

根瘤菌多样性分析中的几种分子生物学方法

阎爱民 陈文新

(中国农业大学生物学院微生物系 100094 北京)

随着生物化学、分子遗传学和分子生物学技术的发展,一些全新的方法应用于根瘤菌分类。这些新的方法把根瘤菌分类提高到研究根瘤菌系统发育和遗传多样性的水平。研究根瘤菌系统发育行之有效的分子生物学技术除 DNA/DNA 杂交, DNA/rRNA 杂交和 16s rDNA 序列分析外^[1,2],近几年又有一些新技术广泛应用于根瘤菌遗传多样性的分析,这里介绍 RFLPs, RAPD^[3,4], REP-PCR 和 ERIC-PCR 等方法^[5,6]。

1 RFLPs 技术

RFLPs(Restriction Fragment Length Polymorphisms)意即限制性片段长度多态性。该方法首先由 Grodzicker 等用在 *adenoviruses* 温度敏感突变基因定位上,后又在构建人类遗传连锁图的可行性上进行了讨论。其理论依据和作法是,限制性内切酶识别双链 DNA 分子中的特定序列,并在特定位点将 DNA 切开。各种原因造成微小的碱基改变会引起限制性内切酶所识别的序列的改变,即消除和产生新的特定酶切位点;另外,大片段的缺失或转移都会造成某些酶切条带的改变。结果某一特定酶不会对两个个体的 DNA 分子总在相同的位点切开。将两个个体的 DNA 分子用酶分离后,即形成不同长度的 DNA 片段。当这些大小不等的片段通过凝胶电泳时就形成不同的带。用分子探针杂交并利用放射自显影在感光底片上成像,就会找出不同带的位置。所谓探针就是放射性标记的一段 DNA 序列。使用特殊的单拷贝的 DNA 探针,可检测到百万分之一的 DNA 片段^[7]。作为一种遗传标记,RFLPs 具有以下优点:① RFLPs 直接研究基因的组成,其变异比形态学变异更稳定,其表现不受环境条件的影响。② RFLPs 反映的是整个基因组的遗传信息,区分能力更强^[5]。在根瘤菌分类中,RFLPs 常用限制性内切酶酶切和多个特定 DNA 探针进行 Southern 杂交相结合的方法。Kaijalainen 等利用 RFLPs 技术分析了山羊豆根瘤菌菌株 (*R. galegae*) 的酶切片段多态性。他分别用 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind* III 三种内切酶酶切总 DNA,然后用 *nod*, *hem*, *gln*, *nifHDK*, *ntr*, *rec* 六种探针进行

Southern 杂交,杂交后进行放射自显影,比较三种内切酶的酶切条带与每个探针进行杂交的结果,发现 *nod* 和 *nifHDK* 把菌株按寄主植物进行了聚群,而 *hemA*, *glnA*, *ntr* 和 *recA* 的 RFLPs 结果则与 DNA-DNA 杂交的结果一致^[8]。Mozo 等用 RFLPs 标记揭示了能在冠岩状黄芩上结瘤的根瘤菌共生固氮基因的高度保守性,他们先检测了这类根瘤菌的质粒图谱,发现各菌株质粒及质粒大小差异甚大,进一步用 *R. meliloti* 的 *nifHDK* 和 *nodD* 作探针进行 RFLPs 分析,结果表明这类菌株虽然质粒组成变异较大,但它们的 *nif* 和 *nod* 基因序列和组成都是高度保守的^[9]。

2 RAPD 技术

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA),意即随机放大多态性 DNA 技术。此技术由美国杜邦公司的 Williams 于 1990 年首先推出,其原理是根据 DNA 聚合酶连续反应技术(PCR),由人工随机合成的 DNA 分子为引物,以基因组 DNA 为模板,通过基因放大器进行多态性 DNA 片段的随机合成。如果某一引物分子与某一片段的模板 DNA 具有互补的核酸顺序,该引物分子就会结合到单链的模板 DNA 上去。在具有 4 种游离脱氧核糖核苷三磷酸(dATP, dGTP, dTTP, dCTP)的情况下,通过 DNA 聚合酶连接, DNA 链就会从引物的 3'—OH 开始接上与模板 DNA 分子互补的各种核苷酸,合成一段新的互补 DNA 链。对整个基因组的 DNA 分子而言,某一引物可能会与单链 DNA 的许多地方结合。对扩增产物进行电泳,用溴化乙锭染色进行分析,就可以直接在紫外光线下看到新合成的 DNA 分子片段形成的带,这种随机放大的多态性 DNA 片段就可以作为分子图谱中的一个位点。应用于 RAPD 的引物合成是随机的,但需满足以下两个条件: G + C 的含量不低于 40%, 5' 与 3' 端的碱基顺序非反方向对称,否则就无法合成专一性的少数几条 DNA 片段。引物的长度以 10

国家自然科学基金资助课题

1996-10-21 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

个碱基为宜,引物太短(少于9个核苷酸长度)结合到模板DNA分子上有困难,聚合反应则很难进行,引物太长,成本提高,合成多态性DNA片段的可能性降低。和RFLPs相比,RAPD所需模板量少,操作快,且无须知道DNA序列的信息,而且获得基因图谱较迅速;标记密度也较大^[10,11],Harrison利用21个随机引物对三叶草根瘤菌的DNA进行了扩增,得到的扩增产物电泳图谱能有效地进行菌株的区分,他们发现引物的有效性取决于其长度和GC含量,并且他们还从培养的细胞或根瘤组织中直接扩增出了有意义的谱带^[12]。

Diman van Rossum利用4个引物分析了9株慢生的豌豆根瘤菌和2株慢生大豆根瘤菌的RAPD,发现RAPD得出的遗传差异大于由16s rDNA序列分析得出的差异,他用16s rDNA序列,把这群菌分成A、B两群,A群的RAPD结果支持16s rDNA分析的结果,但B群的RAPD出现了差异,他认为RAPD的信息量大于16s rDNA序列分析所反映的信息量。因此,他认为16s rDNA分析应和RAPD结合起来做比较好。目前,RAPD已不限于用单引物来扩增,双引物的RAPD技术比单引物RAPD具有扩增次数少,重复性好的优点,已在根瘤菌分类中得到应用。

3 REP-PCR和ERIC-PCR技术

众所周知,与真核生物相比,原核生物的基因组较为简单,一般只有一个环状双链的染色体,其大小不超过 10^7 bp,如此小的基因组,要保证原核生物的生长繁殖及一切功能,其非编码区的重复序列必须维持最低值。在细菌的基因组中,DNA序列多以单拷贝的形式存在,但这并不意味着原核生物基因组中没有多拷贝基因,例如:rRNA基因,tRNA基因和插入因子Is等,它们对于原核生物维持快速而大量基因表达和对基因表达进行精细的调节有着重要作用。近年来的研究表明:原核生物基因组中还存在一类短的重复序列,它们与上述的rRNA基因等多拷贝序列不同,大小不超过200bp,反向重复,可以转录成RNA但不编码蛋白。这类短重复序列一般是位于基因间区域,广泛分布在原核生物特别是细菌的基因组中,已报道的重复序列有REP序列,ERIC序列,Ng-rep序列,Repmpl,SDCI序列和STRR序列。应用于根瘤菌分类的主要是REP和ERIC序列。

REP(Repetitive Extragenic Palindrome 基因外重复的结构),最早由Gilson在*E. coli*及Higgins在*Salmonella typhimurium*中发现的,是一段长38bp的反向重复序列,它能组成一个稳定的茎环结构,存在于基因组中,并在序列中的特定区域形成一个5bp可变环。在此序列的对称臂上,如果一侧臂的某一碱基发生变化,则

在其另一臂上也会相应的发生变化。REP序列也存在于*Rhizobium* spp.中。ERIC(Enterobacterial repetitive intergeneric Consensus,肠杆菌基因间的重复一致序列)是一段长为126bp的反向重复序列。与REP序列相似,也定位于基因组内可转录的非编码区域或与转录有关的区域。Hufton比较了7株*E. coli*及7株*Salmonella typhimurium*中的ERIC序列后,发现ERIC序列在基因组内的不同位点或在种内菌株间,甚至种间都具有高度的保守性。Bruijn用REP-PCR和ERIC-PCR作了*Rh. meliloti*基因的指纹图谱,他以*Rh. meliloti*的染色体DNA为模板。以REP和ERIC特异的引物进行PCR扩增,对REP和ERIC的PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,用溴化乙锭染色,他发现ERIC序列在*R. meliloti*中分布比REP序列更广泛。他认为REP-PCR和ERIC-PCR能反映细菌同一属和同一种内菌株之间的微小差异。Judd等运用REP和ERIC-PCR标记对慢生型大豆根瘤菌血清簇123的菌株进行区分,发现血清群123的菌株REP和ERIC-PCR谱带高度相似,血清群127菌株的谱带表现出较大的差异,血清群129菌株的谱带可分为两个不同的类型。根据REP和ERIC-PCR标记对血清簇123菌株进行的系统发育分类与RFLPs标记的结果吻合^[13]。和其他方法相比,REP-PCR和ERIC-PCR具有以下优点:①实验无需属、种和菌株专一性的探针,只须有一套引物就可进行相近菌株甚至相差较大的菌株之间的分析;②通过不同引物的组合可以简化REP-PCR和ERIC-PCR分析,从而获得同种和不同种甚至不同属的菌株的差异信息;③无需进行Southern杂交。REP-PCR和ERIC-PCR的扩增产物可直接用于电泳分析;④REP-PCR和ERIC-PCR只需少量悬浮于PCR缓冲液中的细胞就可进行。所以REP-PCR和ERIC-PCR有可能无需获得细菌的纯培养和无需提取DNA就可进行分析^[14]。

4 其他用于根瘤菌遗传多样性研究的技术

有人在*R. tropici*中发现了巨型质粒的存在(>1000kb),在*R. meliloti*, *R. fredii*, *R. galegae*中也发现了此巨型质粒的存在,在*R. tropici*中发现巨型质粒结构保守,不易转移,利用巨型质粒对*R. tropici*的两个亚群A、B进行分类,发现巨型质粒是亚型专一性的。而且这一结果和DNA-DNA杂交(同源性只有36%)一致,Martinez已经建议定义这两个亚群为亚种,甚至不同的种。巨型质粒被认为是*Rhizobium*基因成员中的小染色体,考虑到其DNA含量高和其稳定性,巨型质粒对细菌基因特征群的作用不容忽视。另外AFLP技术,

16s~23s rDNA 基因间扩增片段的 RFLPs 及序列分析, tRNA-PCR 技术在根瘤菌分类中也有应用^[6]。

根瘤菌的基因组约在 10^6 bp 左右, 利用 RFLP、RAPD、REP-PCR 和 ERIC-PCR 等方法都是反映的整个基因组的差异信息, 而且这些方法和 16SrDNA 全序列分析相比, 具有信息量大以及适合于大量菌株之间进行比较的特点, 所以较适合于菌株之间和种以下水平的多样性分析。16SrDNA 约 1.5kb 左右, 且其序列担当保守。对大量菌株进行测序是不太可能的, 因此, 16SrDNA 序列分析更适合于亲缘关系较远的种群之间的比较。Vandamme 等认为 16SrDNA 序列分析较适合于种、属之间甚至科水平的比较^[15]。Gisèle Laguerre 等认为 16SrDNA 序列分析不适合于种内菌株间的区分^[16]。在根瘤菌分类中, 16SrDNA 全序列分析已被认为是确定新属的一个必要标准。研究根瘤菌的多样性应该尽可能地反映研究个体间的差异信息, 而且所用方法应适合于大量菌株差异的比较, 因此, 从这两方面考虑, RELP、RAPD、REP-PCR 和 ERIC-PCR 更适合于根瘤菌多样性的研究。

参 考 文 献

[1] Gary Stacey, Robert H B, Harold J E. Biological Nitrogen Fixation, Vol 1, Chapman & Hall Inc., New York, 1992, 43~86.

[2] Woese C R. Microbiol Rev, 1987, 98(51):221~271.
 [3] Elkan G H. Can. J. Microbiol, 1992, 38:446~450.
 [4] Martínez E. Plant and Soil, 1994, 161:11~20.
 [5] 盛祖嘉, 陈永青编著. 微生物遗传学综述文集, 上海: 科技出版社, 1993, 110~115.
 [6] 覃筱婷, 万钧, Whitty P 等. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 135~140.
 [7] 周洪生. 作物杂志, 1992, (4): 7~9.
 [8] Kajjalainen S. J of Bacteriology, 1989, 171(10): 5561~5566.
 [9] Mozo T, Cabrera E, Ruiz-Argueso T. Appl Environ Microbiol, 1988, 5(5):1262~1267.
 [10] 卢江. 植物学报, 1993, 35(增刊): 119~127.
 [11] Grajal-Martin M J, Simon C J, Muehlbauer F J. Molecular Plant Pathology, 1993, 83(6):612~614.
 [12] Harrison S P, Mgiton L R, SKt L et al. Can J Microbiol, 1992, 38:1009~1015.
 [13] Judd A K, Schreider M, Sadowsky M J, De Bruijn F J. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(6):1702~1708.
 [14] De Bruijn R J. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(7):2180~2187.
 [15] Vandamme P, Pot B, Gillis M et al. Microbiological Review, 1996, 60(2):407~438.
 [16] Gisèle laguerre, Patrick Mavingue, Marie-Reine Auaro et al. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6):2029~2036.