

根瘤菌结瘤因子的微量生物检测法

杨国平 朱 军 徐苏芸 娄无忌

(南京农业大学微生物学系, 南京 210095)

摘 要 在豆科植物根系分泌物诱导下, 根瘤菌在自生状态下能产生胞外寡糖胺类物质——结瘤因子, 其生物学功能之一是引起某些豆科植物根毛卷曲。结瘤因子与根毛接触 4h 后, 即使去除结瘤因子, 3~6 天后根毛即能发生变形。据此设计出一种结瘤因子微量生物检测法。该法操作方便, 并且只需耗用微量结瘤因子。

关键词 根瘤菌, 结瘤因子, 微量检测法

根瘤菌与其豆科寄主植物在共生过程中存在着特异性的相互识别现象, 寄主植物分泌某种(或某些类黄酮)刺激根瘤菌产生胞外寡糖胺类物质, 诱使寄主植物发生根毛变形。这类物质被称为结瘤因子(Nod factor)^[1]。结瘤因子的生物合成涉及许多酶, 而先前所鉴定的根瘤菌结瘤基因(nod genes)的生物功能即是编码这些酶, 或对合成过程进行调控^[2]。结瘤因子的发现和分子结构的阐明是近年来生物固氮领域的重要进展之一。Truchet^[3]等证明, 共生固氮中复杂的结瘤过程可由结瘤因子独立完成而无需根瘤菌参与。他们用纯化的结瘤因子诱导出解剖正常的空瘤。由此可看出结瘤因子在共生固氮体系中的重要作用。结瘤因子的研究已成为共生固氮研究的重要课题。鉴于结瘤因子研究的重要意义, 建立简便有效的结瘤因子生物检测系统就成为开展这方面研究的基本条件。我们在开展结瘤因子研究的过程中, 对原有的结瘤因子生物检测方法作了一些改进^[4]。后来发现结瘤因子只需与根毛接触 4h 左右, 即能诱导根毛变形, 利用此特性建立了结瘤因子的微量检测法。

1 材料和方法

1.1 紫云英种子(弋江品种)的表面消毒和萌发

分别用 95% 乙醇浸泡 5min 和 0.2% 升汞

浸泡 15min, 然后用无菌水漂洗 6—8 次, 置 4℃ 冰箱中备用。用前将种子分布于 1.0% 的水琼脂平板上, 黑暗中倒置培养 36h 左右使其发芽。

1.2 种子分泌物的制备

表面消毒的种子用 5 倍体积的甲醇, 于沸水浴中加热抽提 30min。弃种子, 含类黄酮的甲醇相在旋转蒸发器上减压蒸发至干。用适量蒸馏水重新悬浮固形残留物, 用等体积乙醚抽提 3 次。乙醚蒸发干后加适量甲醇(约为原用醇体积的 1%)溶解, 再补充等体积蒸馏水, 过滤后备用。

1.3 结瘤因子的产生

紫云英根瘤菌 Ra98 在 YM 液体培养基^[5]上振荡培养 36h(28℃)。使 OD₆₀₀ 达到 0.3~0.5。离心收集菌体, 用 NFP 培养基(本研究)洗涤一次。将细菌重新悬浮在 NFP 培养基中, 使 OD₆₀₀ = 0.05~0.1, 加入 0.1% 种子分泌物。28℃ 振荡培养过夜。7000r/min 离心去菌体, 上清液用 1/5 体积正丁醇抽提 2 次, 用 1/10 体积正丁醇抽提一次。将正丁醇相减压浓缩到干, 固形物用适量蒸馏水溶解, 室温下用等体积乙酸乙酯抽提三次。水相为结瘤因子粗提物, 过滤或用 1×10⁵Pa 灭菌 10min 备用。

NFP 培养基(g/L): NaHPO₄ 5.8, KH₂PO₄ 3.0,

国家自然科学基金资助项目

1995-03-14 收稿

NaCl 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, 甘露醇 5.0, $(NH_4)_2SO_4$ 0.65, Vitamine B₁ 1mg, 烟酰胺 1mg, 生物素 0.1mg, 泛酸钙 1mg, pH 6.8.

1.4 微量检测

取 1~10 μ l 结瘤因子粗提物于 1.5ml Eppendorf 离心管中, 补充 90 μ l Fahraeus 培养基^[6]. 另取 4 颗发芽种子(根长约 5~10mm) 浸入结瘤因子液体中, 置黑暗中 4~5h (22~25 $^{\circ}C$). 在干净无菌载玻片的一端放置 2 颗经结瘤因子处理过的发芽种子, 用盖玻片压住根部, 露出子叶. 用 45 $^{\circ}C$ 左右的水琼脂 (1.0%) 溶液固定小芽和盖玻片. 将此玻片放入无菌培养皿中, 加入 12ml Fahraeus 培养液, 在光照培养箱中倾斜放置培养皿, 使植物根部与培养液接触, 22~25 $^{\circ}C$ 培养 3d (16h 光照 8h 黑暗) 后, 用倒置生物显微镜观察根毛变形情况.

2 结果和讨论

用上述步骤操作能够获得常规 Had 试验完全相同的结果. 以紫云英根瘤菌为材料, 同样可见根毛呈“Z”字形扭曲变形. 在结瘤因子的研究过程中我们发现, 结瘤因子与根毛接触 4h 以后, 环境中即使不再有结瘤因子存在, 2~3d 后

根毛仍能发生剧烈变形. 据此我们设计出新的微量检测法, 用极其微量的结瘤因子代替常规所用的大量结瘤因子. 在此之间, Had 试验一般需用 15~25ml 一定浓度的结瘤因子^[7], 微量 Had 试验法只需用 100 μ l 相应浓度的结瘤因子, 使生物检测所耗的结瘤因子减少到最低限度. 同时因为根毛直接浸泡在结瘤因子中, 试验的重复性好, 结果更加稳定可靠, 操作上也较为简便. 微量检测法将为根瘤菌结瘤因子研究提供一个更加有效和实用的检测手段.

参 考 文 献

- [1] Lerouge P, Roche P, Faucher C, *et al.* Nature, 1990, **344**: 781~784.
- [2] Fisher R F, Long S R. Nature, 1992, **357**: 655~660.
- [3] Truchet G, Roche P, Lerouge P, *et al.* Nature, 1991, **351**: 670~673.
- [4] 杨国平, 朱军, 娄无忌. 南京农业大学学报(微生物学专刊), 1995, **18** (增刊): 122~124.
- [5] Jordan D C. Bergey's manual of systematic bacteriology, Baltimore, American Microbil. Society Press, 1984, Vol. 1, 237.
- [6] Vincent J M. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Oxford, Blaskwell Sci Pub Ltd, 1970.
- [7] Banfalvi Z, Kondorosi A. Plant Mol Biology, 1989, **13**: 1~12.