却非常相似,有其共同特征,只是供试的豌豆根

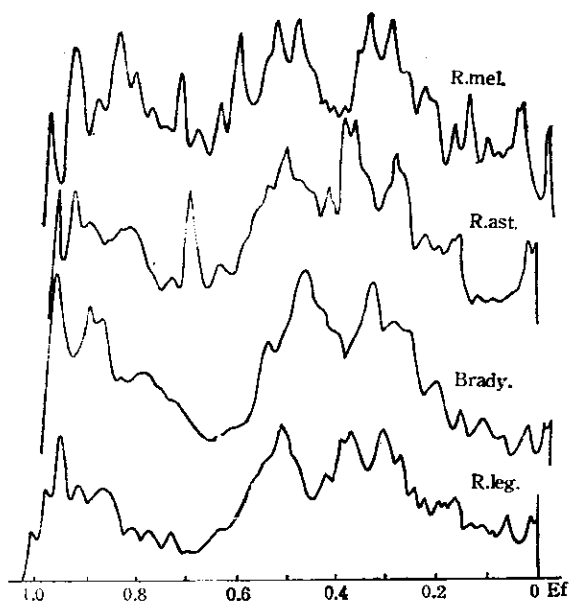


图1 根瘤菌不同种属蛋白图谱的比较

R. mel. 为苜蓿根瘤菌 R. ast. 为紫云英根瘤菌
Brady. 为慢生根瘤菌 R. leg. 为豌豆根瘤菌

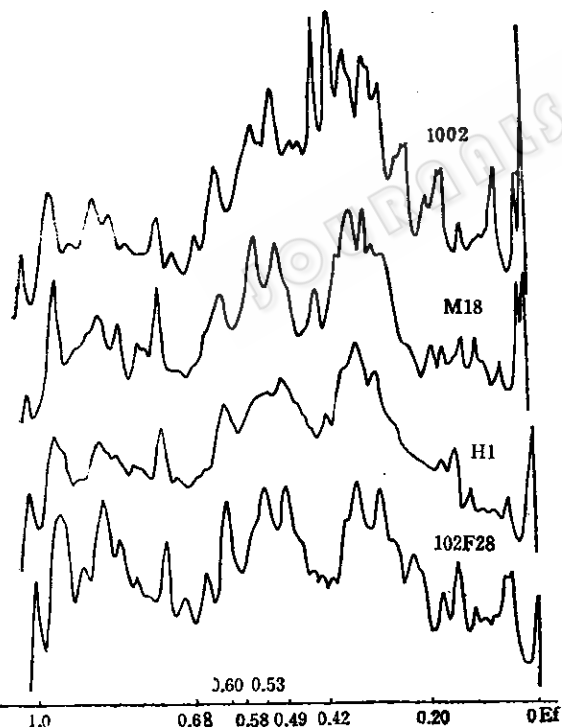


图2 苜蓿根瘤菌蛋白质电泳图谱的紫外扫描

瘤菌菌株间的差别较大。

苜蓿根瘤菌(图2)的共同特征区域在Ef值

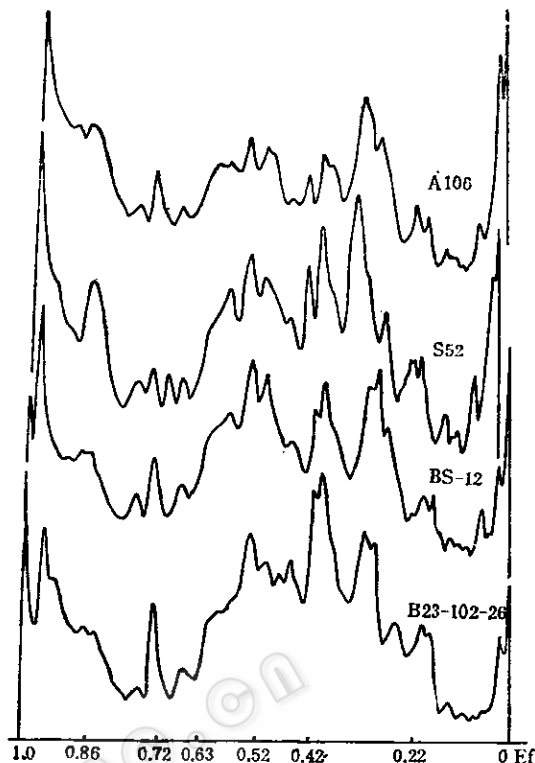


图3 紫云英根瘤菌蛋白质电泳图谱的紫外扫描

0.42—1.0 之间。在此区域,其蛋白质吸收峰以0.68处的“谷”分成两组。一组由0.49, 0.53和0.60处的三个峰及0.58处的一个谷组成;一组由0.68—1.0之间的基本上是对称分布的几个峰组成。在0.42以前的部分,各个菌株间也是比较相似的,但比0.42—1.0之间的差异要大些。

紫云英根瘤菌(图3)的显著共同特征也存在于Ef值0.42—1.0之间。它们在0.52处有一突出的,比较窄的高峰,在其两侧是几个渐次下降的峰,从而构成一个基本对称的图形。在0.72和0.86处的两个高峰及一些矮峰与上述一组峰一起构成紫云英根瘤菌的特征区。在0.42以前,图谱的相似性也是很高的。比较起来,紫云英根瘤菌菌株间的蛋白质图谱差异要比苜蓿根瘤菌菌株间的差异更小。

快生大豆根瘤菌(图4)的供试菌株具有非常相似的蛋白质图谱。在Ef值0.42—1.0之间,它们以共同的图谱区别于上述两个种。同时,它们在0.16附近的三个峰也是共同的。在0.52处,它们也有一窄的高峰,但其两侧呈不对称分

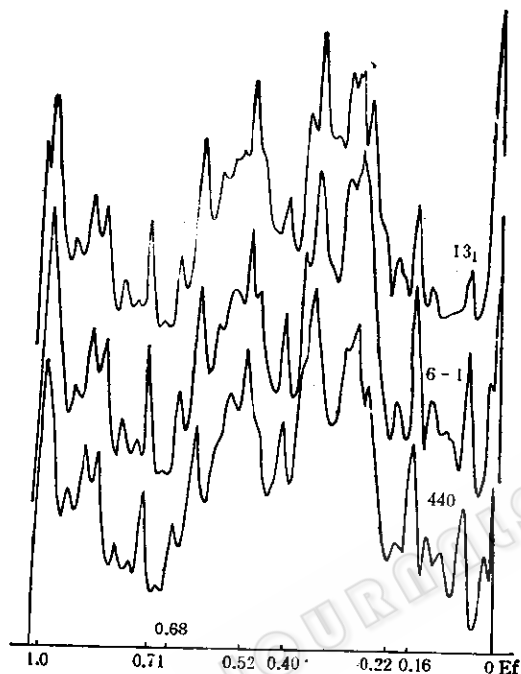


图 4 快生大豆根瘤菌蛋白质电泳图谱的紫外扫描布。

从上述分析及各菌株的图谱来看,在 Ef 值 0.42 以前的部分尽管是种内相似的,但比起 0.42 以后的部分来差异要大一些,它们可能代表着菌株间的差异而在菌株鉴定中有重要意

义。

综上所述,快生根瘤菌的一些种可用蛋白质电泳图谱进行鉴定。用于鉴定的主要区域在相对迁移率为 0.42—1.0 之间。该方法虽比裂解气相色谱费时多些,但比生理生化鉴定要快得多,且其重复性好,方法易掌握。

参 考 文 献

- [1] Allen, O. N. and E. K. Allen: Family Rhizobiaceae. In R. S. Breed, E. G. Murray and N. R. Smith (ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1957.
- [2] Dunican, L. K. and F. C. Cannon: *Plant and Soil*, Special Vol. 73—79, 1971.
- [3] Jarvis, B. D. W. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 42—52, 1980.
- [4] Gibbins, A. M. and K. F. Gregory: *J. Bacteriol.*, 111: 129—141, 1972.
- [5] Roberts, G. P., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 414—422, 1980.
- [6] Graham, P. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 35: 511—517, 1964.
- [7] Noel, K. D. and W. J. Brill: *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 931—938, 1980.
- [8] Vincent, J. M.: *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1970.
- [9] 菅原洁·副岛正美著, 张旭译:《蛋白质定量法》第二版, 农业出版社, 1981.
- [10] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227: 680—685, 1970.