

天山根瘤菌(*Rhizobium tianshanense*)

全细胞蛋白电泳和多位点酶电泳分析

许晓东* 陈文新

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 用全细胞可溶性蛋白电泳和多位点酶电泳对 15 株天山根瘤菌(*Rhizobium tianshanense*)和其它 10 株快慢生根瘤菌进行聚类分析, 结果表明 *R. tianshanense* 种内菌株关系密切而与其它种不同。分析时将全细胞蛋白电泳图谱分为 254 等份, 根据每等份内条带的有无进行聚类, 结果与数值分类基本一致, 说明用该方法对全细胞蛋白电泳结果进行聚类可以作为根瘤菌的分群手段; 用所有出现的 109 种迁移率对 17 种多位点酶的电泳结果作聚类分析, 得到与全细胞蛋白电泳相似的结果。

关键词 天山根瘤菌, 全细胞蛋白电泳, 多位点酶电泳

1987 年开始, 陈文新等^[1]对来源于新疆的根瘤菌进行分类研究时, 发现了一个特殊的根瘤菌群, 后来把在该地区采集到的 20 株有关根瘤菌和 27 株已知的快慢生根瘤菌用 148 个性状进行聚类分析, 发现未知菌中有 17 株菌在 82% 的相似性水平上独立成群。进一步根据 DNA-DNA 杂交和 16S rRNA 基因部分测序的结果, 1995 年陈文新等^[2]将这群菌定为一个新种天山根瘤菌(*Rhizobium tianshanense*)。

本实验试图采用国际系统细菌学委员会根瘤菌和土壤杆菌分委会推荐的多位点酶电泳和全细胞蛋白电泳技术^[3], 对 *R. tianshanense* 作进一步的分析。

1 材料与方法

1.1 菌种

实验中共采用 25 株根瘤菌, 其中 *R. tianshanense* 15 株, 其它种的模式菌 8 株, 另加 *Bradyrhizobium japonicum* 参比菌 2 株(表 1)。菌株的活化及培养条件同文献^[4]。

1.2 全细胞蛋白电泳

实验采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续电

泳系统。分离胶浓度为 15%, 浓缩胶 3%, 胶厚 0.4mm。制胶移植了 DNA 测序电泳的方法, 样井间用鲨鱼齿梳子做间隔, 使各泳道紧挨在一起, 便于比较蛋白质条带间迁移位置的异同。

银染方法见文献^[5]。

将每个菌的电泳图谱平均分为 254 等份(中国科学院微生物研究所 MINTS 软件包所能处理的最多数据数为 255), 每份内如果有条带则记为“1”, 无条带记为“0”, 用 MINTS 软件包进行聚类, 相似性计算公式为 $S = (a+b) / \text{TOTAL}$, 其中 a 和 b 分别为都是“0”和都是“1”的数据数, TOTAL 为数据总数, 聚类方法为平均连锁法, 最终生成树状谱。

1.3 多位点酶电泳

1.3.1 粗酶液的制备

用 1ml 蒸馏水在 1.5ml 离心管中悬浮菌体, 每管加入 500 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ 溶菌酶 10 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴

* 现在通讯地址: 中国科学院微生物研究所

国家自然科学基金资助项目

1995-11-20 收稿

表1 供试菌株一览表

菌株	原寄主	来源	编号
<i>R. loti</i> NZP2213 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	新西兰	1
<i>R. meliloti</i> USDA1002 ^T		美国	2
<i>R. leguminosarum</i> USDA2370 ^T		美国	3
<i>R. tropici</i> CIAT899 ^T	<i>Phaseolus vulgaris</i>		4
<i>R. galegae</i> HAMB1540 ^T	<i>Galega orientalis</i>	芬兰	5
<i>R. huakuii</i> CCBAU2609 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	南京	6
<i>R. fredii</i> USDA205 ^T	<i>Glycine soja</i>	河南	7
<i>R. japonicum</i> USDA6 ^T	<i>Glycine max</i>	美国	8
SEM1A5601	<i>Glycine max</i>	巴西	9
SEM1A5079	<i>Glycine max</i>	巴西	10
<i>R. tianshanense</i>		新疆	
A-1BS ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>		11
6	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>		12
032B	<i>Caragana polourensis</i>		13
060A	<i>Halimodendron holodendron</i>		14
016Bm	<i>Swainsonia salsula</i>		15
005B	<i>Sophora alopecuroides</i>		16
009B	<i>Glycine max</i>		17
91×01	<i>Glycine max</i>		18
91×05	<i>Sophora alopecuroides</i>		19
91×07	<i>Sophora alopecuroides</i>		20
91×72	<i>Sophora alopecuroides</i>		21
91×09	<i>Sophora alopecuroides</i>		22
91×10	<i>Halimodendron holodendron</i>		23
91×11	<i>Caragana plourensis</i>		24
91×13	<i>Glycyrrhiza</i> sp.		25

注: ^T 为模式菌株

保温 40min, 再用超声波处理 5s, 12000r/min 离心 15min, 取上清分装小份, 保存于-70℃冰箱中备用。

1.3.2 电泳及染色

按文献[6, 7]进行。共分析了乙醇脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、半乳糖脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、黄嘌呤脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、磷酸葡萄糖变位

酶、磷酸葡萄糖异构酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、氨肽酶和酯酶等 17 种酶。

1.3.3 结果处理

对于特定的供试菌, 在每一种酶所有出现条带的迁移率中, 某一迁移率有条带则记为“1”, 无条带则记为“0”。将结果输入计算机, 聚类方法同全细胞可溶性蛋白电泳, 最终生成树状谱。

2 结果与讨论

每个菌株电泳图谱上采集到的 254 个数据用平均连锁法进行聚类分析, 聚类结果见树状谱(图 1B)。

2.1 全细胞蛋白电泳

25 株菌全细胞蛋白电泳结果见图 1A, 把

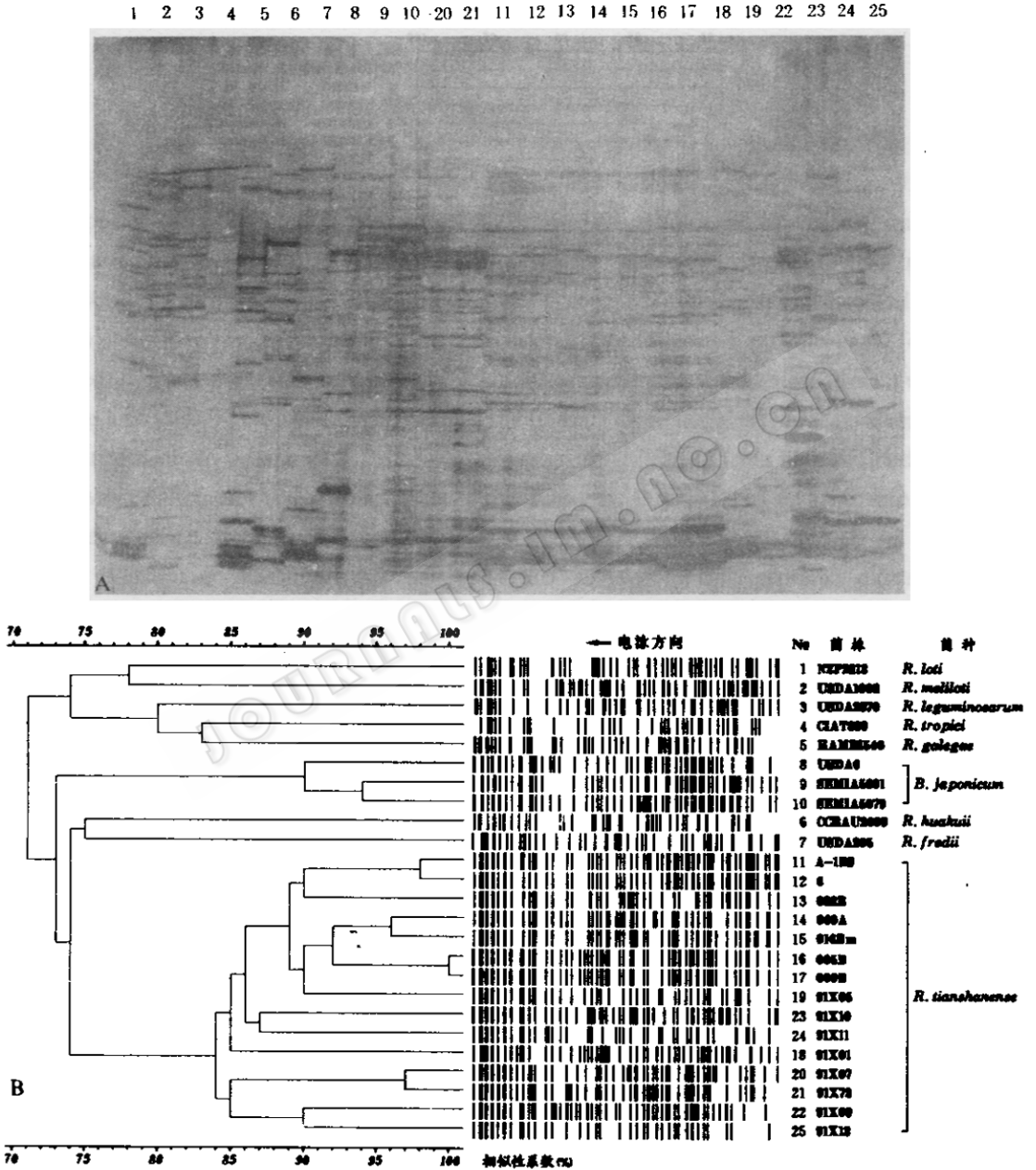


图 1 25 株菌全细胞蛋白电泳图谱(A)和电泳聚类结果(B)

供试菌株中所有的九个种在 84% 的相似性水平上全部分开; *R. japonicum* 的三株菌在 90% 的相似性水平上聚在一起; *R. tianshanense* 的 15 株菌在 84% 的相似性水平上聚在

一起, 成为一个独立的菌群, 与各已知种相区别; 此结果与数值分类的结果完全一致, 表明用全细胞蛋白电泳进行聚类分析完全可以作为根瘤菌种群划分的参考, 方法快速可行。

R. tianshanense 种内菌株间的相互关系与数值分类结果也很一致, 如 91×07、91×72、91×09 和 91×13 聚成一小群而与种内其它菌株关系略远, A-1BS 与 6、005B 与 009B 关系较近等。

2.2 多位点酶电泳

17种酶中每种酶所有出现的不同迁移率一共 109 种, 用平均连锁法进行聚类分析, 聚类结果见树状谱(图 2)。

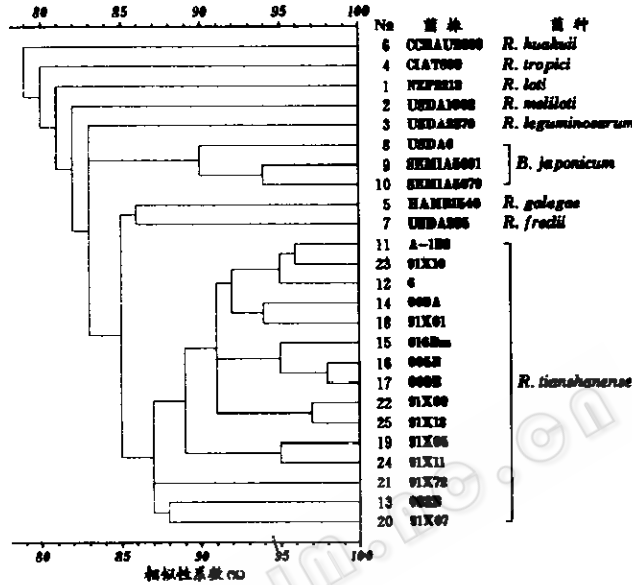


图 2 25 株菌多位点酶电泳聚类结果

供试菌株中所有的种在 87% 的相似性水平上全部分开, 其中 3 株 *B. japonicum* 在 90% 的相似性水平上聚在一起, 全部的 15 株 *R. tianshanense* 在 87% 的相似性水平上聚在一起。

明显区别于其它的种。用这两种方法研究的结果支持 *R. tianshanense* 为一独立的根瘤菌种。

R. tianshanense 种内菌株间的相似关系大体与数值分类相符, 如 A-1BS 和 6、91×05 和 91×11、91×09 和 91×13 及 005B 和 009B 间的关系较近。

参 考 文 献

至于种与种间的相似程度则不能在这两种方法上表现出来, 正如在数值分类中表现不出来一样。看来这三种分析方法, 即根据表型性状对菌株进行聚类, 用作根瘤菌种群划分的参考均是可行的; 其中全细胞蛋白电泳最简单快速, 数值分类方法虽较复杂, 但同时能找出菌群之间的鉴别特征, 也有其不可替代的优点。

[1] 陈文新, 吴柏和, 骆传好, 等. 中国农业科学, 1987, 20(6): 22~27.

[2] Chen W X, Wang E T, Wang S Y, et al. Int. J. Syst. Bacteriol, 1995, 45: 153~159.

[3] Graham P H, Sadowsky M J, Keyser H H, et al. Int. J. Syst. Bacteriol, 1991, 41: 582~587.

[4] 汪恩涛, 陈文新, 李季伦, 等. 微生物学通报, 1987, 14(2): 86~89.

[5] 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18: 32~37.

[6] 张维强, 唐秀芝. 同工酶与植物遗传育种, 北京: 北京农业大学出版社, 1993, 128~190.

[7] Young J P W. J. Gen. Microbiol, 1985, 131: 2399~2408.

2.3 结论

全细胞蛋白电泳和多位点酶电泳的结果表明, *R. tianshanense* 种内 15 株菌的关系密切且

ANALYSIS ON *RHIZOBIUM TIANSHANENSE* BY WHOLE-CELL PROTEIN ELECTROPHORESIS AND MULTILOCUS ENZYME ELECTROPHORESIS

Xu Xiaodong Chen Wenxin

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

Abstract Fifteen strains of *Rhizobium tianshanense* and ten representative strains of described rhizobial species were analysed by electrophoresis of whole-cell proteins and multilocus enzyme. Electrophoretic profile of whole-cell proteins for each strain were divided into 254 equal parts. Distributions of protein bands in each part were recorded, and the date were used for clustering analysis. On the other hand, the relative migration of each multilocus enzyme band for each strain were recorded. Total 109 migration values for 17 multilocus enzyme were obtained, and were also used for clustering analysis. The results that based on the date of these two electrophoretic analysis showed that fifteen strains of *R. tianshanense* formed a unique group, differing from all described species. This conclusion was confirmed the results of phenotypic analysis, DNA-DNA hybridization, and partial 16S rRNA sequencing. It supported the proposal for *R. tianshanense*.

Key words *Rhizobium tianshanense*, electrophoresis of whole-cell protein, electrophoresis of multilocus enzyme