

## 研究报告

# 尼泊尔马桑根瘤内生菌纯培养物的质粒检测

胡传炯<sup>1)</sup> 周平贞<sup>2)</sup> 周 启<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

(<sup>2)</sup> 中国农业科学院油料作物研究所 武汉 430062)

**摘 要** 采用胶内裂解法快速检测了 21 株马桑根瘤内生菌纯培养物和 4 株弗兰克氏菌参考菌株的质粒, 其中有 5 株马桑分离菌株和 1 株参考菌株含有质粒。除马桑菌株和参考菌株各有 1 株携带 2 个质粒外, 其它菌株均只含有 1 个质粒。这些质粒的分子量约为 13~20kb。根据所含质粒的大小和数目, 将 21 株马桑分离菌株划分成 4 个质粒类群。实验还对菌丝体生长、细胞酶解和裂解等条件对质粒检测效果的影响进行了探讨。

**关键词** 马桑, 弗兰克氏菌, 质粒

1982 年 Marvel 首次在弗兰克氏菌 (*Frankia*) 菌株 Arl3 和 Cp11 发现了质粒<sup>[1]</sup>, Normand 和 Simonet 在另一些 *Frankia* 菌株中检测到质粒<sup>[2,3]</sup>, 并作了进一步研究。但是, 随后十几年来, 国内外不再有关于 *Frankia* 质粒研究的新的报道。从现有资料来看, *Frankia* 并不像豆科植物根瘤菌那样绝大多数含有质粒, 它们只有少数菌株含有分子量一般较小的质粒。

质粒快检是研究 *Frankia* 质粒的一种重要手段, 但是该方法对于生长缓慢的 *Frankia* 来说, 要求有比豆科植物根瘤菌的质粒快检更加苛刻的条件。所以, 我们在检测马桑菌株的质粒时, 还探索了适于质粒快检的菌丝体生长、酶解和裂解的适宜条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验菌株

马桑根瘤内生菌分离物: Cs013, Cs025, Cs030, Cs103, Cs120, Cs146, Cs150, Cs155, Cs241, Cs426, Cs466, Cs470, Cs521, Cs631, Cs633, Cs635, Cs636, Cs641, Cs642 和 Cs643。参考菌株: Air12 分离自赤杨 (美国), 阮继生先生惠赠; Hr18, Cc01, Mg<sup>+</sup> 分别分离于沙棘 (辽宁), 细枝木麻黄

(广东) 和杨梅 (美国), 均为丁鉴先生惠赠。

### 1.2 培养基

S 培养基, 参照文献 [5]; S+Tw 培养基为 S 培养基加 0.2% Tween-80。

### 1.3 试剂

无色肽酶 (Achromopeptidase, Sigma 产品); 溶菌酶 (上海生化所产品); RNase (Sigma 产品)。

### 1.4 质粒的检测

菌种活化培养一周后, 经匀浆大量接种, 振荡培养 5~10d, 所得的新鲜培养物离心收集于 Ep 管中, 以 TE8 (tris · Cl<sup>-</sup> 50mmol / L; EDTA 20mmol / L, pH8.0)<sup>[4]</sup> 洗 2 次, 悬浮于等体积的裂解液 (于 1 × TBE 缓冲液<sup>[6]</sup> 中加入无菌的 Ficoll 40020% 溴酚兰 0.05%; RNase 300u / ml; 溶菌酶 7500u / ml; 无色肽酶粉剂 (10mg / ml) 中, 于 37℃ 水浴反应约 30min 后, 迅速移至冰上, 然后用剪去尖嘴的 Tip 小心点样。参考 Eckhardt 的方法<sup>[7]</sup> 制备 0.7% 的琼脂糖凝胶, 在紧靠加样孔的负极端制作一小槽, 其中含 0.4% 琼脂糖的

SDS凝胶。在TBE缓冲液里先以1v/cm电泳30min,然后以5v/cm下电泳2~4h。EB染色,照像。

## 2 结果

### 2.1 质粒的检测

采用胶内裂解法多次检测了21株马桑根瘤内生菌分离物和4株*Frankia*参考菌株的质粒。结果表明,有5株马桑菌株(Cs155,Cs426,Cs466,Cs470和Cs641)和1株参考菌株(Hr18)含有质粒。其中除Cs466和Hr18携带有2个质粒外,其它4株均只含有一个质粒。菌株Cs155,Cs470和Cs641各含一个质粒,其分子大小均约为20kb;而Cs426所含的质粒则为14kb左右。有意思的是,Cs466和Hr18所含两质粒大小很相近。其中大质粒的分子大小均在19kb左右。而小质粒都约为13kb(图1)。

### 2.2 质粒类群

依照质粒的数量和大小,可以将21株马桑菌株划分成4个质粒群,即类群I:包括菌株Cs155,Cs470和Cs641,它们各含有一个约20kb的相同大小的质粒;类群II仅菌株Cs426,它只含有一个约14kb的质粒;类群III,仅菌株Cs466,和Hr18含有约13kb和19kb两个质粒;类型IV则包括所有未检测到任何质粒的菌株。

### 2.3 裂解条件对质粒检测的影响

本研究采用体外胶内裂解法检测*Frankia*的质粒,快速简便。但要求很温和的细胞裂解液条件,若采用提取*Frankia*总DNA的方法则会使质粒遭到破坏。由于*Frankia*生长缓慢,细胞壁裂解很困难,用一般的适于放线菌或细菌的溶菌酶酶解往往难以奏效。所以,Simonet等<sup>[3]</sup>用高浓度的无色肽酶(5500u/ml)和溶菌酶混合酶解后,再用0.2%SDS裂解,获得较满意的结果。但此法操作过程既麻烦又费时,同时检测多数菌株时,细胞裂解往往因点样费时而难以同步。另外,大槽样品在高压电泳下也不易获得满意的电泳带。为此,我们对此法进行了改良,首先加大了无色肽酶的浓度,达

10000u/ml;其次,为了使裂解同步进行,在加样孔的负极端制一0.4%琼脂糖的裂解胶槽,内含0.02%SDS和0.1%溴甲酚绿,在低压电

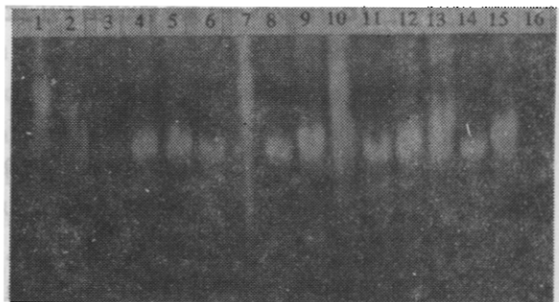


图1 内生菌纯培养质粒的电泳图谱

1.Airl 2; 2.Mg<sup>+</sup>; 3.Hr18; 4.Cs641; 5.Cs635; 6.Cs631;  
7.Cs470; 8.Cs466; 9.Cs426; 10.Cs241; 11.Cs155; 12.Cs146;  
13.Cs103; 14.Cs030; 15.Cs025; 16.入-Hind III

泳时,细胞酶解物在胶内几乎同时经SDS裂解而释放出粒。改良的方法既省时又能保证细胞同步有效地裂解,而且一般只需加样20μl细胞酶解物就可以检测出清晰的质粒。实验还表明SDS裂解液中加入0.01%的溴甲酚绿更有利于细胞有效地裂解。

### 2.4 酶解时间对质粒快检的影响

多次快检试验还表明,单用溶菌酶或无色肽酶酶解,胞壁裂解均不理想,只有两种酶共同作用,才获得满意的酶解效果;而且,酶解反应时间长短也直接影响到质粒快检的效果;菌株Cs466和Hr18在37℃下分别在新鲜酶解液中处理5,10,15,20,30,40,和60min后的检测结果表明,最适的反应时间为20~30min,此时细胞悬液刚刚开始变清变粘,若经胶内裂解一般

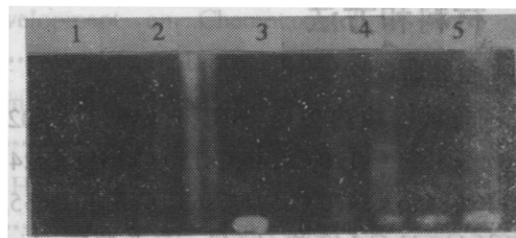


图2 Cs466在不同裂解时间下的质粒图谱

1~5分别为37℃下酶解5,10,15,20,30min

都能出现清晰的质粒带(图 2);而在其它反应时间下的细胞酶解物均未能检测到质粒;若酶解时间超过 40min 至 1h,细胞酶解物很粘稠,呈半透明的胶状物,几乎不能用 Tip 吸取。显微镜观察,这时的细胞壁大多溶去,轮廓不清,大量释放出来的原生质球也多崩解,因而电泳时一般只能看到染色体 DNA。

### 2.5 菌丝体生长条件对酶解和裂解的影响

将活化好的菌种匀浆后,再移接到“S + Tw”培养基中摇瓶培养(28℃, 80r/min) 1~2 周,这时的菌丝体最适于作质粒的快检。Simonet 等<sup>[4]</sup>认为,生理 A 群菌株质粒随菌龄或转代培养而变化。本实验表明,不同菌龄的同一菌株或其不同转代培养物,经同步培养后质粒检测的结果是一致的。此外,利用其它培养基如 Bap 和 Qmod,也常因菌丝体生长更缓慢影响到细胞的酶解和裂解,而不利质粒的检测。

## 3 讨论

*Frankia* 菌内源质粒的分离相当困难。首先因为难以破壁需要辅以特殊而昂贵的无色肽酶或蛋白酶 K。其次由于生长缓慢,常规条件下难以获得足够的菌丝体。一般地,一次制备性质粒 DNA 的分离通常需要 10~40L 培养物,工作量很大。再者,*Frankia* 质粒分离所采用的氯化铯-溴化乙锭差速离心法需要很贵重的试验设备。因此,快检法是研究 *Frankia* 质粒必不可少的手段。

Simonet 等检测 55 株赤杨 *Frankia* 分离菌株中发现有 5 株带有质粒<sup>[3]</sup>,随后他们又以另外 200 株赤杨分离菌株中检测到 8 株含有质粒<sup>[4]</sup>,认为只有少数 *Frankia* 携有质粒。我们在检测马桑分离菌株中也得到类似结果,21 株菌中发现 5 株带有质粒。当然从检出含质粒菌株的百分数来看,马桑菌株稍高些。

大多数 *Frankia* 菌的质粒都比较小。Simonet 等检测到质粒,分子量大小为 7~20kb 的约

占 50%;较大的质粒也只有 30~35kb 或 50~55kb;只有一例发现一大质粒约为 190kb<sup>[3]</sup>。我们检测的马桑菌株质粒大小为 13~20kb,与赤杨菌株的优势质粒类群(7~20kb)相接近。Simonet 等证实 *Frankia* 的小质粒不是因为大质粒缺失而衍生的<sup>[3,4]</sup>。这些小分子量的内源质粒对于发展 *Frankia* 的克隆及载体转化系统很有前途<sup>[8,9]</sup>,但是至今尚未有成功的报道。目前只有若干个质粒被分离出来,尚不知这些质粒的功能和本质,只有一例报道 *Frankia* 的一个 190kb 的大质粒具有异源 *nif* 基因同源片段,因而推测该质粒具有共生固氮有关的基因<sup>[10]</sup>。总之,*Frankia* 的质粒研究还有待进一步深入。然而,利用质粒来考察 *Frankia* 菌的多样性,并将同一来源的菌株划分成不同的群,这对于 *Frankia* 种的分类的探索提供有益的资料。

### 参 考 文 献

- [1] Normand P, Lalonde M. *Plant Soil*, 1986, 90:429~453.
- [2] Normand P, Simonet P, Butour J L. *J Bacteriol*, 1983, 155:32~35.
- [3] Simonet P, Capellano A, Navarro E, et al. *Can J Microbiol*, 1984, 30:1292~1295.
- [4] Simonet P, Normand P, Moiroud A et al. *Plant Soil*, 1985, 87:49~63.
- [5] Lechevalier M P, Baker D, Horriere F et al. *Can J Bot*, 1983, 61:2826~2833.
- [6] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, Cold Spring Harbor, New York.
- [7] Eckhardt T. *Plasmid*, 1978, 1: 584~588.
- [8] Simonet P, Normand P, Hirsch A M, Akkermans A D L. *The molecular biology of symbiotic nitrogen fixation*. CRS Press Inc, New York, 1990, 70~109.
- [9] Bensen D K, Silvester W B. *Microbiol Rev*, 1993, 57:293~319.
- [10] Simonet P, Bardin P, Haurat J, et al. *Mol Gen Genet*, 1986, 204:492~495.

## PLASMID DETECTION FOR PURE CULTURES OF NODULAR ENDOPHYTES OF *CORIARIA NEPALENSIS*

Hu Chuanjiong Zhou Pingzhen\* Zhou Qi

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070

\*Oil Crops Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

**Abstract** A rapid in-gel lysis method was used to detect the plasmids among twenty one *Frankia* strains from *Coriaria nepalensis* and four confirmed *Frankia* strains from other host plants belonging to four genera of actinorhizal trees. Five isolates were detected harbouring plasmids which ranged from 13 to 20 kb in size. Both the *Frankia* strain Hr18 and the isolate Cs466 showed two plasmids. They appeared to share the same plasmid pattern according to the size. Based on the number and size of the plasmids detected, twenty one *Coriaria* isolates were divided into four plasmid groups. The effect of bacterial growth and cell lysis conditions on plasmid detection was also explored.

**Key words** *Coriaria nepalensis*, *Frankia*, Plasmid